

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350112

研究課題名(和文) エラジタンニンのアレルギー抑制効果の解明と食品への利用

研究課題名(英文) Inhibitory effects of ellagitannin on allergy as a food supplement

研究代表者

長野 隆男 (Nagano, Takao)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：20304660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：接触過敏症(CHS)は、アレルギー性接触皮膚炎のモデル動物実験系としてよく用いられる。本研究では、CHS動物実験系を用いてエラジタンニンを多く含むザクロポリフェノール濃縮物(PPC)のアレルギー抑制効果を検討した。研究の結果、食品として摂取可能なポリフェノール量に相当するマウスの摂取量で、CHS抑制効果が示された。そのメカニズムとして好中球を動員するCXCL2とマクロファージを動員するCCL12の発現抑制が考えられた。さらに、PPCと大豆イソフラボンの相乗効果によるCHS抑制効果が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Murine contact hypersensitivity (CHS) is one of the most frequently used animal models of human allergic contact dermatitis (ACD). In this study, we investigated the inhibitory effects of diets supplemented with pomegranate polyphenol concentrate (PPC) on CHS. The results indicate that low doses of dietary PPC alleviate CHS symptoms by attenuating inflammation via downregulation of CXCL2 and CCL12, suggesting that dietary supplementation with PPC may provide beneficial effects on ACD at physiologically relevant doses to humans. Furthermore, it is suggested that the synergistically inhibitory effects of PPC and soybean isoflavone on CHS.

研究分野：食生活学

キーワード：エラジタンニン ザクロ 大豆イソフラボン 接触過敏症 アレルギー性接触皮膚炎 アレルギー

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国におけるアレルギーの罹患率はこの数十年で増加しており、2人にひとりは何らかのアレルギーを持っていると言われている。そのため、アレルギーの予防やその症状の緩和に有効な食品成分とその利用についての研究は重要と考えられる。

(2) エラジタンニン(ET)は、ザクロ、ラズベリー、イチゴ、アーモンドなど多くの食品に含まれているポリフェノールである。ETは、生体内に直接吸収されず、腸管内でエラグ酸に分解され、腸内細菌によるET代謝物の形で吸収される。私たちは、ET代謝物(M1-M4)のアレルギー抑制作用をラット好塩基球由来細胞株を用いた脱顆粒試験により調べた。実験の結果、M1-M4は、アレルギー抑制効果がよく知られているポリフェノールであるケルセチンと同等以上の強い脱顆粒抑制効果を有することを明らかにした。

(3) ザクロ(*Punica granatum L.*)は、中東、地中海地域、中国、米国など広い地域で生産されており、主に果実やジュースとして消費されている。ザクロジュース(PJ)は、オレンジ、ブドウ、グレープフルーツ、リンゴなどの他のジュースと比べてより多くのポリフェノールを含んでいること、抗酸化活性が最も高いなどの特徴がある。PJの可溶性ポリフェノールはETを主成分としており、がん、糖尿病、心血管疾患などの慢性病にたいして予防効果が報告されている。しかしながら、アレルギーなどの免疫疾患に対する効果についての報告は少ない。

(4) 大豆は、アジアで数千年間食べられてきた主要な作物の一つであり、イソフラボン(SI)、サポニンなどのフィトケミカルを多く含んでいる。最新の臨床研究から大豆食品またはSIには、乳がんや子宮がんなどのがん、心筋梗塞、骨粗鬆症、更年期障害の軽減に対する効果が報告されている。しかしながら、アレルギーなどの免疫疾患に対する効果についての報告は少ない。

(5) アレルギー性接触皮膚炎(ACD)は低分子の化合物がハプテンとなり、繰り返し皮膚に触れることにより炎症を惹起する遅延型のアレルギー疾患である。ハプテンとなる身近な化合物は2800種類以上あると言われ、主なものとして化粧品やヘアカラーに含まれる化合物や装飾品の金属などが挙げられる。接触過敏症(CHS)は、ACDのモデル動物実験系として最もよく用いられる。

2. 研究の目的

(1) CHS動物実験系に与えるジニトロフルオロベンゼン(DNFB)の影響

ACDの研究に、マウスを用いたCHS動物実験系がよく使用される。しかしながら、今までにCHS動物実験系を用いた報告では、チャレンジするハプテンの量と回数は様々であり、その影響を詳細に検討した報告はみられない。そこで、

