

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ~ 2009
 課題番号：19700596
 研究課題名 (和文) ロイコトリエンを標的とした食品中のアレルギー抑制成分の検索と作用機序の解明
 研究課題名 (英文) Study of the mechanisms on anti-allergy factors targeting leukotrienes in food.
 研究代表者
 高杉 美佳子 (TAKASUGI MIKAKO)
 九州産業大学・工学部・講師
 研究者番号：60305802

研究成果の概要 (和文)：マウスマスト細胞株を用いたロイコトリエン放出調節機能検定系を確立した。本研究課題で確立した検定系を用いて大豆イソフラボン類のロイコトリエン放出調節作用を検討した結果、アグリコンであるダイゼインおよびゲニステイン、代謝産物のエクオールに濃度依存的なロイコトリエン B₄ 放出抑制作用が認められた。さらに、ゲニステインおよびエクオールについて、細胞内カルシウムイオン濃度上昇に及ぼす影響を調べた結果、エクオールは細胞内カルシウムイオン濃度の上昇抑制がメカニズムの一部として関与し、ゲニステインは他のメカニズムが関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We developed the method to analyze regulatory factors of leukotriene release in a mouse mast cell line. The method was applied to investigate effect of soy isoflavones on leukotriene release from mast cells. It was elucidated that daizein and genistein, soy isoflavone aglycones and equol, a metabolite of soy isoflavone, suppressed leukotriene B₄ in dose-dependent manner. Equol also suppressed Ca²⁺ influx into mast cells, although genistein exerted no effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：アレルギー・ぜんそく、食品、ロイコトリエン

1. 研究開始当初の背景

我が国ではアレルギーの罹患率が増加傾向にあり、国民の約 1/3 が何らかのアレルギー疾患を持っていると言われている。アレルギーを予防・軽減する対策の一つとして、ア

レルギー抑制成分を含む食品の摂取が挙げられる。食品成分の摂取によるアレルギー症状の改善は、医薬品に比べて作用が穏やかであることや副作用が少ないことなどの理由からその有効性が期待されている。アレルギー

一は即時型および遅延型反応に大別されるが、発症機序については一般的に即時反応を中心に説明されることが多い。すなわち、マスト細胞表面に結合したIgEとアレルゲンとの架橋結合によってマスト細胞内に貯留されていたヒスタミンなどが放出し、平滑筋の収縮、粘液の分泌亢進などを引き起こすものである。従って、これまでの研究では、即時型アレルギーに対して抑制効果を示す食品成分の検索が主として行われてきた。一方、花粉症や気管支喘息などの遅延型（慢性型）反応のアレルギーを抑えることも非常に重要であるが、これに有効な食品成分の検索についてはこれまでほとんど行われていない。

ロイコトリエン（LT）は即時型および遅延型の両反応においてマスト細胞や好酸球から生成・放出され、アレルギー症状を引き起こし、アレルギーの慢性化において重要な役割を持つ。マスト細胞が刺激を受けると、細胞膜リン脂質に含まれるアラキドン酸がホスホリパーゼ A₂ によって切り出され、5-リポキシゲナーゼ反応によって LTA₄ を生成し、LTB₄、LTC₄、LTD₄ へと代謝される。LTB₄ は好酸球遊走作用を有しており、血液中の好酸球をアレルギー反応部位へ集積させる作用がある。一方、LTC₄ および D₄ は Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRSA) とも呼ばれ、好酸球より放出されるおよび LTC₄ および D₄ はヒスタミンよりも長く強い平滑筋収縮作用および粘液分泌促進能を有するので、アレルギー症状の慢性化を助長する。

2. 研究の目的

本研究では、LT を標的として、まず、マスト細胞株の培養条件および LT 放出条件、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による LT の同時定量法を確立し、LT 放出抑制作用を有する食品成分を探索する。また、LT 放出抑制作用が認められた成分に関しては、その作用メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HPLC による LTB₄ および LTC₄ の定量

アラキドン酸ナトリウムを加えて前培養した PB-3c を PBS で洗浄し、タイロード緩衝液で 2×10^6 cells/ml となるように再懸濁した。これらの細胞に 1 mM CaCl₂、5 μ M カルシウムイオノフォア A23187 を含む反応液で 20 分間細胞を刺激し、細胞上清を回収した。この細胞上清に種々の既知濃度の LTB₄ または LTC₄ を添加して LT 量を HPLC で分析し、ピーク面積の変化より、LTB₄ および LTC₄ のリテンションタイムを明らかにした。また、標準物質を段階希釈したものを分析し、LTB₄ および LTC₄ の検出

