

報 文

タンカン果皮に含有されるポリメトキシフラボン類が即時型アレルギー症状に及ぼす
影響の解析

後藤 真生, 石川 (高野) 祐子*

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門

Effects of Tankan compounds administration on immediate allergic reaction

Masao Goto and Yuko Takano-Ishikawa*

Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization
2-1-12 Kannonndai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

We reported that polymethoxyflavones of “Tankan” (*Citrus tankan* Hayata) peel inhibited inflammatory cytokines production from antigen-induced splenocytes. In this study, we investigated the effects of the tankan peel extract and polymethoxyflavones in tankan peel on the allergic reactions. Firstly, allergic cutaneous reaction was reduced in tankan peels orally administered mice. And the treatment of polymethoxyflavones in tankan peels reduced antigen-specific immune responses of splenocytes and degranulation of RBL-2H3 cells. These results suggested that polymethoxyflavones of tankan peels inhibited allergic reactions..

Key words: polymethoxyflavones, Tankan, allergic reactions, antigen-specific immune responses

ポリメトキシフラボン, タンカン, アレルギー, 抗原特異的応答

緒 言

花粉症やアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー疾患の患者数は急速に増加しており, 日本国民の約2人に1人は何らかのアレルギー疾患を患っている(厚生労働省平成23年度リウマチ・アレルギー対策委員会報告書). それによる労働生産性の低下や医療費

の増大は大きな社会的問題となっており, その対策として食品やサプリメントの機能を活用する取り組みへの期待も高まっている.

アレルギーとは, 生体を病原体などの外敵から防御する免疫応答が破綻し, 過剰な炎症を誘起することでもたらされる様々な症状である. 著者らは, 炎症の抑制によるアレルギー症状の抑制・緩和を目的として,

* 連絡先 (Corresponding author), yuko@affrc.go.jp

炎症抑制活性を有する食品の探索を進めてきたところ、柑橘の一種であるタンカンの果皮に強い炎症性サイトカインの産生抑制活性があることを見出し、その活性成分がポリメトキシフラボン類であることを報告している¹⁾。

本研究ではまず、タンカン果皮の経口投与がモデル動物のアレルギー症状に及ぼす影響について検討した。アレルギー性血管透過性亢進を重症度指標として評価した結果、タンカン果皮を摂取した群では症状が有意に軽減することを確認した。一方、即時型アレルギー発症においてはアレルギー刺激による肥満細胞の脱顆粒、IgG1やIgEなどアレルギー関連抗体の産生と関与する免疫担当細胞の活性化が重要である。そこで、本研究では、タンカン果皮の即時型アレルギー症状抑制機序を明らかとするために、肥満細胞のモデル細胞株であるラット好塩基球性白血病細胞RBL-2H3を用いて、タンカン果皮およびポリメトキシフラボン類が肥満細胞の脱顆粒、免疫細胞の増殖およびサイトカイン・抗体の産生を抑制することを明らかにしたので報告する。

実験材料及び方法

1. 試料

供試試料には鹿児島県産のタンカン (*Citrus tankan* Hayata) を用いた。タンカン果皮を凍結乾燥、粉碎し、氷冷下で10倍量の水で抽出した後、遠心分離して得た上清の凍結乾燥物を、メタノールで溶解し、Sepak C₁₈ カートリッジに吸着させた後、水、33%メタノール、66%メタノール、100%メタノールで段階溶出させた。66%メタノール溶出画分を試料として用い、この画分において存在が確認されたポリメトキシフラボンである nobiletin, tangeretin, sinensetin, および 5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone, 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone については Extrasynthese 社 (フナコシ取扱い) より購入した。培養細胞に、これらのDMSO溶液をDMSOの最終濃度が0.1%以下になるように添加し、対照区には試料添加区と最終濃度が等しくなるようにDMSOを添加した。また脾臓細胞を刺激する抗原として卵白アルブミン (OVA grade V, 生化学工業) およびT細胞の刺激には抗CD3ε抗体145-2C11 (eBioscience) を用いた。

2. 細胞と培養培地、および動物

ラット好塩基球性白血病細胞株であるRBL-2H3はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入し、

