

鶏胆汁および biliverdin の抗アレルギー作用に関する研究

中上 辰芳

日本ハム(株)中央研究所

Anti-allergic properties of chicken bile and biliverdin

Tatsuyoshi NAKAGAMI

R & D Center of Nippon Meat Packers, Inc.

(Received April 23, 1990. Accepted July 27, 1990.)

Abstract

Lyophilized chicken bile proved to have anti-allergic properties in several experimental models of allergic diseases. It showed inhibitory effects on type- I allergic disease models (compound 48/80-induced histamine release from rat peritoneal mast cells and 48 hr-homologous passive cutaneous anaphylaxis in rats) and type- II one (complement-dependent cytolysis of sheep erythrocytes), but no effect on type- IV ones (picryl chloride-induced contact dermatitis and sheep erythrocytes-induced delayed type hypersensitivity in mice). Among components of chicken bile, biliverdin markedly inhibits type- I and type- II models mentioned above. Further, it prevents some other models of type- I or type- II (ovalbumin-induced histamine release from sensitized rat mast cells, Forssman anaphylaxis in guinea pigs and antiserum-induced hind paw edema in rats). These observations suggest that biliverdin, a bile pigment, is a potent anti-allergic component of chicken bile especially against immediate-type hypersensitivities.

Key words chicken bile, biliverdin, anti-allergic action, anti-inflammatory action, mast cell, complement-dependent cytolysis of sheep red blood cell, forty eight hour-homologous passive cutaneous anaphylaxis, Forssman anaphylaxis.

Abbreviations TCA, taurocholic acid sodium salt ; TCDCA, taurochenodeoxycholic acid sodium salt ; DSCG, disodium cromoglycate ; PBS, phosphate-buffered saline ; PCA, passive cutaneous anaphylaxis ; SRBC, sheep red blood cell.

緒 言

わが国で製造販売されている大衆薬には、主として植物性生薬が配合されており、動物性生薬の利用は稀である。しかし、最近の中薬に関する成書^{1,3)}には、かなりの数の動物の臓器やその成分が収載されており、特に種々の動物の胆汁は消化不良や肝機能障害の改善薬として広く利用されているようである。わが国においても、熊胆 (*Fel ursi*) や牛黄 (*Bezoar bovis*) は現行の日本薬局方にも収載されており、これらは健胃、鎮咳、強心、解熱などの薬

効があるとされているが、それらの薬理学的裏付けは必ずしも充分ではない。

今回、著者は鶏胆汁乾燥物が百日咳、気管支炎あるいは気管支喘息の治療に鎮咳薬として用いられている事実^{2,3)}に着目し、その作用機構および有効成分を明らかにするため、主に抗アレルギー作用および抗炎症作用について検討した。

材料と方法

実験材料

白色ブリマウスロック系の雌と白色コーニッシュ

*〒675-01 兵庫県加古川市平岡町高畑451
451, Takahata, Hiraoka-cho, Kakogawa,
Hyogo 675-01, Japan

系の雄を交配して得たニワトリから新鮮な胆嚢内容物を無菌的に採取し、真空凍結乾燥によって粉末状にして実験に用いた。Taurocholic acid sodium salt (TCA), taurochenodeoxycholic acid sodium salt (TCDCA) および biliverdin は Sigma 社から、prednisolone, indomethacin, flufenamic acid および sodium citrate は和光純薬工業より入手し、disodium cromoglycate (DSCG) は藤沢薬品工業製を用いた。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

実験動物

Wistar 系雄性ラット, ddY 系雄性マウス, ICR 系雌性マウス, Hertley 系雄性モルモットおよび雄性家兎を用いた。これらは $23 \pm 1^\circ\text{C}$ で湿度 60% に調節した飼育室中で固形飼料および水を与えて飼育した。

実験方法

1. I 型アレルギー実験モデル

ラット肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する作用について検討した。

(1) Compound 48/80 によるヒスタミン遊離に対する作用：Wistar 系雄性ラットの腹腔から Uvnäs and Thon⁴⁾ の方法に準じて肥満細胞を分離した。すなわち、ラットを断頭瀉血後、100 U/ml のヘパリンを含む Hanks 液 10 ml を腹腔内に注入し、90 秒間腹部をゆるやかにマッサージしたのち、腹腔内液を採取した。これを 30% と 40% の Ficoll を含む phosphate-buffered saline (PBS: pH 7.0) を重層した試験管に静かに重層し、室温で 30 分間静置した。ついで、 $250 \times g$ で 10 分間遠心し、40% Ficoll 液層の上部に分離された白濁層を採取した。こうして分離した細胞を PBS で 3 回洗浄し、最終的に PBS に浮遊させた。このようにして調整した細胞を toluidine blue で染色し、細胞内顆粒の存在を指標として検討すると、肥満細胞は全細胞の 85% ~ 90% を占めていた。また、trypan blue dye exclusion test によって調べた細胞の viability は 90% 以上であった。

この細胞を PBS に浮遊させて細胞濃度を 2.9×10^6 cells/ml に調整し、その 1.8 ml を 37°C で 10 分間 preincubate したのち、PBS に溶解または懸濁した検体 0.1 ml と PBS に溶解して 0.2 mg/ml となるように調整した compound 48/80 を 0.1 ml 加え、Uvnäs and Thon⁵⁾ の方法に従って 10 分間 incubate した。ついで、氷冷によってヒスタミン遊離反応を停止させ、 5°C で $250 \times g$ 5 分間遠心して、上清と沈澱を分離した。この上清および沈澱に含ま

れるヒスタミンの量は Shore ら⁶⁾ の方法に従って蛍光法で測定した。ヒスタミン遊離率は細胞に含まれる総ヒスタミン量に対する上清中に含まれるヒスタミン量の百分率として求め、また、次式によって各検体のヒスタミン遊離抑制率を算出した。なお、この実験において検出された tube 当たりの総ヒスタミン量は 40~45 μg の値を示した。

$$\text{遊離抑制率}(\%) = [1 - (B - C) / (A - C)] \times 100$$

A：検体非存在下のヒスタミン遊離率

B：検体存在下のヒスタミン遊離率

C：自発遊離率

(2) 抗原抗体反応によるヒスタミン遊離に対する作用：Wistar 系雄性ラットを Stotland and Share⁷⁾ の方法に準じて卵白アルブミンで免疫し、IgE 型の抗卵白アルブミン抗体を誘導した。すなわち、1 mg の卵白アルブミンと aluminium hydroxide gel 20 mg を百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン（阪大微研製）0.5 ml に加えて混和し、体重 180 g 前後のラットの 4 足蹠皮内に分注した。14 日後に頸動脈から採血して血清を分離した。この血清を用いて passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応を誘導し、それに対する被検体の作用を検討した。

