Osaka University Knowledge Archive

Title	フィトケミカルの併用摂取は抗アレルギー効果を高めるか？
Author(s)	
Citation	令和4（2022）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2023
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/90985
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４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	きむら　しずき 木村 寧希	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	１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	１年
	いのうえ わかな 井上 和香奈		薬学部 薬学科		１年
	きだわら そうた 木俵 爽太		薬学部 薬学科		１年
	たかの はるか 高野 はるか		薬学部 薬学科		１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	フィトケミカルの併用摂取は抗アレルギー効果を高めるか？		
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

現在、花粉症などのアレルギーに苦しんでいる人の数は年々増加しており、アレルギー対策は喫緊の課題である。広義のアレルギー反応とは、花粉などのアレルゲン（抗原）に対して誘導された IgE 抗体が肥満細胞の受容体に結合した状態（感作）で、アレルゲンが IgE 抗体に結合して肥満細胞を活性化し、脱顆粒を誘導することによって起こる。顆粒成分のうち、とくにヒスタミンは周囲の平滑筋細胞、粘液産生細胞、神経細胞などの受容体に結合することで、くしゃみ、鼻水、痒みなどといったアレルギー症状を引き起こすことがよく知られている。

今日、抗アレルギー効果を持つ薬は多数存在するが、副作用や診察にかかる煩わしさから、薬の服用に至っていない人は多い。そこで本研究では、日常的な食事から摂取できるフィトケミカルを利用し、アレルギー症状を改善する新たな対策を提案しようと考えた。本研究の狙いとして、先行研究において単独で作用させたときに抗アレルギー効果を示すことが示唆されている特定のフィトケミカルについて、それらを組み合わせることで、効果の増強が見られるかを明らかにする。評価する抗アレルギー効果について、アレルギーの発症過程には前述のようにいくつかの段階があり、多くの市販薬はそのうちのヒスタミンが受容体に働きかける段階に作用するものであるが、本研究では肥満細胞の脱顆粒を抑制する効能について調べる。

◆研究計画・方法

本研究では、単独の脱顆粒抑制効果が既に報告されているフィトケミカルや、報告は無いものの同効果を発揮する可能性があるフィトケミカルを選定し、実験に用いた（下記参照）。

脱顆粒に関する実験は、参考文献（1）に記載の方法に従って行った。具体的には、ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 を 96 ウェル平底プレートに播種し、抗 dinitrophenyl（DNP)-IgE 抗体(Sigma-Aldrich)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ると共に、底面に接着させた。翌日、脱顆粒試験に頻用される HEPES buffer で細胞を洗浄した。そこに、解析対象とするフィトケミカルの中から 1 種類あるいは 2 種類を含む HEPES buffer を添加し、30 分間インキュベートした。その後、抗原となる DNP-human serum albumin (Sigma-Aldrich)を作用させ、脱顆粒を誘導した。また、フィトケミカルを溶解させた溶媒のみを含む HEPES buffer を添加し、同様に反応させたものをコントロールとした。培養上清を回収後、顆粒成分である β-hexosaminidase の放出量について酵素基質反応を利用して測定し、脱顆粒の指標とした。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（Nacalai tesque）を含む基質溶液と、回収した培養上清を混合して 90 分間 37℃でインキュベートし、吸光度（$OD_{405\text{-}600}$）を測定した。コントロールの吸光度から抗原未刺激時の吸光度を差し引いた値を 100%の β-hexosaminidase 放出量とし、各フィトケミカルで処理した場合の β-hexosaminidase 放出量を百分率で算出した。

