

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K02205

研究課題名(和文) 伝統的食材・イタドリが示す抗アレルギー活性の解明

研究課題名(英文) Anti-allergic activity of Japanese knotweed known as itredori (*Fallopia japonica*)

研究代表者

柏木 丈弘 (Kashiwagi, Takehiro)

高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授

研究者番号：60363256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、アレルギー症状を訴える人が年々増加し、社会問題となっている。当研究室は、イタドリ葉部のMeOH抽出物がI型アレルギーの発症と関連深いマスト細胞からの脱顆粒を強く抑制することを見出した。本研究では、高い活性を示したイタドリの葉に含まれる抗アレルギー活性成分の解明を試みた。その結果、イタドリ葉抽出液からプロアントシアニジン活性成分として単離した。また、RBL-2H3細胞を用いて脱顆粒抑制試験を行ったところ、脱顆粒を濃度依存的に抑制することが明らかになった。今回同定したプロアントシアニジンの抗アレルギー効果によって、イタドリの葉が新たな抗アレルギー薬として利用される可能性が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物が示す抗アレルギー活性に関与する成分を特定し、その作用機序の一端を明らかにすることにより、機能性食品への応用や新たな創薬への応用が期待できる。またこの研究を通じて確立した手法は、本研究に先立って行われたスクリーニングにより見いだされた、他のヒアルロニダーゼ阻害活性を有する植物からの活性成分の単離同定に応用することができ、さらなる研究への道を開くことができる。それを通して、伝統的に食されてきた野草や伝統野菜の価値を見直し、民間療法に化学的な光を当てることができる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the number of people suffering from allergic symptoms has been increasing year by year, becoming a social problem. Our laboratory found that MeOH extract of Japanese knotweed leaves strongly inhibited degranulation from mast cells, which is closely related to the onset of type I allergy. In this study, we attempted to elucidate the antiallergic active components in Japanese knotweed leaves that showed high activity.

As a result, proanthocyanidins were isolated as active components from the Japanese knotweed leaf extract. In addition, degranulation inhibition tests using RBL-2H3 cells revealed that proanthocyanidins suppressed degranulation in a concentration-dependent manner. The anti-allergic effect of the proanthocyanidins identified in this study may lead to the use of Japanese knotweed leaves as a new anti-allergic drug.

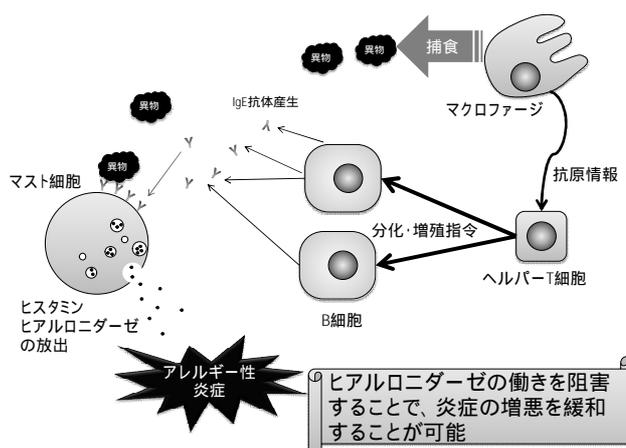
研究分野：生理活性物質科学

キーワード：ヒアルロニダーゼ阻害活性 I型アレルギー RBL-2H3 イタドリ

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は様々な農産物、山菜や野草など 150 種をターゲットに抗アレルギー活性のスクリーニングを行った結果、イタドリ(*Polygonum cuspidatum*)葉メタノール抽出物は 0.43mg 乾固物/mL という非常に低濃度でヒアルロニダーゼの活性を 50% 阻害し、アレルギー緩和効果があるとされるべにふうき緑茶を凌ぐ強い活性を示すことを見いだした。

ヒアルロニダーゼは、I 型アレルギーに関与するケミカルメディエーターであるヒスタミンと同時にマスト細胞から遊離する。そして、結合組織に多く分布するヒアルロン酸を加水分解して、炎症を重度にする(図 1)。このヒアルロニダーゼ阻害活性とマスト細胞からのヒスタミン遊離抑制には正の相関関係があることが、クロモグリク酸ナトリウムやトラニラストなどの抗アレルギー薬品による研究で示されている。従ってヒアルロニダーゼを阻害する食品やそれに関与する化合物が見つければ、その食品を食生活に取り入れることで、アレルギー症状の緩和や予防が期待できる。



