

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510268

研究課題名(和文) 抗ストレス性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

研究課題名(英文) Development of an assay method to search for compounds inhibiting stress-enhanced allergy

研究代表者

石黒 京子 (ISHIGURO, Kyoko)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：70151363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー性疾患は、ストレスにより重症化あるいは再発することが知られている。そこで、ストレスが血流を左右する要因の一つとして知られていることに着目し、演者らが先に開発した卵白リゾチーム感作マウスのアレルギー開始段階における血流量低下に関する研究成果をもとに、ストレスにより重症化する複雑なアレルギーを、血流を指標として総合的に評価できる新たなin vivoアッセイ法を開発した。さらに主にストレスやアレルギー性の疾患に用いられる生薬類を評価し、本法がストレス性のアレルギーを評価できるin vivoアッセイ法として応用可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Allergic disorders, such as atopic dermatitis and asthma, become severe or relapse by stress. Since stress is an important factor affecting blood stream, we have developed a new assay system based upon our findings on lowering blood stream at an induction phase of allergy in mice sensitized by egg-white lysozyme (HEL).

Using this novel assay system, we evaluated natural herbal medicines that are clinically used to treat stress or allergic disorders. Our model should be useful for identifying potential anti-stress-enhanced allergy drugs.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：アレルギー ストレス 血流量 卵白リゾチーム (HEL) アッセイ法の開発

1. 研究開始当初の背景

喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患は年々増加しており、現在我が国の罹患率は人口の約 30%とされている。従ってこれに対する有効な医薬品を開発することは、今なお重要な課題である。そしてこれらのアレルギー反応を阻害する物質を天然資源から探索するためには、作用を評価するための優れた実験モデルを考案することが必須である。我々はこのような着想のもとに、これまでの科研費補助金により卵白リゾチーム (HEL) を用いて、I 型アレルギー (アナフィラキシー) を短期間に誘発するマウスモデルの開発を手掛け、数種の *in vivo* アッセイ法やスクリーニング法の確立を行ってきた。¹⁾

さらに、上記のアナフィラキシーの重篤化メカニズムを追求する過程で、1 回のみ HEL 感作直後から、すなわちアレルギーの開始段階 (induction phase) から、末梢血管の血流量が、9 日間で血圧の関与無しに平常血流量の約 70% まで、有意に再現性よく低下する現象を発見した (図 1)。一般的に血圧と血流量は表裏で関連していることからこれは希有な現象であり、アレルギーと血流量の相関を証明した初めての例であった。そこでこの血流量低下を応用し、アレルギー予防物質探索のための *in vivo* アッセイ法²⁾を構築し、既存のアレルギー治療薬に対する有効性を確認すると共に、天然資源からアレルギーを予防する多くの新規リード化合物を発見した。³⁻⁵⁾またこの血流量低下が、血管内皮細胞や血小板、好中球などが関与し、COX-1, -2, PGI₂, TXA₂, ET-1, 顆粒球エラストラーゼ, NO および iNOS などが関連して生じる複雑なメカニズムに因ることを明らかにし、⁶⁾全身性の炎症性アレルギーを評価できる唯一の *in vivo* アッセイ法として、独創的な方法でアレルギー治療薬の開発に貢献できることを確認してきた。

一方で、これらの研究を進めるうち、ストレスがアトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギーを重症化・再発させることが知られるようになってきた。ストレスは癌をはじめとする多くの疾患のリスクファクターとなることが知られているため、研究は盛んに行なわれ、種々の細胞応答シグナル修飾因子などの役割も明らかになりつつあったが、ストレスが関与するアレルギーの治療薬やこれを開発するための有効な *in vivo* 評価系はなかった。そこでストレスが血流を低下させる要因の一つとして知られていることから、先の我々の血流とアレルギーに関する独自の研究成果をもとに新たな評価系開発への着想に至った。

2. 研究の目的

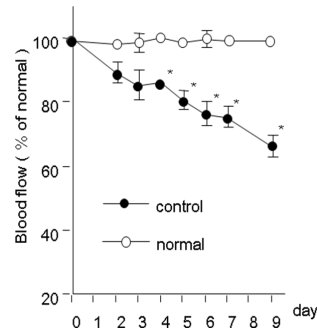


図 1 血流量モニタリング

● : control (HEL-sensitized ddY mice), ○ : normal (nontreated ddY mice)