限界量を調べた。HPLC は ODS-A カラム (150 x 6.0 mm, 5 mm, YMC) を使用し、インジェクション量は 20 μ l、溶離液はアセトニトリル：メタノール：5

mMCH₃COONH₄ 溶液 (30：25：45, v/v/v)、流速 1 ml/min、検出波長 280 nm (島津 SPD-10Avp) の条件で分析した。

(2) マスト細胞株を用いた LT 放出調節機能検定系の確立

マウスマスト細胞株 PB-3c を 5×10^5 cells/ml に調整し、アラキドン酸ナトリウムを添加して前培養を行った。前培養した PB-3c を PBS で洗浄し、タイロード緩衝液に 2×10^6 cells/ml となるように再懸濁した。これらの細胞に 1 mM CaCl₂、5 μ M カルシウムイオノフォア A23187 を含む反応液 50 ml を添加して 37°C で細胞を刺激し、細胞上清に放出された LT 量を HPLC で分析した。LT 放出調節機能検定系を確立するために、前培養時間、アラキドン酸ナトリウム至適添加濃度、カルシウムイオノフォア A23187 の至適刺激時間の検討を行った。

(3) マスト細胞からの LTB₄ 放出に及ぼす大豆イソフラボン類の影響

アラキドン酸ナトリウムを終濃度 50 μ M で添加し、48 時間前培養した PB-3c を PBS で洗浄し、タイロード緩衝液で 2×10^6 cells/ml となるように再懸濁した。これらの細胞に 1 mM CaCl₂、大豆イソフラボンを含むタイロード緩衝液を加えて 37°C で 10 分間プレインキュベーションした後に 5 μ M カルシウムイオノフォア A23187 で 20 分間細胞を刺激し、細胞上清に放出された LT 量を HPLC で分析した。

大豆イソフラボンは配糖体のダイジン、ゲニスチン、アグリコンのダイゼイン、ゲニステイン、ダイゼインの代謝産物であるエクオールを用いた。

(4) 大豆イソフラボン類の細胞内カルシウムイオン濃度上昇に及ぼす影響

PB-3c を 1.5×10^7 cells/ml となるように Hanks' Buffer に懸濁し、蛍光プローブ試薬である Fluo-3 AM を終濃度 6 μ M となるように添加して、遮光下で 37°C、30 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、Hanks' Buffer に再懸濁し、100 μ M ゲニステインまたはエクオールを加え、5 分間安定化させた後に 50 μ M カルシウムイオノフォア A23187 で細胞を刺激し、その時の蛍光強度 (励起波長 490 nm、測定波長 530 nm) を経時的に測定した。

4. 研究成果

(1) HPLC による LTB₄ および LTC₄ の定量

LTB₄ または LTC₄ を添加した細胞上清を HPLC 分析し、標準物質の添加量とピーク面積の相関を調べた結果、LTB₄ のリテンションタイムは約 18 分、LTC₄ のリテンション

タイムは約8分であることを明らかにした。また、それぞれの検出限界量は、LTB₄は0.25 ng、LTC₄は0.32 ngであった。

(2) マスト細胞株を用いたLT放出調節機能検定系の確立

アラキドン酸ナトリウム添加における至適前培養時間の検討を行った結果、アラキドン酸ナトリウム無添加では、LTB₄は全く産生されなかったが、終濃度50 μMのアラキドン酸ナトリウムを添加して前培養したところ、18～48時間までは培養時間の増加に伴い、LTB₄産生量は増加し、48時間の前培養で産生量が最大となった。72時間全培養では、LTB₄の産生量は48時間培養の約2分の1に減少した (Fig. 1)。以上の結果より、LT放出調節機能検定系にはアラキドン酸ナトリウム添加48時間培養の細胞が適していることを明らかにした。

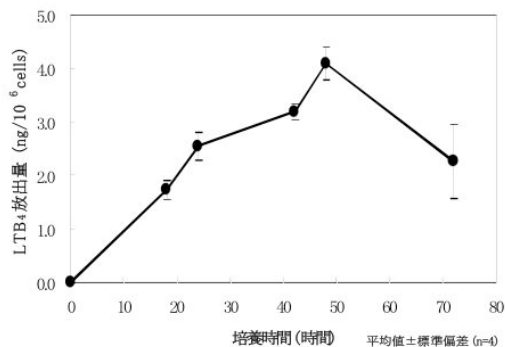


Fig. 1 アラキドン酸ナトリウム添加前培養時間がPB-3cからのLTB₄放出に及ぼす影響。

次にアラキドン酸ナトリウムを終濃度0～100 μMで添加して48時間前培養し、アラキドン酸ナトリウムの至適添加濃度の検討を行った。その結果、LTB₄産生量はアラキドン酸ナトリウムの添加濃度に依存して増加し、終濃度50 μM以上で最大となった (Fig. 2)。