体重 150~180 g の Wistar 系雄性ラットの背部を剪毛し、1 日後、前記のようにして調製した血清の生理的食塩水 40 倍希釈液 0.05 ml を皮内に注射した。注射 48 時間後に、卵白アルブミン 10 mg を含む 1% Evans blue 生理的食塩水溶液 0.5 ml を尾静脈から注入した。注入 30 分後にラットを放血致死させ、皮膚の青染部を切り取って含まれる色素量を Katayama ら⁸⁾ の方法に従って測定した。なお、検体は色素注射 30 分前に経口的に投与したが、供試ラットは検体投与前 24 時間絶食させた。各検体の PCA 反応抑制率は次式によって算出した。

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - B/A) \times 100$$

A：コントロール群の平均色素量

B：検体投与群の平均色素量

なお、抗原抗体反応による肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する作用を *in vitro* の実験系で検討するときは、前述⁷⁾ のようにして卵白アルブミンで免疫したラットの腹腔から肥満細胞を前項⁴⁾ のようにして調製し、卵白アルブミンで刺激した際⁵⁾ に細胞外に遊離されるヒスタミン量を測定した。また、抑制率も前述と同様にして算出した。(1)および(2)における *in vitro* の実験系では対照薬として DSCG を用いた。

2. II型アレルギー実験モデル

(1) 羊赤血球溶血反応に対する作用：Mayer と Kabat⁹⁾の方法に準じて羊赤血球 (sheep red blood cell; SRBC) の抗 SRBC 抗体による溶血反応を誘導し、溶血率を指標として検体の作用を検討した。すなわち、新鮮な SRBC に一定量の検体と家兎抗 SRBC 抗血清を加え、補体源としてモルモット新鮮血清を加えて 37℃ で 90 分間反応させた。反応後、氷水中に 5 分間静置し、1,500×g で 10 分間室温で遠心し、得られた上清の hemoglobin 量を 540 nm の吸光度から測定した。一方、上記の SRBC 浮遊液に 0.1% Na₂CO₃ を加えて完全に溶血させ、その吸光度を測定して完全溶血値とした。溶血率は完全溶血値に対する百分率で表した。また、非特異的溶血におよぼす各検体の影響をしらべる場合は、Inglot and Wolna¹⁰⁾の方法に準じて 60 mM という低張 NaCl 溶液中の溶血反応を用いて検討した。なお、対照薬としては sodium citrate を用いた。

(2) Forssman anaphylaxis に対する作用：Pelczarska and Roszkowski¹¹⁾の方法に従って Forssman anaphylaxis 反応を誘導し、それに対する各検体の作用を検討した。すなわち、体重 3～4 kg の雄性家兎の静脈内に 1 ml の 10% SRBC (日本抗体社製) を隔日 21 日間投与し、最終投与 17 日後に頸動脈から採血して血清を分離した。この Forssman 抗体を含む抗血清を体重 300～400 g の Hertley 系雄性モルモットに 1 ml/kg 静脈内注射して Forssman anaphylaxis を惹起させた。この Forssman anaphylaxis 反応の誘導におよぼす各検体の影響は、惹起注射の 2 分前に静注するか、または惹起注射の 1 時間前に経口投与して検討した。なお、抗血清および検体の静脈内投与はいずれも軽エーテル麻酔下で行った。また、対照薬として flufenamic acid を用いた。

(3) 足趾浮腫反応に対する作用：体重 140～160 g の Wistar 系雄性ラットの右側後肢足趾皮下に、家兎をラット血清で免疫して作製した抗血清 (Capel 社製) の 2 倍希釈液 0.1 ml を注射し、浮腫を誘導した。浮腫の程度は、右側後肢足趾の容積を Winter ら¹²⁾の方法で測定することによって推定し、抗血清注射前値から注射後 1 時間毎に 5 時間目までの浮腫率を算出した。なお、検体は抗血清注射 2 分前に静脈内投与するか、または、抗血清注射 1 時間前に経口投与してその効果を評価した。対照薬としては flufenamic acid を用いた。

3. IV型アレルギー実験モデル

(1) Picryl chloride による接触性皮膚炎に対す

る作用：Asherson and Dtak¹³⁾の方法に従って picryl chloride による接触性皮膚炎を誘導し、各検体の作用を検討した。すなわち、体重 20 g 前後の ddY 系雄性マウスの腹部を剪毛し、1 日後にその部に 7% picryl chloride エタノール溶液 0.1 ml を塗布して感作した。塗布 7 日後に両耳朶に 1% picryl chloride を含むオリーブ油溶液を 0.02 ml ずつ塗布して接触性皮膚炎を誘発した。更にその 3 日後に再び、腹部に 7% picryl chloride エタノール溶液を塗布して再感作し、その 7 日後に 1% picryl chloride オリーブ油溶液を両耳朶に塗布した。塗布 24 時間後に耳朶の厚さを dial thickness gauge (尾崎製作所) を用いて測定した。検体は picryl chloride を耳朶に塗布して接触性皮膚炎を誘導する直前および 16 時間後にそれぞれ経口ゾンデを用いて投与した。また、対照薬としては prednisolone を用いた。耳朶の腫張率および検体による抑制率は、それぞれ次に示すような式で算出した。

$$\text{腫張率}(\%) = (B/A - 1) \times 100$$

A：誘発前の耳朶の厚さ

B：誘発 24 時間後の耳朶の厚さ

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - S/C) \times 100$$

C：コントロール群の平均腫張率

S：検体投与群の平均腫張率

(2) SRBC による遅延型足趾浮腫反応に対する作用：Kettman¹⁴⁾の方法に従って、10⁸個の SRBC を体重 20 g 前後の ICR 系雌性マウスの背部皮下に注射して感作し、4 日後に再び 10⁸個の SRBC を右後肢足趾皮下に注射して、24 時間後に左右後肢足趾の厚さを計測した。各検体は SRBC を足趾に注射する直前および 16 時間後に経口的に投与した。対照薬としては prednisolone を用いた。なお、足趾の腫張率は、次式により算出した。

$$\text{腫張率}(\%) = (B/A - 1) \times 100$$

A：24 hr 後の左足趾の厚さ

B：24 hr 後の右足趾の厚さ

また、抑制率は接触性皮膚炎の場合と同様の方法で算出した。

4. その他の実験モデル

(1) 低張および高温による溶血反応に対する作用：Glenn and Bowman¹⁵⁾の方法に従って低張による溶血反応を誘導し、各検体の作用を検討した。すなわち、体重 300～350 g の Wistar 系雄性ラットから心臓穿刺によってヘパリン添加血液を採取し、

