

博士<健康科学>論文

大豆及びザクロのモデル動物実験系を用いた接触過敏症抑制効果の解析

2016年3月

烏日娜

川崎医療福祉大学大学院

医療技術学研究科

健康科学専攻

目次

第 1 章 序論.....	1
1.1 接触過敏症動物実験系.....	1
1.2 大豆の免疫疾患抑制効果.....	1
1.3 ザクロポリフェノールと健康増進効果.....	3
第 2 章 接触過敏症モデル動物実験系に与えるジニトロフルオロベンゼンの影響.....	4
2.1 要約.....	4
2.2 諸言.....	5
2.3 実験方法.....	6
2.4 研究結果.....	8
2.5 考察.....	10
第 3 章 大豆及び大豆イソフラボンの接触過敏症抑制効果.....	18
3.1 要約.....	18
3.2 序論.....	19
3.3 実験方法.....	20
3.4 研究結果.....	22
3.5 考察.....	24
第 4 章 ザクロポリフェノール濃縮物の接触過敏症抑制効果.....	32
4.1 要約.....	32
4.2 諸言.....	33
4.3 実験方法.....	34
4.4 研究結果.....	36
4.5 考察.....	38
謝辞.....	45
引用文献.....	46
本研究に関する論文および学会発表.....	54

第1章 序論

1.1. 接触過敏症動物実験系

接触皮膚炎は、外来性の刺激物質や接触アレルゲン（ハプテン）が皮膚に接触して生じた湿疹性の炎症反応と定義され、一次刺激性接触皮膚炎（irritant contact dermatitis; ICD）とアレルギー性接触皮膚炎（allergic contact dermatitis; ACD）に大別される。ICDは、皮膚に接触した刺激物質が角層の障害部位から侵入して角化細胞を刺激して惹起する炎症と考えられている。ACDは、IV型遅延性アレルギーの一種であり、職業的な皮膚病の主因となっている。ACDの発症には、ハプテンを捕獲した抗原提示細胞が所属リンパ節に遊走し抗原情報をTリンパ球に伝えて感作リンパ球が誘導される感作相と、感作成立後にハプテンが再び接触することにより感作T細胞が活性化されて表皮に炎症をおこす惹起相があるとされる¹⁻⁴。

ACDの研究において、マウスを用いた接触過敏症（contact hypersensitivity; CHS）は、よく使用されるモデル動物実験系である^{5,6}。ハプテンとして、ジニトロフルオロベンゼン（dinitrofluorobenzene; DNFB）、トリニトロクロロベンゼン

（trinitrochlorobenzene; TNCB）、オキサゾロン（oxazolone）、フルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate; FITC）などの自己タンパク質と化学的に反応性の高い有機低分子が用いられる。実験系では、まず、有機溶媒とオリーブ油に溶かしたハプテンを除毛したマウスの胸部に塗布する（感作相）。5-7日後に、耳介に同じハプテンをチャレンジすると炎症が惹起される（惹起相）。このアレルギー性の炎症による耳介の腫れは、24-48時間後をピークとして観察される。この耳介の腫れの程度を指標としてCHS評価が行われる⁷⁻¹³。

1.2. 大豆の免疫疾患抑制効果

大豆は、アジアで数千年間食べられてきた主要な作物の一つであり、イソフラボン（soy isoflavone; SI）、サポニン、ステロール、リグナンなどの植物性化学物質を含

んでいる。伝統的大豆食品には、様々な疾患に対する効果が知られている^{14,15)}。また、最新の臨床研究から、大豆食品またはSIには、乳がんや子宮がんなどのがん¹⁶⁾、心筋梗塞¹⁷⁾、骨粗鬆症¹⁸⁾、更年期障害の軽減に対する効果¹⁹⁾が報告されている。

大豆に含まれるSIのアグリコンの主成分はゲニステイン、ダイゼイン、グリステインであり、ほとんどが配糖体として存在している。SIは、配糖体のままでは吸収されず、グリコシダーゼの作用でアグリコンとなり体内に吸収される²⁰⁾。そのため、腸内細菌のグリコシダーゼが、SIの吸収に重要な役割を果たしていると考えられている。大豆には、12種類の異性体が含まれており、3種類のアグリコン(ゲニステイン、ダイゼイン、グリステイン)、3種の配糖体(ゲニスチン、ダイジン、グリシチン)、3種類のマロニル化配糖体(マロニルゲニスチン、マロニルダイジン、マロニルグリシチン)、3種類のアセチル化配糖体(アセチルゲニスチン、セチルダイジン、アセチルグリシチン)がある。大豆に含まれるSIをアグリコンに換算すると、ゲニステイン、ダイゼイン、グリステインがそれぞれ50%、40%、10%の比率となる²¹⁾。

