

宮古ビデンスピローサ  
(*Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF) の  
抗炎症・抗アレルギー効果

堀内 正子

## 目次

ページ

略語一覧 .....	1
序論 .....	2
第1章 ケミカルメディエーター (histamine、substance P) と受動的皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応による血管透過性亢進反応に対する MMBP と eMMBP の抑制効果	
1-1 緒言 .....	4
1-2 実験材料および方法 .....	5
1-2-1 使用動物 .....	5
1-2-2 使用試薬 .....	5
1-2-3 ケミカルメディエーター (histamine、substance P) による血管透過性亢進反応の 測定法 .....	5
1-2-4 DNP-ascaris 抗原誘発 PCA 反応による血管透過性亢進反応の測定法 .....	6
1-2-5 統計処理 .....	6
1-3 結果 .....	7
1-3-1 ケミカルメディエーター (histamine、substance P) による血管透過性亢進反応に 対する MMBP と eMMBP の抑制効果 .....	7
1-3-2 DNP-ascaris 抗原誘発 PCA 反応による血管透過性亢進反応に対する MMBP と eMMBP の抑制効果 .....	12
1-4 考察 .....	15

## 第2章 実験的鼻アレルギーに対する MMBP と eMMBP の抑制効果

2-1 緒言 .....	18
2-2 実験材料および方法 .....	18
2-2-1 使用動物 .....	18
2-2-2 使用試薬 .....	19
2-2-3 Histamine 誘発鼻こすり行動の観察 .....	19
2-2-4 TDI 誘発鼻アレルギーにおけるくしゃみ回数と鼻汁量の測定 .....	19
2-2-5 Ovalbumin (OVA) 感作アレルギー性鼻炎モデルにおける血管透過性亢進反応の測定 .....	20
2-2-6 統計処理 .....	21
2-3 結果 .....	21
2-3-1 Histamine 誘発鼻こすり行動に対する MMBP と eMMBP の抑制効果 .....	21
2-3-2 TDI 誘発鼻アレルギーに対する MMBP と eMMBP の抑制効果 .....	24
2-3-3 OVA 感作アレルギー性鼻炎モデルに対する MMBP と eMMBP の抑制効果 .....	29
2-4 考察 .....	32

## 第3章 DNP-ascaris 抗原感作マウスの IgE 抗体産生促進に対する MMBP と eMMBP の抑制効果

3-1 緒言 .....	34
3-2 実験材料及び方法 .....	34
3-2-1 使用動物 .....	34
3-2-2 使用試薬 .....	34
3-2-3 DNP-ascaris 抗原感作マウスの経日的な IgE 値の測定 .....	35

3-2-4 DNP-ascaris 抗原感作マウスの IgE 抗体産生促進に対する MMBP と eMMBP の抑制効果.....	35
3-2-5 統計処理.....	35
<b>3-3 結果.....</b>	<b>36</b>
3-3-1 DNP-ascaris 抗原感作マウスの IgE 抗体産生における経日的変化.....	36
3-3-2 DNP-ascaris 抗原感作マウスの IgE 抗体産生促進に対する MMBP と eMMBP の抑制効果.....	38
<b>3-4 考察.....</b>	<b>41</b>
 <b>第 4 章 肥満細胞からの histamine 遊離反応に対する MMBP と eMMBP の抑制効果</b>	
<b>4-1 緒言.....</b>	<b>44</b>
<b>4-2 実験材料および方法.....</b>	<b>45</b>
4-2-1 使用動物.....	45
4-2-2 使用試薬.....	45
4-2-3 MMBP の熱水抽出物 (HWex) と eMMBP の調製.....	45
4-2-4 Compound 48/80 誘発 histamine 遊離率の測定.....	46
4-2-5 DNP-ascaris 抗原誘発 histamine 遊離率の測定.....	46
4-2-6 HPLC による HWex と eMMBP の成分の測定.....	47
4-2-7 HWex の MMBP からの収率.....	47
4-2-8 統計処理.....	48
<b>4-3 結果.....</b>	<b>48</b>
4-3-1 肥満細胞からの Compound 48/80 誘発 histamine 遊離反応に対する eMMBP と HWex の	

抑制効果 .....	48
4-3-2 肥満細胞からの DNP-ascaris 抗原誘発 histamine 遊離反応に対する eMMBP と HWex の抑制効果 .....	48
4-3-3 HPLC による eMMBP と HWex の成分の比較 .....	49
4-3-4 HWex の MMBP からの収率 .....	49
<b>4-4 考察 .....</b>	<b>53</b>
<b>総括 .....</b>	<b>55</b>
<b>謝辞 .....</b>	<b>58</b>
<b>掲載論文目録 .....</b>	<b>59</b>
<b>引用文献 .....</b>	<b>60</b>

## 略語一覧

本論文では以下の略語を用いた。

CMC-Na	Sodium carboxymethylcellulose
DNP-ascaris	2,4-dinitrophenylated ascaris
EB	Evans blue
eMMBP	Enzyme-treated MMBP
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
HWex	Hot water extract of MMBP
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
MMBP	Musashino Miyako Bidens Pilosa
PCA	Passive cutaneous anaphylaxis
PSB	Pontamine sky blue
TDI	Toluen-2, 4-diisocyanate
Th1	T helper 1 cell
Th2	T helper 2 cell
$\epsilon$ GT	$\epsilon$ germ line transcripts

## 序論

ビデンスピローサ (*Bidens pilosa*) 種で最も変種の多いコセンダングサ (*Bidens pilosa* L.) は、アフリカ、北アメリカ、中央アメリカ、南アメリカ、中国、日本に広く存在する草本植物で、糖尿病、炎症、肝炎などの伝承薬物として、また防腐剤として用いられている。コセンダングサの変種のひとつであるタチアワユキセンダングサ (*Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF) は、原産地であるアメリカから沖縄県の島々に広められた。ビデンスピローサ (*Bidens pilosa*) は、ステロール、炭化水素、カテコール、フラボノイド、フェニルプロパノイド、ポリアセチレンなどを含有することが知られている。また、ビデンスピローサはビタミン E の供給源として評価され<sup>1)</sup>、胃潰瘍の抑制効果が報告されている<sup>2)</sup>。武蔵野免疫研究所は、タチアワユキセンダングサを宮古島のサンゴ土壌にて緑肥のみで独自の手法により栽培し、宮古ビデンスピローサと呼び、その地上茎葉を蒸す、練る、揉む、乾燥などの加工を施した原末を武蔵野宮古ビデンスピローサ (Musashino Miyako Bidens Pilosa : MMBP) と称した。MMBP は、性状、細菌数、ミネラル分、毒性試験など多項目にわたって条件が規定されている。近年 MMBP は血液循環障害が原因で発症する夏季潰瘍 (Livedo reticularis with summer ulceration) の再発予防効果を有することが臨床的に報告された<sup>3)</sup>。また、すでに当教室は MMBP の成分と抗酸化活性との関連性を報告した<sup>4)</sup>。当初 MMBP は熱水で抽出されたお茶 (かんぼう茶®) として飲用されてきた。後に MMBP は、煎じ薬としての抽出効率をより高めるためにセルロシン®を用いた酵素処理の改良が加えられ、現在健康食品用の錠剤として市販されている。それを本研究では eMMBP (enzyme-treated MMBP) と称した。

一方、我が国ではアレルギー疾患、およびその背景となるアレルギー体質保有者が増えている<sup>5)</sup>。とくに若い世代において顕著であり、20 歳代の男子では

8割以上がダニあるいはスギに感作されており、アレルギー体質の保有者といわれる。また、アレルギー体質保有者のうち半数以上が投薬を必要とするアレルギー疾患を発症している。ここでいうアレルギーとはI型アレルギー、すなわちIgE抗体が肥満細胞や好塩基球に結合し、これらの細胞の脱顆粒を促し、ケミカルメディエーターの遊離を引き起こす病態をさしている。アレルギーの治療には histamine  $H_1$  拮抗薬（抗ヒスタミン薬）をはじめ、ケミカルメディエーター遊離抑制薬、トロンボキサン  $A_2$  阻害・拮抗薬、ロイコトリエン拮抗薬、Th2 サイトカイン阻害薬など、もしくは漢方薬や生薬が用いられている。さらにアレルギー反応を予防あるいは軽減させる食品成分が報告され、また代表的アレルギー疾患の一つである花粉症を緩和するサプリメントも多数市販されている<sup>6,7)</sup>。なかでも乳酸菌、シソエキス、バラポリフェノール、甜茶エキス、ラカンカ、ペパーミント等は肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用やIgE産生抑制作用を有することが明らかにされ注目されている<sup>8-11)</sup>。

すでにコセンダングサは炎症に対する有効性が伝承されているため、MMBPとeMMBPにも同様な有効性が推測されるが、それらの抗炎症効果や抗アレルギー効果を裏付ける基礎的な検討が不十分である。そのため本研究では、動物の炎症やI型アレルギーモデルを用いてMMBPとeMMBPの抗炎症効果および抗アレルギー効果を明らかにすると共に、それらの作用機序の一部を明らかにした。またそれらの含有成分の差異より、抗アレルギー作用に関与する有効成分を推定した。



## 第1章 ケミカルメディエーター (histamine、substance P) と

### 受動的皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応による

### 血管透過性亢進反応に対する MMBP と eMMBP の抑制効果

#### 1-1 緒言

MMBP は宮古島における栽培植物であり、かんぼう茶<sup>®</sup>として服用すると夏季潰瘍の再発予防効果のあることが臨床的に報告されている<sup>3)</sup>。夏季潰瘍は動脈性の循環障害で、動脈の閉塞をとまなうことが多く、春から夏にかけて下腿から足部に疼痛の強い難治性の壊死性潰瘍を形成するのを特徴とする原因不明の病態である。夏季潰瘍の治療には末梢血管拡張剤や交感神経ブロック、副腎皮質ホルモンなどが有効であるといわれているが、いずれもその抑制効果は一時的なことが多く、現在のところ有効な治療法がない。そのような現状から治療よりも予防対策や悪化防止に重点を置くことが効果的であると考えられ、MMBP を主成分とするかんぼう茶<sup>®</sup>による夏季潰瘍の再発予防効果が検討されて、近年臨床的にその有効性が示された。一方、MMBP の原種である *Bidens pilosa* L. は胃潰瘍に効果が示すとの報告もあることから<sup>2)</sup>、MMBP は急性皮膚炎やアレルギーにおいても抑制効果を示す可能性が考えられた。従来、夏季潰瘍に対する MMBP の服用は、かんぼう茶<sup>®</sup>として熱水抽出液をお茶のように飲用していた。そのため外出先では服用しにくい欠点を持っていたが、後に改良され錠剤化された eMMBP はインスタント型として利便性が高まった。

本章では、炎症のケミカルメディエーターである histamine と substance P 及び PCA 反応による血管透過性亢進反応に対する MMBP と eMMBP の作用について比較検討した。

## 1-2 実験材料および方法

### 1-2-1 使用動物

Wistar/ST 系ラット (200 g) を日本 SLC (Shizuoka, Japan) 株式会社より購入し、一定期間予備飼育を行った後実験に使用した。また、動物は室温  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55 \pm 5\%$  の動物室で飼育し、固型飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社、Tokyo, Japan) と水は自由摂取させた。なお、動物の取扱は「星薬科大学動物実験指針」に基づいて行った。

### 1-2-2 使用試薬

実験に用いた MMBP および eMMBP は武蔵野免疫学研究所 (東京都新宿区新宿 1-14-5) より供与され、 $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。eMMBP は MMBP の抽出に際してセルロシン® (HBI Inc., hyogo, Japan) を加えて組織を軟化させ抽出したエキス末である。Histamine、substance P、ketotifen は Sigma 社 (St. Louis, MO, U. S. A.) より、DNP-ascaris 抗原および抗 DNP-ascaris 抗体は Cosmo Bio. LSL 社 (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入し使用した。

### 1-2-3 ケミカルメディエーター (histamine、substance P) による血管透過性亢進反応の測定法

藤井ら<sup>12)</sup>の方法を参照し、7 週齢の Wistar/ST 系雄性ラットの背部を剃毛し、histamine (10 nmol/site) あるいは substance P (1 nmol/site) をそれぞれ皮内投与し、その直後に青色色素 (pontamine sky blue : PSB) を尾静脈投与した。1 時間後、histamine あるいは substance P 投与部位の背部皮下に漏出した PSB を含む約  $2\text{ cm}^2$  の皮膚を切除し、この皮膚切片を細切して 1 M の KOH 溶液 1 mL を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 24 時間インキュベートすることにより皮膚切片を溶解させた。皮膚切片溶解溶液に 0.2 M リン酸 : acetone (5 : 13) 溶

液 2 mL を加えて PSB を抽出し遠心分離後上清を 590 nm で比色定量した<sup>13)</sup>。  
MMBP (100、250、500 mg/kg)、eMMBP (100、250、500 mg/kg) なら  
びに陽性対照薬の ketotifen (5 mg/kg) は 0.25% CMC-Na に懸濁してケミカ  
ルメディエーターおよび PSB の投与 1 時間前に経口投与した。

#### 1-2-4 DNP-ascaris 抗原誘発 PCA 反応による血管透過性亢進反応の測定法

7 週齢の Wistar/ST 系雄性ラットの背部を剃毛し、抗 DNP-ascaris 抗体 0.1 mL を皮内投与して、48 時間後に 0.5% 青色色素 (Evans blue : EB) と DNP-ascaris 抗原 (1 mg) の混液 1 mL を尾静脈より投与した。30 分後投与部位の背部皮下に漏出した EB を含む皮膚を切除し、この皮膚切片を細切して 1 M の KOH 溶液 1 mL を加え、37°C で 24 時間インキュベートすることにより皮膚切片を溶解させた。皮膚切片溶解溶液に 0.2 M リン酸 : acetone (5 : 13) 溶液 2 mL を加えて EB を抽出し遠心分離後上清を 620 nm で比色定量した<sup>14,15)</sup>。  
MMBP および eMMBP (100、250、500 mg/kg) は、抗 DNP-ascaris 抗体投与の 10 日前より粉末飼料に混合しラットに給餌した。陽性対照薬である ketotifen (5 mg/kg) は 0.25% CMC-Na に懸濁し、DNP-ascaris 抗原と EB を投与する 1 時間前に経口投与した。

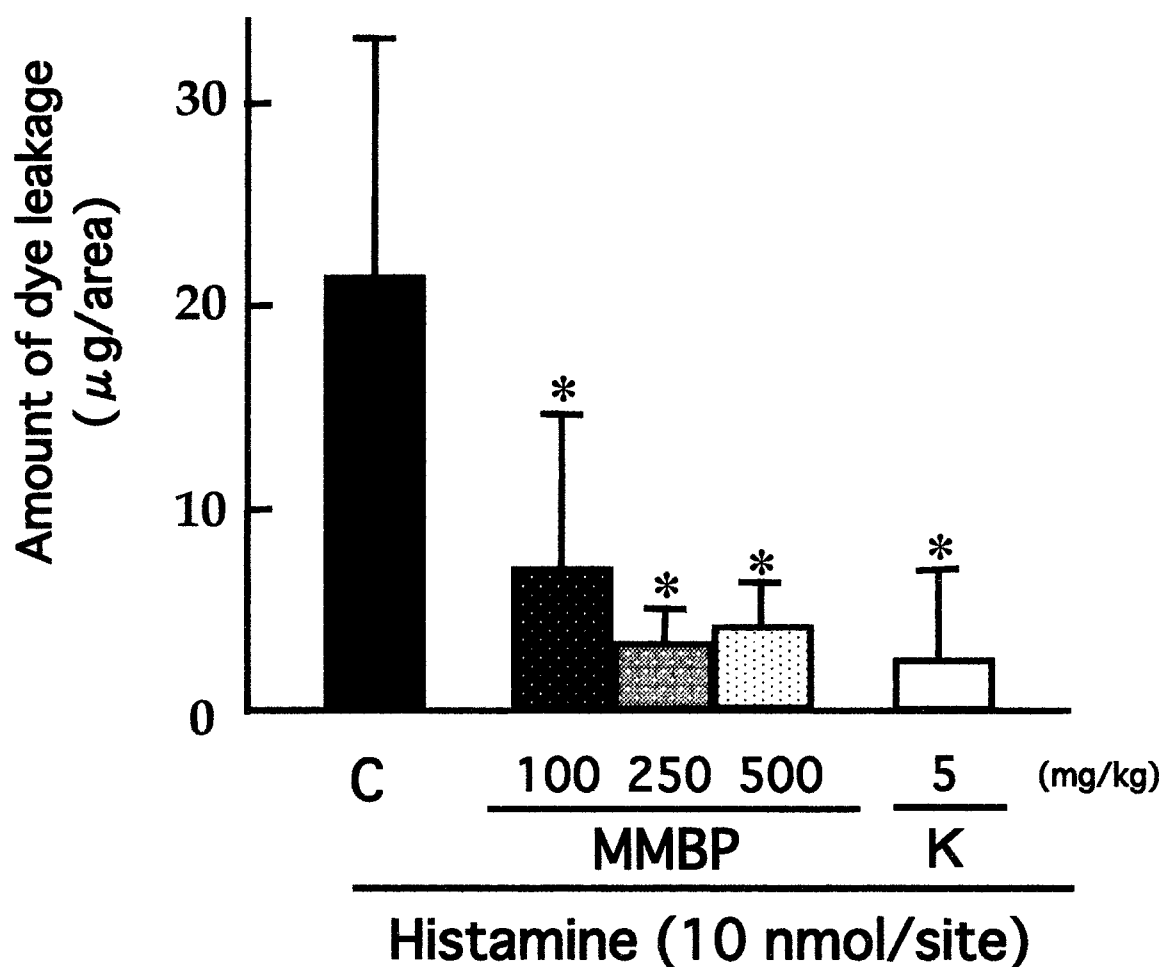
#### 1-2-5 統計処理

結果は全て平均 ± 標準偏差 (Mean ± SD) で示した。有意差検定には Dunnett's two-tailed test を用い、 $P < 0.05$  のとき、有意差ありと判定した。

