

ハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の
抗アレルギー作用に関する研究

県立広島大学大学院
総合学術研究科
生命システム科学専攻

博 士 論 文

平成 28 年 3 月
(2016 年)

森 下 雄 太

目次

第一章 緒言

第一節 生体内における免疫反応とアレルギー	1
第一項 生体異物に対する免疫反応	1
第二項 アレルゲンとアレルギーについて	3
第三項 医薬品による I 型アレルギー抑制	5
第四項 食品成分によるアレルギー抑制	8
第二節 アレルギー疾患のメカニズム	8
第一項 アレルギー疾患における細胞内シグナル伝達	8
第二項 I 型アレルギーの細胞内シグナル伝達	10
第三項 RBL-2H3 細胞（好塩基球）と肥満細胞の差異	11
第四節 本研究について	12

第二章 ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の単離・精製

第一節 序論	14
第二節 材料および方法	17
第一項 脱顆粒抑制物質の単離・精製	17
第二項 細胞培養	18
第三項 β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性試験	19
第四項 WST-1 法による細胞障害性試験	22
第五項 β -グルクロニダーゼによる ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の加水分解	23
第六項 統計処理	24
第三節 実験結果	24
第一項 脱顆粒抑制物質の単離・精製	24
第二項 ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の構造解析	31
第三項 β -グルクロニダーゼによるホウレンソウ由来 脱顆粒抑制物質 SO-1 の加水分解と生成物の単離	36
第四項 脱顆粒抑制物質 SO-1 のアグリコンの脱顆粒抑制活性	40

第五項	脱顆粒抑制物質 SO-1 のアグリコンの細胞障害性	41
第四節	小括	42
第三章	ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の 細胞内シグナル伝達における作用メカニズムの解析	
第一節	序論	45
第二節	材料および方法	47
第一項	タンパク回収	47
第二項	Bradford によるタンパク定量	48
第三項	Western blotting による細胞内シグナル伝達の解析	49
第四項	細胞内 Ca ²⁺ 動態の測定	50
第五項	統計処理	51
第三節	実験結果	52
第一項	Western blotting による細胞内シグナル伝達分子の リン酸化の解析	52
第二項	ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の 細胞内 Ca ²⁺ 動態に及ぼす影響	54
第四節	小括	55
第四章	ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の マウスにおける抗アレルギー活性の評価	
第一節	序論	56
第二節	材料および方法	57
第一項	受動皮膚アナフィラキシー反応における SO-1 および SO-1 アグリコンの作用	57
第二項	ヒスタミンとセロトニンによる血管透過性亢進作用 に対する SO-1 および SO-1 アグリコンの作用	60
第三項	統計処理	60
第三節	実験結果	61
第一項	受動皮膚アナフィラキシー反応における SO-1 および SO-1 アグリコンの作用	61

第二項	ヒスタミンとセロトニンによる血管透過性亢進作用 における SO-1 および SO-1 アグリコンの作用	63
第四節	小括	64
第五章	ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の抗酸化活性および 脱顆粒抑制に対する影響	
第一節	序論	65
第二節	材料および方法	67
第一項	試料調製	67
第二項	DPPH ラジカル消去活性の測定法	67
第三項	スーパーオキシドアニオン消去活性の測定法	68
第四項	脱顆粒抑制活性の測定法	69
第五項	統計処理	69
第三節	実験結果	70
第一項	ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質および 既知フラボノイドのスーパーオキシドアニオン消去活性 および DPPH ラジカル消去活性	70
第二項	ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質および 既知フラボノイドの脱顆粒抑制活性	73
第四節	小括	76
第六章	総括	78
	謝辞	81
	参考文献	82

略語一覽

ADP: adenosine 5'-diphosphate

ATP: adenosine 5'-triphosphate

BSA: bovine serum albumin

DMSO: dimethyl sulfoxide

DMEM: dulbecco's modified eagle's medium

DNP-HSA: dinitrophenylated human serum albumin

DPPH: diphenylpicrylhydrazyl

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FBS: fetal bovine serum

FcεRI: fc epsilon receptor I

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Th: helper T-cell

IFN-γ; interferon-γ

IL: interleukin

Ig: immune globulin

IP3: inositol trisphosphate

ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

JAK: janus kinase

Lyn: tyrosine-protein kinase Lyn

MEM: minimum essential medium

MHC: major histocompatibility complex

MyD88: myeloid differentiation factor 88

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase

Nfil3: basic leucine zipper transcriptional regulator

NF-κB: nuclear factor-kappa B

OVA: ovalbumin

PCA: passive cutaneous anaphylaxis

PGE2: prostaglandin E2

PPIS: protease and phosphatase inhibitor solution

PVDF: polyvinylidene difluoride

RBL-2H3: rat cell line derived from basophilic leukemia cells

ROS: reactive oxygen species

SH2: src-homology 2

SOD: superoxide dismutase

Syk: spleen tyrosine kinase

TCR: T-cell receptor

TGF- β : transforming growth factor β

TLR: toll-like receptor

Treg: regulatory T-cell

Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid

第一章 緒言

第一節 生体内における免疫反応とアレルギー

第一項 生体異物に対する免疫反応

免疫反応は細菌やウイルスなどの病原体をはじめとする生体異物の生体への侵入に対して起こる防御反応である。自然免疫と獲得免疫に分類され、自然免疫は非特異的な生体異物に対する反応であり、獲得免疫は特異的な生体異物に対する反応（免疫学的記憶の成立）である。なかでも獲得免疫は病原体（抗原）が繰り返し侵入した場合に強い防御反応（二度なし現象）を示す（1）。例えば、生体内に侵入した異物は、まずマクロファージや樹状細胞の細胞膜表面にある Toll 様受容体群（toll-like receptor; TLR）により異物と認識される。次に異物を認識したマクロファージや樹状細胞から種々のケモカインや炎症性サイトカイン、脂質メディエーターを放出することにより、血管の拡張に伴う血流増加や好中球などの細胞が集まる。集まった樹状細胞やマクロファージは非特異的に貪食能を示し、自然免疫と呼ばれる（1）。これに続く獲得免疫はさらに複雑かつ高度に制御されている。異物を貪食した樹状細胞やマクロファージは細胞内でリソソームによる分解を経て、異物の断片（エピトープ）を主要組織適合抗原（major histocompatibility complex; MHC）クラス II 分子と共に細胞表面に提示する。そして、提示された抗原はナイーブ T 細胞の細胞膜表面にある T 細胞受容体（T-cell receptor; TCR）により認識され、ナイーブ T 細胞を活性化する。活性化したナイーブ T 細胞は細胞環境のサイトカインにより、種々の免疫細胞に分化する。この分化に関与するサイトカインは、異物を認識したマクロファージや樹状細胞から放出される。例えば、インターロイキン 6（interleukin-6; IL-6）や IL-12、インターフェロン γ （interferon- γ ; IFN- γ ）などにより、ヘルパー T 細胞（helper T-cell; Th）、制御性 T 細胞（regulatory T-cell; Treg）に分化する（1,2）。分化に関わるサイトカイン及び脂質メディエーターを Table 1 に示す。分化した Th1 や Th2、Th17、Treg はそれぞれサイトカインを分泌し、B 細胞や上皮細胞、血管内皮細胞の機能や各箇所での炎症を制御する。Th1 は IFN- γ と IL-2 を放出し、マクロファージや

樹状細胞などの貪食細胞を活性化する (3~5)。また IgM から IgG へのクラススイッチの役割を果たす。また Th2 は IL-4、5、13 を放出し、B 細胞の形質細胞への分化を促進する。さらに Th2 の放出するサイトカインでは形質細胞から分泌される抗体は IgE に偏る。このため、Th1 と Th2 のサイトカインバランスは、正常な抗体産生の重要な因子である (1)。さらに近年では Th1 に抗原刺激が続くと塩基性ロイシンジッパー転写制御因子 (basic leucine zipper transcriptional regulator; Nfil3) が発現し、Th2 と同様に IL-13 を産生するという報告がある (6~9)。サイトカインバランスの調節に関与する免疫細胞やサイトカインの同定が行われることで、今後もより詳細な免疫応答メカニズムが判明すると考えられる。一方で、Th17 は IL-17 を放出し上皮細胞や血管内皮細胞からの IL-8 や IL-6、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF) を産生させることで異物に対する貪食細胞の作用を高めている (4,5)。ナイーブ T 細胞の各ヘルパー T 細胞への分化により、B 細胞の形質細胞への分化が起こり、その結果形質細胞から異物に特異的な抗体が産生される。抗体と異物が反応することで、貪食細胞の異物認識能が高まる (オプソニン化)。このように体液性免疫では異物 (抗原) 特異的な抗体を産生することにより、免疫応答を増幅している (1)。

Table 1 ナイーブ T 細胞の分化に関わるサイトカイン及び脂質メディエーター

サイトカイン 脂質メディエーター	T 細胞の分類
IFN- γ , IL-12	Th1
IL-4, IL-13, PGE2*	Th2
IL-6, IL-23, TGF- β **	Th17
TGF- β	Treg

*プロスタグランジン E2 (prostaglandin E2; PGE2)

**形質転換増殖因子 β (transforming growth factor β ; TGF- β)

第二項 アレルゲンとアレルギーについて

アレルギーはアレルゲンに対して過度な免疫応答が生じることで引き起こされる。このアレルゲンとは生体では抗原と同義であり、生体内に取り込まれるとアレルギー反応を引き起こす抗原をアレルゲンという。またアレルギーは過敏反応（Hypersensitivity reaction）の一部であり、本来であれば感染とは関係のない無害な物質に対して免疫反応を引き起こす（1,10~16）。アレルギーには I~IV 型に分類されている。なかでも、I 型アレルギーは腸管の寄生虫に対する本来の生体応答が過剰な、そして有害な免疫応答として発現するものである。その結果、アレルギー性鼻炎や気管支喘息、蕁麻疹、アナフィラキシーがあり、代表的な症例に花粉症がある。花粉症はスギ花粉やカモガヤ花粉、イネ花粉などの植物から飛散する花粉がアレルゲンとなるため、花粉飛散の時期にくしゃみや鼻水、目のかゆみなどの症状を呈する（17~20）。また食材に対するアレルギーもあり、卵や大豆、小麦などを調理した食品を食べると花粉症と同様な症状や呼吸困難、口唇浮腫、アナフィラキシーなど重篤な症状を呈することがある。これらの反応は即時型反応と呼ばれており、抗原特異的抗体で感作した肥満細胞が抗原を認識することにより肥満細胞の顆粒に含まれるヒスタミンやロイコトリエン等のメディエーターが放出され、血管透過性亢進や好酸球遊走などの炎症反応を惹起し、症状を惹起する（1）。メディエーターのなかでもヒスタミンは主要な病因因子であり、治療薬の標的分子にされている。

アレルゲンに対する過剰な免疫応答を引き起こす初発のメカニズムについては、未だ不明であるが、免疫学では免疫応答を増強させる物質（アジュバント）を用いて、通常は生体に対して無害な物質に対する免疫応答を惹起する実験が多くなされている（1）。このため、アレルゲンによるアレルギー応答の誘導には、アレルゲン以外にもアジュバントとなりうる物質の関与が示唆されている（21）。卵白アルブミン（ovalbumin; OVA）はフロイト完全アジュバントを用いて免疫すると、OVA 特異的 Th1 を誘導し、IgG 抗体を産生する（21, 22）。一方、水酸化アルミニウムゲルを用いた免疫では、OVA 特異的 Th2 を誘導し、IgE 抗体を産生することが知られている（21, 23）。このように、アジュバントが異なると同じ抗原を用いても Th1 あるいは Th2 を誘導することができる。フロイト完全アジュ

バントは菌体成分により、TLRを介して樹状細胞が刺激されることで、IL-12の産生やCD80/CD86（活性化した樹状細胞の細胞膜表面に存在し、ナイーブT細胞の細胞膜表面のCD28と結合することでナイーブT細胞を活性化する）を発現し、Th1への分化を促す。また、水酸化アルミニウムを含むアルミニウム塩(alum)は、これまでalumに抗原が吸着することで長期間、免疫部位にとどまり、抗原を少量ずつ放出することがTh2誘導に関与していると考えられていたが、最近の研究では、抗原は投与後まもなく免疫部位を離れることや、alumによる肉芽を除去した条件でもTh2を誘導することから疑問がもたれている(24)。このため、フロイト完全アジュバントのように抗原提示細胞に対する影響が検討されている。いままでにTh1誘導で認められるTLRを介した活性化は関与しておらず、インフラマソーム（炎症反応や細胞質内の異物の認識、除去に関与するタンパク複合体）の活性化により、Th2誘導を起こしてしる考えられている(25)。ただし、詳細なメカニズムに関しては現在も研究が進められている。アレルゲンとアジュバントの関連性を含むアレルゲンの性質について、Takaiらが以下の3つの点を挙げている(26)。第一にIgE抗体やTh2による認識、第二にタンパク質としての作用、ダニ由来アレルゲンに代表されるシステインプロテアーゼやセリンプロテアーゼである。第三に本項で示したIgE抗体やTh2に依存しないアジュバント様作用であり、免疫応答の誘導や粘膜上皮や皮膚のバリア機能を減弱する(26)。代表的なアレルゲンとして知られるダニ由来アレルゲンのプロテアーゼ活性は、*in vivo*での皮膚バリアの破壊を誘導・促進し、呼吸器を介した感作や免疫応答への関与が示唆されている。また花粉やカビ、寄生虫などに由来するプロテアーゼによっても皮膚バリアの破壊が起こることで感作していると考えられている(10~16)。スギやブタクサなどの花粉由来アレルゲンでは、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; NADPH)オキシダーゼがマウスモデルでのTh2誘導に重要であると報告されている。また花粉由来の脂質によって好酸球や好中球を活性化させるものや、樹状細胞のIL-12産生を抑制することでTh2を誘導していると示唆されている(17~20)。このような、アレルゲンのアジュバント様作用のメカニズム解明により、新たな抗アレルギー作用のターゲットが見出されると考えられる。

I型アレルギーを含めたアレルギーの患者数は増加の一途を辿る。日本国内に

において 1997 年と 2008 年の鼻アレルギー有病率を比較すると 30%から 39%へ約 10%も増加している (27)。この患者数の増加は日本国内に留まらず、中国や韓国などアジア諸国や欧米諸国など世界的に増加している (28)。この増加の原因として、アレルギー発症の原因である遺伝と環境要因のうち、環境要因による影響が主たる原因と言われている (29)。現代社会では衛生環境を整えたために、生後数週から数年間のウイルスや細菌曝露の機会が減少し、第一項で示したヘルパーT細胞のサイトカインバランスが Th2 に偏ることでアレルギーを発症するリスクが高まると考えられる。

第三項 医薬品による I 型アレルギー抑制

現在までに I 型アレルギーを予防する手段として、アレルゲンを体内に侵入させないマスクの着用や清掃や薬剤によりダニの繁殖を抑制する方法がある。また、ヒスタミンがヒスタミン H1 受容体に結合して、血管透過性の亢進や気管支収縮等を生じ、炎症反応や急性反応を惹起することから、ヒスタミン H1 受容体との拮抗薬として抗ヒスタミン剤が開発されており、ヒスタミンによる痒みやくしゃみ、鼻水などの症状を抑える方法がとられている (30)。またメディエーターの遊離抑制作用を有するものは抗アレルギー剤として用いられ、抗ヒスタミン作用やメディエーター遊離抑制作用の両作用を有する薬剤は少なくなく、他にもロイコトリエンやトロンボキサンなどの脂質メディエーターとの拮抗薬も市販されている (Table 2)。これらの薬剤による治療において最も注目すべき点は副作用である。例えば、抗ヒスタミン作用を有するケトチフェンフマル酸やオキサトミドなどでは脳内のヒスタミン受容体とも拮抗作用を示すため神経伝達を阻害し、倦怠感や眠気を催す。また重大な副作用としてヒスタミン H1 拮抗薬やトロンボキサン A2 拮抗薬、ロイコトリエン拮抗薬に共通する肝機能障害がある。他にも浮腫や嘔吐、頭痛などが報告されており、抗アレルギー剤の副作用が懸念されている (30)。これらの薬剤による症状の緩和は対症療法であり、またアレルギーの自然治癒は難しいことから、花粉症やハウスダストによるアレルギーでは花粉飛散の季節や場所によって症状を呈し、それに備えて薬剤を服用する必要がある。このため、対症療法ではなくアレルギーの自然経過を改善する治療法も研究され

ており、薬剤による対症療法的な治療ではなく、アレルギーの根本治療の可能性を有しているとされる（31~33）。

アレルギーの根本療法として現時点で挙げられるのは減感作療法（抗原特異的免疫療法）である。長期（週に1回、2年間）の間、アレルゲンである花粉やダニの粗抽出物を皮下または舌下投与することで、生体内ではIL-10産生制御性T細胞が活性化する。IL-10は形質細胞の免疫グロブリン（immune globulin; Ig）E産生を抑制し、IgG産生を促進するためアレルギー反応初期に必須なIgEを減少させアレルゲンとの反応を抑えることが可能となる（31）。また長期間治療を継続すると生体内のTh1/Th2サイトカインバランスが整えられ、アレルゲンの定期的な投与なしでもアレルギー反応を生じないため、対症治療である薬剤と異なり根本的な治療が期待出来る。しかし、減感作療法は長期の治療にも関わらず、その有効率は6~7割と個人差が大きく、1年間の治療では治療していない人との差が認められず、2年以上の治療で改善されるという報告がある。またアレルゲンを投与するため先の個人差を含め、濃度を誤るとアナフィラキシーショックを誘発する可能性がある。この問題点の解決に向けてアレルゲン抽出液の投与にアジュバントを添加することで短期間、有効率の改善を目指した試みが行われている（31）。

アレルギーでは肥満細胞や好塩基球の細胞膜表面にある高親和性IgE受容体（Fc epsilon receptor I; FcεRI）に結合したIgEと抗原との反応により症状が引き起こされる。そこでFcεRIに結合するためのIgEを抗IgE抗体によって捕捉、不活化させる医薬品としてOmalizumabが開発された（34）。Omalizumabはマウスで抗ヒトIgE抗体を作製し、特にFcεRIに結合するIgEの免疫グロブリン結晶化可能断片（fragment crystallizable of immunoglobulins t; Fc）部分を認識する。このため、FcεRIに結合前のIgEを捕捉し、既に結合しているIgEは認識しないことから、抗体刺激により受容体を活性化することがなく、副作用を最低限に抑えている。またマウス由来の抗体であるため、ヒトの生体内では抗マウスIgE抗体として抗体を生じ、アナフィラキシーショックを引き起こす可能性や抗体により捕捉されることで、治療効果を発揮できないと考えられた。このため、マウス由来抗IgE抗体の95%をヒト由来に置き換えたものがOmalizumabである（34）。生体内のIgE濃度は、OmalizumabによりIgEが捕捉されることで低下する。IgE

濃度の低下が長期間継続すると肥満細胞の FcεRI の発現量も減少するため、抗体医薬によるアレルギー治療は予防や改善だけでなく根本治療も期待される。しかし、問題点として Omalizumab は抗体であるため他の抗アレルギー剤と比較しても分子量は極めて大きいため、血中から組織への移行量が少なく、アレルギー性皮膚炎や食物アレルギーなどの皮膚組織に分布する肥満細胞に感作する IgE に対しては反応が弱く、治療が困難であることが指摘されている。

Table 2 現在利用されている抗アレルギー剤

	薬剤名	作用	副作用
遊離抑制薬	クロモグリク酸ナトリウム	遊離抑制作用	発疹、咽喉痛 刺激感
	トラニラスト	遊離抑制作用	膀胱炎、腎機能障害 肝機能障害
ヒスタミン H1 拮抗薬	ケトチフェンフマル酸	遊離抑制作用 抗ヒスタミン作用	肝機能障害、眠気 倦怠感、頻尿
	オキサトミド	遊離抑制作用 抗ヒスタミン作用	肝機能障害、アナフィラキシー様症状
トロンボキサン A2 拮抗薬	セラトロダスト	平滑筋収縮の抑制	肝機能障害 劇症肝炎、眠気
	ラマトロバン	平滑筋収縮の抑制	肝機能障害、浮腫 眠気
ロイコトリエン (LT) 拮抗薬	ザフィルルカスト	選択的ペプチド LT 受容体拮抗作用	劇症肝炎 肝機能障害、蕁麻疹
	モンテルカストナトリウム	Cys LT1 受容体に 選択的に結合	アナフィラキシー様 症状、血管浮腫
Th2 サイトカイン 阻害薬	トシル酸スプラタスト	IgE、IL-4、IL-5 産生抑制	肝機能障害 ネフローゼ症候群

浦部 晶夫ら編集 今日の治療薬解説と便覧 2014 より引用改変

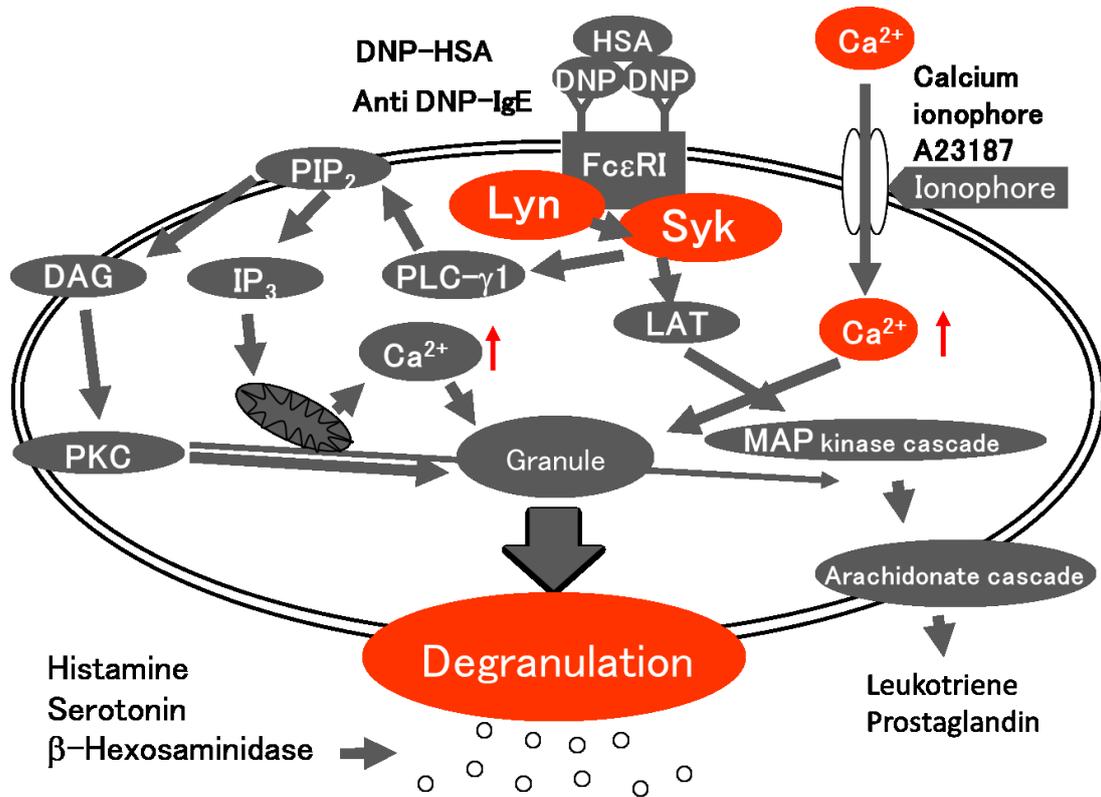
第四項 食品成分によるアレルギー抑制

食品には、3つの機能があり、それぞれ一次機能—栄養面での働き、二次機能—嗜好面での働き、三次機能—疾病予防面での働きが提唱されている。特に注目されているのが、三次機能の疾病予防面での働きである(35)。近年は高齢化が進み2015年には高齢化率25%を超えることが予想されており、何らかの病気に罹患する高齢者が増加している。病気の蔓延は、国民医療費の増加にも直結するため、高齢化とともに社会問題となっている。これに対して、国民医療費を圧縮するためには病気にならないこと、予防が最も有効な手段であるとし、食品の三次機能により疾患の発症リスクを低減させることが期待されている。最近では食品の三次機能に特化した特定保健用食品が多く市販されるようになっている(36)。特定保健用食品は、*in vitro*、*in vivo* 試験やヒトに対する有効試験などの科学的根拠をもとに食品に含まれる成分が健康の保持・増進に役立つ証明を受けた食品であり、オリゴ糖、乳酸菌などの整腸作用成分を含んだ飲料や、コレステロール低下作用を目的とした植物コレステロールを多く含有する油などが市販されている(37)。アレルギーに関しては第三項で述べた予防や治療法が行われており、そのような対策も重要な課題として挙げられるが、近年では食品の機能性に着目し、機能性成分によりアレルギーの予防や改善する試みがなされている。例えば、ある種の乳酸菌をプロバイオティクスやプレバイオティクスに利用し、正常な腸内菌叢に整えることで、経口寛容の誘導やTh1/Th2細胞バランスの正常化を行い、アレルギー反応を抑制するものや医薬品の作用メカニズムにあるケミカルメディエーターの遊離抑制作用を有する機能性成分の探索も行われている(32, 33)。

第二節 アレルギー疾患のメカニズム

第一項 アレルギー疾患における細胞内シグナル伝達

特異的な IgE 抗体で感作された好塩基球や肥満細胞が抗原と相互作用することにより細胞内では脱顆粒プロセスが惹起される。細胞内シグナル伝達ではプロテインキナーゼが主な役割を果たしている。プロテインキナーゼとは、標的タンパク分子にリン酸基を付加するリン酸化酵素をいい、アデノシン三リン酸（adenosine 5'-triphosphate; ATP）やアデノシン二リン酸（adenosine 5'-diphosphate; ADP）などのリン酸基を有する化合物が基質となる。アレルギー疾患治療の標的因子には、サイトカイン産生やリンパ球の分化・成熟、細胞増殖に関与し、サイトカイン受容体に結合する Janus キナーゼ（Janus kinase; JAK）や T 細胞や B 細胞、肥満細胞の活性化などの特にアレルギーに関与する免疫受容体チロシン活性化モチーフ（immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM）含有受容体に結合するチロシンプロテインキナーゼ（tyrosine-protein kinase Lyn; Lyn）や脾臓チロシンキナーゼ（spleen tyrosine kinase; Syk）、炎症反応や獲得免疫、自然免疫制御に関与する TLR に結合するミエロイド系分化因子 88（myeloid differentiation factor 88; MyD88）がある（38~41）。またプロテインキナーゼの他にも炎症反応において重要な転写因子である κ B 阻害因子（I-kappa B; I κ B）や核内因子 κ B（nuclear factor-kappa B; NF- κ B）なども注目されている。



