

炎症反応における血管透過性亢進および
白血球の血管外遊走の解析とフラボノイドの抑制効果

石川(高野) 祐子

目次

緒 言	1
第 1 章 炎症初期におけるケミカルメディエータ産生に対するフラボノイドの効果	7
1. 序論	8
2. ラット炎症性腹腔マクロファージにおけるプロスタグランジン産生に対するフラボ ノイドの効果	10
1) 実験方法	10
(1) 試薬	10
(2) ラット炎症性腹腔マクロファージの調製	10
(3) マクロファージの刺激方法およびプロスタグランジン産生量の測定方法	11
(4) ウェスタンブロット法による脂肪酸シクロオキシゲナーゼ-2の発現量測定	12
(5) 統計処理	13
2) 実験結果	13
(1) フラボノイドの構造とプロスタグランジン産生抑制活性	13
(2) プロスタグランジン産生抑制活性と脂肪酸シクロオキシゲナーゼ-2発現量	20
3) 考察	22
(1) フラボノイドの構造と PGE ₂ 産生抑制活性の相関	22
(2) フラボノイドの PGE ₂ 産生抑制作用機序	23
3. ポリメトキシフラボンのアレルギー性炎症抑制効果の解明	27
1) J774A.1 細胞における腫瘍壊死因子 (TNF)- α 産生に対するポリメトキシフラ ボンの効果	27
(1) 実験方法	27
(1)-1 試薬	27
(1)-2 J774A.1 細胞の炎症刺激方法および TNF- α 産生量の測定方法	27
(2) 実験結果	28

(2) - 1	ポリメトキシフラボンの構造と TNF- α 産生抑制活性	28
2)	マウス脾臓細胞の増殖およびサイトカイン産生に対するポリメトキシフラボンの効果	30
(1)	実験方法	30
(1) - 1	試薬	30
(1) - 2	使用動物および細胞の調製	30
(1) - 3	細胞増殖活性およびサイトカイン産生量の測定	30
(1) - 4	脾臓細胞の抗体産生量の測定	31
(1) - 5	統計処理	31
(2)	実験結果	31
(2) - 1	脾臓細胞増殖に対するポリメトキシフラボンの効果	31
(2) - 2	脾臓細胞のサイトカイン産生に対するポリメトキシフラボンの効果	35
(2) - 3	脾臓細胞の抗体産生に対するポリメトキシフラボンの効果	37
3)	ラット好塩基球性白血病細胞 (RBL-2H3) の抗原刺激による脱顆粒に対するポリメトキシフラボンの効果	39
(1)	実験方法	39
(1) - 1	細胞および試薬	39
(1) - 2	脱顆粒抑制活性測定方法	39
(2)	実験結果	40
4)	考察	42
(1)	TNF- α 産生抑制効果	42
(2)	脾臓細胞の増殖、サイトカインおよび抗体産生に対する効果	42
(3)	RBL-2H3 細胞脱顆粒抑制活性	44
4.	小括	44
第 2 章	炎症部位への好中球の遊走の測定 および白血球接着分子の発現に対するフラボノイドの効果	46
1.	序論	47
2.	組織標本による好中球のローリングと遊走測定法を用いた炎症反応解析	48

1) 実験方法	48
(1) 試薬	48
(2) 使用動物	49
(3) TNF- α および IL-1 α 、カゼインの腹腔内投与による炎症惹起	49
(4) 腸間膜静脈の組織標本における細静脈内および組織中の白血球の測定 ...	49
(5) 統計処理	50
2) 実験結果	50
(1) 細静脈の直径と多形核白血球の浸潤との関係	50
(2) TNF- α 、IL-1 α およびカゼインにより誘導された炎症における多形核白血球 の浸潤の時間経過	50
(3) カゼイン誘導炎症における多形核白血球と単球のローリングの時間経過	51
(4) カゼイン炎症 1 時間後におけるローリングに対する PAF アンタゴニスト および selectin 阻害薬の効果	51
(5) TNF- α 、IL-1 α およびカゼイン誘導炎症における多形核白血球の浸潤に 対する selectin 阻害薬および PAF アンタゴニストの効果	53
3) 考察	55
3. 白血球接着分子の発現に対するフラボノイドの効果	58
1) 実験方法	58
(1) 試薬	58
(2) ヒト臍帯静脈内皮細胞の刺激方法	58
(3) 細胞表面酵素免疫測定 (Cell Surface ELISA) による白血球接着分子 発現量の測定方法	59
(4) 細胞毒性の測定	59
(5) 統計処理	59
2) 実験結果	60
(1) 細胞表面に発現した E-selectin の ELISA 法による測定条件の検討	60
(2) 白血球接着分子発現に対するフラボノイドの効果	60
3) 考察	65
4. 小括	66

第 3 章 アレルギー性炎症抑制効果の測定法開発およびフラボノイドの投与 によるアレルギー性炎症の抑制	67
1. 序論	68
2. 齧歯類の皮膚を用いた血管透過性測定法の改良	69
1) 実験方法	69
(1) 試薬	69
(2) 使用動物	69
(3) 牛血清アルブミンの蛍光標識方法	69
(4) 血管透過性の測定方法	69
(5) 統計処理	71
2) 実験結果	71
(1) 検量線の直線性	71
(2) 蛍光トレーサー法による測定のための最適加温時間の検討	71
(3) 色素法と蛍光標識法の相関の直線性	74
(4) ラットおよびマウス皮膚における反応性の検討	74
3) 考察	78
3. ICR マウスを用いたフラボノイドのアレルギー性炎症抑制効果の検討	80
1) 実験方法	80
(1) 試薬	80
(2) 使用動物	80
(3) OVA 感作方法およびフラボノイド投与方法	80
(4) アレルギー性炎症における血管透過性の測定	80
(5) 血清中抗体量および OVA 特異的抗体価の測定	81
(6) 統計処理	81
2) 実験結果	81
(1) フラボノイドの皮膚反応に対する効果	81
(2) 血清中の抗体量および卵白アルブミン特異抗体価	82
3) 考察	85

4. 小括	85
総 括	87
謝 辞	93
略号表まとめ	94
引用文献	96

緒 言

炎症とは、外界からの様々な刺激によって引き起こされる組織傷害に対する生体防衛反応と定義される¹。炎症時には、まず血管透過性が亢進し、血管が拡張するために発赤と浮腫による腫脹が起こり、それに伴い発熱物質や発痛物質による熱や痛みが生じる。また、さらに関節等に長く炎症が起こる場合には慢性炎症となり、機能障害が引き起こされる。このように臨床症状として認められる、発赤、腫張、発熱、発痛、機能障害を炎症の五大兆候と呼んでいる。

炎症初期に認められる生体防御反応を Fig. 1 に模式図として示した。炎症初期の血管透過性亢進期には、外界からの刺激等を受けた肥満細胞からのヒスタミン等の遊離を通じて、血管拡張や血管透過性の亢進が起こり、それに引き続き好中球やマクロファージのような炎症細胞が炎症局所へ浸潤する。これらの白血球は活性化を受け、アラキドン酸代謝物（プロスタグランジン (prostaglandin: PG)、ロイコトリエン (leukotriene: LT) 等) や活性酸素 (O_2^- 、 OH^- 、 H_2O_2 等)、あるいはサイトカインのような種々のケミカルメディエータの産生が誘導される。このように、炎症初期には様々な細胞、並びにそれらの産生するケミカルメディエータ等が複雑に絡み合った反応が起きている。そこで、炎症反応の制御においては、これらのケミカルメディエータの動態を把握することが重要である。

典型的な急性滲出性炎症モデルであるラットカラゲニン胸膜炎においては、血管透過性亢進期の滲出液中に PGE_2 や PGI_2 が検出され²、同時に関与するブラジキニン等の血漿滲出作用を増強することにより血管透過性を亢進する。つまり、 PGE_2 は他のメディエータの作用を増強し³、炎症の進展に寄与している。これらの PG 合成は脂肪酸シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase: COX) が律速酵素となっている⁴。この酵素には常在型と誘導型の2種類のアイソザイムが存在することが、1990 年代初頭に明らかになった^{5, 6}。常在型の COX-1 から産生される PG は、胃粘膜保護や血圧維持等の生体の恒常性をつかさどり⁷、炎症局所における PG 産生には主に誘導型の COX-2⁸ が関係する。1971 年 Vane によりアスピリンが、COX 活性を特異的に阻害し、PG 類の生合成を阻害することが報告された⁹。しかし、アスピリンをはじめとする非ステロイド型抗炎症薬 (Non steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs) は、

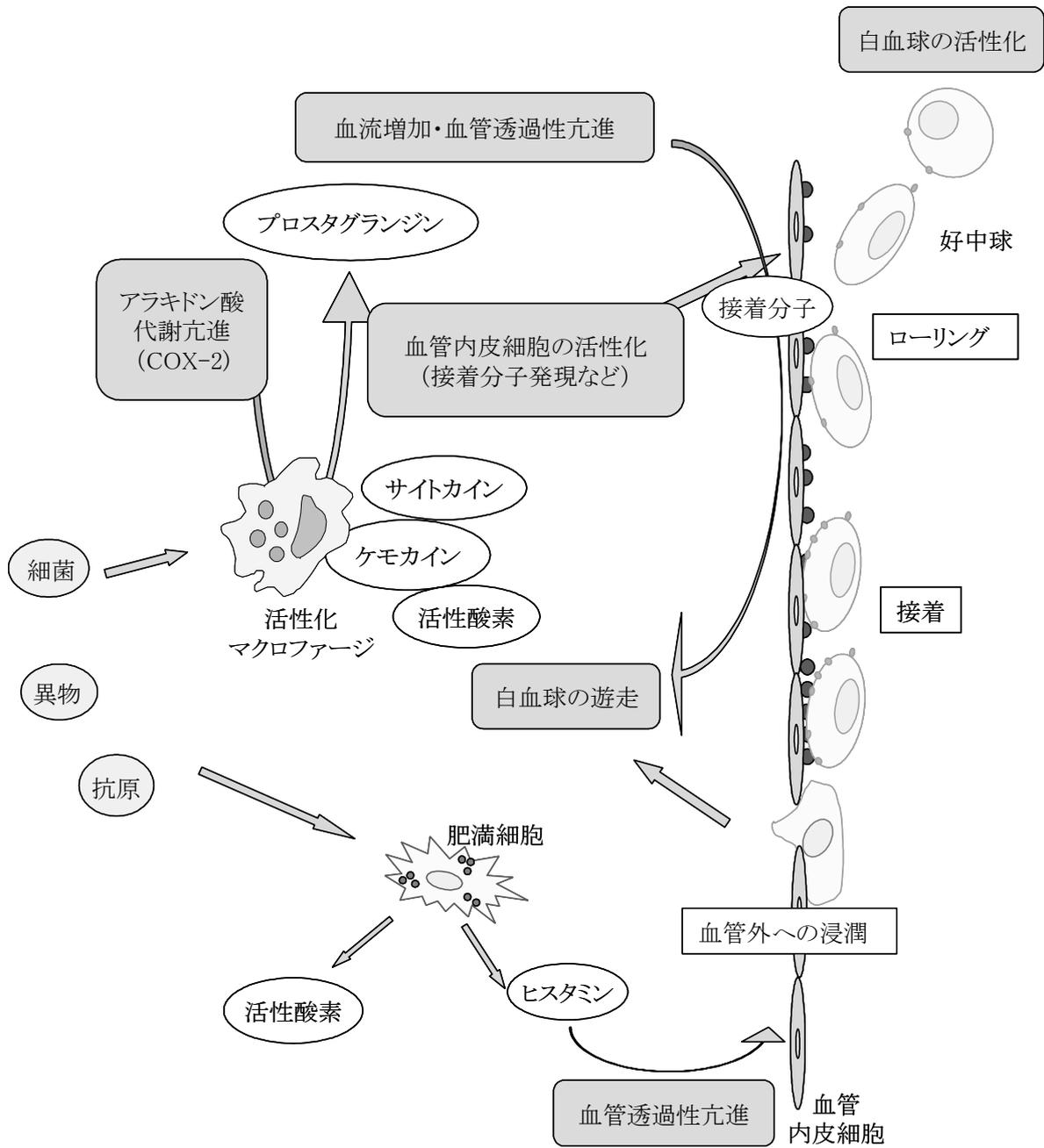


Fig. 1 炎症初期に起こる生体防御反応 (模式図)

非選択的に COX-1 まで阻害¹⁰することから、胃腸障害等の副作用を起こすと考えられている¹¹。そのため、炎症抑制の面では副作用の起こりにくい選択的 COX-2 阻害剤が抗炎症薬として有効であり^{12, 13}、現在も開発が進められている。COX 阻害剤のスクリーニング法としては、ヒツジ精嚢腺から得られた酵素を用いる方法等^{14, 15}が、酵素の直接阻害作用を調べる網羅的方法として用いられてきた。しかし、最近ではより生体系に近い方法として炎症細胞を用いた COX-2 阻害剤スクリーニング法として、マクロファージを LPS で刺激し、産生される PGE₂ を定量する方法^{16, 17}が用いられる。

また、活性化された白血球から炎症反応初期に産生される主要なサイトカインである腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor: TNF)- α は、血管内皮細胞に白血球接着因子の発現を誘導する等¹⁸、炎症時の白血球遊走に重要な役割を果たしている。また、TNF- α は炎症刺激により亢進されるサイトカインのうち最も初期に産生されることから、以降のサイトカイン産生に対して大きな影響を与え、炎症初期のシグナルとして重要な役割を果たしている。また、TNF- α の過剰産生は破骨細胞を活性化させ¹⁹、関節の骨破壊を促進し、機能不全を引き起こす。そのため、TNF- α 産生の調節は炎症の抑制において重要な要素となる。

血管透過性亢進後に起こる好中球の浸潤には様々なプロセスが存在し、ローリング (rolling)、接着 (adhesion、firm adhesion)、血管壁通過、組織への浸潤等が連続して起こり、白血球が炎症局所へ集積する²⁰。この初期段階で起こるローリングは浸潤過程における重要な現象であり、この現象を抑制することにより、白血球の遊走が抑制されると考えられる。さらに、このローリング現象は詳細な解析が行われており、その重要な接着分子として selectin の関与が明らかになっている^{21, 22}。Selectin には 3 つの型が同定されており、血小板に発現するタイプを P-selectin²³、白血球に発現するタイプを L-selectin²⁴、血管内皮細胞に発現するタイプを E-selectin²⁵と呼んでいる。このうち、L-selectin は恒常的に発現しており、また P-selectin は細胞内に不活性型で存在するのに対し、E-selectin は炎症性サイトカインにより発現が誘導されることから、炎症抑制活性の検討を行うにあたり、血管内皮細胞に発現する E-selectin をターゲットとすることが適していると考えられている。

以上のように、炎症には様々な段階があり、それらの各段階で炎症抑制活性を有する物質の探索が行われている。その中で、中薬、和漢薬等の分野において、植物由来のフラボノイドの抗炎症作用についての研究が進み²⁶、²⁷、様々なフラボノイドとその機能が明らかになっている。フラボノイドは Benzo- γ -pyrone の誘導体で、植物全般に広く分布しており、骨格上の違いにより chalcones、flavan-3-ols、flavanones、flavones、flavonols、isoflavones および biflavonoids 等に分類される。構造的には単純であるが、自然界には多くの誘導体が存在することが報告²⁸されている。このように多様にわたるフラボノイドであるが、その炎症抑制活性について構造別に網羅的な検討を行った報告は少ない。そこで、フラボノイドの構造的差異と炎症抑制活性との関係を明らかにするため、先に述べたケミカルメディエータ産生等の炎症の各段階における効果について構造活性相関を中心に検討を行った。

本研究では、まず第1章において炎症初期に産生されるケミカルメディエータとして PGE₂ および TNF- α の産生に対するフラボノイドの効果を明らかにするため、ラット炎症性腹腔マクロファージおよびマウス単球由来株細胞 (J774A.1) を用い、それぞれ LPS 刺激により産生を誘導した際の抑制活性の構造活性相関を検討した。さらに、ポリメトキシフラボンについては、免疫担当細胞に対する効果についても検討を行った。

また、第2章においては、血管透過性の亢進に引き続いて認められる、炎症局所への白血球浸潤の第1段階であるローリングの測定法を開発した。さらにヒト臍帯静脈内皮細胞を用い、腫瘍壊死因子によって誘導される白血球接着分子 E-selectin 発現に対するフラボノイドの効果について、構造活性相関と合わせて検討した。

最後に第3章において、炎症モデルとしてラットおよびマウスの皮膚反応を用い、迅速かつ鋭敏に血管透過性を測るための測定法の改良を試みた。さらに、その改良された皮膚反応法を用いて、フラボノイドの即時型アレルギー反応に対する効果を検討した。

以上のように、炎症に関わるケミカルメディエータ産生および白血球浸潤、また動物モデルにおける炎症反応測定法を検討するとともに、フラボノイドの

炎症抑制効果についてその構造活性相関や作用機序について検討を行なった。フラボノイドの抗炎症活性を明らかにすることにより、医薬品としての可能性を検討するとともに、食品由来成分による炎症やアレルギー症状の抑制についての知見を得ることを目的として研究を行った。

第 1 章

炎症初期におけるケミカルメディエータ産生 に対するフラボノイドの効果

1. 序論

炎症に關与するケミカルメディエータには、ヒスタミン、セロトニン、ブラジキニン、補体、プロスタグランジン、ロイコトリエンおよびサイトカインがあげられる。これらのケミカルメディエータのうち、特にプロスタグランジンは、免疫応答を含め多種多様の機能を有しており、正常時の生体内の様々な恒常性調節機構において重要な役割を果たしているばかりではなく、病態時、特に炎症やアレルギー反応における脂質メディエータとして非常に重要と考えられている^{29, 30}。

プロスタグランジン類は、細胞膜リン脂質の2位を切断する酵素であるホスホリパーゼ A₂ により遊離されるアラキドン酸から生成される。このアラキドン酸を PGH₂ に変換する酵素が律速酵素である脂肪酸シクロオキシゲナーゼ (COX: EC 1.14.99.1) であり^{2, 31}、さらに PGH₂ はそれぞれの合成酵素により、直ちに PGE₂³² や PGF_{2α} をはじめとする様々なプロスタグランジンに変換される。COX には、2種類のアイソザイムが存在し、常在型の COX-1 および誘導型の COX-2 に分けられる^{33, 34}。常在型の COX-1 から産生される PG は、血管拡張や胃粘膜の保護等の働きを持ち、生体の恒常性に重要な役割を果たしている。それに対し、誘導型の COX-2 から産生される PG は炎症局所等において、生体防御に關与する。COX-2 の最も重要な働きは PGE₂ 合成酵素の誘導と協調して、炎症の増強に關与することである³⁵。そのため、COX-2 の選択的阻害剤は、副作用のない抗炎症薬として有効であると考えられてきた^{12, 13}。

最近の研究により、食品あるいはその成分に抗炎症活性が認められてきている³⁶が、その背景には、フラボノイドを主成分として含む植物の抽出液が、伝統的な局所の抗炎症薬として古くから多く使用されてきた³⁷という事実がある。フラボノイドの抗炎症メカニズムは Vane によるアスピリンの PG 産生抑制効果の報告³を基礎とした類推により、炎症部位における PG 産生を抑制するためであると考えられる。幾つかのフラボノイドにおいては、既にプロスタグランジン産生に対する効果が明らかにされているものの^{17, 38}、それらの化学構造と PG 産生について体系的に行われた研究は多くない³⁹。そこで、ラット炎

症性腹腔マクロファージを用い、大腸菌リポ多糖により誘導されたプロスタグランジン産生に与える効果について、39種のフラボノイドおよびその類似化合物を用い、その抑制活性を構造との相関に重点を置いて明らかにすることを目的として研究を行った。

また、炎症反応の初期においてマクロファージ等の炎症細胞から産生される重要なサイトカインとして、TNF- α が挙げられる。TNF- α は、細菌由来のリポ多糖により活性化されたマクロファージや単球系の細胞等から産生され、細胞死の誘導⁴⁰、好酸球におけるICAM (Intracellular cell adhesion molecule)-1発現誘導⁴¹等様々な機能を有している。炎症反応とTNF- α との関連では、次章に述べるような血管内皮細胞における白血球接着分子の発現¹⁷が重要である。しかし、TNF- α はそれ以外にも、炎症時に産生されるIFN(interferon)- γ 、IL(interleukin)-6、IL-8等のサイトカインやケモカイン等の産生に影響することが知られている。このようにTNF- α は炎症初期における様々な生体防御反応をつかさどり、重要な役割を担っている。しかし、TNF- α が過剰に産生された場合には、慢性関節リウマチにみられるような組織の傷害を引き起こすことがある。そのため、TNF- α 産生のコントロールが可能になれば、アレルギー性炎症や慢性関節リウマチのような慢性炎症においては、過剰なTNF- α 産生を抑制することにより、症状の軽減が期待される。以前の報告⁴²においても、いくつかのフラボノイドが強いTNF- α 産生抑制活性を持つことを明らかにしたことから、フラボノイドの炎症抑制活性としてTNF- α 産生抑制についても検討することとした。

さらに本研究では、近年がん予防⁴³や炎症抑制効果^{44, 45}を有するとして様々な研究が進んできているポリメトキシフラボンについて、そのTNF- α 産生抑制活性を検討した。また、抗体産生に関わる脾臓細胞の増殖やサイトカイン、抗体産生は、T細胞の分化を含めアレルギー発症にあたり、重要な要因と考えられることから、抗原および抗CD3 ϵ 抗体刺激による脾臓細胞増殖およびサイトカイン、抗体産生への影響を検討した。さらに、IgEの関与する即時型のアレルギー反応に対する効果として、RBL-2H3細胞の抗原刺激による脱顆粒の抑制活性についても検討を行った。

2. ラット炎症性腹腔マクロファージにおけるプロスタグランジン産生に対するフラボノイドの効果

1) 実験方法

(1) 試薬

本実験に用いた試薬は以下のとおりである。可溶性デンプン(和光純薬工業株式会社、大阪、日本)、Bacto-peptone(Difco Laboratories Co., Detroit, MI, USA)、および大腸菌リポ多糖(LPS; *Escherichia coli* 0111:B4, Difco Laboratories)を使用した。フラボノイド類は catechin、epicatechin、chlorogenic acid、resveratrol(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)、5-hydroxyflavone、7-hydroxyflavone、baicalein、apigenin、luteolin、7,3',4'-trihydroxyflavone、3-hydroxyflavone、7-hydroxyflavonol、chrysin、galangin、fisetin、kaempferol、isorhamnetin、robinetin、quercetagenin、myricetin、eriodictyol、daidzein、daidzin、genistein、genistin、phloretin、phloridin、cyanidine chloride(Extrasynthes Inc., Genay, France)、epigallocatechin、epicatechin-3-gallate、epigallocatechin-3-gallate(栗田工業、東京、日本)、quercetin、rutin(ナカライテスク、京都、日本)、morin、quercitrin、naringin、naringenin、hesperetin、hesperidin(東京化成工業、東京、日本)をそれぞれ供試した。また、NS-398([N-2(cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)]-methanesulfonamide、ALEXIS[®] Biochemicals、CA、USA)、および Aspirin[®](Sigma Chemical Co.)を使用した。

(2) ラット炎症性腹腔マクロファージの調製

ラット炎症性腹腔マクロファージの採取には、5週令の Sprague-Dawley (SD)系雄性ラット(体重 200-500g、SPF: Specific pathogen free、日本チャールズリバー、厚木、神奈川、日本)を予備飼育後に使用した。全ての動物実験は独立行政法人食品総合研究所動物実験管理委員会に定めた方法に従って行った。

マクロファージの回収は渡辺ら⁴⁶の方法に基づき行った。略記すると、可溶性デンプンと Bacto-peptone をそれぞれ 5% (w/v) になるよう生理食塩水に溶かし、オートクレーブ滅菌したものを雄性 SD ラットに体重 100 g あたり 5 ml を腹腔内投与した。投与 4 日後、ラットをエーテル麻酔下で頸動脈切断にて放血致死させ、Hanks(-)にて腹腔内を洗浄し、その洗浄液よりマクロファージを回収した。

回収されたマクロファージは RPMI 1640 培地 (Gibco[®]、Invitrogen Corp.、Carlsbad、CA、USA) に懸濁し、 2×10^5 cells/well になるよう 96-well culture plate (Falcon: #3072、Becton Dickinson Co.、NJ、USA) に播種、37 °C のインキュベータ (air 95% -CO₂ 5%) で 2 時間静置した。その後、プレートを 37 °C に暖めた Hanks(-) で 3 回洗浄し、非接着の細胞を除き、10% fetal calf serum (FCS; JRH Bioscience、KS、USA) を含む RPMI 1640 培地で 24 時間培養した後、実験に供した。

(3) マクロファージの刺激方法およびプロスタグランジン産生量の測定方法

24 時間培養後、細胞を Hanks(-) で 3 回洗浄し、RPMI 1640 培地を 160 μ l 入れた。供試フラボノイド等は dimethyl sulfoxide (DMSO) もしくはエタノールに溶解し、最終の溶媒濃度が 0.1% (v/v) 以下になるよう Dulbecco's phosphate buffer saline [PBS (-)、Ca (-)、Mg (-)、pH 7.4] (日水製薬、東京、日本) で希釈して 20 μ l 添加した。また、コントロールには同量の溶媒のみを添加した。さらに LPS (10 μ g/ml) を 20 μ l 添加 (最終濃度: 1 μ g/ml) することにより、マクロファージのプロスタグランジン産生を誘導した。14 時間培養後、培養上清を回収し、PGE₂ の測定試料とした。試料は測定時まで -30 °C で凍結保存した。

培養上清に遊離した PGE₂ 含量の測定には PGE₂ ELISA kit (Cayman Chemical Co、MN、USA) による ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法を用いた。測定結果は陽性対照に対する百分率で表した。

(4) ウェスタンブロット法による脂肪酸シクロオキシゲナーゼ-2の発現量測定

ラット炎症性腹腔マクロファージを前述のように回収し、6-well culture plate (FALCON: #3046)に 3×10^6 cells/well になるよう RPMI 1640 培地 3 ml に懸濁して播種し、37 °C のインキュベータ (air 95% -CO₂ 5%) で 2 時間静置した。その後、プレートを 37 °C に暖めた Hanks (-) で 3 回洗浄し、非接着の細胞を除いた。10% FCS を含む RPMI 1640 培地で 24 時間培養した後、実験に供した。この細胞を Hanks (-) で 3 回洗浄し、RPMI 1640 培地を 2.4 ml 入れた。供試フラボノイド等は DMSO もしくはエタノールに溶解し、最終の溶媒濃度が 0.1% (v/v) になるよう調製し、300 µl を添加した。コントロールには同量の溶媒のみを添加した。さらに LPS (10 µg/ml) を 300 µl 添加 (最終濃度: 1 µg/ml) することにより、マクロファージの COX-2 蛋白質を誘導した。14 時間培養後、細胞を氷冷した PBS (-) で 3 回洗浄した後、100 µl の氷冷した cell lysis buffer [HEPES 20 mM、Triton X-100 1%、Glycerol 10%、EDTA•2Na (ethylene diaminetetraacetic acid disodium salt) 1 mM、p-nitrophenylene phosphate 2.5 mM、Na₃VO₄ (sodium orthovanadate) 1 mM、leupeptin 5 µg/ml、sodium fluoride 1 M: pH 7.3]⁴⁷ を加えて細胞を溶解した。得られた細胞溶解液は、4 °C で 15,000 rpm x 15 分間遠心分離し、上清を回収、COX-2 蛋白質測定試料とした。上清中の蛋白質含量は DC protein assay[®] (Bio Rad Laboratories、CA、USA) で測定した。