## 1-3 結果

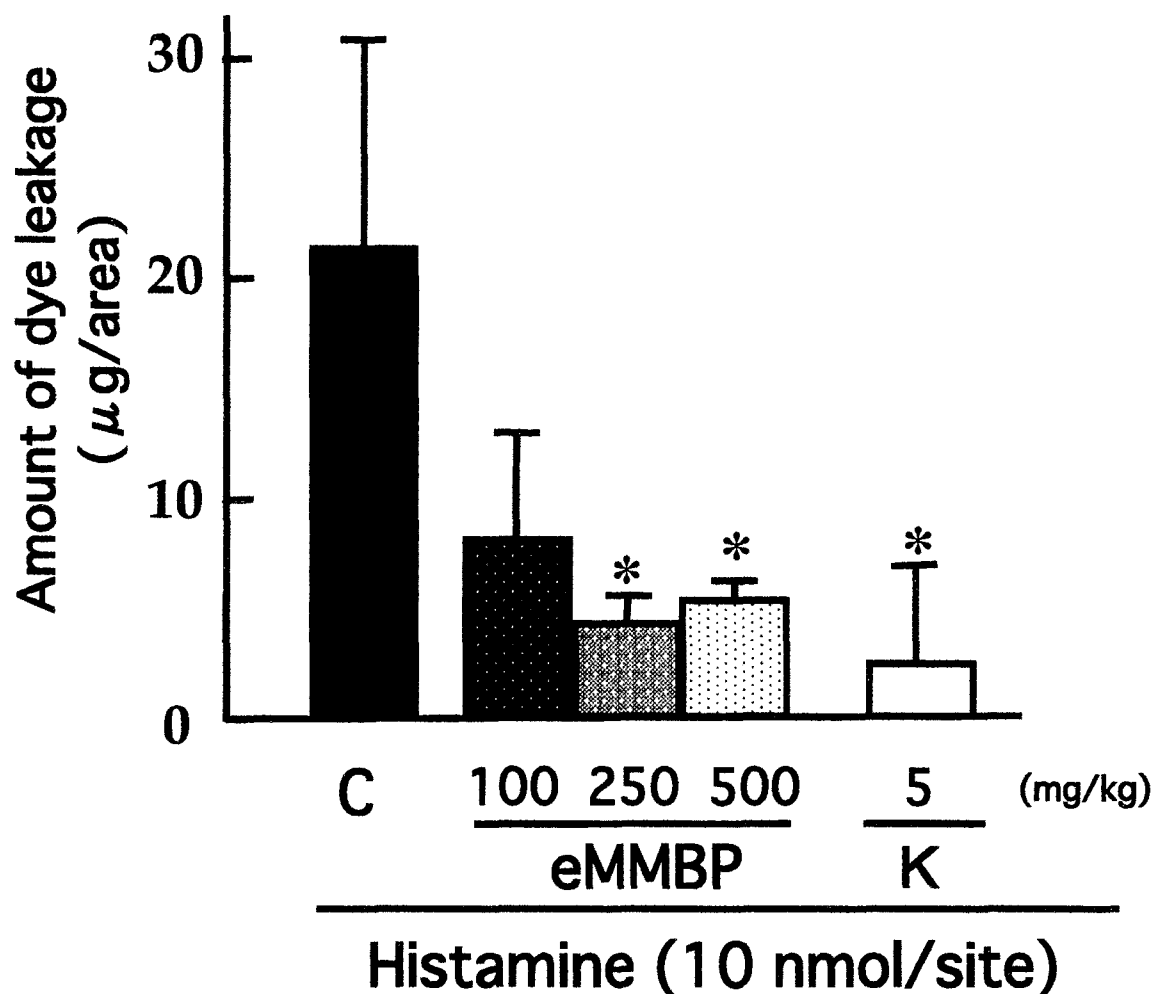
### 1-3-1 ケミカルメディエーター (histamine、substance P) による血管透過性亢進反応に対する MMBP と eMMBP の抑制効果

MMBP と eMMBP はともに 100～500 mg/kg の用量範囲において、用量依存的に histamine 誘発の血管透過性亢進による PSB 漏出量増加を抑制し、MMBP では 100、250 および 500 mg/kg の投与で、eMMBP では 250 および 500 mg/kg の投与で対照と比較して有意な抑制が認められた (Fig. 1-1、Fig. 1-2)。またそれらの抑制作用は陽性対照薬である ketotifen (5 mg/kg) の投与による抑制効果とほぼ同程度であった。さらに MMBP は 250 および 500mg/kg、eMMBP は 100～500 mg/kg の用量範囲において、用量依存的に substance P 誘発血管透過性亢進による PSB 漏出量増加を抑制し、MMBP では 250 および 500 mg/kg の投与で、eMMBP では 500 mg/kg の投与で対照と比較して有意な抑制が認められた (Fig. 1-3、Fig. 1-4)。なお、陽性対照薬として用いた ketotifen のケミカルメディエーターによる血管透過性亢進反応に対する抑制作用を確認した。



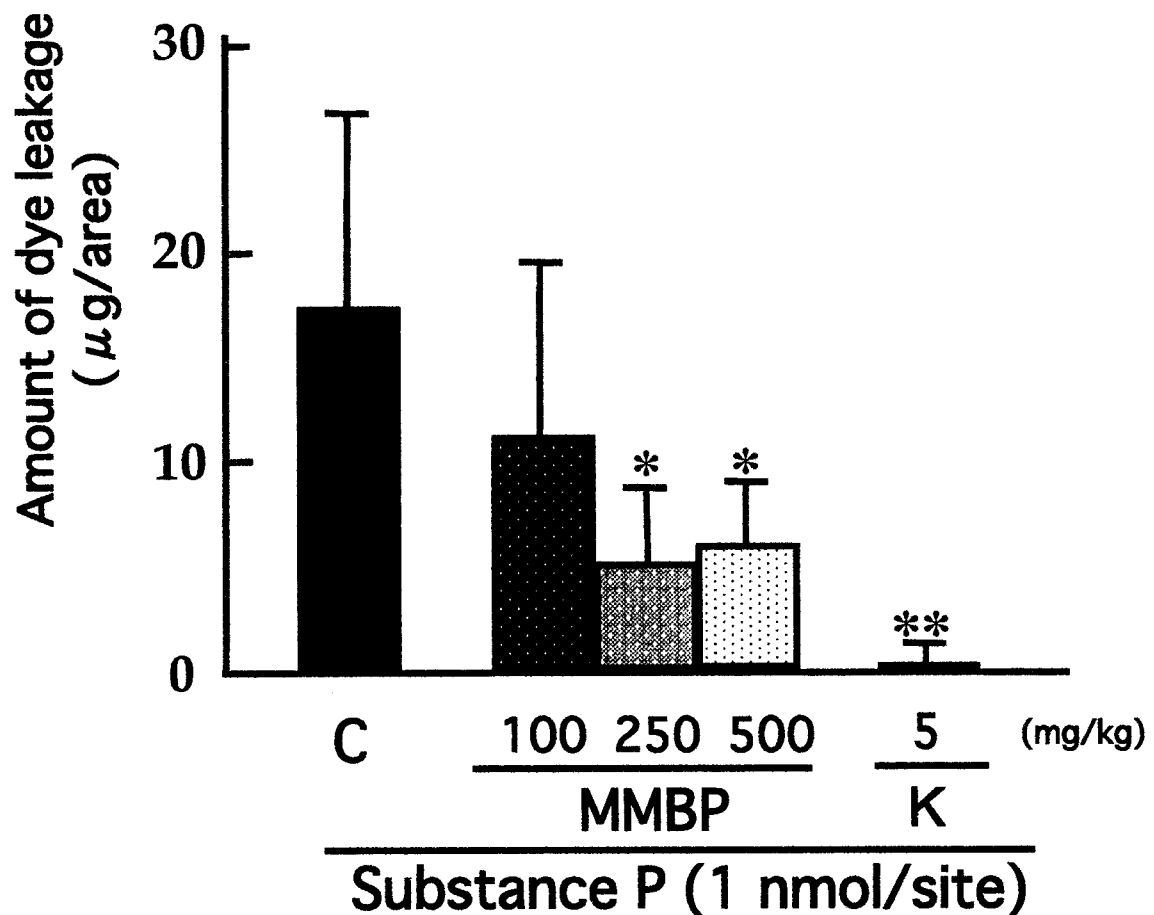
**Fig.1-1 Effect of MMBP on dye leakage induced by histamine (10 nmol)**

C: Control group, 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1 hr before injection of histamine and dye; MMBP group: the suspension of MMBP (100, 250, 500 mg/kg) in 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1 hr before injection of histamine and dye; K: ketotifen group, ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1 hr before injection of histamine and dye. Each value represents mean  $\pm$  SD of 6-10 rats. \* $p < 0.05$ , significantly different from control group.

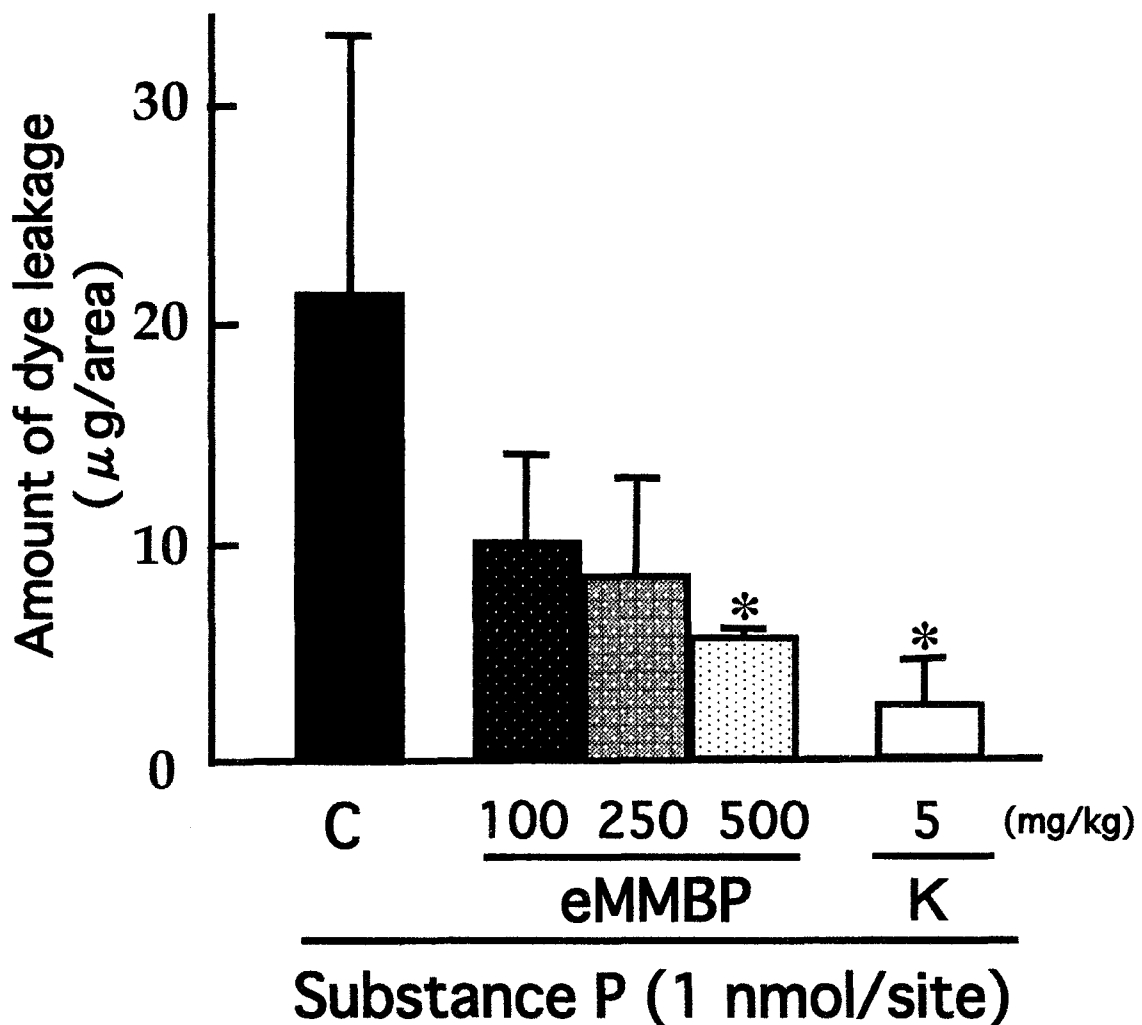


**Fig.1-2 Effect of eMMBP on dye leakage induced by histamine (10 nmol)**

C: Control group, 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1 hr before injection of histamine and dye; eMMBP group: the suspension eMMBP (100, 250, 500 mg/kg) in 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1 hr before injection of histamine and dye; K: ketotifen group, ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1 hr before injection of histamine and dye. Each value represents mean  $\pm$  SD of 6-10 rats. \* $p < 0.05$ , significantly different from control group.



**Fig. 1-3. Effect of MMBP on dye leakage induced by substance P (1 nmol)**  
 C: Control group, 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1 hr before injection of substance P and dye; MMBP group: the suspension of MMBP (100, 250, 500 mg/kg) in 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1 hr before injection of substance P and dye; K: ketotifen group, ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1 hr before injection of substance P and dye. Each value represents mean  $\pm$  SD of 6-10 rats. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , significantly different from control group.



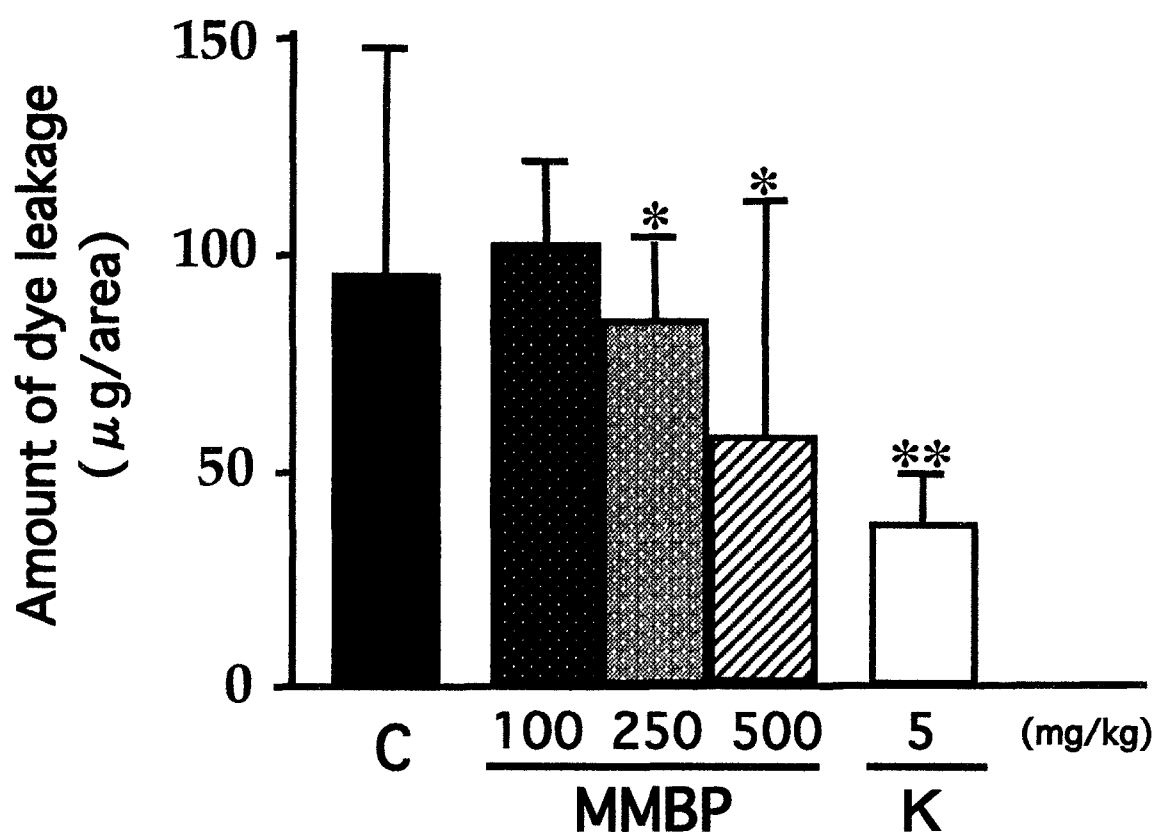
**Fig. 1-4. Effect of eMMBP on dye leakage induced by substance P (1 nmol)**

C: Control group, 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1 hr before injection of substance P and dye; eMMBP group: the suspension of eMMBP (100, 250, 500 mg/kg) in 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1 hr before injection of substance P and dye; K: ketotifen group, ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1 hr before injection of substance P and dye. Each value represents mean  $\pm$  SD of 6-10 rats. \*  $p < 0.05$ , significantly different from control group.