### 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが見出したイタドリ葉に含まれるヒアルロニダーゼ阻害活性の関与成分を単離同定し、それらが生体内で抗アレルギー機能を発揮するかを明らかにする。現在、抗アレルギー作用を示す食品や植物が多数報告されているが、その関与成分の特定に至った例は少なく、多くの場合、その食品に含まれるフラボノイドやポリフェノールが活性に関わっていると予想するにとどまっている。本研究は、植物が示す抗アレルギー活性に関与する成分を特定し、その作用機序の一端を明らかにすることにより、機能性食品への応用や新たな創薬への応用が期待できる。またこの研究を通じて確立した手法は、本研究に先立って行われたスクリーニングにより見いだされた、他のヒアルロニダーゼ阻害活性を有する植物からの活性成分の単離同定に応用することができ、さらなる研究への道を開くことができる。それを通じて、伝統的に食されてきた野草や伝統野菜の価値を見直し、民間療法に化学的な光を当てることを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒアルロニダーゼ阻害活性測定

ヒアルロニダーゼ (from bovine testes)、活性剤である compound 48/80、ヒアルロン酸ナトリウム (from rooster comb)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  は、0.1 M acetate buffer (pH 4.0) に溶解した。ホウ酸カリウム溶液は 0.8 M ホウ酸溶液 100 mL に KOH 2.24 g を添加して調製した。10 N HCl 6mL と酢酸 44 mL 混合した溶媒に *p*-Dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) 100 mg を溶解した。使用時には、この溶液 1 mL に、酢酸を 4 mL 添加し、DMAB 溶液とした。

サンプル 30  $\mu\text{L}$  にヒアルロニダーゼ (1600 u/mL) 15  $\mu\text{L}$  を添加し、37°C で 20 分間インキュベートした。そこに 0.1 mg/mL 活性剤 30 $\mu\text{L}$  を加えさらに 37°C で 20 分間インキュベートした。その後、0.32 mg/mL ヒアルロン酸ナトリウム溶液 75  $\mu\text{L}$  を添加し、37°C で 60 分間反応させ、0.4 N NaOH 30  $\mu\text{L}$  で反応を停止した。そこにホウ酸カリウム溶液 30  $\mu\text{L}$  を加え、100°C で 3 分間インキュベートしたものを反応溶液とした。この反応溶液を 96 穴マイクロプレート

に 84  $\mu$ L 入れ、DMAB 溶液を 180  $\mu$ L 添加し、37°C で 20 分間インキュベート後、585 nm における吸光度を測定した。ヒアルロニダーゼ阻害率は以下の計算式を用いて算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{(A_c - A_{cb}) - (A_s - A_{sb})}{(A_c - A_{cb})} \times 100$$

(2) RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制試験 (Scheme2-4)

脱顆粒抑制試験には RBL-2H3 細胞を用い、サンプルは葉粗抽出液 (1.0 g eq./mL in MeOH) およびイタドリ由来プロアントシアニジン (10 mg/mL in 50% MeOH)

RBL-2H3 細胞を 96 穴培養プレートに  $5.0 \times 10^4$  cells/well となるよう播種し、37°C で一晚培養した。その後、RPMI-1640 培養液で希釈された抗 DNP IgE (50 ng/mL) で 2 時間感作させ、改変タイロイドバッファー (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5.6 mmol/L glucose, 20 mmol/L HEPES, 0.1% BSA, pH 7.4) で洗浄後、培養液で希釈したサンプル溶液、もしくはコントロールを添加し、37°C 10 分間インキュベートした。その細胞に終濃度 50 ng/mL になるようにタイロイドバッファーで希釈した DNP-HAS 10  $\mu$ L を添加し、30 分間刺激した。それぞれの上清を回収した後、0.1% Triton X-100 含有タイロイドバッファー 130  $\mu$ L を添加し、氷冷下で 5 秒超音波破碎した。上清および細胞溶解液はともに新しい 96 穴マイクロプレートに 50  $\mu$ L/well になるよう移し、37°C で 5 分間インキュベートした。そこに、0.1 M クエン酸バッファー (pH 4.5) で溶解した 3.3 mM 4-nitrophenyl 2-acetamide-2-deoxy- $\beta$ -D -glucopyranoside をそれぞれのウェルに添加し、25 分間 37°C でさらにインキュベートした。最後に、2.0 M グリシンバッファー (pH 10.4) 100  $\mu$ L を加えることで酵素反応を停止させ、マイクロプレートリーダを用いて 405 nm における吸光度を測定した。以下の式を用いて  $\beta$ -hexosaminidase 放出率を算出した。

$$\beta\text{-hexosaminidase 放出率 (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Asupernatant} - \text{Ablank of supernatant})}{(\text{Asupernatant} - \text{Ablank of supernatant}) + (\text{Acell lysate} - \text{Ablank of cell lysate})}$$

(3) 活性成分の分画

イタドリの葉 500 g を 80% MeOH で抽出し、濃縮乾固後 1.0 g 当量/mL に定容したものをイタドリ葉粗抽出液とした。その抽出液をヘキサン層、酢酸エチル層、クロロホルム層、水層に液液分配し、ODS 中圧カラムクロマトグラフィー、逆相系 HPLC で順次分画し、ヒアルロニダーゼ阻害活性を測定した。