ハプテンとして最もよく使用されるDNFBを使用し、耳介にチャレンジする濃度と回数がCHS反応に与える影響について検討した。

(2) 大豆及び大豆イソフラボン(SI)のCHS抑制効果

MF(オリエンタル酵母)は、齧歯動物用飼料として広く使われている。MFなどの齧歯動物用飼料には、たんぱく質源として大豆タンパク質が配合されることからSIを多く含むことが報告されている。そのため、MFのSI含量が高いことからMFにはCHS抑制効果がある可能性を考えた。そこで、MF飼料と市販のSIを用いて大豆とSIのCHS抑制効果を検討した。

(3) ザクロポリフェノール濃縮物(PPC)のCHS抑制効果

PJからザクロポリフェノール濃縮物(PPC)を調製し、CHS動物実験系を用いてPPCのCHS抑制効果について検討を行った。ここで、マウスの一日平均摂水量は4~5g/匹である。従って、摂水を通して0.2%PPC摂取するマウスでは1日に5~6mgのポリフェノールを消費し、およそ300mg/kg体重/日のポリフェノールを摂取すると推定される。一方、PJのポリフェノールの含量は0.2%~1.0%であることから、コップ1杯(200mL)のPJには0.4~2.0gのポリフェノールが含まれることになる。ヒトが食品として摂取可能な量に相当する量を0.01%PPCとし、0.01%PPCと0.2%PPC摂取群でCHS抑制効果を研究した。

(4) PPCとSIの相乗効果によるCHS抑制効果

栄養や健康の面から、食事は色々なものを食べることが推奨される。そのため、ザクロと日本人がよく食べている大豆を組み合わせることに、ACDの発症の予防や緩和における利点が見いだせないかと考えた。そこで、CHS動物実験系を用いてPPCとSIの相乗効果によるCHS抑制効果について検討をおこなった。

3. 研究の方法

(1) CHS動物実験系

実験0日目と1日目に、毛を剃った腹部に0.5%DNFBで感作をおこなった。実験5日目と12日目に0.15%DNFBを耳介にチャレンジした。チャレンジする前と24時間後の耳介の厚みをマイクロメーターで測定し、その差を耳介の腫れとして評価した。なお、本動物実験は、川崎医療福祉大学動物実験委員会、及び川崎医科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

(2) 耳介組織の組織化学的観察方法

マウス耳介を採取し、IHC Zinc Fixative(BD Bioscience)で24時間固定をおこなった後にパラフィン包埋切片を作製した。組織切片の染色は、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色と免疫組織化学(IHC)染色をおこなった。IHC染色は、ペンタナXTシステムディスカバリー(ロシュ・ダイアグノスティクス)を使用して行った。一次抗体としてanti-mouse Ly-6G(Gr-1)抗体

(eBioscience) を用い、二次抗体として biotin mouse anti-rat IgG2b (BD Bioscience) を使用した。また、ヘマトキシリンで核の染色をおこなった。IHC 染色した組織切片は、40 倍対物レンズを使用して光学顕微鏡で観察し、210 μm 四方中の染色された細胞を数え、1 切片につき 5 箇所の細胞数の平均を求めた。

(3) 遺伝子発現解析方法

マウスの耳介組織を試料とした。RNeasy Fibrinous Tissue Mini Kit (Qiagen) を使用して、トータル RNA を精製した。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析は、Filgen に委託して GeneChip[®] Mouse Gene ST Array (Affymetrix) を使用して行われた。mRNA レベルは TaqMan 法 (Applied Biosystems) を用いたリアルタイム PCR によって測定した。ハウスキーピング遺伝子には β -アクチンを用いた。

(4) サイトカインの発現解析方法

マウスの耳介組織を試料とし、抗体アレイ (R&D Systems) を用いてサイトカイン及びケモカインの発現解析を行った。サイトカインの定量は ELISA を用いて行った。

(5) 統計解析

結果は、平均値と標準誤差で示した。統計解析には、Origin 8.5J (OriginLab) を使用した。各群の比較には一次元配置分散分析を行い、その後 Tukey 検定でポストホックテストをおこなった。

4. 研究成果

(1) CHS 動物実験系に与える DNFB の影響

CHS 動物実験系

非 CHS コントロール群 (n=3), 0.15% DNFB をチャレンジした 0.15% DNFB 群 (n=6), 0.3% DNFB をチャレンジした 0.3% DNFB 群 (n=6), 0.5% DNFB をチャレンジした 0.5% DNFB 群 (n=6) の 4 群で行った。