モデル動物実験系を用いた実験によるSIの免疫疾患抑制効果が、報告されている²²⁻²⁴⁾。ゲニステイン投与には、遅延型過敏症(delayed-type hypersensitivity; DHS)の抑制効果が示された^{25,26)}。大豆食品とSIの摂取は、アレルギー性鼻炎を軽減し、喘息に効果があることが報告されている^{27,28)}。SIとゲニステイン摂取は、オボアルブミン誘導気管支炎を軽減させ好中球の浸潤を抑制する効果があることが、マウスを用いた喘息モデルで示された²⁹⁾。喘息患者において、SI摂取により好酸球におけるロイコトリエンC₄の産生と気管支炎の減少が報告されている³⁰⁾。さらに、マウスを用いたモデル動物実験系で、オボアルブミン特異的免疫反応の抑制³¹⁾、大豆発酵食品のピーナツアレルギー緩和作用³²⁾、ゲニステインとダイゼイン摂取によるデキストラン硫酸による大腸炎の抑制³³⁾が報告されている。しかしながら、大豆もしくはSIの免疫系疾患に対する利用研究は、ヒトではほとんど進んではおらず、モデル動物実験系を用いた研究も限られているのが現状である²²⁾。

1.3. ザクロポリフェノールの健康増進効果

ザクロ (*Punica granatum L.*) は、中東、地中海地域、中国、米国など広い地域で生産されており、主に果実やジュースとして消費されている。ザクロジュースは、オレンジ、ブドウ、グレープフルーツ、リンゴなどの他のジュースと比べてより多くのポリフェノールを含んでいること、抗酸化活性が最も高いなどの特徴がある³⁴⁾。ザクロジュースの可溶性ポリフェノール含量は品種によって異なるが、0.2%~1.0%含まれている。ザクロポリフェノールは、エラジタンニンを主成分としており、がん、糖尿病、心血管疾患などの慢性病にたいして予防効果が報告されている^{35,36)}。

エラジタンニンは、加水分解性タンニンに分類され、ザクロはプニカラジンやプニカリンなどを含んでいる。ザクロジュースのエラジタンニンについてヒトで生物学的利用能が研究された。エラジタンニンは、腸内でエラグ酸に加水分解され、腸内菌叢によってウロリチンに代謝される。エラジタンニンとエラグ酸はほとんど吸収されず、ウロリチン（主にウロリチンA; UA）として吸収される³⁷⁻⁴²⁾。

ザクロポリフェノール、エラグ酸、UAには、抗酸化性、抗腫瘍性、抗動脈硬化症性、抗炎症性作用など様々な生理活性があることが知られている⁴²⁻⁴⁵⁾。長野らは、ザクロジュースからザクロポリフェノール濃縮物 (pomegranate polyphenol concentrate; PPC) を調製し、CHS 動物実験系を用いて CHS 抑制効果を検討した。その結果、DNFB による耳介の腫れは、コントロール群と比較して PPC 摂取群で抑制された。血清中の抗原特異 IgG1 は、コントロール群と比較して PPC 摂取群で低下したが、IgG2a は変わらないことが判明した。さらに、脾臓の IL-10 産生細胞と IFN- γ /IL-4 産生 CD4⁺T 細胞にコントロール群と比較して PPC 摂取群で増加が観察された。以上の結果から、PPC の CHS と IgG1 産生の抑制作用は、IL-10 産生細胞の増加と Th1/Th2 バランスの調節作用によるものと考えられた（長野ら、未発表データ）。しかしながら、現在のところザクロポリフェノールの CHS 抑制作用についての研究は少ないことから、不明な点が多い。

