The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	脱顆粒抑制効果を示すフィトケミカルの作用機序の解明及び抗アレルギー効果の評価
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2025
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101283
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式６

申請先学部　　薬学部　採択番号　No.5

令和６年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏　　名	きだわらそうた 木俵爽太	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	３年
ふりがな 共　同 研究者氏名	いいぬまこうた 飯沼宏太	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	３年
	いのうえわかな 井上和香奈		薬学部 薬学科		３年
	きむらしずき 木村寧希		薬学部 薬学科		３年
	たかのはるか 髙野はるか		薬学部 薬学科		３年

アドバイザー教員 氏名	齊藤達哉	所属	大学院薬学研究科
研究課題名	脱顆粒抑制効果を示すフィトケミカルの 作用機序の解明及び抗アレルギー効果の評価		
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。（先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。）		

＜研究目的＞

現代社会において、花粉症に代表されるアレルギー疾患の患者数は年々増加しており、アレルギー対策は喫緊の課題となっている。アレルギーは次の順序で発症すると考えられている。;①体内に侵入したアレルゲンに対して特異的に結合する IgE 抗体が産生される。②IgE 抗体が肥満細胞に発現している受容体に結合する(感作)、③アレルゲンが体内に再び侵入して IgE 抗体との結合を介して肥満細胞を活性化し、ヒスタミンをはじめとする炎症誘発物質が放出されて種々のアレルギー症状が起こる。現在のアレルギー対策として抗アレルギー薬や抗ヒスタミン薬の服用が挙げられるが、前者は効果が現れるまでに一定の時間を要する、後者は効果が生じる期間が限定的であるなどの問題を抱えている。副作用や診察にかかる煩わしさといった理由と併せて、両者共に服用に至っていない人は多い。そこで本研究では、脱顆粒を抑える成分を組み合わせて食餌摂取することで効率よくアレルギー症状の軽減を図る、新たな日常習慣を将来的に提案することを目標とし、その候補となる成分を探索・解析した。

＜研究計画＞

昨年度までの自主研究で、健康茶として嗜まれている延命草に含まれる Oridonin がラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 およびマウス骨髄から初代培養した肥満細胞に対して脱顆粒抑制効果を示すことを見出した。さらに、Oridonin はアレルギー性鼻炎モデルマウスにおいて肥満細胞依存的なアレルギー症状を抑えることも見出した。今年度の自主研究では、マウス肥満細胞における Oridonin の脱顆粒抑制効果の濃度依存性、RBL-2H3 細胞とマウス肥満細胞に対する毒性を検証した上で、これまでの成果を論文としてまとめて学術誌に投稿することを目標とする。

＜研究方法＞

＜実験Ⅰ＞ マウス肥満細胞を用いたOridoninの脱顆粒抑制効果の濃度依存性の評価

マウスの骨髄細胞を回収した後、IL-3 存在下で培養し、肥満細胞に分化させた。肥満細胞を抗dinitrophenyl (DNP)-IgE抗体を添加した培地中で一晩培養して、細胞に抗体を感作させた。翌日、脱顆粒試験に頻用されるHEPES bufferで細胞を洗浄し、培養プレートに播種した。そこに、Oridoninの濃度が0～20 μMとなるよう調整したHEPES bufferを添加し、一定時間インキュベートした。その後、抗原となるDNP-human serum albumin (HSA)を作用させ、脱顆粒を誘導した。培養上清を回収後、顆粒成分であるβ-hexosaminidase の放出量を計測した。具体的には、β-hexosaminidase の働きにより呈色するβ-D-N-アセチルガラクトサミンを含む基質溶液と、回収した培養上清を混合してインキュベートし、吸光度を測定した。Oridonin を含まない HEPES buffer で処理した場合のβ-hexosaminidase 放出率を 100%とし、各濃度の Oridonin で処理した場合のβ-hexosaminidase 放出率を計算した。