耳介の腫れに与える DNFB の濃度とチャレンジ回数の影響

1 回目のチャレンジを行ない耳介の腫れを測定した結果、コントロール群で $-0.001 \pm 0.005\text{mm}$, 0.15% DNFB 群で $0.058 \pm 0.021\text{mm}$, 0.3% DNFB 群で $0.099 \pm 0.019\text{mm}$, 0.5% DNFB 群で $0.224 \pm 0.028\text{mm}$ であった。次に、2 回目のチャレンジを行ない耳介の腫れを測定した結果、コントロール群で $0.007 \pm 0.006\text{mm}$, 0.15% DNFB 群で $0.218 \pm 0.020\text{mm}$, 0.3% DNFB 群で $0.243 \pm 0.040\text{mm}$, 0.5% DNFB 群で $0.376 \pm 0.040\text{mm}$ であった。0.15% DNFB 群と 0.3% DNFB 群では有意な差は認められなかった。0.5% DNFB 群でほとんどのマウスの耳介に水疱ができ耳介の厚み測定は困難であった。さらに、3 回目のチャレンジを行ない耳介の腫れを測定した結果、コントロール群で $0.006 \pm 0.005\text{mm}$, 0.15% DNFB 群で $0.196 \pm 0.014\text{mm}$, 0.3% DNFB 群で $0.311 \pm 0.044\text{mm}$, 0.5% DNFB 群で $0.951 \pm 0.261\text{mm}$ であった。

0.3% DNFB 群でマウスの耳介に水疱ができ、耳介の厚み測定に支障をきたす個体が見られた。これらの結果から、0.15% と 0.3% DNFB では 2 回のチャレンジで、0.5% DNFB では 1 回のチャレンジで評価をすることが望ましいと考えられた。

耳介組織の観察

3 回目のチャレンジをおこなった 24 時間後の耳介を採取して組織切片を作製し、HE 染色をおこなった後に光学顕微鏡を使用して組織観察を行った。コントロール群と比較して 0.15% DNFB 群, 0.3% DNFB 群, 0.5% DNFB 群で、CHS により耳介組織が腫れている様子が観察された。0.15% DNFB 群と 0.3% DNFB 群では、組織の腫れに大きな差はみられなかった。0.5% DNFB 群では、耳介組織の苔癬化が進んでおり次の IHC 染色は困難と判断した。

耳介組織の IHC 染色

抗 Gr-1 抗体を用いて耳介組織に浸潤した炎症細胞の IHC 染色を行った。光学顕微鏡下で IHC 染色された細胞の数を数えたところ、0.15% DNFB 群で 166 ± 59 個/ mm^2 , 0.3% DNFB 群で 253 ± 59 個/ mm^2 であった。0.3% DNFB 群は、0.15% DNFB 群と比較して耳介組織に浸潤した炎症細胞の有意な増加がみられた。

以上、耳介の腫れを指標に CHS 評価をおこなった結果、0.15% と 0.3% DNFB は 2 回のチャレンジで、0.5% DNFB は 1 回のチャレンジで CHS 評価をすることが望ましいことが示された。次に、HE 染色と IHC 染色をおこない耳介組織の CHS 評価をおこなった。その結果、HE 染色では 0.15% と 0.3% DNFB 群に耳介組織の腫れに大きな差は見られなかった。一方、IHC 染色では、0.3% DNFB 群は 0.15% DNFB 群と比べて耳介組織に浸潤した炎症細胞に有意な増加がみられた。従って、抗 Gr-1 抗体を使用した IHC 染色は、CHS 評価をするうえで有用な研究方法と考えられた。

(2) 大豆及び SI の CHS 抑制効果

CHS 動物実験系

F2PLD1 と水摂取のネガティブコントロール (ネガコン) 群 (n = 3) とポジティブコントロール (ポジコン) 群 (n = 6), MF と水摂取群 (大豆摂取群, n = 6), F2PLD1 と 0.1% HG 溶液摂取群 (SI 摂取群, n = 6) の 4 群に分けて実験を行った。

SI 含量

SI は、MF に $51.2 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 含まれており、F2PLD1 では検出されなかった。HG には、 $54.4 \text{ mg}/100 \text{ g}$ の SI が含まれていた。そのため、マウスに与える HG の濃度は 0.1% で行った。

