

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007 ~ 2009
課題番号：19500685
研究課題名 (和文) 抗アレルギー作用を有する大豆イソフラボンの免疫疾患病態制御に関する基盤的研究
研究課題名 (英文) Basic study that examining immune regulatory effect of soy isoflavones.
研究代表者
酒井 徹 (SAKAI TOHRU)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：40274196

研究成果の概要 (和文)：大豆中に含まれるイソフラボンは、これまで血清脂質低下作用、骨粗鬆症予防およびホルモン依存性の悪性腫瘍予防に関わることが明らかにされている。今回の研究では、大豆イソフラボンが免疫機能にどのように作用するか検討を行った。大豆イソフラボンの一種であるエクオールは、血中の抗原特異的 IgE 抗体を上昇させた。また、マウスでの実験的大腸炎の系では、炎症を増強することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：Soy foods have been consumed for centuries in Asian countries. Human clinical and epidemiological studies have revealed many potential benefits of intake of soy products. In this study, we therefore investigated the effects of equol on ovalbumin (OVA)-specific T cell and B cell responses in BALB/c mice. Mice that had been treated with 20 mg/kg equol showed a significantly higher level of OVA-specific IgE than that in control mice. Furthermore, equol perpetrated DSS-induced colitis in BALB/c mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：イソフラボン、免疫、大腸炎

1. 研究開始当初の背景

近年、大豆食品は慢性疾患、ことに心疾患と癌に対するリスク低減効果が証明された事によって大きな関心を集めている。大豆は古代から存在するマメ科植物で、発酵

食品・非発酵食品に関わらず原料として伝統的に多用され、日本をはじめとするアジア圏の主要な食物となっている。

大豆食品には植物化学物質 (フィトケミカル) と呼ばれる生理学的機能を持つ化合

物の宝庫であり、これらが重要な健康増進効果に関与しているものと推察されている。サポニン、フィチン酸、プロテアーゼインヒビター、レシチンなどはそれぞれ抗癌物質であり、植物ステロール類はコレステロール低下作用を有し、さらにイソフラボンは多彩な機能を示す。これら大豆中の機能性化合物の中でも最も注目されているのはイソフラボンであり、循環器疾患、ホルモン依存性の悪性腫瘍および骨粗鬆症発症リスクの低減に寄与することが明らかにされている。

2. 研究の目的

現在、アレルギーは国民病とされ、実に日本人の3人に1人は何らかのアレルギー症状を訴えているとされる。そのアレルギー発症の原因の一つとして細胞性免疫応答を担う1型ヘルパーT細胞(Th1)応答と体液性免疫応答を担う2型ヘルパーT細胞(Th2)応答のバランスが崩れ、Th2応答が有意になると抗原特異的IgE反応が過剰となりアレルギーの発症につながるということが示唆されている。これまで、我々は大豆イソフラボンの一種であるゲニステインが抗原特異的免疫応答を抑制すること(Nutrition, 22:802-809, 2006)、アトピー性皮膚炎自然発症モデル動物を用いた解析より皮膚炎に対し症状改善効果が認められること(J. Nutr. Sci. Vitaminol., 54:293-295, 2006)、およびT細胞レセプタートランスジェニックマウスを用いた解析より抗原特異的サイトカイン産生を増強させること(J. Nutr. Sci. Vitaminol., 52:327, 2006)を明らかにしてきた。これらの知見はゲニステインには免疫制御作用が存在することを示すものである。大豆製品は日本の食生活上欠かせない食品であり、その大豆製品中に存在するイソフラボンの免疫機能に対する影響を明らかにすることは興味深いことと考

えられる。本申請研究では、これまで我々が明らかにしてきた大豆イソフラボンの免疫調節作用が、様々な免疫疾患の病態制御に関わるか免疫疾患モデル動物を用い解析をすると共にその作用機序を明らかにし、ヒトにおける臨床応用の基盤的データを提供することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗原特異的免疫誘導に対する大豆イソフラボンの影響

① 実験デザイン

7週齢の雌BALB/cマウスを、0(コントロール)、4及び20 mg/kg/day ダイゼインまたはエクオール投与群に分け、5日間予備飼育した。その後35日間連続的に、0、4及び20 mg/kg/day となるように調製したダイゼインまたはエクオール溶液0.2 mlを、ゾンデにて1日1回経口的に強制投与を行った。イソフラボン投与開始日を0日として、7日及び21日に卵白アルブミン(OVA)による免疫を施した。