測定試料に 3 倍量 (v/v) の sample loading buffer [Tris 50 mM、SDS (Sodium dodecyl sulfate) 4% (v/v)、glycerol 10% (v/v)、2-mercapto ethanol 4% (v/v)、bromophenol blue 50 µg/ml: pH 7.4] を加え、5 分間煮沸したものを蛋白質 2 µg BSA (bovine serum albumin) 相当量、ポリアクリルアミドゲル (7.5%; PAGEL[®]、アトー株式会社、東京、日本) に添加し、20 mA 定電流で 80 分間電気泳動した。泳動終了後、分離された蛋白質をニトロセルロース膜 (Hybond-ECL[®]、Amersham Bioscience Co.、USA) に 20 V で 1 時間転写した。転写されたニトロセルロース膜を 4 °C で 1 晩ブロッキング (Block Ace[®]、大日本製薬株式会社、大阪、日本) した後、1% BSA/Tris buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) で希釈した一次抗体

[rabbit antibody to murine COX-2, rat COX-1, x1000 (Cayman Chemical Co.) および β -actin, Clone AC-15 monoclonal antibody, x5000, (Sigma Chemical Co.)] で室温にて1時間インキュベートした。洗浄後、二次抗体 (COX-1 および COX-2 については goat anti-rabbit IgG-HRP, x500, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA, β -actin については goat anti-mouse IgG-HRP, x500, Santa Cruz Biotechnology Inc.) で室温にて1時間、それぞれ免疫染色を行った。最後に、ECL detection kit (Amersham Bioscience Corp., NJ, USA) で室温1時間インキュベーションし、X線フィルム (Hyperfilm[®], Amersham bioscience Corp.) を用いて発光を検出した。

(5) 統計処理

実験データは全て3回以上の測定を行い、平均値 \pm 標準誤差で表した。結果の統計処理にはANOVA解析後、Student's-*t*検定および多重解析にはFisher's PLSDによる検定を行った。

2) 実験結果

(1) フラボノイドの構造とプロスタグランジン産生抑制活性

39種のフラボノイドおよび類似化合物のPG産生抑制効果を明らかにするため、LPSにより活性化させたマクロファージにおけるPGE₂産生について検討を行った。フラボノイドとの比較対照として、非ステロイド抗炎症薬であるAspirin[®]およびCOX-2の選択的阻害剤であるNS-398についても合わせて試験を行った。

LPS刺激したラット腹腔マクロファージのPGE₂産生は経時的に増加し、12-15時間後にほぼ最大量となった (Fig. 2)。また、LPS濃度を様々に変えて処理を行ったところ、濃度依存的にPGE₂産生は増加し、1.0 μ g/mlでプラトーに達した (データ省略) ことから、以後の実験には1.0 μ g/mlのLPSを用いた。

Table 1に試験に用いたフラボノイドの慣用名およびその化学構造式を示した。この結果、いくつかのフラボノイドおよびその他の化合物において、用量

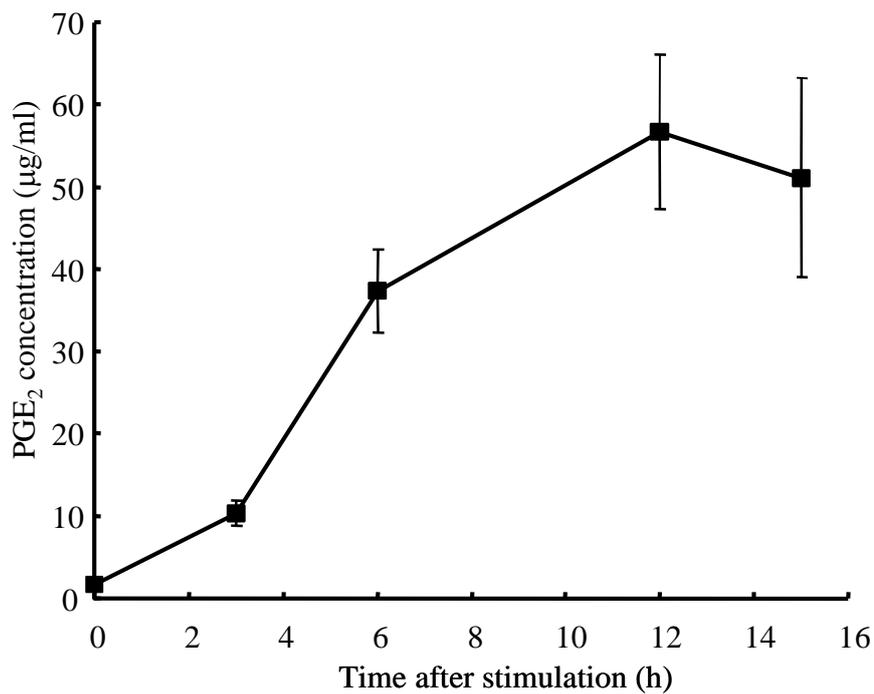
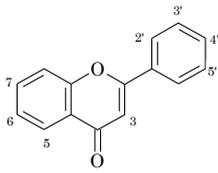
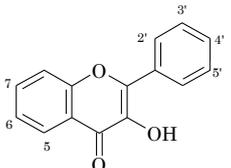
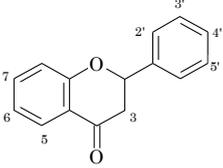
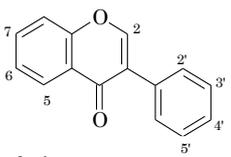
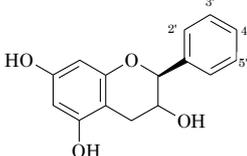


Fig. 2 Time-dependent PGE₂ production of LPS stimulate rat peritoneal macrophage.

Activated peritoneal macrophages were collected from soluble starch and bacto peptone-injected SD rats. After 24 h incubation in 96-well culture plate, the macrophages were stimulated by LPS, and supernatant were collected at 3, 6, 12, 15 hours after the stimulation. PGE₂ content in the supernatant were measured by ELISA.

Table 1 Chemical structure and 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of the various flavonoids tested for the inhibition of PGE₂ biosynthesis in rat peritoneal macrophage stimulated by LPS.

Subclass (Chemical formula)	Name	IC ₅₀ (μM) ^a	Substitutions		
			OH residues	OCH ₃	Others
	5-Hydroxyflavone	10.6±3.9 ^b	5		
	7-Hydroxyflavone	5.2±2.2 ^b	7		
	Chrysin	2.8±0.4 ^b	5,7		
	Baicalein	2.5±0.9 ^b	5,6,7		
	Apigenin	3.3±2.0 ^b	5,7,4'		
	7,3',4'-Trihydroxyflavone	36.3±18.8 ^c	7,3',4'		
	Luteolin	>1000	5,7,3',4'		
	3-Hydroxyflavone	30.6±26.8 ^c	3		
	7-Hydroxyflavonol	10.7±6.6 ^b	3,7		
	Galangin	14.3±2.6 ^{bc}	3,5,7		
	Kaempferol	13.1±1.7 ^b	3,5,7,4'		
	Fisetin	>1000	3,7,3',4'		
	Morin	>1000	3,5,7,2',4'		
	Quercetin	13.9±2.3 ^{bc}	3,5,7,3',4'		
	Isorhamnetin	>1000	3,5,7,4'	3'	
	Rutin	>1000	5,7,3',4'		3-rutinoside
	Quercitrin	>1000	5,7,3',4'		3-rhamnoside
	Robinetin	>1000	3,7,3',4',5'		
	Quercetagetin	>1000	3,5,6,7,3',4'		
	Myricetin	>1000	3,5,7,3',4',5'		
		Naringenin	7.9±1.9 ^b	5,7,4'	
Naringin		>1000	5,4'		7-neohesperidoside
Eriodictyol		7.2±1.7 ^b	5,7,3',4'		
Hesperetin		8.4±1.3 ^b	5,7,3'	4'	
Hesperidin		>1000	5,3'	4'	7-rutinoside
		Daidzein	37.6±14.3 ^c	7,4'	
	Daizin	>1000	4'		7-glucoside
	Genistein	7.2±2.3 ^b	5,7,4'		
	Genistin	>1000	5,4'		7-glucoside
	(+)-Catechin	>1000	3,5,7,3',4'		
	(-)-Epicatechin	>1000	3,5,7,3',4'		
	Epigallocatechin	>1000	3,5,7,3',4',5'		
	Epicatechin-3-gallate	>1000	5,7,3',4'		3-gallate
	Epigallocatechin-3-gallate	>1000	5,7,3',4',5'		3-gallate
	Other compounds	Chlorogenic acid	>1000		
Cyanidine chloride (anthocyanin)		>1000			
Phloretin (dihydrochalcone)		>1000			
Phloridin		>1000			
Resveratrol (Stilbene)		7.6±1.9 ^b			
COX-2 selective inhibitor		NS-389	<0.1 ^a		
NSAID	Aspirin	2.9±2.1 ^b			

^aThe values of IC₅₀ were analyzed by Fisher's PLSD test.

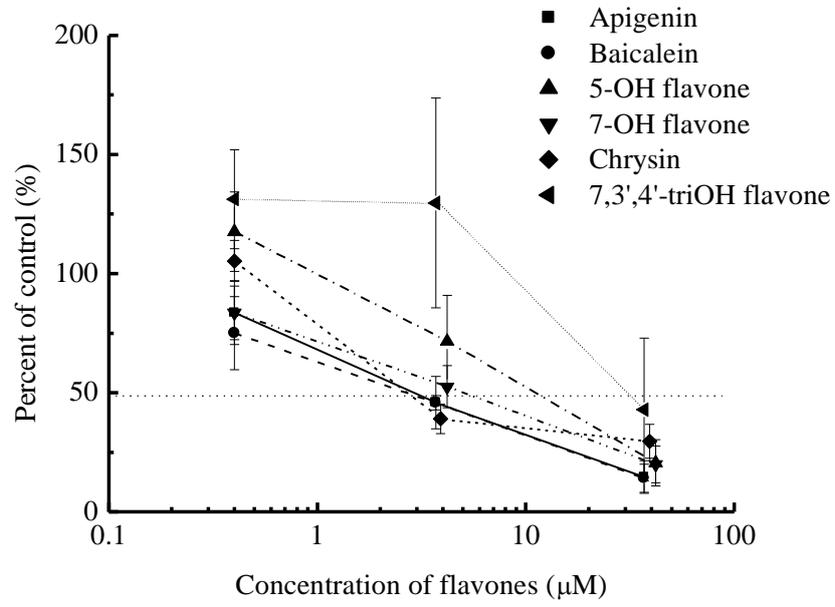
依存的に PGE₂ 産生を抑制することが明らかになった。抑制活性を有するフラボノイドの用量依存的な抑制曲線をサブクラスごとに Fig. 3 に示した。Fig. 3A (Flavones) では、試験に用いた flavone のうち luteolin を除く全てに抑制活性が認められた。そのうち、chrysin、baicalein および apigenin は 5-hydroxyflavone や 7,3',4'-trihydroxyflavone よりも強い抑制活性を示した。Baicalein と apigenin は非常によく類似した抑制曲線を示した。しかし、chrysin は IC₅₀ (50% 抑制濃度) で 4 μM と baicalein や apigenin とほぼ同程度の値を示したが、抑制曲線の傾きは類似しなかった。

試験に用いた 13 種類の flavonols のうちの 5 種類、3-hydroxyflavone、7-hydroxyflavonol、galangin、kaempferol および quercetin のみが Fig. 3B のように抑制活性を示した。Galangin、quercetin および kaempferol の IC₅₀ は、3-hydroxyflavone よりも低値を示した。配糖体とアグリコンの比較、たとえば quercetin と rutin (quercetin 3-rutinoside) や quercitrin (quercetin 3-rhamnoside) に関しては、配糖体は PGE₂ 産生に対し、やや促進もしくは非常に弱い抑制を示した(データ省略)。その他、flavonol である robinetin、quercitagetin および myricetin では、PGE₂ 産生の弱い増強傾向が認められた。

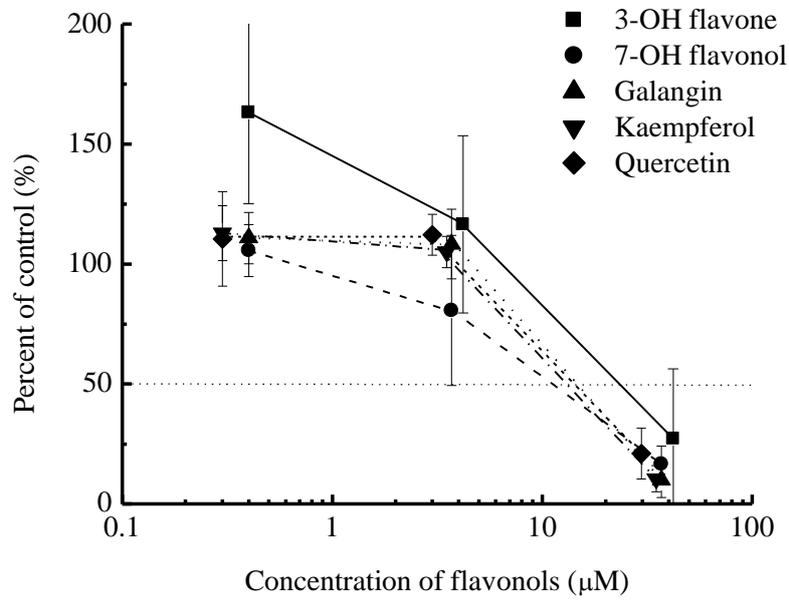
Flavanone のアグリコンは (Fig. 3C) に示したように抑制活性を有するが、それに対する配糖体、naringin (naringenin-*O*-7-neohesperidoside) や hesperidin (hesperetin-*O*-7-rutinoside) では、抑制活性は認められなかった。Isoflavone では、genistein および daidzein において LPS 刺激による PGE₂ 産生を抑制していたが (Fig. 3D)、genistein の方が daidzein に比べ IC₅₀ で約 5 倍の強い抑制活性を示した。Genistin および daidzin それぞれの 7-*O*-glucoside 配糖体である genistein および daidzein では、全く抑制活性が認められないか、逆に増加の傾向が確認された。Resveratrol および COX 阻害剤である Aspirin[®] および NS-398 も PGE₂ 産生を抑制した (Fig. 3E)。しかし、実験に用いたその他のフラボノイド、例えば flavan-3-ol (catechin、epicatechin、epigallocatechin 他) や anthocyanidin、またその類似化合物では LPS 誘導による PGE₂ 産生抑制活性は認められなかった。

LPS 誘導による PGE₂ 産生抑制効果を示した 16 種のフラボノイドについて

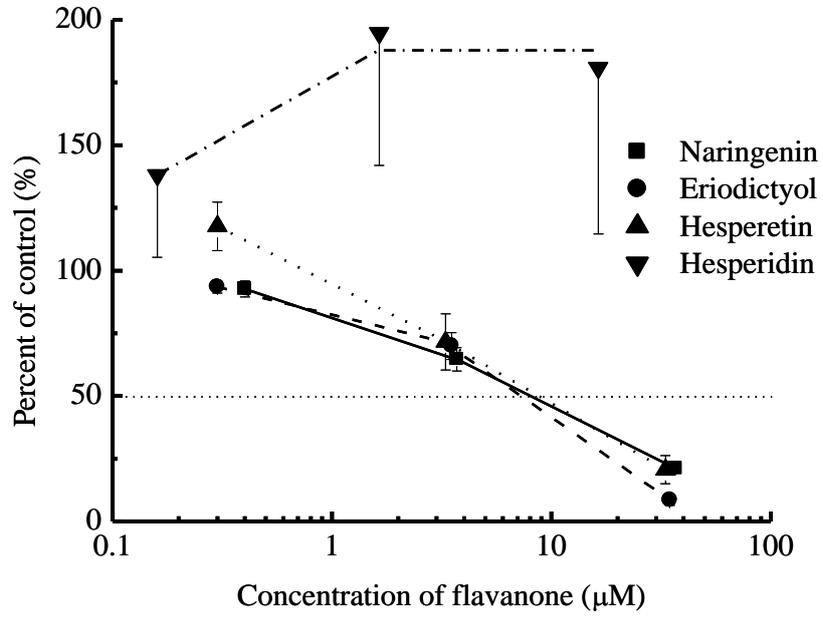
A



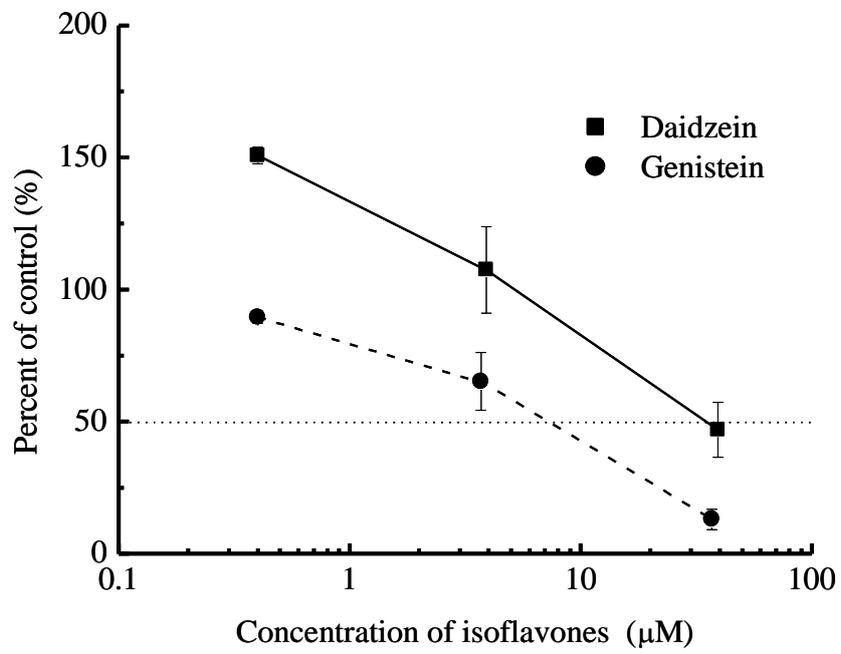
B



C



D



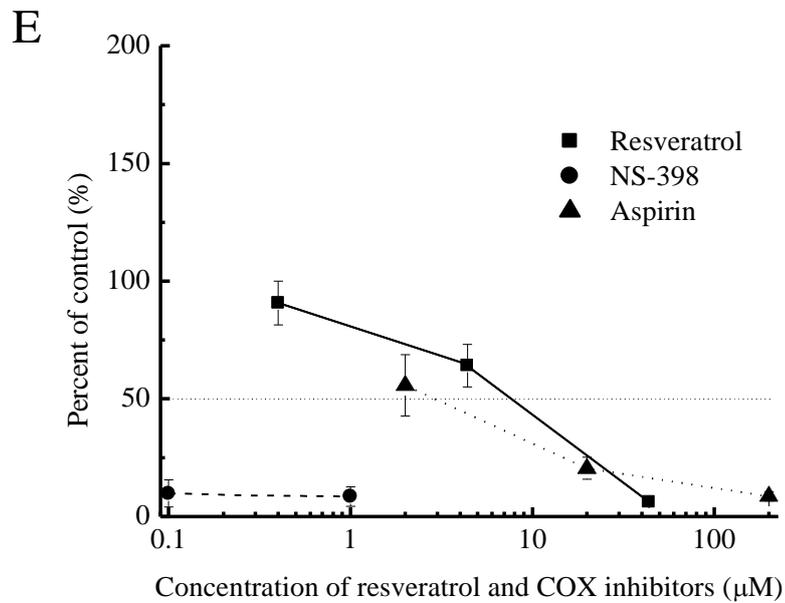


Fig. 3 Inhibition concentration curves of flavonoids. (A: Flavone, B: Flavonol, C: Flavanone, D: Isoflavone, E: Resveratrol and COX inhibitors)

Activated peritoneal macrophages were collected from soluble starch and bacto peptone-injected SD rats. After 24 h incubation in 96-well culture plate, the macrophages were stimulated by LPS, and each flavonoid was added simultaneously with LPS. After 14 h incubation, culture media was removed and prostaglandin E₂ level was measured by ELISA.

PGE₂ production was indicated by percent of control. Dose-response suppression of PGE₂ syntheses was demonstrated as sigmoid regression of inhibition concentration curves. Each value is expressed as mean \pm standard error (n=3).

て、Table 1 に IC_{50} を示した。 IC_{50} で比較した場合、flavone および flavanone は LPS 誘導による PGE_2 産生に対し、最も強い抑制効果を示すグループであり、その数値は 2.5-36.3 μM の範囲であった。次に高いグループは flavonol であり、その数値は 10.7-30.6 μM の範囲であった。また、isoflavone では、その値は 7.2-37.6 μM と広範囲に分布した。Stilbene に属する resveratrol の IC_{50} およびその阻害曲線は genistein のそれに非常に良く類似していた。典型的な NSAID であり、かつ非選択的 COX 阻害剤である Aspirin[®] や COX-2 の選択的阻害剤である NS-398 では、非常に強い抑制を示し、それぞれの IC_{50} は 2.9 μM および 0.1 μM 以下であった。

(2) プロスタグランジン産生抑制活性と脂肪酸シクロオキシゲナーゼ-2 発現量

PG 産生抑制と COX 発現との相関を調べる目的で、 PGE_2 産生抑制効果を持つフラボノイドのうちいくつかを選択し、脂肪酸シクロオキシゲナーゼ蛋白質のウエスタンブロットを行った結果を Fig. 4 に示した。

強い産生抑制活性を有するグループに属する apigenin、7-hydroxyflavonol および eriodictyol は COX-2 蛋白質の発現が常在型のアイソザイムである COX-1 に比べ、抑制されることが確認された。例えば、apigenin における COX-2/ COX-1 比は 0.4 μM から 40 μM の濃度の範囲で 2.8 から 0.1 と用量依存的に低下していた。同様に 7-hydroxyflavonol および eriodictyol においてもそれぞれ 1.7 から 0.4、10.0 から 5.0 と低下していた。それに対し、 PGE_2 産生抑制の弱いグループに属する daidzein では、COX-2 蛋白質の発現抑制効果は弱く、COX-2/ COX-1 比は 2.8 から 11.0 であった。

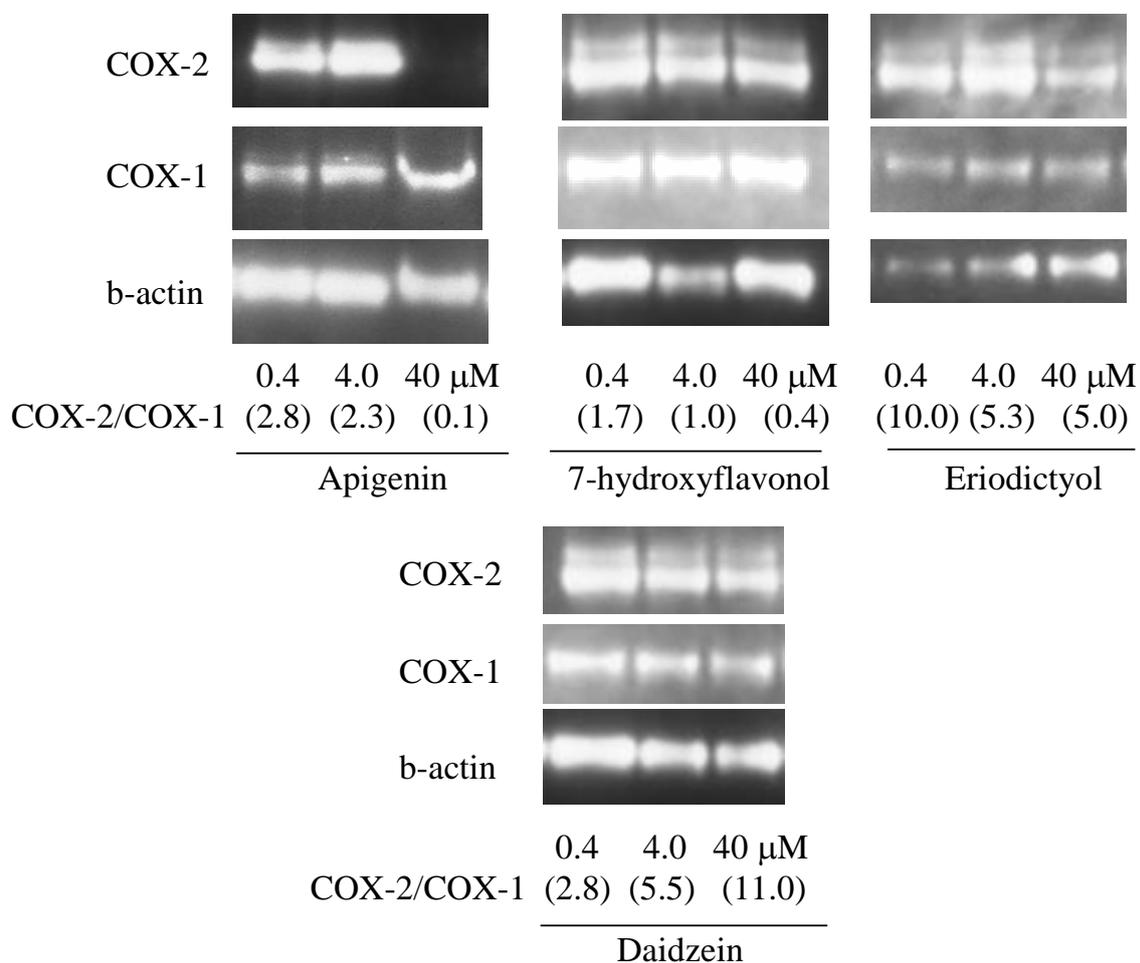


Fig. 4 Western blot analysis of COX-1, -2 in rat peritoneal macrophages. (Upper part: strongly suppressive flavonoids, Lower part: lesser effective flavonoid)

Activated peritoneal macrophages were collected from soluble starch and bacto-peptone injected SD rats. Macrophages were incubated with several concentrations of flavonoids for 14 h in the presence and absence of 1 μg/ml of LPS as stimulator.

After washing, the cells were lysised. The cell lysates were analyzed by western blot as described in Materials and Methods.