＜実験Ⅱ＞RBL-2H3 細胞及びマウス肥満細胞を用いたOridoninの細胞毒性の評価

RBL-2H3 細胞の評価では細胞を培養プレートに播種後、一晩培養して底面に接着させた。マウスの肥満細胞は前項の通りに用意した。それぞれの細胞を0～20 μMのOridoninを含むHEPES buffer中で１時間インキュベートした。細胞が Oridonin により傷害された場合には細胞内の乳酸脱水素酵素がbuffer内に放出されるため、その存在を市販のキットを用いた酵素基質反応により調べた。

＜研究成果＞

＜実験Ⅰ＞

マウス骨髄細胞から分化させた肥満細胞に対する Oridonin の脱顆粒抑制効果の濃度依存性を評価した。図１に示す通り、マウス肥満細胞に対してOridoninを10 μM及び20 μMで処理した場合には、濃度依存的に脱顆粒を抑制することがわかった。

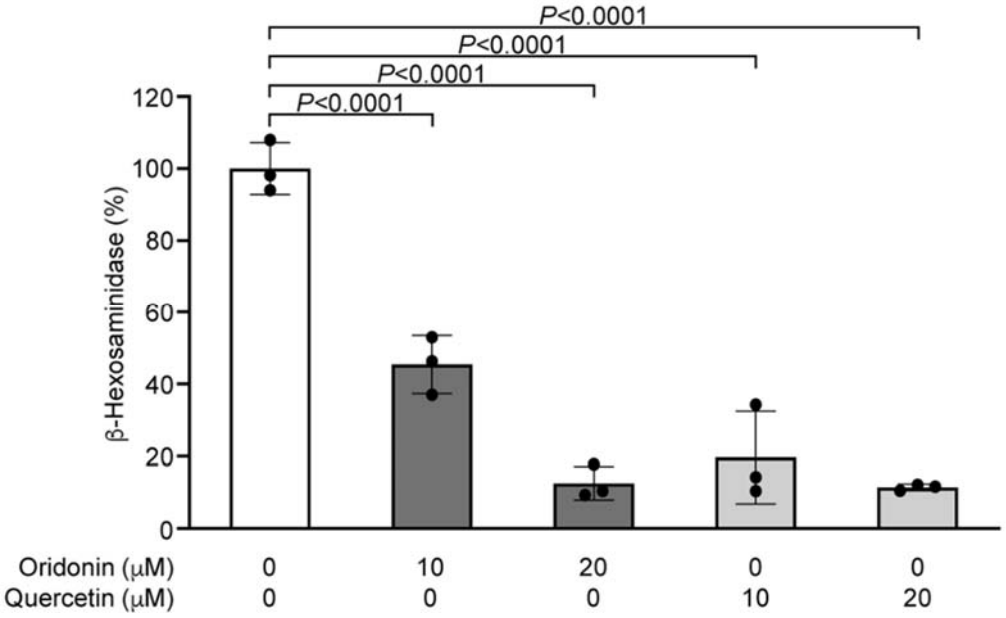

図１ マウス肥満細胞におけるOridoninの脱顆粒抑制効果の評価
各条件はtriplicateで行った。結果は平均値±標準偏差で示した。
一元配置分散分析（ANOVA）した後にTukey-Kramer検定してP値を算出した。

＜実験Ⅱ＞

RBL-2H3 細胞及びマウス肥満細胞に対する Oridonin の細胞毒性を評価した。Oridonin は、RBL-2H3 細胞に対しては 2.5～20 μM、マウス肥満細胞に対しては 10～20 μM で作用させた。RBL-2H3 細胞では図 2 のような結果が得られ、マウス肥満細胞では図 3 のような結果が得られた。どちらの細胞でも、Oridonin を作用させた場合の survival rate(%)は作用させていない場合と比べてほぼ変わらない値であった。このことから、今回の実験に用いた濃度では Oridonin は細胞毒性を示さないことがわかった。