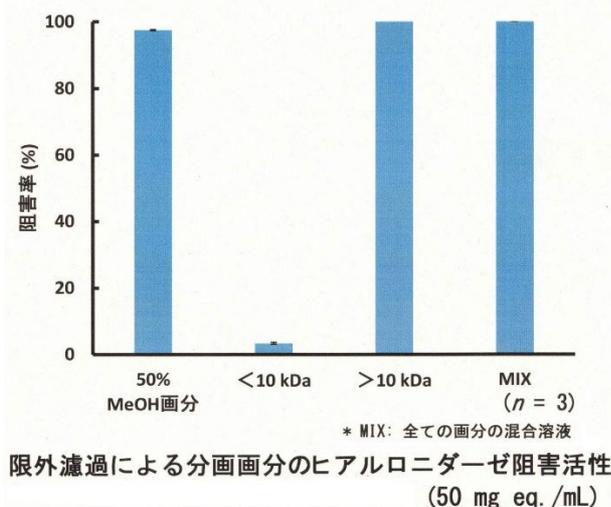
#### 4. 研究成果

イタドリ葉の抗アレルギー活性を評価するために、イタドリ葉 80% MeOH 抽出物 50 mg eq./mL のヒアルロニダーゼ阻害活性を測定したところ、阻害率 98.5% を示し、IC<sub>50</sub> は 8.13 mg eq./mL であった。ウドのヒアルロニダーゼ阻害活性の IC<sub>50</sub> は 1119 mg eq./mL、イチョウの葉は 27 mg eq./mL と報告されていることから、イタドリ葉は高い抗アレルギー活性を示すことが明らかになった。イタドリ葉 80% MeOH 抽出物を液液分配により、ヘキサン層、酢酸エチル層、クロロホルム層、BtOH 層、水層に分画した。水層は沈殿が生じたため、遠心分離により、水層上清と水層沈殿に分画した。各画分の活性を測定したところ、ヘキサン層 66.9%、酢酸エチル層 6.22%、クロロホルム層 1.38%、BtOH 層 27.8%、水層上清 92.6%、水層沈殿 97.2% の阻害率を示した。ヘキサン層、水層上清、水層沈殿に高い阻害活性が認められたため、さらに分画を進めた。

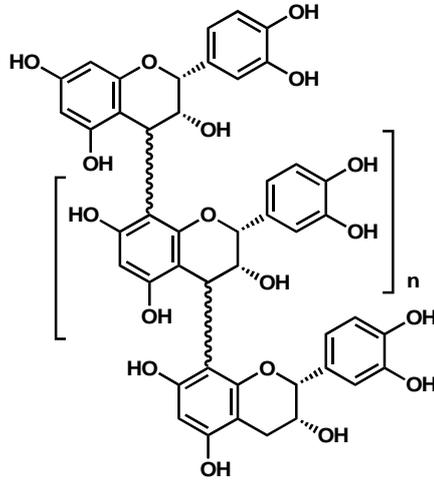
ヘキサン層をシリカゲル中圧カラムにアプライし、100%ヘキサン画分、100%酢酸エチル画分、100% MeOH 画分に分画し、活性を測定したところ、100% MeOH 画分に高い活性が認められた。ヘキサン層 100% MeOH 画分を ODS オープンカラムで 40%、60%、80%、100% MeOH 画分に分画し、活性を測定したところ、40% MeOH 画分に高い活性が認められたことから、この画分を HPLC に供した。得られたクロマトグラムの保持時間に従い、Fr. A ~ D に分画し、活性を測定したところ、ブロードなピークを示した Fr. D に高い活性が認められた。Fr. D の活性には高分子が関与している可能性があると考えられるが、活性成分の解明にはさらなる分画と分析が必要であると考えられた。

水層上清を ODS カラムクロマトグラフィーで 0%、20%、40%、100% MeOH 画分に分画したところ、40% MeOH 画分に高い阻害率(40.0%)が認められた。そこで、40% MeOH 画分を HPLC に供し、保持時間に従い Fraction 1~7 に分画し、活性を測定した。その結果、Fr. 1 が 7.19%、Fr. 7 が 0.70%の阻害率を示した一方で、他の Fraction に活性は認められなかった。しかし、全ての画分を混合すると、活性が大幅に増加した(25.4%)。このことから、イタドリ葉が示すヒアルロニダーゼ阻害活性は複数の成分が、相加的あるいは相乗的に作用することで発現していることが示唆された。そこで単独のピークである Fr.2,3,4 について構造解析を行った。NMR 分析において、3 つの画分ともフラボノイド配糖体に特徴的なシグナルを示し、解析の結果、Fr.2 は Orientin、Fr. 3 は Isoorientin、Fr. 4 は Vitexin と同定した。Luteolin および Apigenin などのフラボノイドはヒアルロニダーゼ阻害活性を示すことが明らかとなっている。また、Rutin や Hesperidin などのフラボノイド配糖体も活性を持つことが報告されている。このことから、今回同定した 3 つの化合物が活性に関与していることが考えられた。