3) 考察

(1) フラボノイドの構造と PGE₂ 産生抑制活性の相関

本項では LPS 刺激によるラット炎症性腹腔マクロファージにおける PGE₂ 産生に対するフラボノイドの抑制効果について構造活性相関を中心に検討を行った。

フラボノイドはフラボノイド骨格と呼ばれる A、B、C の 3 環からなる構造を有し、骨格上の違いによりサブクラスに分類されている。また、Table 1 に示したように、様々な位置に水酸基の配位が見られ、さらにその誘導体が存在する。本実験に用いたフラボノイドのうち、flavan-3-ol および anthocyanin に属するものには LPS 刺激マクロファージにおける PGE₂ 産生抑制効果は認められず (IC₅₀ で 1000 μM 以上)、その他の flavone や flavonol、flavanol 等にものみ抑制が認められた。このことから、PGE₂ 産生抑制活性を示すためには 4 位のケトン基 (オキソ構造) が必須であること、また C2-C3 位における二重結合は抑制活性を強めることが明らかになった。Landolfi らは、フラボノイドの C2-C3 の二重結合が欠けると脂肪酸シクロオキシゲナーゼ経路による PGE₂ 産生抑制活性が低下することを報告している⁴⁸。しかし、本試験のラット炎症性腹腔マクロファージにおける PGE₂ 産生抑制に関する結果においても、有意差は認められないものの、同様の傾向が確認された。

PGE₂ 産生におけるフラボノイドの抑制活性は、水酸基の位置や数にも影響を受けており、例えば、A 環の 5 位と 7 位の水酸基は大きな影響を与えることが明らかになった。今回抑制活性を示したフラボノイドにおける IC₅₀ の比較によれば、5、7 位の両方に水酸基を有するフラボノイドは、7 位のみ、もしくはいずれの水酸基も持たないものに比べ、有意に高い抑制活性を示した。また、5 位に水酸基を持たない isoflavone よりも水酸基を有する方が高い活性を示した。また、flavone と flavonol においては、B 環の水酸基も活性に強く関わっており、3'、4'位に水酸基を持つものよりも、水酸基を持たないものの方が高い活性を示した。また、2'、4'位や 3 個以上の水酸基を有するフラボノイドは、全く活性を示さなかった。Mutoh らは COX-2 の転写活性に対するフラボノイドの構造活性相関を検討し、5 位および 7 位の水酸基における電子

密度が低いほど抑制活性が強いことを示しており⁴⁹、本試験とほぼ同様の結果を得ていることから、フラボノイドの構造と PGE₂ 産生抑制活性の関係は、これらの電子密度への影響から推測できる可能性がある。

また、Kalkbrenner らは単離した COX 酵素の活性阻害とフラボノイドの構造について、平面構造をとらないフラボノイド (catechin、epicatechin) の方が、平面構造をとるフラボノイド (galangin、quercetin) 等よりも抑制活性が強いとしており⁵⁰、この点では本試験と異なる結果を示している。しかし、フラボンにおける B 環の *o*-ジフェノール構造やフラボノールにおける A 環 5、7 位の水酸基の抑制活性への影響については同様の結果であることから、細胞刺激による結果と単離された酵素活性阻害では若干の差異は認められるものの、フラボノイドの PGE₂ 産生抑制活性についてはかなり類似した結果が得られた。

(2) フラボノイドの PGE₂ 産生抑制作用機序

フラボノイドの抑制作用機序については、resorcin 構造を有するフラボノイドである quercetin、kaempferol、genistein や resveratrol が大腸がん細胞において、COX-2 プロモーター活性を抑制する効果が確認されており⁵¹、本実験においても、これらのフラボノイドは高い PGE₂ 産生抑制効果を示した。この結果より、フラボノイドにおける PGE₂ 産生抑制活性の作用機序として、LPS 刺激マクロファージにおける COX-2 プロモーター活性を抑制する可能性が示唆された。

また、COX は酸素添加酵素であることから、フラボノイドの抗炎症活性が抗酸化活性に由来する可能性があると考えられた。例えば、フラボノイドのラジカル消去活性は良く知られているが、LPS シグナルによって誘導される NF-κB の活性化がラジカル消去能により抑制されることが報告されている⁵²。また、フラボノイドのラジカル消去活性には、B 環の 3'、4'位に配位した水酸基が非常に重要な働きを示すとされている⁵³。しかし、本実験においては、前述のように B 環の水酸基を持たない方が 3'、4'位に水酸基を持つものより活性が高いことから、フラボノイドの抗酸化活性の PGE₂ 産生に対する影響はあまり大きくはないと考えられた。

さらに、別な作用機序として、quercetin、genistein、apigenin および

resveratrol 等のフラボノイドがチロシンキナーゼ蛋白発現を阻害するというメカニズムが報告されている^{54, 55}。この酵素は、シグナル伝達において大変重要な役割を持つことから、これらのフラボノイドの示す強い PGE₂ 産生抑制活性が、LPS 由来のチロシンキナーゼシグナル伝達系を介した COX-2 蛋白発現阻害によるものである可能性が存在する。本実験において、stilbene に属する resveratrol の PGE₂ 産生抑制活性は genistein に匹敵する IC₅₀ を示しており、resveratrol の示す PGE₂ 産生抑制効果の一部が、チロシンキナーゼ阻害に由来すると考えられた。また、フラボノイドの一種である wogonin (5, 7-dihydroxy-8-methoxyflavone) では、亜急性期の皮膚炎症における COX-2 の mRNA を低下させたり、急性炎症における PGE₂ 含量を減少させることが報告されている⁵⁶。これらの結果から、特定のフラボノイドでは COX-2 の mRNA レベルを低下させている可能性が類推された。

LPS で刺激したマクロファージにおいては、PGE₂ 産生量の増加と比例して COX-2 蛋白質発現の増大が認められる。本実験では、数種のフラボノイドにおいて、COX-2 蛋白量がコントロールに比べ減少しており、PGE₂ 産生量の減少が、COX-2 蛋白質発現のレベルと相関することが明らかになった。

また、COX-2 の誘導を阻害することによりアレルギー性炎症反応を抑制できることは良く知られている⁵⁷。これらの知見はアレルギーにおける抗原抗体反応によって起こる炎症の繰り返しにおいて、抗原投与によって誘導された COX-2 が重要な働きをすることを示唆している。本試験において、apigenin や genistein は COX-1 の蛋白質発現に影響を与えることなく、COX-2 蛋白質の発現を抑制しており、PGE₂ 産生抑制を強く抑制するフラボノイドでは、COX-2 蛋白質の発現をも抑制されることが示唆された。

LPS 刺激したラット炎症性腹腔マクロファージにおいて、フラボノイドは COX-2 由来の PGE₂ 産生を抑制するが、COX-1 由来の PGE₂ 産生はほとんど抑制しておらず、COX-2 の選択的阻害剤である NS-398⁵⁸と同じ効果を示した。NS-398 処理により PGE₂ 産生は強く抑制され、その IC₅₀ は 0.1 μM 以下であった。非ステロイド抗炎症薬であるアスピリンは COX-1 と COX-2 のいずれの酵素も不可逆的に不活化することにより、PGE₂ 産生を抑制する⁵⁹。いくつかのフラボノイドではアスピリンとほぼ匹敵する IC₅₀ を示したが、その作用機

序は酵素の不可逆的不活化とは異なると考えられた。

また、用量反応曲線および Western blot による COX-2 蛋白質の発現における結果では、40 μM の apigenin (flavone) は PGE₂ 産生を強く阻害するだけでなく、COX-2 蛋白質の発現をも抑制した。それに対し、40 μM の 7-hydroxyflavonol (flavonol) や eriodictyol (flavanone) では、PGE₂ 産生を阻害するものの、COX-2 蛋白質の発現抑制は弱かった。このことから、flavone は COX-2 蛋白質の発現を直接抑制することが明らかとなった。COX-2 蛋白質の発現以外の flavonol や flavanone の PGE₂ 産生抑制作用機序としては、フラボノイドが PGE 合成酵素やホスホリパーゼ A₂ 活性を阻害するという報告^{26, 60}が存在することから、これらの酵素活性阻害等に由来する可能性があると考えられた。

また、今回の検討に用いたような *in vitro* 試験ではフラボノイドの細胞膜透過性も活性発現に大きな影響を与えられられる。いくつかのフラボノイドでは、配糖体はそれに対応するアグリコンに比較し、効果が大きく減少することが確認された。例えば、quercetin は PGE₂ 産生抑制活性が IC₅₀ で 13.9 μM であるのに対し、その配糖体である rutin や quercitrin は 1000 μM 以上で、ほとんど活性は認められなかった。さらに、genistein や daidzein に対する genistin および daidzin についても同様の傾向が認められた。配糖体とアグリコンについてのこのような抑制活性の違いには、細胞膜透過性が寄与しているものと考えられた⁶¹。フラボノイドの細胞膜透過性は、フラボノイドの疎水性の強さに大きく影響されており、疎水性の強さは水酸基の数および糖の配位等によって左右される。このことが、B 環に 3 以上の水酸基を有するフラボノイドにおいて PGE₂ 産生抑制効果が認められなかった理由の一つと考えられた。

さらに、近年では *in vivo* におけるフラボノイドの代謝についての研究も進んでいる。植物や食品に含有されるフラボノイドは、flavan-3-ol (catechin 等) を除き、配糖体 (rhamnoside、glucoside、hesperidoside 等) の形で存在することが多く⁶²、本実験のような *in vitro* 試験では、フラボノイド配糖体は PGE₂ 産生抑制活性を示さないことから、生体内で作用しにくいとも考えられる。これに対し、*in vivo* で経口投与されたフラボノイドは、量的には非常に少ない

が、加水分解されたアグリコンの形で吸収されると考えられている⁶³。さらに、Erlundらの quercetin と rutin (quercetin-3-O-rutinoside) に関する薬学的な知見によれば、quercetin と rutin を経口投与した場合、血中には quercetin のグルクロン酸抱合体もしくは硫酸抱合体のみが認められ、rutin は検出されていないことから、体内におけるフラボノイドの動態としてアグリコンの抱合体であることが示唆されている⁶⁴。しかし、炎症局所では β -glucuronidase 活性の亢進に伴い、フラボノイド抱合体がアグリコンに脱抱合されることが確認されており⁶⁵、また、血清中の quercetin とその抱合体 (B 環もしくは 3 位に抱合) は、大腸がん細胞に対し、無刺激もしくは interleukin-1 β により誘導された状態で COX-2 の mRNA 発現量を低下させることが報告されている⁶⁶。以上のような知見から、フラボノイドの経口摂取による吸収量は低値であると推察されるが、血液中に確認される量でも十分な抗炎症活性を示すと考えられる。

3. ポリメトキシフラボンのアレルギー性炎症抑制効果の解明

1) J774A.1 細胞における腫瘍壊死因子 (TNF)- α 産生に対するポリメトキシフラボンの効果

(1) 実験方法

(1) - 1 試薬

Nobiletin (5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone)、tangeretin (5,6,7,8,3'-pentamethoxyflavone) (以上、和光純薬)、sinensetin (5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone)、5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone、5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone、gardenin (5-hydroxy-6,7,8,3',4',5'-hexamethoxyflavone)、3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (以上、Indofine Chemical Company, Inc., NJ, USA) を供試した。LPS は、前項と同様のものを用いた。マウス単球由来株細胞 (J774A.1) は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲されたものを用いた。

(1) - 2 J774A.1 細胞の炎症刺激方法および TNF- α 産生量の測定方法

J774A.1 細胞を 5×10^4 cells/well の濃度になるよう 10% FCS および penicillin (100 unit/ml) - streptomycin (100 μ g/ml, Sigma chemical Co.) を含む DMEM 培地 (Sigma chemical Co.) で希釈し、96-well culture plate に播種した。約 20 時間後、プレートを 37 $^{\circ}$ C に暖めた Hanks (-) で 3 回洗浄し、FCS を含まない DMEM 培地を 160 μ l ずつ well に入れた。試料は DMSO に溶解、滅菌した PBS (-) を用いて DMSO の最終濃度が 0.1% (v/v) になるよう希釈したものを 20 μ l ずつ添加し、コントロールには同量の溶媒のみを添加した。その後、DMEM 培地で 10 μ g/ml になるよう調製した LPS を 20 μ l ずつ入れ、6 時間培養し、TNF- α の産生を誘導した。

培養終了後、検鏡により細胞の状態を確認した後、培養上清をポリプロピレン製の 96-well プレート (Genetics Co. Ltd., Sunnyvale, CA, USA) に回収し、測定時まで -30 $^{\circ}$ C にて保存した。

培養上清中に遊離する TNF- α 産生量の測定には、mouse Ready-

SET-Go TNF- α ELISA kit (e-Bioscience, CA, USA) による ELISA 法を用いて測定した。測定結果は陽性対照に対する百分率で表した。

(2) 実験結果

(2) - 1 ポリメトキシフラボンの構造と TNF- α 産生抑制活性

Table 2 に供試したポリメトキシフラボンの IC₅₀ を示した。

供試したポリメトキシフラボンのうち、5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone (IC₅₀=3.7 μ M)、sinensetin (4.8 μ M) および nobiletin (5.7 μ M) において TNF- α 産生に対する高い抑制活性を示した。本試験においては、最大で 10 μ M (最終濃度) のポリメトキシフラボンを添加したが、この濃度において細胞障害性は認められなかった。

ポリメトキシフラボンはいずれも同じフラボン骨格を有していることから、産生抑制活性の強さはメトキシ基の位置と数の違いで決定されたと考えられた。その結果、nobiletin と tangeretin の比較から 4'位のメトキシ基、また 5,7,3',4',5'-pentamethoxyflavone と 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone の比較から 6 位のメトキシ基が活性発現に重要な役割を果たしていると考えられた。

Table 2 IC₅₀ values of polymethoxyflavone on TNF- α production

	IC ₅₀ (μ M)
5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone	3.7 \pm 0.9
sinensetin	4.8 \pm 0.8
nobiletin	5.7 \pm 2.2
tangeretin	>100
5,7,3',4',5'-pentamethoxyflavone	>100
gardenin	>100
3,4,7,3',4'-pentamethoxyquercetin	>100

2) マウス脾臓細胞の増殖およびサイトカイン産生に対するポリメトキシフラボンの効果

(1) 実験方法

(1) - 1 試薬

供試したポリメトキシフラボンは、前項と同じものを用いた。細胞増殖活性の測定には、cell proliferation ELISA, BrdU kit (Roche、Basel、Switzerland)を用いた。OVA (ovalbumin: Sigma Chemical Co.)、抗 CD3ε 抗体 (e-Bioscience、clone: 2C11)を使用した。

(1) - 2 使用動物および細胞の調製

8-10 週令の雄性 DO11.10 マウス (C.Cg-Tg (DO11.10) 10D1o/J、Jackson Laboratories、ME、USA)を用いた。いずれのマウスも、頸椎脱臼により速やかに屠殺し、直ちに脾臓を摘出した。摘出した脾臓を RPMI 1640 培地 (Sigma Chemical Co.) 2 ml 中で分散させ、15 ml チューブ (FALCON: #2196)に移し、8 ml にメスアップした。よく攪拌した後、1 分間静置し、上清の 7 ml を細胞浮遊液として回収した。細胞を 2×10^6 cells/ml になるよう 10% FCS および penicillin (100 unit/ml) -streptomycin (100 µg/ml) (Sigma chemical Co.)を含む RPMI 1640 培地で調製した。

(1) - 3 細胞増殖活性およびサイトカイン産生量の測定

OVA (抗原) 刺激方法: 調製した DO11.10 マウス脾臓細胞 (50 µl/well) に OVA を 10 µM (最終濃度) 添加し、さらにポリメトキシフラボンを DMSO に溶解し、最終の溶媒濃度が 0.1% (v/v) になるよう調製したものを添加した。また、コントロールには同量の溶媒のみを添加した。

抗 CD3ε 抗体刺激方法: あらかじめ抗 CD3ε 抗体 (0.5 µg/ml) を 96-well culture plate (Narge Nunc、NY、USA) に 50 µl/well ずつ入れ、4 °C で一晚コーティングしたものに、調製した脾臓細胞を 50 µl ずつ播種することにより、細胞刺激を行った。供試ポリメトキシフラボン並びにコントロールは上と同様に添加した。

脾臓細胞の増殖等は、いずれの刺激方法においても同様に測定した。刺激 70 時間後の細胞を用い、キットの手順に従い、BrdU を 2 時間取り込ませた後、化学発光による測定を行った。

サイトカイン産生は、IL-2 および IL-4 については 48 時間後、IL-10 および INF- γ については 72 時間後の培養上清を回収し、測定に用いた。回収した培養上清は測定まで -30 °C で保存し、サイトカイン量の測定には IL-2、IL-4、IL-10、INF- γ ELISA キット (Mouse cytokine Ready-SET-Go ELISA kit、e-Bioscience) を用いた。

(1) - 4 脾臓細胞の抗体産生量の測定

(1) - 2 と同様に回収した脾臓細胞を 2×10^6 cells/ml に調製し、48-well culture plate (Narge Nunc) に 50 μ l ずつ入れ、OVA (10 μ M 最終濃度) および供試ポリメトキシフラボンを加え、1 週間培養し、上清を回収した。回収した培養上清は測定まで -30 °C で保存し、IgG₁、IgG_{2a}、IgE、IgA の産生量をそれぞれ測定した。抗体産生量の測定には Mouse Immunoglobulin ELISA kit (Bethyl Inc.、TX、USA) を用いた。

(1) - 5 統計処理

実験結果は、Dunnett の多重比較を用い、 $P < 0.05$ の場合に有意であると示した。測定値は平均値 \pm 標準誤差で表した。n は一群あたりの匹数を示した。

(2) 実験結果

(2) - 1 脾臓細胞増殖に対するポリメトキシフラボンの効果

OVA 刺激による DO11.10 マウス脾臓細胞の増殖をコントロールに対する百分率として Fig. 5 に示した。なお、ポリメトキシフラボンのみを添加し、抗原刺激を行わなかった場合には、脾臓細胞の増殖は認められなかった (データ省略)。Tangeretin および 5,6,3',4',5'-pentamethoxy flavone では供試した 0.4-3.3 μ M の濃度範囲でコントロールとほぼ同等の細胞増殖を示したが、nobiletin と sinensetin では濃度依存的に抗原刺激による脾臓細胞の増殖

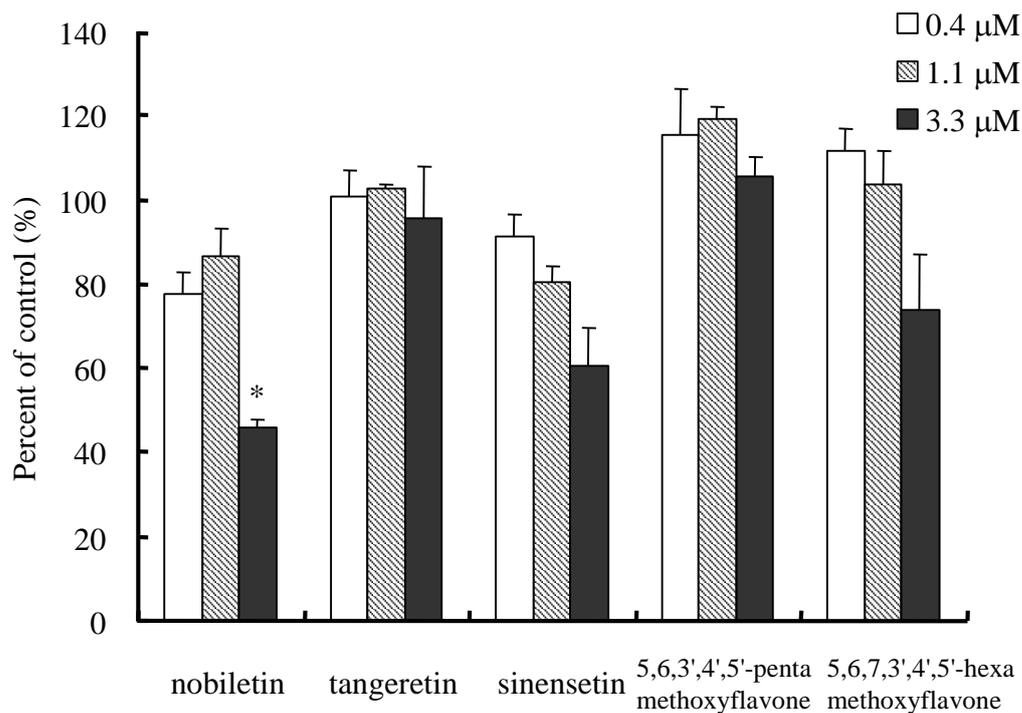


Fig. 5 Effect of polymethoxyflavones on antigen-stimulated proliferation of DO11.10 mice splenocytes.

Splenocyte were prepared from DO11.10 mice and cultured with polymethoxyflavones and 10 μM of OVA described in methods.

The cell proliferation were measured at 70-72 hours after stimulation.

*: significantly different from control (p<0.05)

を抑制する傾向が認められた。

そこで、抗 CD3 ϵ 抗体による刺激を行い、脾臓細胞の増殖を検討した。コントロールと比較すると、5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone ではすべての濃度で増殖を亢進する傾向が認められた。それ以外のポリメトキシフラボンにおいては、0.4、1.1 μM ではコントロールとほぼ同程度の増殖を示したが、3.3 μM では増殖が抑制される傾向にあった。しかし、いずれも有意差は認められなかった (Fig. 6)。

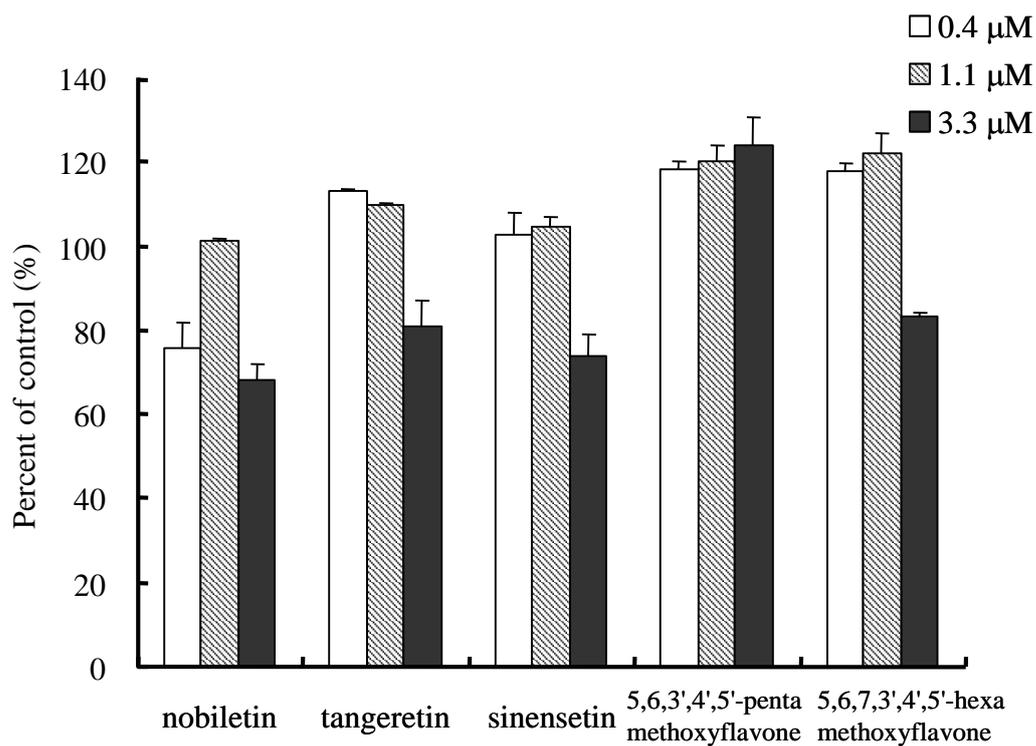


Fig. 6 Effect of polymethoxyflavones on anti-CD3 ϵ antibody stimulated proliferation of DO11.10 mice splenocytes.

Splenocyte prepared from DO11.10 mice were stimulated by plate-coated anti-CD3 ϵ antibody and cultured with polymethoxyflavones described in methods.

The cell proliferation were measured at 70-72 hours after stimulation.

(2) - 2 脾臓細胞のサイトカイン産生に対するポリメトキシフラボンの効果

OVA 刺激による DO11.10 マウス脾臓細胞培養上清中の、IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ の 4 種のサイトカイン産生量を測定した結果を Fig. 7 にコントロールに対する百分率で示した。コントロールにおける、それぞれのサイトカインの培地中に遊離した量は、IL-2 (1004.9 \pm 250 pg/ml)、IL-4 (11.0 \pm 5.6 pg/ml)、IL-10 (905.1 \pm 262 pg/ml)、IFN- γ (15.6 \pm 6.3 ng/ml) であった。IL-2 産生量では、すべてのポリメトキシフラボンで濃度依存的に抑制の傾向が認められ、3.3 μ M の濃度では有意に産生が減少していた。IL-10 では 5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone の 3.3 μ M および 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone の 1.1、3.3 μ M において有意な減少が認められた。また、IFN- γ の産生量はすべてのフラボノイドで 1.1、3.3 μ M の濃度において有意にコントロールより産生量が減少していた。しかし、IL-4 においては、いずれのポリメトキシフラボンもコントロールの産生量に対し有意な差は認められず、tangeretin においては逆に濃度依存的に増加の傾向があった。

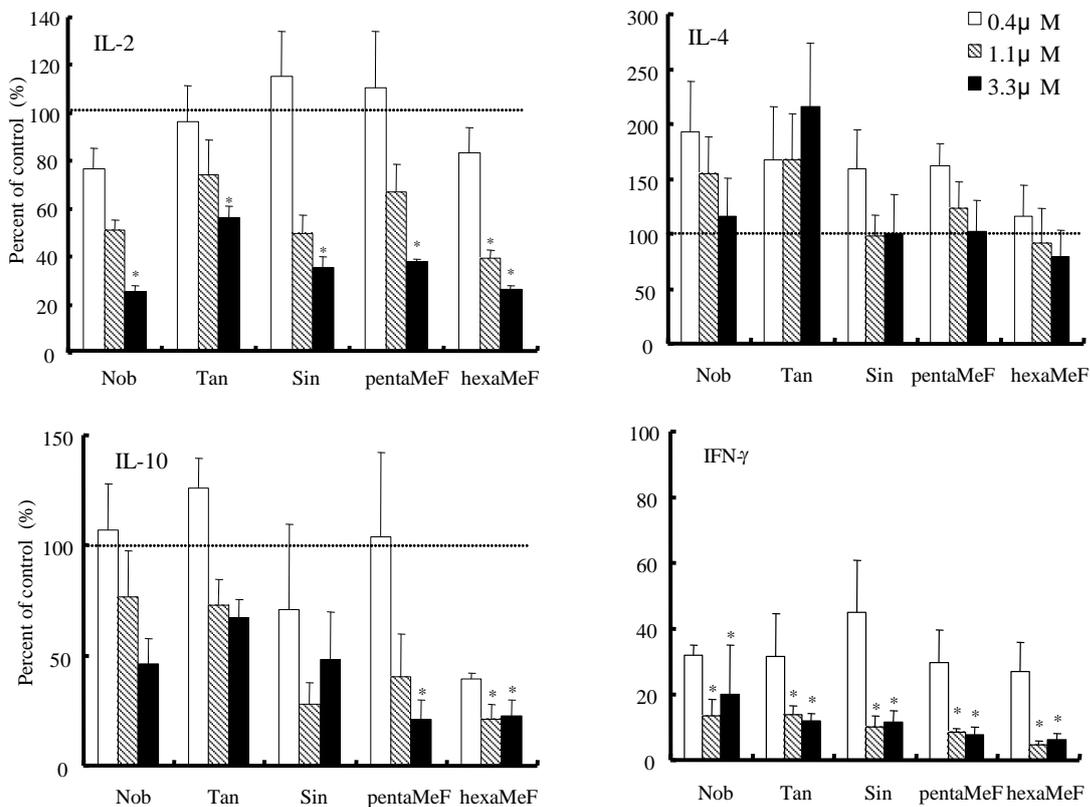


Fig. 7 Effect of polymethoxyflavones on antigen-specific cytokines production of DO11.10 splenocytes.

Splenocytes were prepared from DO11.10 mice and cultured with polymethoxyflavones and 10 μM of OVA described in methods.

The supernatants were collected at 48 hours (for IL-2, IL-4) and 72 hours (for IL-10, IFN-γ) after stimulation. Cytokines in cultured supernatants were measured by ELISA.