② IFN- γ 、IL-4 および IL-13 産生

牛胎仔血清入りRPMI-1640培地で400 μ g/mlに調整したOVA溶液250 μ lに 1×10^7 cells/mlに調整した細胞浮遊液250 μ lを加え、24-wellプレートにて3日間培養を行った。抗マウスCD3 mAbによる刺激では、まずPBSにて2 μ g/mlに調整した抗マウスCD3 mAbを300 μ lずつ24-wellプレートに入れ、4°Cで一晩インキュベートし固相化を行い、OVA刺激の場合と同様に細胞を加えた。それらを5% CO₂、37°Cの条件下で72時間培養を行い、培養終了後、培養上清を回収し、Mouse IFN- γ 、IL-4 および IL-13 ELISA kit(eBioscience)を用いてそれぞれのサイトカイン産生量を測定した。

③ 抗原特異的抗体産生

OVAをcoating bufferにて10 μ g/mlに調

整し、ELISA プレートに 100 μ l/well 入れ、4°Cで一晩インキュベートした。各ウェルを 0.05% Tween 20 を含んだ PBS 溶液 (PBS-T) で 3 回洗浄し、1% BSA を含む PBS-T を 200 μ l/well 入れ、室温で 2 時間静置し、ブロッキングを行った。3 回洗浄した後、PBS-T で段階希釈した血清 100 μ l をそれぞれウェルに入れ、室温で 2 時間静置した。各ウェルを 3 回洗浄した後、1% BSA を含む PBS-T で 1,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗マウス IgG1、IgG2a、又は IgG を 100 μ l/well 加え、室温で 2 時間静置した。IgE 測定では、1% BSA を含む PBS-T で 1,000 倍希釈したビオチン標識抗マウス IgE を 100 μ l/well 加え、室温で 1 時間静置した後、各ウェルを 3 回洗浄し、1% BSA を含む PBS-T で 3,000 倍希釈したストレプトアビジン標識 AP を 100 μ l/well 加え 1 時間室温で静置した。各ウェルを 5 回洗浄し、*p*-nitrophenyl phosphate を 10% ジエタノールアミンバッファーに溶解した溶液 (1 mg/ml) を 100 μ l/well 加えて発色させた。その後 100 μ l の 3 N NaOH で反応を止め、405 nm の波長にて吸光度を測定した。

(2) DSS 誘発大腸炎に対する大豆イソフラボンの影響

① 実験デザイン

5 週齢の雌 BALB/c マウスのうち 8 匹をコントロール、7 匹ずつを 20 mg/kg/day のゲニステイン、ダイゼイン及びエクオール投与群に分け、4 日間予備飼育した。その後 12 日間連続的に、0 (コントロール) 及び 20 mg/kg/day になるように調整した genistein、daidzein 及び equol 溶液 0.2 ml をゾンデにて 1 日 1 回経口投与を行った。経口投与開始を -7 日として、0 日から 4 日間 4% デキストラン硫酸塩 (DSS) 溶液の自由飲水を開始した。7 日に

マウスを屠殺後、大腸を採取して組織学的な解析を行った。

② 潰瘍性大腸炎誘発

潰瘍性大腸炎は、DSS によって誘発させた。DSS は蒸留水に溶解し、DSS 4% の溶液を作製し用いた。

③ 培養

本実験では、CD3mAb 及び LPS で刺激を行った。まず、抗マウス CD3 mAb は PBS 溶液で 1 μ g/ml に溶解した後、48 well プレートに 150 μ l/well ずつ加え、4°Cで一晩コーティングさせた。このプレートを培養直前に牛胎仔血清入り RPMI-1640 培地で 3 回洗浄して、250 μ l/well 入れ、 4.2×10^6 cells/ml に調整した細胞浮遊液を 250

μ l/well ずつ加えた。LPS (2 mg/ml) は牛胎仔血清入り RPMI-1640 培地で 20 μ g/ml に希釈した後、48 ウェルプレートに 250 μ l/well ずつ加え、上記と同様に細胞浮遊液を加えた。また、牛胎仔血清入り RPMI-1640 培地を 250 μ l/well ずつ加え、同様に細胞浮遊液を加えた後、37°C、5% CO₂ 環境下で 48 時間刺激を行った。培養終了後、培養上清を回収し培養上清に含まれるサイトカイン量を ELISA 法により測定した。