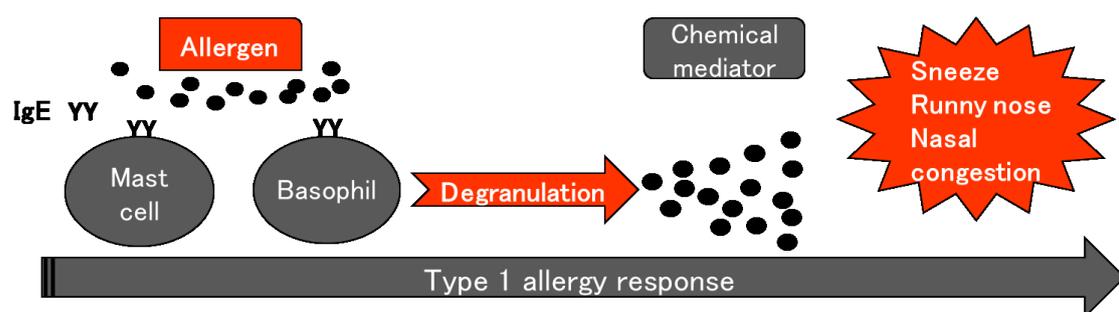
Scheme 1 Cell signaling pathway of Type I allergy

第二項 I型アレルギーの細胞内シグナル伝達

アレルギー疾患発症に至る流れには、アレルゲンが侵入し、体内の抗原提示細胞（樹状細胞）によるアレルゲンの取り込みと抗原提示が起こる。提示された抗原により、Th2細胞を誘導し、IL-4の産生を増加させる。また、B細胞によるアレルゲン特異的IgE抗体の産生が起こり、肥満細胞や好塩基球のFcεRIにIgE抗体が結合し、感作される。ここにアレルゲンが再侵入すると特異的IgE抗体によりアレルゲンが捕捉され、架橋結合することにより肥満細胞や好塩基球の活性化が起こる。活性化された肥満細胞と好塩基球はヒスタミンやセロトニンなどのケミカルメディエーターを含む顆粒を放出（脱顆粒）し、好酸球の遊走や血管拡張、血管透過性の亢進などのアレルギー炎症を誘発する（第一項）。このようなアレルギー反応を惹起する根本的な要因は未だ解明されておらず、現在でも衛生仮説が主たる原因ではないかと考えられている（42）。

衛生仮説は1989年にStrachanにより提唱されたアレルギー疾患発症メカニズムの仮説である（42）。衛生仮説では、花粉症の保有や既往の割合は兄弟の数に

反比例し、またその効果は年下よりも年上の兄弟の数に依存している。すなわち、屋外での活動や行動が活発となる年上の兄弟と接触または行動することで間接的、直接的に感染曝露機会が増加しているという結果から、生育時の感染曝露頻度の違いであると推測し、これを衛生仮説として提唱している（42）。加えて、環境中のエンドトキシン量の多い地域で育つとアレルギー特異的 IgE 抗体の保有率は最大で 5 倍程度低くなるというもある（43）。従って、衛生仮説は乳幼児期の環境要因がアレルギー体質を決定するとしている。エンドトキシンとともにアレルギーが侵入するとナイーブ T 細胞からアレルギー特異的 1 型ヘルパー（Th1）や 17 型ヘルパー（Th17）T 細胞への分化が促進され、IFN- γ などを放出し、細胞性免疫や感染防御に関与する一方で、それらと拮抗するアレルギー特異的 Th2 細胞、特にメモリー Th2 細胞への分化を抑制する（1, 20,）。これにより、免疫バランスが保たれ、アレルギーの発症が抑えられる。一方で、乳幼児期に曝露しないと、メモリー Th2 細胞が発達し、エンドトキシンの存在の有無に関係なくアレルギー侵入によりただちに Th2 細胞が増殖し、その結果、アレルギー発症につながるとも言われている。ただし、衛生仮説で提唱されている幼少期の Th1 誘導に対して、鉤虫や住血吸虫などの蠕虫症の感染とアレルギー発症は負の相関があることも認められている（42）。Th2 応答を誘導する蠕虫（寄生虫）に感染している子供と抗蠕虫薬により感染していない子供ののちのアレルギー発症状況を調べると、抗蠕虫薬により非感染を維持しているよりも感染して Th2 応答を促すと発症が少ないことが認められている。このため、衛生仮説は対向制御仮説（Counter-regulation hypothesis）に修正され、その定義は「すべての感染症は、IL-10 や TGF- β などの Th1 と Th2 両方の応答を抑制するサイトカインを誘導することによって発症を抑える」とされている（44）。



Scheme 2 Type 1 allergy response

第三項 RBL-2H3 細胞（好塩基球）と肥満細胞の差異

ラット好塩基球性白血病（rat cell line derived from basophilic leukemia : RBL-2H3）細胞は、Wistar 系ラットに β -chloroethylamine を投与しクローニングの結果得られた好塩基球である(47, 48)。腹腔内に誘導される肥満細胞と同様に、抗アレルギー作用の指標となる脱顆粒抑制活性のスクリーニングに使用されている(49)。好塩基球と肥満細胞の差異として、まず生体内での分布が異なることが挙げられる。好塩基球は血中に多く存在し、一方で肥満細胞は皮膚や粘膜などの組織に多く分布している(46)。また脱顆粒誘発因子に対する反応性も異なっており、脱顆粒惹起モデル化合物の compound 48/80 による刺激に対しては、好塩基球は反応しないのに対して、組織結合性の肥満細胞は反応し、粘膜中の肥満細胞は好塩基球と同様に反応しない(45, 50, 51)。また、細胞内のヒスタミン含有量も異なっており、好塩基球は細胞 10^6 個あたり $0.1 \mu\text{g}$ であるのに対して、組織結合性の肥満細胞は $10\sim 30 \mu\text{g}$ であり、粘膜中の肥満細胞は $0.1\sim 1 \mu\text{g}$ である(45)。このことから、好塩基球は粘膜中の肥満細胞と同等の反応性を有していると考えられている。生体内における免疫応答に関しては、好塩基球は組織での炎症局所に動員され、サイトカインや抗原により活性化すると細胞膜表面に $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ を発現する。好塩基球に発現する $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ は、肥満細胞に発現する $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ と同様に IgE 抗体を結合するため、炎症局所での脱顆粒を起こし、ヒスタミンや IL-4 を放出する(46)。また肥満細胞と好塩基球は相互に影響を与えることが知られており、これに好酸球を加えた 3 つの細胞種はアレルギー反応の増強を引き起こすと考えられている(46)。従って、*in vitro* と *in vivo* では反応性が異なるため、スクリーニングした化合物の動物実験は必要不可欠と考えられる。

第三節 本研究について

現在までに、抗アレルギー作用物質の探索を目的として、茶や野菜等の様々な食資源から脱顆粒抑制活性を指標にスクリーニングを行ってきた。その結果、ホウレンソウの搾汁液に強い脱顆粒抑制活性が認められた。ホウレンソウは中央アジアから西アジア原産の野菜で、本学庄原キャンパスのある広島県庄原市の有力

な地産農産物である。これまでにホウレンソウに関する生理活性の報告には抗酸化、抗腫瘍活性などがあるのみであった（第二章に示す）。著者の研究と時期を同じくして、ホウレンソウ抽出物の脱顆粒抑制活性に関する報告が Ishida らによってなされているが、脱顆粒抑制物質については作用本体の解明には至っておらず、主成分はペプチドやオリゴサッカライドなどの高分子化合物が想定されている状況である（52）。従って、本研究では第一の目的として脱顆粒抑制活性を指標にホウレンソウ熱水抽出物から脱顆粒抑制活性物質の単離・精製を行った。次に作用メカニズムを解析するためにウエスタンブロッティングによる細胞内シグナル伝達経路に対する影響と細胞内 Ca^{2+} 濃度に対する影響を評価した。次にホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質を *in vitro* 試験と *in vivo* 試験により、抗アレルギー作用評価を行った。また、ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質と既知の脱顆粒抑制物質との抗酸化活性と脱顆粒抑制活性を比較し、構造活性相関や既知物質との作用の差を解析することとした。

第二章 ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の単離・精製

第一節 序論

本研究では抗アレルギー作用物質の探索を目的として、ホウレンソウを始め、ダイコンやアスパラガス、ネギ等の野菜やクワ茶、スギナ茶、ハブソウ茶等の健康茶を食資源として用いて、脱顆粒抑制活性を指標にスクリーニングを行った。その結果、ホウレンソウの搾汁液に強い脱顆粒抑制活性が認められた (Fig. 1)。ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) は世界中で栽培され、食材としての利用や地域によっては薬草として使用されている。例えば、日本や中国では天日で乾燥させたホウレンソウからエキスを抽出し、これを飲むと貧血や便秘、糖尿病、高血圧、脱力感等に効果があるとされている (53)。また、これまでにホウレンソウに含まれる成分やその生理活性について多くの研究が行われている (Table 3)。生理活性では抗変異原性や血糖降下作用、抗浮腫やタンパク質合成阻害活性などが知られている。またホウレンソウを食べるとアレルギー反応を示し、アレルギー性の活性を持つことも報告されている。ホウレンソウの有する生理活性には様々なものがあるが、現在までに脱顆粒抑制活性は知られていない (53)。そこで、脱顆粒抑制活性を示すホウレンソウからスクリーニングと同様に脱顆粒抑制活性を指標として活性成分の単離・精製を試みた。

評価法としては、主に細胞として肥満細胞のモデル細胞系であるラット好塩基球形白血病 (rat basophilic leukemia cells; RBL-2H3) 細胞株を用い、測定対象として細胞内顆粒から分泌される β -ヘキソサミニダーゼ量を測定する方法である。ラット由来のマスト細胞は、ヒト由来マスト細胞に似た顆粒を持ち、顆粒中の β -ヘキソサミニダーゼ量は、ヒスタミン量に相関していることも知られているため、一般に抗アレルギー薬の作用評価に利用されている。しかし、実際にラット由来マスト細胞を使用するためには、実験毎にラットから調製しなければならない、またラットの個体差や操作の煩雑さから再現性が悪い。このため、現在ではスクリーニングに株化されたラット好塩基球形白血病細胞 (RBL-2H3) 細胞が使用されており、再現性などの欠点を解決している (47,48)。RBL-2H3 細胞は、ラット由来の白血病細胞で好塩基球である。好塩基球は血中の白血球の内 0.5%程を占

め、マスト細胞と同様に FcεRI を細胞表面に有し、Th2 サイトカインの分泌を行う。アレルギーによる FcεRI に結合した IgE 抗体の架橋で脱顆粒を起こし、ヒスタミンなどの炎症メディエーターを放出する。このため、脱顆粒抑制活性試験によく用いられている (49)。

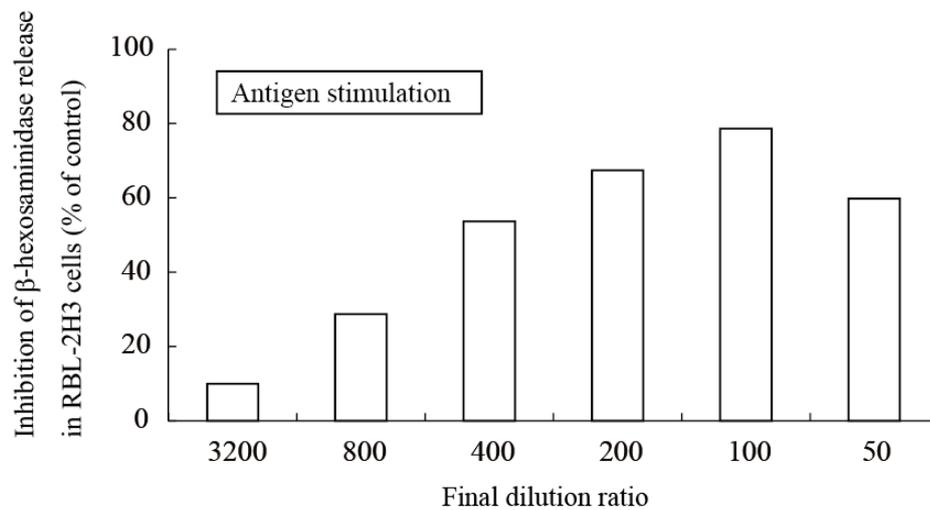


Fig. 1 Evaluation of inhibitory activity of spinach extract on IgE-mediated degranulation in RBL-2H3 cells.

Table 3 Bioactivity of *Spinacia oleracea*

Antimutagenic activity
Hypoglycemic activity
Glucose metabolism stimulation activity
Insulin receptor binding effect
Antiedema activity
Antioxidant activity
Antitumor-promoting activity
Pancreatic secretion stimulation activity
Amylase release stimulation activity
Lipase release stimulation activity
Proteolytic activity
Quinone reductase induction activity
Protein synthase induction activity
Naphthyl butyrate esterase stimulation activity
Amine tetrazolium reductase inhibition activity.
Intraocular pressure reduction activity
Allergenic activity
Catalase stimulation activity
Hemagglutinin activity
Antimalarial activity
Elastase inhibition activity

Kimura T. International collation of traditional and folk medicine. より引用改変

本章ではホウレンソウに含まれる脱顆粒抑制活性物質を単離・精製、構造解析までを目的とし実験を行った。

第二節 材料および方法

第一項 脱顆粒抑制物質の単離・精製

ホウレンソウ熱水抽出物の調製

生のホウレンソウ（広島県庄原市内の農産品直売所ゆめさくらで購入）をミキサーでペースト状にし、80°Cに加熱した純水をホウレンソウペーストに対して2倍量加え、3時間攪拌後、ガーゼろ過を行った。残渣に同量の熱水を加え、3時間攪拌し、同様にガーゼろ過を行った。次にろ液をひとつにまとめた後、吸引ろ過（No. 2濾紙）を行った。ろ過後、ろ液全量を次の分離に用いた。

Diaion HP20 カラムクロマトグラフィー

ガラス製カラム(3 cm i.d.×45 cm)にメタノールで一晩膨潤させた Diaion HP20 (Mitsubishi Chmemeical)を 200 ml 充填し、純水に置換後、クロマトグラフィーに使用した。

Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー

ガラス製カラム(2 cm i.d. × 30 cm)にメタノールで一晩膨潤させた Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB)を 80 ml 充填し、純水に置換後、クロマトグラフィーに使用した。

分取用薄層クロマトグラフィー

PLC プレート (Sillica gel 60F254, 0.5 mm, Merck Ltd. Japan) を使用し、ガラス製展開層に CHCl_3 : MeOH: Water = 6 : 4 : 1 (v/v/v) の溶媒を入れ、展開した。展開後、目的成分のスポットをスパーテルでかきとり、吸引濾過でシリカゲルを除き、回収した。

- HPLC

送液ポンプ; Shimadzu LC-10AD

検出装置; Shimadzu SPD-10Avp

記録装置; Shimadzu CHROMATOPAC C-R8A

Mobile phase: 26% AcCN - 0.02% TFA

Column: Mightysil RP-18 GP (10×250 mm)

Flow rate: 2.0 ml/min

Detection: 260 nm or 210 nm

- 構造解析

核磁気共鳴装置

Avance700 (Bruker Biospin)

¹H-NMR (700 MHz, C₅D₅N)

¹³C-NMR (175 MHz, C₅D₅N)

2D-NMR (HMBC, ROESY)

質量分析装置

APEX-Qe 9.4T AS (Bruker Daltonics)

第二項 細胞培養

試薬

- 細胞培養液

ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum; FBS, Cell Culture Technology)は 56℃、30分間の非働化处理後、0.45 μm フィルターろ過し、-30℃で保存した。使用時に 0.22 μm フィルターでろ過し、終濃度 10% (v/v) になるようにイーグル最少必須培地 (Minimum essential medium; MEM, Sigma Aldrich Co.) 培地に添加して調製した。

- トリプシン-EDTA 溶液

トリプシン (Sigma Aldrich Co.)、EDTA (和光純薬) をそれぞれ 0.25%、0.02% となるように PBS に溶解し、0.22 μm フィルターでろ過して調製した。

細胞培養法

RBL-2H3 細胞は、独立行政法人 医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクから購入した。細胞は 10%FBS を含む MEM 培地中で 5%CO₂ 空気気相下、37℃で培養した。継代は 2、3 日ごとに、細胞密度が 80%コンフルエントになる前に行った。継代回数を重ねることで細胞の形質に変化が起こる可能性があるため、継代を 20 回前後行うごとに廃棄し、新たに凍結保存しておいた細胞と交換した。凍結保存液として 10%DMSO を含む細胞培養液を用い-145℃で保存した。

継代方法

古い培養上清を捨て、新しい培地を加え、細胞層を洗浄した。トリプシン-EDTA 溶液を細胞が浸る程度加えて細胞を剥離させ、細胞をチューブに回収した。37℃、1100 rpm で 5 分間遠心後、上清を捨てて新しい培地を加え、静かに懸濁して細胞浮遊液を調製した。細胞浮遊液の一部をとり、血球計算盤にて細胞数を測定し、新しいディッシュに播種した。

第三項 β-ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性試験

試薬

- ・ 0.1%BSA 含有 Tyrode-HEPES buffer

Tyrode-HEPES buffer は以下の組成で調製し、1 N NaOH で pH 7.4 に調製後、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA, Sigma Aldrich Co.) を 0.1% (v/v) になるように溶解し、0.45 μm フィルターでろ過した。137 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.8 mM CaCl₂、1.0 mM MgCl₂、0.4 mM NaH₂PO₄、20 mM HEPES (Free Acid)、5.6 mM D-glucose、0.1% (w/v) gelatin

- ・ マウスモノクローナル抗 DNP- IgE 抗体溶液

1 mg/ml のマウスモノクローナル抗 DNP-IgE 抗体 (Sigma Aldrich Co.) は細胞培養液で所定の濃度に希釈した。

- DNP-HSA 溶液

Dinitrophenylated human serum albumin (DNP-HSA、Sigma Aldrich Co.) を 1 mg/ml となるように超純水に溶解した。実験に使用するとき、Tyrode-HEPES buffer で所定の濃度に希釈した。

- Calcium ionophore A23187 溶液

Calcium ionophore A23187(Sigma Aldrich Co.)を 1 mg/ml となるように DMSO に溶解した。実験に使用するとき、Tyrode-HEPES buffer で所定の濃度に希釈した。

- 基質溶液

4-Nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma Aldrich Co.) を 1.3 mg/ml となるように Citrate buffer (0.1 M、pH 4.5) に溶解した。

- Lysis buffer

Tris-EDTA buffer (Tris 50 mM (Wako pure chemical)、EDTA 20 mM (Wako pure chemical, pH 7.5) に Triton-X 100 (Nacalai tesque) を 1% (v/v) となるように溶解した。

- ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質

試験化合物を 12.5 mg/ml になるよう dimethyl sulfoxide (DMSO, Kanto Chemical Co.) で溶解した。さらに実験には、Tyrode HEPES buffer で 100 倍希釈 (125 μ g/ml) し、各濃度に Tyrode HEPES buffer で希釈したものをを用いた。

- 抗アレルギー剤

ケトチフェンマレート (Sigma Aldrich Co.) とトラニラスト (Funakoshi) を DMSO に溶解し、さらに各濃度に Tyrode HEPES buffer で希釈したものをを用いた。なお、DMSO の終濃度は 0.5%以下とした。

方法

(1) 抗原抗体刺激

細胞を 96 well カルチャープレート (NUNC) に 5×10^4 cells/90 μ l/well で播種し、抗 DNP-IgE 抗体溶液を 10 μ l 添加後、24 時間、37°C で培養し、細胞を接着させた。上清の培地を吸引除去し、Tyrode-HEPES buffer で well を 2 回洗浄した。試料溶液を 80 μ l 添加し、37°C、30 分インキュベートした後に DNP-HSA を 20 μ l 添加し、37°C、1 時間インキュベートした。各ウェルの細胞上清 20 μ l を 96 well

アッセイプレート (IWAKI) に回収した。Blank の細胞には Lysis buffer を 100 μ l 添加し、細胞の溶解を確認後、細胞溶液 20 μ l を 96 well アッセイプレートに回収した。細胞上清、細胞溶解液に基質溶液を 50 μ l 添加し、37°C、90 分間インキュベートした。Borate buffer (0.2 M、pH 9.8) を 100 μ l 添加、混合後、マイクロプレートリーダーを用い、415 nm における吸光度を測定した。

(2) Calcium ionophore A23187 刺激

細胞を 96 well カルチャープレート (NUNC) に 5×10^4 cells/100 ml/well で播種し、24 時間、37°C で培養し、細胞を接着させた。培地の上清を吸引除去し、Tyrode-HEPES buffer で well を 2 回洗浄した。試料溶液を 80 μ l 添加し、37°C、30 分後、Calcium ionophore A23187 溶液を 20 μ l 添加し、37°C、1 時間インキュベートした。各ウェルの細胞上清 20 μ l を 96 well アッセイプレート (IWAKI) に回収した。Blank の細胞には Lysis buffer を 100 μ l 添加し、細胞の溶解を確認後、細胞溶解液 20 μ l を 96 well アッセイプレートに回収した。細胞上清、細胞溶解液に基質溶液を 50 μ l 添加し、37°C、90 分間インキュベートした。Borate buffer (0.2 M、pH 9.8) を 100 μ l 添加、攪拌後、マイクロプレートリーダーを用い、415 nm における吸光度を測定した。

(3) 遊離量の評価法

β -hexosaminidase の遊離率は、以下の式に基づき算出した。

$$\text{Release rate (\%)} = \frac{\text{Abs stimulation} - \text{Abs blank}}{\text{Abs cell lysate} - \text{Abs blank}} \times 100$$

Abs stimulation: cell (+), anti DNP-IgE antibody-DNP-HSA antigen (+)

or Calcium ionophore A23187 (+)

Abs blank: Tyrode-HEPES buffer (+), cell (+)

Abs cell lysate: cell lysate treated with lysis buffer

抑制活性の評価法

試料添加による β -hexosaminidase 遊離に対する抑制率は、以下の式に基づき算出した。

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (\text{Abs}_{+s} - \text{Abs}_b) / (\text{Abs}_{-s} - \text{Abs}_b)] \times 100$$

Abs_{+s}: test sample (+), DNP-HSA (+), or Calcium ionophore A23187 (+)

Abs_b: blank with test sample (-), DNP-HSA (-), Tyrode HEPES buffer (+)

Abs_{-s}: control with test sample (-), DNP-HSA (+),

or Calcium ionophore A23187 (+)

第四項 WST-1 法による細胞障害性試験

試薬

- ・ 試料溶液

DMSO で溶解し、保存溶液を作製した。実験で使用する場合は細胞培養液で各濃度に希釈した。ただし、DMSO 含有量は終濃度において 0.1%以下になるように希釈した。

- ・ HEPES buffer

20 mM HEPES となるように超純水で調製し、1N NaOH で pH 7.4 に調製した。

- ・ Methoxy PMS 溶液

20 mM 1-Methoxy PMS (DOJINDO) となるように HEPES buffer に溶解した。

- ・ WST-1 溶液

WST-1 (DOJINDO) を 5 mM、Methoxy PMS 溶液を 100 倍希釈となるように HEPES buffer で調製した。

方法

RBL-2H3 細胞を 96 穴プレート (NUNC) に 5×10^4 cells/ 100 μ l/ well で播種し、3 時間、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養し、細胞を接着させた。試料溶液を 100 μ l 添加し、24 時間、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。WST-1 溶液を 20 μ l 添加し、2 時間、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養後、マイクロプレートリーダーを用いて、415 nm における吸光度を測定した。

細胞障害性の評価

試料添加による細胞障害性は、以下の式に基づき算出した。

$$\text{Relative cell viability (\%)} = (\text{Abs}_{+s} - \text{Abs}_b) / (\text{Abs}_{-s} - \text{Abs}_b) \times 100$$

Abs_{+s}: Sample (+), Cell (+), Medium (+)

Abs_{-s}: Sample (-), Cell (+), Medium (+)

Abs_b: Sample (+), Cell (-), Medium (+)

第五項 β-グルクロニダーゼによる

ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の加水分解

方法

第一項より単離した化合物を 10 mmol/L になるよう 0.1 M Sodium acetate buffer (pH5.2) -0.5 M Sodium chloride に溶解し試料溶液とした。試料溶液 950 μl に *Helix pomatia* 由来β-グルクロニダーゼを 50 μl 加え、よく攪拌した後、2 時間 37℃ インキュベートした。インキュベート後、10,000×g で遠心分離を行い、沈殿した生成物を試料として用いた。

・分析条件

Mobile phase: 35% AcCN - 0.02% TFA

Column: Mightysil RP-18 GP 150×6.0 mm (5μm)

Detection: 210 nm

Flow rate: 0.7 ml/min

・分取条件

Mobile phase: 40% AcCN - 0.02% TFA

Column: Mightysil RP-18 250×10 (5μm)

Detection: 260 nm

Flow rate: 2 ml/min

- ・ UV スペクトルの測定

V-530 UV/VIS spectrophotometer (日本分光)

Wavelength: 190 ~ 400 nm

Sample: 20 µg/ml

Solvent: Methanol

第六項 統計処理

脱顆粒抑制活性試験と細胞障害性では各濃度 3 well を使用し、その平均値を求める実験を 3 回行い、その平均±標準誤差 (SEM) を求めた。3 回未満の実験では、平均値のみを示した。