*: significantly different from control (p<0.05)

Nob: nobiletin, Tan: tangeretin, Sin: sinensetin, pentaMeF: 5, 7, 3', 4',5'-polymethoxyflavone, hexaMeF: 5, 6, 7, 3', 4',5'-polymethoxyflavone

(2) - 3 脾臓細胞の抗体産生に対するポリメトキシフラボンの効果

OVA 刺激による DO11.10 マウス脾臓細胞の抗体産生量を Fig. 8 に示した。コントロールにおける各種抗体の培養液中の量は、IgG₁ (133.3±36.4 ng/ml)、IgG_{2a} (6.1±3.1 ng/ml)、IgA (63.0±28.1 ng/ml)、IgE (1.3±0.5 ng/ml) であった。

いずれの抗体産生量においても動物個体間のばらつきが大きかったが、nobiletin および tangeletin は濃度依存的に IgG₁ の産生量を増加させる傾向が認められた。それに対し、5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone の 1.1 および 3.3 μM における IgG₁ の産生量は、コントロールに比較して有意な減少が認められた。今回供試したポリメトキシフラボンのうち、5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone および 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone においては、IgE を除き、IgG₁、IgA、IgG_{2a} 抗体の産生量がコントロールに比較し、濃度依存的に減少する傾向が認められた。

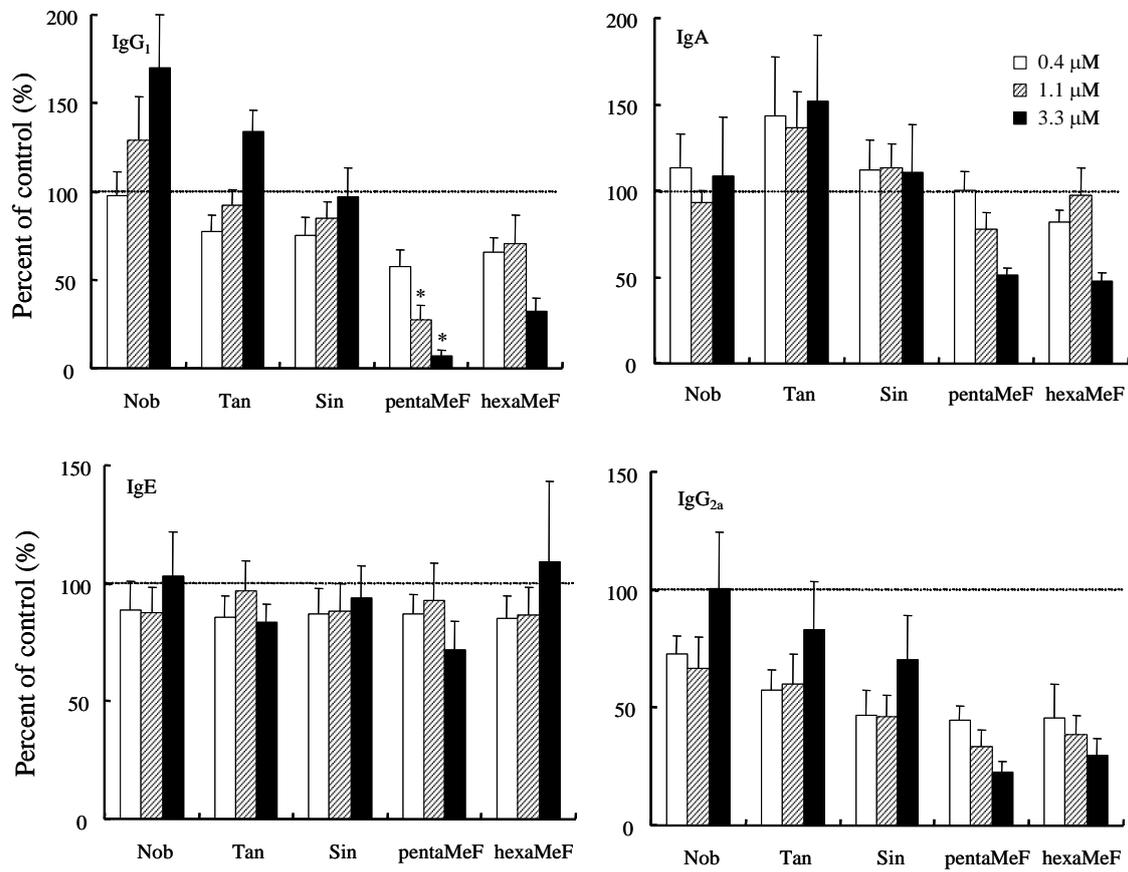


Fig. 8 Effect of polymethoxyflavones on antigen-specific immunoglobulin production of DO11.10 splenocytes.

Splenocytes were prepared from DO11.10 mice and cultured with polymethoxyflavones and 10 μM of OVA described in methods.

Cultured supernatants were collected at 7 days after stimulation. Cytokines in the supernatants were measured by ELISA.

*: significantly different from control ($p < 0.05$, $n = 5$)

Nob: nobiletin, Tan: tangeretin, Sin: sinensetin, pentaMeF: 5, 7, 3', 4', 5'-polymethoxyflavone, hexaMeF: 5, 6, 7, 3', 4', 5'-polymethoxyflavone

3) ラット好塩基球性白血病細胞 (RBL-2H3) の抗原刺激による脱顆粒に対するポリメトキシフラボンの効果

(1) 実験方法

(1) - 1 細胞および試薬

ポリメトキシフラボンは前項と同じものを供試した。ラット好塩基球性白血病細胞 (RBL-2H3) はヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲されたものを用いた。抗 dinitrophenol IgE 抗体 (anti-DNP IgE)、Triton X-100、DNP-human serum albumin (HAS) (以上 Sigma Chemical Co.)、wortmannin、p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (和光純薬)を用いた。

(1) - 2 脱顆粒抑制活性測定方法

RBL-2H3 細胞を 2.5×10^5 cells/well の濃度になるよう 10% FCS および penicillin (100 units/ml) - streptomycin (100 μ g/ml) (Sigma chemical Co.) を含む DMEM 培地 (Sigma chemical Co.) で希釈し、24-well culture plate (FALCON #2047) に播種し、37 $^{\circ}$ C、95% air-5% CO₂ で培養した。約 20 時間後、細胞に 50 ng/ml の anti-DNP-IgE を 500 μ l 添加し、2 時間後に細胞を 37 $^{\circ}$ C に暖めた MT buffer [Modified Tyrode's buffer (137 mM NaCl, 2.7 M KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM glucose, 20 mM HEPES, 0.1% BSA)] で 2 回洗浄し、抗体を除去した。その後、DMSO に溶解した試料を最終濃度 0.1% (v/v) になるよう MT buffer で希釈、490 μ l/well を添加し、10 分間インキュベートした。陽性対照として、wortmannin を DMSO に溶解、MT buffer で 5 μ M に希釈したものを用いた。10 μ l の 2.5 μ g/ml DNP-HAS を添加し、抗体を架橋させることにより、細胞内の β -hexosaminidase を放出させた。培養上清および 0.1% Triton X-100 (Sigma chemical Co.) を用いて細胞を溶解した cell lysate を用い、それぞれ 50 μ l に、100 μ l の 3.3 mM p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (0.1 M citrate buffer, pH4.5) を基質として加え、37 $^{\circ}$ C で 25 分間酵素反応を行い、2 M glycine buffer (pH10.4) 100 μ l で反応を

終了させた後、405 nm の吸光度を測定した。脱顆粒は計算により細胞内酵素量に対する放出割合 (%) として求めた。

(2) 実験結果

β -hexosaminidase を指標として用い、ポリメトキシフラボンにおける RBL-2H3 細胞の脱顆粒抑制活性を検討した。それぞれ前項と同じ試料を用い、10 μ M の濃度で細胞に添加した。その結果、Fig. 8 に示したように、nobiletin と sinensetin において、 β -hexosaminidase の放出抑制が認められ、10 μ M を添加した際の抑制率はそれぞれ 21 および 31% であった。

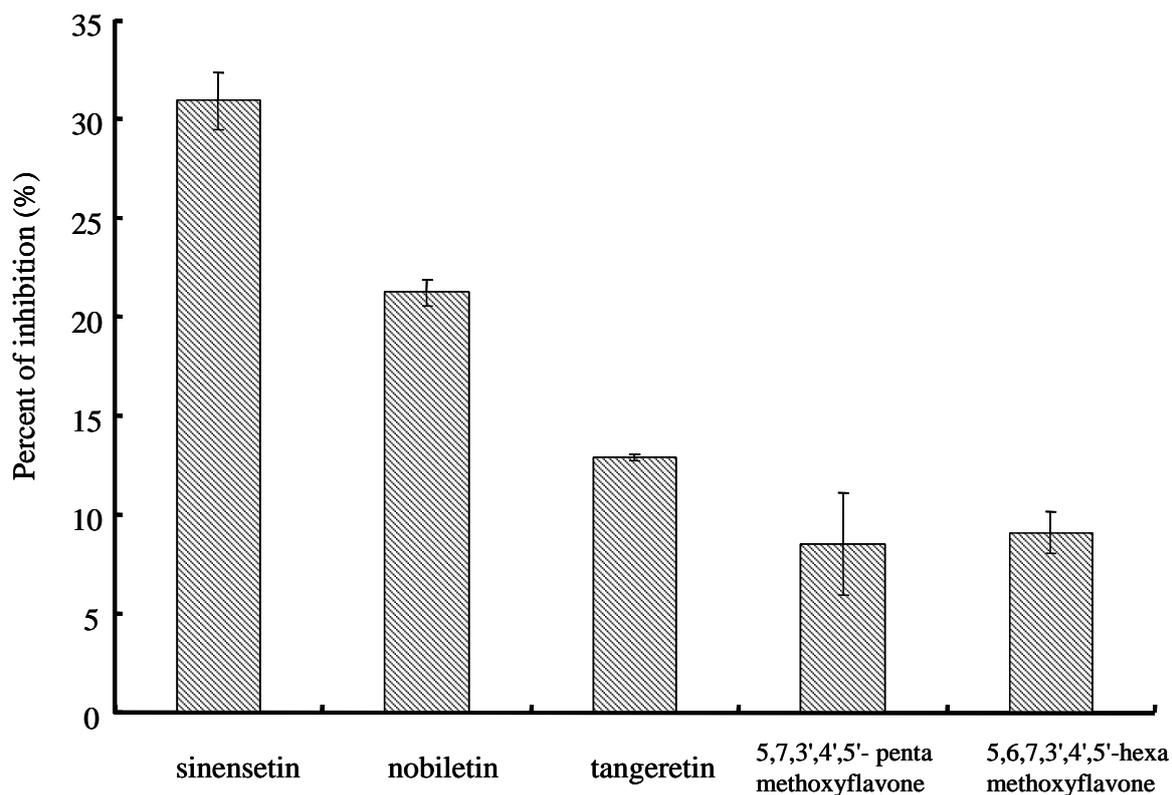


Fig. 9 Inhibitory effect of polymethoxyflavones on degranulation of RBL-2H3 cells .

RBL-2H3 cells (2.5×10^5 cells/well) were cultured in 24-well plate and sensitized by anti-DNP-IgE. After 10min, incubation with polymethoxyflavones, cells were stimulated by the antigen for 30 min. The degranulation activity was measured as activity of β -hexosaminidase.

The degranuration was calculated from the enzyme concentration in cell lysate.

4) 考察

(1) TNF- α 産生抑制効果

フラボノイドの TNF- α 産生に対する抑制効果に対しては多くの報告⁶⁷があり、また以前の報告⁴²においても、apigenin、kaempferol、quercetin、catechin、phloretin 等、いくつかのフラボノイドが IC₅₀ で 3 μ M 程度という高い抑制活性を示すことを明らかにした。これらの結果から、TNF- α 産生抑制活性を示すフラボノイドには、前項の PGE₂ 産生抑制と同様に C2-C3 の二重結合や 4 位のケトン基、5,7,4' 位の水酸基を有するものが多いことが確認された。今回供試したポリメトキシフラボン、カンキツ類の果皮に多く含有されているフラボノイドであり、フラボン骨格として C2-C3 の二重結合および 4 位のケトン基を有し、さらにフラボンの水酸基がメトキシ基に置換された構造を持つ。ポリメトキシフラボンは、多くのメトキシ基を有することから疎水性が強く、細胞透過性が高いと考えられるため、より強い抑制効果を示す可能性が期待された。しかし、本試験で抑制活性を示した 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone や sinensetin、nobiletin でも IC₅₀ は 3.7-5.7 μ M であり、apigenin 等とほぼ同じ程度であった。ポリメトキシフラボンの中では、メトキシ基の位置により活性の有無の差異が認められ、TNF- α 産生の抑制には 6 および 4' 位のメトキシ基が活性発現に重要な役割を果たすことが示唆された。

ポリメトキシフラボンの TNF- α 産生抑制については、Manthey らがヒト末梢血白血球を用いた報告⁶⁸において mRNA の誘導を抑制することを明らかにしていることから、同様の作用機序と考えられた。

(2) 脾臓細胞の増殖、サイトカインおよび抗体産生に対する効果

アレルギー性炎症疾患においては、抗原特異的な免疫応答を担当する脾臓細胞の増殖およびサイトカインや抗体の産生が、T 細胞の分化を含めたアレルギー発症にあたり、重要な要因と考えられる。そこで、抗原や抗 CD3 ϵ 抗体を用いた刺激誘導に対するポリメトキシフラボンの効果について検討を行った。

供試した濃度範囲においては、ポリメトキシフラボンの細胞毒性は認められ

なかった。しかし、有意差は認められないものの、抗原刺激、抗 CD3 ϵ 抗体刺激のいずれにおいても増殖は抑制される傾向であった。抗 CD3 ϵ 抗体による処理では T 細胞のみが刺激を受けると考えられているが、OVA による抗原刺激とほぼ同様の傾向が認められることから、ポリメトキシフラボンは T 細胞の活性抑制を通じて、抗原特異的増殖応答を抑制していると考えられた。

サイトカインについては、いわゆる Th2 型サイトカインである IL-10、また Th1 型サイトカインの IL-2、IFN- γ のいずれにおいても産生の抑制が認められた。しかし、IFN- γ の産生抑制が強いこと、さらに Th2 への分化を誘導する IL-4 の産生は抑制されないことから、サイトカインの産生に対する効果としては、供試したポリメトキシフラボンは Th2 型細胞優位に分化を誘導する可能性が推測された。

それに対し、抗体産生に対する効果を検討したところ、Th2 型と考えられる IgG₁ の産生量はポリメトキシフラボンの種類によって、抑制活性を有するものと増強の傾向を示すものが認められた。特に、5,6,3',4',5'-penta-methoxyflavone では IgG₁ の産生が濃度依存的に強く抑制されており、その他 IgA や IgG_{2a} の産生量も減少の傾向が認められたことから、抗体産生細胞の活性抑制を通じ、アレルギー性炎症を抑制する可能性も示唆された。

サイトカイン産生と抗体産生では一見矛盾する結果も得られていることから、一部のポリメトキシフラボンは B 細胞における抗体産生等に作用する可能性も推測された。

免疫担当細胞に対するフラボノイドの効果では、Guo らがイソフラボンの genistein 投与が抗原刺激や抗 CD3 ϵ 抗体刺激による脾臓細胞増殖には影響を与えないが、無刺激の細胞を増殖させること、また IgG や IgM の産生に影響しないことを報告している⁶⁹。また、ポリメトキシフラボンの混合抽出物が免疫したマウスの脾臓細胞重量を用量依存的に増加させるという報告もある⁷⁰。しかし、フラボノイドには脾臓細胞の増殖を抑制する活性を有するものが多い⁷¹ことから、ポリメトキシフラボンにおいても脾臓細胞の増殖や活性の抑制を通じてサイトカインや抗体の産生が抑制されたものと考えられた。

(3) RBL-2H3 細胞脱顆粒抑制活性

RBL-2H3 細胞を抗 DNP IgE 抗体で感作した後、DNP-HAS で抗原処理し架橋することによって細胞内顆粒を放出させる方法を用い、脱顆粒に対するポリメトキシフラボンの効果を検討したところ、供試したポリメトキシフラボンのうち、sinensetin や nobiletin には脱顆粒抑制活性が認められた。しかし、Matsuda らの報告によれば luteolin、diosmin、fisetin、quercetin では 2.1-4.2 μM の IC_{50} を示すとされているが⁷²、今回供試したポリメトキシフラボンの RBL-2H3 の脱顆粒抑制活性はそれらのフラボノイドよりも低かった。

Middleton らはヒト好塩基球におけるヒスタミン遊離について、様々な刺激剤に対する抑制活性を検討し、apigenin は供試したすべての刺激に対し抑制活性を示すのに対し、tangeretin は抗原刺激による遊離は抑制しないが、Con A や TPA 刺激による遊離を抑制することを報告しており⁷³、本試験で検討した抗原刺激による脱顆粒では同様の結果が得られている。このことからポリメトキシフラボンの脱顆粒抑制活性において、メキシ基の有無や位置は IgE 依存的な脱顆粒刺激に影響すると考えられた。

4. 小括

炎症初期のケミカルメディエータとして、ラット炎症性腹腔マクロファージの LPS 刺激による PGE_2 産生に対するフラボノイドの抑制効果について検討を行った。フラボノイドの抑制効果は、基本骨格構造の違いによって差が認められ、flavone と flavonol が最も効果が高く、次いで flavanone の効果が高かった。構造活性相関の検討により、C 環の C2-C3 が二重結合であること、4 位にケトン基 (オキシ構造) を持つことが活性発現に重要な要素であると考えられた。その他、A 環や B 環においては水酸基の位置および数が抑制活性に関与していた。水酸基はフラボノイドの疎水性に影響を与えることから、フラボノイド配糖体に活性が認められなかったことと合わせ、細胞膜透過性が抑制活性発現に大きく関わっていることが示唆された。さらに、今回特に強い抑制活性を示したフラボノイドでは、アラキドン酸から PG を産生する際に律速酵素となる脂肪酸シクロオキシゲナーゼ蛋白質の発現も抑制されていたこと

から、フラボノイドの PGE_2 産生抑制作用は、酵素活性の抑制だけに留まらず、酵素蛋白質の発現抑制にも起因することを明らかにした。

また、近年抗腫瘍作用等が明らかにされつつあるポリメトキシフラボンを試し、 PGE_2 と同様に炎症初期に産生される重要なサイトカインの一つである $\text{TNF-}\alpha$ の産生に対する効果、脾臓細胞の増殖やサイトカイン、抗体産生に対する効果、また RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制効果についての検討を行った。その結果、nobiletin をはじめとする一部のポリメトキシフラボンに $\text{TNF-}\alpha$ 産生抑制活性および脱顆粒阻害活性が確認された。脾臓細胞の増殖抑制活性に対するポリメトキシフラボンの効果については明らかとはならなかったが、サイトカインや抗体の産生においては、いわゆる Th1 型サイトカインである $\text{IFN-}\gamma$ 産生の抑制、 IgG_1 抗体産生の抑制等が認められた。しかし、本章で検討した炎症性ケミカルメディエータ産生抑制に関わる機能は、いずれもポリメトキシフラボンだけに認められる活性ではないことから、フラボノイド全般に共通する作用機序に基づくものと推測された。

以上の結果により、フラボノイドは炎症初期に重要な役割を果たす PGE_2 やサイトカイン等のケミカルメディエータの産生抑制を通じ、炎症抑制効果を示す可能性があると考えられた。

第 2 章

炎症部位への好中球の遊走の測定
および白血球接着分子の発現に対する
フラボノイドの効果

1. 序論

本章においては、フラボノイドの抗炎症活性のうち、白血球浸潤に着目し、その抑制についての検討を行った。炎症反応は、先に述べたように血管透過性の亢進、それに引き続く白血球の炎症局所への浸潤、そして治癒という3つの過程に大きく分けることができる。アレルギー性炎症や、慢性炎症においては、血管透過性の亢進と白血球の浸潤が、白血球から遊離される走化因子等により、繰り返し起こっていると考えられる。つまり、炎症局所への白血球遊走がこの複雑な反応の制御を担っていると言っても過言ではない。

白血球の炎症局所への遊走は、いくつかの過程を経て起こる²⁰。最初に、生体は何らかの刺激を受けると、血管内を血流に沿って流れている白血球は血管壁付近を流れるようになり、次に血管内皮細胞表面を転がる現象が起こる。この現象をローリング(rolling)と呼んでいる。次に、白血球は内皮細胞表面に接着(adhesion)し、内皮細胞間を通過した後、血管周囲の結合組織を通り、最後に炎症局所に向かって移動していく。浸潤の初めの段階であるローリング反応には、接着因子である selectin と呼ばれる P-selectin (CD62P)、L-selectin (CD62L) および E-selectin (CD62E) というレクチンに類似した糖鎖構造を持つ Ca^{2+} 依存性の蛋白⁷⁴が関与する。これらの selectin のうち、L-selectin は恒常的に白血球の細胞表面に発現しているが、P-selectin および誘導型 E-selectin は血管内皮細胞に発現する^{25, 75}。P-selectin は血小板の α -顆粒内および血管内皮細胞の Weibel-Palade 小体に不活性型で存在する²³。TNF- α や IL-1 のような炎症性サイトカインは、まず P-selectin 分子を活性化して内皮細胞の表面に発現させ、それに引き続き E-selectin の発現を誘導する。

このローリング反応は、白血球の血管外浸潤と炎症局所への集積に必須のものであり、このような白血球のローリング、接着、浸潤について詳細な検討を行うためには、白血球ローリングの動態を直接顕微鏡観察するという手法が非常に有効である。小動物を用い、麻酔下で腸間膜静脈を体外に引き出し、顕微鏡で直接血管内を観察する方法として、生体顕微鏡法がある。しかし、生体顕微鏡法においては、外科的手段により引き起こされる障害そ

のものにより白血球浸潤が誘発されることから、長時間の試験を行うのが困難である。そこで、血管内白血球数の組織学的定量法を用い、ラット腸間膜静脈におけるヒスタミン誘導による白血球のローリングを解析する方法を開発した。特に、組織学的手法は腸間膜静脈の生体顕微鏡観察のような外科手術等の障害を受けない方法であるため、白血球の血管外浸潤の測定に関しても有効である^{76, 77}。さらに、本法を用い、TNF- α や IL-1 α により誘導された白血球浸潤について検討した。

また、野菜や果実等植物由来のいくつかのフラボノイドで、内皮細胞表面の接着分子発現を抑制することが報告されており^{78, 79}、その作用機序としてチロシンキナーゼ、MAP キナーゼ、MEK キナーゼ等のシグナル伝達過程の酵素阻害があると考えられている。フラボノイドによる接着分子発現抑制効果は、白血球の浸潤を減少させ、抗炎症や抗アレルギーにつながるものと期待される。しかし、フラボノイドの接着分子発現、特に E-selectin に関する報告^{80, 81}は少ない。また、フラボノイド等の機能性成分が吸収され、血中に移行した場合、最初に影響する細胞が血管内皮細胞であると考えられることから、フラボノイドが血管内皮細胞に作用することにより、E-selectin の発現に影響すると想定される。以上のことから、TNF- α により惹起されたヒト臍帯静脈内皮細胞表面に発現する E-selectin の発現に対するフラボノイドの効果を検討した。

2. 組織標本による好中球のローリングと遊走測定法を用いた炎症反応解析

1) 実験方法

(1) 試薬

ヒト recombinant TNF- α および IL-1 α は大日本製薬(大阪、日本)より供与されたものを用いた。TCV-309 (3-bromo-5-[N-phenyl-N-[2-[[2-(1,2,3,4-tetrahydro-2-isoquinolylcarbonyloxy) ethyl] carbamoyl] ethyl] carbamoyl]-1-pro-pylpyridiniumnitrate) は、武田薬品(大阪、日本)より分

与されたものを用いた。Fucoidin (Sigma Chemical Co.)、Giemsa 染色液 (Merck, Darmstadt, Germany)、カゼインと Canada balsam (和光純薬) を用いた。

(2) 使用動物

雄性 SD ラット (200-250 g、日本 SLC、静岡、日本) を用いた。動物の飼育及び取り扱いについては、独立行政法人食品総合研究所および北里大学における動物実験委員会勧告に準じて行った。

(3) TNF- α および IL-1 α 、カゼインの腹腔内投与による炎症惹起

TNF- α および IL-1 α 、カゼインの SD ラットに対する腹腔内投与は、エーテル麻酔下で行った。TNF- α および IL-1 α については、37 °C に暖めた滅菌済み生理食塩水 5 ml に溶解し、カゼインは 37 °C に暖めた Krebs-Ringer bicarbonate solution 5 ml に溶解したものをを用いた。

ラットに腹腔内投与した後、pentobarbital (Nembutal[®] sodium solution、Abbot Laboratories、North Chicago、IL、USA、60 mg/ml) 0.2 ml を心臓内投与することにより血流を停止させた。その後開腹し、腸間膜静脈を直ちに摘出した。組織のサンプリングを行う前に、動脈血試料を尾動脈より採取し、全身における多形核白血球 (PMN) および単核球 (MN) 量の計測に用いた。これらの細胞は、Türk 液 (1:10、和光純薬) で染色した後、Burker-Türk の血球計算盤を用いて計測した。

(4) 腸間膜静脈の組織標本における細静脈内および組織中の白血球の測定

腸間膜の試料は既報⁷⁵ のように、paraformaldehyde (2%) および glutaraldehyde (5%) を用いて固定し、Giemsa 染色液 (1:20) にて染色、乾燥後、Canada balsam でスライドガラス上にマウントした。また、細静脈 (内径 20-50 μm) 内の PMN および MN 白血球の濃度も既報と同様に、血管を円筒形であると見なした上で、幾何学的に計算した。すなわち、ローリングしている白血球の数は、微細血管における白血球の総数を全身性のものから減算

することにより求めた。血管内の白血球は血管の体積 (nl) あたりで換算し、血管内白血球量と全身の白血球量の比率により表示した。血管内白血球濃度の平均値は、動物 1 匹あたり 2-6 箇所 of 血管を測定し、それらを平均して表した。血管外白血球数は、細静脈 (内径 20-50 μm) の周辺部を調べた。血管周辺部 200x200 μm の浸潤した PMN 白血球を 1000 倍の顕微鏡下で計測した。

(5) 統計処理

実験結果は、one-way ANOVA および 3 ないしそれ以上の群の比較には Dunnett の多重比較、2 群の比較には Student の *t*-test を用い、 $p < 0.05$ の場合に有意であるとした。測定値は平均値 \pm 標準誤差で表した。n は一群あたりの匹数を示した。

2) 実験結果

(1) 細静脈の直径と多形核白血球の浸潤との関係

多形核白血球の浸潤と細静脈血管の直径との関係を明らかにするため、腸間膜のプレパラートの適当な範囲を数えた。直径 20-50 μm の腸間膜細静脈周辺の様々な場所を決め、多形核白血球の数を計測し、血管の直径と浸潤の関係を明らかにした。相関直線は、 $y = 1.13x + 104.59$ 、 $r^2 = 0.0076$ (n=15、x: 血管の直径、y: 浸潤した多形核白血球数) であった。この結果から、細静脈血管の直径と浸潤した多形核白血球数には相関がないことが明らかになった。そこで、これ以降、ランダムに選択した 20-50 μm の直径を持つ細静脈周辺の多形核白血球数を計測し、浸潤の指標とした。

(2) TNF- α 、IL-1 α およびカゼインにより誘導された炎症における多形核白血球の浸潤の時間経過

本法を用い、TNF- α 、IL- α およびカゼインにより誘導された炎症における多形核白血球の浸潤を測定した (Fig. 10A)。TNF- α 誘導による炎症では、浸潤のピークは投与 3 時間後に認められた。IL-1 α 誘導においても同様にピ