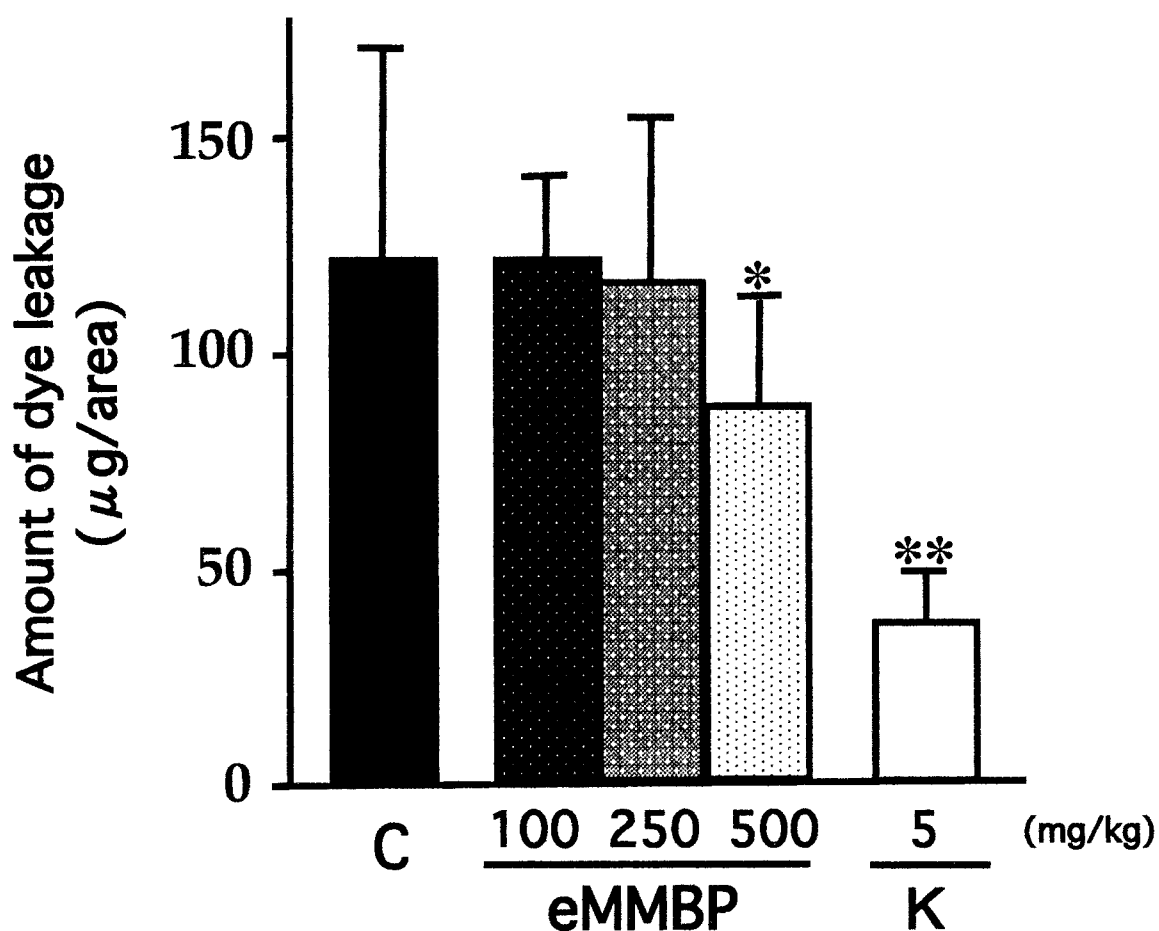
### 1-3-2 DNP-ascaris 抗原誘発 PCA 反応による血管透過性亢進反応に対する MMBP と eMMBP の抑制効果

MMBP と eMMBP はともに 100～500 mg/kg の用量範囲において用量依存的に、DNP-ascaris 抗原誘発 PCA 反応による血管透過性亢進反応に伴う EB 漏出量増加を抑制し、MMBP では 250 および 500 mg/kg の投与で、eMMBP は 500 mg/kg の投与で対照と比較して有意な抑制が認められた (Fig. 1-5、Fig. 1-6)。なお、陽性対照薬として用いた ketotifen (5 mg/kg) 投与の、DNP-ascaris 抗原誘発 PCA 反応に対する抑制作用を確認した。



**Fig. 1-5 Effect of MMBP on dye leakage induced by DNP-ascaris antigen (1 mg/ mL)**

C: control group, 0.25%CMC-Na was administered p.o. 1 hr before injection of antigen plus dye; MMBP group: the suspension of MMBP (100, 250, 500 mg/kg) in 0.25% CMC-Na was given with the diet for 10 days; K: ketotifen group, ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1 h before injection of antigen plus dye; Each value represents mean  $\pm$  SD of 6-8 rats. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , significantly different from control group



**Fig. 1-6 Effect of eMMBP on dye leakage induced by DNP-ascaris antigen (1 mg/ mL)**

C: control group, 0.25%CMC-Na was administered p.o. 1 hr before injection of antigen plus dye; eMMBP group: the suspension of eMMBP (100, 250, 500 mg/kg) in 0.25% CMC-Na was given with the diet for 10 days; K: ketotifen group, ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1 h before injection of antigen plus dye; Each value represents mean  $\pm$  SD of 6-8 rats. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , significantly different from control group

#### 1-4 考察

食品アレルギーやアトピー性皮膚炎は主に I 型アレルギーに属し、これらの反応は皮膚に存在する肥満細胞の脱顆粒にともない遊離した histamine をはじめとするケミカルメディエーターによって引き起こされる。アレルギー性の皮膚炎症に対する MMBP の抑制効果を検討するために、本章では、炎症性ケミカルメディエーターである histamine および substance P による血管透過性亢進反応、あるいは PCA 反応による血管透過性亢進反応のそれぞれに対する MMBP もしくは eMMBP の抑制効果について検討した。MMBP と eMMBP は histamine および substance P 誘発血管透過性亢進により皮下へ漏出した色素量増加をともに抑制し、それらの抑制効果はほぼ同程度であった。一般に、炎症刺激で肥満細胞から放出された histamine は、血管内皮細胞のレセプターに結合しアクチンの重合にともなう内皮細胞の収縮をおこす。その結果、血管内皮細胞間隙が拡大し、血管透過性が亢進する。このことから血管透過性亢進反応に対する MMBP と eMMBP の抑制作用は、それらが血管内皮細胞に直接なんらかの影響を及ぼしたか、もしくは主に血管内皮細胞に存在する histamine  $H_1$  受容体を介した作用が考えられる。生薬ではニンジンや白鮮皮が Compound 48/80、histamine あるいは serotonin で誘導した血管透過性亢進反応に対して抑制することが報告されており MMBP の作用と類似している<sup>16,17)</sup>。一方、Substance P は肥満細胞の脱顆粒を誘導し<sup>18,19)</sup>、substance P を含む神経ペプチドの受容体が肥満細胞に存在することが報告され、substance P と肥満細胞の相互作用が知られている<sup>20)</sup>。本実験において MMBP と eMMBP は substance P による血管透過性亢進反応を抑制した。これらの抑制作用は、substance P の作用を直接抑制したか、もしくは substance P が影響を及ぼした histamine の反応を二次的に抑制したものと考えられる。また、MMBP は histamine 以外にも serotonin 誘発血管透過性亢進反応も抑制

した (data not shown)。Histamine、serotonin あるいは substance P 誘発の血管透過性亢進反応はシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害薬のインドメタシンで抑制されることが報告されているため<sup>12)</sup>、MMBP と eMMBP の COX への関与も推察される<sup>1)</sup>。一方、MMBP あるいは eMMBP の 10 日間連続投与と 1 時間前の単回投与を比較すると、それらのケミカルメディエーターによる血管透過性亢進反応に対する抑制効果はほぼ同程度であった (data not shown)。したがって血管透過性亢進反応の本炎症モデルにおいては、MMBP あるいは eMMBP の投与は、ケミカルメディエーター投与の 1 時間前でも十分効果を示すと考えられる。DNP-ascaris 抗原により誘発された PCA 反応に対しては、MMBP あるいは eMMBP を DNP-ascaris 抗原を投与する 1 時間前に単回投与しても、有意な抑制には至らなかったが (data not shown)、MMBP あるいは eMMBP を 10 日前から連続投与すると、MMBP では 250 および 500 mg/kg において、また eMMBP では 500 mg/kg において、PCA 反応にともなう血管透過性亢進による PSB 漏出を有意に抑制させた。これより、MMBP と eMMBP は、予備的な反復投与により抗アレルギー効果を示すことが推察された。なお、MMBP と eMMBP の抗アレルギー効果はほぼ同程度であった。

漢方方剤では十味敗毒湯、柴胡清肝湯など、生薬では延胡索、厚朴、細辛、大棗、中国人参、中国柴胡なども、PCA 反応を抑制する抗アレルギー作用が報告されている<sup>21-24)</sup>。これらの漢方方剤や生薬の抗アレルギー作用に関する報告では、PCA 反応抑制作用以外に、肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用、histamine  $H_1$  受容体阻害あるいは IgE 抗体産生抑制など、抗アレルギー作用として複数の機序による作用が報告されていることがある。MMBP と eMMBP もそれらと同様に、histamine  $H_1$  受容体阻害作用や局所の血管透過性亢進反応に対する抑制効果以外に、DNP-ascaris の抗原抗体反応に対する抑制、肥満細胞からのケミカルメディエーター遊離阻害、IgE 抗体産生およびサイトカイ

ン産生への影響など、種々の作用機序により抗炎症および抗アレルギー効果を示す可能性が考えられた。

以上、本章の研究から MMBP と eMMBP が histamine 及び substance P 誘発による血管透過性亢進反応を抑制し抗炎症効果を示すこと、DNP-ascaris 誘発 PCA 反応にともなう血管透過性亢進反応を抑制することが明らかとなり、MMBP と eMMBP は抗炎症効果および抗アレルギー効果を有することが示唆された。

## 第2章 実験的鼻アレルギーに対する MMBP と eMMBP の抑制効果

### 2-1 緒言

I 型アレルギーでは皮膚炎以外にアレルギー性鼻炎、気管支喘息、薬物アレルギー、金属アレルギーなどが代表的な疾患としてあげられる。近年特に罹患率が高まっている花粉症に関しては、鼻炎予防用品、サプリメントあるいはドリンク剤など多種多様な商品が販売されている。前章では MMBP と eMMBP の皮膚における抗炎症作用と抗アレルギー作用を明らかにしたが、次に鼻アレルギーに対する抑制効果の可能性を推察した。本章ではアレルギー性鼻炎の 3 大症状であるくしゃみ、鼻汁、鼻閉を実験的に誘発させた動物モデルを使用し、MMBP と eMMBP の鼻アレルギー抑制効果について検討した。なお、アレルギー性鼻炎は、発作性反復性のくしゃみ、水性鼻汁、鼻閉を主徴とする鼻粘膜の I 型アレルギー反応によって生じるのに対し、鼻アレルギーは副鼻腔等を含む鼻粘膜におけるアレルギー疾患全般を示す。本研究は花粉を抗原とした抗原抗体反応に依存する I 型アレルギー反応について限定した検討をしたものではなく、鼻腔に histamine あるいは toluen-2, 4-diisocyanate (TDI) を直接滴下してアレルギー症状を誘発した動物モデルでも検討しているため、また鼻閉に関しては直接的な検討をしていないため、本研究では鼻アレルギーと記述した。

### 2-2 実験材料および方法

#### 2-2-1 使用動物

7 週齢の Wistar/ST 系雄性ラットおよび 400-600 g の Hartley 系雄性モルモットは日本 SLC 株式会社 (Shizuoka, Japan) から購入し、約 1 週間の予備飼育を経て実験に用いた。また、動物は室温  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55 \pm 5\%$  において固形飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社、Tokyo, Japan) と水を

自由摂取させた。なお、動物の取扱は「星薬科大学動物実験指針」に基づいて行った。

## 2-2-2 使用試薬

実験に用いた MMBP および eMMBP は武蔵野免疫学研究所（東京都新宿区新宿 1-14-5）に供与され、4℃で保存した。TDI は Sigma 社（St. Louis、MO、U. S. A.）より、アラムは Imject® Alum を PIERCE 社（IL、U. S. A.）よりそれぞれ購入し使用した。

## 2-2-3 Histamine 誘発鼻こすり行動の観察

7 週齢の Wistar/ST 系雄性ラットに histamine (10 nmol/10  $\mu$ L) を両鼻腔に滴下し、鼻こすり行動回数を経時的に測定した<sup>25)</sup>。MMBP (500 mg/kg) と eMMBP (500 mg/kg) はそれぞれ 0.25% carboxy-methyl-cellulose sodium (CMC-Na) に懸濁した。これらの懸濁液及び陽性対照薬の ketotifen (5 mg/kg) は histamine 滴下 1 時間前に経口投与した。なお、対照には生理食塩水を同様に経口投与した。

## 2-2-4 TDI 誘発鼻アレルギーにおけるくしゃみ回数と鼻汁量の測定

400-600 g の Hartley 系雄性モルモットに、10% TDI 酢酸エチル溶液を、一側につき 5  $\mu$ L を両鼻腔に 1 日 1 回 5 日間連続で滴下した。3 週間の無処置期間後、5% TDI 酢酸エチル溶液 5  $\mu$ L を両鼻腔に再び滴下し、くしゃみと鼻水を誘発させた<sup>26)</sup>。MMBP (500 mg/kg)、eMMBP (500 mg/kg) ならびに陽性対照薬である ketotifen (5 mg/kg) は 0.25% CMC-Na に懸濁し、TDI によるくしゃみと鼻水の誘発 1 時間前に経口投与した。なお、コントロールには生理食塩水を同様に経口投与した。経時的にくしゃみ回数を測定すると同時



に、こよりを用いて鼻汁を採集し、重量を測定して鼻汁量とした<sup>27)</sup>。

#### 2-2-5 Ovalbumin (OVA) 感作アレルギー性鼻炎モデルにおける血管透過性亢進反応の測定

生理食塩水 1 mL にアラム 5 mg を含有するようにアラム溶液を希釈し、OVA 抗原を 10 mg/mL の濃度で乳化して OVA 抗原乳剤を作製した。7 週齢の Wistar/ST 系雄性ラットに、1 mL の OVA 抗原乳剤を腹腔内投与して感作した。感作 1 週間後に、同様に作製した OVA 抗原乳剤を 10 mg/mL/rat の用量で前後跗足蹠皮下に 4 分割して投与し、更に 1 週間後、同様に作製した OVA 抗原乳剤を 10 mg/mL/rat の用量で皮下注射することにより追加感作した<sup>28)</sup>。初回感作より 3 週間後、即時型皮内反応を用いて感作の成立を確認した。すなわち、生理食塩水に 10 mg/mL で溶かした OVA の 0.1mL をラットの背部に皮内注射し、生じた発赤の長径を計測し、10 mm 以上のとき感作成立とした<sup>29)</sup>。感作が成立したラットをペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、気道を切開し、カニューレを気管に挿入し気道を確保した。小島ら<sup>30)</sup>の方法に従ってペリスタポンプを用い、鼻腔に流速 0.25 mL/分で生理食塩水もしくは OVA 抗原溶液を灌流し、外鼻孔から流出する灌流液を一定量ずつ経時的に採取した。すなわち、はじめに 10 分間生理食塩水を灌流し、その間に採取した灌流液を Period-1 (P1) とした。次に 4% pontamine sky blue (PSB) を 5 mL/kg で尾静脈注射し、P1 と同様に 10 分間生理食塩水を灌流して自然漏出する PSB を含む灌流液を採取し Period-2 (P2) とした。その後 OVA 抗原溶液の 10 mg/mL を 10 分間灌流し Period-3 (P3) とした。再び生理食塩水を 30 分間灌流し、10 分ごとに灌流液を採取し、順に Period-4 (P4)、Period-5 (P5)、Period-6 (P6) とした。P1～P6 の採取灌流液をそれぞれ 3000 r.p.m. 10 分間遠心分離した後、上清中の吸光度 (620nm) を測定し、PSB の

漏出量を算出した。MMBP (500 mg/kg)、eMMBP (500 mg/kg) ならびに陽性対照薬の ketotifen (5 mg/kg) は 0.25% CMC-Na に懸濁し灌流 1 時間前に経口投与した。なお、コントロールには生理食塩水を経口投与した。

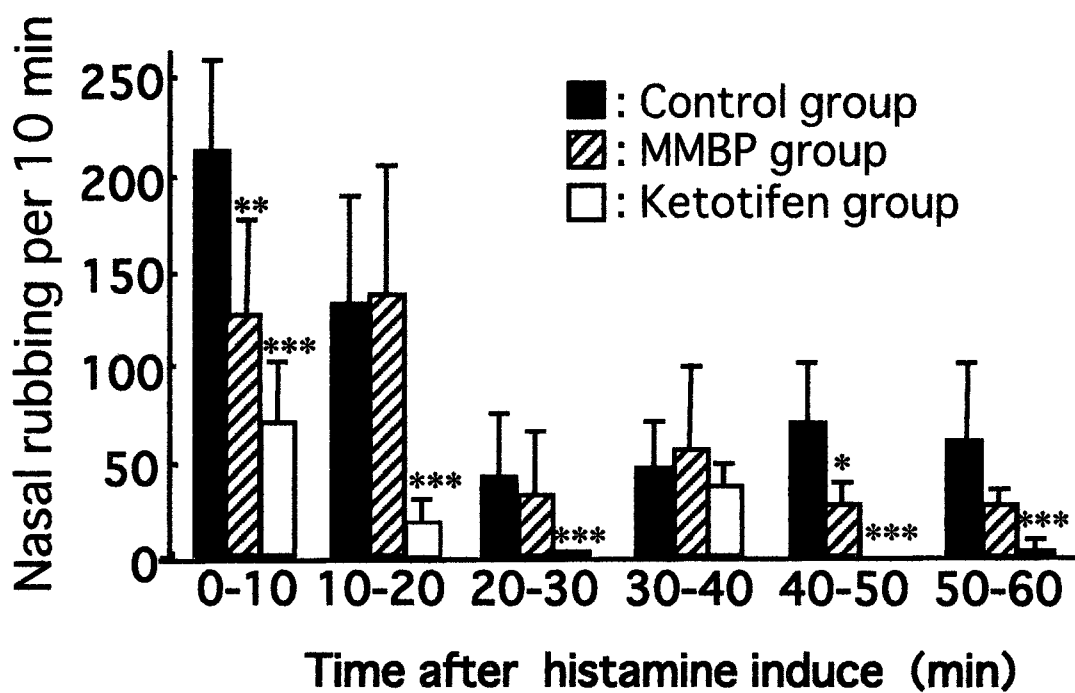
#### 2-2-6 統計処理

結果は全て平均±標準偏差(Mean±SD)であらわし、有意差検定には Dunnett's two-tailed test を用いた。

### 2-3 結果

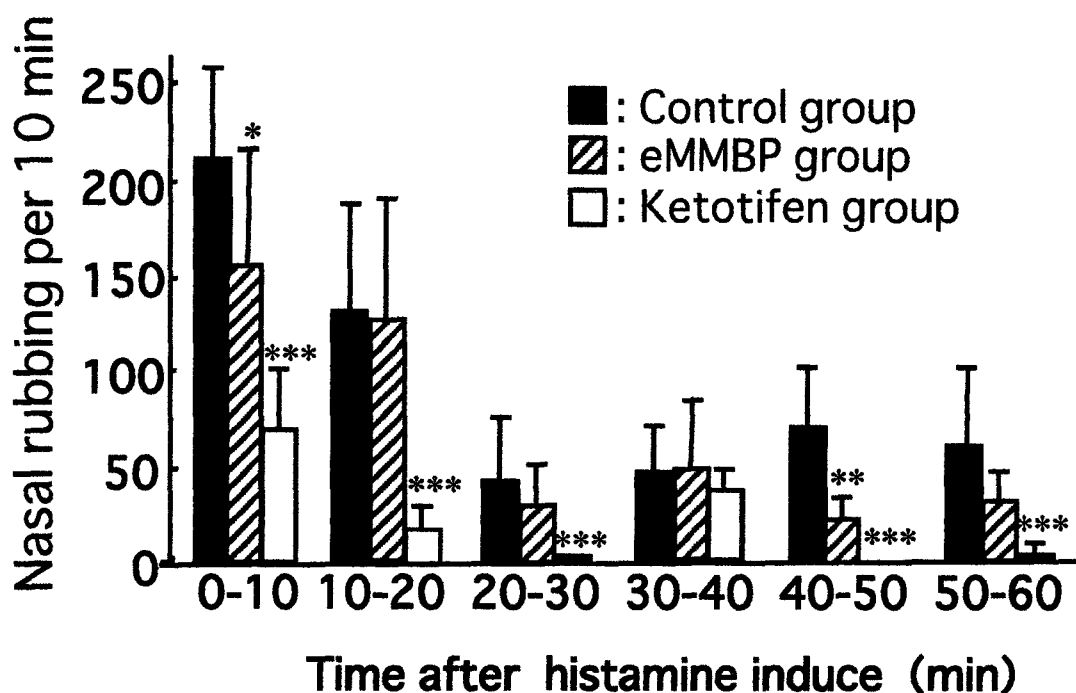
#### 2-3-1 Histamine 誘発鼻こすり行動に対する MMBP と eMMBP の抑制効果

ラット両鼻腔に histamine を滴下すると、滴下直後より高頻度で鼻こすり行動が認められ、その後時間の経過とともに鼻こすり行動の回数は減少した。MMBP および eMMBP は、500 mg/kg の投与では対照と比較して、histamine 滴下後 0～10 分と 40～50 分の鼻こすり行動を有意に抑制させた。なお、陽性対照薬として用いた ketotifen (5 mg/kg) 投与の histamine 滴下鼻こすり行動に対する抑制作用を確認した (Fig. 2-1、 Fig. 2-2)。



**Fig. 2-1 Effect of MMBP on histamine-induced nasal rubbing in rats**

Control group: 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1h before the histamine induce; MMBP group: the suspension of MMBP (500 mg/kg) was administered p.o. 1h before the histamine (10 nmol/10  $\mu$  L) induce; Ketotifen group: Ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1h before the histamine induce. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 6 rats. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, significantly different from Control group.