本申請では、以下の手順に従って、新たに「ストレスが関与するアレルギー反応を阻害するシーズ探索のための、血流量を指標とした *in vivo* アッセイ法の開発」を行い、さらに本法を応用して「天然から新規メカニズムによる副作用の少ない阻害物質の探索」を目指す。またストレス状態での血流量低下のメカニズムを解明することにより、アレルギーの軽減と患者の QOL 向上に貢献することを目的とする。(図 2)

- 1) ストレスとアレルギーの併発を反映する病態モデルマウスの作製。
- 2) 作製した病態モデルマウスを用いて血流量を指標とする *in vivo* アッセイ系の構築にむけての種々の検討。
- 3) 作製したアッセイ法の位置づけを明確化。

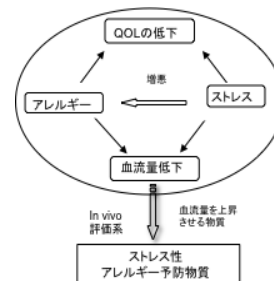


図 2 ストレスとアレルギーの関連性

3. 研究の方法

(1) 感作法: 前報と同様に、ddY マウスを 12.5 μg, 25, 50 μg/head の卵白リゾチーム (HEL) を腹腔内投与し、感作した。

(2) 血流量モニター: 前報と同様にマウスの尾部皮下の動脈微循環の血流量を、無麻酔下、非接触型レーザー血流計を用いて、感作日を 0 日目として 9 日目まで連日、血流量を 10 分間測定し、無処置群と比較した。データは、実験開始前 10 分間測定した各マウスの平均血流量に対する割合 (%) の平均値 ± 標準誤差で表わし、Dunnnett's 法 (Bonferroni 補正) を用いて統計学的処理を行なった。

(3) ストレス負荷法: Castilla-Ortega Eらの方法を改変し、空気穴を開けた遠心チューブ(内径2.8cm×長さ11.2cm)内にマウスを、1日60または90分間拘束し、5~10日間、連日ストレスを負荷した。

(4) 感作液の抗原量の検討: HEL 50 µg(先と同様)および25、12.5 µg/headの3種の感作液を腹腔内投与して感作し、前報¹⁾と同様にマウスの尾部皮下の静脈微小循環系の血流量を無麻酔下、レーザー血流量計を用いてモニターした。

(5) ストレス負荷条件の検討: HEL 濃度(12.5 µg)で感作し、60分/dayあるいは、90分/dayの拘束ストレスを8日間負荷した際の血流量をモニターした。

(6) 各種生薬エキスの調製: ストレス性疾患および瘀血に臨床使用される以下の生薬(栃本天海棠)20gを30%エタノールで一昼夜抽出した後、減圧濃縮して各収量のエキスを得た。

生薬名	エキス量(g)	生薬名	エキス量(g)
ブクリョウ	0.41	トウニン	1.30
ケイヒ	0.66	ボタンビ	3.86
サンシシ	3.72	シャクヤク	6.84
サイコ	0.73	トウキ	6.84

(7) 新規アッセイ法を用いた活性試験: 上記の生薬エキスを、感作日(0日目:感作の1hr前)、3および6日目に100 mg/kgで経口投与した。各日とも血流測定後に投与し、その1hr後にストレス負荷した。0日目から9日目にかけて徐々に低下する血流量を、水投与群(コントロール)の血流量低下と比較した。データは実験開始前日に測定した各マウスの平常血流量に対する割合(%)の平均値±標準誤差(n=5)で表し、有意差検定はDunnettの多重比較テストを用い、Bonferroniで補正した。

4. 研究成果

(1) ストレスのみによる血流量への影響

ストレスのみを負荷したマウスの血流量は、無処置マウスに比較して約80%の有意な低下が見られた。またこの際の血中コルチゾール量も有意に増加することを確認した。

(2) HEL 感作マウスへのストレス負荷の影響(図3)