ークは 3 時間後であったが、カゼイン誘導では最初の多形核白血球浸潤のピークが 2 時間後にあり、その後 5 時間後に再度増加した。

(3) カゼイン誘導炎症における多形核白血球と単球のローリングの時間経過

カゼインによる炎症において、ローリングの指標としての細静脈血／全身血の白血球濃度比を Fig. 10B に表した。多形核白血球では、投与 1 時間後に最初のピークがあり、4 時間後に 2 番目のピークが観察された。それに対し、単球では、カゼインの投与後 5 時間目まで徐々にローリングが増加した。

(4) カゼイン炎症 1 時間後におけるローリングに対する PAF アンタゴニストおよび selectin 阻害薬の効果

カゼイン炎症 1 時間後における特異的 PAF アンタゴニスト(TCV-309: 0.1 mg/kg)の白血球ローリングに対する効果を検討した(Fig. 11A)。TCV-309 および selectin 阻害薬である fucoidin を尾静脈よりカゼインと同時に投与したところ、TCV-309 は 1 時間後の多形核白血球のローリングに対し全く影響を与えず、単球のローリングに対しても同様であった。それに対し、selectin 阻害薬である fucoidin を投与した場合には多形核白血球のローリングは阻害されたが、単球には効果が認められなかった。

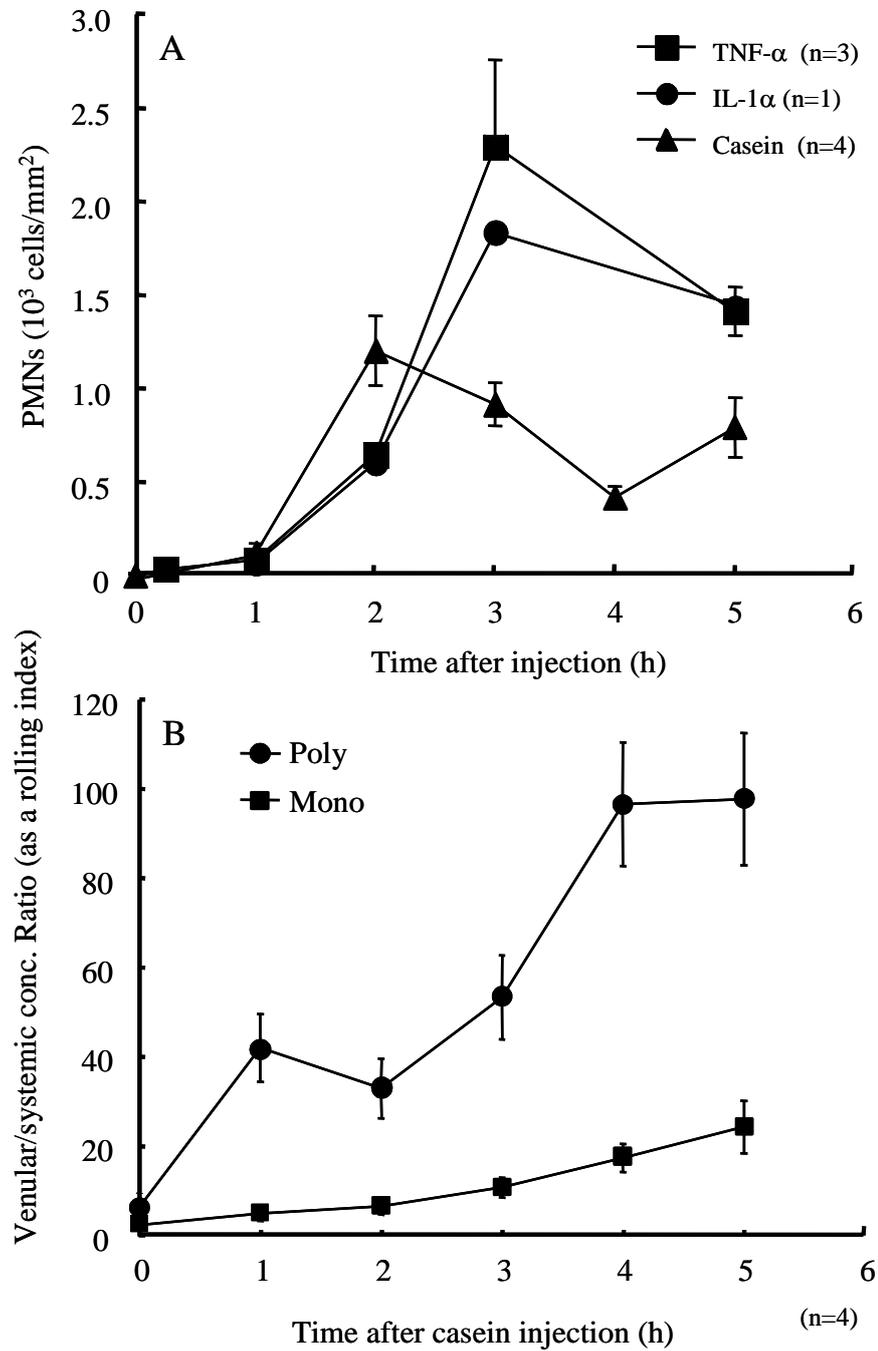


Fig. 10 Leukocytes rolling and migration induced by TNF- α , IL-1 α , and 1% casein.

A: PMN migration with TNF- α , IL-1 α and 1% casein stimulation.

B: Leukocyte rolling with 1% casein stimulation.

Values were expressed by means \pm standard error.

(5) TNF- α 、IL-1 α およびカゼイン誘導炎症における多形核白血球の浸潤
に対する selectin 阻害薬および PAF アンタゴニストの効果

TNF- α 、IL-1 α およびカゼイン誘導炎症における多形核白血球浸潤に対する selectin 阻害薬および PAF アンタゴニストの効果を検討した (Fig. 11B、11C および 11D)。Fucoïdin は TNF- α 投与 3 時間後における多形核白血球の浸潤に対し濃度依存的な抑制を示し、TCV-309 においても同様の傾向が認められた。IL-1 α による炎症においては、10 mg/kg の fucoïdin は多形核白血球の浸潤を完全に抑制し、TCV-309 も 0.1 mg/kg でほぼ完全に抑制した (Fig. 11C)。カゼイン投与 2 時間後では、fucoïdin (1-10 mg/kg) は濃度依存的に多形核白血球の浸潤を抑制し、0.1 mg/kg の TCV309 においても抑制が確認された (Fig. 11D)。

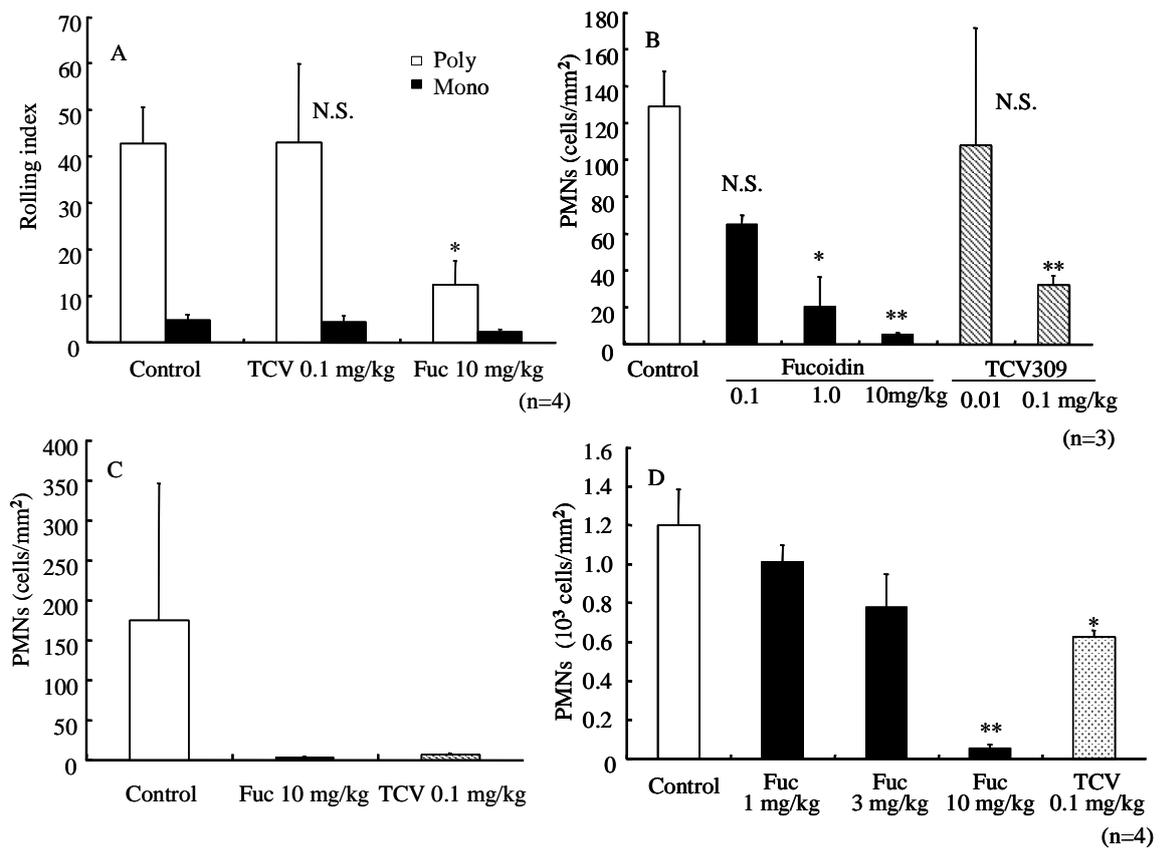


Fig. 11 Effects of PAF antagonist and selectin inhibitor on rolling in casein induced inflammation in (A) and PMN migration in peritoneal inflammation induced by TNF- α (B), IL-1 α (C), and 1% casein (D) in rats.

Values were expressed by means \pm standard error. N.S. means no significant against control group.

*: $p < 0.05$ vs control group. **: $p < 0.01$ vs control group.

3) 考察

多形核白血球の浸潤に関しては、多くの測定手法が存在するが、*in vitro* では Boyden chamber を用いて測定する方法⁸²が最も一般的である。また、*in vivo* では腹膜炎や胸膜炎において、浸潤した多形核白血球の数を計測する場合もある。組織学的試料においては、組織中の浸潤した多形核白血球を計測する方法に代えて、組織中の myeloperoxidase 活性を測定し、浸潤した量とする方法⁸³が多く用いられている。腸間膜静脈は、様々な PMN 測定に用いられるが、この血管を用いる観察は血管の検出や血管内の細胞の流れの観察が容易であることから、ローリングの測定としては最も適した方法である。

これらの方法の欠点を補うために、組織学的な手法によりローリングを測定する方法を考案した^{75, 76, 84}。この方法は微小循環系に障害を与えず白血球のローリングを観察するのに大変有効であることから、さらに拡大して、多形核白血球の浸潤を測定するのにも適用した。本法は、ローリングと浸潤の両方を同じ試料で測定することが可能であることから、これらの現象の相互関係等を測定するためには非常に有効と考えられる。

本法を用いることにより、ローリング開始からと血球浸潤までの時間的なずれがおよそ 1 時間であることを明確にとらえることが可能となった。組織学的手法には様々な利点があるが、例えば局所の手術による損傷を受けないことから、外的刺激無しにローリング現象を観察することが可能である。そのため、この方法により、*in vivo* においても炎症誘導薬等の刺激を純粋な反応として観察することが可能になると期待される。

Fig. 10B において、多形核白血球のローリングは、炎症の急性期(0-5 時間)において投与開始 1 時間後および 4 時間目にピークを示して増加したが、単球のローリングは徐々に増加していた。一般に、炎症局所においては最初に多形核白血球の集積が見られ、その後単球(マクロファージ)が補充されて、最後にリンパ球が浸潤することが知られており、本試験においても単球のローリングが多形核白血球より後に増加することが観察された。しかし、カゼインによる急性炎症においては、多形核白血球と単球のローリングには相関が

なく、それぞれの細胞の腸間膜細静脈におけるローリングは独立に起こっていることが明らかになった。

Fucoidin は selectin により誘導される血管の反応、特に血管壁へのローリングおよび接着の強力な阻害薬であり⁸⁵、ローリングの解明にも用いられる。Fucoidin の投与により多形核白血球の浸潤が抑制されたことから、多形核白血球浸潤を起こすためには、白血球の血管壁におけるローリングが必須な条件であることも証明された。

また、PAF や IL-8 はローリングや接着の間、白血球を活性化させ、また白血球を血管外に誘引すると考えられており⁸⁶、同様に白血球の血管外浸潤に重要な要素である。PAF の白血球（特に好酸球）浸潤に関する報告はいくつかある^{87, 88, 89}が、ほとんどがヒト血管内皮細胞と白血球を用いた培養細胞による結果である。そこで本研究では、選択的 PAF アンタゴニストである TCV-309 を用い、カゼイン誘導炎症における多形核白血球の遊走に対する PAF の影響を明らかにした。TCV-309 は、*in vivo*、*in vitro* に関係なく PAF に関する研究に多く用いられている。いくつかの報告では、PAF は特に好酸球の浸潤に関与することが示唆されている^{85, 86}。

また、白血球の浸潤に関与すると述べた報告⁸⁷等、PAF は、多形核白血球の浸潤や、活性酸素の産生、肺組織等を活性化し、アラキドン酸代謝物を遊離させることが報告されている^{90, 91}。これらの報告は PAF が白血球を活性化させる物質であることを示しているが、阻害試験の結果 (Fig. 11A) から、TCV-309 が多形核白血球のローリングには影響を与えないことが明らかになった。これは、PAF が多形核白血球のローリングに関与しないことを示している。また、ある報告によれば、PAF は白血球の接着に関与し、ずり速度依存的な白血球接着を増加させる⁹²。しかし、PAF により誘導されたローリングが白血球の浸潤に直接関与するという報告はない。

TNF- α により誘導された多形核白血球の浸潤は、TCV-309 (0.1 mg/kg) の投与により部分的に抑制された。一方、IL-1 α によって誘導された PMN の浸潤は、TCV-309 によりほぼ完全に抑制された。この結果から、TNF- α により誘導された PMN の浸潤には、PAF だけでなく他の因子も関係していること、それに対し、IL-1 α により誘導された PMN の浸潤には PAF が大変重要な役

割を持つことが示唆された。TNF- α は血管内皮細胞や好酸球細胞の表面に、白血球浸潤に必要な不可欠な ICAM-1 を急速に誘導する^{93, 94}ことが知られている。Young らは白血球の移動における TNF- α と IL-1 β の作用機序に違いがあることを報告している⁹⁵。これらの報告により、これらのサイトカインは作用機序が異なるものの、同じ白血球の浸潤という効果を有していることが推察された。

PAF アンタゴニストや選択的阻害薬のような物質は、PMN の浸潤に対する PAF や selectin の働きを調べるために多用される。今回の結果から、PAF および selectin は腸間膜静脈における PMN 浸潤において重要な関与をしていると考えられる。TNF- α 誘導による腹膜炎において、PAF は PMN の浸潤に対し部分的にのみ関与する。その一方で、ローリング後に PMN が血管外へ遊走するためには、PAF 誘導による PMN の浸潤が必要であった。つまり、カゼイン誘導の腹膜炎において、TNF- α により誘導された炎症と同様に、PAF は PMN の浸潤に対し部分的な関与をしていた。この結果から、カゼイン誘導による腹膜炎は、TNF- α 産生を介していることが示唆された。

カゼイン誘導炎症において、PAF アンタゴニストである TCV-309 による効果は PMN の遊走という一部分にのみ認められており、カゼイン誘導炎症による PMN の浸潤は IL-1 α タイプではなく、TNF- α タイプであることが示された。このアンタゴニスト実験から、PAF は IL-8 等の他の因子と同様に、腸間膜における PMN 遊走に関与することが明らかになった。

微小循環系を阻害しない本改良測定法はローリングだけでなく白血球浸潤の解析においても非常に有効な方法である。カゼイン誘導による炎症を、本法を用いて解析したところ、白血球の浸潤が起こるためにローリングが必須であることが確認され、炎症による白血球の血管外遊走に対する PAF の部分的関与が示唆された。

3. 白血球接着分子の発現に対するフラボノイドの効果

1) 実験方法

(1) 試薬

フラボノイドおよびその他のフェノール化合物として、catechin、epicatechin、chlorogenic acid、resveratrol、biochanin A、formononetin (Sigma Chemical Co.)、5-hydroxyflavon、7-hydroxyflavone、baicalein、3-methoxyflavone、3',4'-dihydroxyflavone、apigenin、luteolin、chrysin、7,3',4'-trihydroxyflavone、3-hydroxyflavon、7-hydroxyflavonol、fisetin、galangin、kaempferol、isorhamnetin、robinetin、quercetagenin、myricetin、eriodictyol、daidzein、genistein、phloretin、butein (Extrasyntes Inc.)、quercetin、rutin (ナカライテスク)、morin、quercitrin、naringin、naringenin、hesperetin、hesperidin (東京化成工業) を供試した。

(2) ヒト臍帯静脈内皮細胞の刺激方法

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC、BioWhittaker Inc.、MD、USA) は、2ないし4継代までのものを試験に用いた。培地および継代用試薬についても、同社のものを使用した。ヒト臍帯静脈内皮細胞は 1×10^4 cells/well になるよう96-well culture plate (Falcon: #3072) に播種し、コンフルエントになるまで 37°C (air 95% - CO_2 5%) で培養したものをを用いた。

E-selectin の発現誘導には、Human recombinant TNF- α (Genzyme、MN、USA、最終濃度 1 ng/ml) を添加し、4時間培養したものをを用いた。供試フラボノイド等は DMSO もしくはエタノールに溶解し、最終の溶媒濃度が 0.1% (v/v) になるよう PBS (-) で調製し、20 μl 添加した。コントロールとして同量の溶媒のみを添加した。この溶媒には E-selectin の発現が誘導されないことを確認した。

(3) 細胞表面酵素免疫測定 (Cell Surface ELISA) による白血球接着分子発現量の測定方法

細胞表面に発現した E-selectin 量は、細胞の表面で行う酵素免疫測定 (cell surface ELISA) 法⁹⁶を用いて測定した。

培養終了後、HUVEC を 37 °C に暖めた PBS で 2 回洗浄し、100% メタノールで細胞表面の蛋白質を固定した。固定後、直ちに細胞を 0.05% Tween-20 を含む PBS (PBS-T) で 2 回洗浄し、200 μ l の Block Ace[®] を入れて 4 °C で一晩ブロッキングを行った。

PBS-T で 3 回洗浄した後、1% BSA を含む PBS で 2000 倍希釈した mouse 抗 human E-selectin 抗体 (clone: 68-5H11、Pharmingen、Becton Dickinson、NJ、USA) を 100 μ l ずつ加え、室温で 2 時間置いた。PBS-T で 3 回洗浄した後、1% BSA を含む PBS で 1 万倍に希釈した peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体 (Immunotech、France) を 100 μ l ずつ加え、室温で 1 時間置いた。再度 PBS-T で 3 回洗浄した後、peroxidase 基質 (TMB、BioFX Laboratories Inc.、MD、USA) を 100 μ l ずつ加え、TMB 停止液 100 μ l で反応を停止させた後、microtiter plate spectrophotometer (BioRad Laboratories、CA、USA) を用いて、450 nm の吸光度を測定した。

(4) 細胞毒性の測定

細胞毒性の測定は LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ、大津、滋賀) を用いて行った。

(5) 統計処理

測定値は、それぞれ 3 ないし 6 ウエルの平均値 \pm 標準誤差で表示し、Dunnet の多重比較により、コントロールとの差を検定した。

2) 実験結果

(1) 細胞表面に発現した E-selectin の ELISA 法による測定条件の検討

Human recombinant TNF- α (1.0 ng/ml) 刺激により HUVEC 表面に E-selectin の発現を誘導し、培養時間による発現量を検討した。その結果、E-selectin の発現量は 1 時間後から徐々に増加し、4 時間で平衡に達した (Fig. 12)。また、human recombinant TNF- α の量を 0.001 から 10.0 ng/ml まで増加させ、E-selectin の誘導を調べたところ、Fig. 13 に示したように用量依存的な増加が認められた。これらの結果により、E-selectin の発現誘導に最適な培養時間を 4 時間、TNF- α 濃度を 1.0 ng/ml として以降の実験を行った。

(2) 白血球接着分子発現に対するフラボノイドの効果

本実験に用いたフラボノイドの化学構造および慣用名を Table 3 に示した。TNF- α 刺激による白血球接着分子 E-selectin 発現の阻害曲線を Fig. 14 に示した。Flavone に属する luteolin と apigenin は、もともと強い抑制活性を示し、IC₅₀ はそれぞれの 0.7 および 1.1 μ M であった。次に抑制活性の強いグループとしては、fisetin (0.8 μ M)、quercetin (4.5 μ M) および kaempferol (4.3 μ M) の flavonol、さらに chalcone に属する butein の 1.5 μ M であった。Isoflavone と flavanone は上の 3 つのサブクラスよりもやや活性が弱く、genistein が 13.8 μ M、eriodictyol が 70.6 μ M という IC₅₀ を示した。それ以外の flavonoids では全く発現抑制活性を示さないか、非常に弱かった。乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 測定キットを用い、細胞毒性について検討したところ、今回の試験に用いた 0.1-10 μ M (ただし、genistein および eriodictyol については 100 μ M まで) の濃度範囲では、これらのフラボノイドの細胞に対する毒性は認められなかった。

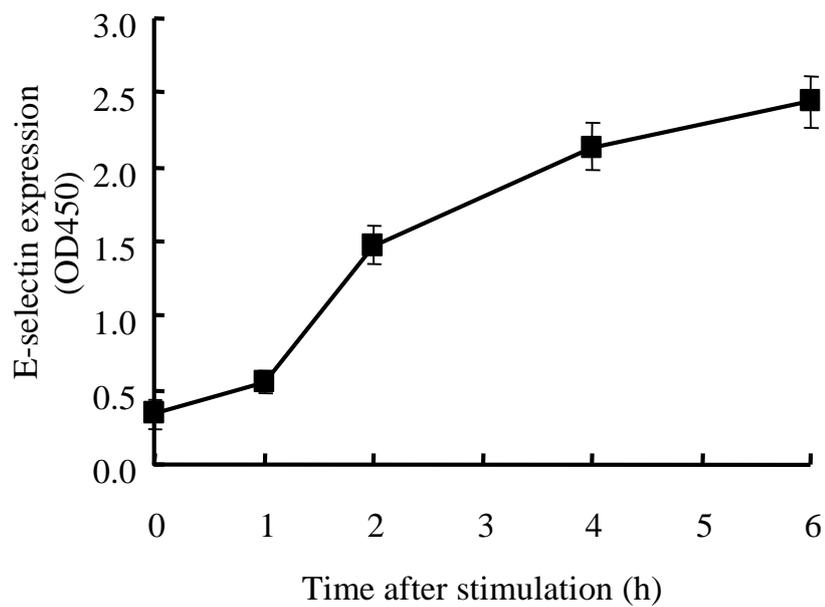


Fig. 12 Time course E-selectin expression of HUVEC stimulated by TNF- α .

E-selectin was induced on the cell surface of HUVEC by treatment with 1 ng/ml of TNF- α . The levels of E-selectin were measured by cell-ELISA as OD450. Each value is expressed as mean \pm standard error (n=5).

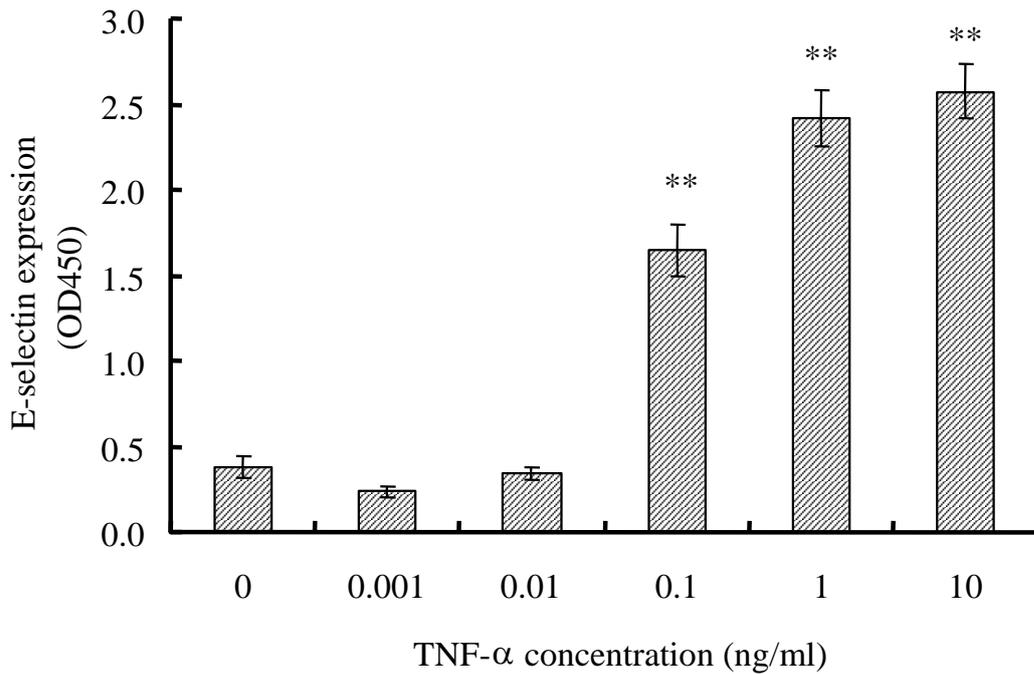
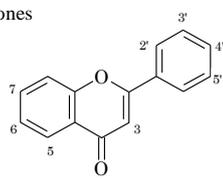
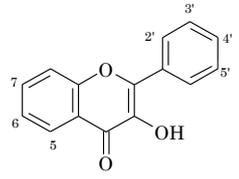
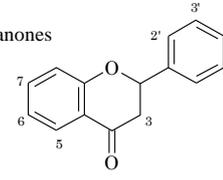
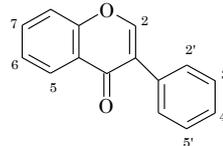
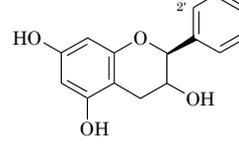
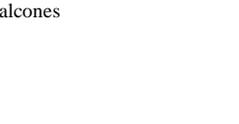


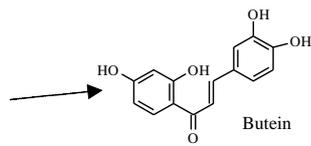
Fig. 13 Dose response of E-selectin expression on HUVEC stimulated by TNF- α

E-selectin was induced on the cell surface of HUVEC by treatment for 4 h with several concentration of TNF- α . The levels of E-selectin were measured by cell-ELISA as OD450. Each value is expressed as mean \pm standard error (n=3).