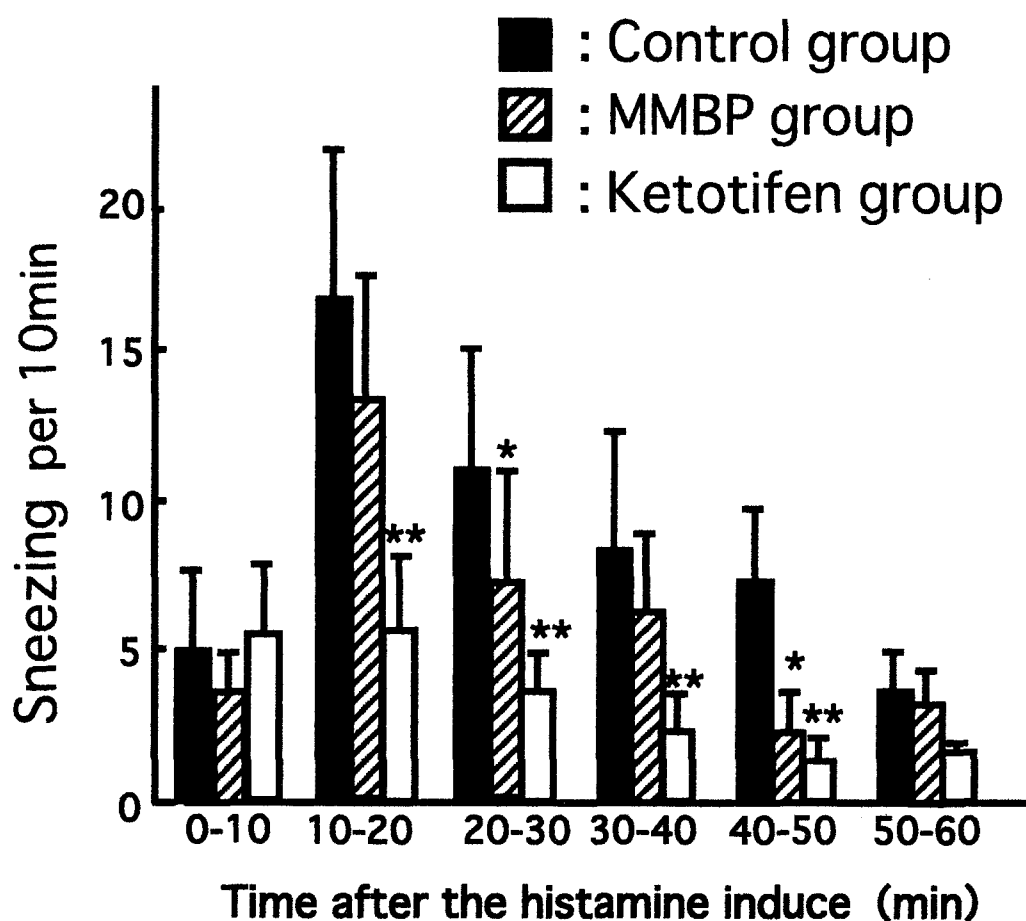


**Fig. 2-2 Effect of eMMBP on histamine-induced nasal rubbing in rats**

Control group: 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1h before the histamine induce; eMMBP group: the suspension of eMMBP (500 mg/kg) was administered p.o. 1h before the histamine (10 nmol/10  $\mu$ L) induce; Ketotifen group: Ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1h before the histamine induce. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 6 rats. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, significantly different from Control group.

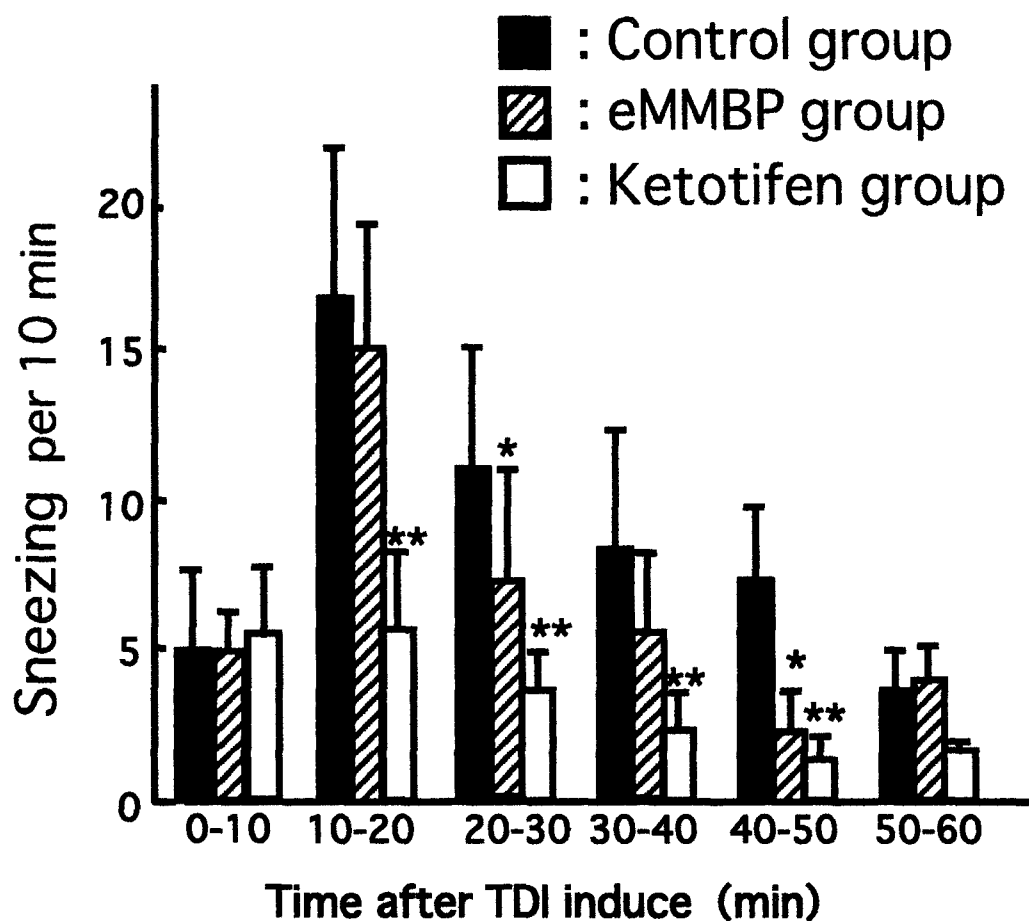
### 2-3-2 TDI 誘発鼻アレルギーに対する MMBP と eMMBP の抑制効果

TDI 誘発モルモット鼻アレルギーのくしゃみ回数は、TDI 滴下 10～20 分後に最も頻度が高くなり、その後減少した (Fig. 2-3、 Fig. 2-4)。MMBP の 500 mg/kg 投与あるいは eMMBP の 500 mg/kg 投与は、対照と比較して TDI 滴下後 20～30 分および 40～50 分のくしゃみ回数を有意に減少させた。さらに、鼻汁量は TDI 滴下 10～20 分後に最も多量に流出し、MMBP の 500 mg/kg 投与あるいは eMMBP の 500 mg/kg 投与は 0～10 分、10～20 分および 20～30 分において有意に鼻汁量を抑制させた。(Fig. 2-5、 Fig. 2-6)。なお、陽性対照薬として用いた ketotifen (5 mg/kg) の投与による、TDI 誘発鼻アレルギーのくしゃみ回数および鼻汁流出に対する抑制作用を確認した。



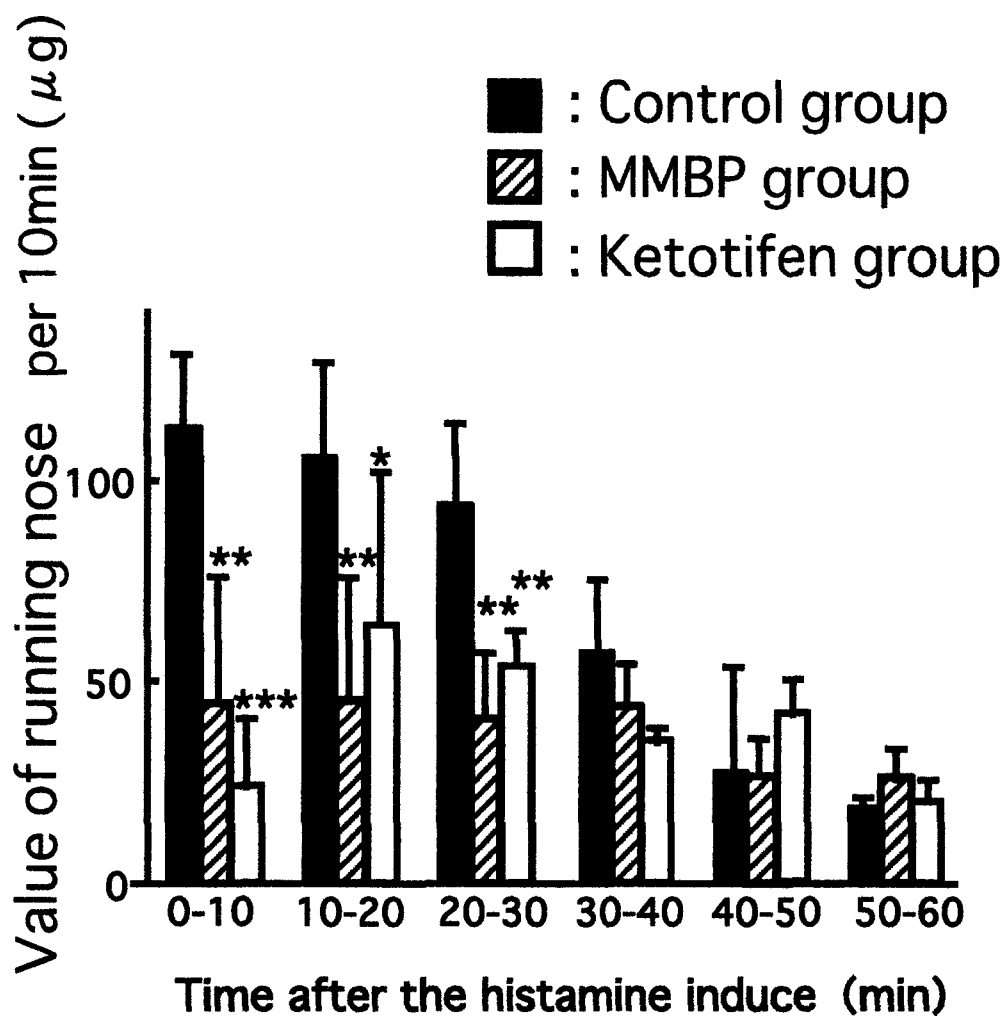
**Fig. 2-3 Effect of MMBP on TDI-induced sneezing in guinea pigs**

Control group: 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1h before the TDI (10% TDI,  $5\mu\text{L}$ ) induce; MMBP group: the suspension of MMBP (500 mg/kg) was administered p.o. 1h before the TDI induce; Ketotifen group: Ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1h before the TDI induce. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 6 guinea pigs. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significantly different from Control group.



**Fig. 2-4 Effect of eMMBP on TDI-induced sneezing in guinea pigs**

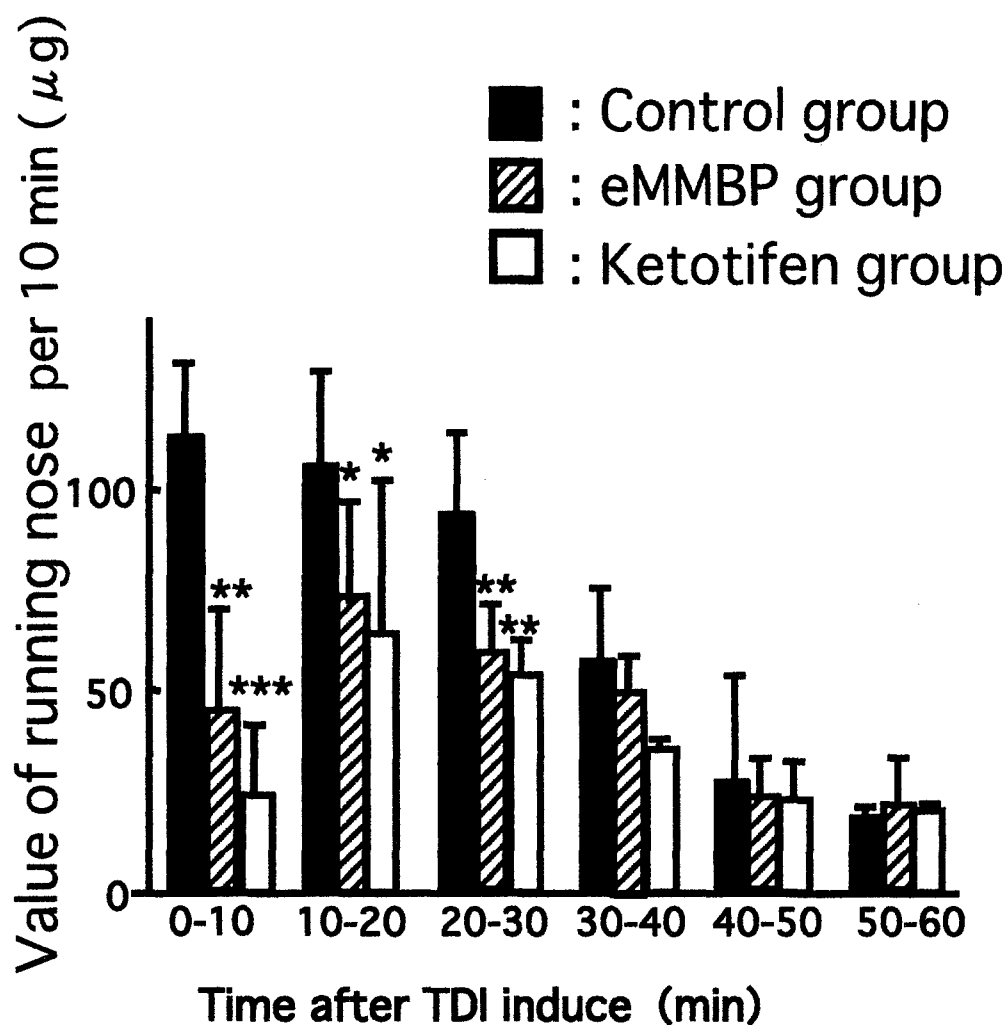
Control group: 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1h before the TDI (10% TDI, 5  $\mu$ L) induce; eMMBP group: the suspension of eMMBP (500 mg/kg) was administered p.o. 1h before the TDI induce; Ketotifen group: Ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1h before the TDI induce. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 5-6 guinea pigs. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, significantly different from Control group.



**Fig. 2-5 Effect of MMBP on value of running nose in guinea pigs**

Control group: 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1h before the TDI (10% TDI, 5  $\mu$ L) induce; MMBP group: the suspension of MMBP (500 mg/kg) was administered p.o. 1h before the TDI induce; Ketotifen group: Ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1h before the TDI induce. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 6 guinea pigs. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, significantly different from Control group.



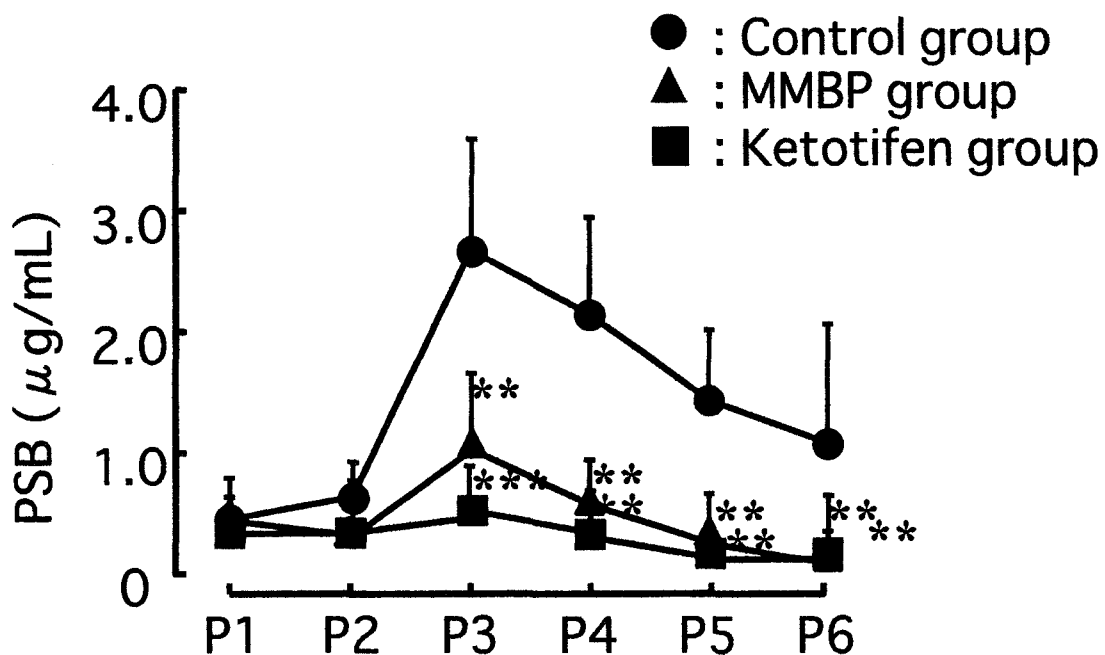


**Fig. 2-6 Effect of eMMBP on value of running nose in guinea pigs**

Control group: 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1h before the TDI (10% TDI, 5  $\mu$ L) induce; eMMBP group: the suspension of eMMBP (500 mg/kg) was administered p.o. 1h before the TDI induce; Ketotifen group: Ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1h before the TDI induce. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 5-6 guinea pigs. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, significantly different from Control group.