前報と同条件の感作マウスに心理的ストレスを負荷し、血流量に及ぼす影響を観察した。その結果、感作マウスと感作マウスにストレス負荷を行った場合の有意差が

確認できなかった。これは感作のみのマウスの血流量が低下しすぎるためと考えられた。この場合の有意差は、今後の実験に不可欠であることから、まず抗原(HEL)量の検討を行った。

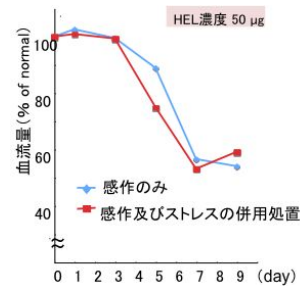


図3 感作群と感作及びストレスの併用処置群の末梢血流量の比較

(3) 感作液のHEL濃度の検討(図4)

感作による血流量低下はHEL量にほぼ依存した。HEL 25 µgでは、50 µg(前報¹⁾の抗原量)とほぼ同程度の低下が認められ、12.5 µgでは緩やかな血流量低下を示した。最終的にHEL 12.5 µgにおいても感作が成立し、induction phaseにおける血流量低下を確認できることを明らかにした。

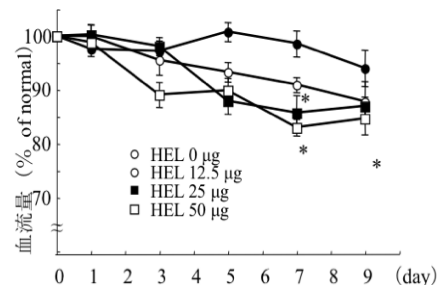


図4 HEL濃度と血流量低下の関係
Data was mean ± SE (n=5). * p<0.05, vs 無処置, Dunnett test with Bonferroni

(4) ストレスを負荷条件の検討

前述の直接床電撃刺激法にくらべ、比較的緩和なストレス負荷方法とされる既存の下記の①~のストレスを負荷し、血流量を測定し、いずれもストレス未処置の場合と比較し、再現性、操作の簡便さなどを検討した。

コミュニケーションボックスを用いた精神的ストレス

はさみでひげを短く切る

過密飼育(10匹用ケージで20匹飼育)

Castilla-Ortega Eら⁶⁾の方法: 空気穴をあけた50mlの遠心ピニールチューブにマウスを3時間拘束し、21日間継続する。

その結果、①~では十分な血流量低下が確認できなかった。の方法が適当と思われたが、拘束時間が長かったため、苦痛緩和および操作簡便化を目的に、拘束時間を90分に

短縮したところ、ストレス+感作群の血流量は5日目から、10日目まで無処置群に対して有意な低下を示した。そこで以下の実験は我々が考案したCastilla-Ortega E₃⁶⁾の改変法を用いることに決定した。すなわち、遠心チューブ(直径2.8cm、長さ11.2cm)に90分間/day拘束し、これを10日間続ける。

(5) アレルギー開始段階の血流低下に及ぼすストレス負荷の影響

ストレス負荷のみ群及び感作のみ群では血流量はほとんど変化しなかったが、HEL濃度を12.5 µgに減じて感作し、上記のストレス負荷群(感作マウス+ストレス負荷)では血流量が5日目まで有意に低下し、両者の血流量低下に、確実に有意差が出ることを確認した。(図5)

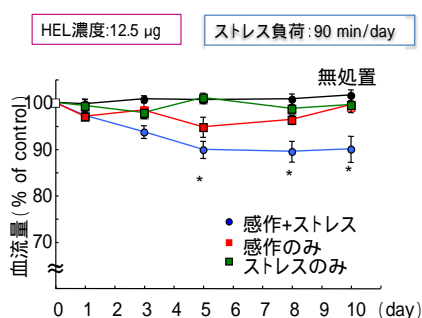
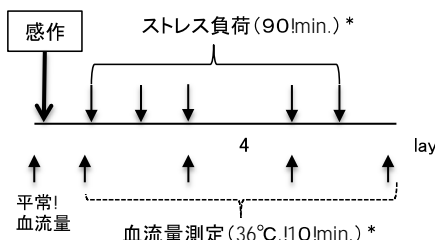