** : p<0.01 vs control group.

Table 3 Chemical structure and 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of the various flavonoids tested for the E-selection in HUVECs stimulated by TNF- α

Subclass (Chemical formula)	Name	IC ₅₀ (μ M)	Substitutions		
			OH residues	OCH ₃	Others
	5-Hydroxyflavone	>1000	5		
	7-Hydroxyflavone	>1000	7		
	3-Methoxyflavone	>1000		3	
	3',4'-Dihydroxyflavone	>1000	3',4'		
	Chrysin	>1000	5,7		
	Baicalein	>1000	5,6,7		
	Apigenin	1.1 \pm 0.3	5,7,4'		
	7,3',4'-Trihydroxyflavone	>500	7,3',4'		
	Luteolin	0.7 \pm 0.04	5,7,3',4'		
		3-Hydroxyflavone	>1000	3	
7-Hydroxyflavonol		>1000	3,7		
Galangin		>1000	3,5,7'		
Kaempferol		4.3 \pm 1.1	3,5,7,4'		
Fisetin		0.8 \pm 0.2	3,7,3',4'		
Morin		>1000	3,5,7,2',4'		
Quercetin		4.5 \pm 1.0	3,5,7,3',4'		
Isorhamnetin		>1000	3,5,7,4'	3'	
Rutin		>1000	5,7,3',4'		3-rutinoside
Quercitrin		>1000	5,7,3',4'		3-rhamnoside
Robinetin		>1000	3,7,3',4',5'		
Quercetagenin		>1000	3,5,6,7,3',4'		
	Naringenin	>500	5,7,4'		
	Naringin	>1000	5,4'		7-neohesperidoside
	Eriodictyol	70.6 \pm 50.3	5,7,3',4'		
	Hesperetin	>1000	5,7,3'	4'	
	Hesperidin	>1000	5,3'	4'	7-rutinoside
		Daidzein	>1000	7,4'	
Genistein		13.8 \pm 6.5	5,7,4'		
Formononetin		>1000	7	4'	
Biochanin A		>1000	5,7	4'	
	(+)-Catechin	>1000	3,5,7,3',4'		
	(-)-Epicatechin	>1000	3,5,7,3',4'		
	Phloretin	>1000			
	Butein	1.5 \pm 0.2			
Other polyphenols	Chlorogenic acid	>1000			
	Resveratrol	>500			



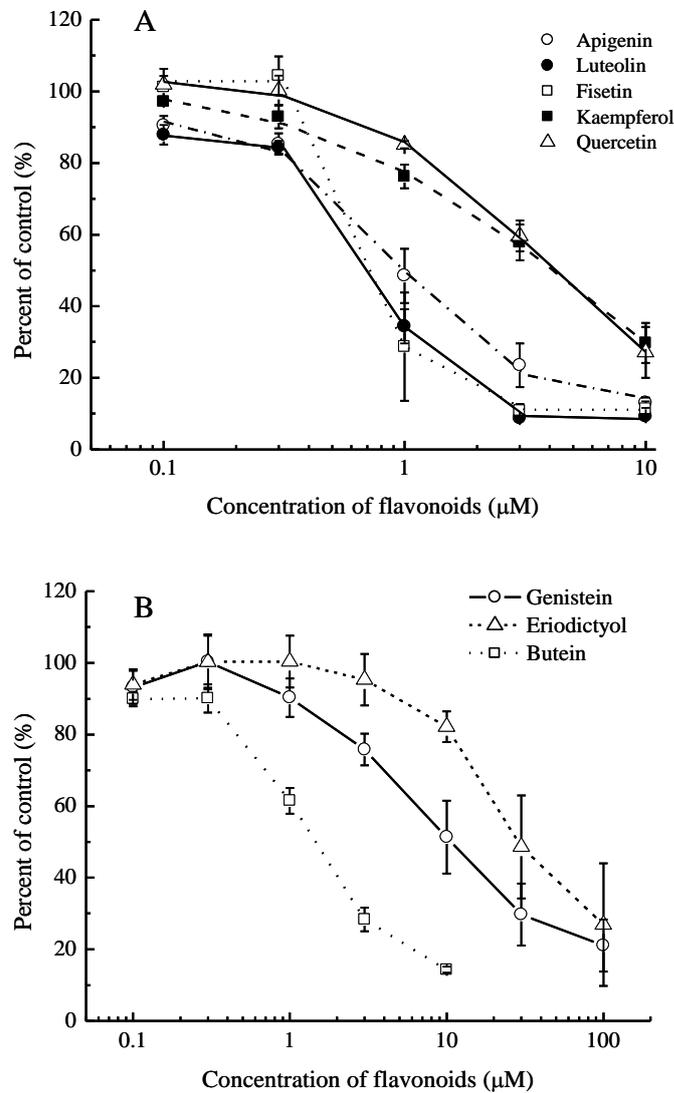


Fig. 14 Inhibition concentration curves of several flavonoids on the expression of E-selectin. (A: Flavone and Flavonol, B: Flavanone, Isoflavone and Chalcone)

E-selectin was induced on the cell surface of HUVEC by treatment for 4 h with 1ng/ml TNF- α and each flavonoid was added simultaneously with TNF- α . The levels of E-selectin were measured by cell-ELISA and were indicated by percent of control.

Dose-response suppression of E-selectin expression was demonstrated as sigmoid regression of inhibition concentration curves. Each value is expressed as mean \pm standard error (n=3).

3) 考察

フラボノイドのサブクラスのうち、flavone、flavonol、flavanone、isoflavone および chalcone に属する数種のフラボノイドにおいて、TNF- α 刺激による白血球接着分子 E-selectin の発現を抑制することが認められた。本結果をフラボノイドの構造と比較して考えた場合、フラボノイド A 環に存在する C2-C3 の2重結合を持つグループの方が単結合のグループよりも強い活性を示した。さらに、4 位のケトン基は、本抑制活性の発現に必須であると考えられた。

また、A および C 環においては、3 位に水酸基を有する flavonol は同じ構造で水酸基を持たない flavone よりもやや活性が劣り、flavone 3-ol は活性を示さなかった。さらに、6 位の水酸基を有するものは活性を持たないことから、本活性の発現に水酸基の数や位置が重要な役割を示していることが明らかになった。また、B 環の水酸基では、4'位単独、もしくは 3', 4'位のジヒドロキシ構造を取る場合には活性を示すが、全く水酸基を持たないか、メトキシ基である場合には抑制活性が認められなかった。前章で用いたポリメトキシフラボンについて E-selectin の発現に対する影響を同様に調べたところ、抑制活性は認められなかった(データ省略)ことから、PGE₂ や TNF- α の産生抑制とは異なる作用機序により発現抑制活性を示している可能性も示唆された。

近年、Choi らはフラボノイドと ICAM-1、VCAM-1 および E-selectin 等の細胞接着分子発現との関係について報告しており⁹⁷、E-selectin に関しては今回もほぼ同様の結果が得られていた。また、抑制作用機序の解析では、luteolin や apigenin、quercetin では selectin 等の細胞接着分子の転写をダウンレギュレートすることにより、単球の接着を阻害すると報告している。

フラボノイド配糖体とそれに対応するアグリコンを比較すると、配糖体では阻害活性が認められなかった。これは、前章に述べたのと同様に、配糖体とアグリコンの細胞膜透過性の違いに起因しているものと考えられた。

ヒトにおいては、経口投与におけるフラボノイドの吸収は非常に少ないとされる⁶³。しかし、加水分解されたアグリコンの形で吸収され、血中動態である硫酸もしくはグルクロン酸抱合体が炎症部位において脱抱合⁶⁵されることから、フラボノイドが白血球接着分子の発現抑制を通じ、炎症の抑制に寄与

する可能性が示唆された。

4. 小括

本章では、フラボノイドの抗炎症活性について、白血球の炎症局所への浸潤、その中でも白血球浸潤の最初の段階であるローリング過程に着目して検討を行った。まず、白血球の浸潤を測定するために、ラットの腸間膜において、操作による傷害を与えることなく遊走の解析ができるよう、これまでの測定方法を改良した。本改良測定法は、ローリングの解析だけでなく、白血球の浸潤の検討にも使用できる有効な方法であると考えられた。カゼイン投与により誘導される炎症を本法により検討したところ、白血球の浸潤とローリングには約1時間のラグタイムがあることが確認でき、また白血球の血管外遊走の要因として部分的な PAF の関与が必要であることが示唆された。

白血球浸潤における最初の段階として、ローリングの必要性が明らかになったことから、ローリングの開始に重要な役割を果たす白血球接着分子のうち、誘導型 E-selectin の血管内皮細胞表面への発現に対するフラボノイドの影響を検討した。供試フラボノイドのうち、flavone ($IC_{50}=0.7-1.1 \mu M$) で抑制活性が強く、次いで flavonol ($0.8-4.5 \mu M$)、chalcone ($1.5 \mu M$) の活性が高かったが、Isoflavone ($13.8 \mu M$) や flavanone ($70.6 \mu M$) ではそれらに比べ活性が弱かった。構造に関しては C2-C3 の二重結合を有するものが単結合のものよりも高い活性を示し、4位のケトン基(oxo構造)が必須であること等、前章の PGE₂ 産生抑制に似た傾向を示した。しかし、isoflavone や flavanone の抑制活性が低いこと、ポリメキシフラボンには活性抑制が認められなかったことから、異なる作用機序による阻害活性を示す可能性も示唆された。

第 3 章

アレルギー性炎症抑制効果の測定法開発および
フラボノイドの投与によるアレルギー性炎症の抑制

1. 序論

アレルギー等の炎症関連の研究、例えば抗炎症活性を持つ薬物や食品成分の探索や作用の解明においては、齧歯類を用いた炎症モデルが汎用されている。その例として、足蹠や耳介等の浮腫形成^{98, 99}や背部や腹部の皮膚炎症反応¹⁰⁰、背部皮下に作成するラット空気嚢炎症モデル¹⁰¹、ラット胸膜炎モデル^{102, 103}等がある。これらの炎症モデルにおいては、炎症の指標として血管透過性を測定する方法が一般に良く用いられている。血管透過性の測定には、マウス耳浮腫⁹⁷や皮膚浮腫⁹⁹の測定に簡単な色素法が用いられている。さらに、¹²⁵I で標識したヒトアルブミンを用いた背部皮膚の血漿成分の滲出を測定した報告もある¹⁰⁴。しかし、色素法は分光光度計で測定することができるが感度が低く、また放射性同位元素を用いた方法は、被爆の危険と廃棄物等の適切な処理が必要になる。

蛍光標識した牛血清アルブミンを血管透過性の指標として用いる方法は、様々な炎症による浮腫モデルにおいて使用されている^{105, 106}。蛍光色素は非常に感度の高いトレーサーとして用いることができるため、血管透過性の測定には大変有効であるものの、滲出した色素を皮膚組織から抽出するという煩雑な操作を必要とする。そこで、蛍光分光光度計に代わり、蛍光色素の強度を蛍光マイクロプレートリーダーにより多検体を自動的に測定する方法の開発を試みた。本方法は、炎症刺激に応じた血管透過性の増加を高い感度で簡便に測定することを可能とするものである。

また、改良した血管透過性測定方法の有効性の確認、およびフラボノイドの抗炎症作用を動物レベルで検証するために、免疫した動物を用い、実際に即時型アレルギー反応を起こした際の血管透過性の亢進を本法により測定し、フラボノイド投与が皮膚反応(血漿滲出量)に与える影響について検討を行った。

2. 齧歯類の皮膚を用いた血管透過性測定法の改良

1) 実験方法

(1) 試薬

牛血清アルブミン Bovine serum albumin (BSA: Fraction V)、fluorescein isothiocyanate (Sigma chemical Co.)、histamine、formamide (以上、和光純薬)、活性炭 (alkaline-washed Norit[®] A、ScienceLab. com, Inc.、TX、USA)、Brilliant blue 6B (東京化成工業) を供試した。

(2) 使用動物

雄性 SD ラット (230-280 g、日本チャールズリバー) および ICR マウス (30-45 g、日本チャールズリバー) を用いた。使用した動物は、病原性微生物等のコントロール環境 (室温 25±3 °C、湿度 50±10%、日周期 12 時間) 下で飼育し、餌および水は自由摂取させた。

(3) 牛血清アルブミンの蛍光標識方法

牛血清アルブミン (BSA) の fluorescein isothiocyanate (FITC) による蛍光標識は、McKinney らの方法¹⁰⁷ に準じて行った。すなわち、0.1M Sodium bicarbonate buffer (pH 9.5) に 0.2% になるよう FITC を溶解したものの約 25 ml に、50 ml の 10% BSA (0.1 M Sodium bicarbonate buffer、pH 9.5) を加え、pH を 9.5 に調節し、室温で 3 時間反応させた。未反応の FITC を除去するため、水洗した活性炭 5 g を加え、さらに 1 時間攪拌した¹⁰⁸。混合液を 20,000x g で 20 分間遠心分離し、上清を 0.45 μm 次いで 0.22 μm のフィルター (Millipore、Billerica、MA、USA) でろ過して活性炭を除いた。濾液を蒸留水で 4 °C、一晩透析したのち、凍結乾燥したものを蛍光標識 BSA (FITC-BSA) として用いた。

(4) 血管透過性の測定方法

SD ラットに軽くエーテル麻酔をかけ、尾静脈より 0.3 ml の 10% FITC-BSA

(10 mg/ml Tyrode's solution)を投与し、血管透過性測定用のトレーサーとした。ICR マウスの場合は、同様にエーテル麻酔下で、尾静脈より 0.2 ml の 1.5% FITC-BSA (15 mg/ml)を投与した。

FITC-BSA 投与後、直ちに様々な濃度で Tyrode's solution に溶解したヒスタミン溶液を 0.1 ml/site (ラット)、0.05 ml/site (マウス) ずつ、あらかじめ剃毛した背部皮内に 1 匹あたり 6 点注射した。ヒスタミンの用量は、ラットでは 0.6-40 µg/site、マウスでは 0.16-2.50 µg/site とした。さらに、コントロールとして溶媒 (Tyrode's solution) のみを注射した。注射部位はそれぞれの動物ごとにランダムに配置し、コントロール部位の測定値を X 軸の 0 の値として表示した。

注射 30 分後、ラットは頸動脈切断、マウスは心臓全採血によりすみやかに屠殺し、採取した血液は血清中の FITC-BSA の蛍光強度を測定するために凝固後、遠心分離して血清を採取した。また、背部皮膚を切り取り、注射部位を直径 15 mm もしくは 10 mm の円形にくり抜いたものを測定用試料とした。皮膚試料は直ちに 24-well culture plate (Falcon #3047) の底に貼り付け、1 ml のホルムアミドを加えた。同様に回収した血清 100 µl (マウスの場合 50 µl) を 24-well culture plate に入れ、900 µl (同 950 µl) のホルムアミドを加え、皮内の FITC-BSA の蛍光が測定できるよう、50 °C で 2-6 時間加熱した。被験物質を注射した皮膚の蛍光強度は、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm により測定した。100 µl (マウス 50 µl) の血清サンプルにおける蛍光強度から、測定試料中の血清相当量 (µl) を計算して求めた。

比較のため、一般に蛋白染色に用いられる Brilliant blue 6B をエーテル麻酔下で尾静脈より 50 mg/kg になるよう投与し、蛍光色素による方法と同様に、背部皮内に被験試料を投与した。直径 15 mm の炎症部位の皮膚を切り取り、それぞれの皮膚試料に 2 ml のホルムアミドを加え、50 °C で 2-6 時間加熱し、ろ過した後、分光光度計により 620 nm の吸光度を測定した。色素総量は測定値の平均を標準曲線から計算して求めた。

(5) 統計処理

血管透過性の測定結果は、多重比較の場合 ANOVA により統計処理し、有意性の検討を行った。

2) 実験結果

(1) 検量線の直線性

投与した FITC-BSA の蛍光強度を Fig.15 に示した。ラット皮膚試料において、トレーサーとして用いた FITC-BSA の検量線は 1-30 μg の間で直線性を示し、相関係数は 0.997 を示した。さらに用量を 100 μg まで増やして検討を行ったところ、高い投与量においては直線性が失われるものの、多項式近似を行った際の決定係数は $R^2=0.999$ であった。

(2) 蛍光トレーサー法による測定のための最適加温時間の検討

様々な加温時間 (0、4、10、および 30 h) における、蛍光強度の直線近似式を Fig.16A に示した。最小二乗法による決定係数は、0 時間の場合 0.8029 であり、加温時間が不十分であると考えられた。30 時間加温の場合には、4 ないし 10 時間に比べ、明らかに回帰直線の傾きが低値であった。回帰直線の傾き (Fig. 16B)、y切片 (Fig. 16C)、および相関係数 (Fig. 16D) の3つの値の結果から、蛍光強度の測定に最適な加温時間を 2-6 時間と決定した。

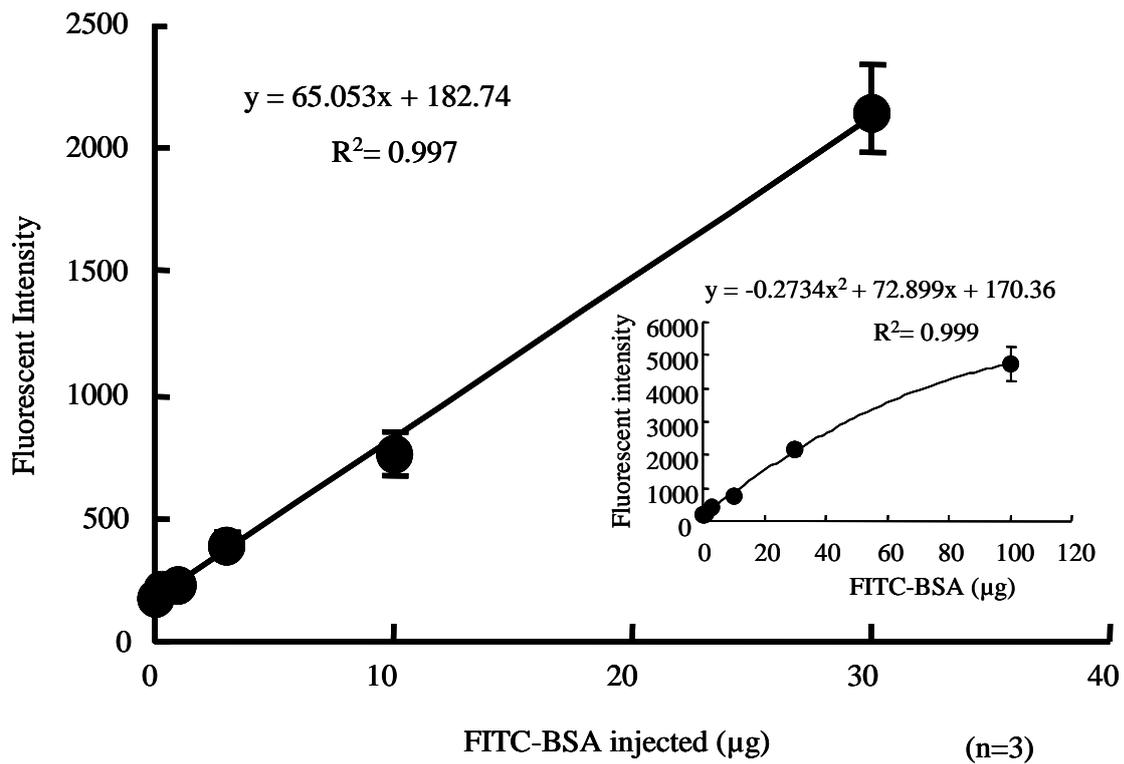


Fig. 15 The linear relationship between measured fluorescence intensity and FITC-BSA injected.

Male SD rats were injected with fluorescent isothiocyanate-labeled bovine serum albumin (FITC-BSA) into the dorsal skin.

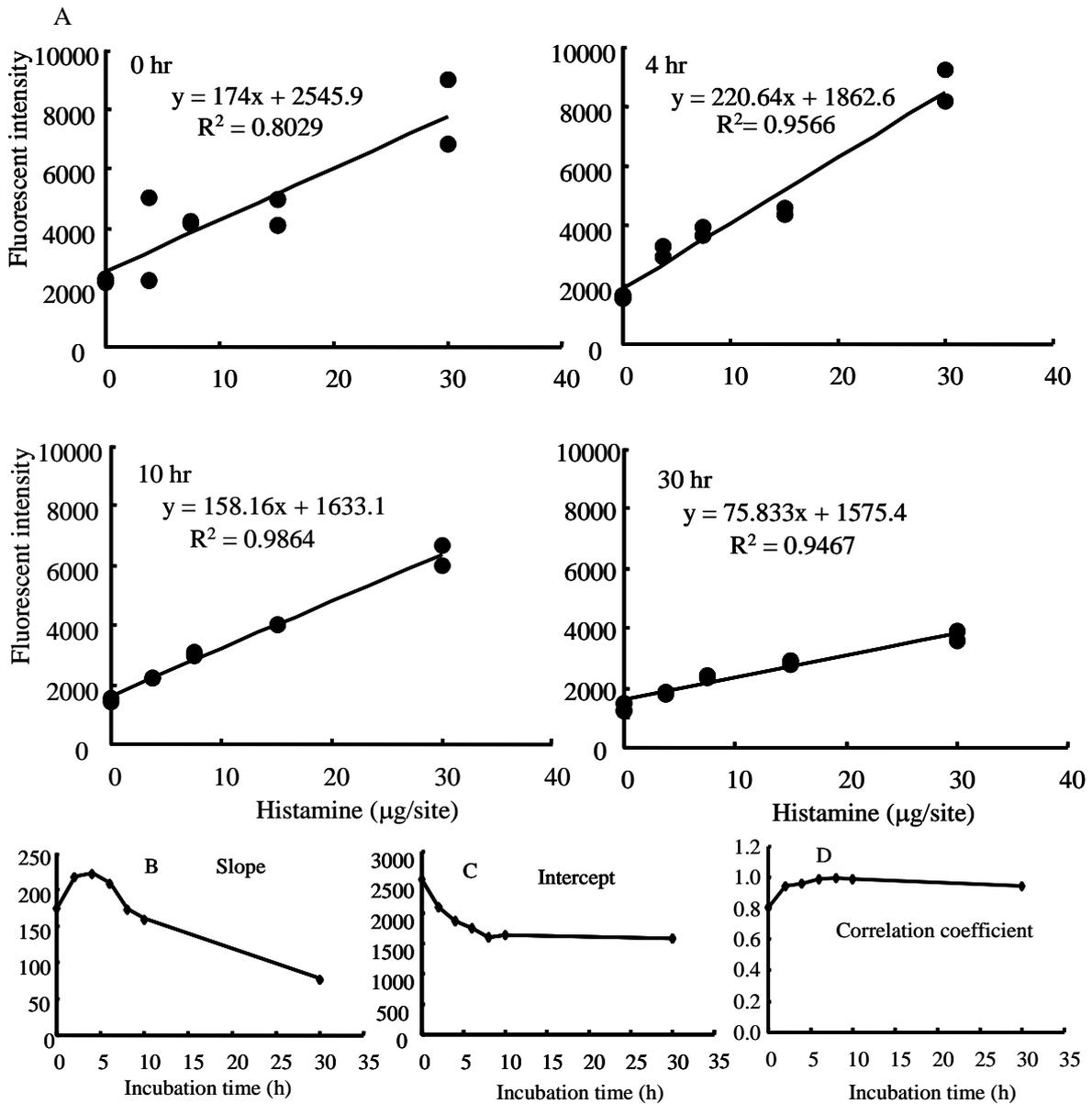


Fig. 16 Regression curves on several heating times and changes of formula parameters.

For each heating time, the fluorescence intensity was measured by a fluorescence microplate reader. From the measured data, several regression curves were obtained using the method of least squares. From these data, three parameters were obtained and were plotted against heating times. (A) Original regression curves, (B) slope, (C) intercept, (D) correlation coefficient against heating times. The points were made from five doses in two separate animals.

(3) 色素法と蛍光標識法の相関の直線性

ラット背部皮膚のヒスタミンによる反応において、青色色素を用いる方法と本蛍光色素 (FITC-BSA) による方法との直線性を Fig. 17 に示した。ヒスタミンの用量を変えて、ラット 4 匹の背部皮膚に皮内投与し、ヒスタミンによる血漿滲出を上記の2法により測定し、比較を行った。

その結果、本蛍光色素法はこれまでの色素抽出法と非常に良い相関 (相関係数、 $r=0.993$) を示した。この結果により、FITC-BSA をトレーサーとして血管透過性の測定に用いる方法はより感度が高く、動物の皮膚炎症モデルの簡便な方法として用いることができることが確認された。

(4) ラットおよびマウス皮膚における反応性の検討

本法を用い、皮膚の血管透過性を増加するきわめて重要なケミカルメディエータであるヒスタミンに対するラットおよびマウスの反応性を検討した。Fig. 18 にラットおよびマウスの用量依存曲線を示した。最初にラットおよびマウス動物の尾静脈から FITC-BSA を投与し、その後、濃度を変えたヒスタミン溶液を背部皮内に注射した。マウスにおいては、背部皮膚のヒスタミンによる血漿の滲出は、 $0.31-1.25 \mu\text{g}/\text{site}$ の範囲で用量依存的に増加し、 $1.25-2.5 \mu\text{g}/\text{site}$ でほぼプラトーに達した。それに対し、ラットにおける血漿滲出は、 $10 \mu\text{g}/\text{site}$ まで直線的に増加し、 $10-40 \mu\text{g}/\text{site}$ でプラトーに達した。Fig. 19 に示したように、ラットとマウスではヒスタミンに対する感受性も異なっており、マウスでは $50 \text{ ng}/\text{site}$ でコントロールに比べ有意に増加していたが、ラットでは $200 \text{ ng}/\text{site}$ でコントロールとの差が有意となった。

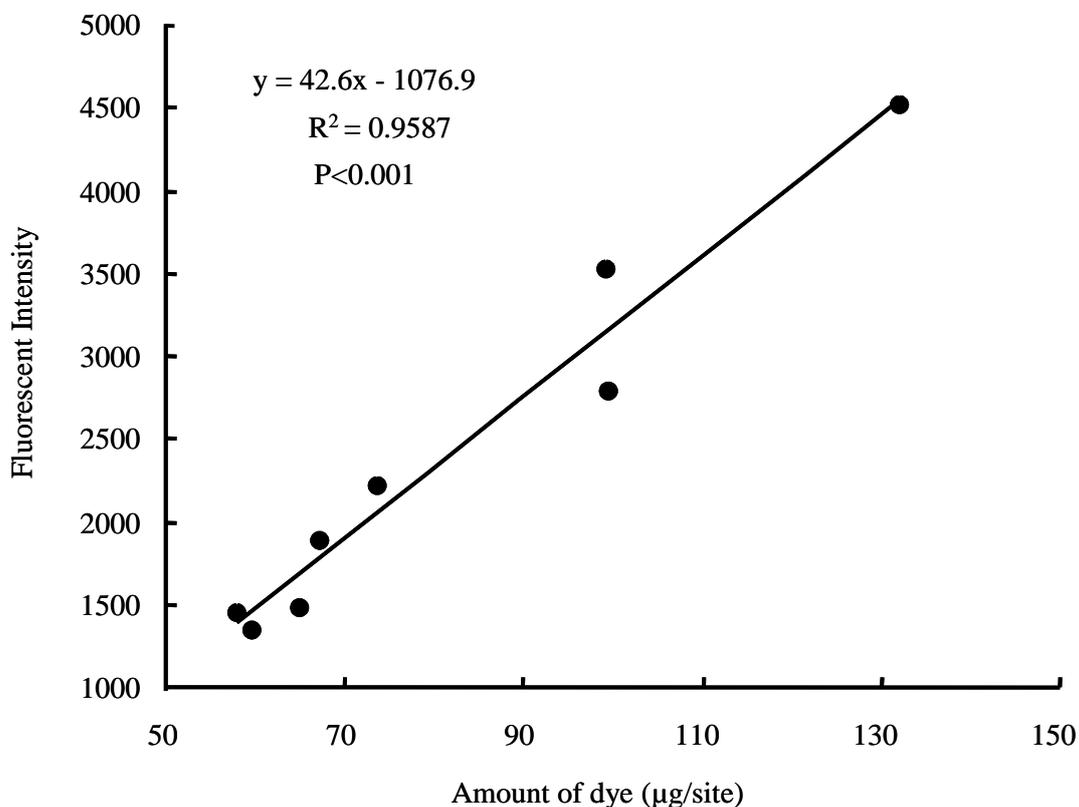


Fig. 17 Linear relation between the dye method and the improved fluorescence method for histamine-induced vascular permeability in rat dorsal skin.