以上のことから、本研究では CHS 動物実験系に与える DNFB の影響、大豆及びザクロポリフェノールの影響について検討した。

第2章 接触過敏症動物実験系に与えるジニトロフルオロベンゼンの影響

2.1. 要約

CHS モデルマウスの耳介にチャレンジするジニトロフルオロベンゼン (DNFB) の濃度と回数の影響について検討した。まず、耳介の腫れを調べた結果、0.15%と0.3%DNFBでは2回のチャレンジで、0.5%DNFBでは1回のチャレンジで評価をすることが望ましいと考えられた。次に、耳介組織をヘマトキシリン・エオジン(HE)と免疫組織化学(IHC)を用いて染色した。IHCでは、抗Gr-1抗体を使用して耳介組織に浸潤した炎症細胞を染色した。その結果、HE染色では0.15%と0.3%DNFB群で耳介組織の腫れに差はみられなかった。一方、IHC染色では、0.3%DNFB群は0.15%DNFB群と比べて耳介組織に浸潤した炎症細胞の数に有意な増加がみられた。従って、抗Gr-1抗体を使用したIHC染色は、CHS評価において有用な研究方法と考えられた。

2.2. 諸言

今までに CHS 動物実験系を用いた報告では、チャレンジするハプテンの量と回数は様々であり、その影響を詳細に検討した報告はみられない。そこで本研究では、ハプテンとして最もよく使用される DNFB を使用して、耳介にチャレンジする濃度と回数が CHS 反応に与える影響について検討した。さらに、免疫組織化学的 (immunohistochemical, IHC) 手法を用いて CHS による耳介の炎症状態について評価をおこなった。

2.3. 実験方法

2.3.1. 試薬

2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) は、関東化学から購入した。

2.3.2. マウス

6 週齢雌 BALB/c マウスを日本エスエルシーから購入した。マウスには、F2PLD1 (オリエンタル酵母) と酸性水を自由摂取させた。実験は、コントロール群 (n=3), 0.15%DNFB 群 (n=6), 0.3%DNFB 群 (n=6), 0.5%DNFB 群 (n=6) の 4 群で行なった。なお、本動物実験は、川崎医療福祉大学動物実験委員会 (承認番号: 13-011), 及び川崎医科大学動物実験委員会 (承認番号: 14-019) の承認を得て実施した。

2.3.3. 接触過敏症動物実験系

実験スケジュールを Fig. 2-1 に示す。まず、マウスの胸部の毛をトリマーで剃った。感作は、毛を剃った胸部に 0.5% DNFB (アセトン: オリーブ油 (4:1) に溶解) 50 μ L / 匹を滴下し、実験 0 日目と 1 日目に合計 2 回おこなった。ここで、コントロール群は溶媒のみで感作した。耳介にチャレンジする DNFB 濃度は、コントロール群で 0%, 0.15%DNFB 群で 0.15%, 0.3%DNFB 群で 0.3%, 0.5%DNFB 群で 0.5%とした。チャレンジは、DNFB をマウス耳介の背側部分 (両耳) に 20 μ L ずつ、計 40 μ L / 匹を滴下し、実験 5 日目, 12 日目, 19 日目の合計 3 回おこなった。また、すべての操作はセボフレン吸入麻酔剤を使用して麻酔下でおこなった。

2.3.4. 耳介の腫れの測定方法

耳介の腫れは、チャレンジ 24 時間後の耳介の厚みからチャレンジ前の耳介の厚みを差し引いて求めた。耳介の厚みは、マイクロメータ (ソフトタッチマイクロ CLM, ミツトヨ) を使用して測定した。

2.3.5. 耳介組織の観察方法

3回目のチャレンジをおこなった24時間後(実験20日目)に耳介を採取し、IHC Zinc Fixative(日本BD)で24時間固定をおこないパラフィン包埋切片(3 μm)を作製した。組織切片は、ヘマトキシリン・エオジン(HE)とIHCで染色を行った。HE染色をおこなった耳介組織は、10倍対物レンズを使用して光学顕微鏡で組織観察した。

2.3.6. 免疫組織化学染色方法

IHC染色は、ベンタナXTシステム ディスカバリー(ロシュ・ダイアグノスティックス)を使用しておこなった。一次抗体としてanti-mouse Ly-6G(Gr-1)抗体(eBioscience)を用い、二次抗体としてbiotin mouse anti-rat IgG2b(日本BD)を使用した。また、ヘマトキシリンで核の染色をおこなった。IHCで染色した組織は、40倍対物レンズを使用して光学顕微鏡で観察し、210 μm 四方中の染色された細胞を数えた。細胞数の計測は、1切片につき5箇所でおこなった。