第三節 実験結果

第一項 脱顆粒抑制活性物質の単離・精製

広島県庄原産のハウレンソウ 1.34 kg をミキサーでペースト状にしたのち、2 倍量の熱水 80°C を加えて 3 時間攪拌抽出を行った。攪拌後、二重のガーゼろ過により抽出液とした。残渣は熱水抽出を繰り返し、6 L の熱水抽出液を得た。熱水抽出液は抗原抗体刺激による脱顆粒に対する抑制活性 (第三項) を認めた。次に熱水抽出液を Diaion HP20 を担体としたオープンカラム (45×3 cm) に供し、ゲルベットの 2 倍量の純水と MeOH を用いて水溶出画分と MeOH 溶出画分とした。それぞれの画分で脱顆粒抑制活性を評価し、脱顆粒抑制活性を認めた MeOH 溶出画分を次の分離に用いた。MeOH 溶出画分はロータリーエバポレーター (45°C) で濃縮乾固し、次の Sephadex LH-20 オープンカラム (30×2 cm) に供した。ゲルベットの 2 倍量になるよう純水を流し、水溶出画分 (画分 (Fr.), Fr. W-1~3) を得た。次に 2 倍量の 70% (v/v) アセトン溶液を用い溶出し、70%アセトン画分とした。各画分の脱顆粒抑制活性を評価し、Fr. W-3 に脱顆粒抑制活性が認められたことから、1.21 g の Fr. W-3 を分取用薄層クロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH-H₂O, 6/4/1) により分離を行い、6 画分を得た (Fig. 2)。脱顆粒抑制活性が認められた Fr. 4 (408 mg) について HPLC を用いて分取を行った。

PLC で分離した 6 つの画分の内、Fr. 4 に強い脱顆粒抑制活性が認められた (Fig. 3)。

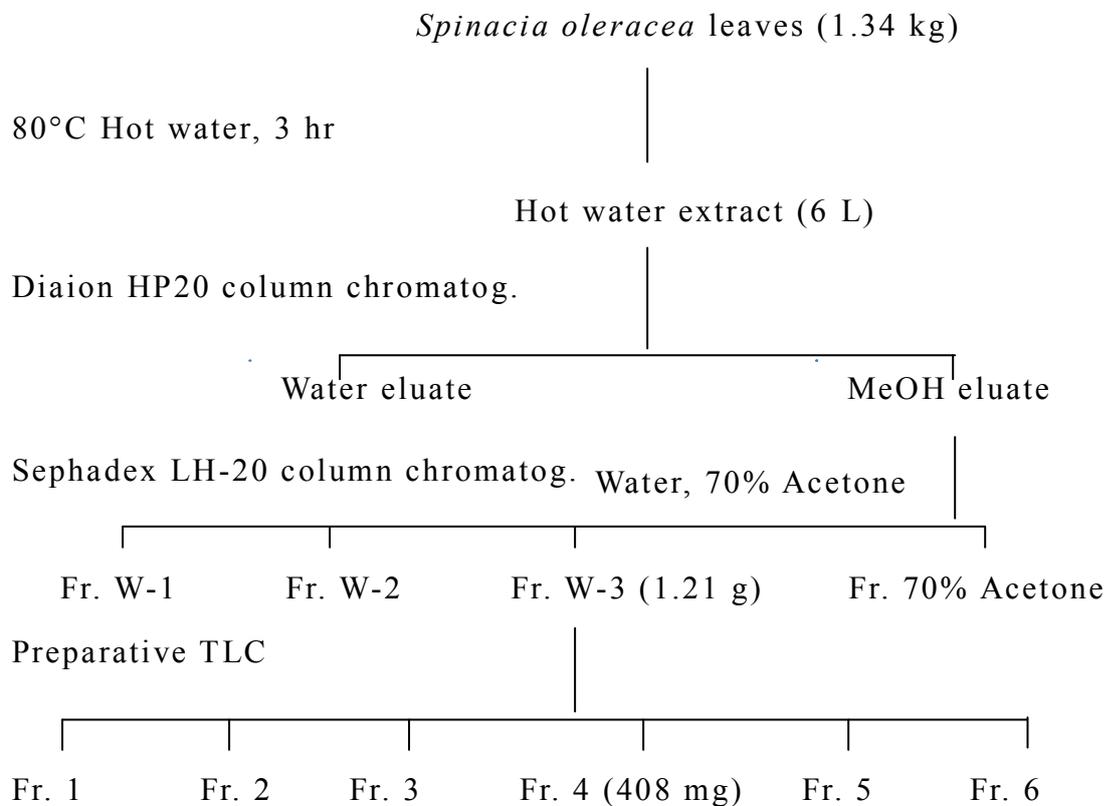


Fig. 2 Isolation procedure of degranulation-inhibitory substances from spinach extract

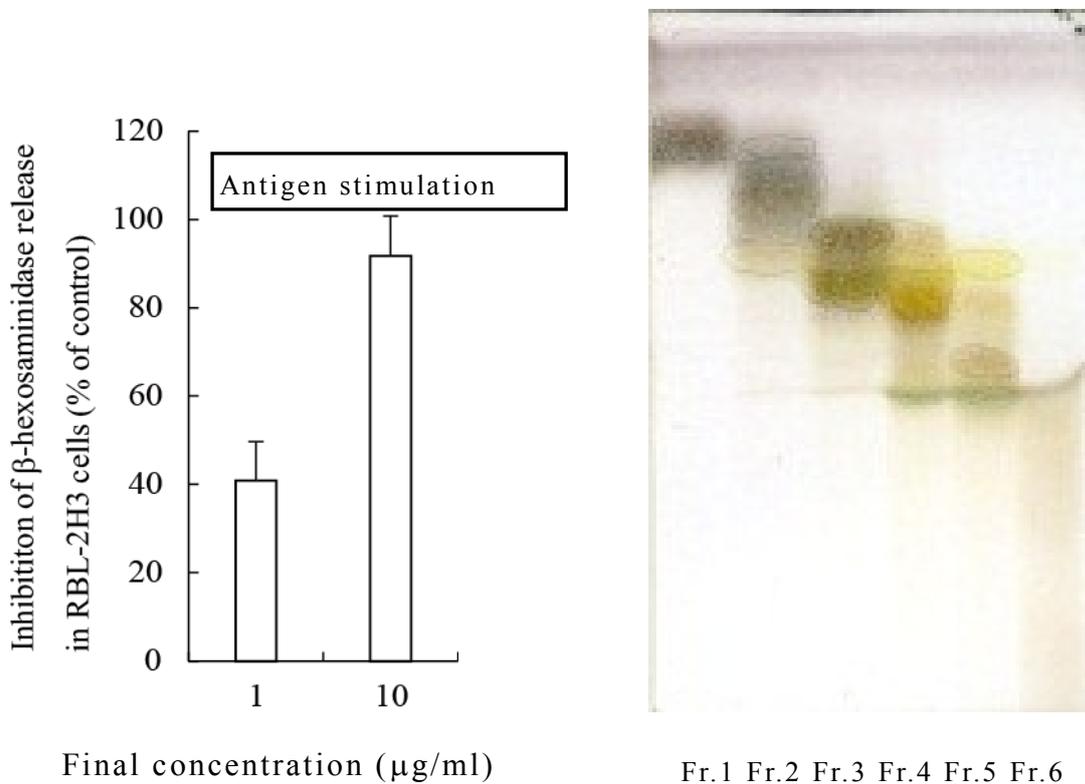


Fig. 3 Inhibitory effect of Fr.4 on IgE-mediated degranulation in RBL-2H3 cells

Right figure shows the TLC patterns of Frs. 1-6 separated by preparative TLC. Solvent ; $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$, 6/4/1 (v/v/v)

次に、脱顆粒抑制活性の強い Fr. 4 について HPLC を用いて分離を行った (Fig. 4)。分取した Fr. 4-2, 3, 4 について脱顆粒抑制活性を比較したところ、Fr. 4-4 に強い脱顆粒抑制活性が認められた (Fig. 5)。Fr. 4-2 および Fr. 4-3 についても弱い抑制活性を認めたが、用量相関は見られなかった。

次に Fr. 4-2, 3, 4 について HPLC を用いて精製を行い、最終的に高純度に精製した化合物を SO-1 (Fr. 4-4)、SO-2 (Fr. 4-2)、SO-3 (Fr. 4-3) と命名した (Fig. 6)。

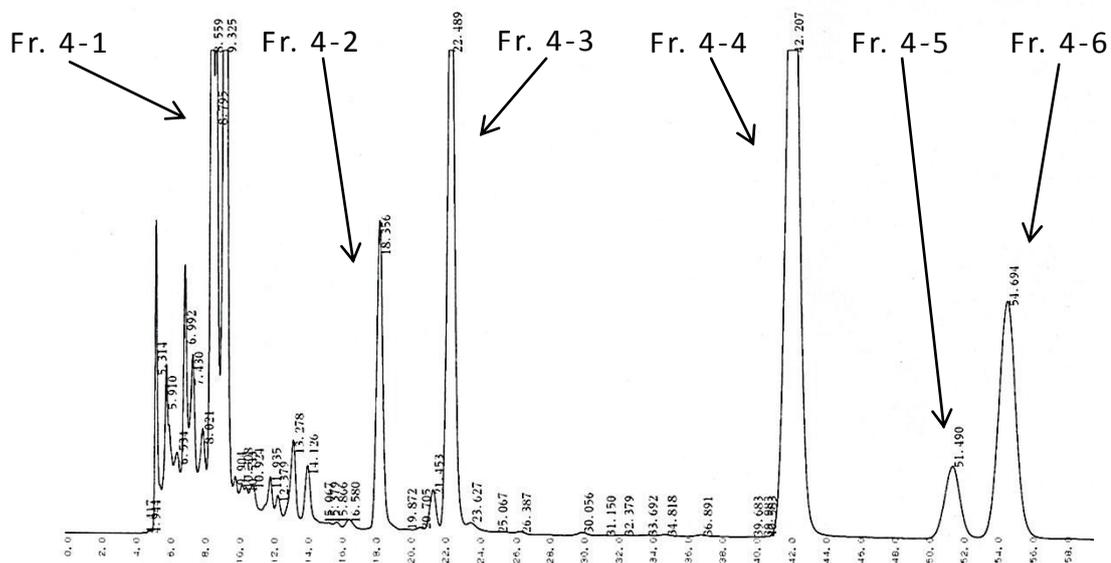


Fig. 4 Separation of Fr. 4 by preparative HPLC

Mobile phase: 26% AcCN - 0.02% TFA, column: Mightysil RP-18 GP (10×250 mm)

Flow rate: 2.0 ml/min, detection: 260 nm

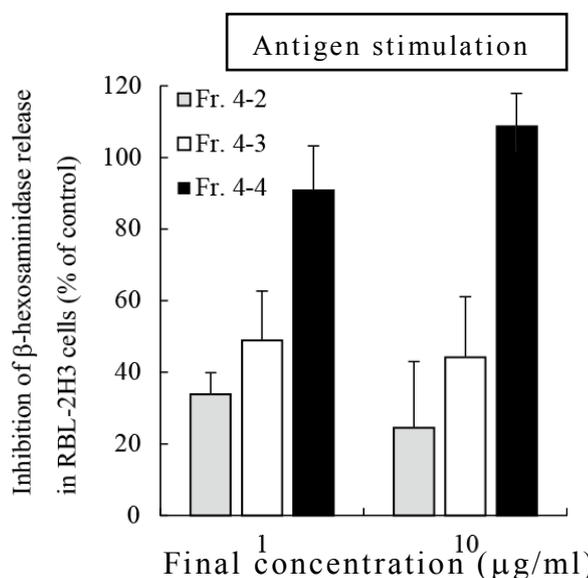
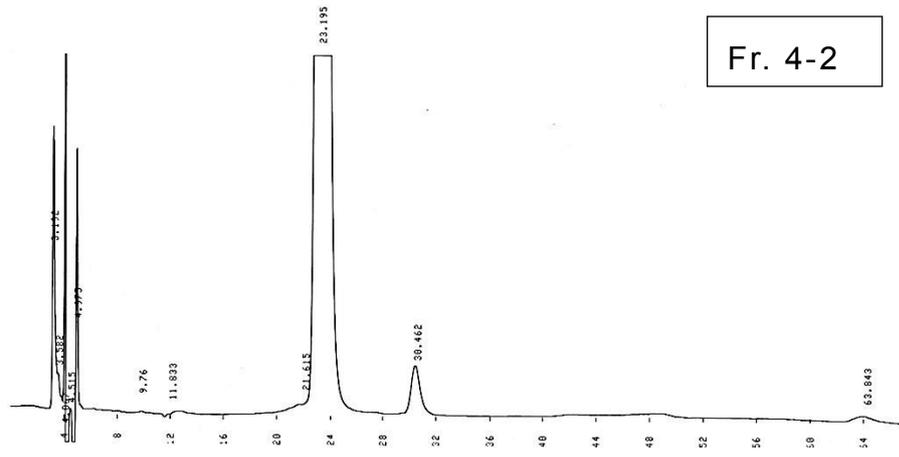
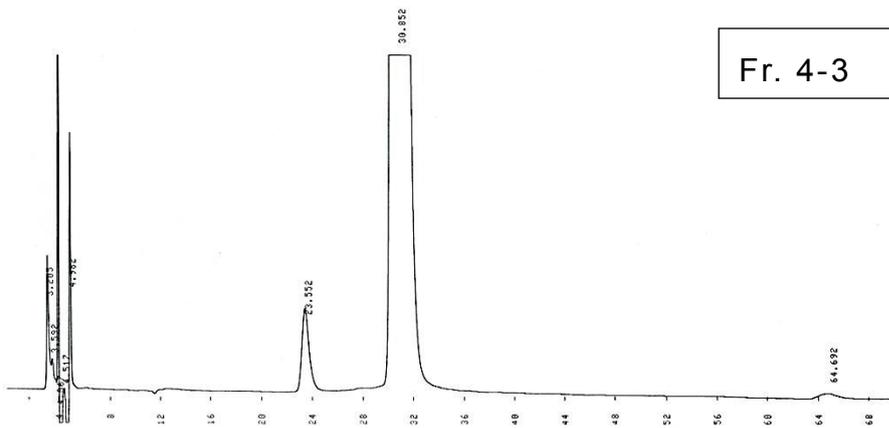


Fig. 5 Inhibitory effects of Fr.4-2, 3 and 4 on IgE-mediated degranulation

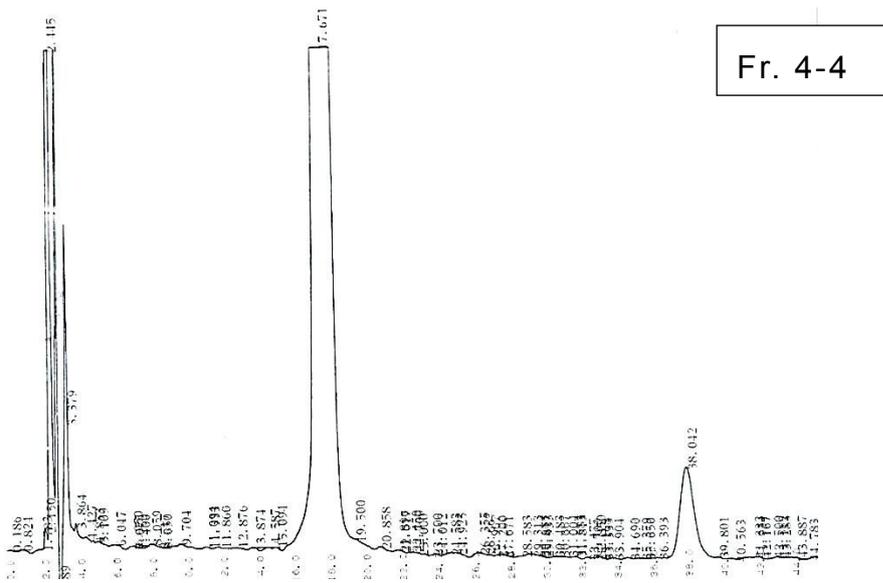
in RBL-2H3 cells



Fr. 4-2



Fr. 4-3



Fr. 4-4

Fig. 6 Final isolation of Fr. 4-2, 3 and 4 by HPLC
 Fr. 4-2 and Fr. 4-3; Mobile phase: 26% AcCN-0.02%TFA
 Fr. 4-4; Mobile phase: 36% AcCN-0.02%TFA

ホウレンソウから単離した SO-1、SO-2、SO-3 について、抗原抗体刺激による RBL-2H3 細胞からの β -ヘキソサミニダーゼ遊離に対する抑制活性を評価した結果、SO-1 は濃度依存的な抑制活性を示し、 IC_{50} は $1.76 \mu M$ であった (Fig. 7)。SO-2、3 に関しても弱いながらも脱顆粒抑制活性が認められた。しかし、カルシウムイオノフォア刺激に対しては、SO-1 が高濃度域で弱い抑制活性を示したものの、他の 2 化合物には殆ど活性は認められなかった (Fig. 8)。ポジティブコントロールとして用いた抗アレルギー剤のケトチフェンフマレートの IC_{50} は $114 \mu M$ であった (Fig. 9)。また同様に抗アレルギー剤であるトラニラストの IC_{50} は $436 \mu M$ であった (データは示していない)。

RBL-2H3 細胞における細胞障害性を評価した結果、SO-1 は脱顆粒抑制活性を認めた最大 $10 \mu g/ml$ の濃度範囲では細胞障害性は認められなかった。一方、SO-2 および SO-3 では、SO-2 に弱いながらも細胞障害性を認め、SO-3 は $10 \mu g/ml$ で細胞生存率が 60%程度であることから細胞障害性を示すことが示唆された (Fig. 10)。

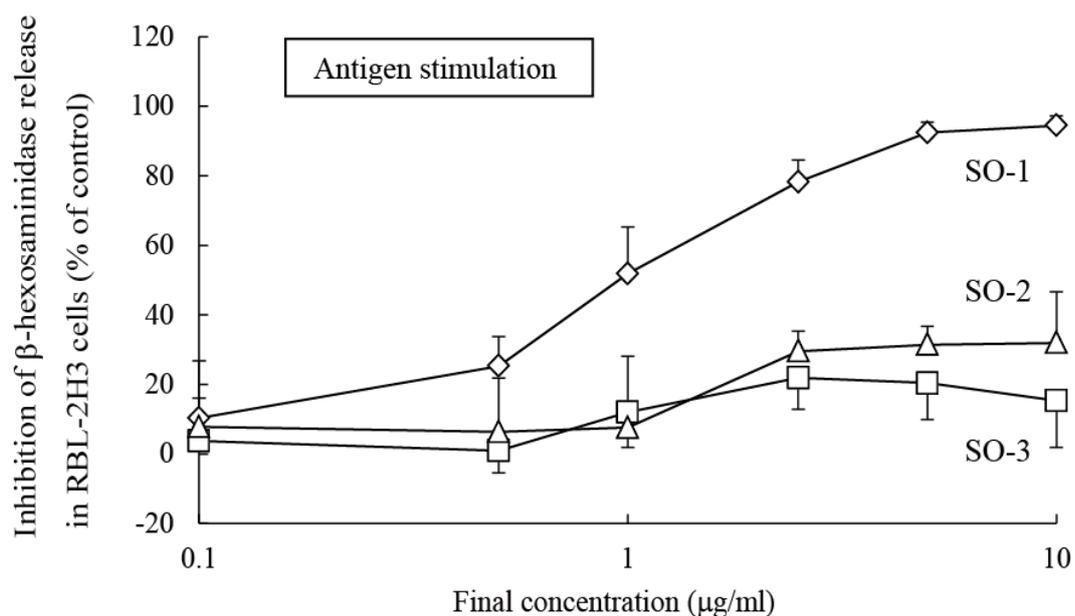


Fig. 7 Dose dependency of SO-1, 2 and 3 on IgE-mediated degranulation in RBL-2H3 cells

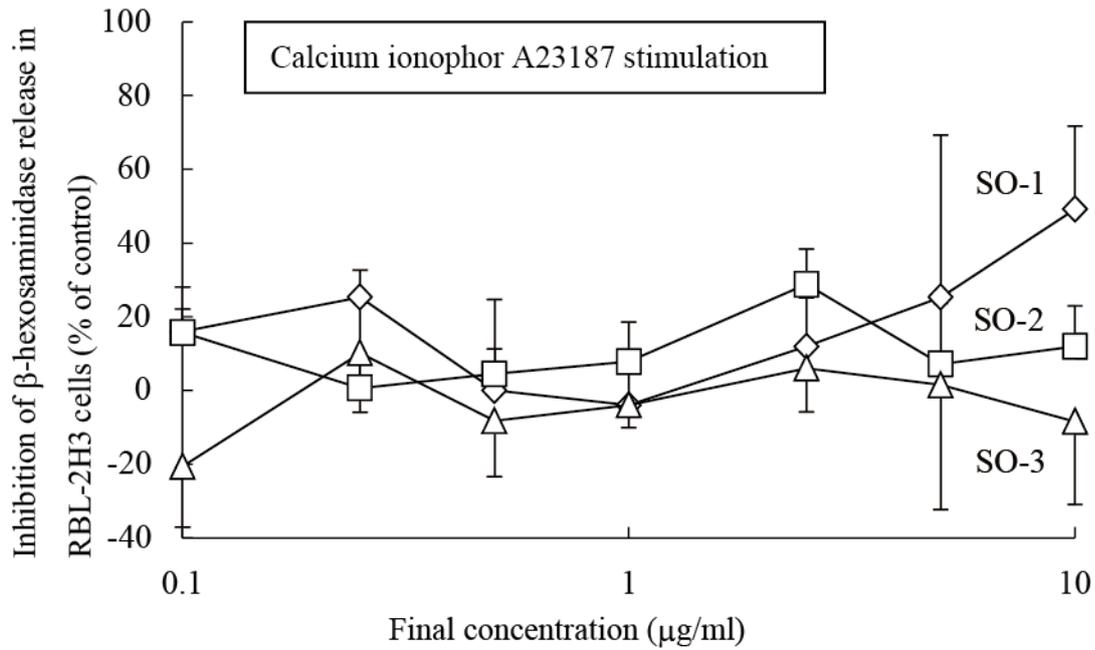


Fig. 8 Dose dependency of SO-1, 2 and 3 on Calcium ionophore-induced degranulation in RBL-2H3 cells

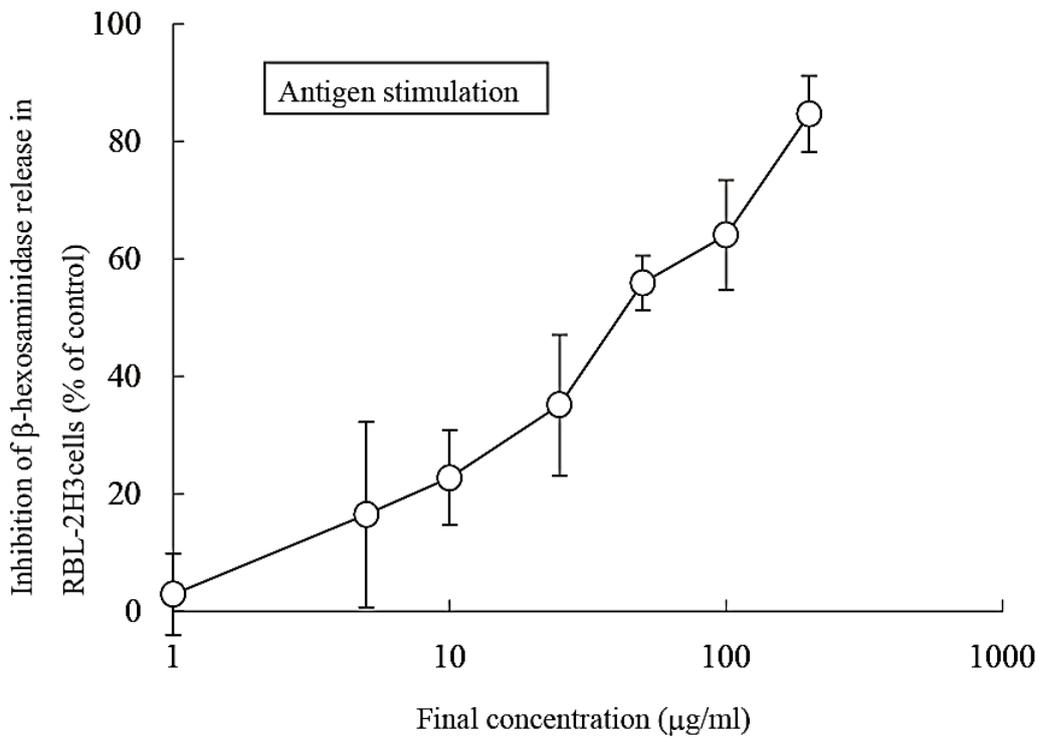


Fig. 9 Inhibitory effect of ketotifen fumarate salt on IgE-mediated degranulation in RBL-2H3 cells