遠心によって赤血球を分離した。これを 0.15 M phosphate buffer (pH 7.4) で数回洗浄したのち、同じ phosphate buffer に懸濁して 5 % 赤血球浮遊液を調製した。この浮遊液 3.0 ml に検体を添加した 0.015 M phosphate buffer (pH 7.4) を 3.0 ml を加え、37°C で 1 時間 incubate した後、氷水中で 5 分間冷却した。ついで、 $1,200 \times g$ 10 分間遠心し、上清の 540 nm における吸光度を測定した。また、同じ赤血球浮遊液に等量の 0.1% Na_2CO_3 を加えて溶血させ、前述と同様の手順で得られた吸光度を完全溶血値とした。各検体の低張溶血におよぼす影響は各検体を添加したときの吸光度と完全溶血時の吸光度を比較して算出した。

一方、前述と同様にして調製した赤血球浮遊液を 53°C で 30 分間 incubate し、以後同様の方法で高温による溶血に対する各検体の作用を検討した。

(2) 毛細血管透過性亢進に対する作用：Kostar ら¹⁶⁾の方法に従って、マウスの腹腔内毛細血管の透過性を亢進させ、各検体の作用を検討した。すなわち、前もって 18 時間絶食させた体重 20 g 前後の ddY 系雄性マウスに検体を経口的に投与し、投与 30 分後に、4 % pontamine sky blue を含む生理的食塩水を 0.1 ml/10 g 体重静注した。静注 5 分後に腹腔内に 0.1 ml/10 g 体重の 0.6 % 酢酸溶液を注射して毛細血管の透過性を亢進させた。20 分経過後、マウスを断頭瀉血致死させ、腹腔内を 10 ml の蒸留水で灌流して腹腔内容物を集めた。この灌流液に 0.1 ml の 0.1 N NaOH を加えて遠心し、590 nm における吸光度を測定した。水投与群（コントロール群）と各検体投与群の吸光度から各検体による抑制率を算出した。なお、対照薬としては indomethacin を用いた。

(3) Carrageenan による足蹠浮腫誘導に対する作用：前もって 18 時間絶食させた Wistar 系雄性ラット（体重 120～140 g）に検体を経口的に投与し、1 時間後に Winter ら¹²⁾の方法に従って 1 % carrageenan 生理食塩水溶液 0.1 ml を一側後肢足蹠皮下に注射して浮腫を誘導した。以後、経時的に足蹠の容積を測定し、carrageenan 溶液注射直前の足蹠の容積との比率から腫脹率を算出した。対照薬としては indomethacin を用いた。

(4) 化学分析：鶏胆汁末中の総胆汁酸、コレステロール、脂肪酸、リン脂質、全糖、蛋白質および胆汁色素（biliverdin および bilirubin）の含量はそれぞれ Table VI に示した方法で定量した。

(5) 統計学的処理：実験値は平均値±標準誤差で示し、有意差検定は、Dunnet^{17,18)}および Scheffe¹⁹⁾

の方法に基づいて樹立された Yamazaki ら²⁰⁾の ASSIT 法を用いて行った。

結 果

1. 鶏胆汁末の抗アレルギー作用および抗炎症作用の検討

I 型アレルギー実験モデルに対する作用

Compound 48/80 で肥満細胞を刺激する際に 500 または 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の鶏胆汁末を添加すると、Table I に示すように、ヒスタミンの遊離は明らかに抑制された。しかし、その抑制率は対照薬として用いた DSCG の約 1/5 程度であった。

また、漏出色素量を指標として卵白アルブミンを用いたラット PCA 反応を測定する実験系で、Evans blue 液静注 1 時間前に鶏胆汁末を経口的に投与してその影響を検討した結果、Table II に示すように、PCA 反応は 500 mg/kg 体重の投与によって有意に抑制された。

Table I Inhibitory effect of chicken bile on compound 48/80-induced histamine release from rat peritoneal mast cells.

Treatment	Concn. ($\mu\text{g/ml}$)	Release (%)	Inhibition (%)
Control	—	84.0 ± 0.7	—
Chicken bile	500	73.0 ± 0.2	15.4
	1000	61.5 ± 0.2	28.9
DSCG ^{a)}	500	29.2 ± 0.1	70.4

Each value represents mean $\pm$ s.e. of 5 experiments. Spontaneous histamine release (%) was 6.2 ± 0.1 .

a) Disodium cromoglycate.

Table II Inhibitory effect of chicken bile on 48 hr homologous PCA in rats.

Treatment (p.o.)	Dose (mg/kg)	Amount of dye ($\mu\text{g/site}$)	Inhibition (%)
Control ^{a)}	—	8.80 ± 1.21	—
Chicken bile	100	6.93 ± 1.65	21.3
	500	$4.73 \pm 1.10^b)$	46.3

The test drug, suspended in distilled water, was orally given 1 hr before the challenge. Each group consisted of 10 animals (mean $\pm$ s.e.). a) Distilled water was orally administered at 2 ml/kg. b) Significantly different from the control group at $p < 0.01$.

II 型アレルギー実験モデルに対する作用

補体結合反応による SRBC 免疫溶血反応において SRBC に抗 SRBC 抗血清を加えると同時に鶏胆汁末を添加し、ついで補体を添加した。Table III に示すように、鶏胆汁末は添加濃度に依存して顕著な溶血抑制効果を示した。また、低張溶液中に SRBC をさらした時にみられる溶血反応も鶏

Table III Inhibitory effect of chicken bile on complement-dependent cytotoxicity of SRBC.