図5 HEL感作およびストレス負荷の影響

(6) 病態モデルマウスの作製と実験スケジュールの決定

苦痛緩和および操作簡便化を目的に、拘束時間をさらに60分間に短縮したところ、ストレス+感作群の血流量は徐々に低下したが、10日目まで有意差が出なかった。そこで、病態モデルマウスとして、以下、マウス1匹当たり12.5 µgのHELで感作し、1日90分間の拘束ストレスを、4日目を除く5日間連続負荷することにした。

さらに*in vivo*アッセイ系の実験スケジュールを以下の図に示すように決定した。なお、血流量測定を行う日は測定後、負荷を行った。



(7) アッセイ法による生薬類の評価 確立したアッセイ系の位置づけと評価

を目的に、活血を目的としないがストレス性の疾患に用いられる生薬(ブクリョウ、サンシシ、サイコ、ケイヒ)の血流量におよぼす影響を検討した。これらの生薬は、先の「感作のみの血流量低下」を指標とした方法では、効果が見られなかったが、今回確立した上記のアッセイ法ではコントロール群(水投与群)に対し、有意な血流改善効果を示した。また、駆瘀血生薬(シャクヤク、トウキ、トウニン、ボタンピ)を投与した群においても、有意な血流改善効果が見られた。

従って、本法はアレルギー、ストレスおよび瘀血(炎症)が複雑に係る病態を評価できる*in vivo*アッセイ法として応用可能なことが示唆された。

総括

これまで、ストレスが関連するアレルギーに有効な*in vivo*評価系がなかったため、有効な治療薬を天然から探索することが困難であった。今回開発したアッセイ法は、これらを解決する唯一のものであり、本研究の独創的な点である。今後、ストレスによるアレルギーの増悪化メカニズムの解析および治療物質の探索に加え、ストレスによる瘀血病態の悪化、さらには瘀血とアレルギー重症化の関連の解明にも繋がると考える。また、本法により天然から探索される天然シーズは、難治性のストレス性アレルギーに対して広範囲な予防と治療を可能とする。さらに得られた活性物質は、従来の単なる抗酸化物質や、副作用が懸念される既存の抗うつ薬等とは異なり、新しいメカニズムによる天然由来の副作用の少ない抗ストレス性アレルギー薬になる可能性が高いと考える。

今後、治療標的分子を解明することにより、新しい*in vitro*の評価系にも発展させることができ、ストレスにより悪化する多くのアレルギー病態に、効率良く対応できる新しい治療戦略として医薬品開発に貢献できることを確信している。

[参考文献]

- 1) Kyoko Ishiguro, Yukiko Ohira and Hisae Oku, *Biol. Pharm. Bull.*, **25** (4), 505-508 (2002).
- 2) Ishiguro K., Oku H., et.al., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1490-1495 (2005).
- 3) Y. Ogawa, H. Oku, E. Iwaoka, M. Iinuma, K. Ishiguro, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 675-678 (2007).
- 4) E. Iwaoka, H. Oku, M. Iinuma and I. K., *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 714-716 (2010).
- 5) K. Ishiguro, H. Oku, E. Iwaoka, M. Iinuma, *Planta Medica*, **76**, 1345 (2010).
- 6) Hisae Oku, Yuko Ogawa, K. Ishiguro *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1324-1328

(2007).

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計7件)

Ogino N., Uno Y., Hisano M., Kitaaki H., Ishiguro K., Oku H., Itoh H., Development of Environmental Control Method for Rapid Production of High Quality *Hedyotis diffuse*, 査読無, Preprints of the 2013, IFAC Bio-Robotics Conference, USB

伊藤博通、宇野雄一、荻野伸佑、久野正貴、石黒京子、奥尚枝、光条件が白花蛇舌草のイリドイド含量に与える影響、農業機械学会関西支部報, 114, 5 (2013).

Iwaoka E., Oku H., Iinuma M. and Ishiguro K. Development and application of the New in vivo Assay Method for the Allergy-Preventive Substances, 査読有, Ann. Proc. Gifu. Pharm. Univ., 60, 11-22.