以下に、今回の試験で用いたフィトケミカルと、抗アレルギー効果や他の健康効果に関する参考論文を併記する。

- Capsaicin：マウスにおいてヒスタミン誘発性のかゆみを抑える (2)
- Chlorogenic acid：マウスにおいてアレルギー性鼻炎の症状を抑える (3)
- Epigallocatechin gallate (EGCG)：RBL-2H3 細胞株において脱顆粒を抑える (4)
- Isoflavone：大豆イソフラボンが喘息患者の症状を抑える (5)
- Lutein：抗アレルギー作用に関する論文は無いものの、抗酸化作用をはじめとする様々な健康効果が期待されている (6)
- Lycopene：RBL-2H3 細胞株において脱顆粒を抑える (7)
- Menthol：RBL-2H3 細胞株において脱顆粒を抑えるほか、モルモットにおいてアナフィラキシーを抑える (8)
- Oridonin：マウス喘息モデルにおいて症状を抑える (9)
- Quercetin：RBL-2H3 細胞株において脱顆粒を抑える (10)
- Rosmarinic acid：ラットにおいてアレルギー性鼻炎症状を抑える (11)
- Sesamin：ラット肥満細胞においてヒスタミンや炎症性サイトカインの放出を抑える (12)
- Sulforaphane：ヒト肥満細胞株において炎症性サイトカインの放出を抑える (13)

◆研究結果

まず、単独のフィトケミカルによる脱顆粒抑制効果を調べた。各フィトケミカルの濃度は 10 μM とした。Quercetin の脱顆粒抑制効果が高いことは先行研究からも明らかになっているが、Oridonin、Sesamin、Sulforaphane も有意な脱顆粒抑制効果を示した（図 1）。

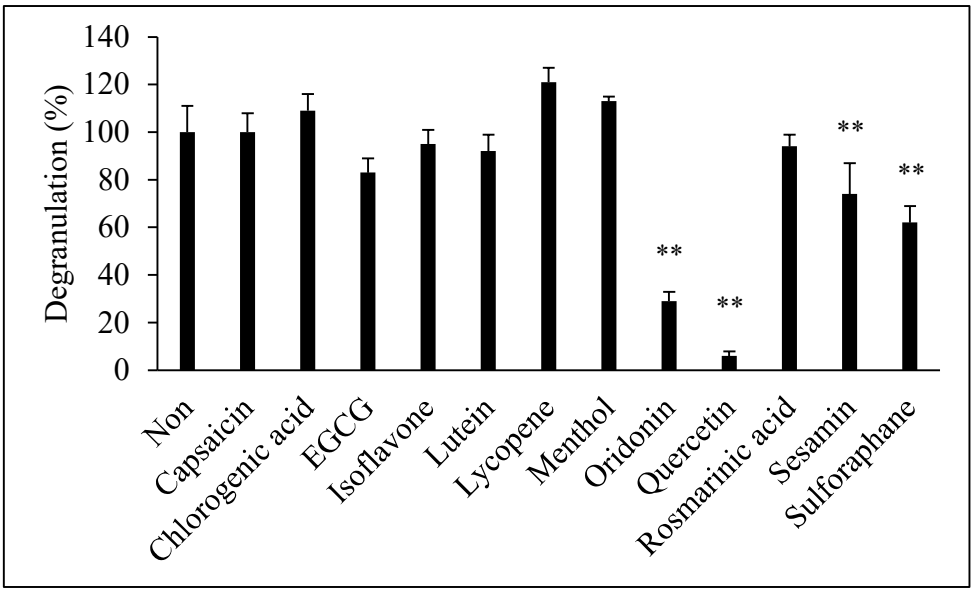

図 1　フィトケミカルを単独で作用させた場合の脱顆粒抑制効果の評価

各条件は triplicate で行った。結果は平均値±標準偏差で示した。

**; *P*<0.01 (vs Non, Tukey–Kramer *post-hoc* test)

今回の試験で脱顆粒抑制効果が見られたフィトケミカルのうち、Oridonin については肥満細胞の脱顆粒を抑制する効果はこれまで報告されていない。Oridonin の脱顆粒抑制効果の濃度依存性について 2.5～20 μM の濃度範囲で評価したところ、同濃度の Quercetin と同等に脱顆粒を抑制することがわかった（図 2）。