First, male SD rats were injected with fluorescent isothiocyanate-labeled bovine serum albumin (FITC-BSA) or brilliant blue 6B solution from a tail vein. The rats were then immediately injected with histamine solution into the dorsal skin. After 30 min, the rats were sacrificed by cutting the carotid artery. The histamine-injected sites of the dorsal skin were removed as round sections and were either placed into the test tubes for blue dye extraction, or in a well of a 24-well culture plate for measuring on microplate reader. Extraction methods were performed for the blue dye and fluorescent dye, respectively. Absorbance of the blue dye and the fluorescent intensity of FITC-BSA were each measured by spectrophotometers

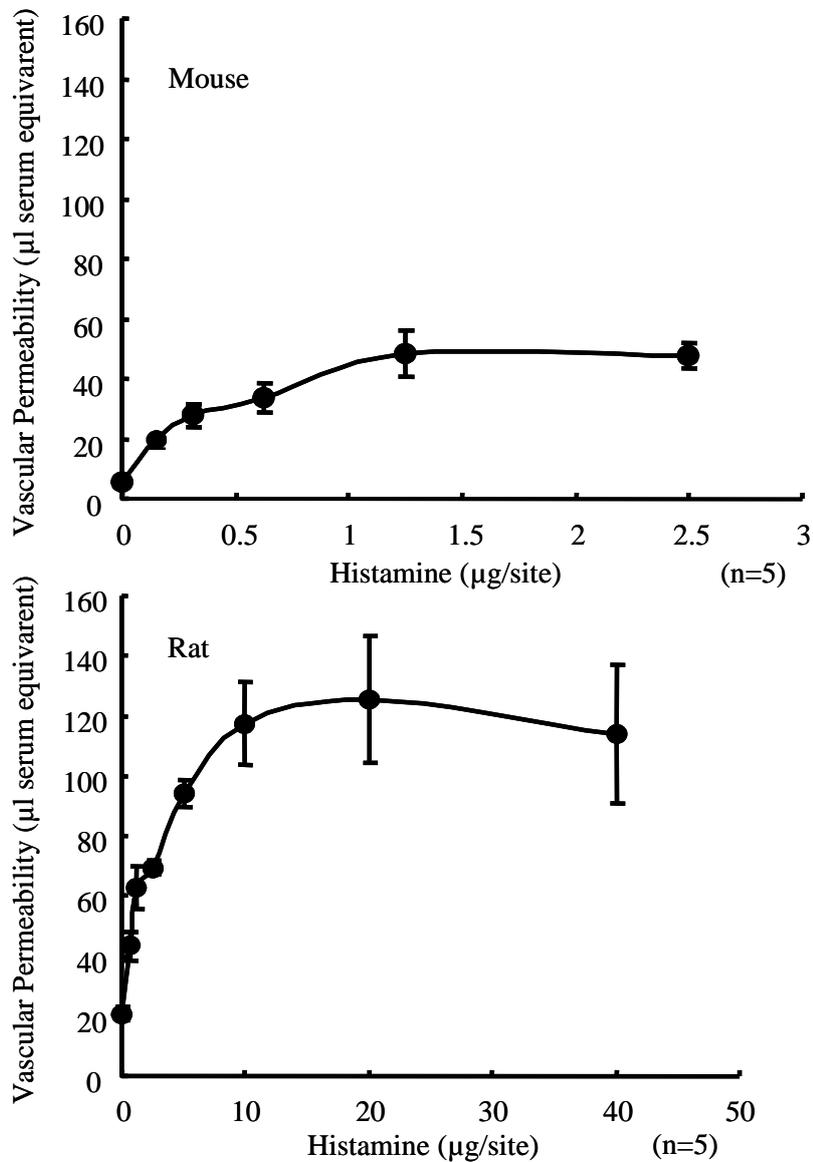


Fig. 18 The reactivity of dorsal skin to histamine injection in mice and rats.

Mice and rats were injected with FITC-BSA into a tail vein under light ether anesthesia. The animals were injected with histamine solution into the dorsal skin. After 30 min, the mice and rats were sacrificed by cardiac puncture and cutting the carotid artery, respectively. The histamine-injected sites of the dorsal skin were removed in round sections, and placed into a well of a 24-well culture plate. Extraction of fluorescent dye was undertaken. The fluorescence intensity of each well was measured by a fluorescence microplate reader. Values are expressed as mean \pm standard error. Zero on the x-axis refers to skin sites injected with Tyrode's solution only.

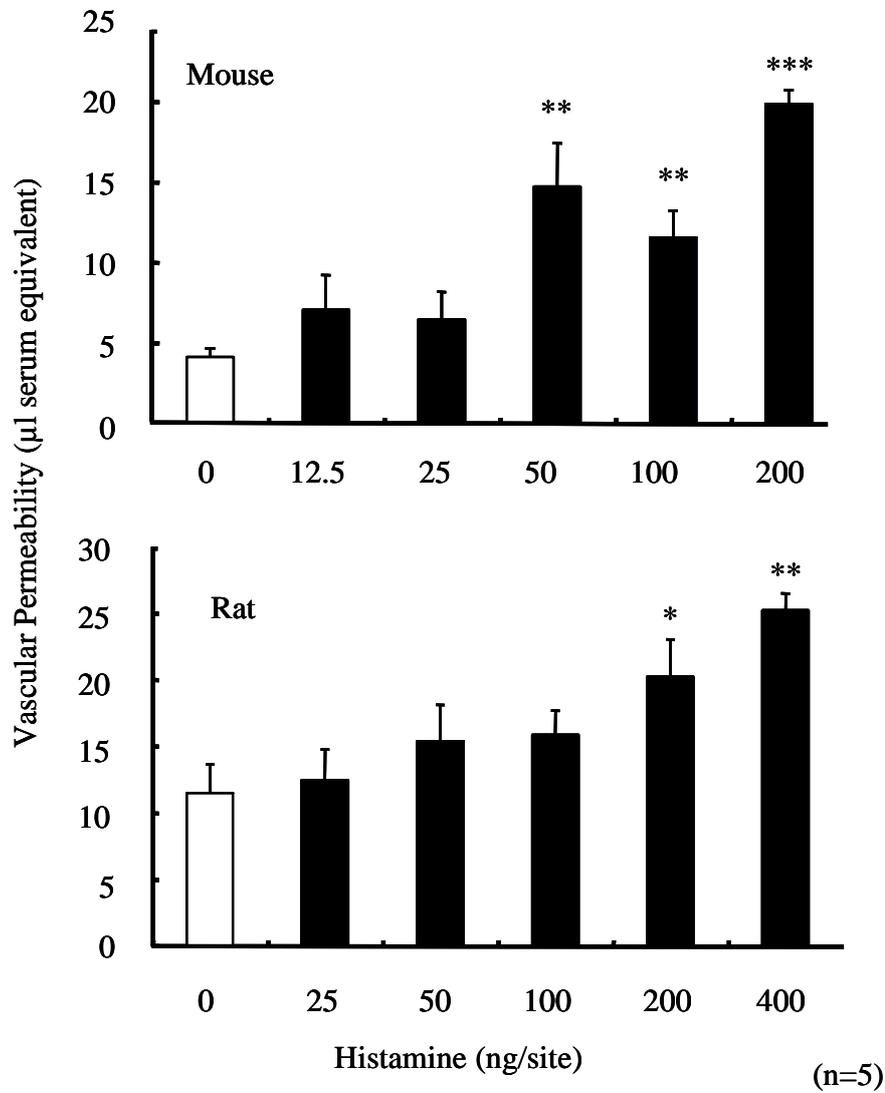


Fig. 19 The reactivity of dorsal skin on histamine injection of small doses in mice and rats.

Values are expressed as mean \pm standard error (n= 5). Zero (control) expressed a value of skin sites injected with Tyrode's solution only.

*: p< 0.05, * *p< 0.01 vs control.

3) 考察

炎症の指標として血管透過性を測定するにあたり、感度および操作性の向上を図るために、蛍光色素をトレーサーとして用い、蛍光マイクロプレートリーダーによる多検体自動測定を試みた。測定部の皮膚をホルムアミド中で加温することにより皮膚の蛍光の透過性を高め、皮膚の蛍光強度を簡便かつ直接に蛍光プレートリーダーで測定することが可能になった。加温方法の特性を明らかにし、至適温度および時間を特定するために、50℃で0-30時間にわたって皮膚を加温し、蛍光強度を測定した。加温温度は、測定に用いる24-well culture plateの材質であるポリスチレンの温度耐性が65℃であることから、50℃とした。回帰直線の傾き(Fig.16B)が本法における感度を示し、y切片(Fig. 16C)が改良法の検出限界を表している。また、相関係数(Fig. 16D)は測定方法の再現性を示している。傾きの結果から、2ないし4時間が最も感度の高い加温時間であり、検出限界では4時間が、また再現性では2時間が最適加温時間であることから、これらの結果を検討した上で、加温時間を4時間と設定した。しかし、2時間の加温においても十分蛍光強度を測定することは可能であった。以上の点から、測定部の皮膚から蛍光色素を抽出するための加温時間を2-6時間とした。その結果、本改良法の測定に必要な時間はおよそ3時間と見積もることができた。Fig. 17の結果から、FITC-BSAを血管透過性測定トレーサーとして用いる本改良法は、動物の皮膚炎症モデルにおいて有効な手法として用いることが可能になった。なお、本改良法における再現性は、実験内、実験間誤差として4.7-7.1%であった(n=4-7、データ省略)

また、Fig. 19に示したように、マウスはラットに比べ約1/4の濃度でヒスタミンに対する反応を示した。マウスにおけるヒスタミンの感受性は50 ng/siteにおいて、15 μ lの血漿滲出に相当した。同じく、ラットにおいては200 ng/siteのヒスタミンが、20 μ lの血漿滲出に相当したことから、本改良法は色素を用いる方法と比較し、高い感度を有することが示された。マウスおよびラットにおける用量依存性の検討においては、ラット皮膚の方がマウス皮膚に比べてより広い範囲でヒスタミンに対する反応性を示した(Fig. 18)。これは、ラットとマ

ウスの背部皮膚における毛細血管網の違いによるものと考えられた。ヒスタミン用量依存性は、マウス、ラットいずれの背部皮膚においても、良い相関を示した。しかし、皮膚反応試験に用いる動物種としては、ラットよりもマウスの方が適していると考えられた。その理由は、この方法において、マウスの皮膚の方がラットに比べ 6 倍ほど高い感受性を示したことによる。本皮膚反応改良測定法は簡便で容易な方法であり、一般の色素法に比較し、測定にかかる時間も短縮できた。ただし、ラット皮膚の方がマウス皮膚に比べて厚いため、皮内へ物質の投与を行うにはラットの方が技術的には容易であった。

最近の研究において、ラットは動物皮膚の血管透過性測定モデルとして多く用いられている。Hayashi らは、ラット皮膚における血管透過性に対する知覚神経マスト細胞の役割について報告しており¹⁰⁹、血管透過性測定のトレーサーとして Evans blue 色素を用い、血清 20 μ l 相当量の検出限界という結果を示した。また、Irie らは、マウス皮膚におけるリポ多糖によって誘導される血管透過性の変化に対する cAMP 亢進物質の影響について報告しており¹¹⁰、その中で青色色素を血管透過性測定のトレーサーとして用い、30 μ l 相当量を検出限界としている。本改良法の最低検出限界はマウスで 15 μ l 血清相当量、ラットで 20 μ l 相当量と見積もられた。

また、この方法は、蛍光マイクロプレートリーダーを用いることにより、簡便にかつ多くの試料を短時間で自動測定できるという利点がある。先に、常法の青色色素を用いる皮膚反応測定法を用いて、感度の上昇が可能であるかを検討した。しかし、試料の吸光度を測定する方法は、高い脂質含量によって引き起こされる試料の混濁により、非常に困難を極め、感度上昇を図ることは不可能であった。それに対し、蛍光色素を用いた本改良法は、培養プレートを用い、色素を皮膚から抽出する操作を必要としないことから、皮膚からの脂質の溶出がなく、脂質含量の高低に左右されることのない手法ではあるが、高い蛍光値における減衰という根本的な問題がある。実際、血管透過性が高い場合には、蛍光強度が低くなる結果が認められた。

最後に、この確立した血管透過性の改良測定法は、単純で簡単に皮膚反応の測定が可能であるだけでなく、マイクロプレートを用いることにより多検体試料を短時間で測定できる手法として有効であることが確認された。

3. ICR マウスを用いたフラボノイドのアレルギー性炎症抑制効果の検討

1) 実験方法

(1) 試薬

フラボノイドとして、apigenin、eriodictyol (Extrasynthes Inc.) を供試した。大豆油 (和光純薬)、Freund's incomplete adjuvant (FIA: Difco Laboratories)、卵白アルブミン (OVA)、注射用生理食塩水 (大塚製薬 (株)、東京、日本) を用いた。

(2) 使用動物

5 週令の雄性 ICR マウス (27-29 g、SPF、日本チャールズリバー) を予備飼育 (室温 25 ± 3 °C、湿度 $50 \pm 10\%$ 、日周期 12 時間) 後に使用した。餌および水は自由摂取させた。

(3) OVA 感作方法およびフラボノイド投与方法

OVA を 2.5 mg/ml になるよう注射用生理食塩水に溶解したものを同量の FIA と混和してエマルジョンを作成し、200 μ l/mouse をエーテル麻酔下でマウスの腹腔内に投与した。1 週間後に同量をマウスに腹腔内投与し、追加免疫を行った。血清中の抗体量測定のため、免疫開始時、追加免疫時 (1 週間後) および皮膚反応測定時にそれぞれ血液を採取し、血清試料として測定時まで -30 °C で保存した。供試フラボノイドはあらかじめ大豆油に懸濁し、それぞれ 10 mg/kg になるようマウス腹部皮下に免疫開始 0、3、7、11 日後に投与した。なお、コントロールには同量の大豆油のみを投与した。試料の皮下投与終了後、速やかに針穴を瞬間接着剤で塞ぎ、試料の漏れを防いだ。

(4) アレルギー性炎症における血管透過性の測定

OVA による感作開始 2 週間後、皮内に抗原を投与することにより即時型アレルギー性炎症を惹起し、血管透過性の亢進による血漿成分の滲出を

測定した。血管透過性の測定には、前項の蛍光色素を用いた改良法を用い、以下のとおり行った。要約すると、エーテル麻酔下でマウス尾静脈より 30 mg/ml (Tyrode's solution) に溶解した FITC-BSA をトレーサーとして 0.1 ml/mouse 投与した。FITC-BSA の投与後、直ちにあらかじめ剃毛したマウス背部皮膚にヒスタミン 10 µg/ml (positive control)、および抗原として OVA 0.1 ないし 0.5 µM を 0.05 ml/site 皮内投与することにより、即時型アレルギー反応を惹起した。コントロールには溶媒のみを投与した。

抗原投与 30 分後に、エーテル麻酔下で心臓採血を行い、血清を回収した。皮膚試料を切り取り 24-well culture plate に入れ、ホルムアミド液 1 ml を加えて 50 °C で 2 時間加温した後、蛍光マイクロプレートリーダーにより励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm で測定した。血漿滲出量は、50 µl の血清を同様に測定し、その蛍光強度から算出した。

(5) 血清中抗体量および OVA 特異的抗体価の測定

血清中のイムノグロブリン (Ig) 量は Immunoglobulin ELISA kit (Bethyl、TX、USA) を用い、マニュアルに従って測定した。また、OVA 特異的 IgG₁ の抗体価については、同 ELISA kit の一次抗体の代わりに、50 µg/ml の OVA を 96-well ELISA plate にコーティングすることにより測定した。

(6) 統計処理

実験結果は平均値 ± 標準誤差で表し、Fisher's PLSD による検定を行った。

2) 実験結果

(1) フラボノイドの皮膚反応に対する効果

マウスを OVA で感作し、同時に大豆油に懸濁したフラボノイドを皮下に投与した。2 週間後、抗原である OVA をあらかじめ剃毛した背部皮内に注射し、皮膚反応に対するフラボノイドの効果を検討した結果を血漿滲出量として、Fig. 20 に示した。

0.5 μ M の OVA 注射を行った部位において、apigenin および eriodictyol 単独投与群と混合投与群は、コントロール群に比較し、有意に血漿滲出量が抑制されていた。

(2) 血清中の抗体量および卵白アルブミン特異抗体価

免疫開始時、追加免疫時(1週間後)および皮膚反応測定時(2週間後)における血清中の IgG₁、IgE 量をそれぞれ測定した(Table 4)。免疫開始時、追加免疫時の IgG₁ 量は 200-400 μ g/ml の値を示し、いずれの処理群においても差は認められなかった。皮膚反応測定時では感作前に比べ 10-20 倍に抗体量が増加していたが、コントロール群とフラボノイド投与群の間には有意差は認められなかった。IgE 抗体量については、追加免疫時には免疫開始時の 10-20 倍程度に増加したが、皮膚反応測定時には追加免疫時の約半分に減少していた。

OVA 特異的 IgG₁ の抗体価については、皮膚反応時に 15 を超える高い値を示したが、いずれの処理群においても差は認められなかった(Table 4)。

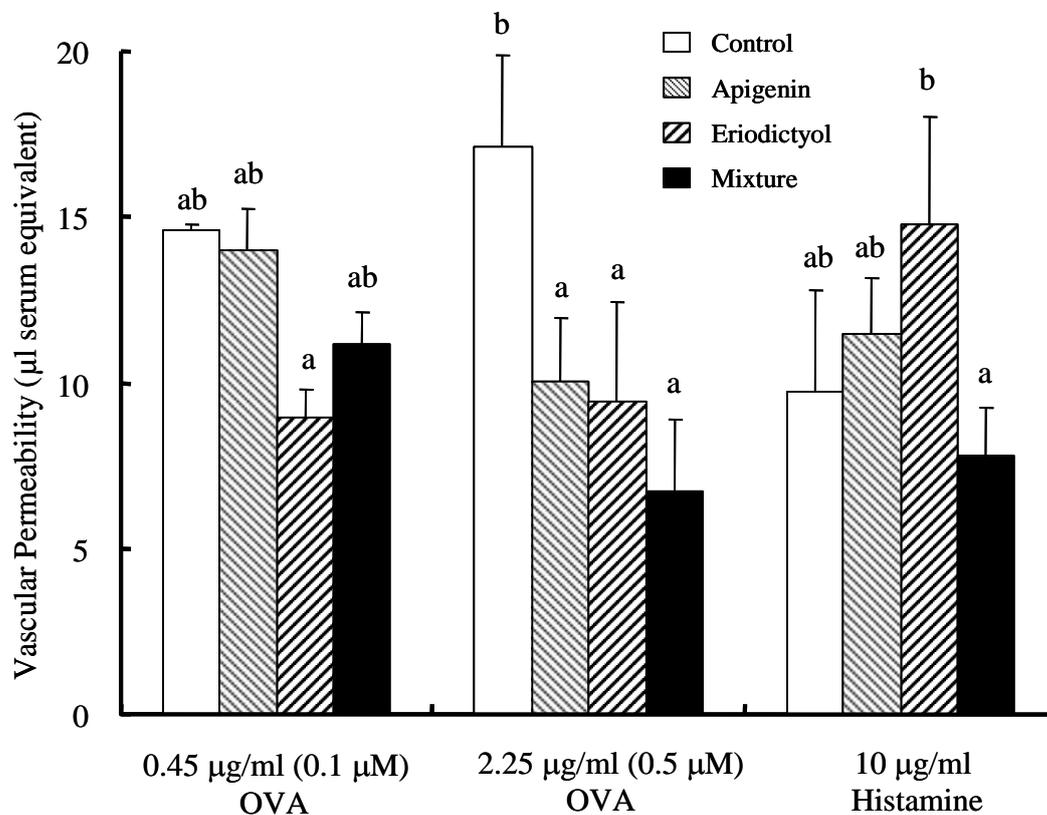


Fig. 20 Plasma leakage by injections of OVA and histamine in ICR mice.

FITC-BSA were injected to OVA sensitized ICR mice from a tail vein under light ether anesthesia. The animals were injected with OVA (antigen) and histamine solution into the dorsal skin. After 30 min, the mice were sacrificed by cardiac puncture.

The plasma leakage of the injected sites of skin were measured as the rate of fluorescence intensity of the skin and 50 µl of serum.

Values were expressed as mean \pm standard error (n= 6). Zero on the x-axis refers to skin sites injected with Tyrode's solution only.

The same letter do not differ significantly from one another (p<0.05).

Table 4 Concentration of and IgG₁, IgE and titer of IgG₁ in flavonoid injected mouse sera.

	Total IgG ₁ (µg/ml)			Total IgE(ng/ml)			IgG ₁ Titer	
	0w	1w	2w	0w	1w	2w	1w	2w
Control	334.5	463.6	2912.9	41.1	337.9	228.8	6.8	15.2
SE	62.6	67.8	592.1	11.6	92.6	65.2	0.8	0.6
Apigenin	381.9	484.6	4109.8	22.1	406.7	102.4	7.6	15.5
SE	109.9	77.2	499.5	4.1	112.7	24.4	0.8	0.4
Eriodictyol	398.0	598.3	4628.4	28.3	503.5	206.0	8.8	15.6
SE	67.4	69.0	932.8	6.3	62.9	105.7	0.6	0.3
Mixture	298.5	500.1	3320.1	74.4	588.7	414.9	6.6	15.2
SE	61.2	85.6	791.3	27.2	162.6	127.4	0.8	0.3

3) 考察

フラボノイドの炎症抑制活性に関する研究では、前述のように細胞レベルでの報告は多いが、動物への投与による活性を検討した報告^{111, 112}は少ない。本試験では、OVAを抗原としてFIAとのエマルジョンを腹腔内投与により感作を行い、同時に皮下へフラボノイドを投与した。感作成立後、即時型アレルギー反応を惹起し、遊離したヒスタミンによる血管透過性の亢進に対するフラボノイド投与の影響を明らかにすることを目的とした。

その結果、血漿成分の滲出量を炎症強度の指標として測定したところ、供試した apigenin、eriodictyol のいずれにおいてもコントロールに比べ滲出量が抑制されており、動物レベルでの炎症抑制効果が確認された。しかし、血清中の IgG₁、IgE 抗体量および OVA 特異的 IgG₁ 抗体価については差が認められず、炎症抑制作用機序についてはさらなる検討が必要であると考えられた。

4. 小括

第1, 第2章で細胞系におけるフラボノイドの抗炎症活性の検討を行い、いくつかのフラボノイドに炎症初期のケミカルメディエータ産生や、炎症局所への白血球浸潤を抑制する効果が認められた。そこで、本章では動物モデルを用いたフラボノイドの炎症抑制効果を確認するために、血管透過性亢進を炎症の指標とした測定手法の改良、および即時型アレルギーモデルによる試験を行った。

アレルギー等の炎症関連の研究において汎用される炎症モデルにおいては、血管透過性の亢進を炎症の指標として測定する方法がよく用いられている。しかし、briliant bule 6B等の色素や放射性同位元素をトレーサーとして用いる方法には、測定感度が低いことや実験者の被爆のおそれ、さらに廃棄物の処理等いくつかの問題点が存在する。

そこで、最初に炎症モデルにおいて血管透過性を測定する方法の改良を試みた。まず、感度を向上させるためにトレーサーとして蛍光色素を用いるこ

とにより、マウスにおけるヒスタミンの感受性が 50 ng/site において 15 μ l の血漿滲出、ラットにおいては 200 ng/site のヒスタミンが、20 μ l の血漿滲出に相当する高い感度を得ることができた。さらに操作の簡便性、迅速性の点から、皮膚組織からの抽出操作を行うのではなく、皮膚組織の光透過性を高めることにより、蛍光マイクロプレートリーダーを用いての測定を可能にした。本法は、従来の色素方法との相関も高く、動物の皮膚炎症モデルの測定に簡便法として用いることが可能であると考えられた。

この改良法を用い、細胞レベルで炎症抑制活性が認められたフラボノイドのうち、基本骨格の異なる apigenin (フラボン)、eriodictyol (フラバノン) を用い、モデル動物を用いた即時型アレルギー性炎症の抑制効果を検討した。ICR マウスを OVA で免疫すると同時にフラボノイドを皮下投与し、感作成立後に即時型アレルギーによる炎症を惹起し、本方法を用いて血管透過性を測定した。その結果、apigenin、eriodictyol いずれにおいても有意に血漿滲出を抑制する効果が認められた。

この結果から、フラボノイドの投与により即時型アレルギーによる炎症を抑制できる可能性が期待され、炎症抑制効果を示す物質の探索に際し、細胞レベルでの PGE₂ 産生抑制活性や E-selectin 発現抑制活性などを指標として用いることができると考えられた。しかし、実際の即時型アレルギー反応による血管透過性亢進を抑制する作用機序についてはまだ不明な点が多く残されており、今後さらなる研究が必要である。

総括

本研究においては、炎症反応の初期に認められる血管透過性の亢進および白血球の炎症局所への遊走に着目し、それらの反応に対するフラボノイドの抑制効果について検討を行った。

第1章においては、炎症初期に産生されるケミカルメディエータのうち、アラキドン酸から脂肪酸シクロオキシゲナーゼにより合成され、血管透過性亢進に寄与する PGE_2 、さらに炎症性サイトカインとして血管内皮細胞に白血球接着因子の発現を誘導し、炎症時の白血球遊走に重要な役割を果たす $\text{TNF-}\alpha$ を選択し、マクロファージを大腸菌リポ多糖にて刺激した際のこれらの産生誘導に対するフラボノイドの効果を明らかにした。また、抗体産生細胞の増殖やサイトカイン、抗体産生、およびマスト細胞における脱顆粒に対するポリメトキシフラボンの効果を明らかにした。

細胞膜に存在するアラキドン酸の代謝物として PG が合成される際に、その産生を律速する誘導型の COX-2 酵素に着目し、 PGE_2 産生量および本酵素の発現に対するフラボノイドの効果について明らかにした。供試した約40種類のフラボノイドのうち、16種類に PGE_2 産生抑制活性が認められ、フラボノイドの構造別ではフラボンが最も活性が高く、baicalein (2.5 μM)、chrisin (2.8 μM)、apigenin (3.3 μM) という IC_{50} 値を示し、非ステロイド性抗炎症剤である Aspirin[®] (2.9 μM) とほぼ同等の値であった。次いで、フラバノンの eriodictyol (7.2 μM)、naringenin (7.9 μM)、イソフラボンの genistein (7.2 μM)、フラボノールの 7-hydroxyflavonol (10.7 μM)、kaempferol (13.1 μM) 等において高い抑制活性が認められた。

構造活性相関の検討により、活性発現においては4位のケトン基(オキソ構造)が必須であること、またC2-C3位における二重結合は抑制活性を強めること、フラボノイドB環の水酸基の数およびその位置により活性に差が認められること、A環の5,7位に水酸基を持つフラボノイドは持たないものに比べ、有意に活性が高いことを明らかにした。