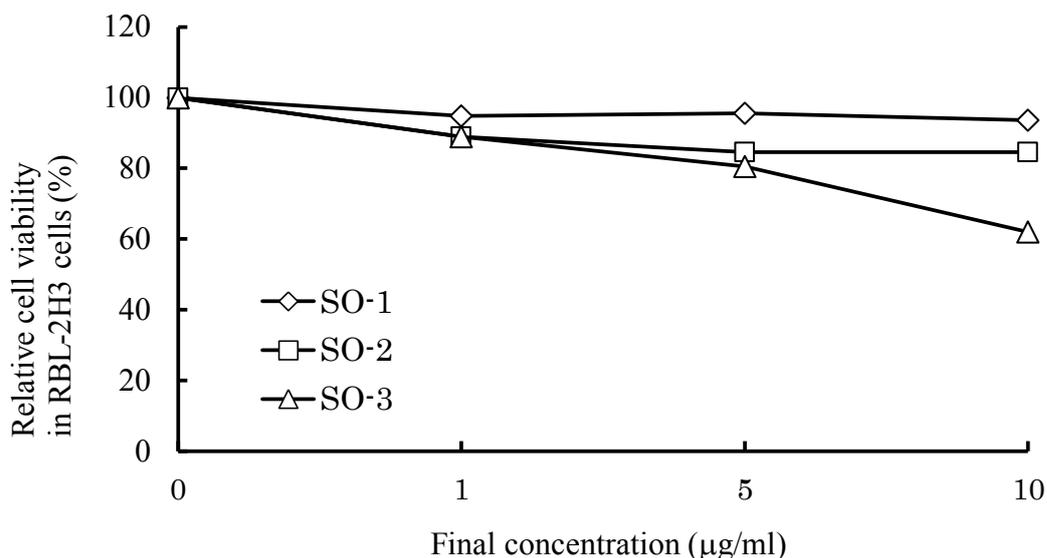


Fig. 10 Cytotoxicity of SO-1, 2 and 3 on RBL-2H3 cells

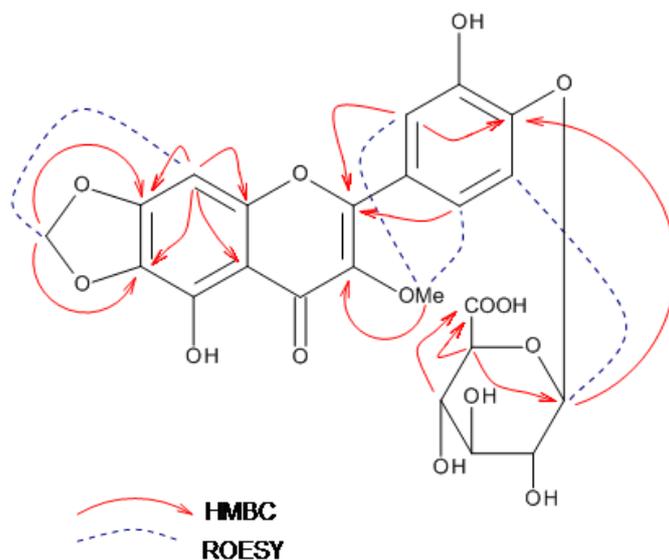
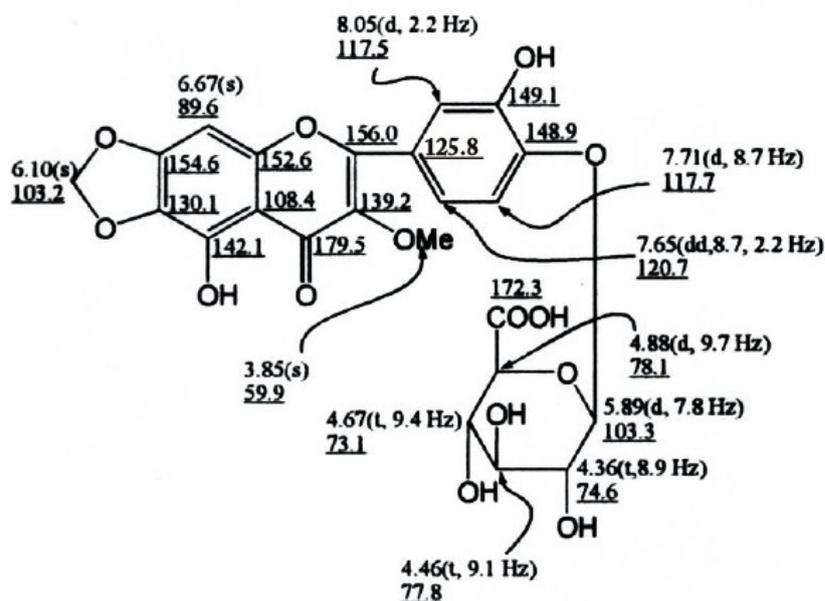
第二項 ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の構造解析

第一項で得た、SO-1、2、3 に関して HRMS、NMR、による構造解析を行った (Fig. 11, 12, 13)。¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトルからプロトンおよび炭素を帰属した結果、3 つの化合物は C6-C3-C6 のフェニルクロマン骨格を有するフラボノイドであり、B 環 4 位にグルクロン酸が結合しているフラボノイドのグルクロン酸配糖体と推定された。また SO-1 に関しては ¹H-NMR スペクトルより、複素環式化合物のシグナル 6.10 (2H, s) と ¹³C-NMR スペクトルより、エーテル化合物のシグナル (103.2 ppm) が考えられ、A 環の 6 位および 7 位にメチレンジオキシ基を有していると推定された (Fig. 11)。また SO-2 および SO-3 に関しては 3.94 (3H, s) のシグナルより、A 環 6 位にメトキシ基を有していると推定された (Fig. 12, 13)。また、3 つの化合物に共通する置換基として、3.85 (3H, s) のシグナルより、C 環 3 位にメトキシ基を有していると推定された。次に、HMBC および ROESY の結果から相関関係を帰属した。3 つの化合物に共通する B 環 4 位のグルクロン酸結合は、グルクロン酸の H1 位からアグリコンの B 環 C4 位への HMBC による相関が認められ、B 環 H5 位への ROESY による相関が認められた (Fig. 11, 12, 13)。次に SO-1 の A 環メチレンジオキシ基に関しては、メチレン

ジオキシ基のプロトンから A 環 C6 位および C7 位への HMBC による相関が認められた。さらに A 環 H8 位への ROESY による相関が認められた (Fig. 11)。また SO-2 および SO-3 の A 環 6 位のメトキシ基のプロトンから、A 環 C6 位への HMBC による相関が認められた。3 つの化合物に共通する C 環 3 位のメトキシ基のプロトンから、それぞれ C 環 C3 位への HMBC による相関が認められ、B 環 H2 位及び H6 位への ROESY による相関が認められた。SO-3 の B 環 3 位のメトキシ基のプロトンから、B 環 C3 位への HMBC による相関が認められた。また HRMS より、SO-1 は $C_{23}H_{21}O_{14}$ 、SO-2 は、 $C_{23}H_{23}O_{14}$ 、SO-3 は $C_{24}H_{25}O_{14}$ となり、フラボノイドのグルクロン酸配糖体であることが推定された (Fig. 11,12,13)。以上の結果からホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の構造式は、SO-1 が 5,3',4'-Trihydroxy-3-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone 4'- β -glucuronide (54, 55, 57)、SO-2 が Axillarin 4'- β -glucuronide (56, 57)、SO-3 が Jaceidin 4'- β -glucuronide (55, 57) であると同定した。いずれの化合物は既知のものであったが、脱顆粒抑制活性の報告はなく新規の生理活性であった。

^1H - NMR (700MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

^{13}C - NMR (175MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

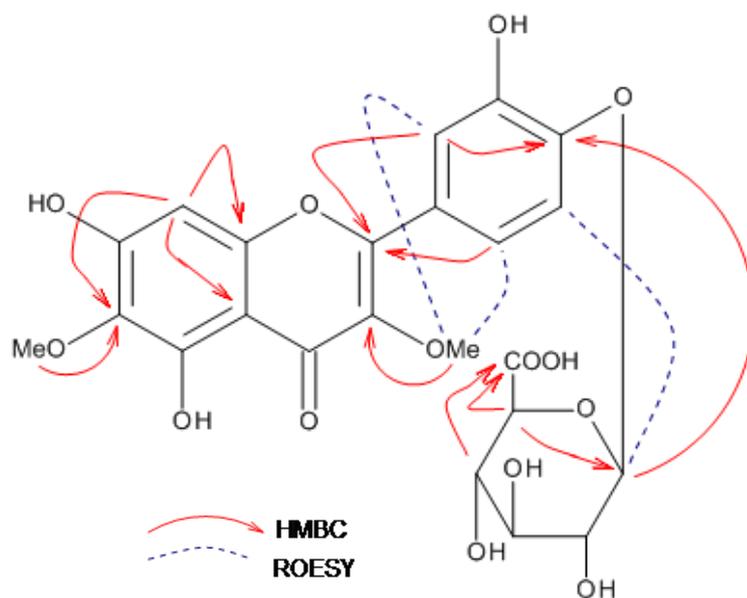
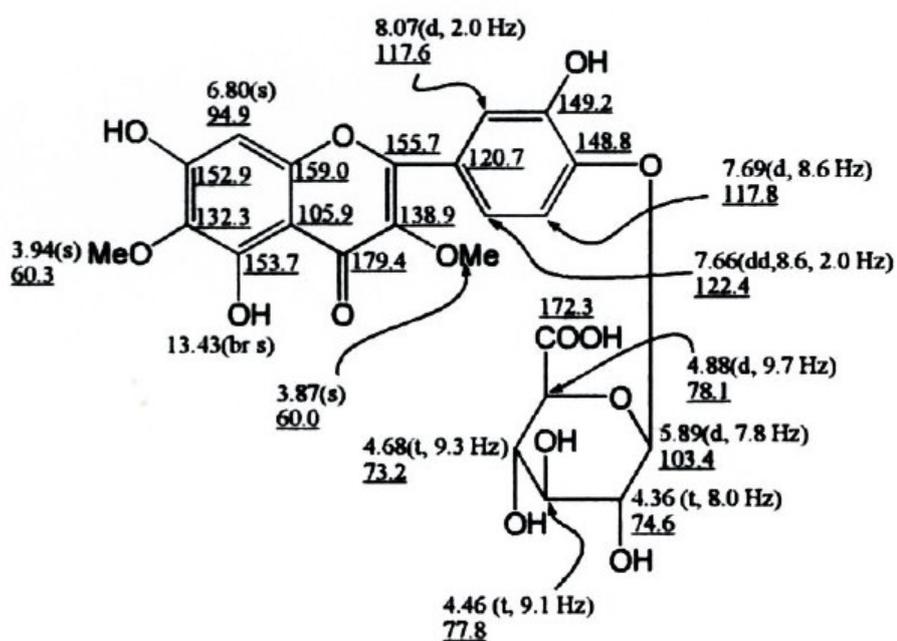


HR-ESI-MS; m/z 521.0941 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. 521.0931 for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_{14}$)

5,3',4'-Trihydroxy-3-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone

4'- β -glucuronide

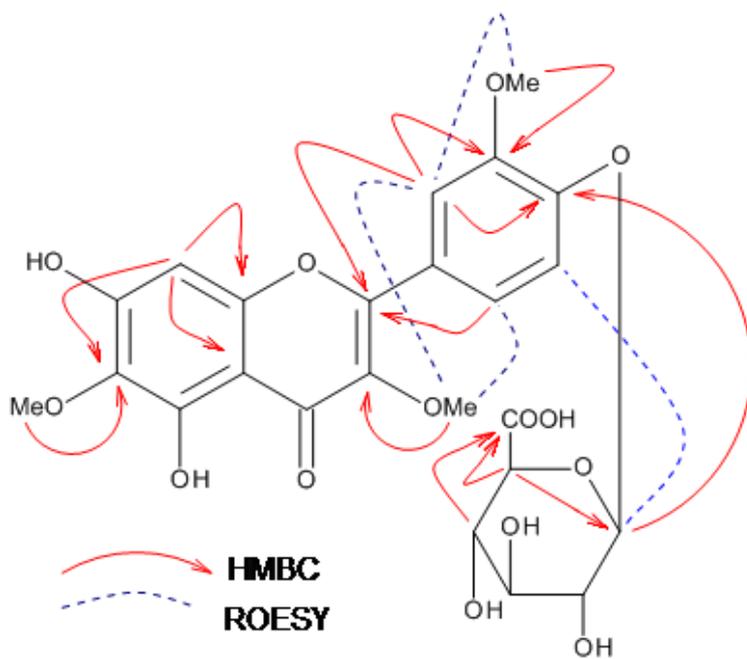
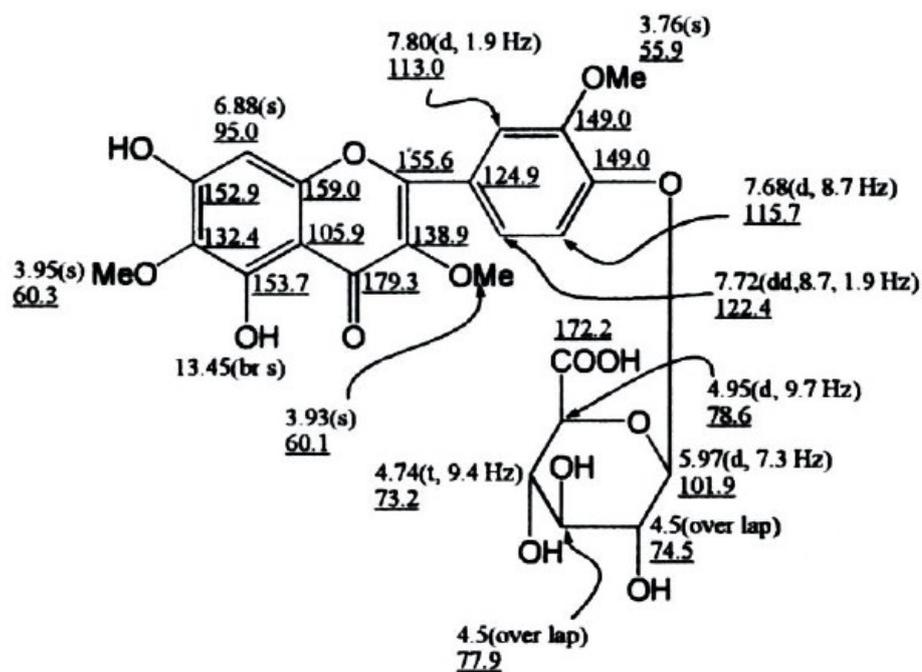
Fig. 11 Assignment of chemical structure of SO-1



HR-ESI-MS; m/z 523.1067 $[M+H]^+$ (calcd. 523.1088 for $C_{23}H_{23}O_{14}$)

Axillarin 4'- β -glucuronide

Fig. 12 Assignment of chemical structure of SO-2



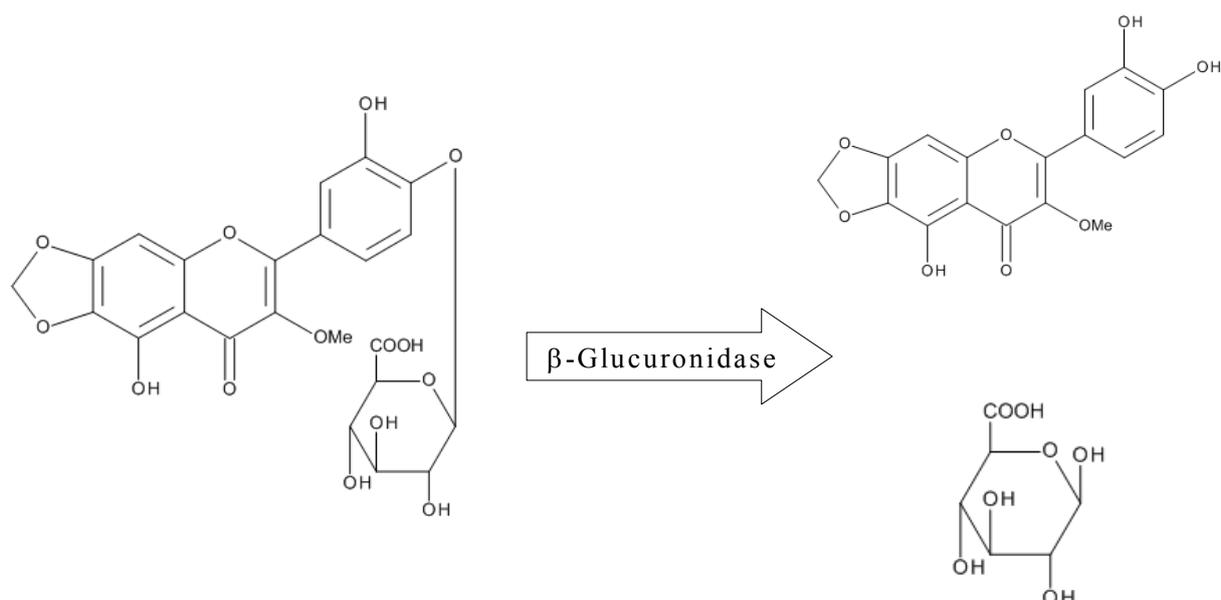
HR-ESI-MS; m/z 537.1234 $[M+H]^+$ (calcd. 537.1244 for $C_{24}H_{25}O_{14}$)

Jaceidin 4'- β -glucuronide

Fig. 13 Assignment of chemical structure of SO-3

第三項 β -グルクロニダーゼによるホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質 SO-1 の加水分解と生成物の単離

ホウレンソウ抽出物から単離された脱顆粒抑制物質 SO-1 は、フラボノイドのグルクロン酸配糖体であり、*in vitro* 細胞培養系では顕著な活性を示す物質であった。しかし、体内ではグルクロン酸の結合した化合物は消化吸収がされにくく、また生理活性の発現も抑制されると考えられる。そこで、グルクロン酸を除いたアグリコンの活性を評価するため SO-1 について、 β -グルクロニダーゼによる加水分解を行い、アグリコンを精製した。



Composition of reaction mixture

Enzyme 50 μ l

β -Glucuronidase (EC 3.2.1.31) Type HP-2 from *Helix pomatia*

Sample

SO-1 10 mmol/l dilution at buffer

Buffer 950 μ l

0.1 M Sodium acetate buffer (pH 5.2)-0.5 M Sodium chloride

Total 1000 μ l

Scheme 3 Enzymatic hydrolysis of SO-1 by β -glucuronidase

反応液を 37°C でインキュベートし、一定時間毎に一部採取し、HPLC により分析した。Fig. 14 に示すように、0 min と 120 min を比較すると、SO-1 のピーク (R.T.=9.6 min、図中に白矢印で示す) よりも後ろに大きなピークの出現が確認され、 β -グルクロニダーゼによる水解を確認した。最も遅いピーク (R.T.=23.9 min、図中に黒矢印で示す) は時間経過に従って量が増加していることから、SO-1 の主たる加水分解物と推定された。

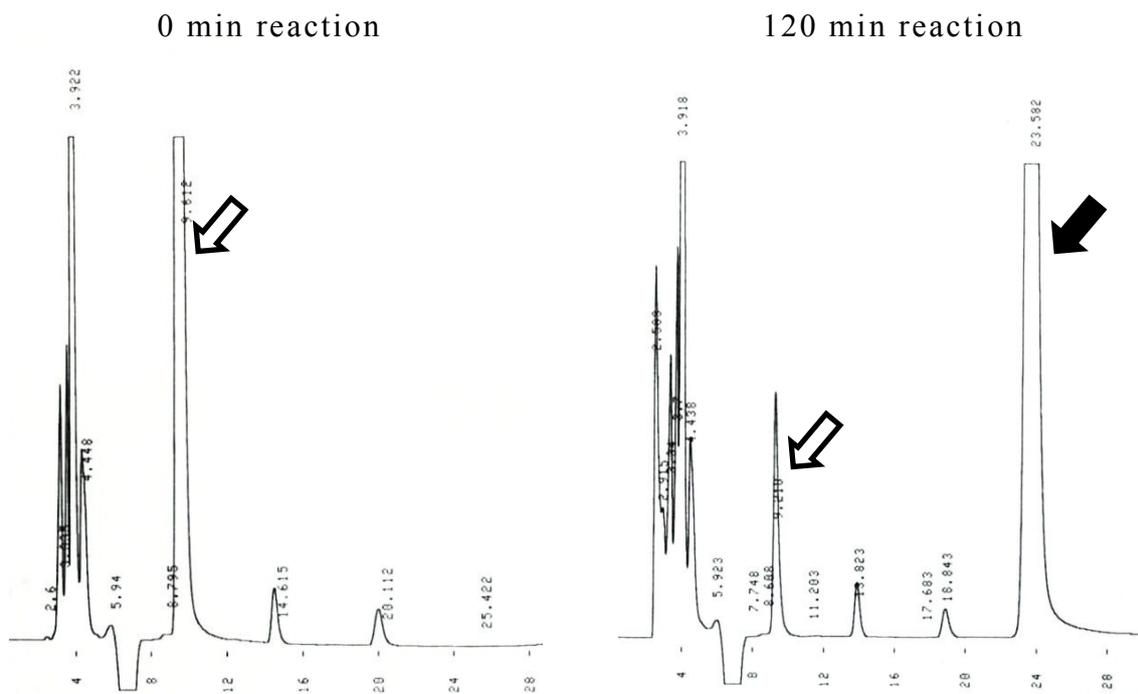


Fig. 14 HPLC profiles of enzymatic digests of SO-1

そこで、反応 3 時間の反応液から SO-1 の加水分解物を分離するため、分取クロマトグラフィーを行い、SO-1 の加水分解物と考えられる成分を精製した。その結果、SO-1 (18.6 mg) から主たる加水分解物 11.9 mg を得、その HPLC クロマトグラムから高度に精製されていることを確認した (Fig. 15)。

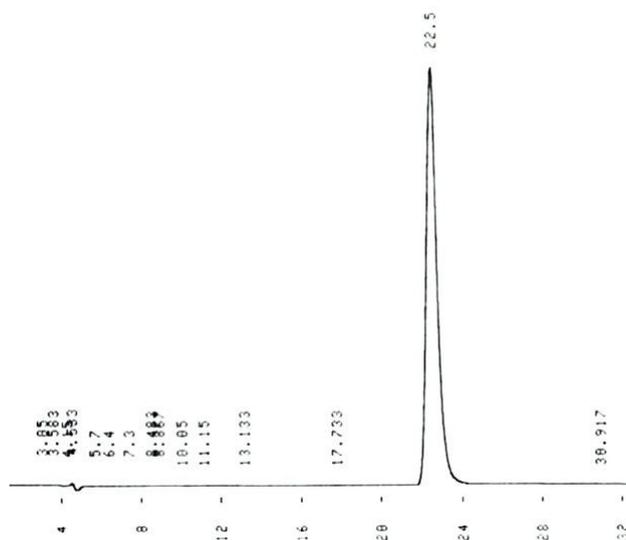


Fig. 15 HPLC profile of isolated product from β -glucuronidase-treated SO-1

HPLC のリテンションタイムから SO-1 のアグリコンであると予想される加水分解物について、分解前の SO-1 と UV スペクトルを比較することにより、成分の同定を行った。Fig. 16 に示すように UV スペクトルに類似性が確認され、吸収極大波長についてもほぼ同様の結果であったことから、加水分解産物は SO-1 のアグリコンであると特定した。

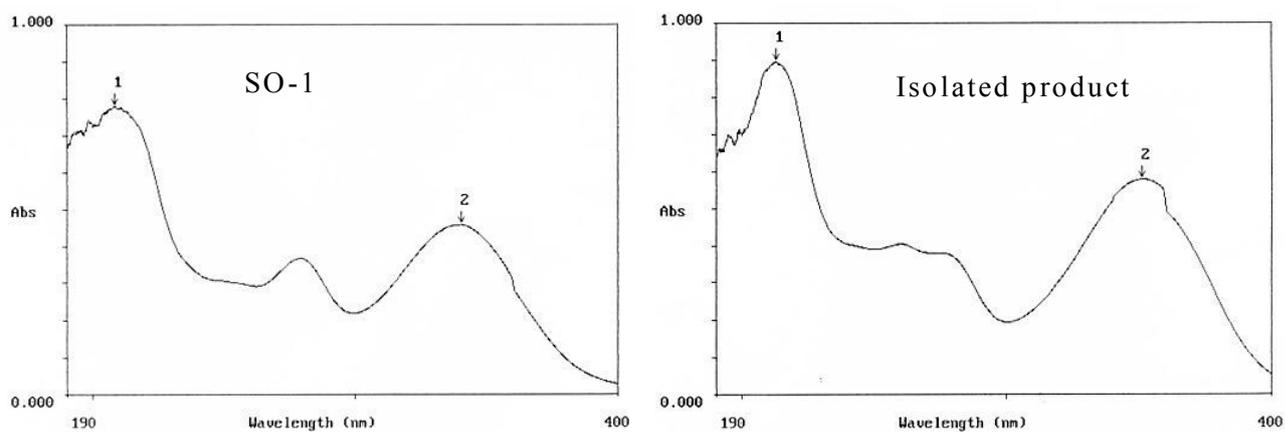


Fig. 16 Spectra of SO-1 and isolated product

第四項 脱顆粒抑制物質 SO-1 のアグリコンの脱顆粒抑制活性

SO-1 のβ-グルクロニダーゼ処理により調製したアグリコンについて、SO-1 と同様の方法で、脱顆粒抑制活性を評価した。抗原抗体刺激における脱顆粒に対する抑制活性を比較したところ、SO-1 は $IC_{50}=1.76 \mu M$ を示したのに対して、アグリコンは $IC_{50}=1.47 \mu M$ と、より低値を示し比活性の上昇が認められた (Fig. 17)。