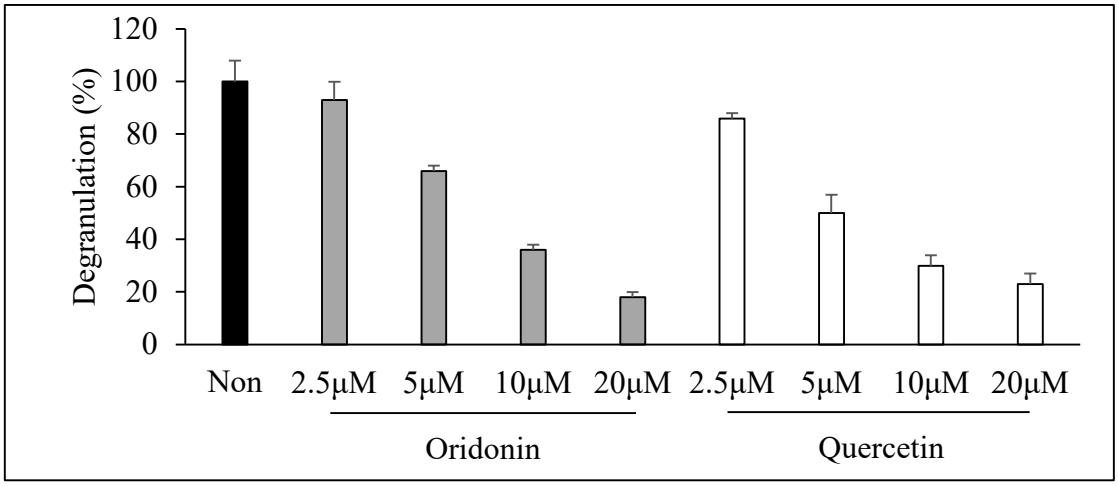

図 2　Oridonin による脱顆粒抑制効果の濃度依存性の評価

各条件は triplicate で行った。結果は平均値±標準偏差で示した。

さらに、Oridonin と Quercetin とを組み合わせた場合の脱顆粒抑制効果を調べた。それぞれの濃度は 10 μM、5 μM、2.5 μM、1 μM と変化させ、組み合わせた。その結果、Oridonin と Quercetin を組み合わせた場合は、Quercetin の濃度に関係なく Oridonin の濃度が高いほど強い脱顆粒抑制効果を示した（図 3）。また、Oridonin の濃度が 5 μM 以上の場合、Quercetin と組み合わせるとほぼ 100%の抑制効果を示すことがわかった。