大豆と SI 摂取による耳介の腫れに対する抑制効果

2 回目のチャレンジ 24 時間後に耳介の腫れを測定したところ、ネガコン群で $0.004 \pm 0.001 \text{ mm}$, ポジコン群で $0.190 \pm 0.009 \text{ mm}$, 大豆摂取群で $0.134 \pm 0.004 \text{ mm}$, SI 摂取群で $0.144 \pm 0.005 \text{ mm}$ であった。ポジコン群と比較して大豆または SI 摂取群で耳介の腫れは有意に抑制された。

大豆とSI摂取によるGr-1陽性炎症細胞の浸潤抑制効果

2回目のチャレンジ24時間後に耳介組織を採取して、組織切片を作製した。次に、抗Gr-1抗体を用いて耳介組織に浸潤した炎症細胞のIHC染色を行った。耳介組織に浸潤したGr-1陽性炎症細胞の数を測定した結果、ポジコン群で 366 ± 40 個/mm²、大豆摂取群で 203 ± 50 個/mm²、SI摂取群で 223 ± 51 個/mm²であった。大豆とSI摂取群は、ポジコン群と比較して耳介組織に浸潤した炎症細胞の数に有意な減少がみられた。

大豆とSI摂取による耳介組織におけるCCL24発現抑制効果

大豆摂取によるCHSの抑制効果のメカニズムを明らかにするために、DNAマイクロアレイを使用して遺伝子発現解析を行った。2回目のチャレンジ24時間後の耳介組織を試料として、ポジコン群と大豆摂取群のマウスについて調べた。その結果、大豆摂取により*Ccl24*遺伝子が最も抑制された。次に、リアルタイムPCRとELISAを用いて耳介組織におけるCCL24のmRNAとたん白質の発現量を定量した。その結果、大豆とSI摂取群で、ポジコン群と比較してCCL24のmRNAとたん白質の発現に有意な減少がみられた。

以上の結果から、大豆およびSI摂取によるCHS抑制効果が示され、そのメカニズムとしてCCL24の発現抑制が考えられた。

(3) PPCのCHS抑制効果

CHS動物実験系

水摂取のネガティブコントロール群(ネガコン, n=3)とポジティブコントロール群(ポジコン, n=6)、0.01%PPC摂取群(n=6)、0.2%PPC摂取群(n=6)の4群に分けて実験を行った。

PPC摂取による耳介の腫れに対する抑制効果

2回目のチャレンジをおこなって24時間後の耳介の腫れを測定した。耳介の腫れは、ネガコン群で 0.001 ± 0.007 mm、ポジコン群で 0.206 ± 0.007 mm、0.01%PPC摂取群で 0.153 ± 0.011 mm、0.2%PPC摂取群で 0.136 ± 0.005 mmであった。耳介の腫れは、ポジコン群と比較して0.01%と0.2%PPC摂取群で有意に抑制された。

PPC摂取による耳介組織の腫れとGr-1陽性炎症細胞の浸潤抑制効果

HE染色をおこなって耳介組織を観察した結果、ポジコンと比較して0.01%と0.2%PPC摂取群は耳介の腫れが抑制されていた。IHC染色をおこない、耳介組織に浸潤した白血球の数を求めた。耳介組織に浸潤した白血球の数は、ポジコンで 346 ± 25 個/mm²、0.01%PPC摂取群で 252 ± 21 個/mm²、0.2%PPC摂取群で 221 ± 26 個/mm²であった。耳介組織に浸潤した白血球の数は、ポジコンと比較して0.01%と0.2%PPC摂取群で有意に減少していた。

PPC摂取の耳介組織でのサイトカイン遺伝子発現に対する抑制効果

ポジコンと0.2%PPC摂取群の耳介について、

DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析をおこなったところ、*Cxcl2*、*Cxcl3*、*Ccl3*で発現抑制が認められた。次に、リアルタイムPCRを用いた定量的遺伝子発現解析をおこなった結果、ポジコン群と比較して0.01%と0.2%PPC摂取群で*Cxcl2*と*Cxcl3*の有意な発現抑制が見られたが、*Ccl3*では観察されなかった。