Oku Hisae, Ogawa Yuko, Iwaoka Emiko, Yamaguchi Y., Kagota Satomi, Shinozuka Kazumasa, Kunitomo Masaru and Ishiguro Kyoko, Preventive effects of the extract of Kinka-cha, a folk tea, on a rat model of metabolic syndrome, J. Nat. Med. 査読有, 65 巻, 2011, 610-616.

Oku Hisae, Ogawa Yuko, Iwaoka Emiko and Ishiguro Kyoko, Allergy-preventive effects of Chlorogenic acid and Iridoid Derivatives from Flower Buds of *Lonicera japonica*, Biol. Pharm. Bull. 査読有, 34 巻, 2011, 1330-1333.

Ishiguro Kyoko and Oku Hisae, Allergy-preventive effects of flowers of *Campsis grandiflora*, Plant. Med. 査読有, 76 巻, 2010, 1345-1345.

Iwaoka Emiko, Oku Hisae, Iinuma Munekazu and Ishiguro Kyoko, Allergy-preventive effects of the flowers of *Impatiens textori*, Biol. Pharm. Bull., 査読有, 33 巻, 2010, 714-716.

〔学会発表〕(計21件)

Kyoko Ishiguro, Midori Okumura, Megumi Miyawaki, Hisae Oku, Development of an assay method to search for compounds inhibiting stress-enhanced allergy, 62th International Congress and Annual Meeting for Medicinal Plant and

Product Research, 2014 年 8 月, ミンホ大学, ポルトガル.

Hisae Oku, Kana Maruyama, Teruyo Yagi, Kyoko Ishiguro, Mechanism of the purgative action of multiflorin A, 62th International Congress and Annual Meeting for Medicinal Plant and Product Research, 2014 年 8 月, ミンホ大学, ポルトガル.

伊藤博通、宇野雄一、黒木信一郎、久野正貴、中野かおり、石黒京子、奥尚枝、植物工場における白花蛇舌草の栽培環境制御技術の開発、第73回農業食料工学会年次大会、2014年5月16日、琉球大学、沖縄

奥尚枝、奥村翠、宮脇恵、石黒京子、ストレス性アレルギーを抑制する物質の探索を目的としたアッセイ法の開発と応用、2014年3月、日本薬学会第134年会、熊本大学

中野かおり、伊藤博通、宇野雄一、黒木信一郎、久野正貴、石黒京子、奥尚枝、白花蛇舌草の栽培環境制御技術の開発、農業食料工学会関西支部第131回例会、2014年3月28日、大阪府立大学、大阪

奥尚枝、丸山加菜、八木照世、石黒京子、マルチフロリンAの瀉下発現メカニズムに関する研究、2013年11月2日、第5回食品薬学シンポジウム、京都大学、京都

久野正貴、伊藤博通、宇野雄一、荻野伸祐、中野かおり、石黒京子、奥尚枝、白花蛇舌草の栽培環境制御技術の開発、日本生物環境工学会、2013年9月、高松大会

伊藤博通、宇野雄一、荻野伸祐、久野正貴、石黒京子、奥尚枝、光条件が白花蛇舌草のイリドイド含量に与える影響、2013年3月、農業機械学会関西支部 第129回例会.

阿部文由香、奥尚枝、森永紀、正山征洋、石黒京子、マルチフロリンAの瀉下発現メカニズムに関する研究(第6報)、第63回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013年3月、同志社女子大学、京都

Hisano M., Uno Y., Ogino N., Kitaaki H., Ishiguro K., Oku H., Itoh H., Development of Environmental Control Method for Rapid Production of High Quality *Hedyotis diffuse*, The 2013 IFAC Bio-Robotics Conference.