### 2-3-3 OVA 感作アレルギー性鼻炎モデルに対する MMBP と eMMBP の抑制効果

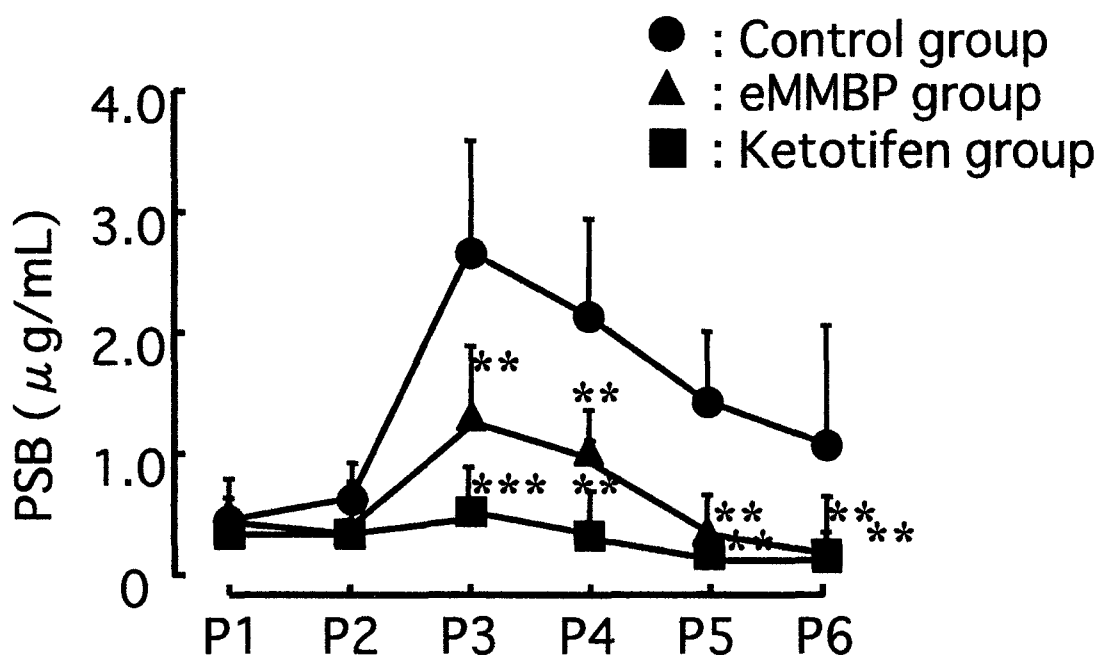
OVA を抗原として感作したラットの鼻腔に抗原の OVA を灌流した P3 では、鼻腔からの PSB 漏出が最大となり、灌流液を OVA から生理食塩水に替えた後の P4 以降では、PSB 漏出が徐々に減少した。MMBP の 500 mg/kg 投与と eMMBP の 500 mg/kg 投与は、対照と比較して P3 から P6 のいずれにおいても、OVA 抗原溶液灌流で誘発された PSB 色素漏出を有意に抑制させた。なお、陽性対照薬として用いた ketotifen (5 mg/kg) の投与による PSB 漏出に対する抑制作用を確認した。(Fig. 2-7、 Fig. 2-8)。



**Fig. 2-7 Effect of MMBP on PSB content of the perfusate collected from nasal cavity**

**the rats during different periods**

Control group: 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1h before the collection of perfusae; MMBP group: the suspension of MMBP (500 mg/kg) was administered p.o. 1h before the collection of perfusate; Ketotifen group: Ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1h before the collection of perfusate. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 5 rats. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, significantly different from Control group.



**Fig. 2-8 Effect of eMMBP on PSB content of the perfusate collected from nasal cavity the rats during different periods**

Control group: 0.25% CMC-Na was administered p.o. 1h before the collection of perfusae; eMMBP group: the suspension of eMMBP (500 mg/kg) was administered p.o. 1h before the collection of perfusate; Ketotifen group: Ketotifen (5 mg/kg) was administered p.o. 1h before the collection of perfusate. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 5 rats. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, significantly different from Control group.

## 2-4 考察

鼻アレルギーでは、外気中のアレルゲン（抗原）が鼻腔から侵入し鼻粘膜に付着して鼻粘膜中の肥満細胞や好塩基球表面のアレルゲン特異性 IgE 抗体と結合することにより、抗原抗体反応が引き起こされる。この反応により肥満細胞や好塩基球細胞から histamine をはじめとする様々なケミカルメディエーターが放出される。これらのケミカルメディエーターは、鼻粘膜中の三叉神経終末を刺激し、続いてくしゃみ中枢を刺激し、くしゃみを誘発させる。さらにケミカルメディエーターは分泌血管運動中枢を刺激し、鼻汁分泌を亢進させる。また histamine や leukotriene は鼻粘膜下血管の血管透過性を亢進させ、鼻粘膜の浮腫を生じさせて鼻閉を引き起こす。本章では主にアレルギー性鼻炎の 3 大特徴、すなわち、くしゃみ、鼻汁（鼻水）、鼻閉（鼻詰まり）に対する MMBP と eMMBP の影響について検討した。

はじめに、histamine 誘発鼻こすり行動に対する影響について検討した。すなわち代表的なケミカルメディエーターである histamine をラットの鼻腔に直接滴下すると、鼻こすり行動が観察された。これは histamine がくしゃみ中枢を刺激して鼻粘膜の浮腫を誘導したため、ラットの鼻に不快感をもたらしたものと考えられる。それに対して MMBP と eMMBP は、それぞれ有意に抑制した。MMBP と eMMBP は histamine 誘発鼻こすり行動を抑制したことより、histamine  $H_1$  受容体阻害作用を有すると考えられた。

次に TDI 誘発鼻アレルギーモデルに対して、MMBP と eMMBP は、TDI 滴下後 20～30 分および 40～50 分のくしゃみ回数をそれぞれ有意に抑制した。また MMBP と eMMBP は TDI 滴下 30 分後までの鼻汁量を有意に減少させた。これらより、MMBP と eMMBP は、それぞれくしゃみと鼻汁流出を抑制する効果を有すると考えられた。TDI 誘発鼻アレルギーは、花粉により誘発されるアレルギー性鼻炎の抗原抗体反応と同様に、TDI 感作された動物が再び TDI

を認識し抗原抗体反応をおこすと、肥満細胞から histamine が遊離し I 型アレルギーが引き起こされる<sup>26)</sup>。本実験結果より MMBP と eMMBP は、TDI をアレルゲンとして認識してからアレルギー反応がおこるまでのいずれかのステップに作用したものと考えられた。

次に OVA を抗原とし感作したラットの鼻腔に抗原を灌流した。これはアレルギー性鼻炎の鼻腔から浸入した抗原が鼻粘膜に付着して抗原抗体反応を誘発した状態をモデル化したもので、実際のアレルギー性鼻炎に近いと考えられる。この抗原抗体反応後に放出された histamine や serotonin などのケミカルメディエーターで誘発された血管透過性亢進にともなう PSB 漏出を指標として、MMBP と eMMBP の抑制効果を検討した。その結果 MMBP と eMMBP は、抗原灌流後の PSB 漏出量を有意に抑制した。これより MMBP と eMMBP は、OVA 感作鼻炎モデルにおいて鼻粘膜の血管透過性亢進反応を抑制することが認められた。従って、鼻アレルギー抑制効果を有すると推察され、また鼻粘膜下の血管透過性亢進から鼻粘膜浮腫を経由しておこることが予測される鼻閉も抑制する可能性のあることが推察された。これより、MMBP と eMMBP は、TDI 誘発鼻アレルギーと同様に、I 型アレルギーの発症機序における、抗原抗体反応からアレルギー反応までのいずれかの過程を抑制したものと考えられた。なお MMBP、eMMBP ならびに陽性対照薬の ketotifen は、これらの鼻アレルギーに対してそれぞれほぼ同等な抑制効果を示した。

すでに生薬では麻黄、細辛、乾姜、桂枝、附子、当帰などで、それらを含む方剤が証に応じて臨床的にアレルギー疾患に対して適応されている<sup>31)</sup>。また、緑茶は抗アレルギー作用が広く知られており、季節性アレルギー性鼻炎を対象とした抗アレルギー作用が評価され飲料水として製品化されている<sup>32)</sup>。MMBP と eMMBP にも類似の抗アレルギー作用が認められた。

### **第 3 章 DNP-ascaris 抗原感作マウスの IgE 抗体産生促進に対する MMBP と eMMBP の抑制効果**

#### **3-1 緒言**

I 型アレルギーでは、肥満細胞から遊離されるケミカルメディエーターと共に IgE 抗体が中心的に働き、アレルギー反応の引き金となっている。また血清中の IgE 値はアレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎およびアトピー型気管支喘息などのアレルギー性疾患では健常者に比べて増加していることが報告されている<sup>33)</sup>。前章までに MMBP および eMMBP の皮膚血管透過性反応を指標とした抗アレルギー効果ならびに鼻アレルギー抑制効果が明らかとなったが、本章ではそれらの作用機序を考察するために、MMBP および eMMBP が DNP-ascaris 抗原感作マウスの IgE 抗体産生促進に及ぼす影響について検討した。

#### **3-2 実験材料及び方法**

##### **3-2-1 使用動物**

BALB/c マウスを日本 SLC 株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入し、一定期間予備飼育を行った後、実験に使用した。また、動物は室温  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55 \pm 5\%$  において固形飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社、Tokyo, Japan) と水を自由摂取させた。なお、動物の取扱は「星薬科大学動物実験指針」に基づいて行った。

##### **3-2-2 使用試薬**

実験に用いた MMBP および eMMBP は武蔵野免疫学研究所 (東京都新宿区新宿 1-14-5) に供与され、 $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。Cyclophosphamide は Sigma 社

(St. Louis, MO, U.S.A.) より、DNP-ascaris は Cosmo Bio. LSL 社 (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入し使用した。

### 3-2-3 DNP-ascaris 抗原感作マウスの経口的な IgE 値の測定

BALB/c マウス (18-20 g) に DNP-ascaris 抗原 ( $5\mu\text{g/mL}$ ) - アラム ( $1\text{ mg/mL}$ ) 乳剤 ( $1\text{ mL/body}$ ) を腹腔内投与し感作した。感作 5、10、15 日後にそれぞれ血清を採取し<sup>34,35)</sup>、得られた血清の IgE 値 ( $\mu\text{g/mL}$ ) を ELISA 法で測定した。なお、5 日目の無処置群を対照に用いた。

### 3-2-4 DNP-ascaris 抗原感作マウスの IgE 抗体産生促進に対する MMBP と eMMBP の抑制効果

BALB/c マウス (18-20 g) に DNP-ascaris 抗原 ( $5\mu\text{g/mL}$ ) - アラム ( $1\text{ mg/mL}$ ) 乳剤 ( $1\text{ mL/body}$ ) を腹腔内投与し感作した。感作 10 日後に血清を採取した。MMBP (100、250、500 mg/kg) および eMMBP (100、250、500 mg/kg) は 0.25% CMC-Na に懸濁し、DNP-ascaris 抗原感作と同時に 5 日間経口投与した。また、陽性対照薬の cyclophosphamide (20 mg/kg) も、DNP-ascaris 抗原感作と同時に 5 日間経口投与した。それぞれ得られた血清の IgE 値 ( $\mu\text{g/mL}$ ) を ELISA 法で測定した。

### 3-2-5 統計処理

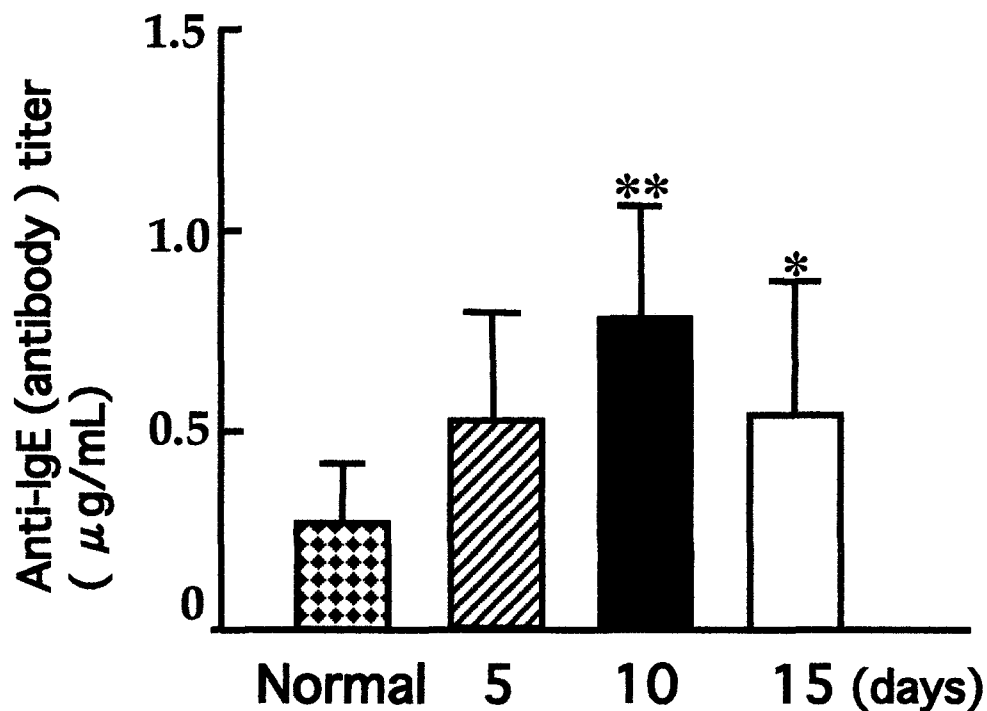
結果は全て平均  $\pm$  標準偏差 (Mean  $\pm$  SD) であらわし、有意差検定には Dunnett's two-tailed test を用い、 $P < 0.05$  のとき、有意差ありと判定した。



### 3-3 結果

#### 3-3-1 DNP-ascaris 抗原感作マウスの IgE 抗体産生における経日的変化

DNP-ascaris 抗原感作の 5、10、15 日後における血清 IgE 値 ( $\mu\text{g/mL}$ ) は、対照と比較して 10 日後と 15 日後に有意に増加し、特に 10 日後の増加が顕著であった (Fig. 3-1)。



**Fig. 3-1 Titer of anti-IgE 5, 10 and 15 days after immunization**

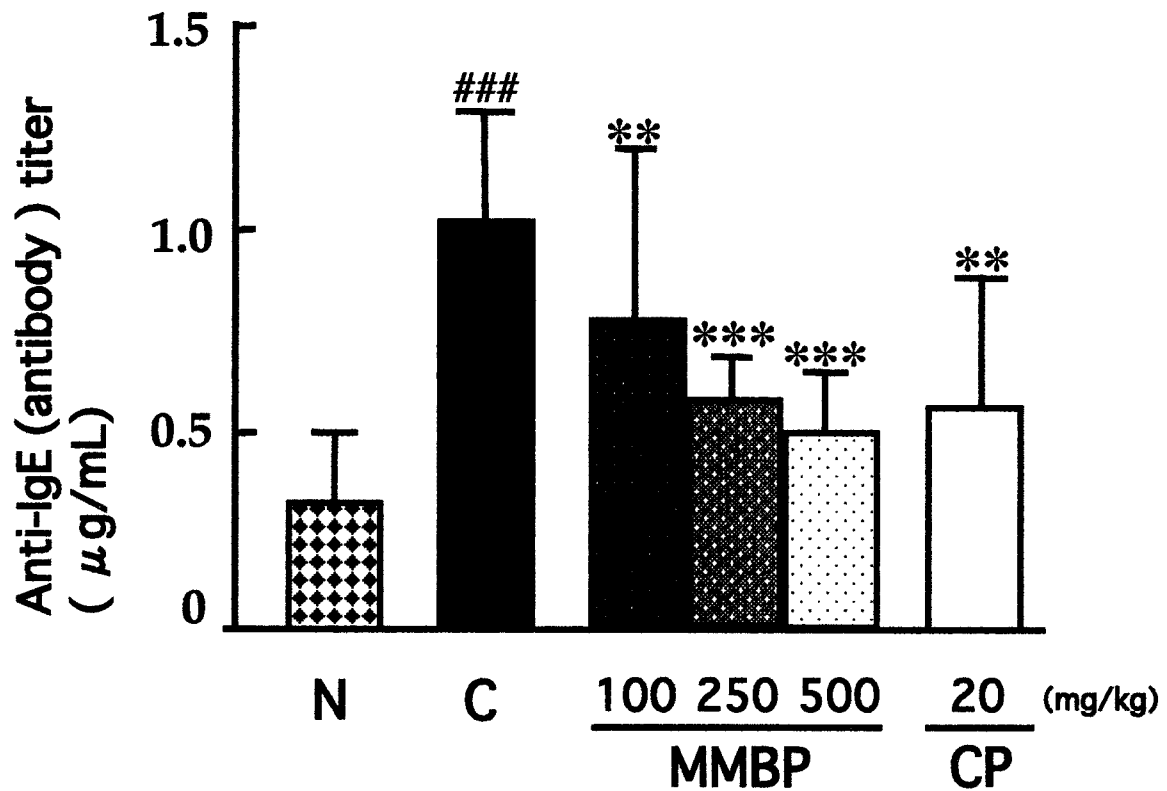
5 : 5 days grup, the titer was determine at 5 days after injection of DNP-ascaris

(5  $\mu$ g); 10: 10 days grup, the titer was determine at 10 days after injection of DNP-ascaris (5  $\mu$ g); 15: 15 days grup, the titer was determine at 15 days after injection of DNP-ascaris (5  $\mu$ g). Each value represents mean  $\pm$  S.D. of 6 mice.

\*p < 0.05, \*\*p<0.01, significantly different from normal group.