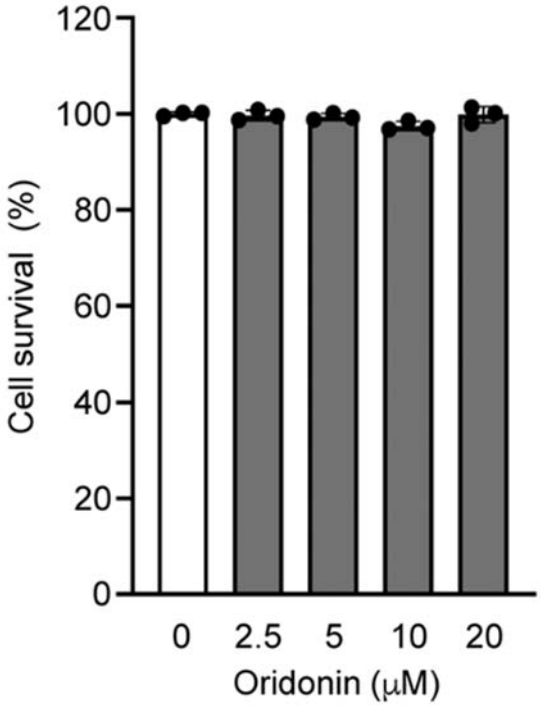

図 2 RBL-2H3 細胞に対する Oridonin の毒性の評価
各条件は triplicate で行った。結果は平均値±標準偏差で示した。

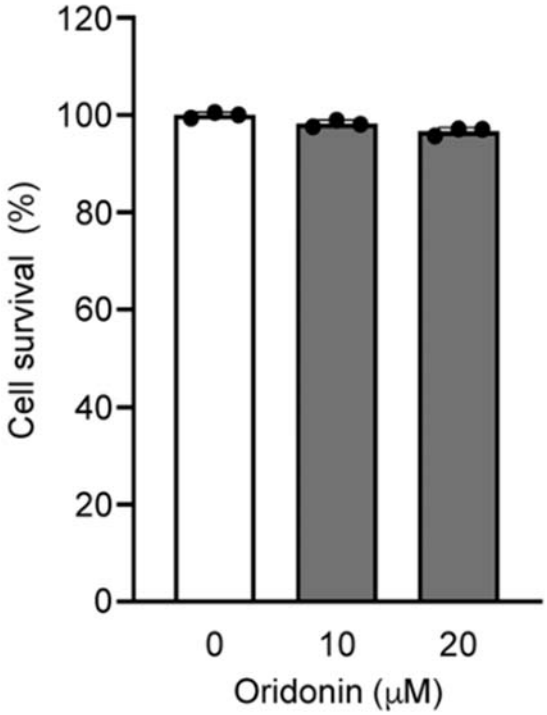

図 3 マウス肥満細胞に対する Oridonin の毒性の評価
各条件は triplicate で行った。結果は平均値±標準偏差で示した。

以上の実験により得られた結果と、昨年度までの自主研究で得られた実験結果とを論文にまとめ、Biological and Pharmaceutical Bulletin 誌に投稿し、受理された（*Biol Pharm Bull.* 2024;47(11):1920-1926.)。

＜考察・まとめ＞

今年度までに行った各実験より、RBL-2H3 細胞、マウス肥満細胞に対して Oridonin は強い細胞毒性を示さずに、濃度依存的に脱顆粒抑制効果を示すことが分かった。今後、Oridonin が脱顆粒抑制効果や抗アレルギー効果を発揮する機序の詳細を明らかにする必要がある。また、今回の自主研究では、3 年間の研究で得られた成果を論文としてまとめ、学術誌に発表することができた。原稿や図の準備、editor や reviewer からのコメントへの対応など、論文の投稿から受理に至るまでの一連の流れ知る貴重な機会を得たことから、この経験を今後の研究活動に活かしていきたい。