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Complement-dependent cytotoxicity	Hypotonic cytotoxicity
		Hemolysis (%)	Hemolysis (%)
Control	—	69.65 ± 0.68	64.98 ± 1.33
Chicken bile	20	61.57 ± 0.36	56.49 ± 0.42
	100	13.74 ± 0.66	48.69 ± 0.30
	500	3.15 ± 0.00	44.04 ± 0.41
SC ^{a)}	1000	2.10 ± 0.12	38.24 ± 0.55
	5000	0.00 ± 0.00	19.66 ± 0.31

Each value represents mean $\pm$ s.e. of 5 experiments. a) Sodium citrate.

胆汁末の添加によって軽度ながら抑制された。これらの溶血反応抑制作用は対照薬として用いた sodium citrate のそれに匹敵するものと推測された (Table III)。

IV型アレルギー実験モデルに対する作用

Picryl chloride 感作マウスの耳に picryl chloride を塗布して遅延型接触性皮膚炎を誘導すると、塗布24時間後における耳の厚さはコントロール群で平均98%程度増加した。この実験において、鶏胆汁末を picryl chloride 塗布直前および16時間後に経口的に投与し、picryl chloride 塗布24時間後の耳の厚さの増加を計測した。その結果、Fig. 1 に示すように、鶏胆汁末 (20~500 mg/kg) 投与群と非投与対照群との間には有意な差が認められなかった。

また、マウスの SRBC に対する遅延型過敏症反応による腫脹率はコントロール群で平均47%程度であった。Fig. 2 に示すように、この浮腫の程度は SRBC を足跡皮内に注射する直前および16時間後に鶏胆汁末を経口投与してもほとんど変化がなかった。

その他の実験モデルに対する作用

前述のように、SRBC の低張液における溶血反応は鶏胆汁末の添加によって軽度に抑制されたが、ラットの赤血球を低張液にさらして溶血を起こしたときに 500 $\mu\text{g/ml}$ まで鶏胆汁末を加えても、Table IV に示すように、溶血にはほとんど影響を与えなかった。また、ラットの赤血球を53℃で30分間加熱する場合に誘導される溶血反応は 100 $\mu\text{g/ml}$ までの鶏胆汁末添加で抑制されたが、500 $\mu\text{g/ml}$ の添加ではかえって溶血反応が亢進した (Table IV)。

また、Fig. 3 および Fig. 4 に示すように、酢酸により誘導されるマウス毛細血管透過性亢進および carrageenan 注射によるラット足跡浮腫反応に対して、鶏胆汁末は 500 mg/kg までの経口投与で有意な抑制作用は示さなかった。

上記の鶏胆汁末についての実験結果を Table V

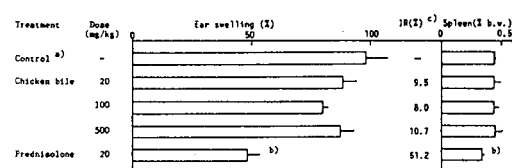


Fig. 1 Inhibitory effect of chicken bile on picryl chloride-induced contact dermatitis in mice.

Each test drug, suspended in distilled water, was given orally immediately before and 16 hr after challenge with picryl chloride. Each group consisted of 10 animals (mean $\pm$ s.e.). a) Distilled water was given orally at 20 ml/kg. b) Significantly different from the control group at $p < 0.01$. c) Inhibition rate.

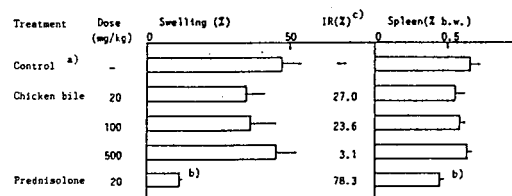


Fig. 2 Inhibitory effect of chicken bile on SRBC-induced delayed-type hypersensitivity in mice.

Each test drug, suspended in distilled water, was given orally immediately before and 16 hr after challenge with SRBC. Each test group consisted of 10 animals (mean $\pm$ s.e.). a) Distilled water was given orally at 20 ml/kg. b) Significantly different from the control group at $p < 0.01$. c) Inhibition rate.

にまとめた。

2. 活性成分の検討

鶏胆汁末の分析結果を Table VI に示した。胆汁酸、リン脂質および蛋白質が大部分を占め、bilirubin は検出されず、biliverdin が存在するのが特徴である。活性成分を検討するため、まず、鶏胆汁末

Table IV Inhibitory effect of chicken bile on hypotonic and hyperthermic cytolysis of rat erythrocytes.

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Hypotonic cytolysis	Hyperthermic cytolysis
		Hemolysis (%)	Hemolysis (%)
Control	—	80.44 ± 0.78	60.93 ± 2.07
Chicken bile	20	78.25 ± 1.04	40.04 ± 3.66
	100	73.59 ± 0.53	10.23 ± 0.04
	500	79.48 ± 0.69	97.60 ± 0.22

Each value represents mean $\pm$ s.e. of 5 experiments.

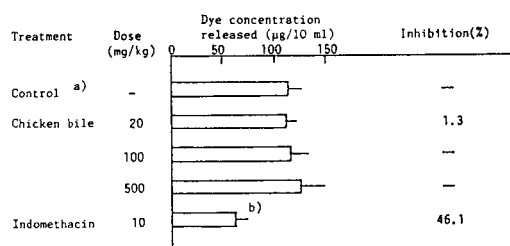


Fig. 3 Inhibitory effect of chicken bile on vascular permeability increase induced by acetic acid in mice.

Each test drug was given orally to mice 30 min before the intravenous injection of pontamine sky blue. Five minutes after the dye injection, acetic acid was injected intraperitoneally. Each group consisted of 10 animals (mean $\pm$ s.e.). a) Distilled water was given orally at 20 ml/kg. b) Significantly different from the control group at $p < 0.05$.

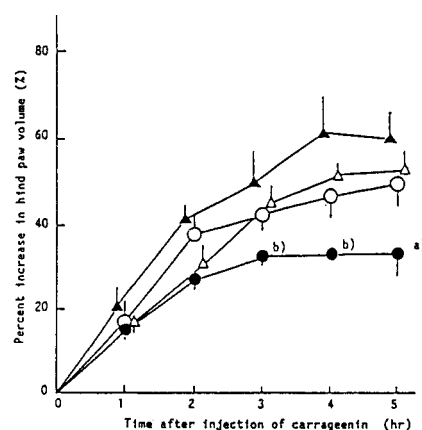


Fig. 4 Inhibitory effect of chicken bile on carrageenan-induced hind paw edema in rats.