④ 統計処理

データは全て平均±標準偏差で示した。有意水準の検定については一元配置分散分析、次いで有意差を認められたものに対して Tukey-Kramer 法を行った。生存率に関しては Kaplan Meier 法を行った。 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。検定は Statcel 2 を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 抗原特異的免疫誘導に対する大豆イソフラボンの影響

① 抗原特異的 T 細胞応答に対するダイゼインおよびエクオールの影響

OVA 特異的な T 細胞応答を観察すると、統計的に有意差は認められないものの、エクオール投与群で量依存的にリンパ球増殖反応が高くなる傾向が認められた。一方、抗 CD3 mAb で刺激を行い、T 細胞応答を観察した場合、エクオールの投与による増殖反応の増強は認められなかった。OVA 特異的な T 細胞によるサイトカイン産生を測定したところ、1 型ヘルパー T 細胞が産生する IFN- γ 、2 型ヘルパー T 細胞が産生する IL-4 の両者において、大豆イソフラボン投与群と非投与群との間に差を認められなかった。

②抗原特異的抗体産生に対するダイゼインおよびエクオールの影響

抗原特異的 B 細胞応答に対する影響を検討するために、OVA 特異的 IgG, IgG1, IgG2a および IgE 抗体を測定した。OVA 特異的 IgG, IgG1, IgG2a に関しては、コントロール群、ダイゼイン投与群およびエクオール投与群の間で有意な差を認めなかった。しかしながら、OVA 特異的 IgE 抗体は、20 mg/kg エクオール投与マウスで有意に高値を示した (図 1)。

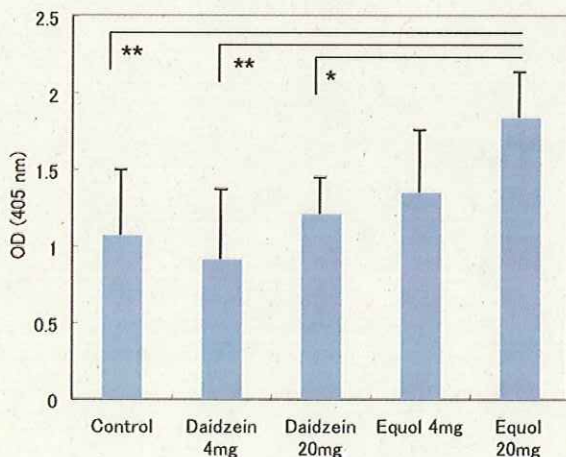


図 1 エクオールは抗原特異的 IgE 産生を増加させる

③IL-13 産生に対するダイゼインおよびエクオールの影響

20 mg/kg のエクオール投与を行ったマウスでは、抗原特異的 IgE 抗体レベルの上昇が認められた。IL-4 は、IgE 産生を誘導するサイトカインであるが、OVA 特異的 IL-4 産生量は、20 mg/kg のエクオール投与群とコントロール群で差を認めなかった。そのため、IL-4 以外に IgE のクラススイッチに関わるサイトカインである IL-13 について ELISA 法を用いて測定を行った。20 mg/kg のエクオール投与を行ったマウスでは、OVA 特異的 IL-13 産生がコントロールマウスに比べ統計的に有意に上昇していた (図 2)。

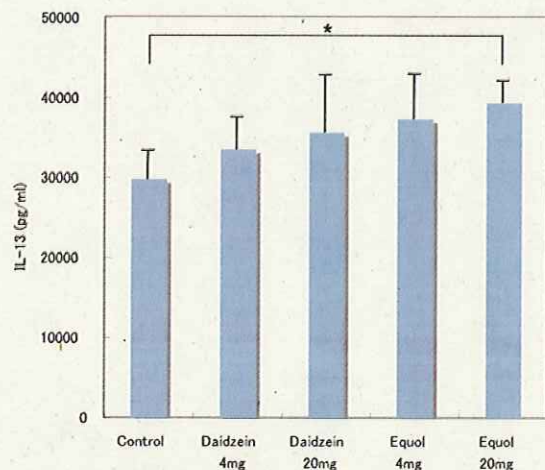


図 2 エクオールは抗原特異的 IL-13 産生を増加させる

(2) 実験的大腸炎に対する大豆イソフラボンの影響

①DSS 誘導大腸炎に対する大豆イソフラボンの作用

イソフラボンの経口投与開始 7 日後に 4% DSS を 4 日間自由飲水させた。DSS 投与期間は、強制投与も併行して行った。DSS は潰瘍性大腸炎を誘発することが知られているが、予備実験において、濃度別 DSS (2%、3%、4%) の自由飲水による体重変化を観察したところ、4% DSS が最も体重が減少したため、本実験では、DSS の濃度を 4% とした。本実験