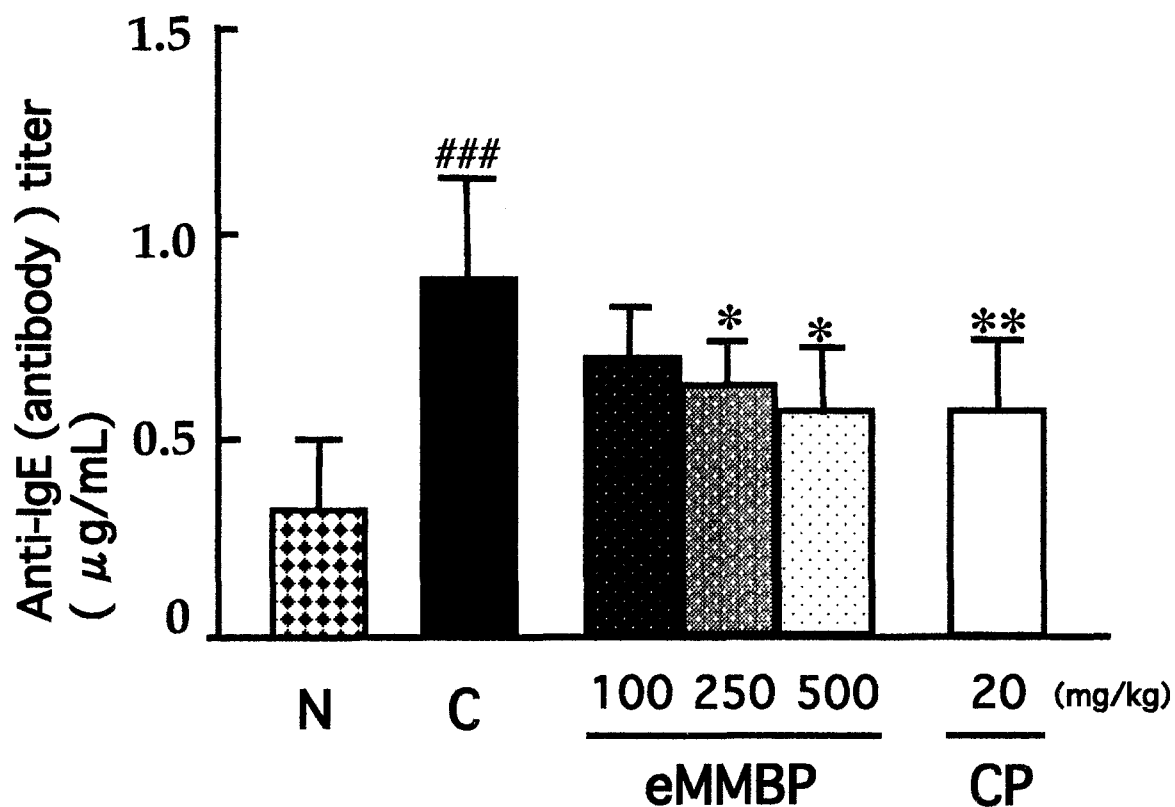
### 3-3-2 DNP-ascaris 抗原感作マウスの IgE 抗体産生促進に対する MMBP と eMMBP の抑制効果

DNP-ascaris 抗原感作 10 日後の血清 IgE 値は、Control 群では無処理対照群の Normal 群と比較して有意に増加した。それに対し MMBP と eMMBP はともに 100～500 mg/kg の用量範囲において用量依存的に血清 IgE 値の増加を抑制した。MMBP では 100、250 あるいは 500 mg/kg の投与で、eMMBP では 250 あるいは 500 mg/kg 投与で、Control 群と比較してそれぞれ血清 IgE 値を有意に減少させた(Fig. 3-2、Fig. 3-3)。なお、陽性対照薬として用いた cyclophosphamide (20 mg/kg) 投与の血清 IgE 値増加に対する抑制効果を確認した。



**Fig. 3-2. Effect of MMBP on titer of anti-IgE 10 days after immunization**

N: Normal group; C: control group, CMC-Na was given p.o. for 5 days from the injection of antigen (DNP-ascaris,  $5 \mu\text{g}$ ); MMBP group: MMBP (100, 250, 500 mg /kg) was given p.o. for 5 days from the injection of antigen; CP: cyclophosphamide group, cyclophosphamide (20 mg/kg) was given p.o. for 5 days from the injection of antigen. Each value represents mean  $\pm$  SD of 6-9 mice. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, significantly different from control group; ###p < 0.001, significantly different from normal group.



**Fig. 3-3 Effect of eMMBP on titer of anti-IgE 10 days after immunization**

N: Normal group; C: control group, CMC-Na was given p.o. for 5 days from the injection of antigen (DNP-ascaris,  $5\mu\text{g}$ ); eMMBP group: eMMBP (100, 250, 500 mg /kg) was given p.o. for 5 days from the injection of antigen; CP: cyclophosphamide group, cyclophosphamide (20 mg/kg) was given p.o. for 5 days from the injection of antigen. Each value represents mean  $\pm$  SD of 6-9 mice.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , significantly different from control group. ### $p < 0.001$ , significantly different from normal group.

### 3-4 考察

DNP-ascarisを抗原として感作したマウスのI型アレルギーモデルに対するMMBPおよびeMMBPの抑制効果を、血清中IgE濃度を指標として検討した。陽性対照薬には免疫抑制薬として市販されているcyclophosphamide (20 mg/kg) を用い血清中IgE抑制効果を比較した。その結果MMBPとeMMBPは、DNP-ascaris 抗原感作で上昇した血清中IgE値を有意に減少させた。cyclophosphamideは体重減少を引き起こしたため、松浦らの<sup>31)</sup> 報告と同様にIgGやIgMなどを含む免疫系全般を抑制したと考えられるが、MMBPとeMMBPはマウスの体重に影響を与えなかったため (data not shown)、MMBPとeMMBPは免疫系全般を抑制したのではないと推察した。

花粉症などのI型アレルギーでは、IgEが高親和性IgEレセプター (FcεRI) を介して肥満細胞に結合し、肥満細胞からの脱顆粒を促し、histamineなどのケミカルメディエーターを遊離させ、これらケミカルメディエーターによりアレルギー症状が誘発されることが考えられている<sup>35)</sup>。従って、IgE抗体の産生量を抑制させることはアレルギー症状を軽減あるいはアレルギー発症を防止できると考えられる。MMBPとeMMBPはDNP-ascaris抗原感作で促進した血清IgE産生を有意に抑制させたため、MMBPとeMMBPのI型アレルギー抑制作用にはIgE抗体産生抑制が関与している可能性が考えられた。さらに、血中IgEと同時にサイトカインのIL-4とIFN-γも測定し、これらに対するMMBPとeMMBPの影響を検討した (data not shown)。対照群は無処理対照群と比較しIFN-γ/IL-4が低下したが、Control群に対しMMBPとeMMBPはともにIFN-γ/IL-4を有意に増加させた。これよりMMBPとeMMBPはTh1/Th2バランスを改善させる可能性があると考えられた。

病原体をはじめ感染を契機とした免疫応答にともない、免疫反応を制御する役目を担うヘルパーT細胞はTh1細胞とTh2細胞に分化し、それぞれ細胞性

免疫と液性免疫を活性化し、免疫応答を調節している。この Th1/Th2 の分化バランスは免疫応答の調節に重要であり、このバランスの崩れはアレルギー疾患や自己免疫疾患などの免疫疾患発症の要因と推測されている。Th1 細胞と Th2 細胞は相反する関係にあり、Th2 細胞が優勢になると、IgE の産生が促進されることからアレルギーを起こしやすくなる。よって Th1/Th2 バランスにおいて Th1 を優位にさせると、アレルギーの発症を抑制することが可能と考えられている<sup>33)</sup>。本章で MMBP と eMMBP の投与は血清中 IgE 値を減少させることが認められた。さらに MMBP と eMMBP の高用量は INF- $\gamma$ /IL-4 を増加させたことより (data not shown)、Th1/Th2 バランスを改善する可能性があると考えられた。

現在、臨床的に使用されている抗アレルギー薬で Th2 細胞由来のサイトカインを阻害させるトリル酸プラタストは、IgE 抗体を減少させ、IL-4、IL-5 産生を抑制させることが知られている。天然物の IgE 抗体やサイトカインに対する作用について、Sato らは $\beta$ カロテンが I 型アレルギーモデルの血清中の IgE を減少させると共に脾臓の INF- $\gamma$ 、IL-12 の生成を促進させ、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 の生成を抑制させると報告している<sup>37)</sup>。また、Fang らは漢方薬である玉屏風散が OVA 誘発喘息モデルマウスにおける INF- $\gamma$ /IL-4 を改善させると報告しており<sup>38)</sup>、シジウムの含有成分である methyl gallate は IL-4 や IL-5 の産生を顕著に抑制させることが報告されている<sup>39)</sup>。フラボノイドの、ルテオリン、フィセチン、アピゲニンなどは、アレルゲンや IgE 抗体の刺激により産生される IL-4 や IL-13 を顕著に抑制させることや、フラボノイドが IL-4 や IL-13 の産生を抑制させ CD 抗原の発現を抑制させること、さらにフラボノイドのひとつである isoquercitrin は TNF- $\alpha$  を抑制し抗炎症作用を有することなどが報告されている<sup>40-42)</sup>。isoquercitrin を含むフラボノイドは MMBP と eMMBP にも含有されることから、フラボノイドがサイトカイン産生に影響を

及ぼし、その結果 IgE 抗体産生抑制効果を促した可能性があると考えられた。臨床的にプロテオバイオティクス BB536 配合のヨーグルトが、スギ花粉症における血漿中の IFN- $\gamma$  の低下を回復させることが報告されており<sup>42)</sup>、MMBP と eMMBP が IFN- $\gamma$  の低下を回復させることにより IFN- $\gamma$ /IL-4 を改善させたことに類似していた。一方 IgE へのクラススイッチは IL-4 刺激により IgE 重鎖胚型転写 ( $\epsilon$  germ line transcripts;  $\epsilon$  GT) の発現が誘導されることでおこるが、茶葉成分のストリクチニンを処理すると  $\epsilon$  GT 発現抑制がおこるために IgE 抗体産生が阻害されることが最近報告され<sup>43)</sup>、IgE 抗体産生に関する詳細なメカニズムが解明されつつある。

以上の結果より、MMBP と eMMBP の抗アレルギー作用機序のひとつとして、IgE 抗体産生抑制作用が考えられた。



## 第4章 肥満細胞からの histamine 遊離反応に対する MMBP と eMMBP の抑制効果

### 4-1 緒言

2005 年の診療ガイドラインによると、アトピー性皮膚炎では外用薬としてステロイド、内服薬として抗ヒスタミン薬と抗アレルギー薬が基本となっており、またアレルギー性鼻炎では第 2 世代の抗ヒスタミン薬とケミカルメディエーター遊離抑制薬のどちらかを使用もしくは併用し、重症度が増すと鼻噴霧用ステロイドや抗ロイコトリエン受容体阻害薬やトロンボキサン A2 阻害・拮抗薬を使用する治療法が示されている。また、特に鼻炎では抗アレルギー剤の中でもケミカルメディエーター抑制薬に分類されているクロモグリク酸ナトリウムやトラニラストなどは、第 2 世代の抗ヒスタミン薬と共に軽症時より頻繁に使用されている<sup>48)</sup>。本研究で使用したケトチフェンは histamine H<sub>1</sub> 拮抗作用があるため、第 2 世代抗ヒスタミン薬として分類されており、histamine 遊離抑制と histamine 受容体拮抗の両方の作用を併せ持つところが優れているため、鼻炎の治療薬として OTC としても販売されている。

前章までに、MMBP と eMMBP の抗炎症・抗アレルギー効果と IgE 抗体産生抑制作用を明らかにしたが、本章ではさらに作用機序を探るために、肥満細胞からの histamine 遊離阻害効果について検討した。さらに MMBP の熱水抽出物 (HWex) と eMMBP の histamine 遊離抑制効果を比較し、それらの差異と HPLC による成分分析から、histamine 遊離抑制効果における MMBP と eMMBP の有効成分についても考察した。

## 4-2 実験材料および方法

### 4-2-1 使用動物

Wistar/ST 系ラット（7週齢）を日本 SLC 株式会社（Shizuoka、Japan）より購入し、一定期間予備飼育を行った後実験に使用した。また、動物は室温  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55 \pm 5\%$  において固形飼料（オリエンタル酵母工業株式会社、Tokyo、Japan）と水を自由摂取させた。なお、動物の取扱は「星薬科大学動物実験指針」に基づいて行った。

### 4-2-2 使用試薬

実験に用いた MMBP および eMMBP は武蔵野免疫学研究所（東京都新宿区新宿 1-14-5）に供与され、 $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。histamine、ketotifen、heparin、compound 48/80、L- $\alpha$ -phosphatidyl-L-serine は Sigma 社（St. Louis、MO、U.S.A.）より、DNP-ascaris 抗原および抗 DNP-ascaris 抗体は Cosmo Bio. LSL 社（Tokyo、Japan）よりそれぞれ購入し使用した。

### 4-2-3 MMBP の熱水抽出物（HWex）と eMMBP の調製

4g の MMBP を 100mL の精製水に懸濁させ、 $100^{\circ}\text{C}$  で 24 時間の熱水抽出後に上清を凍結乾燥してこれを熱水抽出物（HWex：hot-water extract）と称した。HWex を Tyrode-HEPES 緩衝液（Tyrode-HEPES 緩衝液：0.137 M NaCl、2.7 mM KCl、1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ 、1.0 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、20 mM HEPES、5.6 mM D-glucose、0.1% (W/V) gelatin) に溶解させ使用した。eMMBP はそのまま Tyrode-HEPES 緩衝液に溶解させて実験に使用した。

#### 4-2-4 Compound 48/80 誘発 histamine 遊離率の測定

7 週齢の Wistar/ST 系雄性ラット腹腔内に 0.03% heparin/Tyrode-HEPES 緩衝液を注射し、腹部の両側から中心部に向けて軽く 90 秒間マッサージし腹部を切開した後、腹水を採取した。それを 280 g×1 分間遠心分離することにより得られた細胞を 20% フィコール溶液に混合後、40% フィコール溶液、30% フィコール溶液の上に順に重層し、350 g×20 分間遠心分離する操作、即ちフィコール密度勾配法により肥満細胞を分取した。HWex (2 mg/0.05 mL)、MMBP (2 mg/0.05 mL) あるいは陽性対照薬の ketotifen (0.05 mg/0.05 mL) をそれぞれ 37°C で予備加温し、それぞれに肥満細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/0.2 mL) を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。その後、compound 48/80 (0.2  $\mu$ g/0.05 mL) をそれぞれに加え、さらに 37°C で 10 分間インキュベートし、冷却 Tyrode-HEPES 緩衝液を加えて反応を停止させた。これを 280 g×1 分間遠心分離後、上清中の histamine 量を ELISA (SPI Bio、Paris、France) で測定した。それぞれの histamine 量の、インキュベート前における肥満細胞中の histamine 総量に対する割合を、histamine 遊離活性 (%) とした<sup>44-47)</sup>。なお、Compound 48/80 を加えずに、同操作で遊離した histamine 遊離活性を自然遊離率とした。また、肥満細胞を含む溶液 0.05 mL に 0.45 mL の 0.25% ニグロシン溶液を加えて 5 分後に青染する壊死した細胞を数え、死亡細胞の割合を算出した。

#### 4-2-5 DNP-ascaris 抗原誘発 histamine 遊離率の測定

前述と同様に採取した肥満細胞 ( $2 \times 10^6$  cells/mL) 0.1 mL に抗 DNP-ascaris 抗体 (48 時間 homologous PCA 力価; 1 : 512) 0.1 mL を加え 37°C で 1 時間インキュベートし、280 g で 1 分間遠心分離した後、それぞれの肥満細胞を  $1 \times 10^5$  cells/0.2 mL に調整した。HWex (2 mg/0.05 mL)、MMBP (2 mg/0.05

mL)あるいは陽性対照薬の ketotifen (0.05 mg/0.05 mL) に加え 37°Cで 10 分間インキュベートした。その後 L- $\alpha$ -phosphatidyl-L-serine (0.01 mg/0.05 mL)と DNP-ascaris 抗原溶液 (0.02 mg/0.05 mL) を加え 37°Cで 10 分間インキュベートし、冷却 Tyrode-HEPES 緩衝液を加えて反応を停止させた。反応液を 280 g $\times$ 1 分間遠心分離し、上清中の histamine 量を ELISA (SPI Bio、Paris、France) で測定した。これらの histamine 量から、抗 DNP-ascaris 抗体の代わりに対照のラット血清を用いて同様な操作をした場合の histamine 値を差し引いた値の、インキュベート前の肥満細胞中 histamine 総量に対する割合を histamine 遊離活性 (%) とした<sup>44-47)</sup>。なお、DNP-ascaris 抗原溶液を加えずに、同操作で遊離した histamine 遊離活性を自然遊離率とした。尚、肥満細胞を含む液 0.05 mL に 0.45 mL の 0.25%ニグロシン溶液を加えて 5 分後の青染する壊死した細胞を数え、死亡細胞の割合を算出した。

#### 4-2-6 HPLC による HWex と eMMBP の成分の測定

試料 1 mg を水 1 mL に溶解し、0.45  $\mu$ m のメンブランフィルター (Advantec、Osaka、Japan) でろ過した後、10  $\mu$ L を試料とした。また MeOH と 0.02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を 30:70 (W/W) の割合で混合し、移動相溶媒とした。カラムは BENSIL 5 C18 (1.6 $\times$ 150 mm ; ベンテック、Tokyo、Japan) 用い、分析時のカラム温度は室温に保ち、移動相の流速は 1.0 mL/min に、検出波長は 254 nm に設定した。ピーク面積より各成分量を比較検討した。

#### 4-2-7 HWex の MMBP からの収率

MMBP 4 g を 100mL の 100°Cの熱水で 24 時間抽出した後、得られた HWex の凍結乾燥重量より収率を算出した。

#### 4-2-8 統計処理

結果は平均±標準偏差 (Mean±SD) であらわし、有意差検定には Bonferroni's test を用いた。危険率 5%未満 ( $p<0.05$ ) のときを有意差ありと判定した。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 肥満細胞からの Compound 48/80 誘発 histamine 遊離反応に対する eMMBP と HWex の抑制効果

Compound 48/80 誘発 histamine 遊離率は、コントロールでは  $41.3\pm 13.0\%$ 、HWex (2 mg/0.05 mL) では  $26.5\pm 9.7\%$  となり、HWex の 2 mg/0.05 mL 添加はコントロールと比較して histamine 遊離率を有意に抑制させた。HWex の抑制作用は、陽性対照薬として用いた ketotifen の 0.05 mg/0.05 mL 投与群より弱かった。また eMMBP の 2 mg/0.05 mL 添加での histamine 遊離率は  $5.4\pm 2.1\%$  となり、コントロールと比較して histamine 遊離率を有意に抑制させた。なお、陽性対照薬として用いた ketotifen の 0.05 mg/0.05 mL 投与群による抑制作用を確認した。さらに eMMBP では HWex より histamine 遊離を強く抑制し、その抑制作用は有意であった。なお、自然遊離率は  $3.4\pm 0.9\%$  であった。死細胞は 5%未満であった。(Fig. 4-1)

#### 4-3-2 肥満細胞からの DNP-ascaris 抗原誘発 histamine 遊離反応に対する eMMBP と HWex の抑制効果

DNP-ascaris 抗原誘発 histamine 遊離率のコントロールは  $29.2\pm 18.8\%$  となった。HWex の 2 mg/0.05 mL を作用させると、histamine 遊離率は  $20.1\pm 12.4\%$  となり、HWex は肥満細胞からの histamine 遊離を有意に抑制させていた。HWex の抑制作用は、陽性対照薬として用いた ketotifen の 0.05