Rats were injected subcutaneously with carrageenan 1 hr after the oral administration of test drugs. Each group consisted of 10 animals (mean $\pm$ s.e.).

a), b) : Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. $\circ$ Control 2 ml/kg *p.o.*, $\triangle$ Chicken Bile 100 mg/kg *p.o.*, $\blacktriangle$ Chicken Bile 500 mg/kg *p.o.*, $\bullet$ Indomethacin 10 mg/kg *p.o.*

Table V Anti-allergic and anti-inflammatory effects of lyophilized chicken bile.

	Inhibitory effect
Type-I allergic models	
(1) Compound 48/80-induced histamine release from rat peritoneal mast cells (<i>in vitro</i>)	+
(2) Passive cutaneous anaphylaxis in rats (<i>p.o.</i>)	+
Type-II allergic model	
(3) Complement-dependent cytolysis of SRBC (<i>in vitro</i>)	+
Type-IV allergic models	
(4) Picryl chloride-induced contact dermatitis in mice (<i>p.o.</i>)	—
(5) SRBC-induced DTH in mice (<i>p.o.</i>)	—
Inflammation	
(6) Hypotonic or hyperthermic cytolysis of rat erythrocytes (<i>in vitro</i>)	$\pm$
(7) Acetic acid-induced vascular permeability increase in mice (<i>p.o.</i>)	—
(8) Carrageenan-induced hind paw edema in rats (<i>p.o.</i>)	—

p.o. : *per os*

Table VI Analysis of lyophilized chicken bile ([CB]).

	(mg/g)
Total bile acid ^{a)}	404
Cholesterol ^{b)}	9
Fatty acid ^{c)}	4
Phospholipid ^{d)}	298
Total sugar ^{e)}	12
Protein ^{f)}	144
Biliverdin (Bile pigment) ^{g)}	2
Bilirubin (Bile pigment) ^{h)}	<0.01

a) Enzyme method.

b) *o*-Phthalaldehyde method.

c) Bathocuproine method.

d) Molybdenum blue method.

e) Phenol-sulfate method.

f) Lowry method.

g) HPLC method.

h) Alkali-azo bilirubin method.

の構成成分と考えられる TCA, TCDCA (以上胆汁酸類) および biliverdin (胆汁色素) について鶏胆汁末で抑制効果の認められた I, II 型アレルギーの *in vitro* 実験モデルに対する作用を検討した。

Compound 48/80 によるラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する抑制作用を指標に鶏胆汁末の 3 種の構成成分の活性を検討したところ, biliverdin のみに顕著な抑制活性が認められた (Table VII)。100 μ g/ml の biliverdin を compound 48/80 と同時に肥満細胞に添加すると, ヒスタミン遊離反応は顕著に抑制され, 500 μ g/ml の添加ではほぼ完全に抑制された。これに反して, TCA および TCDCA にはそのような作用がなく, 反応液中に dimethyl sulfoxide が存在するこの実験では, 鶏胆汁末による抑制効果は低下する傾向を示した。なお, biliverdin 100 μ g/ml の作用は DSCG 500 μ g/ml の作用より強かった。

一方, SRBC 免疫溶血反応に対する 3 種の成分の抑制活性を検討したところ, biliverdin に最も強い抑制作用が認められた (Table VIII)。Biliverdin は, 鶏胆汁末および対照薬として用いた sodium citrate のそれぞれ 1/5, 1/10 の濃度で同程度の抑制を示した。また, この反応に対しては, TCDCA, TCA にも軽度の抑制活性が認められた。

さらに, 上記の *in vitro* 実験モデルにおいて顕著な抑制活性を示した biliverdin について, *in vivo* モデルを中心に他の I および II 型アレルギー実験モデルに対する作用を検討した。

まず, ラット 48 時間 homologous PCA 反応に対する作用を検討したところ, biliverdin は経口投与量に依存して同反応を抑制し, 20 mg/kg の投与に

Table VII Inhibitory effect of chicken bile components on compound 48/80-induced histamine release from rat peritoneal mast cells.

Treatment	Concn. (μ g/ml)	Release (%)	Inhibition (%)
Control	—	87.9 $\pm$ 1.6	—
Chicken bile	100	89.4 $\pm$ 1.0	—
	500	83.1 $\pm$ 1.3	5.1
Biliverdin	100	41.9 $\pm$ 0.7	54.6
	500	5.6 $\pm$ 0.7	98.3
TCA ^{a)}	100	90.0 $\pm$ 0.4	—
	500	90.0 $\pm$ 2.2	—
TCDCA ^{b)}	100	92.8 $\pm$ 0.7	—
	500	94.4 $\pm$ 0.7	—
DSCG ^{c)}	500	57.6 $\pm$ 0.6	35.7

Each value represents mean $\pm$ s.e. of 5 experiments. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to buffer solution (0.5%, final concn.). Spontaneous histamine release (%) was 4.1 $\pm$ 0.1. a) Taurocholic acid (sodium salt). b) Taurochenodeoxycholic acid (sodium salt). c) Disodium cromoglycate.

Table VIII Inhibitory effect of chicken bile components on complement-dependent cytotoxicity of SRBC.