牛胎児血清 (大日本製薬) 10% を含む DMEM 培地 (Sigma-Aldrich) を培養培地とした。OVA に特異的な T 細胞受容体を発現する DO11.10 マウス (10-15 週齢) から定法によって採取した脾臓初代細胞は、牛胎児血清 10%, 2-メルカプトエタノール (50 μM), ペニシリン (100 U/mL), ストレプトマイシン (100 μg/mL) を含む RPMI-1640 培地 (ニプロ) を培養培地とした。各細胞は炭酸ガスインキュベータ中 (5% CO₂-95%air, 37°C) で培養した。DO11.10 マウス (Jackson laboratories) は (株)チャールズリバーから購入し、当部門のバリアシステムの動物飼育室において、市販標準飼料で繁殖・維持した。本動物実験は食品総合研究所 (現: 食品研究部門) 動物実験委員会の承認を受けて実施した。

3. 初代免疫細胞培養

細胞培養用 48 ウェルプレートに、脾臓細胞 (1 × 10⁶ cells/well), OVA (10 μM), 供試試料を計 250 μL/well となるように培養し、培養上清を回収した。細胞増殖能の評価には、細胞培養用 96 ウェルプレートに、脾臓細胞 (1 × 10⁵ cells/well), OVA (10 μM) または固相化 (0.5 μg/mL 溶液を 100 μL/well でプレートに入れ、プレート底面を一晩 4°C でインキュベートすることによって、コートした後、余分のタンパク質をリン酸緩衝液で洗浄したもの) 抗 CD3ε 抗体, 供試試料を計 100 μL/well となるように培養した。

4. 脱顆粒抑制活性試験

RBL-2H3 細胞に anti-DNP (dinitrophenol)-IgE を添加した後、供試試料を添加、その後 DNP-HSA (human serum albumin) を添加して IgE を架橋させた刺激により脱顆粒を誘導した。脱顆粒により放出された β-hexosaminidase の活性を培養上清および細胞溶解液それぞれについて測定し、細胞内酵素量に対する放出割合 (%) として脱顆粒率を計算した。

5. アレルギー症状重症度評価試験

DO11.10 マウスに、タンカン果皮凍結乾燥物を NMF 粉末餌 (オリエンタル酵母) に 5% (w/w) となるよう混合した餌を 3 週間自由摂取させた。餌の投与開始 1 週間後に OVA 2% (w/w) 水溶液を飲水として、3 日間連続 OVA 水溶液投与後、4 日間連続水投与を 2 回繰り返す。感作を行った。感作成立後に皮膚反応試験を行い、即時型アレルギー反応による血管透過性亢進の重症度を血漿成分の滲出量として測定した。

6. 各種測定

細胞増殖は、抗原や抗 CD3 ϵ 抗体による刺激から 70 時間後に BrdU chemiluminescent cell-proliferation ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals) を用いて、指定された手順に従って測定した。サイトカイン産生は、刺激から、IL-2 と IL-4 については 48 時間後、IFN- γ については 72 時間後に回収した培養上清を Mouse Cytokine ELISA Ready-SET-Go! kits (eBioscience) を用いて、指定された手順に従って測定した。抗体産生については、刺激から 1 週間後に回収した培養上清をイムノグロブリンアッセイキット (Bethyl) により測定した。培養上清は測定に供するまで遮光密閉状態で -30 $^{\circ}$ C で保存した。

7. 統計処理

統計処理には Microsoft excel を用い、実験結果は複数回反復した値の平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表した。統計処理はスチューデントの *t*-検定により、危険率 5% もしくは 1% 水準で有意差ありと判定した (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

実験結果

1. アレルギーモデル動物を用いたタンカン果皮摂取の即時型アレルギー症状抑制能の評価

即時型アレルギー性炎症反応による血管透過性亢進を血漿成分の滲出量として測定したところ、タンカン果皮凍結乾燥物を経口投与した群では、対照群に比べ有意に滲出量が抑制された (図 1)。

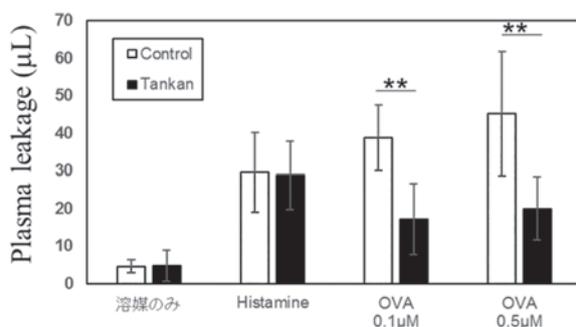


図 1 血管透過性亢進を指標としたタンカン果皮経口投与の即時型アレルギー性炎症に対する効果

N=6 で行った結果を平均値 \pm SD で表し、スチューデントの *t*-検定により、危険率 5% 以下を有意差ありと判定した (**: $p < 0.01$)。