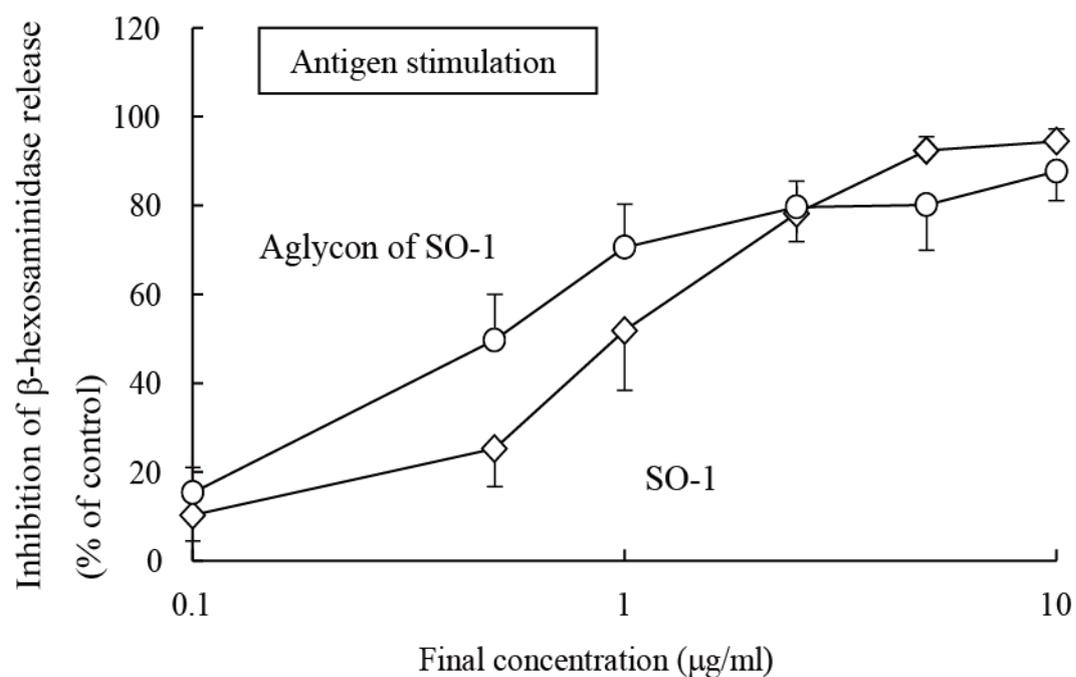


Fig. 17 Degranulation-inhibitory activity of aglycon obtained from SO-1

第五項 脱顆粒抑制物質 SO-1 のアグリコンの細胞障害性

脱顆粒抑制物質 SO-1 のアグリコンについて、SO-1 と同様に RBL-2H3 細胞における細胞障害性を測定した。SO-1 は脱顆粒抑制活性を示す濃度範囲において、ほとんど細胞障害性は示さないが、そのアグリコンは高濃度域で弱い細胞障害性を示すことが伺われた (Fig. 18)。

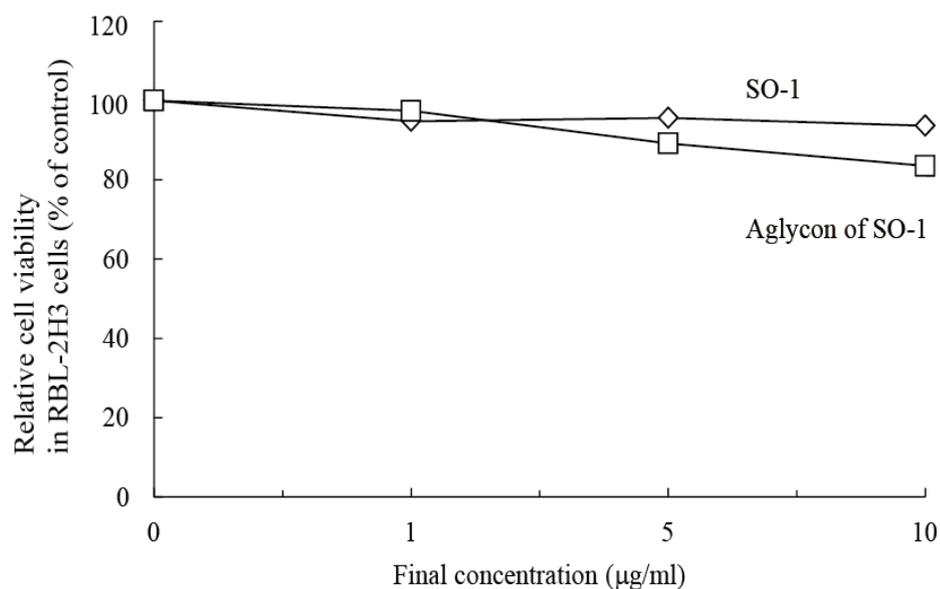


Fig. 18 Cytotoxicity of SO-1 and its aglycon on RBL-2H3 cells

第四節 小括

ホウレンソウ熱水抽出物から RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制活性を指標に単離・精製を行なったところ、3成分の脱顆粒抑制物質を得た。いずれも 3-メトキシフラボンのグルクロン酸配糖体と同定された (Fig. 11,12,13)。これらの物質については、ホウレンソウから分離された先行研究があり、その活性に抗酸化活性や抗腫瘍活性の報告はされているが、脱顆粒抑制活性についての報告はこれまでになく初めてである。抗原抗体刺激下で、もっとも強い脱顆粒抑制活性を示した SO-1 は、抗アレルギー剤である Ketotifen fumarate よりも強く、 $IC_{50}=1.76 \mu M$ を示した (Fig. 7, 9)。またその他の脱顆粒抑制物質である SO-2、SO-3 に関しては、弱いながらも抑制を示した (Fig. 7)。カルシウムイオノフォア刺激による脱顆粒に対して、3成分は弱い抑制かほとんど抑制を示さなかった (Fig. 8)。また WST-1 の結果、SO-1 は脱顆粒抑制活性を示す濃度範囲において、細胞障害性は認められなかった (Fig. 10)。

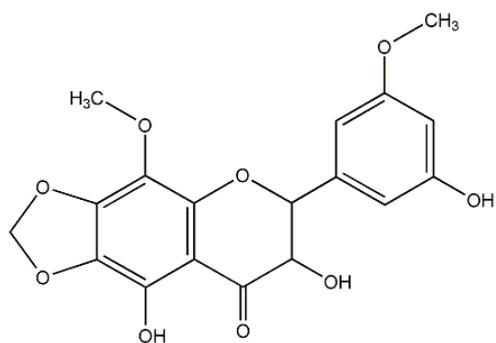
近年では脱顆粒抑制活性を示す成分が食資源からも多く発見されており、その数は年々増加している。例えば、レモンなどの柑橘類やイチゴ、小豆があり活性成分としてフラボノイドを中心に研究されている (58~63)。加えて、抽出液のクルードな状態で作用を示すものも見出され、それらの食品による I 型アレルギーの予防や改善が行われるかもしれない。また、I 型アレルギーの予防や改善に効果を見出した食品を実際の食事から取り入れるとなると、その作用濃度から摂取量が膨大になる場合があり、日々の食事により予防、改善を図るためには相応しくない。このため食品に脱顆粒抑制活性が認められた場合、その作用本体を見出し、低濃度での作用を検討および科学的に検証することで食事やサプリメントとして日常に取り入れることが可能になると考えられる。食資源由来脱顆粒抑制物質の多くは、*in vitro* 試験が主であり *in vivo* 試験は多くない (60~63)。また *in vivo* 試験では作用物質の経口投与を行う報告はほとんどなく、皮下や腹腔内投与がほとんどである。従って、食資源に由来する脱顆粒抑制物質を経口投与した実験系で評価することが求められる。

本実験で得たホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質は、3成分ともフラボノイドのグルクロン酸配糖体であり、クエルセチンやルテオリンなどのフラボノイドと同

様の C6-C3-C6 のフェニルクロマン構造を有している。しかし、ホウレンソウ由来のフラボノイドはグルクロン酸配糖体である一方、ルテオリンやアピゲニンはアグリコンである。先行研究からフラボノイドは配糖体化すると、その生理活性が低下することが知られていることから、ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質を β -グルクロニダーゼにより加水分解し、アグリコンを得て脱顆粒抑制活性を評価した(62,64)。結果から配糖体よりも強い脱顆粒抑制活性を示し、SO-1 は $IC_{50}=1.76 \mu M$ 、アグリコンは $IC_{50}=1.47 \mu M$ であった。これらの値は、既に脱顆粒抑制活性の知られているルテオリンやいずれのフラボノイドよりも高く植物起源の脱顆粒抑制物質として特記されるものである。しかも、グルクロン酸配糖体に同程度の強い活性が認められたことから B 環の構造より A 環、C 環が脱顆粒抑制活性に関与するかもしれない。さらに、今回単離した 3 化合物のなかで、強い抑制活性を示した SO-1 とアグリコンは、特徴的な A 環のメチレンジオキシ基を有しており、一方で弱い抑制活性を示した SO-2 および SO-3 に関しては A 環のメチレンジオキシ基は開裂し、メチル基とヒドロキシル基である。このことから、メチレンジオキシ構造が脱顆粒抑制活性に強く関与していると考えられる。

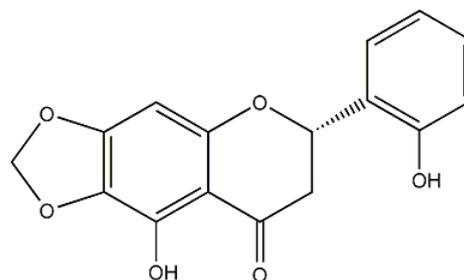
ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質として単離・精製した 3-メトキシフラボンのグルクロン酸配糖体である SO-1 は、他のフラボノイドと比較して A 環 6,7 位にあるメチレンジオキシ基が特徴的であり、脱顆粒抑制活性に寄与すると考えられる。この特徴的な置換基を持つフラボノイド、特にフラボノイド骨格の A 環 6,7 位にメチレンジオキシ基を有するフラボノイドを生合成する植物は少なく、フラバノンではイソマツ科ルリマツリ (66)、アヤメ科アイリス (65)、フラボンではホウレンソウやアカザ科ビート、ヒユ科 Blutaparone (67) がある。現在までの知見では SO-1 は唯一ホウレンソウから分離されたフラボノイドである。

フラバノン



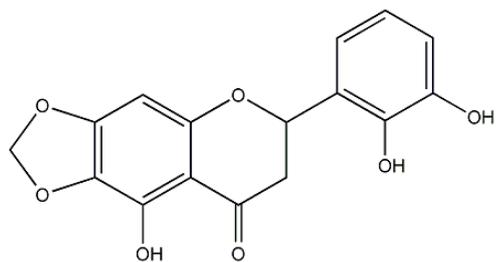
イソマツ科ルリマツリ

フラバノン

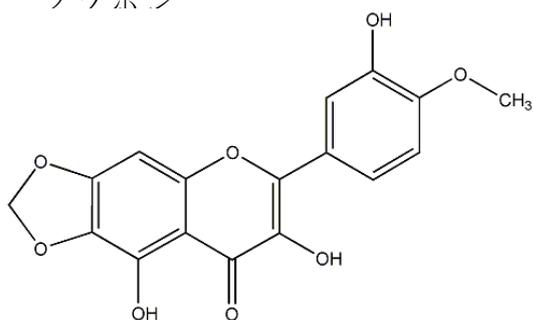


アヤメ科アイリス

フラボン



アヤメ科アイリス



Blutaparon のヒユ科

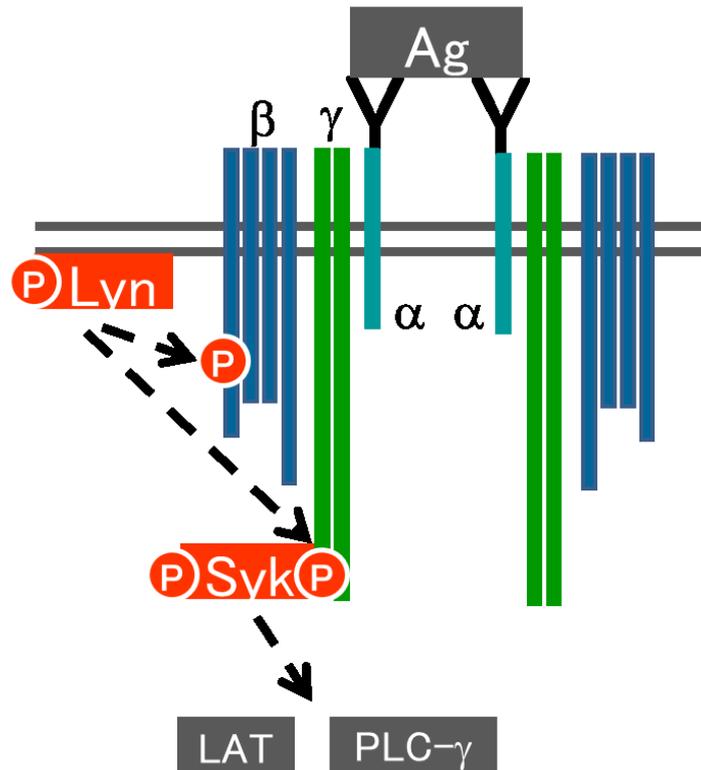
以上のことから、SO-1 のメチレンジオキシ基は脱顆粒抑制活性において重要な置換基であると考えられる。これについては第五章で既知のフラボノイドとの活性を比較し考察する。

第三章 ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の細胞内シグナル伝達における作用メカニズムの解析

第一節 序論

生体内におけるアレルギー応答は、特定の抗原と反応する特異的抗体に感作された肥満細胞や好塩基球に抗原刺激が加わることにより、ヒスタミンやセロトニンなどの炎症性メディエーターが放出されること、さらにこれに引き続いて。好酸球やマクロファージなどの免疫細胞が遊走し炎症箇所でもより強度の反応が惹起されることによる。このように炎症性メディエーターの放出（脱顆粒）は、アレルギー応答初期に生じる反応であるため、抗原刺激後の細胞内シグナル伝達の解析は抗アレルギー作用を解明するための重要な要点となる（1, 2, 20）。

細胞内シグナル伝達に関して、主要なシグナル分子として Lyn タンパク質（tyrosine-protein kinase ; Lyn）、脾臓チロシンキナーゼ（spleen tyrosine kinase; Syk）、ホスホリパーゼ C（phospholipase C; PLC）、が挙げられる。これらのシグナル分子は、抗原が IgE を介して FcεRI に結合し、脱顆粒を惹起するための起点となる。まず Lyn は Fcε受容体のβ鎖と会合し、自己リン酸化を起こす、この分子がγ鎖の免疫受容活性化チロシンモチーフ（immunoreceptor tyrosine based-activation motif; ITAM）をリン酸化する。Lyn によるリン酸化を受けた g 鎖に Syk が Src 相同性領域 2（src-homology 2;SH2）を介して会合し、自己リン酸化を生じることで、さらに下流へシグナル伝達が起こる（Scheme 4）。



Scheme 4 IgE-mediated stimulation system focused on Lyn and Syk

ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質である SO-1 とそのアグリコンは RBL-2H3 細胞の抗原抗体刺激において、低濃度で効果的に脱顆粒の指標である β -ヘキソサミニダーゼ遊離を抑制することが示された。この脱顆粒抑制作用メカニズムを解析するため、RBL-2H3 細胞を抗原抗体刺激した際の細胞内シグナル伝達をウェスタンブロッティングにより評価した。評価対象のシグナル分子として Lyn、Syk、細胞外シグナル制御キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase; ERK) のリン酸化を評価した。また脱顆粒シグナルカスケードの下流に位置する細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) の濃度変化に関して、Fura 2-AM を用い評価を行った。すなわち、細胞膜を容易に透過する Fura 2-AM は細胞内エステラーゼによる分解を受け、細胞内 Ca^{2+} と結合する Fura 2 となる。Fura 2 は細胞内 Ca^{2+} 濃度が高くなると 340 nm で励起する蛍光強度が上昇し、一方で 380 nm で励起する蛍光強度が低下する。このため蛍光強度比 ($R = F_{\text{ex}340 \text{ nm}} / F_{\text{ex}380 \text{ nm}}$) を求めることにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度を評価することが可能となる。細胞内の Ca^{2+} 濃度は脱顆粒シグナル伝達の上流部 (Lyn や Syk) のリン酸化が抑制されることによって抗原抗体刺激後も低値を示すと考えられる。

第二節 材料および実験方法

第一項 タンパク回収

試薬

- PPIS (Protease and phosphatase inhibitor solution)

154 mg/ml DTT(Dithiothreitol)、10 mg/ml leupeptin、1 mg/ml pepstain A になるよう超純水に溶解し、50 μ l ずつチューブに分注し、-28°C で保存した。

- Aprotinin solution

超純水に aprotinin を 10 mg/ml になるよう溶解し、50 μ l ずつチューブに分注した後 -28°C で保存した。

- PMSF-DMSO solution

11.5 μ l の DMSO に 1 mg の PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)を溶解した(用時調製)。

- Lysis buffer

MOPS(Sigma Aldrich Co.)を 25 mM になるよう超純水に溶解し、1N の NaOH を用いて pH 7.2 に調整した。その後、15 mM EGTA (Kanto Chemical Co.)、40 mM β -glycerophosphate(Kanto Chemical Co.) 15 mM MgCl₂(Wako Pure Chemical)、15 mM *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma Aldrich Co.)、0.2 mM Na₃VO₄ (Sodium orthovanadate, Wako Pure Chemical) になるよう溶解した。ろ過滅菌した後、褐色ビンで-4°C に保存した(使用期限 1 カ月)。この溶液 1 ml を用時、10 μ l PPIS、10 μ l Aprotinin、2 μ l PMSF、10 μ l Triton X-100 (Nacalai tesque) と混合し、Lysis buffer として用いた。

- PBS (-)

PBS(-) (phosphate buffered saline, Nissui Pharmaceutical Co.) 9.6 g を純水に溶解した後、全量を 1 L にメスアップした。濾過滅菌した後、6°C で保存した。

細胞培養

対数増殖期の RBL-2H3 細胞を細胞培養液で 100×10^4 cells/dish になるよう 60 mm ディッシュ (Nunc) に播種した後、抗 DNP-IgE 抗体を終濃度 50 ng/ml となるように添加し、一晚 37°C、5%CO₂ インキュベーターで培養した。培養後、Tyrode HEPES buffer でディッシュを二度洗浄後、試料を各濃度添加し 30 分間 37°C、5%CO₂ インキュベーターで培養した。その後、DNP-HSA 抗原を終濃度 50 ng/ml になるように添加した。処理 15 分及び 30 分、60 分後に細胞をセルスクレイパーで剥がし、PBS(-)を 4 ml 加え回収した。回収した細胞懸濁液を 9500×g、3 分間、4°C で遠心し、上清を除去したのち底部のペレットに Lysis buffer を加え、細胞溶解液とした。細胞溶解液を 9500×g、10 分間、4°C で遠心後、上清を Western blotting の試料として回収し、-80°C で保存した。

第二項 Bradford 法によるタンパク定量

試薬

・ BSA solution

ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA, Sigma Aldrich Co.) を 1 mg/ml になるように純水に溶解し、280 nm における吸光度が 0.630 になるよう純水で調整した。0.6 ml チューブに 100 µl ずつ分注し、-30°C に保存した。測定時には純水で各濃度の希釈系列を作製した。

測定方法

96 well assay plate (IWAKI) に 500、250、125、62.5 µg/ml になるよう希釈した BSA solution 及び純水で希釈した細胞溶解液を 10 µl、Bradford reagent (Sigma Aldrich Co.) 200 µl を混合してマイクロプレートミキサー (NS-P, Iuchi) で 5 分間攪拌した後、マイクロプレートリーダー (Model 550, Bio-Rad) を用いて 595 nm における吸光度を測定した。細胞溶解液中のタンパク質量は BSA solution の検量線から BSA 換算した。

第三項 Western blotting による細胞内シグナル伝達の解析

試薬

- Sample buffer

4% SDS (Sodium lauryl sulfate; SDS, Wako Pure Chemical)、20% glycerol (Kanto Chemical Co.)、10% 2-mercaptoethanol (Wako Pure Chemical) となるように 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8, Wako Pure Chemical) で調製した。

- TBS (Tris buffered saline)

25 mM Tris-HCl、0.25 M NaCl (Kanto Chemical Co.) を純水に溶解した後、pH 7.4 に調整した。

- TBST (TBS-Tween)

Tween-20 (Sigma Aldrich Co.) を終濃度 0.05% になるように TBS に溶解した。

- ブロッキング溶液

スキムミルク (Wako Pure Chemical) を 0.8% になるように TBST に溶解した。

- メンブレン

PVDF (Polyvinilidene Difluoride) メンブレン (Millipore) を用いた。

- 泳動用緩衝液

3.03 g の Tris 及び 1 g の SDS、14.4 g の glycine (Wako Pure Chemical) を純水で 1 L になるよう溶解した。

- 転写用緩衝液

20%メタノールになるよう泳動用緩衝液で調製した。

- 抗体

一次抗体 : Phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) Antibody, Source; Rabbit (1000 times diluted, Cell Signaling), p-Syk (Y525/526)(C87C1) Rabbit Antibody, Source; Rabbit (1000 times diluted, Cell Signaling), p-Lyn (Tyr507) Antibody, Source; Rabbit (1000 times diluted, Cell Signaling), β -Actin polyclonal Antibody, Source; Rabbit (200 times diluted, Funakoshi)

二次抗体 : Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody(3000 (MAP, p-Lyn, β -Actin) or 1000 (p-Syk) times diluted, Cell Signaling)

- ・ 発光基質

Immobilon Western (Millipore)

- ・ 剥離溶液

WB Stripping solution (Nacalai tesque)

方法

泳動試料（10 $\mu\text{g protein/lane}$ ）に等量の Sample buffer を加え、100°C で 5 分間加熱処理したものを泳動用試料とした。試料は 12.5% SDS-PAGE ゲルにて分離を行った。泳動条件は 200 V 定電圧で 45 分間行った。泳動後のゲルは 15 分間、メンブレンは 30 分間、20%メタノール溶液に浸した後、ゲルから PVDF メンブレンに 5.5 mA/cm² 定電流で 30 分間転写した。次いで、ブロッキング溶液で 1 時間ブロッキングを行い、一次抗体を反応させた。一次抗体は 0.8%スキムミルク-TBST で希釈したものを用いた。次に PBST で 10 分間の洗浄を 3 回を行い、0.8%スキムミルク-TBST で希釈した二次抗体を反応させた。その後、PBST で 10 分間の洗浄を 3 回を行い、発光基質を添加し 5 分間反応させ Ez-capture II (ATTO) で発光バンドを検出した。

第四項 細胞内 Ca²⁺動態の測定

試薬

- ・ Recording medium

Recording Medium (2 \times) 5 mL に 250 mmol/l Probenecid を 50 μl 加え、これに全量が 10 ml になるよう純水を加えて混合した。使用する前に Recording Medium を 37°C インキュベーターで保温した。

- ・ Loading buffer

DMSO (Dimethylsulfoxide, Kanto Chemical Co.) を 50 μl 、Fura-2AM (50 μg) に加え、溶解した。Recording Medium (2 \times) を 5 ml 取り、5% pluronic F-127 を 80 μl 、250 mmol/l Probenecid を 50 μl 添加し、これに全量が 10 ml になるよう純水を加え、よく混合した。Fura 2-AM 溶液を 50 μl を添加し、超音波で溶解した。

方法

細胞内 Ca^{2+} 濃度は Calcium Kit-Fura 2 (Dojindo) を用いて測定した。RBL-2H3 細胞を 96 well flat plate (Nunc) に 5×10^4 cells/90 μl /well で播種し、 37°C 1 時間、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーターで培養した。インキュベート後、マウスモノクローナル抗 DNP-IgE 抗体溶液を 0.5 μg /10 μl / well 添加し、 37°C 24 時間、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーターで培養した。その後、細胞培養液を除去し、 37°C に加温しておいた PBS(-) で well を 2 回洗浄した。Fura 2-AM を含む Loading buffer を 100 μl /well 添加し、 37°C 1 時間、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーターで培養した。細胞を傷つけないよう Loading buffer を吸引除去し、再び PBS(-) で 2 回洗浄し、Recording medium または Recording medium で希釈した試料を 80 μL /well ずつ加え、 37°C 30 分間でインキュベートした。その後、DNP-HSA 溶液 (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 20 μl 添加し、蛍光強度変化を蛍光プレートリーダーで測定した ($\lambda_{\text{ex}}=340 \text{ nm}/380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=510 \text{ nm}$)。

第五項 統計処理

数値は 3 つの測定値からの平均 \pm 標準誤差 (SEM) を求め、エラーバーとしてグラフ中に示した。3 回未満の実験では、平均値のみを示した。有意差検定では実験系に合わせて Student *t*-test または paired *t*-test、分散分析 one-way ANOVA 及び Dunnett test を行った。

第三節 実験結果

第一項 Western blotting による細胞内シグナル伝達分子のリン酸化の解析

抗 DNP-IgE 抗体で感作した RBL-2H3 細胞にホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質 SO-1 または SO-1 アグリコンを添加し、抗原抗体刺激した際の細胞内リン酸化型 Syk、Lyn、ERK の検出を行った。Fig. 18 に示すように、抗原刺激後 15 分の細胞内リン酸化型 Syk が SO-1 及び SO-1 アグリコンの終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ において顕著に抑制されていた。また 1 $\mu\text{g/ml}$ においてもリン酸化抑制が認められた。抗原刺激後 30 分におけるリン酸化型 Syk の発現では、15 分処理よりも強いリン酸化抑制作用を示した。また抗原刺激後 60 分におけるリン酸化型 Syk の発現では、30 分処理よりも弱いものの 15 分処理よりも強いリン酸化抑制作用を示した。これらは SO-1 と SO-1 アグリコンともに認められた。

リン酸化型 Lyn に関しては、Fig. 19 に示すように抗原刺激後 15 分において、Syk よりも弱いながらも SO-1 の終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ においてリン酸化抑制が認められた。一方で SO-1 アグリコンでは終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ に強いリン酸化抑制が認められた。また抗原刺激後 30 分では SO-1 のみが Lyn のリン酸化を抑制した。SO-1 アグリコンはリン酸化抑制を示さなかった。抗原刺激後 60 分では SO-1 及び SO-1 アグリコンは Lyn のリン酸化を抑制しなかった。

リン酸化型 ERK に関しては抗原刺激後 15 分において、SO-1 の終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 共にリン酸化抑制は認められなかった。一方で SO-1 アグリコンでは終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ においてリン酸化抑制が認められた。また抗原刺激後 30 分では SO-1 アグリコンのみに ERK のリン酸化抑制作用が認められた。また抗原刺激後 60 分では SO-1 アグリコンによる ERK のリン酸化抑制作用は認められなかった。

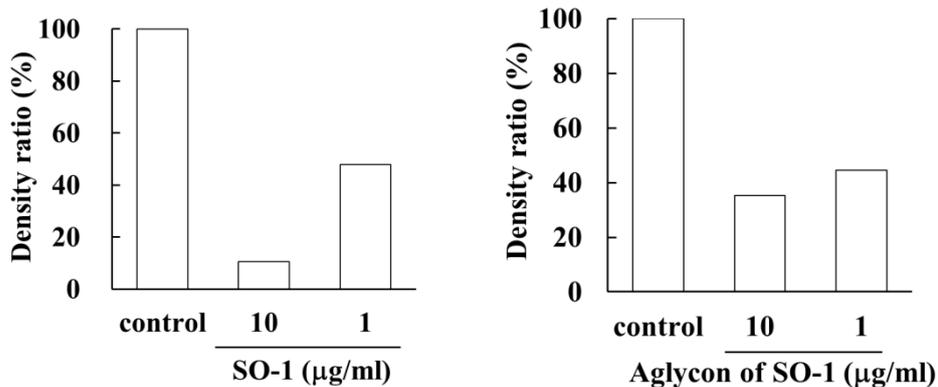


Fig. 18 Effects of SO-1 and its aglycon on antigen-stimulated phosphorylation of Syk

IgE-sensitized RBL-2H3 cells were treated with or without samples at the indicated concentrations. Fifteen minutes after the stimulation with antigen.