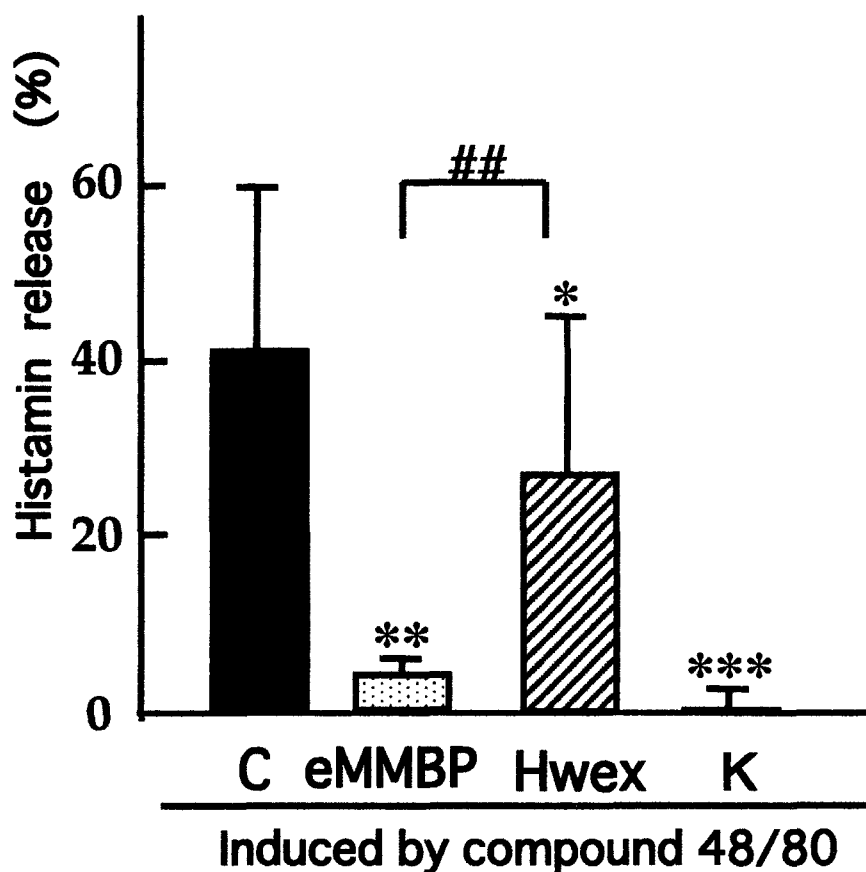
mg/0.05 mL の作用より histamine 遊離率が弱かった。また、eMMBP の 2 mg/0.05 mL を作用させると、histamine 遊離率が  $2.4 \pm 0.9\%$  となり、対照と比較して有意に抑制していた。eMMBP の抑制作用は、陽性対照薬として用いた ketotifen の 0.05 mg/0.05 mL を作用させた場合とほぼ同等であった。また、eMMBP は HWex より histamine 遊離を強く抑制し、その抑制作用は有意であった。なお、自然遊離率は  $19.3 \pm 10.1\%$  であった (Fig. 4-2)。死細胞は 5%未満であった。

#### 4-3-3 HPLC による eMMBP と HWex の成分の比較

eMMBP と HWex の HPLC クロマトグラムをそれぞれ比較すると、主に caffeic acid 含有画分である peak 1 は、eMMBP では HWex の 5~7 倍、主に hyperin 含有画分である peak 3 は、eMMBP では HWex の 3~5 倍、主に isoquercitorin 含有画分である peak 4 は eMMBP では HWex の 2~4 倍それぞれ多く含まれていた (Fig. 4-3)。一方 peak 2 は、eMMBP では HWex より少なかった。

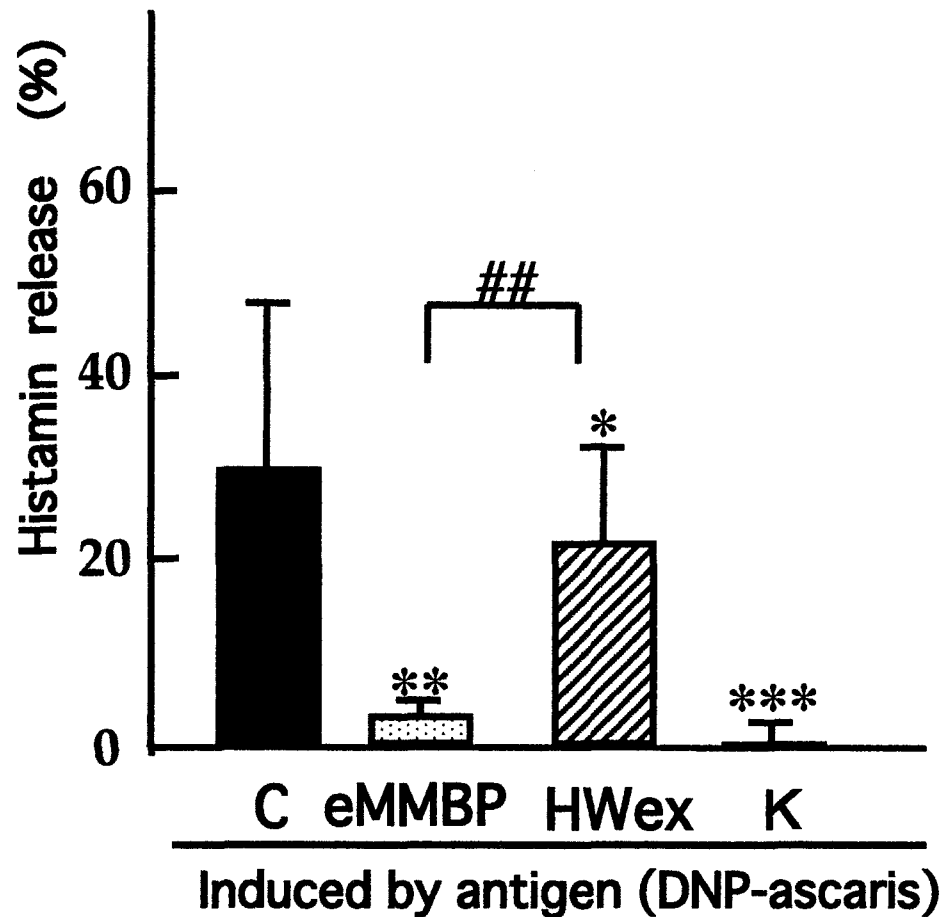
#### 4-3-4 HWex の MMBP からの収率

4 g の MMBP 原末からは 1.2 g 前後の HWex が得られ、収率は約 30%であった。



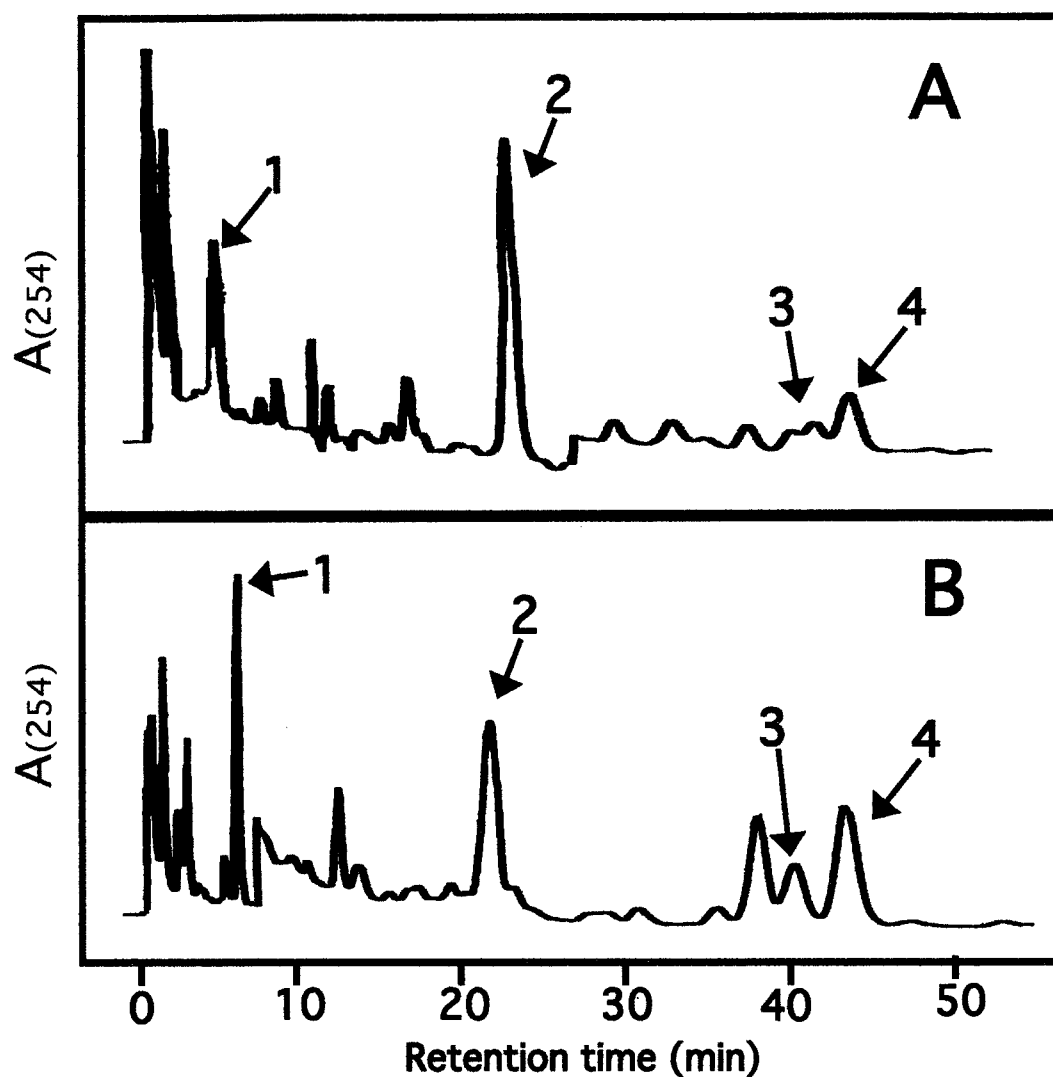
**Fig. 4-1 Effects of eMMBP and HWex on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80 (0.2  $\mu$ g/0.05mL)**

C: Control group; eMMBP : eMMBP (2 mg/0.05 mL) was added to mast cells ( $1 \times 10^5$  cells / 0.2 mL) in a tube; HWex: HWex (2 mg/0.05 mL) was added to mast cells ( $1 \times 10^5$  cells / 0.2 mL) in a tube; K: ketotifen (0.05 mg/0.05 mL) was added to mast cells ( $1 \times 10^5$  cells / 0.05 mL) in a tube. Each value (%) represents the mean  $\pm$  SD of 5 experiment (5 rats were used). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from each control group. ## $p < 0.01$ , eMMBP group significantly different from HWex group.



**Fig. 4-2 Effects of eMMBP and HWex on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by antigen (DNP-ascaris) ( $0.2 \mu\text{g}/0.05 \text{ mL}$ )**  
 C: Control group; eMMBP: eMMBP ( $2 \text{ mg}/0.05 \text{ mL}$ ) was added to mast cells ( $1 \times 10^5$  cells /  $0.2 \text{ mL}$ ) in a tube; HWex: HWex ( $2 \text{ mg}/0.05 \text{ mL}$ ) was added to mast cells ( $1 \times 10^5$  cells /  $0.2 \text{ mL}$ ) in a tube; K: ketotifen ( $0.05 \text{ mg}/0.05 \text{ mL}$ ) was added to mast cells ( $1 \times 10^5$  cells /  $0.2 \text{ mL}$ ) in a tube. Each value (%) represents the mean  $\pm$  SD of 5 experiment (5 rats were used). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from each control group. ## $p < 0.01$ , eMMBP group significantly different from HWex group.





**Fig. 4-3 HPLC chromatograms of (A) HWex and (B) eMMBP**

Peak 1: Caffeic acid; peak 2: caffeoylquinic acid; peak 3: hyperin; peak 4: isoquercitorin. Chromatographic conditions are detailed in Materials and Methods.

Analytical conditions: column, BENSIL 5C18 (1.6 × 150 mm); flow-rate, 1.0 mL/min; detection, UV at 254 nm; injection volume, 10  $\mu$  L

#### 4-4 考察

本研究では肥満細胞からの histamine 遊離反応を、DNP-ascaris 抗原による抗原抗体反応に基づく誘発と、compound 48/80 による誘発の 2 種類の方法により測定し、HWex と eMMBP の histamine 遊離阻害効果を確認した。HWex と eMMBP は、compound 48/80 もしくは DNP-ascaris 抗原により誘発される肥満細胞からの histamine 遊離を共に抑制することが示された。また histamine 遊離抑制効果は HWex と比較して eMMBP の方が顕著であることが示された。さらに compound 48/80 により誘発される肥満細胞からの histamine 遊離を、eMMBP は  $0.01 \sim 1.0 \mu\text{g}/0.05 \text{ mL}$  の用量範囲で用量依存的に抑制した (data not shown)。

従来からセルラーゼやペプチダーゼなどの酵素を用いて加工することは、細胞壁の破壊による抽出効率の向上、体内吸収を促進、果実をジュースにする液化促進、農業廃棄物軽減などの目的で行われてきた。また酵素処理の付加価値として、ポリフェノールや抗酸化活性の増加により、様々な利点が示されている。その一例として、リンゴジュースやブルーベリージュースでは製造工程でセルラーゼ等の酵素処理をすることにより、それらのジュースは酵素未処理果汁よりも多量に糖分とポリフェノールを含み、さらに廃棄物の発生を減少させることが報告されている<sup>49,50)</sup>。また、これまで家畜の餌にする、もしくは海に廃棄していた芋焼酎の搾りかすを、酵素セルロシンと麴で処理することで、カフェ酸含量とポリフェノール含量を増加させたため、その利用価値が高まったことが報告されている<sup>51,52)</sup>。本研究では MMBP を酵素処理することにより、利便性が高まるだけでなく、より強い histamine 遊離抑制効果を得ることができることを示した。また、提供された eMMBP の収率は約 40%であることが示されているが、HWex の収率は約 30%であったため、MMBP を酵素処理することは抽出効率の向上にも寄与したと考えられた。

ハーブを含む植物をはじめ漢方薬、食物など多くの天然物から抗アレルギー効果が認められている<sup>53-56)</sup>。Alcaraz ら<sup>47)</sup>によりフラボノイドの抗炎症効果が報告されており、Inoue ら<sup>45)</sup>によりペパーミント中フラボノイドの抗アレルギー効果が報告されている。さらに Hossein ら<sup>57)</sup>によりカフェ酸のアレルギー性皮膚炎および浮腫への抑制効果が報告され、カフェ酸は抗酸化活性を有することも報告<sup>58)</sup>されている。これらの報告からも、eMMBP 中のカフェ酸やフラボノイドに、強い histamine 遊離抑制効果が存在することが推測できる。MMBP からはすでに 7 種類のカフェ酸キナ酸エステルと 6 種類のフラボノイドが単離されている<sup>4)</sup>。そこで MMBP と eMMBP の histamine 遊離抑制に関する有効成分を検討するために、HWex と eMMBP のそれぞれの HPLC のクロマトチャートを比較した。それぞれの含有成分は、草野ら<sup>4)</sup>により MMBP から単離され NMR により同定された標準品を用いて、溶出時間を比較することにより検討した。その結果酵素処理をされた eMMBP は HWex より、カフェ酸、isoquercitorin、hyperin、および hyperin より溶出時間が約 2 分前の未同定物質を主に含むピークが増大していることが明らかとなった。これらの含有成分の差は、eMMBP が HWex より強い histamine 遊離抑制効果を示す要因になっているものと考えられる。フラボノイドの histamine 遊離抑制作用と構造活性相関については、アグリコン部 B 環のカテコール構造と C 環の二重構造の必要性が報告されている<sup>59)</sup>。これらの構造が isoquercitorin や hyperin にも存在するため、MMBP と eMMBP の histamine 遊離抑制作用においても isoquercitorin と hyperin が関与した可能性が考えられた。

以上より、MMBP と eMMBP の抗炎症・抗アレルギー作用における作用機序のひとつとして、肥満細胞からの histamine 遊離抑制作用が考えられ、MMBP と eMMBP に含有されるカフェ酸とフラボノイド (isoquercitrin、hyperin) が関与していることが示唆された。

## 総括

本研究から以下の結果を得た。

1. ケミカルメディエーター (histamine、substance P) と PCA 反応による血管透過性亢進反応を MMBP と eMMBP は共に抑制した。
2. 実験的鼻アレルギーに対して MMBP と eMMBP は共に抑制した。
3. DNP-ascaris 抗原感作マウスの IgE 抗体産生促進を MMBP と eMMBP は共に抑制した。
4. 肥満細胞からの histamine 遊離反応を eMMBP は HWex より強く抑制した。  
また eMMBP と HWex の成分の比較により、histamine 遊離抑制作用にはカフェ酸とフラボノイド (isoquercitorin、hyperin) の関与が推察された。

これらの研究は MMBP と eMMBP の抗炎症、抗アレルギー作用補助食品としての有効性を基礎的に裏付けるものである。なお、最近臨床的治験が進められ、MMBP と eMMBP の花粉症に対する有効性が認められた。

また以下のことが推察される。すなわち、MMBP と eMMBP は、histamine の局所投与による血管透過性亢進反応、histamine 鼻腔滴下による鼻こすり行動をそれぞれ抑制させた。さらに eMMBP のフラボノイドを主に含有する画分には、モルモット回腸の histamin 刺激による収縮に対し阻害傾向が認められ (data not shown)、 $H_1$  受容体阻害が推察された。このことから MMBP と eMMBP は、histamine 遊離抑制作用、IgE 抗体産生抑制作用ならびに  $H_1$  受容体阻害作用により抗炎症および抗アレルギー効果を示すことが推測された (Fig. 5)。

現在 I 型アレルギーに対して使用されるトラニラストやクロモグリク酸ナトリウム等に代表されるケミカルメディエーター遊離抑制薬は、天然物から単離された成分をリード化合物として創薬された医薬品であることが知られている<sup>60,61)</sup>。それらと同様に MMBP あるいは eMMBP にも抗アレルギー薬のリード化合物となる化合物を含有している可能性が考えられ、含有成分の更なる検討は新規抗アレルギー薬の開発につながるものと期待される。