Treatment	Concentration (μ g/ml)	Complement-dependent cytotoxicity Hemolysis (%)
Control	—	71.92 $\pm$ 0.78
Chicken bile	20	67.17 $\pm$ 1.72
	100	50.40 $\pm$ 0.41
	500	3.24 $\pm$ 0.21
Biliverdin	4	64.24 $\pm$ 1.68
	20	13.85 $\pm$ 0.99
	100	6.20 $\pm$ 0.26
TCA ^{a)}	20	66.77 $\pm$ 1.50
	100	61.28 $\pm$ 0.48
	500	41.37 $\pm$ 0.24
TCDCA ^{b)}	20	62.32 $\pm$ 0.89
	100	42.31 $\pm$ 0.76
	500	8.86 $\pm$ 0.24
SC ^{c)}	500	56.86 $\pm$ 1.59
	1000	4.24 $\pm$ 0.12

Each value represents mean $\pm$ s.e. of 5 experiments. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to buffer solution (1.25%, final concn.).

a) Taurocholic acid (sodium salt), b) Taurochenodeoxycholic acid (sodium salt), c) Sodium citrate

よって有意な抑制を示した (Fig. 5)。また, 卵白アルブミンを抗原とした抗原抗体反応によるラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離反応に対しても, biliverdin は添加濃度に依存して強い抑制作用を示し, 100 μ g/ml の添加によって DSCG 500 μ g/ml に近いヒスタミン遊離の抑制を認めた (Table IX)。

次に, II 型アレルギーの *in vivo* 実験モデルと考えられているモルモット Forssman anaphylaxis 反応および抗血清により誘発されるラット足趾浮腫反応に対する biliverdin の抑制作用についても検討した。モルモット Forssman anaphylaxis 反応モデルにおいて, biliverdin を Forssman 抗血清注射の

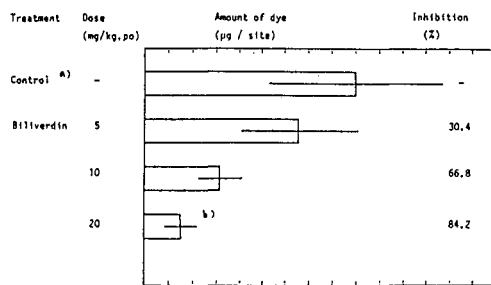


Fig. 5 Inhibitory effect of biliverdin on induction of PCA in rats.

The test drug, suspended in distilled water, was given orally 1 hr before the intravenous injection of Evans Blue. Each group consisted of 5-8 animals (mean $\pm$ s.e.). a) Distilled water was given orally at 20 ml/kg. b) Significantly different from the control group at $p < 0.05$.

Table IX Inhibitory effect of biliverdin on ovalbumin-induced histamine release from sensitized rat peritoneal mast cells.

Treatment	Concn. (μ g/ml)	Release (%)	Inhibition (%)
Control	—	85.5 $\pm$ 1.9	—
Biliverdin	20	64.2 $\pm$ 2.0	27.8
	100	48.0 $\pm$ 1.3	49.0
	500	31.8 $\pm$ 0.3	70.2
DSCG ^{a)}	500	43.2 $\pm$ 2.4	55.3

Each value represents mean $\pm$ s.e. of 3 experiments. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to buffer solution. (0.5%, final concn.) Spontaneous histamine release (%) was 9.0 $\pm$ 0.3. a) Disodium cromoglycate.

2分前に静注すると、Fig. 6に示すように、5 mg/kgを投与することによって、モルモットの24時間生存率ならびに死亡に至るまでの時間を有意に増大させ、その作用は対照薬として用いた flufenamic acid より強かった。しかし、鶏胆汁末および低濃度の biliverdin 投与によっては生存率の上昇は認められなかった。このような Forssman anaphylaxis をモルモットに誘導する際、biliverdin を経口的に投与し、その影響を観察したところ、Fig. 7に示すように、5および50 mg/kgの投与により24時間生存率の上昇とともに生存時間の延長が認められ、その効果は対照として用いた flufenamic acid より大きかった。また、ラット足蹠皮下に家兔抗ラット血清を注射すると、浮腫が誘導される。この浮腫反応を抗血清注射後5時間まで経時的に測定すると、Fig. 8に示すように、抗血清注射2時間後に浮腫が顕著になり、3時間後に最高に達し、以後徐々に軽減した。この抗血清注射2分前に1 mg/kg または5 mg/kg の biliverdin を静注してその影響を検討

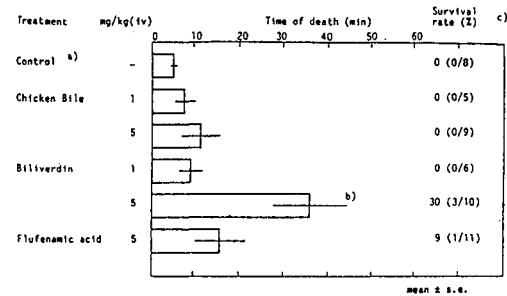


Fig. 6 Inhibitory effect of Chicken Bile and biliverdin on Forssman anaphylaxis in guinea pigs. (1)

Each test drug, suspended in saline, was injected intravenously 2 min before the intravenous injection of Forssman antiserum.

a) Saline was injected intravenously at 1 ml/kg. b) Significantly different from the control group at $p < 0.01$. c) Numbers in parentheses refer to number of animals survived/total.

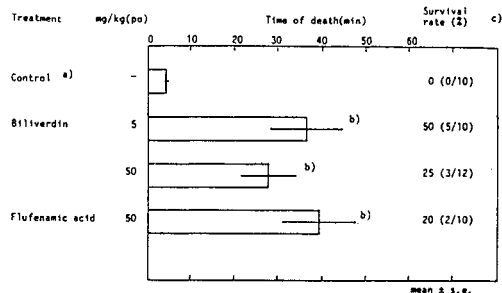


Fig. 7 Inhibitory effect of biliverdin on Forssman anaphylaxis in guinea pigs. (2)

Each test drug, suspended in distilled water, was given orally 1 hr before the intravenous injection of Forssman antiserum.

a) Distilled water was given orally at 2 ml/kg. b) Significantly different from the control group at $p < 0.01$. c) Numbers in parentheses refer to number of animals survived/total.

すると、Fig. 8に示すように、5 mg/kg の biliverdin の投与によって足蹠浮腫反応は有意に抑制され、その効果は5 mg/kg の flufenamic acid とほぼ同等であった。また、抗血清注射1時間前に前記の10倍量の biliverdin を経口的に投与してその影響をみたところ、Fig. 9に示すように、biliverdin は経口投与によっても、flufenamic acid と同程度の抑制作用を示すことが認められた。

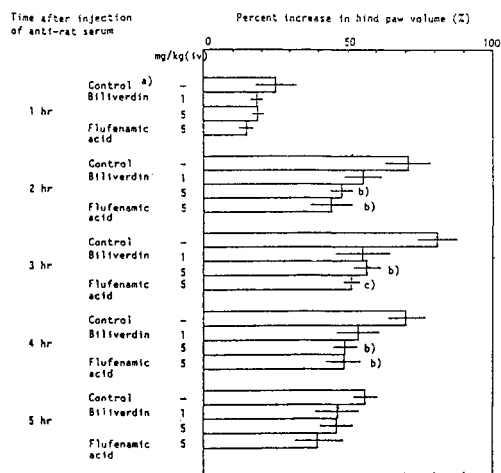


Fig. 8 Inhibitory effect of biliverdin on rat hind paw edema induced by antiserum. (1)