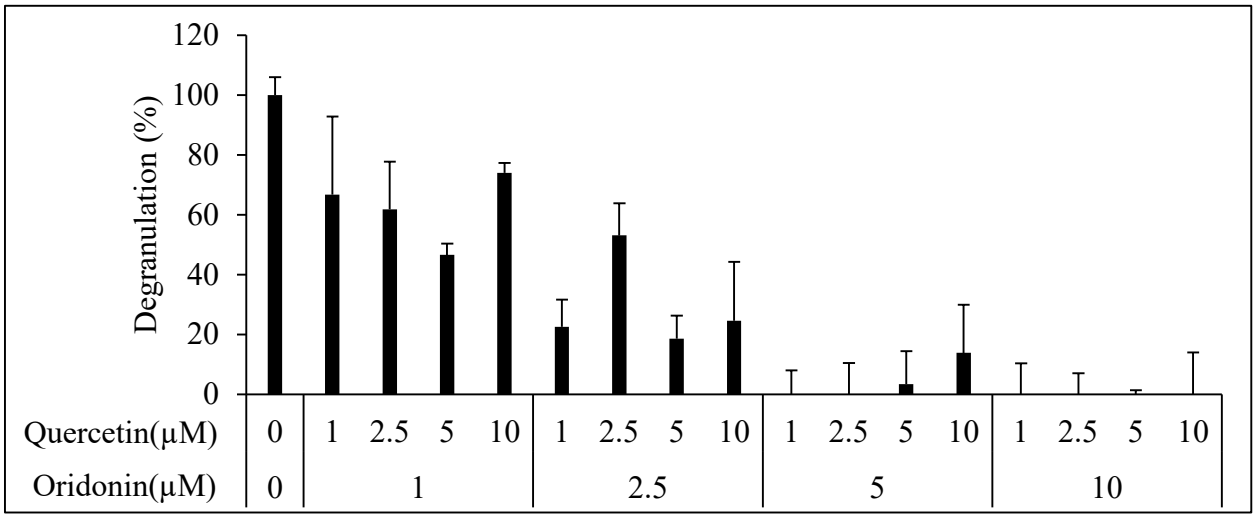

図 3 Oridonin と Quercetin との組み合わせによる脱顆粒抑制効果の評価

各条件は triplicate で行った。結果は平均値±標準偏差で示した。

最後に、図 1 において有意な抑制効果を示した Sesamin と Sulforaphane の組み合わせについて、脱顆粒抑制効果を調べた。その結果、それぞれ単独では 20-30%程度の阻害効果であったのに対して（図 1）、組み合わせによって 60%ほどの抑制効果を示した（図 4）。

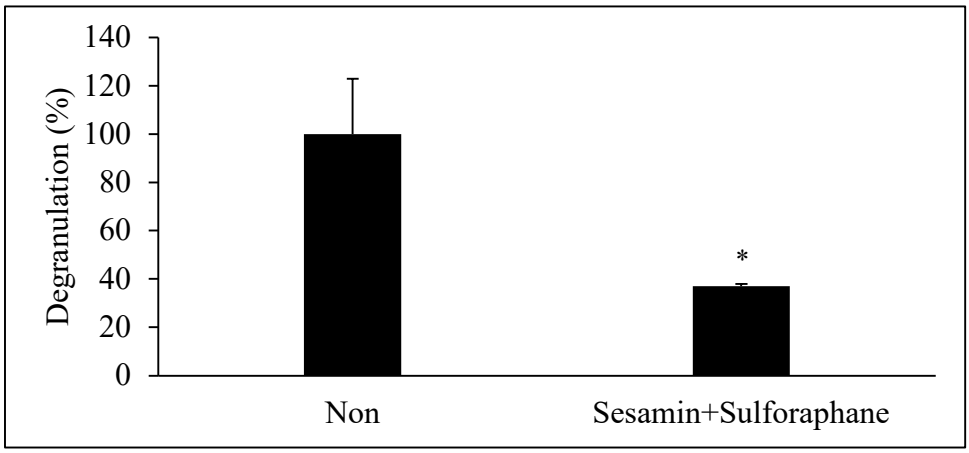

図 4 Sesamin と Sulforaphane との組み合わせによる脱顆粒抑制効果の評価

各条件は triplicate で行った。結果は平均値±標準偏差で示した。

*; $P<0.05$ (vs Non, Student t-test)

◆考察・まとめ

今回の実験結果より、まず Oridonin が強い脱顆粒抑制効果を示すことが分かった。その効果の度合いは、脱顆粒を抑制することでよく知られている Quercetin と同程度であった。本研究の本来の目的とは異なるが、単独で強い脱顆粒抑制効果を持つフィトケミカルを新たに見出せたことは有益であった。さらに、Oridonin と Quercetin とを組み合わせることで、より強い効果を示すことが確認できた。Oridonin は延命草という生薬に含まれる成分であり、延命草はお茶としても嗜まれている。一方で、Quercetin は主にタマネギやリンゴなど身近な野菜や果物に豊富に含まれている。普段の食生活をしながら延命草茶を飲むことで、アレルギー症状を和らげる効果を得られる可能性が示唆された。

また、Oridonin と Quercetin に比べると脱顆粒抑制効果が弱かったものの、Sesamin と Sulforaphane もそれぞれ脱顆粒を抑制し、組み合わせることで相加効果が得られることが分かった。Sesamin と Sulforaphane はそれぞれゴマとブロッコリーに豊富に含まれており、いずれも日常的に食卓に上がる食材である。ブロッコリーをゴマ和えにして食べる人もいる。これらのような弱いながらも脱顆粒抑制効果のあるフィトケミカルでも、意識的にうまく食材を組み合わせて摂取することで、アレルギー症状を和らげる効果を得られる可能性が示唆された。