2.3.7. 統計解析の方法

結果は、平均値と標準偏差(SD)で示した。統計解析には、Origin 8.5J(OriginLab)を使用し、2群の比較には t 検定を用いた。3群以上の比較には一次元配置分散分析を行い、その後にTukey検定でポストホックテストをおこなった。

2.4. 研究結果

2.4.1. マウスの体重測定

実験開始時と終了時の各群におけるマウスの体重を測定した (Table 2-1)。その結果、実験開始時と終了時で、各群間での有意な差は観察されなかった。このことから、チャレンジした DNFB 濃度の違いはマウスの体重に影響を与えないと考えられた。

2.4.2. 耳介の腫れの評価

DNFB の濃度を変えてマウス耳介にチャレンジし、24 時間後の耳介の腫れを評価した。まず、1 回目のチャレンジを行ない耳介の腫れを測定した結果、コントロール群で -0.001 ± 0.005 mm, 0.15%DNFB 群で 0.058 ± 0.021 mm, 0.3%DNFB 群で 0.099 ± 0.019 mm, 0.5%DNFB 群で 0.224 ± 0.028 mm であった (Fig. 2-2A)。次に、2 回目のチャレンジを行ない耳介の腫れを測定した結果、コントロール群で 0.007 ± 0.006 mm, 0.15%DNFB 群で 0.218 ± 0.020 mm, 0.3%DNFB 群で 0.243 ± 0.040 mm, 0.5%DNFB 群で 0.376 ± 0.040 mm であった。0.15%DNFB 群と 0.3%DNFB 群では有意な差は認められなかった (Fig. 2-2B)。0.5%DNFB 群では、多くのマウスの耳介に水疱が観察されたため耳介の厚み測定は困難であった。さらに、3 回目のチャレンジを行ない耳介の腫れを測定した結果、コントロール群で 0.006 ± 0.005 mm, 0.15%DNFB 群で 0.196 ± 0.014 mm, 0.3%DNFB 群で 0.311 ± 0.044 mm, 0.5%DNFB 群で 0.951 ± 0.261 mm であった (Fig. 2-2C)。0.3%DNFB 群でマウスの耳介に水疱が観察され、耳介の厚み測定に支障をきたす個体が見られた。0.5%DNFB 群では、耳介で苔癬化が進んでおり、測定値に大きなバラツキが生じた。

2.4.3. 耳介の組織観察

チャレンジ 3 回目の 24 時間後にマウス耳介を採取して組織切片を作製し、HE 染色による組織観察を行った (Fig. 2-3)。コントロール群と比較して、0.15%DNFB 群, 0.3%

DNFB 群, 0.5%DNFB 群で CHS により耳介組織が腫れている様子が観察された。0.15%と 0.3%DNFB 群では, 組織の腫れに大きな差は見られなかった。0.5%DNFB 群では, 耳介組織の苔癬化が進んでいたことから IHC 染色は困難と判断した。

2.4.4. IHC 染色

抗 Gr-1 抗体を用いて耳介組織に浸潤した炎症細胞の IHC 染色を行った (Fig. 2-4)。画像で, 青色に染まった部分はヘマトキシリンで染色された核であり, 褐色に染まった部分は耳介組織に浸潤した炎症細胞と考えられる。IHC 染色された細胞の数は, 0.15% DNFB 群で 166 ± 59 個/mm², 0.3%DNFB 群で 253 ± 59 個/mm²であった。0.3%DNFB 群は, 0.15%DNFB 群と比較して耳介組織に浸潤した炎症細胞の数に有意な増加がみられた (Fig. 2-5)。