Each test drug, suspended in saline, was injected intravenously 2 min before the subcutaneous injection of antiserum. Each group consisted of 5 animals (mean $\pm$ s.e.).

a) Saline was injected intravenously at 1 ml/kg.

b), c) ; Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

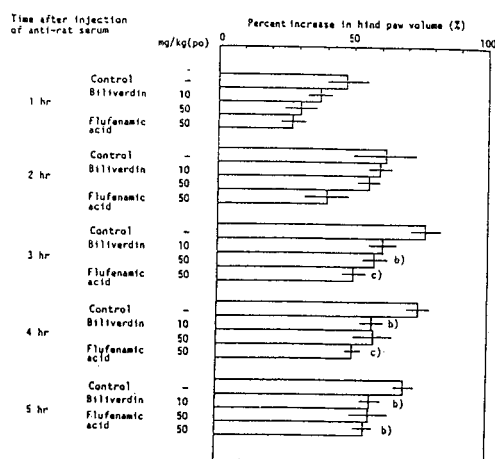


Fig. 9 Inhibitory effect of biliverdin on rat hind paw edema induced by antiserum. (2)

Each test drug, suspended in distilled water, was given orally 1 hr before the subcutaneous injection of antiserum. Each group consisted of 5 animals (mean $\pm$ s.e.).

a) ; Distilled water was given orally at 2 ml/kg.

b), c) ; Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

考 察

東洋医学的民間療法において、鶏胆汁乾燥物が鎮咳作用など抗過敏症的効能を期待して使用されてきたことに着目し、その薬理学的解明を目的として、主として実験的アレルギー疾患モデルに対する作用について検討した。

鶏胆汁末には、I およびII型アレルギー実験モデルにおいて顕著な抑制効果がみられたが、遅延型アレルギー実験モデル、低張または加熱によるラット赤血球の溶血、実験的マウス毛細血管透過性の亢進ならびにラットにおけるカラゲニン浮腫の誘導に対しては有効性が認められなかった。この結果より、以後の活性成分の検討はI およびII型アレルギー実験モデルを指標として行った。

熊胆 (*Fel ursi*) や牛黄 (*Bezoar bovis*) に代表される胆汁生薬のさまざまな薬効は、主として胆汁の主成分のひとつである各種胆汁酸の薬理作用から研究されてきた²¹⁾したがって、本研究において、鶏胆汁末に認められた抗アレルギー活性の活性本体を検討するにあたり、まず、鶏胆汁末中に存在する胆汁酸類に着目した。供試胆汁酸類として、難波ら²²⁾の鶏胆汁中の胆汁酸組成に関する報告に従い、TCA および TCDCA を用いた。一方、予備試験により、SRBC 免疫溶血反応がゲル濾過法 (使用ゲル: Sephadex G-50) によって鶏胆汁から分離した biliverdin を含む分画で顕著に抑制されることを認めたこと (data not shown) から、biliverdin の作用についても検討した。その結果、TCA および TCDCA は SRBC 免疫溶血反応において、弱い抑制活性を示したものの (Table VIII), compound 48/80 によるラット肥満細胞からのヒスタミン遊離反応に対しては、まったく無効であった (Table VII)。Biliverdin は両反応とも顕著に抑制することから、さらに *in vivo* モデルを中心に他の I およびII型アレルギー実験モデルについて検討したところ、試験したすべてのモデルで有効性が認められた。これらの結果より、生薬“鶏胆汁乾燥物”の鎮咳作用に代表される抗過敏症的効能は、主に biliverdin の作用によるものであると考えられる。しかしながら、鶏胆汁末の主成分である胆汁酸類については、ある程度の生体膜安定化作用を持つこと (Table VIII) や、その界面活性作用により難溶性の biliverdin を可溶化して生体への吸収を高めることなどが考えられることから、生薬の構成要素として意義のあるものと思われる。

生体における胆汁色素の最大の意義は、ヘモグロビン代謝産物の排泄であると考えられ、それ以外の機能または作用に関してはほとんど顧みられなかった。最近、Stocker ら²³⁻²⁶⁾ は、biliverdin が生体内で抗酸化剤として働き、炎症反応で形成された活性酸素による組織障害を抑制する可能性を示唆している。また、森下らは牛黄と人参から構成されている霊黄参が四塩化炭素、*d*-galactosamine および α -naphthylisothiocyanate によって誘発されるラット肝障害を抑制することを報告し、その作用は肝臓の微小循環の充進や活性酸素産生の抑制などによる可能性が強いことを示唆している。²⁷⁾ 彼らは hypoxanthine-xanthine oxidase によって作られる superoxide anion を指標として霊黄参、bilirubin および superoxide dismutase の作用を検討しているが、その結果は superoxide anion の産生ないしそれによる組織障害が胆汁成分によって抑制されることを示唆するに十分である。炎症性反応の誘導や修飾に oxygen radical が関与することは知られているので、²⁸⁾ biliverdin の抗炎症作用ないし抗アレルギー作用は oxygen radical との関連で検討すべきであると考えられる。一方、胆汁色素 bilirubin には、赤血球、^{29,30)} ミトコンドリア膜、³¹⁾ リン脂質二重膜³²⁻³⁵⁾ あるいはガングリオシド^{36,37)} などとの間で相互作用のみられることが報告されている。本研究で biliverdin に認められた肥満細胞からのヒスタミン遊離や SRBC の免疫溶血反応の抑制は、bilirubin にみられるような細胞膜脂質構造への作用と関係があるのかもしれない。