将来的には、今回効果が認められたフィトケミカルについて濃度や処理時間を工夫したり、効果を検証するフィトケミカルの数を増やしたりなどして、有効な組み合わせ条件を新たに探していきたい。また、細胞実験で得られた効果が実際の生体内でも同様の効果を発揮するか、さらなる実験、情報収集を進めていきたい。

◆参考論文

1. Kuehn HS, Radinger M, Gilfillan AM. Measuring mast cell mediator release. Curr Protoc Immunol. 2010 Nov;Chapter 7:Unit7.38.
2. Nakano T, Andoh T, Sasaki A, Nojima H, Kuraishi Y. Different roles of capsaicin-sensitive and H1 histamine receptor-expressing sensory neurones in itch of mosquito allergy in mice. Acta Derm Venereol. 2008;88(5):449-54.
3. Dong F, Tan J, Zheng Y. Chlorogenic Acid Alleviates Allergic Inflammatory Responses Through Regulating Th1/Th2 Balance in Ovalbumin-Induced Allergic Rhinitis Mice. Med Sci Monit. 2020 Sep 1;26:e923358.
4. Matsuo N, Yamada K, Shoji K, Mori M, Sugano M. Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. Allergy. 1997 Jan;52(1):58-64.
5. Cho SH, Jo A, Casale T, Jeong SJ, Hong SJ, Cho JK, Holbrook JT, Kumar R, Smith LJ. Soy isoflavones reduce asthma exacerbation in asthmatic patients with high PAI-1-producing genotypes. J Allergy Clin Immunol. 2019 Jul;144(1):109-117.e4.
6. Mitra S, Rauf A, Tareq AM, Jahan S, Emran TB, Shahriar TG, Dhama K, Alhumaydhi FA, Aljohani ASM, Rebezov M, Uddin MS, Jeandet P, Shah ZA, Shariati MA, Rengasamy KR. Potential health benefits of carotenoid lutein: An updated review. Food Chem Toxicol. 2021 Aug;154:112328.
7. Manabe Y, Hirata T, Sugawara T. Suppressive effects of carotenoids on the antigen-induced degranulation in RBL-2H3 rat basophilic leukemia cells. J Oleo Sci. 2014;63(3):291-4.

8. Arakawa T, Shibata M, Hosomi K, Watanabe T, Honma Y, Kawasumi K, Takeuchi Y. Anti-allergic effects of peppermint oil, chicle and jelutong. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 1992;33:569-75.
9. Wang J, Li F, Ding J, Tian G, Jiang M, Gao Z, Tuyghun E. Investigation of the anti-asthmatic activity of Oridonin on a mouse model of asthma. Mol Med Rep. 2016 Sep;14(3):2000-6.
10. Lee EJ, Ji GE, Sung MK. Quercetin and kaempferol suppress immunoglobulin E-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 and Caco-2 cells. Inflamm Res. 2010 Oct;59(10):847-54.
11. 山﨑永理, 砂川 正隆, 沼口 佳世, 時田 江里香, 池谷 洋一, 北村 敦子, 世良田 紀幸, 石川 慎太郎, 中西 孝子, 久光 正 日本補完代替医療学会誌 9 巻 (2012) 2 号 p. 107-113.
12. Li LC, Piao HM, Zheng MY, Lin ZH, Li G, Yan GH. Sesamin attenuates mast cell-mediated allergic responses by suppressing the activation of p38 and nuclear factor-κB. Mol Med Rep. 2016 Jan;13(1):536-42.
13. Jeon M, Lee J, Lee HK, Cho S, Lim JH, Choi Y, Pak S, Jeong HJ. Sulforaphane mitigates mast cell-mediated allergic inflammatory reactions in in silico simulation and in vitro models. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2020 Apr;42(2):74-83.