

氏 名（本 籍）	堀 内 正 子	（東京都）
学 位 の 種 類	博士(薬学)	
学 位 記 番 号	乙 第175号	
学位授与年月日	平成21年3月16日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	宮古ビデンスピローサ (<i>Bidens pilosa</i> L. var. <i>radiata</i> SCHERFF) の抗炎症・抗アレルギー効果	
論 文 審 査 委 員	主 査	教 授 瀬 山 義 幸
	副 査	教 授 辻 勉
	副 査	教 授 亀 井 淳 三

論文内容の要旨

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、肝炎などに対する伝承薬物として、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。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壤に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規格化されている。近年 MMBP は、夏季潰瘍 (Livedo reticularis with summer ulceration、微小血管の血行障害を伴い夏季に再発する有痛性潰瘍) に対して、再発予防効果を示すことが臨床的に報告されている。また MMBP から6種類のカフェ酸キナ酸エステルと7種類のフラボノイドが単離され、それぞれの抗酸化作用も報告されている。一方、コセンダングサには抗炎症効果があり、胃潰瘍抑制効果があると報告されている。また、フラボノイドやカフェ酸には抗炎症作用や抗アレルギー作用のあることが報告されていることから、MMBP にも抗炎症効果や抗アレルギー効果があると推察される。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。しかし MMBP と eMMBP 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ことから、本研究では動物実験により(1)MMBPとeMMBPの抗炎症効果と抗アレルギー効果(2)MMBPとeMMBPの鼻アレルギー抑制効果、さらにMMBPとeMMBPの抗炎症および抗アレルギー効果の作用機序を解明するために、(3)MMBPとeMMBPのIgE抗体産生抑制効果(4)MMBPの熱水抽出物(HWex)とeMMBPの肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制効果についてそれぞれ検討した。

(1)皮膚の炎症に対するMMBPとeMMBPの抑制効果を検討するために、ケミカルメディエーターあるいは受動的皮膚アナフィラキシー(PCA)により誘発される血管透過性亢進反応について検討した。すなわち7週齢Wistar/ST系雄性ラットにMMBPあるいはeMMBPを経口投与し、その1時間後にケミカルメディエーターであるヒスタミンあるいはサブスタンスPをラット背部に皮内投与し、その直後に青色色素を尾静脈投与して1時間後に背部皮下に漏出した色素量を血管透過性亢進反応の指標として測定した。MMBPとeMMBPはヒスタミンとサブスタンスP誘発血管透過性亢進反応を抑制した。またPCA反応に対するMMBPとeMMBPの抑制効果を検討するため、7週齢Wistar/ST系雄性ラットにMMBPあるいはeMMBPの混合粉末飼料を給餌し経口摂取させた。経口摂取開始10日後、ラットの背部に抗DNP(dinitrophenylated)-ascaris抗体を皮内投与し、48時間後にDNP-ascaris抗原と青色色素の混液を尾静脈投与することによりPCA反応を惹起した。30分後皮下に漏出した色素量を血管透過性亢進反応の指標として測定した。その結果MMBPとeMMBPはPCA反応による血管透過性亢進反応を抑制した。これらよりMMBPとeMMBPはヒスタミン、サブスタンスPあるいは抗原抗体反応による血管透過性亢進反応をそれぞれ抑制したため、皮膚の炎症もしくはアレルギーに対して抑制効果があるものと考えられる。

(2)代表的な特型アレルギーの鼻アレルギーに対するMMBPとeMMBPの抑制効果について検討するため、ヒスタミン誘発鼻アレルギー、TDI(toluene-diisocyanate)誘発鼻アレルギーおよびOVA(ovalbumin)感作アレルギー性鼻炎の各モデルを作製した。すなわちヒスタミン誘発鼻アレルギーでは、7週齢Wistar/ST系雄性ラットにMMBPあるいはeMMBPを経口投与し、その1時間後にラットの両鼻腔にヒスタミンを滴下して引き起こされた鼻こすり行動を経時的にカウントした。その結果、MMBPとeMMBPは鼻こすり行動をそれぞれ抑制した。次にTDI誘発鼻アレルギーは、500g前後Hartley系雄性モルモットの両鼻腔にTDI溶液を5日間連続で滴下し感作することで作製した。3週間後にMMBPあるいはeMMBPを経口投与し、その1時間後に再びTDI溶液をモルモットの両鼻腔に滴下することで誘発されたくしゃみと鼻汁分泌を比較検討するため、経時的にくしゃみ回数をカウントし、鼻汁量を測定した。MMBPとeMMBPはくしゃみ回数と鼻汁量を減少させた。また、

OVA 感作アレルギー性鼻炎は、7 週齢 Wistar/ST 系雄性ラットに OVA-アラム乳剤で感作し、追加免疫を 2 回行うことにより作製した。初回感作から 3 週間後、MMBP あるいは eMMBP を経口投与し、その 1 時間後に鼻腔灌流を開始した。青色色素を尾静脈投与後、OVA 抗原溶液を鼻腔灌流することで抗原抗体反応を惹起した。鼻腔血管透過性亢進反応の指標とするために、外鼻腔から流出する灌流液を採取し青色色素漏出量を測定した。その結果 MMBP あるいは eMMBP は、OVA の抗原抗体反応による血管透過性亢進反応をそれぞれ抑制した。これらのことより、MMBP と eMMBP は鼻アレルギーにも抑制効果を示すことが認められた。