さらに、 PGE_2 産生抑制効果を持つフラボノイドのうち、サブクラスごとに活性の高いものと低いものを選択し、 COX の発現をウエスタンブロットにより検討したところ、強い抑制活性を有する apigenin、7-hydroxyflavonol および

eriodictyol では COX-2 の発現が用量依存的に抑制されたが、PGE₂ 産生抑制の弱い daidzein では、COX-2 の発現抑制効果は弱く、COX もしくは細胞膜リン脂質からアラキドン酸を遊離する酵素である phospholipase A₂ 活性阻害等他の作用機序によるものと考えられた。また、配糖体はそれに対応するアグリコンに比較し、抑制活性が弱いことから、フラボノイドの細胞透過性も活性発現に大きな影響を与えることが示唆された。

さらに、炎症性サイトカインである TNF- α 産生に対するポリメトキシフラボンの効果を検討したところ、5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone (IC₅₀=3.7 μ M)、sinensetin (4.8 μ M) や nobiletin (5.7 μ M) において、産生抑制活性が認められ、6 位および 4' 位のメキシ基が抑制活性発現に重要であることが明らかになった。

また、sinensetin および nobiletin は抗原刺激した RBL-2H3 細胞における脱顆粒を抑制したが、その抑制活性は 10 μ M の添加でそれぞれ、21、31% であり、luteolin (IC₅₀=2.1 μ M) 等強い抑制活性を有するフラボノイドより低く、ポリメトキシフラボンの抗原刺激による脱顆粒の抑制効果は他のフラボノイドに比べてやや劣ると考えられた。

また、ポリメトキシフラボンの抗体産生細胞に対する影響を細胞増殖、サイトカインや抗体産生の点から検討したところ、抗原刺激および抗 CD3 ϵ 抗体刺激のいずれにおいても細胞増殖は抑制される傾向にあったが、有意差は認められなかった。サイトカイン産生については、IL-10、IL-2、IFN- γ において産生の抑制が認められ、この結果からはいわゆる Th2 型細胞優位に分化を誘導する可能性が推測された。しかし、抗体産生については IgG₁、IgE の産生を抑制する傾向が認められることから、サイトカインとは逆に Th2 型の抗体産生が抑制される結果となった。ポリメトキシフラボンの抗体産生細胞に対する効果としては、B 細胞における抗体産生や抗体のクラススイッチに対する作用、抗体産生細胞の活性抑制等の可能性が考えられた。

第 2 章においては、炎症初期のもう一つの重要な反応である炎症局所における白血球の血管外遊走において、浸潤過程の最初の段階に起きる白血球が血管内皮細胞表面を転がる(ローリング)現象に関与する白血球接

着分子に着目した。ローリング現象を詳細に解析するためには、白血球の動態を直接顕微鏡観察する生体顕微鏡法が有効であるが、操作による傷害を受けることから、長時間の観察が困難である。そこで、この欠点を克服した血管内白血球数の組織学的定量法を、ラット腸間膜静脈におけるヒスタミン誘導による白血球のローリングの解析方法に適用し、サイトカイン等により誘導された白血球浸潤の観察に適用することが可能であることを明らかにした。

また、ローリング現象の開始において、selectin が重要な役割を果たすことが知られていることから、そのうち血管内皮細胞表面に誘導される E-selectin (CD62E) の分子の発現に対するフラボノイドの効果について検討を行った。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を TNF- α で刺激し、E-selectin の発現を cell surface ELISA 法により測定した。供試した約 40 種のフラボノイドのうち、フラボンに属する fisetin ($IC_{50}=0.8 \mu M$)、quercetin ($4.5 \mu M$) および kaempferol ($4.3 \mu M$) の flavonol、さらに chalcone に属する butein ($1.5 \mu M$) において強い抑制活性が認められた。Isoflavone と flavanone は上の 3 つのサブクラスよりも活性が弱く、genistein では $13.8 \mu M$ 、eriodictyol は $70.6 \mu M$ という IC_{50} 値を示した。

構造活性相関では、フラボノイド A 環に存在する C2-C3 の二重結合を持つグループの方が強い活性を示し、4 位のケトン基は、本抑制活性の発現に必須であると考えられた。B 環の水酸基では、4' 位単独、もしくは 3'、4' のジヒドロキシ構造を有する場合には活性を示すが、全く水酸基を持たないか、メトキシ基である場合には抑制活性が認められなかった。フラボノイド配糖体はアグリコンに比較して阻害活性が低いことから、細胞膜透過性が活性に影響するものと考えられた。

前 2 章の結果により、フラボノイドが炎症メディエータの産生や白血球の炎症局所への浸潤を抑制することが細胞系で確認されたことから、第 3 章では即時型アレルギーにより惹起される炎症反応に対するフラボノイドの効果についてモデル動物を用いた検討を行った。生体における炎症反応初期の典型的な特徴として、血管透過性の亢進およびそれに伴う血漿成分の滲出による局所での浮腫が認められる。アレルギー性炎症においては、抗原の侵入に

より肥満細胞からヒスタミン等が放出されて炎症反応が惹起される。このときの炎症局所において認められる浮腫反応を迅速かつ高感度に測定するために、血漿成分の指標として従来の色素に代わり、蛍光色素でラベルした牛血清アルブミンを用いる方法を検討した。さらに、炎症部位の皮膚を切り取った後、ホルムアミドを加えて加温することにより、皮膚の光透過性を高め、蛍光プレートリーダーにより蛍光強度を直接測定することが可能になり、血清中の蛍光色素量から血漿滲出量を算出する方法を開発した。本法は従来の色素法と高い相関を示し、煩雑な抽出操作を必要とせず高感度に多検体を測定することを可能にした。

そこで、細胞系において効果が確認されたフラボノイドのうちフラボンの **apigenin**、フラバノンの **eriodictyol** を用い、OVA で免疫したマウスにおけるアレルギー性炎症抑制効果として、本改良法を用い血管透過性に対する効果を検討したところ、これらのフラボノイドの皮下投与により即時型アレルギーによる血漿滲出が有意に抑制されることが確認されたことから、本測定法の实用性および動物モデルにおけるフラボノイドのアレルギー性炎症抑制効果を明らかにすることができた。

本研究では、炎症反応を制御するフラボノイドの探索を目的として、炎症初期に生体防御反応として認められる血管透過性亢進や白血球の炎症局所への浸潤に着目し、炎症性ケミカルメディエータの **PGE₂** および炎症性サイトカイン **TNF- α** の産生、また血管内皮細胞に発現する白血球接着分子 **E-selectin** の発現抑制活性を有するフラボノイドを探索し、その構造活性相関、作用機序の一部を明らかにした。さらに、細胞レベルで抗炎症活性が認められたフラボノイドについて、モデル動物を用いた炎症抑制活性の評価を行うために、炎症に伴う血管透過性亢進を血漿滲出量として測定する方法を改良し、蛍光色素でラベルした **BSA** をトレーサーとして用い、高感度で迅速な測定を可能とする手法を開発した。本改良法を用い、実際に **OVA** 感作したマウスに即時型アレルギー性炎症を惹起し、フラボノイドの効果を検討したところ、血漿滲出の抑制が認められ、動物レベルでの炎症抑制効果が確認された。

フラボノイドの炎症抑制活性が細胞レベルに留まらず、動物レベルでも確認されたことから、抗アレルギーや抗炎症機能を有する食品成分としてのフラボノイドの有用性についての知見が得られた。今回、抗アレルギーや抗炎症活性を示したフラボノイドは、**apigenin** がセロリやピーマン、**eriodictyol** がレモンや菊花に含まれることが知られており、その他にも **quercetin** がタマネギをはじめとする果実、野菜全般に含有されていることから、これらの食品の摂取がアレルギーや炎症の抑制に寄与する可能性がある。また本知見は、新規機能性食品開発の素材提供への一助となるものと期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、御指導、御鞭撻をいただきました東京大学大学院生命科学研究科教授、清水誠先生に心より深謝いたします。

また、本研究ならびに本論文の作成にあたり、貴重なご意見や実験手技に関する多くの御指導をいただいた独立行政法人 国際農林水産業研究センター 主任研究官、八巻幸二博士に、厚く感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり、ご指導をいただきました独立行政法人 食品総合研究所 機能成分研究室長の新本洋士博士、実験計画等のご助言をいただきました同研究室 後藤真生博士に深く感謝いたします。また、機能成分研究室の皆様にも、感謝申し上げます。

本実験の遂行にあたり、試料分析および動物の管理、実験補助をしていただいた小林直美氏、松尾朋子氏、曾勤氏、また(株)アニマルケア 松下幸裕氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、本論文における実験結果の統計解析等について、助言をいただいた独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 中央農業総合研究センター 関東東海総合研究部 総合研究第3チーム 石川哲也氏に感謝の意を表します。

略号表まとめ

ANOVA	analysis of variance
BSA	bovine serum albumin
BrdU	5-bromo2'-deoxy-uridine
cAMP	adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate
CD	cluster designation
Con A	concanavarin A
COX	cyclooxygenase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DNP	dinitrophenol
EC	Enzyme Commission Number
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylene diaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
FIA	Freund's incomplete adjuvant
FITC	fluorescein isothiocyanate
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
HSA	human serum albumin
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
ICAM	intracellular cell adhesion molecule
ICR	Institute Cancer Research
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin

IL	interleukin
LDH	lactate dehydrogenase
LPS	lipopolysaccharide
LT	leukotriene
MAP	mitogen activated protein
MEK	mitogen activated protein kinase
MN	mononuclear leukocyte
mRNA	messenger ribonucleic acid
MT	modified Tyrode's
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
OD	optical density
OVA	ovalbumin
PAF	platelet-activating factor
PBS	phosphate buffered saline
PG	prostaglandin
PLSD	protected least-squares difference
PMN	polymorphonuclear leukocyte
RBL	rat basophil leukemia
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Sprague-Dawley
SDS	sodium dodecyl sulphate
SPF	specific pathogen free
TBS	Tris bufferd saline
Th	helper T cell
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TPA	12- <i>o</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
VCAM	vascular cell adhesion molecule

引用文献

- 1 飯島宗一 編 (1976) 炎症と生体防御, 岩波講座 現代生物科学 12, 岩波書店, 東京: 1-5.
- 2 Katori M, Harada Y, Tanaka K, Miyazaki H, Ishibashi M, Yamashita Y (1980) Changes of prostaglandin and thromboxane levels in pleural fluid of rat carrageenin-induced pleurisy. *Adv. Prostag. Thromb. Res.* **8**: 1733-1737.
- 3 Oh-ishi S, Hayashi M, Yamaki K (1986) Inflammatory effects of acetylglycerylether phosphorylcholine: vascular permeability increase and induction of pleurisy in rats. *Prostag. Leukotr. Med.* **22**: 21-33.
- 4 Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayashi O (1976) Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.* **51**: 2629-2636.
- 5 Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/ cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* **266**: 12866-12872.
- 6 Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2692-2696.
- 7 Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenase 1/ and 2. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 97-120.
- 8 Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herschman HR (1992) Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J. Biol. Chem.* **267**: 4338-4344.
- 9 Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* **231**: 232-235.

- 10 Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR (1993) Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11693-11697.
- 11 Lanza FL (1989) A review of gastric ulcer and gastroduodenal injury in normal volunteers receiving aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* **163**: 24-31.
- 12 Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, and Isakson P (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12013-12017.
- 13 Vane J (1994) Towards a better aspirin. *Nature* **367**: 215-216.
- 14 Van der Ouderaa FJ, Buytenhek M, Nugteren DH, Van Dorp DA (1977) Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands. *Biochim. Biophys. Acta* **487**: 315-31.
- 15 Ohki S, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O (1979) Prostaglandin hydroperoxidase, an integral part of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.* **254**: 829-836.
- 16 Yamada M, Niki H, Yamashita M, Mue S, Ohuchi K (1997) Prostaglandin E₂ production dependent upon cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 and its contradictory modulation by auranofin in rat peritoneal macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**: 1005-1012.
- 17 Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774.1A. *Life Sci.* **68**: 921-931.
- 18 Kyan-Aung U, Haskard DO, Poston RN, Thornhill MH, Lee TH (1991) Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 mediate the adhesion of eosinophils to endothelial cells in vitro and are expressed by endothelium in allergic cutaneous inflammation in vivo. *J. Immunol.* **146**: 521-528.

- 19 Horton JE, Oppenheim JJ, Margenhagen SE, Raisz LG (1974) Macrophage-lymphocyte synergy in the production of osteoblast activating factor. *J. Immunol.* **113**: 1278-1287.
- 20 Mackay CR, Imhof BA (1993) Cell adhesion in the immune system. *Immunol. Today* **14**: 99-102.
- 21 Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**: 2068-2101.
- 22 Vestweber D, Blanks JE (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* **79**: 181-213.
- 23 McEver RP (1989) GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J. Cell Biochem.* **45**: 156-161.
- 24 Picker LJ, Warnoch RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC (1991) The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* **66**: 921-933.
- 25 Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. (1987) Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 9238-9242.
- 26 Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS (2004) Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharm. Sci.* **96**: 229-245.
- 27 Middleton E Jr., Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**: 673-751.
- 28 Harborne JB (1988) The flavonoids. Advances in research since 1980. Chapman and Hall Ltd. London: 125-329
- 29 Harris GS, Padillaa J, Koumasa L, Raya D, Phipps PR (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* **23**: 144-150.

- 30 Sautebin L (2000) Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia* **71**: S48-S57.
- 31 Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van de Putte LBA, Lipsky PE (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* **12**: 1063-1073.
- 32 Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I (2000) Molecular identification of cytosolic prostaglandin E₂ synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E₂ biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **275**: 32775-32782.
- 33 Lee HS, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D (1992) Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **267**: 25934-25938.
- 34 Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **271**: 33157-33160.
- 35 Matsumoto H, Naraba H, Murakami M, Kudo I, Yamaki K, Ueno A, Oh-ishi S (1997) Concordant induction of prostaglandin E₂ synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E₂ over thromboxane and prostaglandin D₂ in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**: 110-114.
- 36 Read MA (1995) Flavonoids: Naturally occurring anti-inflammatory agents. *Am. J. Pathol.* **147**: 235-237.
- 37 Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* **65**: 337-353.
- 38 Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774.1A. *Life Sci.* **68**: 921-931.
- 39 Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K (2000) Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2

promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**: 686-691.

- 40 Larrick JW, Wright SC (1990) Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- α . *FASEB J.* **4**: 3215-23.
- 41 Hansel TT, De Vries IJ, Carballido JM, Braun RK, Carballido-Perrig N, Rihs S, Blaser K, Walker C (1992) Induction and function of eosinophil intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR. *J. Immunol.* **149**: 2130-6.
- 42 Herath HMT, Takano-Ishikawa Y, Yamaki K (2003) Inhibitory effect of some flavonoids on the tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharides-stimulated mouse macrophage cell line J774.1. *J. Med. Food* **6**: 365-370.
- 43 Iwase Y, Takemura Y, Ju-ichi M, Yano M, Ito C, Furukawa H, Mukainaka T, Kuchide M, Tokuda H, Nishino H (2001) Cancer chemopreventive activity of 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone from the peel of citrus plants. *Cancer Lett.* **163**: 7-9.
- 44 Murakami A, Nakamura Y, Ohto Y, Yano M, Koshiha T, Koshimizu K, Tokuda H, Nishino H, Ohigashi H (2000) Suppressive effects of citrus fruits on free radical generation and nobiletin, an anti-inflammatory poly methoxyflavonoid. *Biofactors* **12**: 187-92.
- 45 Lin N, Sato T, Takayama Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A (2003) Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **65**: 2065-2071.
- 46 Watanabe M, Tamura T, Ohashi M, Hirasawa N, Ozeki T, Tsurufuji S, Fujiki H, Ohuchi K (1990) Dual effects of staurosporine on arachidonic acid metabolism in rat peritoneal macrophages. *Biochimi. Biophys. Acta* **1047**: 141-147.
- 47 Kim YP, Yamada M, Lim SS, Lee SH, Ryu N, Shin KH, Ohuchi K (1999) Inhibition by tectorigenin and tectoridin of prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 induction in rat peritoneal macrophages. *Biochemi. Biophys. Acta* **1438**: 399-407.

- 48 Landolfi R, Mower RL, Steiner M (1984) Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 1525-1530.
- 49 Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K (2000) Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**: 686-691.
- 50 Kalkbrenner F, Wurm G, Bruchhausen F (1992) *In vitro* inhibition and simulation of purified prostaglandin endoperoxide synthase by flavonoids: structure-activity relationship. *Pharmacol.* **44**: 1-12.
- 51 Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K (2000) Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis* **21**: 959-963.
- 52 Shrh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* **480-481**: 243-268.
- 53 Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K (2001) Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **47**: 357-362.
- 54 Palmieri L, Mameli M, Ronca G (1999) Effect of resveratrol and some other natural compounds on tyrosine kinase activity and on cytolysis. *Drugs Exp. Clin. Res.* **XXV**: 79-85.
- 55 Anonymous (1998) Quercetin; monograph. *Altern. Med. Rev.* **3**: 140-143.
- 56 Chi YS, Cheon BS, Kim HP (2001) Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.* **61**: 1195-1203.

- 57 Oguma T, Asano K, Shiomi T, Fukunaga K, Suzuki Y, Nakamura M, Matsubara H, Sheldon HK, Haley KJ, Lilly CM, Drazen JM, Yamaguchi K (2002) Cyclooxygenase-2 expression during allergic inflammation in guinea-pig lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**: 382-386.
- 58 Futai N, Takeshita S, Arai I, Higuchi S, Otomo S (1994) NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity *in vitro*. *Prostaglandins* **47**: 55-59.
- 59 Roth GJ, Stanford N, Majerus PW (1975) Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3073-3076.
- 60 Kalkbrenner F, Wurm G, Bruchhausen F (1992) In vitro inhibition and stimulation of purified prostaglandin endoperoxide synthase by flavonoids: structure-activity relationship. *Pharmacol.* **44**: 1-12.
- 61 Walgren RA, Walle UK, Walle T (1998) Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.* **55**: 1721-1727.
- 62 Haslam E (1966) Chemistry of vegetable tannins. Academic press. London :14-17
- 63 Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **130**: 2073S-2085S.
- 64 Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpaa J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A (2000) Pharmacokinetics and disposition: Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **56**: 545-553.
- 65 Shimoi K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, Nakayama T, Kinae N (2001) Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab. Dispos.* **29**: 1521-1524.
- 66 O'Leary KA, Pascual-Tereasa S, Needs PW, BaoYP, O'Brien NM, Williamson G (2004) Effect of flavonoids and Vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat. Res.* **551**: 245-254.

- 67 Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M (2004) A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor- α production. *Biosci. Biotech. Biochem.* **68**: 119-125.
- 68 Manthey JA, Grohmann K, Montanari A, Ash K, Manthe CL (1999) Polymethoxylated flavones derived from Citrus suppress tumor necrosis factor- α expression by human monocytes. *J. Nat. Prod.*, **62**; 441-444.
- 69 Guo TL, McCay JA, Zhang LX, Brown RD, You L, Karrow NA, Germolec DR, White KL Jr. (2001) Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice. *J. Nutr.* **131**: 3251-3258.
- 70 Delaney B, Phillips K, Buswell D, Mowry B, Nickels D, Cox D, Wang HB, Manthey J (2001) Immunotoxicity of a standardized citrus polymethoxylated flavone extract. *Food Chem. Toxicol.* **39**: 1087-1094.
- 71 Namgoong SY, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP (1994) Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* **54**: 313-320.
- 72 Matsuda M, Morikawa T, Ueda K, Managi H, Yoshikawa M (2002) Structural requirements of flavonoides for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF- α and IL-4 production from RBL-2H3 cells. *Bioorgan. Med. Chem.* **10**: 3123-3128.
- 73 Middleton E Jr., Drzewiecki G (1984) Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 3333-3338.
- 74 Calos TM and Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**: 2068-2101.
- 75 Lasky LA (1992) Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* **258**: 964-969.

- 76 Yamaki K, Lindbom L, Thorlacius H, Hedqvist P, Raud J (1998) An approach for studies of mediator induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br. J. Pharmacol.* **123**: 381-389.
- 77 Yamaki K, Thorlacius H, Xie X, Lindbom L, Hedqvist P, Raud J (1998) Characteristics of histamine induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br. J. Pharmacol.* **123**: 390-399.
- 78 Choi JS, Choi YJ, Park SH, Kang JS, Kang YH (2004) Flavones mitigate tumor necrosis factor- α -induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor- κ B. *J. Nutr.* **134**: 1013-1019.
- 79 Weber C, Negrescu E, Erl W, Pietsch A, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW, Siess W, Weber PC (1995) Inhibitors of protein tyrosine kinase suppress TNF-stimulated induction of endothelial cell adhesion molecules. *J. Immunol.* **155**: 445-451.
- 80 Ebnet K and Vestweber D. (1999) Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectin and the chemokines. *Histochem. Cell Biol.* **112**: 1-23.
- 81 Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF and Perry CA (1995) Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am. J. Pathol.* **147**: 278-292.
- 82 Snyderman R, Altman LC, Hausman MS, Mergenhagen SE (1972) Human mononuclear leukocyte chemotaxis: a quantitative assay for humoral and cellular chemotactic factors. *J. Immunol.* **108**: 857-860.
- 83 Goldblum SE, Wu KM, Jay M (1985) Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbit. *J. Appl. Physiol.* **59**: 1978-1985
- 84 Yamaki K, Takano-Ishikawa Y, Kobori M (2001) Analysis of increased leukocyte ratio induced by tumor necrosis factor- α using several inhibitors in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Int. Immunopharmacol.* **1**: 561-567.

- 85 Lindbom L, Xie X, Raud J, Hedqvist P (1992) Chemoattractant-induced firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium *in vivo* is critically dependent on initial leukocyte rolling. *Acta Physiol. Scand.* **146**: 415-421.
- 86 Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K (1998) Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **102**: 1526-1533.
- 87 Wardlaw AJ, Moqbel R, Cromwell O, Kay AB (1986) Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J. Clin. Invest.* **78**: 1701-1706.
- 88 Liu L, Zuurbier AE, Mul FP, Verhoeven AJ, Lutter R, Knol EF, Roos D (1998) Triple role of platelet-activating factor in eosinophil migration across monolayers of lung epithelial cells: eosinophil chemoattractant and priming agent and epithelial cell activator. *J. Immunol.* **161**: 3064-3070.
- 89 Cepinskas G, Sandig M, Kvietys PR (1999) PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. *J. Cell Sci.* **112**: 1937-1945.
- 90 Gastaldello K, Husson C, Wens R, Vanherweghem JL, Tielemans C (2000) Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* **15**: 1638-1646.
- 91 Grimminger F, Mayer K, Kiss L, Walmrath D, Seeger W (2000) PAF-induced synthesis of tetraenoic and pentaenoic leukotrienes in the isolated rabbit lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **278**: L268-L275.
- 92 Bienvenu K, Russell J, Granger DN (1993) Platelet-activating factor promotes shear rate-dependent leukocyte adhesion in post capillary venules. *J. Lipid Mediat.* **8**: 95-103.
- 93 Javaid K, Rahman A, Anwar KN, Frey RS, Minshall RD, Malik AB (2003) Tumor necrosis factor- α induces early-onset endothelial adhesivity by protein kinase C ζ -dependent activation of intercellular adhesion molecule-1. *Circ. Res.* **92**:

1089-1097.

- 94 Ip WK, Wong CK, Lam CW (2003) Tumour necrosis factor- α -induced expression of intercellular adhesion molecule-1 on human eosinophilic leukaemia Eo1-1 cells is mediated by the activation of nuclear factor- κ B pathway. *Clin. Exp. Allergy* **33**: 241-248.
- 95 Young RE, Thompson RD, Nourshargh S (2002) Divergent mechanisms of action of the inflammatory cytokines interleukin 1- β and tumour necrosis factor- α in mouse cremasteric venules. *Br. J. Pharmacol.* **137**: 1237-1246.
- 96 Rice JW, Davis JE, Crowl RM, Johnston PA (1996) Development of a high volume screen to identify inhibitors of endothelial cell activation. *Anal. Biochem.* **241**: 254-256.
- 97 Choi JS, Choi YJ, Park SH, Lee YJ, Kang YH (2002) Selection of flavonoids inhibiting expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor- α in human vascular endothelial cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 1134-1141.
- 98 Inoue H, Asaka T, Nagata N, Koshihara Y (1997) Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **333**: 231-240.
- 99 Wershil BK, Murakami T, Galli SJ (1988) Mast cell-dependent amplification of an immunologically nonspecific inflammatory response. Mast cells are required for the full expression of cutaneous acute inflammation induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Immunol.* **140**: 2356-2360.
- 100 Ishida H, Fujii E, Irie K, Yoshioka T, Muraki T, Ogawa R (2000) Role of inflammatory mediators in lipid A analogue (ONO-4007)-induced vascular permeability change in mouse skin. *Br. J. Pharmacol.* **130**: 1235-1240.
- 101 Tsurufuji S, Yoshino S, Ohuchi K (1982) Induction of an allergic air-pouch inflammation in rats. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **69**: 189-198.
- 102 Cuzzocrea S, Santagati S, Sautebin L, Mazzon E, Calabro G, Serraino I, Caputi AP, Maggi A (2000) 17 β -estradiol antiinflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy.

Endocrinology **141**: 1455-1463.

- 103 Schrier DJ, Lesch ME, Wright CD, Gilbertsen RB (1990) The antiinflammatory effects of adenosine receptor agonists on the carrageenan-induced pleural inflammatory response in rats. *J. Immunol.* **145**: 1874-1879.
- 104 Taherzadeh M, Das AK, Warren JB (1998) Nifedipine increases microvascular permeability via a direct local effect on postcapillary venules. *Am. J. Physiol.* **275**: H1388-H1394.
- 105 Watanabe K, Nakagawa H, Tsurufuji, S. (1984) A new sensitive fluorometric method for measurement of vascular permeability. *J. Pharmacol. Methods* **11**: 167-176.
- 106 Watanabe K, Nakagawa H, Tsurufuji S (1986) A new sensitive fluorometric method for measurement of plasma exudation in the inflammatory skin reaction. *J. Pharmacol. Methods* **15**: 255-261.
- 107 McKinney RM, Spillane JT, Pearce GW (1964) Factors affecting the rate of reaction of fluorescein isothiocyanate with serum proteins. *J. Immunol.* **93**: 232-242.
- 108 McDonagh PF, Williams SK (1984) The preparation and use of fluorescent-protein conjugates for microvascular research. *Microvasc. Res.* **27**: 14-27.
- 109 Hayashi K, Sato H, Kaise T, Ohmori K, Ishii A, Sano J, Karasawa A (2001) Roles of mast cells and sensory nerves in cutaneous vascular hyperpermeability and scratching behavior induced by poly-L-arginine in rat. *Eur. J. Pharmacol.* **425**: 219-227.
- 110 Irie K, Fujii E, Ishida H, Wada K, Suganuma T, Nishikori T, Yoshioka T, Muraki T (2001) Inhibitory effects of cyclic AMP elevating agents on lipopolysaccharide (LPS)-induced microvascular permeability change in mouse skin. *Br. J. Pharmacol.* **133**: 237-242.
- 111 Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R, Tarkowski A (2003) Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm. Res.* **52**: 341-346.
- 112 Park BK, Heo MY, Park H, Kim HP (2001) Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 expression and skin inflammation in mice by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria*

radix. *Eur. J. Pharmacol.* **425**: 153-157.