2.5. 考察

マウスを用いた CHS は、ヒト ACD のモデル動物実験系として有用と考えられている^{5,6)}。本章の研究では、ハプテンとして報告が最も多い DNFB を用い、耳介にチャレンジする DNFB の濃度と回数が CHS に与える影響について検討した。CHS の評価は、1) 耳介の腫れ、2) 耳介組織の観察、3) 耳介組織に浸潤した炎症細胞についておこなった。耳介に異なる濃度の DNFB をチャレンジし、24 時間後の CHS による耳介の腫れを比較した。1 回目のチャレンジをおこなった結果、耳介の腫れの平均値は 0.15% および 0.3% DNFB 群で 0.1mm 以下であり、0.5% DNFB 群で 0.2 mm を超えた。この結果から、0.15% と 0.3% DNFB 群はさらにチャレンジが必要であり、0.5% DNFB 群は 1 回目のチャレンジで CHS 評価が可能であると考えられた。次に、2 回目のチャレンジをおこなった結果、耳介の腫れの平均値は 0.15% と 0.3% DNFB 群でどちらも 0.2 mm 以上となった。また、0.15% と 0.3% DNFB 群で耳介の腫れに有意な差は認められなかった。一方、0.5% DNFB 群の耳介の腫れの平均値は 0.376 mm と高値ではあったが、多くのマウス耳介で水疱ができており、耳介の厚み測定による評価は困難な状態であった。この結果から、0.15% と 0.3% DNFB 群では 2 回目のチャレンジで CHS 評価が可能となり、0.5% DNFB 群では 2 回チャレンジをおこなうと CHS 評価は難しくなると考えられた。さらに、3 回目のチャレンジをおこなった結果、0.15% と 0.3% DNFB 群で耳介の腫れに有意な差はなく、どちらも 2 回目のチャレンジをおこなった結果と比べて差は観察されなかった。また、0.3% DNFB 群でマウスの耳介に水疱ができ耳介の厚み測定に支障をきたす個体が見られた。以上の結果から、0.15% と 0.3% DNFB は 2 回のチャレンジで、0.5% DNFB は 1 回のチャレンジで CHS 評価をすることが望ましいことが示された。Inagaki and Nagai⁵⁾は、0.15% DNFB を 5 回チャレンジして CHS 評価する方法を提唱している。Bhol and Schechter⁷⁾は、0.2% DNFB を 2 回チャレンジして CHS 評価をおこなった。この Bhol and Schechter の方法を用いて、Yuan ら⁸⁾と Ishida ら⁹⁾は CHS 評価をおこなっている。Tüting のグループ^{10,11)}は、0.3% DNFB を 2 回または 3 回チャレンジして CHS 評価をおこなった。さらに、Sugawara のグルー

プ^{12,13)}は、0.5%DNFBを1回チャレンジする方法でCHS評価をおこなった。すなわち、CHS動物実験系を用いた先行研究において、0.5%DNFBでは1回のチャレンジで、0.15%から0.3%DNFBでは数回のチャレンジでCHS評価を行っている。そのため、我々の結果は、先行研究と矛盾がない結果と考えられる。本研究では、HE染色とIHC染色をおこない3回チャレンジをおこなった耳介組織を評価した。HE染色後に耳介組織を観察したところ、0.15%と0.3%DNFB群で耳介組織の腫れに大きな差は見られなかった。一方、耳介組織中のIHC染色された細胞数を測定したところ、0.3%DNFB群は0.15%DNFB群と比べて有意な細胞数の増加が見られた。CHSの惹起相では、ハプテンが再び皮膚表面に接触すると表皮細胞からサイトカインやケモカインの産生がみられる。続いて、血管の拡張と内皮細胞の活性化がおこり、好中球や好酸球などの炎症細胞が耳介組織に浸潤して炎症状態となる⁶⁾。抗Gr-1抗体を使用すると、この耳介組織に浸潤した炎症細胞を特異的に染色することができる¹⁰⁾。さらに、本研究で耳介の腫れを測定した結果においても、0.15%と0.3%DNFB群で有意な差は見られなかった。これらの結果から、抗Gr-1抗体を使用したIHC染色は、CHS評価をするうえで有用な研究方法と考えられる。

耳介の腫れを指標とした結果、0.15%と0.3%DNFBは2回のチャレンジで、0.5%DNFBは1回のチャレンジでCHS評価をすることが望ましいことが示された。次に、耳介組織をHEとIHCで染色した。IHC染色では、抗Gr-1抗体を使用して耳介組織に浸潤した炎症細胞を染色した。その結果、HE染色では0.15%と0.3%DNFB群で耳介組織の腫れに大きな差は認められなかった。一方、IHC染色では、0.3%DNFB群は0.15%DNFB群と比べて耳介組織に浸潤した炎症細胞の数に有意な増加が見られた。従って、抗Gr-1抗体を使用したIHC染色は、CHS評価をするうえで有用な研究方法と考えられた。

Table 2-1. Mouse body weight (g) at the start and end dates of the experiment.