2. タンカン果皮抽出物および果皮に含有されるポリメトキシフラボンの免疫細胞応答への影響

1) 抗原および抗 CD3 ϵ 抗体刺激で誘導された脾臓細胞の増殖に対する影響

DO11.10 マウス由来脾臓細胞の抗原特異的増殖への影響を、無添加区に対する百分率として示した (図 2)。66% MeOH extract, tangeretin および 5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone では 0.4-3.3 μ M (ただし 66% MeOH extract については μ g/mL) の濃度範囲で影響がほとんど見られなかったが、nobiletin と sinensetin は脾臓細胞の増殖を抑制する傾向が認められた。

そこで、T 細胞のみを刺激する抗 CD3 ϵ 抗体で脾臓細胞を刺激して細胞増殖を検討したところ (図 3)、5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone は細胞増殖を亢進する傾向が認められた。それ以外のポリメトキシフラボンおよび 66% MeOH extract は、3.3 μ M 添加区で増殖が抑制される傾向にあった。

2) 脾臓細胞の抗原特異的サイトカイン産生に対する影響

抗原刺激した脾臓細胞培養上清中の、IL-2、IL-4、IFN- γ の 3 種のサイトカイン量を測定し、IL-2 (図 4A) および IFN- γ (図 4B) について無添加区に対する百分率で示した。供試したすべてのポリメトキシフラボンおよび 66% MeOH extract は、IL-2 と IFN- γ の産生を有意に

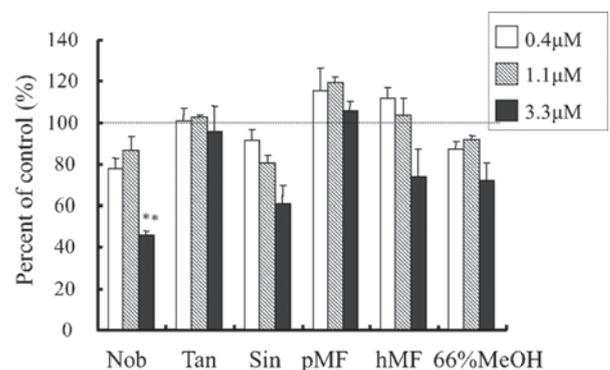


図 2 脾臓細胞の抗原特異的増殖に対するタンカン抽出物およびポリメトキシフラボンの効果

Nob: nobiletin, Tan: tangeretin, Sin: sinensetin, pMF: 5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone, hMF: 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone, 66% MeOH: tanakan 66% MeOH extract (μ g/mL)

3 反復行った結果を平均値 \pm SD で表し、有意差検定を実施し、危険率 5% 以下を有意差ありと判定した (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

抑制した。一方、IL-4においては、いずれも有意差は観られなかった（データ略）。

3) 脾臓細胞の抗原特異的な抗体産生に対する効果

脾臓細胞の抗原特異的な抗体産生を評価するため、

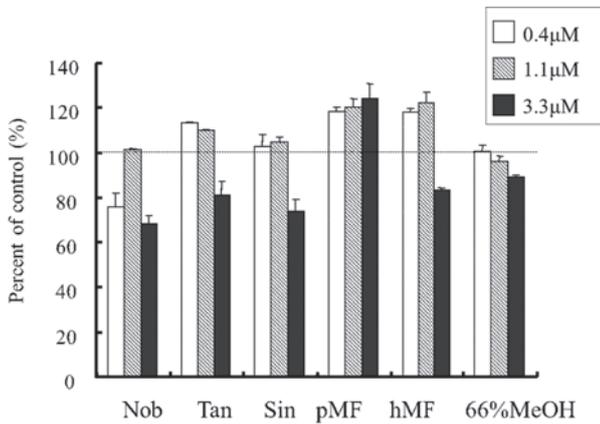


図3 抗CD3ε抗体によって刺激された脾臓細胞の増殖に対するタンカン抽出物およびポリメトキシフラボンの効果

Nob: nobiletin, Tan: tangeretin, Sin: sinensetin, pMF: 5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone, hMF: 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone, 66% MeOH: tanakan 66%MeOH extract (μg/mL)

3反復行った結果を平均値±SDで表し、有意差検定を実施し、危険率5%以下を有意差ありと判定した (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$).