最も活性の高かった水層沈殿を ODS 中圧カラムにアプライし、50%、75%、100% MeOH 溶出部に分画した。活性を測定したところ、50% MeOH 溶出部に高い活性が認められた (97.5%)。さらに排除限界分子量 10,000 の限外濾過膜で 10kDa 以上と以下に分画したところ、10kDa 以上に活性が局在した (100%)。

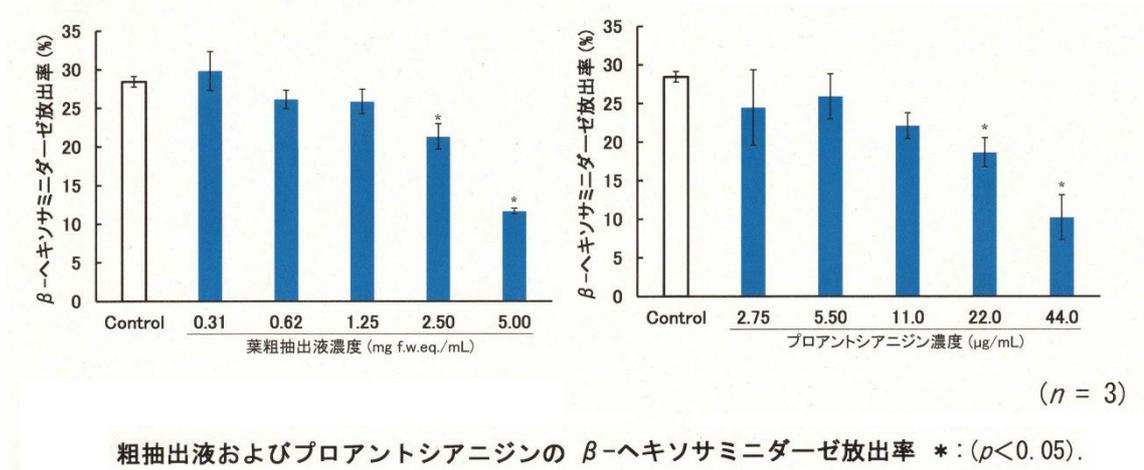


水層沈殿 50% MeOH 画分 >10kDa 画分を HPLC で分析したところ、単一のブロードなピークが得られたため NMR 分析に供した。解析の結果、活性成分はエピカテキンが重合したプロアントシアニジンであると推定された。さらに、プロアントシアニジンの詳細な構造を明らかにするために、フロログルシノールを用いて塩酸性中で加熱分解した。分解生成物を HPLC に供し、カテキン、エピカテキン標品との co-injection の結果、末端はエピカテキンであることが明らかとなった。また、NMR 分析により、伸長部はエピカテキンと決定した。従って、今回単離したプロアントシアニジンはエピカテキンのみからなる重合体であることが判明した。ゲル浸透クロマトグラフィーの結果、数平均分子量は 37320、重量平均分子量は 91002、平均重合度は 129.6 と推定された。



ヒアルロニダーゼ阻害活性を示すエピカテキンから構成されたプロアントシアニジン

単離したプロアントシアニジンを用いて RBL-2H3 細胞に対する細胞毒性試験を行ったところ、細胞毒性は見られなかった。さらに、脱顆粒抑制試験を行ったところ、脱顆粒を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。



粗抽出液およびプロアントシアニジンの β-ヘキソサミニダーゼ放出率 \* : (p < 0.05).

イタドリ葉 1.0 g 中にプロアントシアニジンは 9.03 mg 含まれており、プロアントシアニジンのヒアルロニダーゼ阻害活性に対する IC<sub>50</sub> は 0.237 mg/mL であった。また、プロアントシアニジンの寄与率は 24.6% であり、イタドリ葉抽出物中の主要抗アレルギー成分であることが示唆された。以上のことから、イタドリの葉にはフラボノイド配糖体、プロアントシアニジンといった抗アレルギー活性を示す成分が含まれていることが明らかとなった。今後は、今回単離した活性成分に対する細胞試験、動物試験、ヒト試験へと発展させたい。イタドリの葉が新たな抗アレルギー薬、抗アレルギー食品に利用され、高知県の活性化に貢献することを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	島村 智子  (Shimamura Tomoko)  (50350179)	高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授    (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関