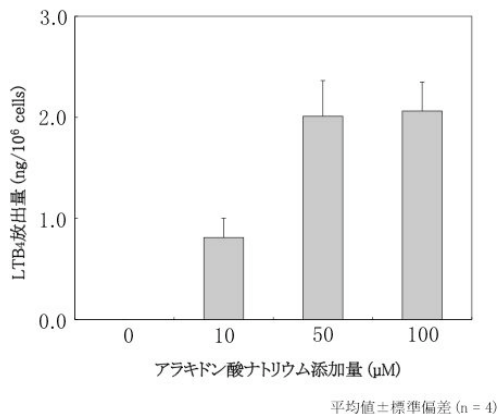


Fig. 2 アラキドン酸ナトリウム添加濃度がPB-3cからのLTB₄放出に及ぼす影響。

また、アラキドン酸ナトリウムで前培養したPB-3cをカルシウムイオノフォアA23187で0～40分間刺激を行い、至適刺激時間の検討を行った。その結果、10分間の刺激でLTB₄放出が認められ、40分間の刺激までLTB₄量に大きな変化はなかった。

以上の結果より、PB-3cを用いた食品成分のLT放出調節機能検定系は、アラキドン酸ナトリウムを終濃度50 μMで添加して、48時間前培養し、カルシウムイオノフォアA23187で20分間刺激の条件で行うこととした。

(3) マスト細胞からのLT放出に及ぼす大豆イソフラボン類の影響

本研究課題で確立した実験方法を用いて、大豆イソフラボンおよびダイゼインの代謝産物であるエクオールのLTB₄放出調節作用を検討した。終濃度50 μMで大豆イソフラボンを添加した時のLTB₄放出量をコントロール (エタノール添加) に対する相対放出量で表した (Fig. 3)。配糖体であるダイジンおよびゲニスチン、アグリコンであるダイゼインには顕著なLTB₄放出調節作用が認められなかったのに対し、ゲニステインはLTB₄放出を約80%抑制し、エクオールはLTB₄放出を完全に抑制することを明らかにした。

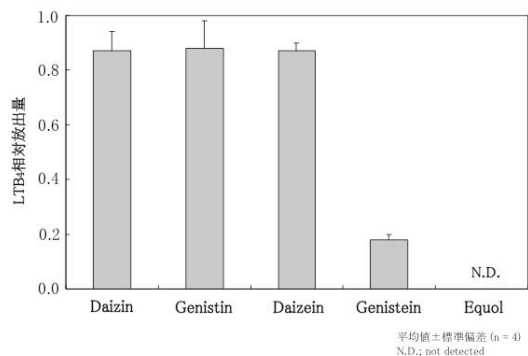


Fig. 3 大豆イソフラボンおよび代謝産物のLTB₄放出に及ぼす影響。

LTB₄放出抑制作用が認められた大豆イソフラボンアグリコンおよびダイゼインの代謝産物であるエクオールを終濃度0～100 μMで添加し、LTB₄放出に及ぼす濃度依存性を検討した。その結果、ダイゼインは終濃度20 μMでLTB₄放出を約20%抑制し、終濃度100 μMで約50%抑制した (Fig. 4)。

ゲニステインは終濃度20 μMでLTB₄放出を約50%抑制し、終濃度80 μM以上でLTB₄放出を完全に抑制した (Fig. 5)。

エクオールは終濃度20 μMでLTB₄放出を約50%抑制し、終濃度40 μM以上でほぼ完全にLTB₄放出を抑制した (Fig. 6)。

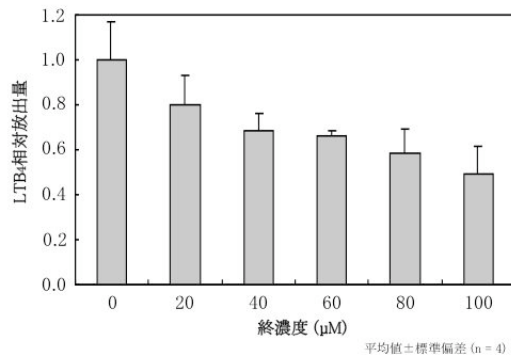


Fig. 4 ダイゼインの LTB₄ 放出に及ぼす影響.

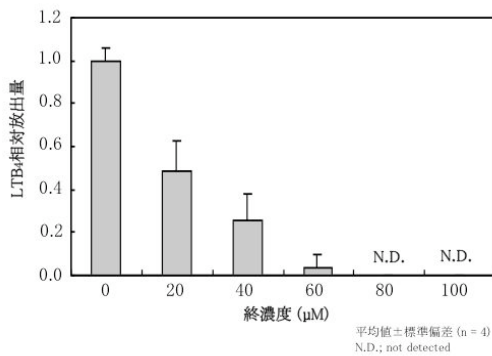


Fig. 5 ゲニステインの LTB₄ 放出に及ぼす影響.