奥尚枝、中原優華、里見彩、重松亨、石黒京子、薬用資源の超高压処理を応用した新機能探索(第2報)-センブリについて-、日本薬学会第133年会、2013年3月27~30日、パシフィコ横浜会議センター、横浜市

奥尚枝、石黒京子、抗かゆみ物質の探索を目的としたアッセイ法の開発と応用、第19回天然薬物の開発と応用シンポ

ジウム、2012年11月、大阪
里見彩、奥尚枝、重松亨、石黒京子、
薬用資源の超高压処理を応用した新
機能探索(第1報)、第62回日本薬
学会近畿支部総会・大会、2012年10
月20日、武庫川女子大学、兵庫県
木村涼、丸山加菜、奥尚枝、石黒京
子、マルチフロリン A の瀉下活性発
現メカニズムの解明(第5報)-機能性
タンパク質の解析-、第62回日本薬
学会近畿支部総会・大会、2012年10
月20日、武庫川女子大学、兵庫県
石黒京子、奥尚枝、Antipruritic and
allergy-preventive effects of the
petals of *Hypericum patulum*、第9
回薬物の分子設計と開発に関する日
中合同シンポジウム、2012年9月
21~24日、桂林市、中華人民共和國
荻野伸祐、伊藤博通、宇野雄一、久
野正貴、北秋広徳、石黒京子、奥尚
枝、薬用植物の栽培環境制御技術の
開発 I、農業環境工場関連学会2012年
大会

Oku Hisae and Ishiguro Kyoko,
Antipruritic effects of the petals of
Hypericum patulum, 13th
International Congress of the
Society for Ethnopharmacology、
2012年9月2~6日、クラーツ、オ
ーストリ

奥尚枝、丸山加菜、八木照世、松永
久美、萩中淳、石黒京子、マルチフ
ロリン A の瀉下活性メカニズムの解
明(第4報)-受容性タンパク質の解
明-、日本薬学会第132年会
坂本真理子、奥尚枝、石黒京子、キ
ンシバイ(*Hypericum patulum*)花弁
の抗かゆみ活性、日本薬学会第132
年会、2012年3月28~31日、北大
Oku Hisae, and Ishiguro Kyoko,
Antipruritic effects of polyphenols
from the petals of *Hibiscus syriacus*
L., 5th International Conference on
Polyphenols and Health, 2011年10
月17~20日、Hotel Meli Sitges、バ
ルセロナ、スペイン

- 21 Ishiguro Kyoko, Oku Hisae, Ogawa
Yuko and Iwaoka Emiko,
Allergy-preventive effects of
Chlorogenic acid and Iridoid
Derivatives from Flower Buds of
Lonicera japonica, 4th Symposium
Nutrition, Oxygen Biology and
Medicine, 2011年6月15~17日、
Pierre et Marie Curie 大学、パリ

〔図書〕(計1件)

石黒京子、奥尚枝、シーエムシー出版、
「薬用食品の開発 II」ホウセンカの多

様な生物活性と成分 - 抗かゆみ作用、抗
アレルギー作用、抗リユーマチ作用、駆
瘀血作用 -、2012、287 (193-204)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: 植物の栽培方法および痒み抑制剤
発明者: 木村周二、小山竜平、石黒京子、
奥尚枝
権利者: 日本山村硝子株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2013070618
出願年月日: 2014年03月31日
国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: ツリフネソウ抽出物を含む抗酸化・抗
アレルギー 剤
発明者: 木村周二、小山竜平、森岡愛、大柳
典子、石黒京子、奥尚枝
権利者: 日本山村硝子株式会社
種類: 特許
番号: 特開 201315451
取得年月日: 2012年01月25日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

武庫川女子大学薬学部 生薬学研究室ホ
ームページ
http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~shouyaku/sheng_yao_xue_yan_jiu_shi/homu.html
第19回天然薬物の開発と応用シンポジ
ウム、優秀発表賞、2012年11月2日)
食品薬学シンポジウム、優秀発表賞
<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/shokuyaku5/5thSPFS-Awards.pdf> (2013年11
月2日)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
石黒 京子 (ISHIGURO, Kyoko)
武庫川女子大学・薬学部・教授
研究者番号: 70151363
- (2) 研究分担者
奥 尚枝 (OKU, Hisae)
武庫川女子大学・薬学部・助教
研究者番号: 90281518
- (3) 連携研究者
岩岡 恵実子 (IWAOKA, Emiko)
兵庫医療大学・薬学部・助教
研究者番号: 60411980
小川 優子 (OGAWA, Yuko)
同志社女子大学・薬学部・助教
研究者番号: 00454997