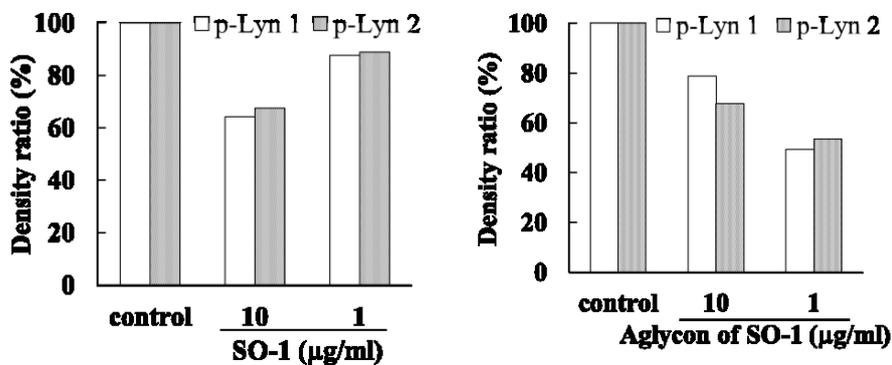


Fig. 19 Effects of SO-1 and its aglycon on antigen-stimulated phosphorylation of Lyn

IgE-sensitized RBL-2H3 cells were treated with or without samples at the indicated concentrations. Fifteen minutes after the stimulation with antigen.

第二項 ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の細胞内 Ca^{2+} 動態に及ぼす影響

Calcium Kit Fura 2 を用いて抗原抗体刺激した際の SO-1 及び SO-1 アグリコンが細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす作用を評価した。

細胞内 Ca^{2+} 濃度は抗原である DNP-HSA で処理した場合と未処理の場合では顕著な差が認められ、脱顆粒シグナル伝達系及び細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は正常に行われていることが確認された。感作した RBL-2H3 細胞に SO-1 及び SO-1 アグリコンで処理した後、抗原抗体刺激したところ SO-1 では脱顆粒抑制活性の IC_{50} よりも遥かに低濃度である $0.1 \mu\text{g/ml}$ では 50% 程度の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の抑制を示した。一方で $1 \mu\text{g/ml}$ 及び $10 \mu\text{g/ml}$ においては約 100% の抑制を示し、抗原抗体刺激を行っていない細胞と同等の Ca^{2+} 濃度であった。

SO-1 アグリコンに関しては $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ のいずれの終濃度においても細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を顕著に抑制し、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ では配糖体の SO-1 よりも強い作用を示した。

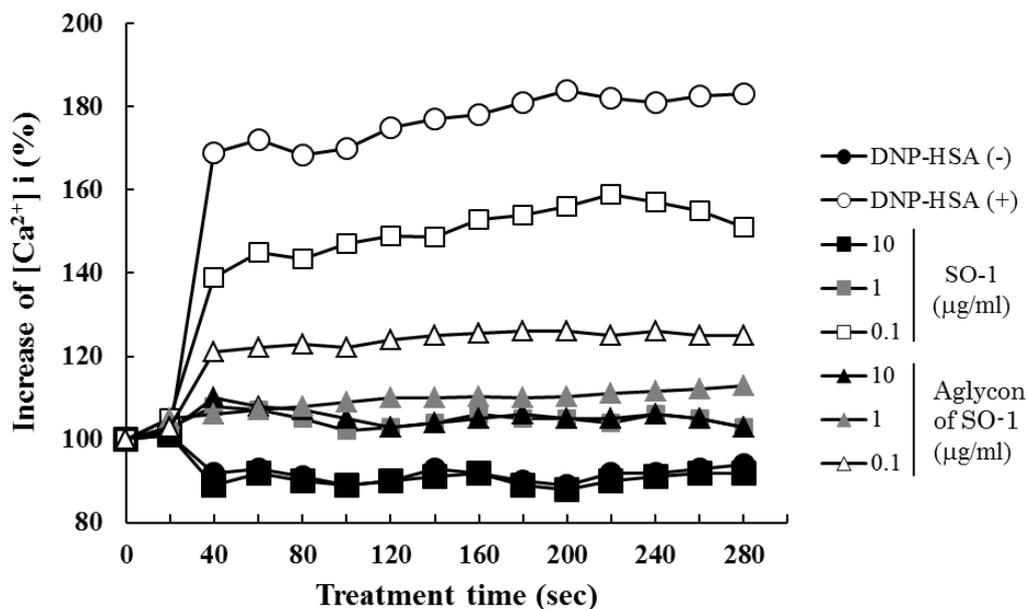


Fig. 20 Effects of SO-1 and its aglycon on antigen-stimulated elevation of intracellular Ca^{2+} levels in RBL-2H3 cells.

IgE-sensitized RBL-2H3 cells were treated for 30 min with or without samples at the indicated concentrations. After the stimulation with antigen at 20 seconds, intracellular Ca^{2+} levels were measured.

第四節 小括

SO-1 および SO-1 アグリコンでは Lyn のリン酸化、その下流に位置する Syk のリン酸化が抑制されていることが認められた。また SO-1 および SO-1 アグリコンの作用時間によるリン酸化への影響を評価したところ、Lyn と Syk は反応 15 分で抑制が認められたが、30 分後には Lyn のリン酸化抑制は消失し、Syk のみリン酸化を抑制していた（データは示していない）。このため、SO-1 と SO-1 アグリコンの作用点は Syk を含めた細胞膜近傍、もしくは FcεRI に対して作用し、Fc 受容体を構成する複合体タンパク質のリン酸化を抑制している可能性が考えられた。

さらなるシグナル伝達解析として、抗原抗体刺激した際の脱顆粒抑制活性における細胞内 Ca^{2+} 濃度の動態変化を確認したところ、10 $\mu\text{g/ml}$ の SO-1 および SO-1 アグリコン処理した細胞は、抗原刺激した細胞と比較して、顕著な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の抑制を示し、濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を低下させた。抗原刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇には 2 つの経路があり、1 つは細胞内 Ca^{2+} 貯蔵庫である小胞体からの放出、もう 1 つは細胞外からの Ca^{2+} 流入がある (58,59)。抗原抗体刺激により細胞内にシグナルが流れるとイノシトール三リン酸 (inositol trisphosphate; IP3) が小胞体の IP3 レセプターに結合し、小胞体内に貯蔵された Ca^{2+} を細胞質へと放出する。前者の小胞体からの Ca^{2+} の不出は迅速かつ一過性であるのに対し、後者の細胞外からの Ca^{2+} の流入は持続的である。SO-1 および SO-1 アグリコンが抗原刺激による Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制させたのは、小胞体からの Ca^{2+} 放出、また小胞体中の Ca^{2+} 減少に伴う細胞外からの Ca^{2+} 流入を阻止したためであると言える。

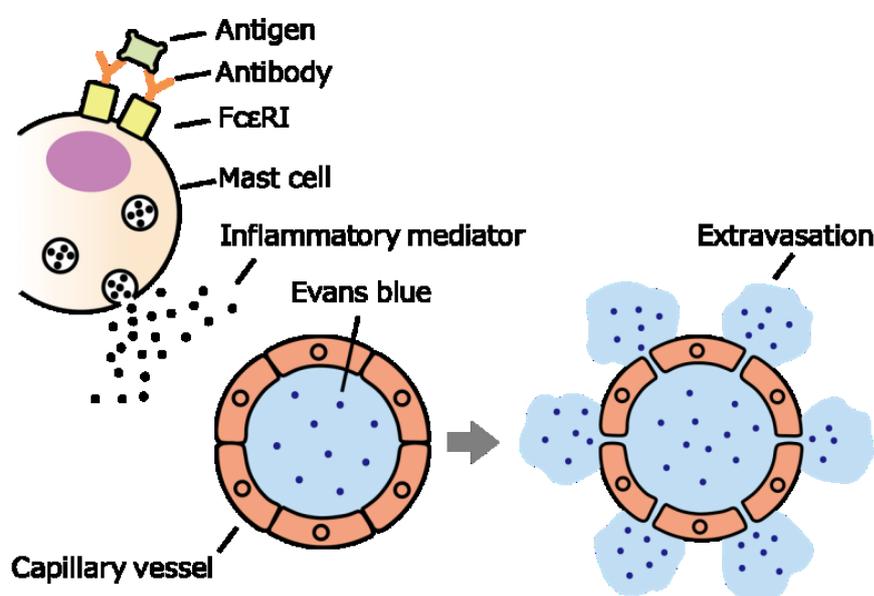
以上のことから、細胞内 Ca^{2+} 濃度の抑制が確認できた理由として、細胞内シグナル伝達の上流に位置する Lyn や Syk もしくは FcεRI を介したリン酸化の抑制により、シグナル伝達が制御され、下流へのシグナル伝達が抑制されたためであると示唆される。

第四章 ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質のマウスにおける 抗アレルギー活性の評価

第一節 序論

ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質は、RBL-2H3 細胞を用いた *in vitro* 試験において既知抗アレルギー剤よりも強い作用を認め、その作用は脱顆粒シグナル伝達に関わるシグナル因子の一つである Syk のリン酸化を抑制していることが示唆された。しかし、実際にこれらの化合物が生体に摂取された場合には、消化管を経た吸収から体内での代謝、分布、排泄の過程で抗アレルギー作用が失われることがある (68,69)。そこで本章では実験動物を使用し、I 型アレルギーを再現したモデル実験 (受動皮膚アナフィラキシー反応、passive cutaneous anaphylaxis: PCA) を行った。また作用解析のため、炎症性メディエーターであるヒスタミンとセロトニンによる血管透過性亢進作用に対する効果も検討した。

In vivo 試験における抗アレルギー評価にはラットやマウスなどの動物を用いたアレルギーモデルが用いられている。特に I 型アレルギーモデルには、PCA 反応、実験的気管支喘息モデル、鼻炎モデル、アナフィラキシーショック、アトピー性皮膚炎モデルが知られている。本実験では、抗アレルギー薬のスクリーニングに適した、PCA 反応に対する抗アレルギー評価を行った。



Scheme 5 Passive cutaneous anaphylaxis reaction *in vivo*

PCA 反応は、免疫グロブリン IgE の Fc 部分を介した細胞の受動感作と抗原抗体反応による肥満細胞からのケミカルメディエーターの遊離、遊離したメディエーターによる血管透過性亢進までの一連のアレルギー反応である (Scheme 5)。手法として、ある抗原に特異的な IgE 抗体を皮下注射し、周辺のマスト細胞表面にある FcεRI に結合させ、感作する。その後、静脈に抗原を投与することで、感作している箇所では血管透過性亢進や浮腫など炎症性反応が惹起される。この反応を抑制することが確認できれば、生体での抗アレルギー活性を定量的に測定できる。

第二節 材料及び方法

第一項 受動皮膚アナフィラキシー反応における SO-1 および SO-1 アグリコンの作用

試薬

- ・ 0.86% NaCl 溶液

0.86%となるように NaCl (Kanto Chemical Co.) を純水に溶解し、0.22 μm フィルターで濾過滅菌した。

- ・ マウスモノクローナル抗 DNP-IgE 抗体溶液

マウスモノクローナル抗 DNP-IgE 抗体 (Sigma Aldrich, Co.) は、1 mg/ml を 5 μl ずつ分注し、冷凍保存した。実験に使用する時、0.86% NaCl 溶液で所定の濃度に希釈した。

- ・ DNP-HSA 溶液

DNP-HSA 溶液 (Sigma Aldrich, Co.) を超純水に希釈し (遮光)、Evans blue 溶液と混合して終濃度 0.4 mg/ml となるように調整した。

- ・ エバンスブルー溶液

エバンスブルー (Sigma Aldrich, Co.) を 0.86% NaCl 溶液に溶解し、DNP-HSA 溶液と混合して 1% となるように使用した。

- ・ 5% アラビアガム水溶液

アラビアガム (Sigma Aldrich, Co.)を 5% (w/v) になるよう秤りとり、純水で溶解した。

- ・ オキサトミド

オキサトミド (Wako Pure Chemical) を経口投与量 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ になるよう 5%アラビアガムに懸濁し、均一になるようミキサー (Iedatrading Co.)を用いてホモジナイズしたものを使用した。

- ・ SO-1 および SO-1 アグリコン

オキサトミドと同様に 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ になるよう 5%アラビアガムに懸濁し、均一にしたものを順次 5%アラビアガムで希釈し使用した。

- ・ 1 N KOH 水溶液

1 N となるように KOH (Nacalai Tesque)を純水に溶解した。

- ・ 0.6 N H₃PO₄ 水溶液

0.6 N となるように H₃PO₄ (Kanto Chemical Co.) を純水で希釈して用いた。

- ・ アセトン-0.6N H₃PO₄ 混液

アセトン (Kanto Chmeical Co.) と 0.6 N H₃PO₄ 水溶液を 13 : 5 の割合 (v/v) で混合したものを使用した。

動物

Jcl:ICR 雄性マウス (作用評価用 11 週齢 各群 3 匹、検量線用 12 週齢 4 匹) (CLEA Japan)を用いた。恒温、恒湿の一定環境の飼育室で、固形飼料 (CE-2, CLEA Japan) を 5 g / mouse / day 与え、水道水は自由摂取させ飼育した。約一週間の予備飼育を行った後、実験に供した。なお実験動物の取り扱いは、県立広島大学人間及び動物を対象とする研究に関する倫理規程 (平成 17 年 7 月 8 日施行) に従い、動物実験倫理審査委員会の承認 (承認番号 13SA001) を受けて実施した。

方法

ICR 系雄性マウスの耳介に麻酔下で 0.86% NaCl 溶液または抗 DNP-IgE 抗体を 20 μl 皮下投与した。24 時間後、無麻酔下でコントロール群には 0.86% NaCl を 0.1 mL/10 g、アグリコン群とオキサトミド群 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ になるよう経口投与を

行なった。この2時間後に DNP-HSA 溶液を 0.25 mL 尾静脈投与した。30 分後に頸椎脱臼により屠殺し、両耳の皮膚中に漏出してくるエバンスブルー量を測定した。屠殺後の耳介は切断し、1N KOH 水溶液 500 μ l で一晩かけて溶解させた。その後、アセトン-0.6N H₃PO₄ 混液を 3.25 ml 加え攪拌後、遠心(700 \times g, 20 min)し上清を 620 nm における吸光度を測定し、検量線をもとにエバンスブルー量を求めた。求めたエバンスブルー量より、各群の PCA 反応抑制率を以下の式により算出した。

Inhibition of PCA reaction (%) =

[Amount of dye (Control)-Amount of dye (Sample treatment)]/Amount of dye (Control)

検量線は 12 週齢の ICR マウスの耳介にそれぞれ、10、20、40、60 μ g/site になるよう皮下投与し、直ちに頸椎脱臼を行い、サンプル投与群と同様の手順で 620 nm における吸光度を測定し、検量線を作成した(Fig. 21)。

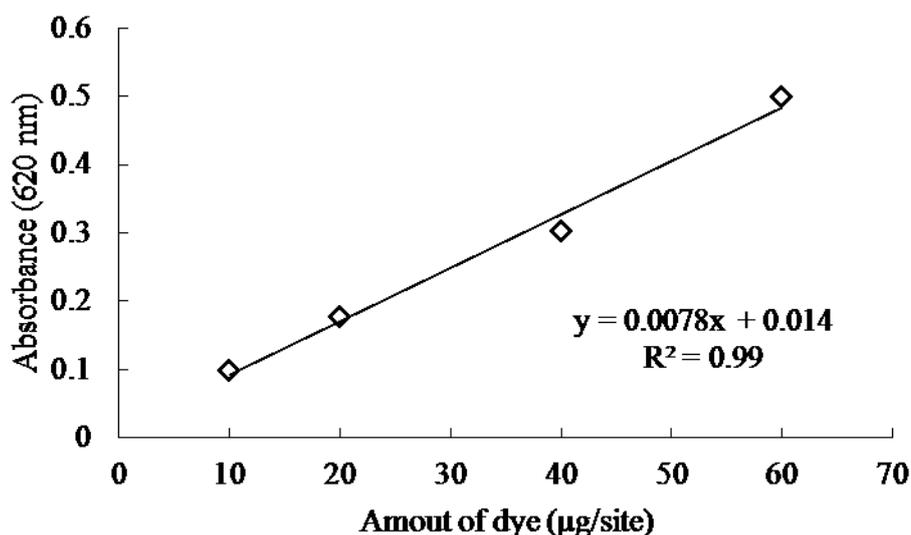


Fig. 21 Standard curve of Evans blue extracted from mouse ears

第二項 ヒスタミンとセロトニンによる血管透過性亢進作用に対する SO-1 および SO-1 アグリコンの作用

方法

ICR 系雄性マウスに無麻酔下でコントロール群には 0.86% NaCl を 0.1 ml/10 g、アグリコン群とオキサトミド群にはそれぞれ 100 $\mu\text{mol/kg}$ になるよう経口投与を行なった。この 2 時間後に背部皮下に麻酔下で 0.86% NaCl 溶液またはヒスタミン、セロトニン溶液を 20 μl 投与した。その後、DNP-HSA 溶液を 0.25 ml 尾静脈投与した。30 分後に頸椎脱臼により屠殺し、背部皮膚に漏出するエバンスブルー量を測定した。エバンスブルーの抽出は第一項と同様の操作を行った。なお、背部皮膚片は漏出個所を中心に 1 cm 角に切り取り使用した。

第三項 統計処理

結果は平均値 \pm 標準誤差 (standard error of the mean; SEM) で示した。有意差検定には Student *t*-test を用いた。P 値が 0.05 未満で有意差ありと判定した。また本実験では陽性対照群 (オキサトミド投与群) とコントロール群 (生理食塩水投与群)、試料投与群 (SO-1 または SO-1 アグリコン投与群) を用いた 3 群の実験系であることから、本実験は優先順位を定め、逐次的に検定を行う閉手順により統計処理を行った。すなわち、優先順位の高い以下の組み合わせで順次、有意差検定を行うことで多重性の問題の回避、実験系の有効性を示した。コントロール群と陽性対照群を絶対条件 (実験条件の適切さ) とし、コントロール群と試料投与群を必要条件 (試料投与の効果)、試料投与群と陽性対照群を十分条件 (試料と対照の比較) と定義し、各条件で有意差が認められない場合は次の検定を行わないこととした。

第三節 実験結果

第一項 受動皮膚アナフィラキシー反応における SO-1 および SO-1 アグリコンの作用

In vitro 実験で脱顆粒抑制活性が認められた SO-1 と SO-1 のアグリコンを用い、*in vivo* 実験での抗アレルギー作用を評価した。Fig. 22 に示すように、マウス PCA 反応の結果、SO-1 と SO-1 のアグリコン投与群に強い抑制作用が認められた。SO-1 のアグリコンとオキサトミドの抑制率を比較すると、アグリコンは 100%、オキサトミドは 64.3%を示し、有意差 ($P < 0.05$) が認められた。実験に用いた投与量はアグリコンで 25 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (8.5 mg/kg)、オキサトミドで 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (43 mg/kg)、と 4 倍薄い濃度で SO-1 のアグリコンは作用していたことになり、アグリコンは抗アレルギー剤であるオキサトミドよりも遥かに強い抗アレルギー作用を示した (Fig. 22A)。一方、SO-1 とオキサトミドの抑制率を比較すると、SO-1 は 73.5%、オキサトミドは 53.9%を示し、有意差 ($p < 0.05$) が認められた。加えて、それぞれの投与量は 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (SO-1; 52 mg/kg. オキサトミド; 43 mg/kg) であることから、抗アレルギー剤よりも強い作用を示した (Fig. 22B)。

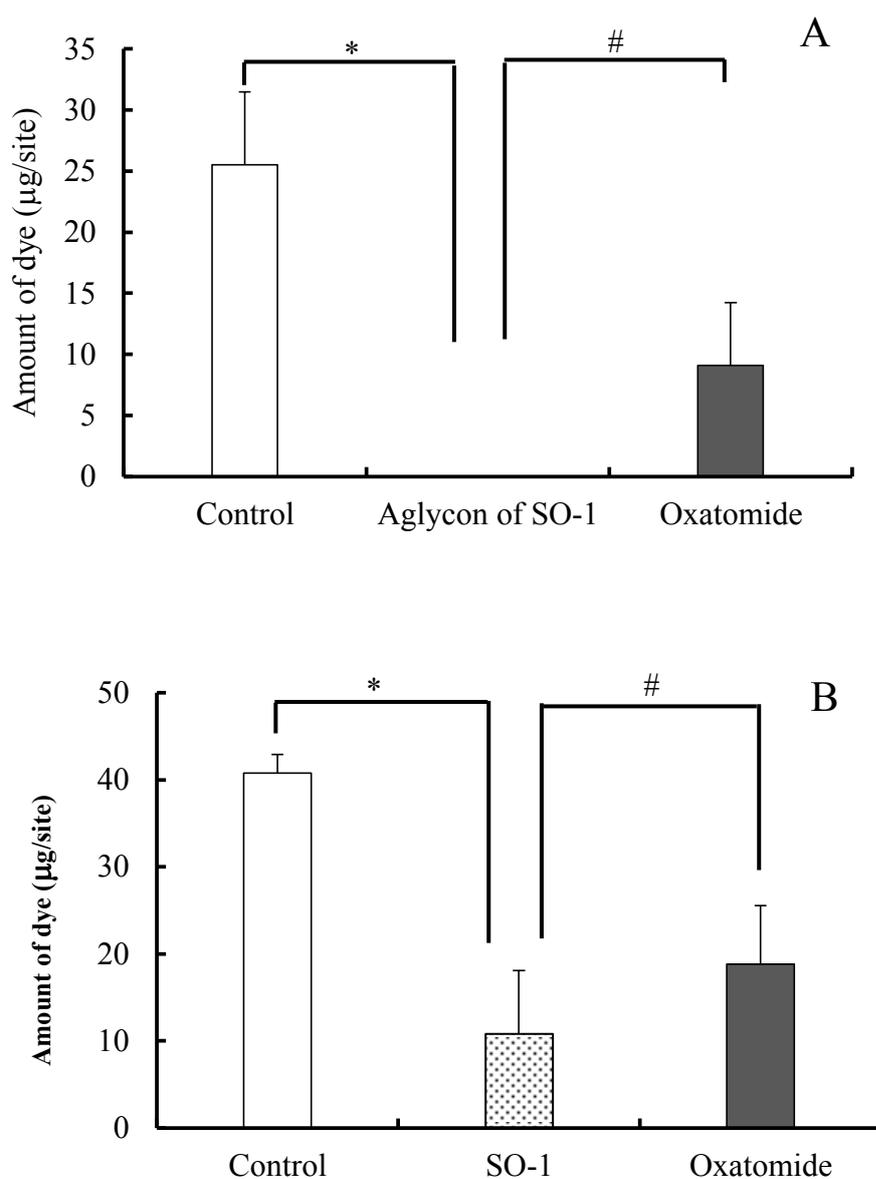


Fig. 22 Effect of SO-1 and its aglycon on PCA reaction in mice.

A, Mice were administered with aglycon of SO-1 (25 µmol/kg b.w.) or oxatomide (100 µmol/kg b.w.). B, Mice were administered with SO-1 (100 µmol/kg b.w.) or oxatomide (100 µmol/kg b.w.). Each value represents the mean ± SEM of 4-5 mice. *P<0.05 or #P<0.05 as compared with the control group or oxatomide group.

第二項 ヒスタミンとセロトニンによる血管透過性亢進作用における
SO-1 および SO-1 アグリコンの作用

SO-1 及び SO-1 アグリコンはヒスタミンとセロトニンによる血管透過性亢進作用を抑制した (Fig. 23)。コントロールのオキサトミド投与群は、ヒスタミンとセロトニンの作用を約 100%抑制した。一方で SO-1 及び SO-1 アグリコン投与群では約 70%の抑制を示し、有意差 ($P<0.05$) が認められた。

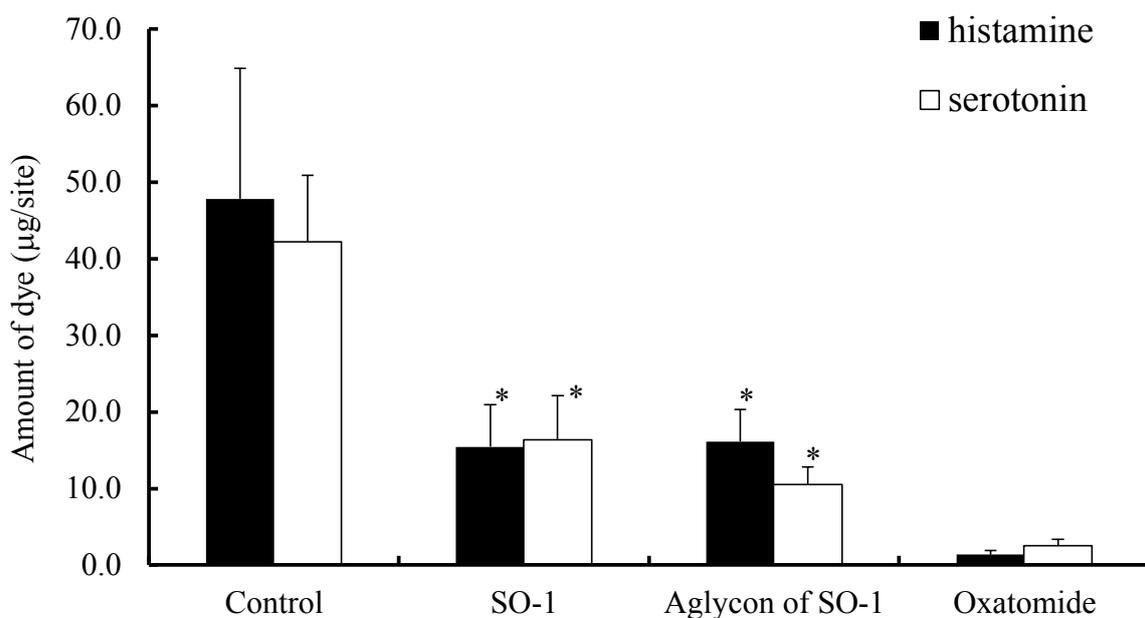


Fig. 23 Effect of SO-1 and its aglycon on histamine or serotonin-induced vascular hyperpermeability in mice

Mice were administered with SO-1 (100 µmol/kg b.w.), aglycon of SO-1 (100 µmol/kg b.w.) or oxatomide (100 µmol/kg b.w.). Each value represents the mean \pm SEM of 5 mice. * $P<0.05$ or # $P<0.05$ as compared with the control group or oxatomide group.