今後、biliverdin のほか、抗酸化作用が報告されている conjugated bilirubin²⁶⁾ をはじめとして、他のテトラピロール誘導体についても検討を加え、その作用機構を比較したいと考えている。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、懇切な御指導、御校閲を賜りました大阪市立大学医学部・森澤成司教授に深謝いたします。さらに、研究の各段階で貴重なる御教示を賜りました近畿大学薬学部・久保道徳教授ならびに大阪市立環境科学研究所・森田茂博士、亀井正治博士に心より感謝いたします。また、この研究を終始ご支援頂きました日本ハム(株)中央研究所・太治司郎所長ならびに共同研究者・山崎暢氏に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) “中薬大辞典”(江蘇医学院編)上海人民出版社, 上海, 1977.
- 2) Gao, S., Dai, D., Fan, Q. and Den, M.: “Chang Jian Yao Yong Dong Wu (常見薬用動物),” Shanghai Ke Xue Ji Publisher, Shanghai, 1984.
- 3) Ji, J. and Zhao, Y.: “Shandong Yao Yong Wu (山東薬用動物),” Shandong Ke Xue Ji Shu Publisher, Jinan, 1979.
- 4) Uvnäs, B. and Thon, I.L.: Isolation of biologically intact mast cells. *Exp. Cell. Res.* **18**, 512-520, 1959.
- 5) Uvnäs, B. and Thon, I.L.: Evidence for enzymatic histamine release from isolated rat mast cells. *Exp. Cell. Res.* **23**, 45-57, 1961.
- 6) Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohn, V.H.: A method for the fluorometric assay of histamine in tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**, 182-186, 1959.
- 7) Stotland, L.M. and Share, N.N.: Active bronchial anaphylaxis in the rat. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* **52**, 1114-1118, 1974.
- 8) Katayama, S., Shinoya, H. and Ohtake, S.: A new method for extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* **22**, 89-101, 1978.
- 9) Mayer, M.M. and Kabat, E.A.: “Experimental Immunochimistry, 2nd Ed.,” C.C. Thomas Publ., Springfield, Illinois, p. 133, 1961.
- 10) Inglot, A.D. and Wolna, E.: Reactions of non-steroidal anti-inflammatory drugs with the erythrocyte membrane. *Biochem. Pharmacol.* **17**, 269-279, 1969.
- 11) Pelczarska, A.B. and Roszkowski, A.P.: Inhibitors of Forssman guinea pig anaphylaxis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **185**, 116-126, 1973.
- 12) Winter, C.A., Risley, E.A. and Nuss, G.W.: Carrageenin-induced edema in hind paw the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**, 544-547, 1962.
- 13) Asherson, G.L. and Dtak, W.: Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. *Immunology* **15**, 405-416, 1968.
- 14) Kettman, J.R.: Modulation of the acquisition and expression of immunity by tilorone: I. Delayed-type hypersensitivity responses. *Immunopharmacol.* **1**, 21-28, 1978.
- 15) Glenn, E.M. and Bowman, B.J.: In vitro effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NAIFD). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **130**, 1327-1332, 1969.
- 16) Kostar, R., Anderson, M. and Dobber, E.J. Fed.: Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* **18**, 412, 1958.
- 17) Dunnett, C.W.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am.*

- Statist. Assoc.* **50**, 1096-1121, 1955.
- 18) Dunnett, C.W. : New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* **20**, 482-491, 1964.
- 19) Scheffe, H. : A method for judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrika* **40**, 87-104, 1953.
- 20) Yamazaki, M., Noguchi, Y., Tanda, M. and Shintani, S. : Statistical methods for multiple comparisons of treatment groups with control. *J. Takeda Res. Lab.* **40**, 163-187, 1981.
- 21) “動物成分利用集成 (陸産動物篇)” (奥山 隆編) R&D プランニング, 東京, p. 450, 1987.
- 22) 難波恒雄, 布目鎮勇, 服部征雄, 東館 栄, 前窪哲也 : 生薬の品質評価に関する基礎研究 (第7報) 各種動物胆について その1. 薬学雑誌 **102**, 760-767, 1982.
- 23) Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N. and Ames, B.N. : Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**, 1043-1046, 1987.
- 24) Stocker, R., Glazer, A.N. and Ames, B.N. : Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5918-5922, 1987.
- 25) Stocker, R. and Ames, B.N. : Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8130-8134, 1987.
- 26) Stocker, R. and Peperhans, E. : Antioxidant properties of conjugated bilirubin and biliverdin : Biologically relevant scavenging of hypochlorous acid. *Free Rad. Res. Comms.* **6** (1) 57-66, 1989.
- 27) 森下信一, 斎藤 隆, 庄司政満, 田中 陽, 佐伯久美, 伊藤千尋 : 牛黄, 人參製剤靈黄參の薬理作用 (第2報) 実験的肝障害及び肝機能に対する作用. 日薬理誌 **93**, 261-270, 1989.
- 28) Fantone, J.C. and Ward, P.A. : Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Amer. J. Pathol.* **107**, 397-418, 1982.
- 29) Sato, H. and Kashiwamata, S. : Interaction of bilirubin with human erythrocyte membranes. *Biochem. J.* **210**, 489-496, 1983.
- 30) Glushko, V., Thaler, M. and Ros, M. : The fluorescence of bilirubin upon interaction with human erythrocyte ghosts. *Biochim. Biophys. Acta* **719**, 65-73, 1982.
- 31) Mustafá, M.G. and King, T.E. : Binding of bilirubin with lipid. *J. Biol. Chem.* **245**, 1084-1089, 1970.
- 32) Nagaoka, S. and Cowger, M.L. : Interaction of bilirubin with lipids studied by fluorescence quenching method. *J. Biol. Chem.* **253**, 2005-2011, 1978.
- 33) Brodersen, R. : Bilirubin : Solubility and interaction with albumin and phospholipid. *J. Biol. Chem.* **254**, 2364-2369, 1979.
- 34) Tipping, E., Ketterer, B. and Christodoulides, L. : Interaction of small molecules with phospholipid bilayers. *Biochem. J.* **180**, 327-337, 1979.
- 35) Eriksen, E.F., Danielsen, H. and Brodersen, R. : Bilirubin - liposome interaction : Binding of bilirubin dianion, protonization and aggregation of bilirubin acid. *J. Biol. Chem.* **256**, 4269-4274, 1981.
- 36) Weil, M.L. and Menkes, J.H. : Bilirubin interaction with ganglioside : Possible mechanism in Kernicterus. *Pediat. Res.* **9**, 791-793, 1975.
- 37) Vázquez, J., Ortega, G., Valdivieso, F. and Mayor, F. Jr. : Interaction of bilirubin with gangliosides. *J. Biochem.* **106**, 139-142, 1989.