



Title	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
Author(s)	奥, 尚枝
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40421">https://hdl.handle.net/11094/40421</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	奥 尚 枝
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 7 5 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 年 12 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小林 資正 (副査) 教 授 前田 正知 教 授 大森 秀信 教 授 田中 慶一

### 論 文 内 容 の 要 旨

花粉症や食物アレルギーあるいはアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患は現代社会における大きな問題になつており、今なお増え続ける多種多様なアレルギー性疾患の予防や治療に対する有効な医薬品を開発することは緊急性の高い課題である。アレルギー発現を阻害する新規物質を天然資源から探索する時、その作用を評価するための優れた実験モデルが必須であると考え、今回、I型アレルギーであるアナフィラキシー反応を抑制する抗I型アレルギー物質の *in vivo* アッセイ法の開発を試みた。

ddY系マウスと卵白リゾチーム(HEL)の組み合わせにより、特異的かつ顕著にアナフィラキシーが惹起されることを見いだし、この現象を抗アナフィラキシーアッセイ法として利用するための検討を行った結果、抗原特異的かつIgE抗体依存性のアナフィラキシーモデルを確立した。本モデルでのマウスの死亡率を指標とした *in vivo* の抗アナフィラキシーアッセイ法(死亡率法)はこれまでのモデルに比較し、(1)感作期間が短い。(2)実験操作や判定が容易である。(3)全身性アナフィラキシーショックを直接測定できる。(4)無麻酔下で実験ができる。(5)感作前または惹起の前の2種類の投与期間の選択によりアナフィラキシー発症の異なった phase での薬物の効果を検討できる等の利点を有する。

さらに、前法の死亡率法では動物が死亡するため、アナフィラキシー反応を経時的に追跡定量できず、作用機序などに関する情報を得にくい。そこでアナフィラキシーに基づく血圧低下を指標としたアッセイ法(血圧法)を開発した。本血圧法は死亡率法に比較して、(1)アナフィラキシーの惹起から回復までの経時的变化を長期的に観察できる。(2)死亡率のように all or none の判定でなく定量できるので、動的であり、アレルギーの作用および発症のメカニズム解明にも利用できる。(3)動物愛護の立場からも支持される等の利点が挙げられる。

次に、本アッセイ法が抗アナフィラキシー作用薬の探索に有効に利用できることを示すために、抗アレルギー作用がすでに報告されている生薬(カンゾウ、オウゴン、ナンテン、シャクヤク、インチンコウ)や臨床医薬品(DSCG, CV-3988, シメチジン、塩酸ジフェンヒドラミン、エピナステチン)について本法を用いた活性測定を行った。その結果、今回試験した薬物の多くが、著者が作製したアッセイ法で抑制効果を示し、本法が抗アナフィラキシー作用薬の探索に有効であること、さらに、血圧の変動パターンを観察することにより、作用メカニズムの推定が可能であることを

示した。

また、血圧法を用いて生体内の血管弛緩物質として近年注目されている一酸化窒素 (NO) やケミカルメディエーターの血圧に与える影響についても検討した。その結果、アナフィラキシーに基づく血圧低下には NO が関与すること、アナフィラキシーの血圧低下のイニシエーターとしてヒスタミンと PAF が、また持続物質として LT と PG が関与することを示した。さらにノーマルマウスに比較し、HEL で感作したマウスではヒスタミンへの感受性が増加していることおよびこの感受性増加にも NO が関与していることを明らかにし、本血圧法はアレルギー症状に対しさまざまな情報を提供する点で、アナフィラキシー発症のメカニズム解明にも有用であることを示した。

一方、天然資源より抗アナフィラキシー活性成分の探索を行うには、一度に多数の検体を処理する必要がある。そこで血圧法での測定時間の短縮についても検討した。アナフィラキシーの血圧低下が最も顕著に現れるのは惹起後15から20分であることに着目し、その5分間の血圧低下の抑制率から活性を測定する一次スクリーニング法を確立した。この方法は天然資源のみならず合成化合物などの多数のサンプルを処理できる利点を有する。

次に、ホウセンカが漢方や民間薬として関連した目的に用いられることから、本アッセイ法を用いてホウセンカの白色花弁の抗アナフィラキシー活性について検討した結果、35% EtOH エキス (IB) が感作前または感作後どちらの時期に投与してもアナフィラキシーによるマウスの死亡率や血圧低下を有意に抑制する幅広い作用を有することが明らかになった。そこで、ホウセンカの白色花弁の成分研究を行い、新規化合物 kaempferol-3-O-[2" -O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-3" -O- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside と 2-hydroxy-3-hydroxyethyl-1, 4-naphthoquinone を含む12種類の flavonol, 1,4-naphthoquinone および *p*-oxybenzoate 誘導体を単離するとともに、それらの活性を検討した。その結果、IB の抗アナフィラキシー活性本体が kaempferol 3-rutinoside などの flavonol 誘導体と 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone などの 1,4-naphthoquinone 誘導体であることが明らかになった。またその作用メカニズムについては、flavonol 誘導体が免疫担当細胞内のシグナル伝達を阻害し、2-hydroxy-1,4-naphthoquinone がピリミジン生合成阻害による IgE 抗体の産生を抑制し、1,4-naphthoquinone 誘導体が抗ヒスタミン作用を示す他、活性本体の特定は行っていないが PAF および NO の血圧低下作用を抑制作用し、PG, プラジキニン, セロトニンの血管透過性亢進作用に対する拮抗作用を示すことを明らかにした。

以上、アレルギーの関与する種々の反応を総合的に評価し、アレルギー反応を動的に捕らえた新しい抗アナフィラキシーアッセイ法を開発するとともに、アナフィラキシー発症メカニズムの解析と、天然資源からの抗アナフィラキシー活性物質の探索に関する研究を行った。

## 論文審査の結果の要旨

花粉症や食物アレルギーあるいはアトピー性皮膚炎などの I 型アレルギーはアナフィラキシーとも呼ばれており、今なお増え続ける多種多様のアレルギー疾患の予防や治療に対する有効な医薬品を開発することは緊急性の高い重要な課題である。申請者は抗 I 型アレルギー物質の *in vivo* アッセイ法の開発を検討した。

ddy 系マウスに卵白リゾチームを皮下注射することにより、特異的かつ顕著にアナフィラキシーが惹起されることを見いだしたことから、この現象を抗アナフィラキシーアッセイ法として利用するための検討を行い、アナフィラキシーに基づくマウスの死亡率を指標とした *in vivo* 抗アナフィラキシーアッセイ法ならびにアナフィラキシーによる血圧の変動を指標としたアッセイ法を確立した。

さらに、本アナフィラキシーアッセイ法を用いて、アナフィラキシーの血圧低下には NO や種々のケミカルメディエーターが関与することを明らかにした。また、民間薬として関連した目的に使用されているホウセンカの花弁の成分研究を行い、本アッセイ法を用いて検討することにより、ホウセンカがアレルギー反応のいくつもの段階でこれを抑制する幅広い作用を有することを明らかにしている。

以上の成果は博士（薬学）の学位論文として充分価値あるものと認められる。