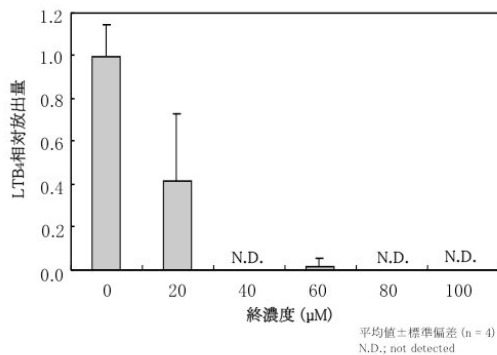


Fig. 6 エクオール の LTB₄ 放出に及ぼす影響.

これらの結果より、大豆イソフラボンアグリコンおよびエクオールは濃度依存的に LTB₄ 放出を抑制し、その抑制作用の強さは、エクオール > ゲニステイン > ダイゼインの順であることを明らかにした。

(4) 大豆イソフラボン類の細胞内カルシウムイオン濃度上昇に及ぼす影響

マスト細胞は刺激を受けると細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、LT やヒスタミンなどのケミカルメディエーターを放出する。そこで、強い LTB₄ 放出抑制作用が認められたゲニステインおよびエクオールの細胞内カルシウムイオン濃度に及ぼす影響を

検討し、作用メカニズムの解明を試みた。

ゲニステイン共存下ではカルシウムイオンノフォア A23187 で細胞を刺激すると細胞内カルシウムイオン濃度は上昇し、コントロールと同様の傾向を示した。これに対しエクオール共存下では、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑制される傾向が認められた (Fig. 7)。このことより、エクオールの LTB₄ 放出抑制作用のメカニズムの一つとして、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇抑制が考えられ、ゲニステインは、他のメカニズムが関与していると考えられる。また、ゲニステインとエクオールでは作用メカニズムが異なることを示唆している。

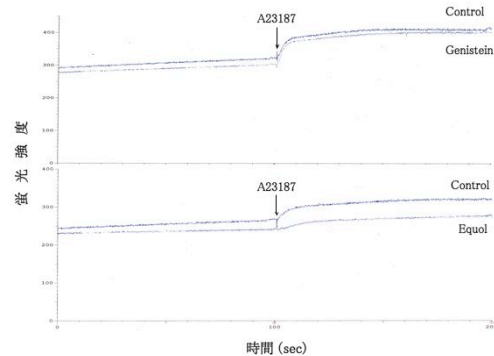


Fig. 7 ゲニステインおよびエクオールの細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に及ぼす影響.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- ① 傘田恵美, 御手洗千鶴, 迎勝也, 高杉美佳子, マウスマスト細胞株を用いたロイコトリエン放出調節機能検定系の確立. 九州産業大学工学部研究報告, 査読無, 45 巻, 2008 年, 83-85.

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 高杉美佳子, 人見英里, 島田和子, 山田耕路, マスト細胞株を用いたロイコトリエン B₄ 放出に及ぼすアラキドン酸の影響. 2007 年度生物機能研究会, 2007 年 6 月 9 日, 鹿児島県鹿児島市.
- ② Toru Shiina, Hirohisa Naito, Mikako Takasugi, Takeshi Ohkubo, Koretaro Takahashi, Bioconversion of Marine Phospholipids in Super Critical Carbon Dioxide to Produce DHA Enriched Phospholipids. The 7th Japan-Korea Joint Seminar on Fisheries Sciences – Sustainability of Fisheries in Japan and Korea -, 2007 年 8 月 27~28 日, Kwanju-City, Yosu-City, Korea.

- ③ 高杉美佳子, 山崎正夫, 人見英里, 島田和子, 西山和夫, 山田耕路, マスト細胞株を用いたロイコトリエン B₄ 放出調節機能検定系の確立. 日本食品科学工学会第 54 回大会, 2007 年 9 月 14 ~ 15 日, 福岡県福岡市.

[図書] (計 1 件)

- ① Koretaro Takahashi, Hirohisa Naito, Takeshi Ohkubo, Mikako Takasugi, Bioconversion of Marine Phospholipid in Super Critical Carbon Dioxide to Produce Functional DHA-Enriched Lysophospholipid. CRC Press, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, ed. by Ching T. Hou, Jei-Fu Shaw, (2009), 279-289.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高杉 美佳子 (TAKASUGI MIKAKO)

研究者番号 : 60305802