においてDSSを自由飲水させると、マウスは下痢及び血便を起し、体重は減少した。大豆イソフラボン、特にequolを投与することによって、体重減少が顕著であり、6日目に最も有意な差が認められた ($P < 0.01$ vs. Control)。7日目にはequol群のマウスがほとんど死亡し、残り1匹のみのため統計処理が行えなかったが、DSS投与前に比べて、-31%の体重減少であった。daidzein投与群でも体重減少が認められた ($P < 0.05$ vs. Control) (図3)。

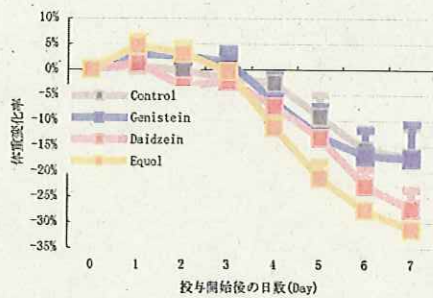


図3 エクオールは実験的大腸炎を増悪させる。

また、生存率においても体重変化率と同様にequol投与群で最も低い割合であった ($P < 0.01$ vs. Control) (図4)。

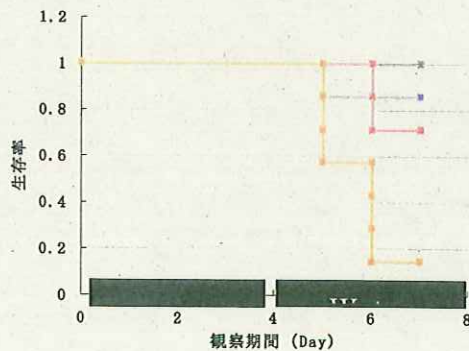


図4 実験的大腸炎誘導マウスにおける死亡率

大腸粘膜の組織学的な解析を行ったとこ

ろ、比較的体重減少が緩やかであった、コントロール群、ゲニステイン群及びダイゼイン群の大腸粘膜の構造が比較的鮮明に観察できるのに対し、体重減少が最も顕著であったエクオール群の粘膜組織は構造が崩れており、扁平になっていた。

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6件)

① Sakai T., Furoku S., Nakamoto M., Shuto E., Hosaka T., Nishioka Y. and Sone S. The soy isoflavone equol enhances antigen-specific IgE production in ovalbumin-immunized BALB/c mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 56:72-76, 2010. 査読有

② Sakai T., Irie A.V., Matoba T., and Yamamoto S. Dietary trans fatty acid suppress the development of spontaneous atopic-like dermatitis in NC/Nga mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55:412-416, 2009. 査読有

③ Sakai T., Nakamoto M., and Shuto E. Hyper-Ag-specific Ab production in NC/Nga mice is not associated with deletion polymorphism in the promoter region of the FcγR11B gene. *Am. J. Immunol.*, 5:61-64, 2009 査読有

[学会発表] (計7件)

① 酒井徹、中本真理子、首藤恵美「大豆イソフラボンの免疫調節作用に関する研究」第56回日本栄養改善学会大会 平成21年9月3日 札幌

② 酒井徹、中本真理子、首藤恵美「大豆イソフラボン（エクオールおよびフォルモノネチン）の抗原特異的免疫誘導に対する影響の検討」第63回日本栄養食糧学会大会 平成21年5月22日 長崎

(2) 研究分担者

③ 酒井徹、小木曾真理、中本真理子「大豆イソフラボンであるエクオールは、免疫機能にどのような影響をおよぼすか？」第62回日本栄養食糧学会大会 平成20年5月4日 坂戸

(3) 連携研究者

〔図書〕（計 3件）

① 酒井徹（2009）山本茂、酒井徹、郡俊之 編著 「公衆栄養学 第2版」第1章 高齢化社会と健康・栄養問題、わが国の食糧自給 p4-8、第3章 わが国の食生活と栄養問題の変遷と現状 p16-23、第4章 食生活とガン p35-40、第6章 学校給食法 p.82、附録

② 酒井徹（2008）山本茂、小松龍史、國井大輔 編著 「管理栄養士技術ガイド」：栄養に関する検査の基準値一覧表 文光堂（東京）

③ 酒井徹（2007）小林修平、山本茂 編著 「人体栄養の基礎」：第12章 栄養と免疫、p211-221 建帛社（東京）

〔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

酒井 徹 (SAKAI TOHRU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40274196