(3) MMBP と eMMBP の作用機序解明のために IgE 抗体産生抑制効果について検討した。4 週齢の BALB/c 雄性マウスに DNP-ascaris 抗原-アラム乳剤を腹腔内投与し感作すると同時に MMBP と eMMBP を 5 日間経口投与した。10 日後に採血し、血清中の IgE 値を測定した。MMBP と eMMBP は DNP-ascaris 抗原で感作したマウスに対し、IgE 抗体産生亢進抑制効果を示した。これより、IgE 産生抑制作用が MMBP と eMMBP の抗アレルギー作用の要因となっていることが考えられた。

(4) ラット腹腔性肥満細胞に HWex あるいは eMMBP を処理して、compound 48/80 もしくは DNP-ascaris の抗原抗体反応により誘発される肥満細胞からのヒスタミン遊離量を測定し、HWex と eMMBP の抑制効果を検討した。その結果、HWex と eMMBP には共に強いヒスタミン遊離抑制作用のあることが明らかとなり、肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用が、MMBP と eMMBP の抗アレルギー作用の要因となっていることが示唆された。また eMMBP の抑制効果は、HWex と比較して顕著であった。HPLC を用いた解析の結果から、eMMBP は HWex よりカフェ酸、イソクエルシトリン、ハイペリンの含量が多いことが明らかとなった。このことから、MMBP と eMMBP のヒスタミン遊離抑制効果には、主に、カフェ酸、イソクエルシトリン、ハイペリンが関与していると推察される。

以上より、MMBP と eMMBP の抗炎症効果と抗アレルギー効果が明らかとなった。これらの研究成果は MMBP と eMMBP の抗アレルギー作用補助食品としての有効性の基礎的な裏付けとなるものであると考えられる。また、現在(特)型アレルギーに対して使用されているトラニラストやクロモグリク酸ナトリウムなど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が、MMBP にも新しい抗アレルギー薬のリード化合物となる成分が含有されている可能性が期待できる。

論文審査の結果の要旨

ビデンスピローサ (*Bidens pilosa*) 種で変種の多いコセンダングサ (*Bidens pilosa* L.) 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) はアメリカから沖縄県の島々に広められた。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壤に緑肥のみで独自の手法で栽培し、これを宮古ビデンスピローサと呼び、その地上茎葉を蒸す、煉る、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(MMBP)と称した。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が、抽出効率をより高めるためセルロシンを用いて酵素処理する改良が加えられ健康食品用の錠剤として市販されている(これを enzyme-treated MMBP; eMMBP と称した)。これらは性状、細菌数、ミネラル分、毒性試験等多項目で規格化されている。従来、治療が困難な夏季潰瘍(微小血管の血行障害を伴い夏季に再発する有痛性潰瘍)に対し、MMBPはこの疾患の再発予防効果が臨床的に認められ、MMBPの生理活性が注目されている。すでに、MMBPにはカフェ酸、カフェ酸キナ酸エステル、フラボノイド等の存在や抗酸化作用が報告されている。さらに、カフェ酸やフラボノイドには抗炎症作用や抗アレルギー作用が報告されていることから、MMBPやeMMBPにも抗炎症効果と抗アレルギー効果があると推測される。そこで、本論文ではMMBPとeMMBPの1)抗炎症と抗アレルギー効果、2)鼻アレルギー抑制効果、3)IgE抗体産生抑制効果、4)肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制効果について、それぞれ検討した。その結果、1)ヒスタミンやサブスタンスP誘発皮膚血管透過性亢進反応をMMBPとeMMBPは抑制し、これらに抗炎症効果が認められた。また、抗DNP(dinitrophenyl)-ascaris抗体とDNP-ascaris抗原の反応、すなわち、受動的皮膚アナフィラキシー(PCA)反応誘発血管透過性亢進反応をMMBPとeMMBPは抑制し、これらに抗アレルギー反応が認められた。2)ヒスタミン誘発鼻こすり行動をMMBPとeMMBPは抑制し、Toluene-diisocyanate誘発くしゃみ回数と鼻汁量をMMBPとeMMBPは抑制した。また、OVA(ovalbumin)感作後、OVA抗原溶液を鼻腔灌流で誘発させた血管透過性亢進反応をMMBPとeMMBPは抑制した。これらから、MMBPとeMMBPに鼻アレルギー抑制効果のあることが示された。

次にMMBPとeMMBPの作用機構を検討した。その結果、3)DNP-ascaris感作後のIgE抗体産生亢進反応をMMBPとeMMBPは抑制すること、さらにラット

腹腔由来肥満細胞からのCompound48/80またはDNP-ascarisの抗原抗体反応により誘発されるヒスタミン遊離亢進反応をMMBPの熱水抽出物 (HWex) とeMMBPは抑制した。eMMBPの抑制効果はHWexより顕著であり、この要因として、eMMBPの抽出効率がHWexより良いこと、eMMBPはHWexよりカフェ酸、イソクエルシトリン、ハイペリン含量が多いことが推測された。

本研究により、MMBPとeMMBPの抗炎症、抗アレルギー効果が認められ、これらの研究成果はMMBPとeMMBPの抗アレルギー作用補助食品としての有効性を裏付けるものと考えられ、また、含有成分が抗アレルギー薬のリード化合物として期待される。従って、本論文は博士（薬学）の学位論文に十分値するものと判定した。