第四節 小括

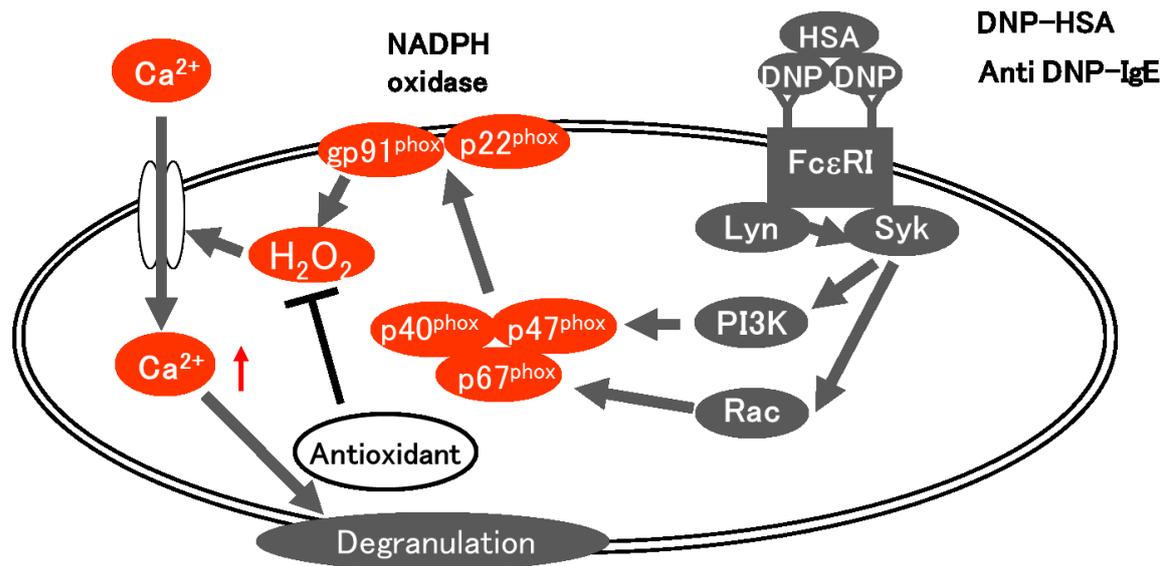
SO-1 と SO-1 アグリコンについて、マウス PCA 反応における抗アレルギー評価を行った結果、抗アレルギー剤であるオキサトミドと同程度または、より低濃度において強い抗アレルギー作用を認めた (Fig. 22)。マウス PCA 反応では SO-1 と SO-1 アグリコンの実験を別日に実施したことから、それぞれのポジティブコントロールであるオキサトミドの抑制率は 100 $\mu\text{mol/kg}$ (43 mg/kg) 投与において、53.9%と 64.3%の抑制率を示した。アグリコンを 25 $\mu\text{mol/kg}$ 投与した結果、約 100%の抑制率を示し、オキサトミドよりも強い抑制率であった。アグリコンの経口投与後、餌や水を摂取していたことから、毒性も低いと考えられる。また、耳介を溶解させた溶液を観察すると、コントロールと比較して、黄色を帯びていた。血清や組織中のアグリコン量の分析を行っていないため推測になるが、アグリコンの黄色が観察できるほどの量が体内に吸収されていると考えられる。

ヒスタミンとセロトニンによる血管透過性亢進作用に対する SO-1 および SO-1 アグリコンの効果については、約 70%の抑制を示した。一方、オキサトミドは約 100%の抑制活性を示した。この結果から SO-1 および SO-1 アグリコンは炎症性メディエーターの受容体と拮抗し、その作用を抑制していると考えられる。また血管透過性亢進作用はヒスタミンやセロトニン受容体からのシグナル伝達により、組織のヒアルロン酸が酵素により消化されることで脆くなった結果、漏出していると考えられる。この点に関しては、脱顆粒抑制活性の測定に用いる β -ヘキソサミニダーゼの活性を SO-1 および SO-1 アグリコンが阻害していないことから消化酵素活性の阻害による血管透過性亢進作用抑制ではないといえる。すなわち、 β -ヘキソサミニダーゼは糖脂質、糖蛋白質や糖アミノグリカンの糖鎖非還元末端に β 結合した N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミンを加水分解して遊離する酸性加水分解酵素であり、炎症部位の組織安定性に関与するヒアルロン酸や血管内皮細胞の間隙を分解することによって、血管透過性を亢進している。このため、 β -ヘキソサミニダーゼを阻害しない SO-1 および SO-1 アグリコンの抗アレルギー作用は、血管透過性亢進作用抑制によるものではないと示唆される。

第五章 ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の抗酸化活性および 脱顆粒抑制に対する影響

第一節 序論

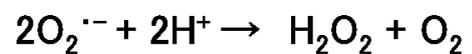
肥満細胞や好塩基球の脱顆粒シグナル伝達ではアレルギーの高親和性 IgE 受容体 FcεRI への結合から Lyn、Syk のリン酸化シグナルカスケードを経てセカンドメッセンジャーとして小胞体からの Ca^{2+} の放出が行われる。この時、小胞体内からの Ca^{2+} 放出と同時に細胞外からのチャネルを介した Ca^{2+} の取り込みが行われるが、この取り込みを促すシグナルに活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) の発生が関与しており、脱顆粒シグナル伝達では特にニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH) オキシダーゼによる ROS の生成が主な経路となっている (64)。なかでも NADPH オキシダーゼから産生されるスーパーオキシドアニオンが細胞内のスーパーオキシドアニオンジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) により過酸化水素となることから、シグナル伝達には NADPH オキシダーゼの活性化→スーパーオキシドアニオンの産生→SOD による過酸化水素の発生→ Ca^{2+} の流入という経路が考えられている (69)。このため ROS 産生の抑制や ROS の消去を行うことにより細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制し、脱顆粒シグナル伝達を阻害することができると考えられている。また、NADPH オキシダーゼの発現、すなわち関連タンパク質の細胞質から細胞膜への移動が抑制されることでも同様に ROS 産生を抑制することが可能である。例えば、Itoh らの報告によると、ウェスタンブロッティングを用いた NADPH オキシダーゼ関連タンパク質の解析により、抗原抗体刺激による脱顆粒抑制活性を示すカルコン類は、NADPH オキシダーゼ活性に関与するタンパク複合体の膜移行を抑制するという報告がある (69)。



NADPH oxidase



Superoxide dismutase



T. Itoh *et al. J. Agric. Food Chem.* 2010

Scheme 6 ROS-activating degranulation system

脱顆粒シグナル伝達に重要な ROS として、NADPH オキシダーゼにより産生されるスーパーオキシドアニオン、および細胞内 SOD によりスーパーオキシドアニオンと 2 個のプロトンによって生じる過酸化水素である (Scheme 6)。従って、本研究では脱顆粒シグナル伝達に関与し、最も初期に発生する ROS のスーパーオキシドアニオンの消去活性を評価した。加えて、スーパーオキシドアニオン消去活性の他に、ROS 消去活性の評価方法として最も多く検討されており、既報との比較が容易なジフェニルピクリルヒドラジル (Diphenylpicrylhydrazyl; DPPH) ラジカル消去活性も評価した (70)。

本章では既知フラボノイド類とハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の抗酸化活性と脱顆粒抑制活性を比較することにより、抗酸化活性と脱顆粒抑制活性の関連性を検討することを目的とした。

第二節 材料および方法

第一項 試料調製

- SO-1 ($\geq 98\%$ HPLC, from spinach leaf)
- SO-1 アグリコン ($\geq 98\%$ HPLC, from SO-1 treated with β -glucuronidase)
- SO-2 ($\geq 98\%$ HPLC, from spinach leaf)
- SO-3 ($\geq 98\%$ HPLC, from spinach leaf)
- アピゲニン (Wako Pure Chemical)
- ルテオリン-7-O-グルコシド (Funakoshi)
- ルテオリン (Wako Pure Chemical)
- ヒドロキシメチルメチレンジオキシフラボン
(3-Hydroxy-6-methyl-3', 4'-methylenedioxyflavone; MF, Funakoshi)
- ケンフェロール (Sigma Aldrich Co.)
- クエルセチン (Sigma Aldrich Co.)
- ナリンギン ($\geq 90\%$ HPLC, from Citrus fruit)
- ナリンゲニン (Sigma Aldrich Co.)
- ヘスペレチン ($\geq 90\%$ HPLC, from Citrus fruit UNSHU)
- (+)-カテキン (Sigma Aldrich Co.)
- (-)-エピガロカテキンガレート (Funakoshi)

第二項 DPPH ラジカル消去活性の測定法

試薬

- 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)
1.211 g の Tris (Nacalai Tesque) を適量の純水に溶解し、1N の HCl を用いて pH 7.4 に合わせる。
- DPPH ラジカル溶液
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma Aldrich Co.) を 0.157 mg/ml になるようエタノール (Kanto Chemical Co.) に溶解する。反応液中終濃度が 0.2 mM になるよう添加する。

- Trolox 溶液

ポジティブコントロールとして 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid (Trolox, Sigma Aldrich Co.) を 1 mM になるよう DMSO (Kanto Chemical Co.) に溶解する。

方法

96 穴アッセイプレートに 0.1 M Tris-HCl 緩衝液を 90 μ l、試料溶液 10 μ l を添加する。DPPH ラジカル溶液を 100 μ l 添加し、プレートミキサーでよく攪拌してから、室温で 30 分間インキュベートする。インキュベート後、プレートリーダーで 516 nm における吸光度を測定する。

コントロール (0%反応: 試料の代わりに緩衝液または試料溶媒を加えたもの) 及びブランク (100%反応: 試料として 10 mM アスコルビン酸水溶液を加えたもの)、各試料を 2 well ずつ用意する。

データ処理

消去活性 (%) =

$$\frac{(\text{吸光度}(0\% \text{反応}) - \text{吸光度}(100\% \text{反応})) - (\text{吸光度}(\text{試料}) - \text{吸光度}(100\% \text{反応}))}{\text{吸光度}(0\% \text{反応}) - \text{吸光度}(100\% \text{反応})} \times 100$$

第三項 スーパーオキシドアニオンラジカル消去活性の測定法

試薬

- スーパーオキシドジスムターゼ (Superoxide dismutase: SOD)

ウシ赤血球由来 SOD (Dojindo) を 10 μ g/ml になるよう緩衝液で希釈する。

- 50 mM sodium carbonate buffer (pH 9.4)

50 mM NaHCO₃ (Kanto Chemical Co.) に 50 mM Na₂CO₃ (Kanto Chemical Co.) を加え、pH 9.4 に調整する。

- 3 mM EDTA

EDTA · 2Na (Dojindo) 5.6 mg を 5 ml の緩衝液に溶解する。

- 3 mM ヒポキサンチン

ヒポキサンチン (Wako Pure Chemical) 2.04 mg を 5 ml の純水に溶解する。
このとき微量の 1N NaOH を添加する。

- 1 mM WST-1

WST-1 (Dojindo) 3.5 mg を 5 ml の純水に溶解する。

- 100 mU/ml キサンチンオキシダーゼ

キサンチンオキシダーゼ (バターミルク由来 12.5 U/ml、Nacalai Tesque) を 100 mU/ml に緩衝液で希釈して使用する。反応液に添加する酵素液の希釈率は酵素標品のロットごとに決定する。

方法

96 穴アッセイプレートに 50 mM Sodium carbonate buffer を 150 μ l、3 mM EDTA、3 mM ヒポキサンチン、1mM WST-1 をそれぞれ 10 μ l ずつ添加し、その後試料溶液 10 μ l を添加する。100 mU/ml キサンチンオキシダーゼを 10 μ l 添加し、プレートミキサーでよく攪拌してから、室温で 10 分間インキュベートする。インキュベート後、プレートリーダーで 415 nm における吸光度を測定する。

コントロール (試料なし)、ブランク (キサンチンオキシダーゼなし)、各試料をそれぞれ 2 well ずつ用意する。

データ処理

$$\text{消去活性(\%)} = \frac{\text{吸光度(コントロール)} - \text{吸光度(試料)}}{\text{吸光度(コントロール)} - \text{吸光度(ブランク)}} \times 100$$

第四項 脱顆粒抑制活性の測定法

第一章第三項 β -hexosaminidase 遊離抑制活性試験と同様に行った。

第五項 統計処理

数値は 3 回の測定値からの平均 \pm 標準偏差 (SD) を求めた。3 回未満のデータには平均値を示した。

第三節 実験結果

第一項 ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質および既知フラボノイドの スーパーオキシドアニオン消去活性および DPPH ラジカル消去活性

既知フラボノイドおよびホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質として精製したフラボノイドのスーパーオキシドアニオン消去活性および DPPH ラジカル消去活性を評価した。

スーパーオキシドアニオン消去活性では、SO-1 アグリコンに強い活性が認められ、その 50%有効濃度 (50% effective concentration; EC₅₀) は 44.9 μM であった。一方、配糖体である SO-2 と SO-3 は EC₅₀ が 50 μM 以上の中程度の活性と推定されたが、SO-1 は 50 μM でも 10%以下の消去活性で、非常に弱かった。既知フラボノイドでは、フラバン-3-オール の B 環にピロガロール構造、C 環 3 位に没食子酸を有する (-)-エピガロカテキンガレートが最も強く、その EC₅₀ は 11.6 μM であった。その他にもフラボンの B 環にカテコール構造を有するルテオリン (EC₅₀=23.5 μM) やフラボノールの B 環にカテコール構造を有するクエルセチン (EC₅₀=44.7 μM) が強い消去活性を示した。B 環にメチレンジオキシ基を有する MF は SO-1 と同様に 50 μM で 10%以下の非常に弱い消去活性であった。

DPPH ラジカル消去活性では、ホウレンソウ由来フラボノイドと既知フラボノイドともにスーパーオキシドアニオン消去活性と同様の結果であった。ホウレンソウ由来フラボノイドでは SO-1 が 30 μM で 10%以下の弱い消去活性を示したのに対して、SO-1 アグリコンは EC₅₀ が 29.2 μM とホウレンソウ由来フラボノイドでは最も強い DPPH ラジカル消去活性を示した。また SO-2 および SO-3 の EC₅₀ は 30 μM 以上である物の中程度の活性と推定された。既知フラボノイドでは、(+)-カテキンが最も強く EC₅₀ は 4.7 μM であり、次いでクエルセチン 15.3 μM、ルテオリン-7-O-グルコシドの 20.4、ルテオリン 24.2 μM であった。ナリングニンやヘスペレチンは EC₅₀ が 30 μM 以上の濃度と推定され、MF は 30 μM で 10%以下の非常に弱い消去活性であった。

Table 4 Superoxide anion scavenging activity of various flavonoids

Groups	Sample name	IC ₅₀ (μM)
Spinach flavonoids	SO-1	—
	SO-1 aglycon	44.9±0.6
	SO-2	>50
	SO-3	>50
Flavones	Apigenin	48.0±2.9
	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	>50
	Luteolin	23.5±0.8
Flavonols	MF	—
	Kaempferol	>50
	Quercetin	44.7±1.8
Flavanones	Naringin	—
	Naringenin	—
	Hesperetin	—
Flavan-3-ols	(+)-Catechin	17.1±1.8
	(-)-Epigallocatechin gallate	11.6±3.4

— ; Scavenging activity is less than 10% at 50 μM.

Table 5 DPPH radical scavenging activity of various flavonoids

Groups	Sample name	IC ₅₀ (μM)
Spinach flavonoids	SO-1	—
	SO-1 aglycon	29.2±0.1
	SO-2	>30
	SO-3	>30
Flavones	Apigenin	—
	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	20.4±0.9
	Luteolin	24.2±1.1
Flavonols	MF	—
	Kaempferol	>30
	Quercetin	15.3±1.8
Flavanones	Naringin	—
	Naringenin	>30
	Hesperetin	>30
Flavan-3-ols	(+)-Catechin	4.7±1.8
	(-)-Epigallocatechin gallate	9.0±3.4

— ; Scavenging activity is less than 10% at 30 μM.

第二項 ホウレンソウ由来脱顆粒抑制物質および

既知フラボノイドの脱顆粒抑制活性

既知フラボノイドおよびホウレンソウ由来フラボノイドの抗原抗体刺激による脱顆粒とカルシウムイオノフォア刺激による脱顆粒に対する抑制活性を評価した。

抗原抗体刺激による脱顆粒に対する抑制活性は、ホウレンソウ由来フラボノイド SO-1 および SO-1 アグリコンともに強く、その 50% 阻害濃度 (50% inhibitory concentration; IC₅₀) はそれぞれ 1.9 μM と 1.5 μM であった。また SO-2 と SO-3 は 200 μM 以上で IC₅₀ を示すと推定された。一方、既知フラボノイドではクエルセチンが最も強い脱顆粒抑制活性を示し、IC₅₀ は 2.2 μM であった。次いで、ルテオリン (2.5 μM) となった。抗酸化活性の評価で強いラジカル消去活性を認めた (-)-エピガロカテキンガレートの脱顆粒抑制における IC₅₀ は 97 μM であり、著しく弱い活性であった。またラジカル消去活性の弱いナリングニンとヘスペレチンはそれぞれ IC₅₀ が 26.1 μM と 70.8 μM の脱顆粒抑制活性を示したが、MF には 200 μM でも脱顆粒抑制活性は認められなかった。

カルシウムイオノフォア刺激では、ホウレンソウ由来フラボノイドは全て 200 μM において脱顆粒抑制活性が認められなかった。一方、用いたフラボノイドの中ではクエルセチンが最も強い活性を示し (IC₅₀=20.8 μM)、次いでケンフェロール、ルテオリン、アピゲニンに活性が認められ、さらにナリングニンとヘスペレチンが弱い活性を示した。しかし、(+)-カテキン、(-)-エピガロカテキンガレート、そして MF には 200 μM でも活性は認められなかった。

Table 6 Inhibitory activity of various flavonoids on IgE-stimulated degranulation in RBL-2H3 cells

Groups	Sample name	IC ₅₀ (μM)
Spinach flavonoids	SO-1	1.9 ± 1.9
	SO-1 aglycon	1.5 ± 1.8
	SO-2	>200
	SO-3	>200
Flavones	Apigenin	3.7 ± 4.0
	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	—
	Luteolin	2.5 ± 2.1
Flavonols	MF	—
	Kaempferol	5.4 ± 3.5
	Quercetin	2.2 ± 2.0
Flavanones	Naringin	—
	Naringenin	26.1 ± 6.7
	Hesperetin	70.8 ± 14.7
Flavan-3-ols	(+)-Catechin	—
	(-)-Epigallocatechin gallate	97.0 ± 4.7

— ; Inhibitory activity is less than 10% at 200 μM.

Table 7 Inhibitory activity of various flavonoids on calcium ionophore-stimulated degranulation in RBL-2H3 cells

Groups	Sample name	IC ₅₀ (μM)
Spinach flavonoids	SO-1	—
	SO-1 aglycon	—
	SO-2	—
	SO-3	—
Flavones	Apigenin	65.1 ± 6.6
	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	—
	Luteolin	50.6 ± 3.3
Flavonols	MF	—
	Kaempferol	47.0 ± 4.5
	Quercetin	20.8 ± 3.7
Flavanones	Naringin	—
	Naringenin	>200
	Hesperetin	>200
Flavan-3-ols	(+)-Catechin	—
	(-)-Epigallocatechin gallate	—

— ; Inhibitory activity is less than 10% at 200 μM.

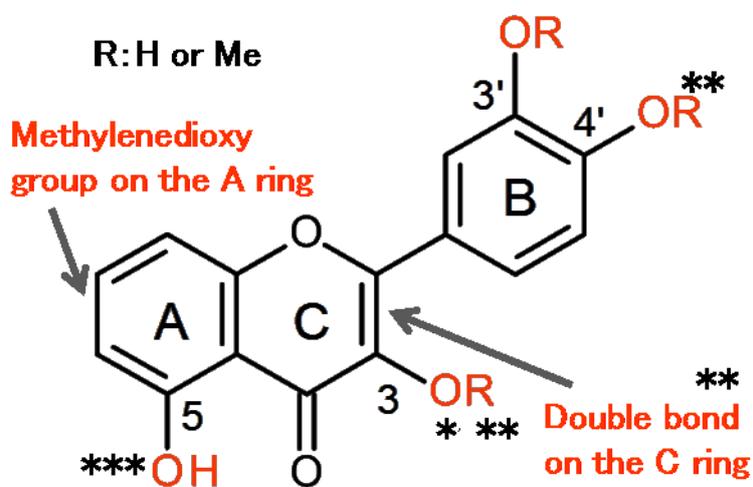
第四節 小括

スーパーオキシドアニオン消去活性については、B 環にカテコール構造を有する SO-1 アグリコンに活性が認められたが、B 環 4 位にグルクロン酸が結合した SO-1 には消去活性は認められなかった。一方、同じく B 環 4 位にグルクロン酸が結合している SO-2 および SO-3 に関しては弱い活性が認められたが (Table 4)、これは A 環のメチレンジオキシ基の開裂に因ると考えられる。加えて、DPPH ラジカル消去活性においても同様の傾向を認めた (Table 5)。このことから B 環のカテコール構造が抗酸化に強く関与すること、そして A 環のメチレンジオキシ基の開裂もその活性に関与する可能性があることが示唆され、先行研究の知見と一致した (70)。また既知フラボノイドについてもスーパーオキシドアニオンや DPPH ラジカル消去活性ともに B 環にピロガロール構造を有する(-)-エピガロカテキンガレートや B 環にカテコール構造を有する(+)-カテキンが強かった。これらの結果からラジカル消去活性では B 環のカテコール構造が最も重要であると考え得られ、ホウレンソウ由来フラボノイドのうち、SO-1 アグリコンはその構造を有することで強い活性を発揮するといえる。

この点を踏まえて、ホウレンソウ由来フラボノイドや既知フラボノイドの脱顆粒抑制活性に関する構造活性相関を考察し、ホウレンソウ由来フラボノイドの活性発現に特徴的な構造を Scheme 7 に示す。先行研究では脱顆粒抑制活性に関しても B 環のカテコール構造の重要性が報告されており、本研究で得られた結果もその点では一致する (Table 6,7)。さらに、本研究で見出したホウレンソウ由来フラボノイドの活性知見を加えると B 環のカテコール構造とともに A 環 6、7 位のメチレンジオキシ基の存在および C 環の二重結合やメトキシ基の存在が脱顆粒抑制に重要であると示唆される。すなわち、抗原抗体刺激で同程度の強い活性を認めた SO-1 および SO-1 アグリコンは、B 環 4 位のグルクロン酸結合の有無がラジカル消去活性の差となり、さらに脱顆粒抑制活性の弱い SO-2 と SO-3 は、SO-1 と B 環 4 位のグルクロン酸配糖化が共通するものの A 環 6,7 位のメチレンジオキシ基が開裂していることで脱顆粒抑制活性の弱さにつながると考えられる。従って、ホウレンソウ由来 SO-1 に関しては B 環へのグルクロニド結合は脱顆粒抑制活性に直接関与せず、B 環のカテコール構造と A 環のメチレンジオキシ

基が脱顆粒抑制活性に関与する重要な化学的構造であると考えられる。

ホウレンソウ由来フラボノイドと既知フラボノイドの脱顆粒抑制活性と抗酸化活性の構造活性相関の解析から抗酸化活性の脱顆粒抑制活性への直接的な関連性は弱いことが示唆された。



Scheme 7 Structure-activity relationship of flavonoid responsible for the degranulation inhibition in mast cells and basophils

**J. Food Hyg. Soc. Japan*, 35, 497-503, 1994

** *J. Pharmacol. Sci.*, 92, 291-295, 2003

*** *Chem. Pharm. Bull.*, 57(10) 1089-1095, 2009

第六章 総括

花粉症に代表される I 型アレルギーは、先進国を中心に増加の一途を辿っている。またその治療薬には副作用の懸念があり、そして治療法では患者への負担が大きいという問題点があるため、近年は機能性食品のような食資源をアレルギーの予防や改善に利用する動きがある。報告例として、Sugahara らによってミカン果皮とヨーグルトを摂取することにより花粉症の改善に繋がるとされている (71)。本研究では、日々の食事で予防・改善できる食物として探索を行い、有用な化合物を見出すことを目的に研究を行った。