PPC摂取の耳介組織でのサイトカイン発現に対する抑制効果

CHS惹起部位である耳介組織を試料として抗体アレイを用いて、25種類のケモカインの発現について検討をおこなった。その結果、好中球を動員するCXCL2とCXCL5、単球/マクロファージを動員するCCL12の発現抑制が示された。さらに、ELISAを用いてCXCL2とCCL12の定量を行って発現抑制を確かめた。

以上の結果から、PPC摂取によるCHS抑制効果が示され、そのメカニズムとして好中球を動員するケモカインであるCXCL2と単球/マクロファージを動員するCCL12の発現抑制が考えられた。

(4) PPCとSIの相乗効果によるCHS抑制効果

CHS惹起部位である耳介を試料として抗体アレイを用いて、サイトカインの発現について検討をおこなった。その結果、PPCとSIの混合液摂取群において、好中球を動員するCXCL2、単球/マクロファージを動員するCCL12、T細胞の活性化を誘導するCXCL10の発現抑制が示された。CXCL10の発現抑制は、PPCとSI単独摂取群では観察されなかった。以上の結果から、CHS抑制におけるPPCとSIの相乗効果によるCHS抑制効果が示唆された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計2件)

Takao Nagano, Woruna Wu, Kazunobu Tsumura, Hiroko Yonemoto-Yano, Tomoari Kamada, Ken Haruma, The inhibitory effect of soybean and soybean isoflavone diets on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読あり, 80(5), 2016, pp. 991-997.

DDI: 10.1080/09168451.2015.1132150
烏烏日娜, 武政睦子, 長野隆男, 接触過敏症モデル動物実験系に与えるジニトロフルオロベンゼンの影響, *川崎医療福祉学会誌*, 査読あり, 25(1), 2015, pp. 113-119.

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/soc/mw/journal/jp/>

(学会発表)(計9件)

長野隆男, ザクロ由来ポリフェノールが接触皮膚炎の軽減に与える効果, 日本家政学会第65回大会, 2013年5月19日, 昭和女子大学(東京都・世田谷区)

長野隆男, 伊東秀之, 西田典永, 接触皮膚炎モデル動物実験系におけるエラジタンニンがT細胞に与える効果, 日本栄養・食糧学会第67回大会, 2013年5月25日, 名古屋

屋大学東山キャンパス(愛知県・名古屋市)
長野隆男, 烏烏日娜, 米元博子, 津村和伸,
接触過敏症モデル動物実験系における大豆の
効果, 日本農芸化学会 2014 年度大会,
2014 年 3 月 29 日, 明治大学生田キャン
パス(神奈川県・川崎市)

烏烏日娜, 白媛媛, 西田典永, 長野隆男,
接触過敏症モデル動物実験系におけるザ
クロポリフェノールと大豆の効果, 日本栄
養・食糧学会第 68 回大会, 2014 年 5 月 31
日, 酪農学園大学(北海道・江別市)

長野隆男, 大豆の接触過敏症抑制効果 -
接触過敏症モデル動物実験系を用いた検
討, 日本家政学会第 66 回大会, 2014 年
5 月 25 日, 北九州国際会議場(福岡県・北
九州市)

Takao Nagano, Norihisa Nishida, Tomoari
Kamada, Ken Haruma, Inhibitory effect of
polyphenol concentration from pomegranate
juice on 2,4-dinitrofluorbenzene-induced
contact hypersensitivity in mice. 17th World
Congress of Food Science and Technology &
Expo, August 18, 2014, Palais des congrès
de Montréal, Montréal (Canada)

長野隆男, 烏烏日娜, 西田典永, 接触過敏
症抑制効果に与えるザクロポリフェノール濃
縮物の投与量の影響, 日本農芸化学会
2015 年度大会, 2015 年 3 月 28 日, 岡山大
学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

Takao Nagano, Wurina Wu, Hiroko
Yonemoto-Yano, Kazunobu Tsumura,
Tomoari Kamada; Ken Haruma, Inhibitory
effect of soy isoflavone on
2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact
hypersensitivity in mice. 12th Asian
Congress of Nutrition, May 16, 2015, パシ
フィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Takao Nagano, Wurina Wu, Kazunobu
Tsumura, Hiroko Yonemoto-Yano, Soy
isoflavone attenuates
2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact
hypersensitivity in mice. The 6th
International Conference on Food Factors,
November 23, 2015, COEX, Soul (Republic
of Korea)

(図書)(計 0 件)

(産業財産権)

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

(その他)

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 隆男(NAGANO Takao)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号: 20304660