培養上清中のIgG₁を測定した(図5)。5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavoneの1.1および3.3μM添加区におけるIgG₁産生は、無添加区と比較して有意な減少が認められた。

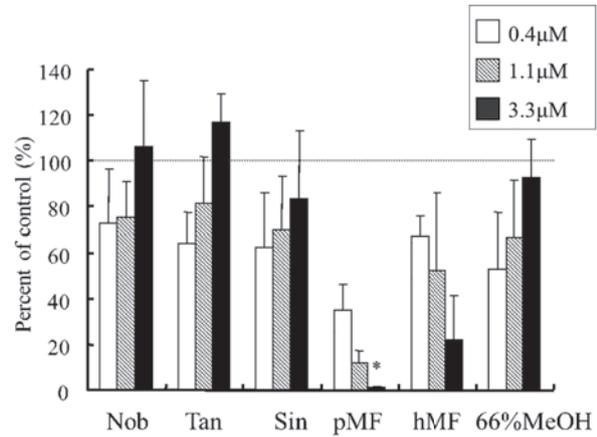


図5 脾臓細胞の抗原特異的な抗体産生に対するタンカン抽出物およびポリメトキシフラボンの効果

Nob: nobiletin, Tan: tangeretin, Sin: sinensetin, pMF: 5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone, hMF: 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone, 66% MeOH: tanakan 66% MeOH extract (μg/mL)

3反復行った結果を平均値±SDで表し、有意差検定を実施し、危険率5%以下を有意差ありと判定した (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$).

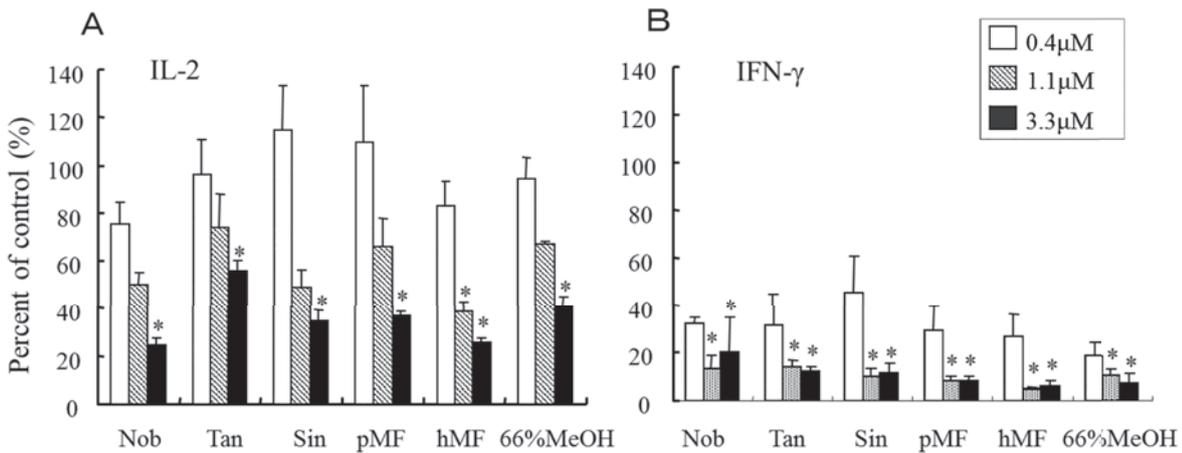


図4 脾臓細胞の抗原特異的なサイトカイン産生に対するタンカン抽出物およびポリメトキシフラボンの効果

Nob: nobiletin, Tan: tangeretin, Sin: sinensetin, pMF: 5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone, hMF: 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone, 66% MeOH: tanakan 66%MeOH extract (μg/mL)

3反復行った結果を平均値±SDで表し、有意差検定を実施し、危険率5%以下を有意差ありと判定した (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$).

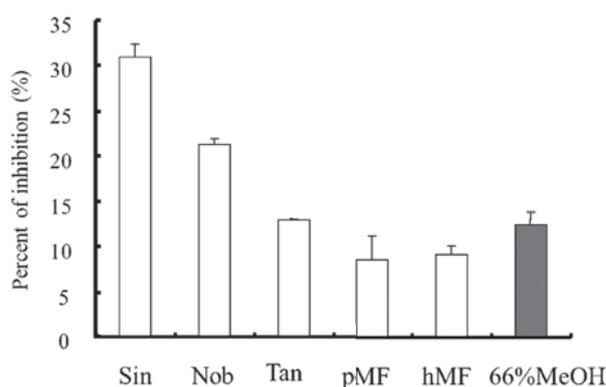


図6 RBL-2H3細胞の脱顆粒に対するタンカン抽出物およびポリメトキシフラボンの効果

Nob: nobiletin, Tan: tangeretin, Sin: sinensetin, pMF: 5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone, hMF: 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone, 66% MeOH: tanakan 66%MeOH extract ($\mu\text{g/mL}$)