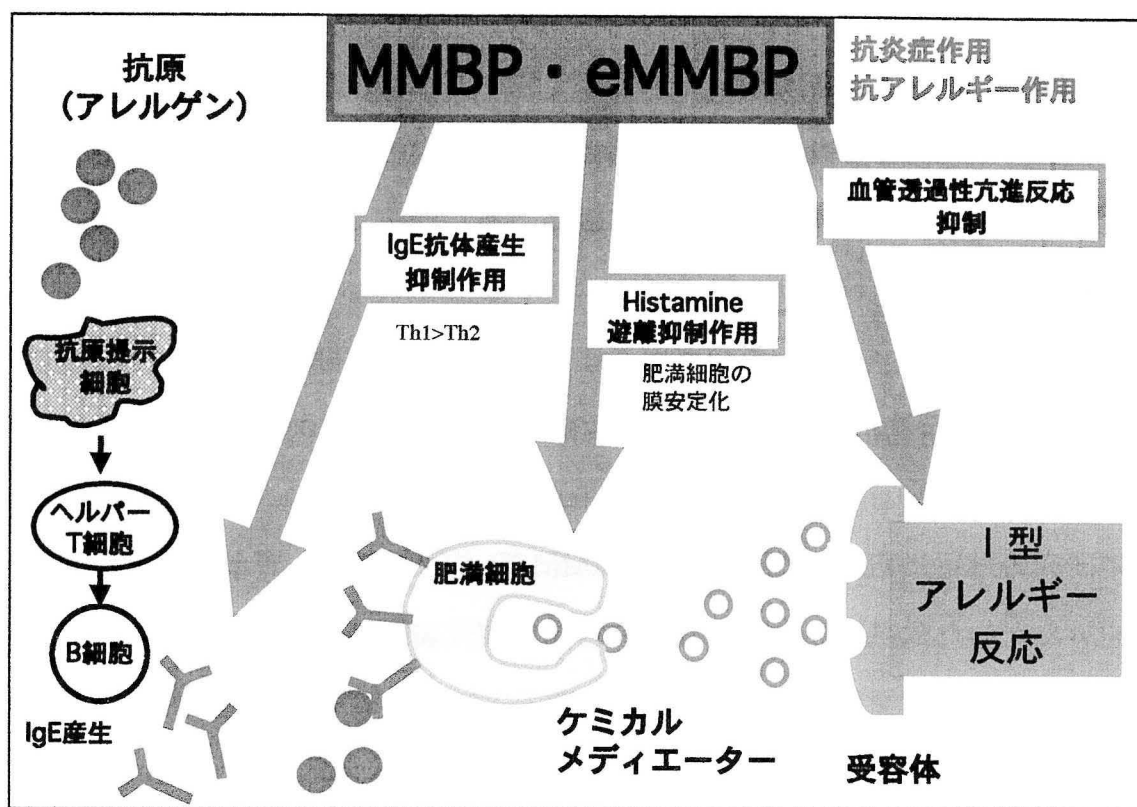


Fig. 5. MMBP および eMMBP の抗アレルギー作用の機序

## 謝辞

本研究にあたり、ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜わりご校閲をいただきました星薬科大学臨床化学教室 瀬山義幸教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究にあたり、ご校閲をいただきました星薬科大学微生物学教室 辻勉教授、ならびに、薬物治療学教室 亀井淳三教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり MMBP 及び eMMBP をご提供いただき、有益なご助言をいただいた武蔵野免疫株式会社の吉田八束代表取締役社長、櫻井美典取締役開発部長に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、ご指導ご助力賜わりました株式会社ベンテック生体機能化学研究所総括責任者の徳永彦氏に御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご指導ご助力賜わりました、星薬科大学機能形態学研究室の鎌田勝雄教授、松本貴之助教に御礼申し上げます。

本研究に際し、ご協力いただきました星薬科大学臨床化学教室の諸氏に深謝いたします。

尚、本研究は平成 16 年度および平成 17 年度沖縄産学官共同研究推進事業として、また平成 18 年度および平成 19 年度の地域コンソーシアム研究開発事業としての助成を得て行われました。

## 掲載論文目録

- 1) Anti-inflammatory and anti-allergic activity *Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF, Horiuchi M., Seyama Y., J. Health Sci., 52, 711 (2006)

1 章、3 章、4 章に用いた。

- 2) Improvement of the antiinflammatory and antiallergic activity of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF treated with enzyme (cellulosine), Horiuchi M, Seyama Y, J. Health Sci., 54, 294 (2008)

1 章、3 章、4 章に用いた。

- 3) 実験的鼻アレルギーに対する宮古ビデンスピローサ (*Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF) の抑制効果について, 堀内正子, 瀬山義幸, 生薬学雑誌, 62, 48 (2008)

2 章に用いた。

- 4) 実験的鼻アレルギーに対する酵素処理宮古ビデンスピローサ (*Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF treated with enzyme, cellulosine) の抑制効果について, 堀内正子, 瀬山義幸, 生薬学雑誌, in press

2 章に用いた。



## 引用文献

- 1) Benhura M. A. N. and Chitsikku I. C., The extractable  $\beta$ -carotene content of Guku (*Bidens pilosa*) leaves after cooking, drying and strage, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 32, 495-500 (1997)
- 2) Tan P. V., Kimo T., Dongo E, Effects of methanol, cyclohexane and methylene chloride extracts of *Bidens pilosa* on various gastric ulcer models in rats, *J. Ethnopharmacol.*, 73, 415-422 (2000)
- 3) Masuzawa, M., Masuzawa, M., Maeda, A., Miyata, T. and Katsuoka, K., Effect of Kanpo-tea on preventing ulceration of livedo reticularis with summer ulceration, *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi*, 115, 7-13 (2005)
- 4) Kusano, A., Seyama, Y., Usami, E., Katayase, T., Shibano, M., and Tsukamoto, D. and Kusano, G., Studies on the antioxidant active constituents of the dried powder from *Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCH, *Nat. Med.*, 57, 100-104 (2003)
- 5) Yamamoto, K., *Karada no Kagaku, Popoular medicine*, 252, Nippon-Hyoron-Sya Co. Ltd., Tokyo, pp.6-9 (2007)
- 6) Kosuge, T., Shishikura, H., Kitanaka, S. and Toyoshima S., Effects of Psidium Components on cytokine productions in hdlper T cells and type- I Allergy, *Yakugaku zasshi*, 120, 408-412 (2000)
- 7) Makino, T., Sasaki, S., Ito, Y. and Kano, Y., Pharmacological properties of traditional medicine (XXX): effects of gyokuheifusan on murine antigen-specific antibody production, *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 110-113 (2005)
- 8) Sala, A. M., Recio, M. C., Schinella, G. R., Manez, S., Giner, R. M., Cerda, M., and Rios. J.L. Assessment of the antiinflammatory activity and free radical

- scavenger activity of tiliroside, *Eur. J. Pharmacol.*, 461, 53-61, (2003)
- 9) Kou, J., Ni, Y., Li, N., Wang, J., Liu, L. and Jiang, Z.H., Analgesic and antiinflammatory activities of total extract and individual fractions of Chinese medicinal ants *polyrhachis lamellidens*, *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 176-180 (2005)
  - 10) Moon, T. C., Lin, C. X., Lee, J. S., Kim, D. S., Bae, K., Son, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S., Son, J. K. and Chang, H. W., Antiinflammatory activity of astilbic acid from *astilbe chinensis*, *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 24-26 (2005)
  - 11) Hossen, M. A., Shinmei, Y., Jiang, S., Takubo, M., Tsumuro, T., Murata, Y., Sugiura, M. and Kamei, C., Effect of lo han kuo (*Siraitia grosvenori* swingle) on nasal rubbing and scratching behavior in ICR mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 238-241 (2005)
  - 12) Fujii, E. and Muraki, T., Role of nitric oxide (NO) in increasing the vascular permeability induced by several inflammatory mediators in mouse skin, *Ensho*, 15, 155-160 (1995)
  - 13) Katayama, S., Shionoya, H. and Ohtake, S., A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats, *Microbiol. Immunol.*, 22, 89-101 (1978)
  - 14) Kwasniewski F., Lima W. T., Bakhle Y. S. and Jancar S., Impairment in connective tissue mast cells degranulation in spontaneously hypertensive rats: stimulus dependent resistance, *Br. J. Pharmacol.*, 124, 772-778 (1998)
  - 15) Park, E., Choo, M., Han, M. and Kim, D., Ginsenoside Rh1 possesses antiallergic and anti-inflammatory activities, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 133, 113-120 (2004)
  - 16) Matsuda, H., Samukawa, K. and Kubo, M., Anti-inflammatory activity of

- Ginsenoside Ro. *Planta Medica.*, 56, 19-23 (1990)
- 17) Jiang, S., Nakano, Y., Rahman, M., A., Yatsuzuka, R. and Kamei C., Effects of *Dictamnus dasycarpus* T. Extract on allergic models in mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 660-665 (2008)
  - 18) Akiyoshi M., Shigeoka T., Torii S., Maki E., Enomoto S., Takahashi H. and Hirano F., Pharmacological and clinical properties of levocabastine hydrochloride (eye drop and nasal spray), a selective H<sub>1</sub> antagonist, *Jpn. J. Pharmacol.*, 119, 175-431 (1995)
  - 19) Hisada T., Ishizuka T., Kurosawa M., Effect of phospholipase A2 inhibitor on substance P-induced histamine release from rat peritoneal mast cells, *Arerugi.*, 40, 555-558 (1991)
  - 20) Suzuki R., Furuno T., McKay D. M., Wolvers D., Teshima R., Nakanishi M. and Bienenstock. J, Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P, *J. Immunol.*, 163, 2410-2415 (1999)
  - 21) Maruyama H., Iimura F., Kaneko A., Kurita Y., Bando C., Murata P. and Kawaamura H., Effect of Z yumi-haidoku-to (TJ6) and Saiko-seikan-to (TJ-80) on Type I allergic reaction, *Jpn. Pharmacol Ther.*, 23, 65-69 (1995)
  - 22) Kubo M., Matsuda. H. Tokuoka K., Kobayashi Y., Ma S. and Tanaka T., Studies of anti-cataract drugs from natural sources. I. Effects of a methanolic extract and the alkaloidal components from *Corydalis tuber* on in vitro aldose reductase activity, *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 458-459 (1994)
  - 23) Koda A., Nishivori T., Nagai H., Matsuura N. Tsuchiya H., Anti-allergic actions of traditional oriental medicine--actions against types I and IV hypersensitivity reactions, *Jpn. J. Pharmacol.*, 80, 31-41 (1982)
  - 24) Hashimoto K., Yanagisawa T., Okui Y., Ikeya Y., Maruno M. and Fujita T., Studies

- on anti-allergic components in the roots of *Asiasarum sieboldi*, *Planta Med.*, 60, 124-127 (1994)
- 25) Yoshida H., Shimizu H. and Fukami S., Relation between symptom and counts of scattering Japanese cedar pollen, *Arerugi*, 45, 49-61 (1996)
  - 26) Inoue T., Sugimoto Y., Masuda H. and Kamei C., Effects of peppermint (*Mentha piperita* L.) extracts on experimental allergic rhinitis in rats, *Biol. Pharm. Bull.*, 24, 92-95 (2001)
  - 27) Nabe T., Mizutani N., Shimizu K., Takenaka H., Takenaka H. and Kohno S., Development of pollen-induced allergic rhinitis with early and late phase nasal blockage in guinea pigs, *Inflammation Research*, 47, 369-374 (1998)
  - 28) Tanaka K., Okamoto Y., Takeoka A and Ino T., Nasal allergy observed in an asthma model by toluene diisocyanate (TDI), *Arerugi*, 33, 199-206 (1984)
  - 29) Kohno H., Inoue H., Seyama Y., Yamashita S. and Akasu M., Mode of the anti-allergic action of cepharanthine on an experimental model of allergic rhinitis, *Jpn. J. Pharmacol.*, 90, 205-211 (1987)
  - 30) Kojima M., Tsutsumi N., Abe M., Komatsu H., Ujiie A., Nito J. and Nakazawa M., Experimental allergic rhinitis in rats and the influence of tranilast and antihistaminics on it. *Arerugi*, 35, 180-187 (1986)
  - 31) Kimura G., Takahashi K., "Karada no Kagaku , Popular medicine, 252," eds by Yamamoto, K, Nippon-Hyoron-sya Co. Ltd., Tokyo, pp.6-9, (2007)
  - 32) Maeda Y. M., Nagai H., Ema K., Kanda E., Okada N. and Yasue M., Effects and safety of consecutive intake of Benihuuki green tea and enhancement of the effect by ginger extract in subjects with Japanese cedar-pollinosis, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 52, 584-593 (2005)
  - 33) Metcalfe D. D., Baram K. and Mekori Y., A., Mast cells, *Physiol. Rev.*, 77, 1033-

1079 (1997)

- 34) Matsuura, N., Mori, H., Nagai, H. and Koda, A., Effects of suplatast tosilate (IPD-1151T) on antibody formations in mice, *Jpn. J. Pharmacol.*, 100, 485-493 (1992)
- 35) Koda, A., Yanagihara, Y. and Matsuura, N. IPD-1151T: a prototype drug for IgE antibody synthesis modulation, *Agents Acctions Suppl.*, 34, 369-378 (1991)
- 36) Shimojyo N., "Karada no Kagaku ,Popular medicine, 252," eds by Yamamoto, K, Nippon-Hyoron-sya Co. Ltd., Tokyo, pp.15-18, (2007)
- 37) Sato Y., Akiyama H., Suganuma H., Watanabe T., Nagaoka M., Inakuma T., Goda Y., Mitani T., The feeding of  $\beta$ -carotene down-regulates serum IgE levels and inhibits the type I allergic response in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 978-984 (2004)
- 38) Fang S., Tanaka T., Tago F., Okamoto T., Kojima S., Immunomodulatory effects of gyokuheifusan on INF-gamma/IL-4 (Th1/Th2) balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 829-833 (2005)
- 39) Kosuge T., Shishikura H., Kitanaka S. and Toyoshima S., Effects of psidium components on cytokine productions in helper T cells and type-1 allergy, *Yakugaaku Zasshi*, 120, 408-412 (2000)
- 40) Tanaka T., Hirano T., Higa S., Arimitsu J., Kawai M., Allergic diseases and flavonoids, *FFI. Journal*, 211, 568-575 (2006)
- 41) Ramiro E., Franch A., Castellote C., Perez C. F., Permanyer J., Izquierdo P. M. and Castell, Flavonoids from theobroma cacao down-regulate inflammatory mediators, *J. Agric Food Chem.*, 53, 8506-8511 (2005)
- 42) Xiao J. Z., Kondo S., Yanagisawa N., Takahashi N., Odamaki T., Iwabuchi N., Iwatsuki K., Kokubo S., Togashi H., Enomoto K., Enomoto T., Effect of probiotic *Bifidobacterium longum* BBS36 in relieving clinical symptoms and modulating

- plasma cytokine levels of japanese cedar pollinosis during the pollen seasn. A randomized double-blind, placebo-control trial, *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 16, 86-93 (2006)
- 43) Tachibana H., Kuubo T., Miyase T., Tanino, S., Yoshimoto M., Sano M., Yamamoto M. M. and Yamada K., Identification of an inhibitor for interleukin 4-induced  $\epsilon$  germline transcription and antigen-specific IgE mproduction in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 53-60 (2001)
  - 44) Ohuchi, K., Ensho to Arerugi, *Seibutsu Yakkagaku Jikken-koza*, Vol. 12, Hirokawa Publishing Co., Tokyo, pp. 371-386 (1993)
  - 45) Inoue, T., Sugimoto, Y., Masuda, H. and Kamei, C., Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 256-259 (2002)
  - 46) Zhao, Q. E., Mihara, T., Sugimoto, Y. and Kamei, C. Mechanism of bradykinin-induced histamine release from rat peritoneal mast cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 237-240 (1996)
  - 47) Alcaraz, M. and Hoult, J., Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside, on prostaglandin biosynthesis and inactivation, *Biochem. Pharmacol.*, 34, 2477-2482 (1985)
  - 48) “Todya’s Drug Therapy in 2008” eds by Mizushima Y., Nankodo Co. Ltd., Tokyo, pp.320-332, (2008)
  - 49) Dongowski G. and Sembries S., Effects of commercial pectololytic and cellulolytic enzyme preparations on the apple cell wall, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4236-4242 (2001)
  - 50) Kim Y. J., Kim D. O., Chun O. K., Shin D. H., Jung H., Lee C. Y. and Wilson K. B., Phenolic extraction from apple peel by cellulases from *thermobifida fusca*, *J.*

- Agric. Food Chem., 53, 9560-9565 (2005)
- 51) Yoshimoto M., Azuma K. R., Jujii M., Hou. D. X., Ikeda K., Yoshidome T. and Osako M., Phenolic composition and radical scavenging activity of sweetpotato-derived shocyu distillery by-products treated with koji, Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 2477-2483 (2004)
- 52) Yoshimoto M., Azuma. R., Fujii M., Hou D. X., Ikeda K., Yohidome T. and Osaka M., Enzymatic production of caffeic acid by koji from plant resources containing caffeoylquinic acid derivatives, Biosci. Biotechnol. Biochem., 69, 1771-1781 (2005)
- 53) Makino, T., Sasaki, S., Ito, Y. and Kano, Y., Pharmacological properties of traditional medicine (XXX): effects of gyokuheifusan on murine antigen-specific antibody production, Biol. Pharm. Bull., 28, 110-113 (2005)
- 54) Kou, J., Ni, Y., Li, N., Wang, J., Liu, L. and Jiang, Z.H., Analgesic and antiinflammatory activities of total extract and individual fractions of Chinese medicinal ants *Polyrhachis lamellidens*, Biol. Pharm. Bull., 28, 176-18 (2005)
- 55) Pereira, R. L. C., Ibrahim. T., Lucchetti. L., Silva, A. J. R. and Moraes, V. L. G., Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L, Immunopharmacology, 43, 31-37 (1999)
- 56) Moon, T. C., Lin, C. X., Lee, J. S., Kim, D. S., Bae, K., Son, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S., Son, J. K. and Chang, H. W., Antiinflammatory activity of astilbic acid from *Astilbe chinensis*, Biol. Pharm. Bull., 28, 24-26 (2005)
- 57) Hossen, M. A., Inoue, T., Shinmei, Y., Minami, K., Fujii, Y. and Kamei C., Caffeic acid inhibits compound 48/80-induced allergic symptoms in mice, Biol. Pharm. Bull., 29, 64-66 (2006)

- 58) Nardini M., Natella F., Gentili V., Felice M D. and Scaccini C., Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: an in vivo study, *Arch. Biochem. Biophys.*, 342, 157-160 (1997)
- 59) Kamei C., Inoue T. Masuda H., Effect of peppermint extract on allergic rhinitis, *Bio. Industry*, 12, 20-28 (2005)
- 60) Matsuura, N., Mori, H., Nagai, H. and Koda, A., Effects of suplatast tosilate (IPD-1151T) on antibody formations in mice, *Jpn. J. Pharmacol.*, 100, 485-493 (1992)
- 61) Koda, A., Yanagihara, Y. and Matsuura, N., IPD-1151T: a prototype drug for IgE antibody synthesis modulation, *Agents Actions Suppl.*, 34, 369-378 (1991)