第二章のハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の単離及び構造解析では、まず抗アレルギー作用の指標として脱顆粒抑制活性を用いた。脱顆粒抑制活性は、市販の抗アレルギー剤のスクリーニングに汎用されている評価法で、本研究ではラット好塩基球性白血病細胞株 (RBL-2H3 細胞) を使用し、抗原抗体刺激により細胞から遊離される顆粒成分である β -ヘキソサミニダーゼ量を測定した。ハウレンソウを含む野菜や健康茶など多様な地域農産物について探索し、その中で脱顆粒抑制活性の認められたハウレンソウ熱水抽出物から、各種のクロマトグラフィーにより 3 成分 (SO-1、SO-2、SO-3) を精製し、それぞれ NMR、MS による構造解析を行った。3 成分ともに 3-メトキシフラボンのグルクロン酸配糖体と同定した。いずれの化合物もハウレンソウに含有する既知化合物であったが、新規な生物活性として脱顆粒抑制活性を有することを認めた。ハウレンソウから精製した 3 化合物のうち SO-1 に最も強い脱顆粒抑制活性を認めた。抗原抗体刺激による脱顆粒を 50%抑制する濃度 (IC_{50}) は $1.85 \mu M$ であり、さらに、既存の抗アレルギー薬 (ケトチフェンフマレートやトラニラスト) よりも強いことを認めた。一方、SO-2 や SO-3 の脱顆粒抑制活性は弱いことから、ハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質に共通する B 環 4 位に結合するグルクロン酸は脱顆粒抑制活性に関与しないものの B 環カテコール構造の重要性と A 環のメチレンジオキシ基の存在が重要であることが示唆された。また、SO-1 から β -グルクロニダーゼ酵素処理で調製されたアグリコンの脱顆粒抑制活性は、SO-1 よりも高活性で、 IC_{50} は $1.47 \mu M$ であった。このことから、ハウレンソウから単離された SO-1 の作用本体はアグリコンであると推測される。

第三章では、ハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の脱顆粒に至るシグナル伝達経路の作用部位に関して解析を行った。強い脱顆粒抑制活性を示した SO-1 と SO-1 アグリコンを用いて、RBL-2H3 細胞内におけるシグナル伝達因子のリン酸化に対する影響をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、いずれの化合物ともに 1 µg/ml (SO-1; 1.9 µM, SO-1 アグリコン; 2.9 µM)、10 µg/ml (SO-1; 19.2 µM, SO-1 アグリコン; 29.0 µM) でシグナルカスケードの上流に位置する 2 つのチロシンキナーゼ (Syk と Lyn) のリン酸化を抑制することを認めた。また時間ごとのリン酸化 Syk、Lyn の発現を観察した結果、長時間になると Lyn のリン酸化の抑制活性は消失し、Syk のリン酸化の抑制のみが認められた。Syk は Lyn による FcεRI (高親和性 IgE 受容体) のγ鎖のリン酸化を認識して、自己リン酸化する。このことからハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質 SO-1 と SO-1 アグリコンは、FcεRI のタンパク質複合体に対して影響を及ぼしていると考えられる。加えて、脱顆粒シグナル伝達で生じる細胞内 Ca²⁺濃度の上昇をともに抑制することも明らかにした。従って、これらの結果から、SO-1 と SO-1 アグリコンともに同一の作用点であると推定され、細胞膜表面における抗原抗体結合部位、特に Fcε RI に作用し、細胞内シグナル分子のリン酸化を抑制することが示唆された。

第四章では、ハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の実験動物における抗アレルギー作用を評価した。ハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質 SO-1 と SO-1 アグリコンを用いて、ICR 系雄性マウスにおける受動皮膚アナフィラキシー反応 (PCA 反応) とヒスタミンまたはセロトニン惹起血管透過性亢進反応に対する抑制活性を評価した。その結果、PCA 反応では SO-1 は 52 mg/kg で 73.5% の抑制を示し、SO-1 アグリコンは 8.5 mg/kg で 100% の抑制率を示した。特に、アグリコンの活性はオキサトミド (ポジティブコントロール、43 mg/kg で約 60% の抑制率) より顕著に強かった。またヒスタミンやセロトニンによる血管透過性亢進に対する効果も確認されたことから、これら化合物は個体レベルでも抗アレルギー活性を発揮することが明らかになった。

第五章では、ハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の有する抗酸化活性と脱顆粒抑制活性との構造活性相関の比較を行った。ポリフェノール化合物には抗アレルギー作用とともに抗酸化活性を有するものが知られていることから、既知のフラボノイド 11 種と比較検討した。フラボノイド系グルクロン酸配糖体である SO-1

とそのアグリコンの有する抗酸化活性については、SO-1 はほとんど活性を示さないのに対して、アグリコンは強い活性を発揮した。このことは抗酸化活性発現にはフラボノイド B 環のカテコール構造が必須であることを示すものである。しかし、第二章で考察した脱顆粒抑制活性に関与する A 環のメチレンジオキシ基の重要性や第三章で示した細胞内シグナルカスケードへの関与の証明から抗酸化活性と脱顆粒抑制活性の直接の相関はないと考えられる。ただし、既知フラボノイドが抗酸化活性を介して脱顆粒抑制活性を発揮するという報告に従って、ハウレンソウ由来 SO-1 アグリコンが NADPH オキシダーゼ関連タンパク質の膜移行の抑制や発現抑制などを介して抗酸化性を発揮することが脱顆粒抑制活性にも一部関与する可能性は残される。

本研究ではハウレンソウ由来脱顆粒抑制物質の体内動態を確認できていない。しかし、先行研究の結果からクエルセチンやケンフェロールなどのフラボノイドは生体内でアグリコンの形で吸収され、その後グルクロン酸転移酵素により、グルクロン酸抱合を受けることが知られている。またこのとき抱合を最も受けやすい構造の部位は、A 環 7 位 > C 環 3 位 > B 環 3 位である (74)。加えて、SO-1 アグリコンは A 環及び C 環がメチレンジオキシ基またはメトキシ基であるため、主に B 環に対する抱合反応が起こると考えられる。そして、フラボノイドのグルクロン酸配糖体が生体内の β -グルクロニダーゼで加水分解されると、A 環 7 位 > C 環 3 位 > B 環 4 位の順に影響を受けやすい (72,73)。このため、B 環 4 位にグルクロン酸を有する SO-1 は消化管で分解を受けてアグリコンの状態でも生体内では再びグルクロン酸配糖体の形に戻り、局所における抗アレルギー作用を発揮できると考えられる。つまり、SO-1 のまま吸収されても、また分解と抱合代謝を受けても抗アレルギー作用を発揮すると考えられる。

このような代謝特性と化合物特性を有する SO-1 は新規な抗アレルギー作用を有する機能性分子としてサプリメント以外にも新たな抗アレルギー薬のシーズとしての活用が期待される。さらに、ハウレンソウから新たな、かつ有望な抗アレルギー物質が発見された事実は地産農産物の高付加価値化を推進するとともに、他の有用資源の探索にも大きな推進力となり、食資源の機能性研究における今後の展開が期待される。

謝辞

本学位論文をまとめるにあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました県立広島大学大学院総合学術研究科、田井章博教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究を進めるうえで御指導、御助言をいただきました県立広島大学総合学術研究科、小西博昭教授、野下俊朗准教授に心より御礼申し上げます。

また、本研究における分離、精製や構造解析の際に、多大なる御指導と御協力を頂きました徳島文理大学香川薬学部黒柳正典先生、代田修教授に感謝の意を表します。

本研究に御協力を頂いた県立広島大学生命環境学部武藤研究室の皆様、特に藤川竜馬様、竹村理絵様、齋藤亜美様に心から感謝致します。

本研究また学部から大学院までの研究活動に際し、御指導、御鞭撻を賜りました県立広島大学総合学術研究科、武藤徳男教授に心より御礼申し上げます。これからの全ての基礎として、初心を忘れず研究活動に日々邁進してまいります。

最後に、学部から大学院まで、不自由なく研究できるよう支えて下さった両親ならびに祖父母に心より御礼申し上げます。

参考文献

- (1) Murphy K. Janeway's Immunobiology., *Garland Science*, 8 EDITION, (2012).
- (2) Dittrich A., Hessenkemper W., Schaper F. Systems biology of IL-6, IL-12 family cytokines., *Cytokine Growth Factor Rev.*, **26**(5), 595-602 (2015).
- (3) Verma ND., Hall BM., Plain KM., Robinson CM., Boyd R., Tran GT., Wang C., Bishop GA., Hodgkinson SJ. Interleukin-12 (IL-12p70) promotes induction of highly potent Th1-like CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells that inhibit allograft rejection in unmodified recipients., *Front Immunol.*, **5**(190), doi: 10.3389/fimmu. (2014).
- (4) Li XN., Pan X., Qiu D. Imbalances of Th17 and Treg cells and their respective cytokines in COPD patients by disease stage., *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **7**(12), 5324-5329 (2014).
- (5) Liu F., Yu J., Bai L., Xue Z., Zhang X. Pingchuan formula improves asthma via restoration of the Th17/Treg balance in a mouse model., *BMC. Complement. Altern. Med.*, **15**(234), doi: 10.1186/s12906-015-0755-8 (2015).
- (5) Basdeo SA., Moran B., Cluxton D., Canavan M., McCormick J., Connolly M., Orr C., Mills KH., Veale DJ., Fearon U., Fletcher JM. Polyfunctional, Pathogenic CD161⁺ Th17 Lineage Cells Are Resistant to Regulatory T Cell-Mediated Suppression in the Context of Autoimmunity., *J. Immunol.*, **195**(2), 528-540. (2015).
- (6) Doi M., Nakajima Y., Okano T., Fukada Y. Light-induced phase-delay of the chicken pineal circadian clock is associated with the induction of cE4bp4, a potential transcriptional repressor of *cPer2* gene., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**(14), 8089-8094 (2001).
- (7) Kuribara R., Kinoshita T., Miyajima A., Shinjyo T., Yoshihara T., Inukai T., Ozawa K., Look AT., Inaba T. Two distinct interleukin-3-mediated signal pathways, Ras-NFIL3 (E4BP4) and Bcl-x1, regulate the survival of murine pro-B lymphocytes., *Mol. Cell. Biol.*, **19**(4), 2754-2762 (1999).

- (8) Zhang W., Zhang J., Kornuc M., Kwan K., Frank R., Nimer S.D. Molecular cloning and characterization of NF-IL3A, a transcriptional activator of the human interleukin-3 promoter., *Mol. Cell. Biol.*, **15**(11), 6055-6063 (1995).
- (9) Lund R., Aittokallio T., Nevalainen O., Lahesmaa R. Identification of novel genes regulated by IL-12, IL-4, or TGF- β during the early polarization of CD4⁺Lymphocyte., *J. Immunol.*, **171**(10), 5328-5336 (2003).
- (10) Mancino D., Buono G., Cusano M., Minucci M. Adjuvant effects of a crystalline silica on IgE and IgG1 antibody production in mice and their prevention by the macrophage stabilizer poly-2-vinylpyridine *N*-oxide., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **71**(3), 279-281 (1983).
- (11) Kool M., Willart MA., van Nimwegen M., Bergen I., Pouliot P., Virchow JC., Rogers N., Osorio F., Reis e Sousa C., Hammad H., Lambrecht BN. An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma., *Immunity.*, **34**(4), 527-540 (2011).
- (12) Shakib F., Ghaemmaghami AM., Sewell HF. The molecular basis of allergenicity., *Trends Immunol.*, **29**(12), 633-642 (2008).
- (13) Kikuchi Y., Takai T., Kuhara T., Ota M., Kato T., Hatanaka H., Ichikawa S., Tokura T., Akiba H., Mitsuishi K., Ikeda S., Okumura K., Ogawa H. Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p1 to sensitization toward IgE and IgG responses., *J. Immunol.*, **177**(3), 1609-1617 (2006).
- (14) Kato T., Takai T., Fujimura T., Matsuoka H., Ogawa T., Murayama K., Ishii A., Ikeda S., Okumura K., Ogawa H. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes., *Allergy*, **64**(9), 1366-1374 (2009).
- (15) Nakazawa T., Takai T., Hatanaka H., Mizuuchi E., Nagamune T., Okumura K., Ogawa H. Multiple-mutation at a potential ligand-binding region decreased allergenicity of a mite allergen Der f 2 without disrupting global structure., *FEBS Lett.*, **579**(9), 1988-1994 (2005).

- (16) Ichikawa S., Takai T., Yashiki T., Takahashi S., Okumura K., Ogawa H., Kohda D., Hatanaka H. Lipopolysaccharide binding of the mite allergen Der f 2., *Genes Cells*, **14**(9), 1055-1065 (2009).
- (17) Gunawan H., Takai T., Kamijo S., Wang XL., Ikeda S., Okumura K., Ogawa H. Characterization of proteases, proteins, and eicosanoid-like substances in soluble extracts from allergenic pollen grains., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **147**(4), 276-288 (2008).
- (18) Boldogh I., Bacsı A., Choudhury BK., Dharajıya N., Alam R., Hazra TK., Mitra S., Goldblum RMSur S. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation., *J. Clin. Invest.*, **115**(8), 2169-2179 (2005).
- (19) Wang XL., Takai T., Kamijo S., Gunawan H., Ogawa H., Okumura K. NADPH oxidase activity in allergenic pollen grains of different plant species., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **387**(3), 430-434 (2009).
- (20) Reese TA., Liang HE., Tager AM., Luster AD., Van Rooijen N., Voehringer D., Locksley RM. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy., *Nature*, **447**(7140), 92-96 (2007).
- (21) Male D., Roitt I. Immunology, *Elsevier*, 7EDITION, (2009).
- (22) Kypriotou M., Rivero D., Haller S., Mariotto A., Huber M., Acha-Orbea H., Werner S., Hohl D. Activin a inhibits antigen-induced allergy in murine epicutaneous sensitization., *Front. Immunol.*, **4**(246), doi: 10.3389/fimmu., (2013).
- (23) Jeon WY., Shin IS., Shin HK., Lee MY. Samsøeum water extract attenuates allergic airway inflammation via modulation of Th1/Th2 cytokines and decrease of iNOS expression in asthmatic mice., *BMC Complement. Altern. Med.*, **15**(47), doi: 10.1186/s12906-015-0561-3 (2015).
- (24) Marrack P., McKee AS., Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium., *Nat. Rev. Immunol.*, **9**(4), 287-293 (2009).

- (25) Kool M., Soullié T., van Nimwegen M., Willart MA., Muskens F., Jung S., Hoogsteden HC., Hammad H., Lambrecht BN. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.*, **205**(4), 869-882 (2008).
- (26) Takai T. TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. *Allergol. Int.*, **61**(1), 3-17 (2012).
- (27) Baba, K. Nakae, K. 鼻アレルギーの全国疫学調査 2008 (1998年との比較) - 耳鼻咽喉科医およびその家族を対象として-, *Prog. Med.*, **28**(8), 2001-2012 (2008).
- (28) Sun BQ., Chen de H., Zheng PY., Huang HM., Luo WT., Zeng GQ., Zhang XW. Allergy-related Evidences in Relation to Serum IgE: data from the China State Key Laboratory of Respiratory Disease, 2008-2013., *Biomed. Environ. Sci.*, **27**(7), 495-505 (2014).
- (29) Thacher JD., Gruzieva O., Pershagen G., Neuman Å., Wickman M., Kull I., Melén E, Bergstrom A. Pre-and postnatal exposure to parental smoking and allergic disease through adolescence., *Pediatrics.*, **134**(3), 428-434 (2014).
- (30) Urabe A., Shimada K., Kawai S. 今日の治療薬 2014 解説と便覧., 南江堂, 36 EDITION, (2014).
- (31) Yonekura S., Sakurai D., Sakurai T., Ilinuma T., Okuma Y., Okamoto Y. 舌下免疫療法を用いたスギ花粉症に対する早期介入 スギ花粉感作陽性未発症者を対象とした発症予防についての検討., *JJIAO.*, **32**(3), 197-201 (2014).
- (32) Feleszko W., Jaworska J., Rha RD., Steinhausen S., Avagyan A., Jaudszus A., Ahrens B., Groneberg DA., Wahn U., Hamelmann E. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma., *Clin. Exp. Allergy*, **37**(4), 498-505 (2007).
- (33) Hisbergues M., Magi M., Rigaux P., Steuve J., Garcia L., Goudercourt D., Pot B., Pestel J., Magi M. *In vivo* and *in vitro* immunomodulation of Der p 1 allergen-specific response by *Lactobacillus plantarum* bacteria., *Clin. Exp. Allergy*, **37**(9), 1286-1295 (2007).

- (34) Busse W., Corren J., Lanier BQ., McAlary M., Fowler-Taylor A., Cioppa GD., van As A., Guta N. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108**(2), 184-190 (2001).
- (35) Dosako S. 三次機能., *ニューフードインダストリー*, **49**(11), 47-60 (2007).
- (36) Naito Y. 食の機能性と健康長寿 (特集 機能性食品、新たな展開) ., *食品と化学*, **57**(3), 59-63 (2015).
- (37) Nishikawa K. 食品機能性の科学., *産業技術サービスセンター*, 第一版, (2008).
- (38) Sanderson MP., Wex E, Kono T, Uto K., Schnapp A. Syk and Lyn mediate distinct Syk phosphorylation events in FcεRI-signal transduction: implications for regulation of IgE-mediated degranulation., *Mol. Immunol.*, **48**(1-3), 171-178 (2010).
- (39) MacGlashan DW. Jr. IgE-dependent signaling as a therapeutic target for allergies., *Trends Pharmacol. Sci.*, **33**(9), 502-509 (2012).
- (40) Sawatzky DA., Kingham PJ., Court E., Kumaravel B, Fryer AD, Jacoby DB, McLean WG., Costello RW. Eosinophil adhesion to cholinergic nerves via ICAM-1 and VCAM-1 and associated eosinophil degranulation., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **282**(6), 1279-1288 (2002).
- (41) Argade A., Bhamidipati S., Li H., Sylvain C., Clough J., Carroll D., Keim H., Braselmann S., Taylor V., Zhao H., Herlaar E., Issakani SD., Wong BR., Masuda ES., Payan DG., Singh R. Design, synthesis of diaminopyrimidine inhibitors targeting IgE- and IgG-mediated activation of Fc receptor signaling., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**(10), 2122-2128 (2015).
- (42) Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size., *BMJ.*, **299**(6710), 1259-1260 (1989).
- (43) Oshima Y. 衛生仮説 2009., *小児科診療* **72**(7), 1219-1224 (2009).
- (44) Rothermund K., Voss A., Wentura D. Counter-regulation in affective attentional biases: a basic mechanism that warrants flexibility in emotion and motivation., *Emotion*, **8**(1), 34-46 (2008).

- (45) Seldin DC., Adelman S., Austen KF., Stevens RL., Hein A., Caulfield JP., Woodbury RG. Homology of the rat basophilic leukemia cell and the rat mucosal mast cell., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 3871-3875 (1985).
- (46) Sawaguchi M., Tanaka S., Nakatani Y., Harada Y., Mukai K., Matsunaga Y., Ishiwata K., Oboki K., Kambayashi T., Watanabe N., Karasuyama H., Nakae S., Inoue H., Kubo M. Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness., *J. Immunol.*, **188**(4), 1809-1818 (2012).
- (47) Eccleston E., Leonard BJ., Lowe JS., Welford HJ. Basophilic leukaemia in the albino rat and a demonstration of the basopoietin., *Nat. New Biol.*, **244**(133), 73-76 (1973).
- (48) Barsumian EL., Isersky C., Petrino MG., Siraganian RP. IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones., *Eur. J. Immunol.*, **11**(4), 317-323 (1981).
- (49) Itoh T., Oyama M., Takimoto N., Kato C., Nozawa Y., Akao Y., Iinuma M. Inhibitory effects of sesquiterpene lactones isolated from *Eupatorium chinense* L. on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice., *Bioorg. Med. Chem.*, **17**(8), 3189-3197 (2009).
- (50) Rothschild A.M. Mechanisms of histamine release by compound 48/80., *Br. J. Pharmacol.*, **38**(1), 253-262 (1970).
- (51) Koibuchi Y., Tomita K. Histamine release induced from mast cells by active components of compound 48/80. *Eur. J. Pharmacol.*, **115**(2-3), 163-170 (1985).
- (52) Ishida M., Nishi K., Watanabe H., Sugahara T. Inhibitory effect of aqueous spinach extract on degranulation of RBL-2H3 cells., *Food Chem.*, **136**(2), 322-327 (2013).
- (53) Kimura T., P H But P., Guo X., Ki Sung C. International collation of traditional and folk medicine. Northeast asia., *World Scientific.*, 1-4 (1996).
- (54) Aritomi, M., Kawasaki T. Three highly oxygenated flavone glucuronides in leaves of *Spinacia oleracea.*, *Phytochemistry*, **23**, 2043-2047 (1984).

- (55) Federico F., Marisol C., Francisco A., Tomas B. Acylated flavonol glycosides from spinach leaves (*Spinacia oleracea*)., *Phytochemistry*, **45**(8), 1701-1705 (1997).
- (56) Aritomi M., Komori T., Kawasaki T. Flavonol glycosides in leaves of *Spinacia oleracea*., *Phytochemistry*, **25**, 231-234 (1986).
- (57) Bergman M., Varshavsky L., Gottlieb HE., Grossman S. The antioxidant activity of aqueous spinach extract chemical identification of active fractions., *Phytochemistry*, **58**, 143-152 (2001).
- (58) Itoh T., Ninomiya M., Nozawa Y., Koketsu M. Chalcone glycosides isolated from aerial parts of *Brassica rapa* L. 'hidabeni' suppress antigen-stimulated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells., *Bioorg. Med. Chem.*, **18**(19), 7052-7057 (2010).
- (59) Itoh T., Ninomiya M., Yasuda M., Koshikawa K., Deyashiki Y., Nozawa Y., Akao Y., Koketsu M. Inhibitory effects of flavonoids isolated from *Fragaria ananassa* Duch on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3., *Bioorg. Med. Chem.*, **17**(15), 5374-5379 (2009).
- (60) Itoh T., Tsukane M., Koike M., Nakamura C., Ohguchi K., Ito M., Akao Y., Koshimizu S., Nozawa Y., Wakimoto T., Nukaya H, Suwa Y. Inhibitory effects of whisky congeners on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice., *J. Agric. Food Chem.*, **58**(12), 7149-7157 (2010).
- (61) Chung MJ., Kim JM., Lee S., Kim T., Kim D., Baek J., Kim T., Lee J., Kim K., Yoon JA., Choe M. Suppressive effects of schizandra chinensis baillon water extract on allergy-related cytokine generation and degranulation in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells., *Nutr. Res. Pract.*, **6**(2), 97-105 (2012).
- (62) Murata K., Takano S., Masuda M., Iinuma M., Matsuda H. Anti-degranulating activity in rat basophil leukemia RBL-2H3 cells of flavanone glycosides and their aglycones in citrus fruits., *J. Nat. Med.*, **67**(3), 643-646 (2013).

- (63) Emim JA., Oliveira AB., Lapa AJ. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and coumestrol, in rats and mice., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**(2), 118-122 (1994).
- (64) Yoshimaru T., Suzuki Y., Matsui T., Yamashita K., Ochiai T., Yamaki M., Shimizu K. Blockade of superoxide generation prevents high - affinity immunoglobulin E receptor - mediated release of allergic mediators by rat mast cell line and human basophils., *Clin. Exp. Allergy.*, **32**(4), 612-618 (2002).
- (65) Kojima K., Gombosurengyin P., Ondogny P., Begzsuren D., Zevgeegy O., Hatano K., Ogihara Y. Flavanones from *Iris tenuifolia*. *Phytochemistry*, **44**(4), 711-714 (1997).
- (66) Dinda B., Chel G., Achari B. A dihydroflavonol from *Plumbago indica*. *Phytochemistry*, **35**(4), 1083-1084 (1994).
- (67) Ferreira EO., Dias DA., A methylenedioxyflavonol from aerial parts of *Blutaparon portulacoides*., *Phytochemistry*, **53**(1), 145-147 (2000).
- (68) Itoh T., Nakamura M., Nakamichi H., Ando M., Tsukamasa Y., Furuichi Y. Regulation of the differentiation of osteoblasts and osteoclasts by a hot-water extract of adzuki beans (*Vigna angularis*)., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**(1), 92-99 (2014).
- (69) Itoh T., Hori Y., Atsumi T., Toriizuka K., Nakamura M., Maeyama T., Ando M., Tsukamasa Y., Ida Y., Furuichi Y. Hot water extract of adzuki (*Vigna angularis*) suppresses antigen-stimulated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice., *Phytother. Res.*, **26**(7), 1003-1011 (2012).
- (70) Mikamo E., Okada Y., Semma M., Ito Y., Morimoto T., Nakamura M. フラボノイド類の抗酸化活性と構造との相関性に関する研究(2)., *JJFC.*, **7**(2), 97-101 (2000).

- (71) Yasunaga S., Hara Y., Shiraishi A., Sakane Y., Kamao T., Takezawa Y., Ohashi Y., Kikuchi T., Kubo. T., Monden A., Sugahara T. 温州ミカン果皮配合ヨーグルトのアレルギー症状緩和効果の検討., *日本農芸化学会 2015 年度大会.*, 要旨 3G41p09.
- (72) OLeary KA., Day AJ., Needs PW., Sly WS., O'Brien NM., Williamson G. Flavonoid glucuronides are substrates for human liver β -glucuronidase., *FEBS Lett.*, **503**(1), 103-106 (2001).
- (73) Untergehrer M., Bücherl D., Wittmann HJ., Strasser A., Heilmann J., Jurgenliemk G. Structure-dependent deconjugation of flavonoid glucuronides by human β -glucuronidase - In vitro and in silico analyses., *Planta. Med.*, **81**(12-13), 1182-1189 (2015).
- (74) Tang L., Zhou J., Yang CH., Xia BJ., Hu M., Liu ZQ. Systematic studies of sulfation and glucuronidation of 12 flavonoids in the mouse liver S9 fraction reveal both unique and shared positional preferences., *J. Agric. Food Chem.*, **60**(12), 3223-3233 (2012).