2反復行った結果を平均値 \pm SDで表した。

3. タンカン果皮抽出物および果皮に含有されるポリメトキシフラボンの脱顆粒抑制活性の評価

ポリメトキシフラボンの試料をそれぞれ10 μM (66% MeOH extract については、20 $\mu\text{g/mL}$) の濃度で細胞に添加し、 β -hexosaminidaseを指標としてRBL-2H3細胞の脱顆粒抑制活性を検討した。その結果、nobiletinとsinensetinにおいて、 β -hexosaminidaseの放出抑制が認められ、抑制率はそれぞれ21および31%であった。66% MeOH extractおよびその他のポリメトキシフラボンには抑制は見られなかった(図6)。

考 察

本研究では、高いTNF- α 産生抑制活性を示すポリメトキシフラボンを含み、抗炎症活性が期待されるタンカン果皮¹⁾の抗アレルギー活性を実験モデル動物による*in vivo*試験によって評価した。筆者らが確立したアレルギー動物モデル²⁾に餌に混合したタンカン果皮凍結乾燥物を自由摂取させたところ、タンカン果皮摂食群では、即時型アレルギー反応が抑制された(図1)。

そこで、本効果の機序を明らかにするために、タンカン果皮抽出物および含有されるポリメトキシフラボン等が免疫関連細胞の機能に及ぼす影響を*in vitro*試験によって評価、検討することとした。

アレルギー性炎症疾患においては、抗原特異的な免疫担当細胞の活性化が重要であるため、まず、脾臓細

胞の抗原特異的増殖に対する66% MeOH extractおよびポリメトキシフラボンの効果について検討したところ、抗原刺激、抗CD3 ϵ 抗体刺激のいずれにおいても細胞増殖は抑制される傾向であった(図2, 3)。T細胞のみを直接活性化する抗CD3 ϵ 抗体刺激による細胞増殖も、抗原刺激による細胞増殖と同様の傾向を示したことから、供試したポリメトキシフラボンの幾つかは活性化T細胞の増殖を抑制すると考えられた。

一方、アレルギーに強く関与するとされるTh2型サイトカインであるIL-4の産生は抑制されず、Th2型サイトカインと拮抗関係にあるとされるTh1型サイトカインであるIFN- γ ³⁾、細胞の活性化に関わるIL-2のいずれの産生も抑制が認められたことから(図4)、供試したポリメトキシフラボンはT細胞の活性化を抑制しつつ、分化についてはTh2型細胞優位に誘導することが示唆された。

そこで、活性化T細胞からのサイトカインなどの刺激を受けてB細胞が産生する抗体への影響について検討したところ、5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavoneがIgG₁の産生を強く抑制しており(図5)、T細胞のサイトカイン産生を強く抑制することで、B細胞による抗体の産生を抑制したと考えられた。さらに、RBL-2H3細胞の脱顆粒に対するポリメトキシフラボンの効果を検討したところ、供試したポリメトキシフラボンのうち、sinensetinやnobiletinに脱顆粒抑制活性が認められ、それぞれ抑制率は21および31%であった。

しかしながらこれらの*in vitro*試験ではポリメトキシフラボンを含む66% MeOH extractには抗体産生、脱顆粒ともに抑制活性が認められず、本実験で供試したポリメトキシフラボン以外の夾雑物の影響が考えられた。すなわち、タンカン果皮が経口投与によって即時型アレルギー性炎症抑制機能を発揮するには夾雑物の消長に関わる消化吸収なども関わっている可能性が考えられ、さらに作用機序の解明を進める必要がある。

要 約

植物・農産物に含まれる成分にはアレルギー疾患への効能が報告されているものが多い。我々は*in vivo*試験によってタンカン果皮の摂取が即時型アレルギー症状を緩和することを明らかにし、その機序解明のために行った*in vitro*試験によって果皮に含まれる成分に抗原特異的免疫応答や肥満細胞の脱顆粒を抑制するものがあることを明らかにした。

参考文献

- 1) 岡田大士・石川(高野)祐子・鈴木重徳・亀山眞由美・吉田充・八巻幸二, (2003) 鹿児島県特産カンキツの炎症メディエータ産生抑制機能, 日本食品科学工学会誌, **50**, 435-438.
- 2) Goto, M., Yamaki, K., Shinmoto, H., Takano-Ishikawa, Y. (2009) Continuous orally administered coffee enhanced the antigen-specific Th1 response and reduced allergic development in a TCR-transgenic mice model. *Biosci Biotechnol Biochem.* **73**, 2439-2444
- 3) Yang, J., Murphy, T.L., Ouyang, W. and Murphy, K.M. (1999) Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur. J. Immunol.*, **29**, 548-555.