	Control	0.15% DNFB	0.3% DNFB	0.5% DNFB
Start date	19.8 ± 0.8	20.1 ± 0.8	20.1 ± 0.6	18.7 ± 1.0
End date	20.1 ± 0.8	20.6 ± 0.6	20.1 ± 0.7	19.8 ± 0.8

*Data are expressed as the means ± SD.

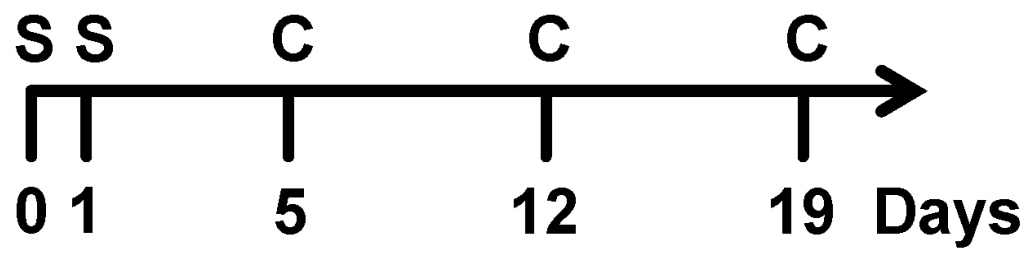


Figure 2-1. Experimental protocol

Notes: BALB/c mice were sensitized (S) with 0.5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), and were challenged (C) with different DNFB concentrations. The control mice were sensitized and challenged with vehicles.

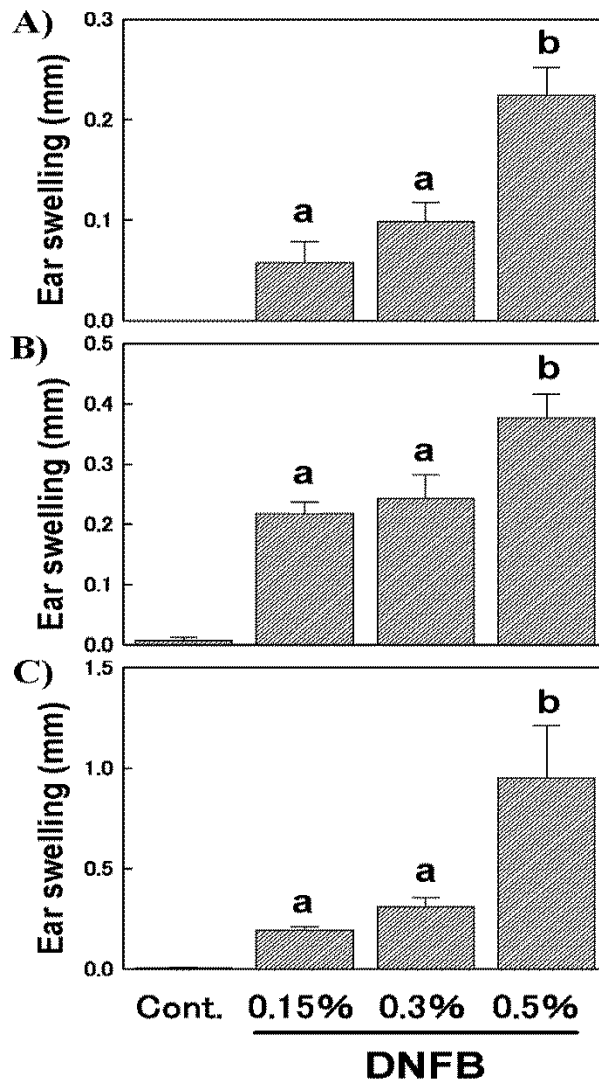


Figure 2-2. Ear swelling 24 h after the DNFB-challenge.

Notes: Ear thickness was measured using a micrometer and ear swelling was calculated as the difference in ear thickness before and after the challenge. A) Ear swelling 24 h after the first DNFB-challenge. B) Ear swelling 24 h after the second DNFB-challenge. C) Ear swelling 24 h after the third DNFB-challenge. Each value represents the mean \pm SD. a, b: $p < 0.01$.

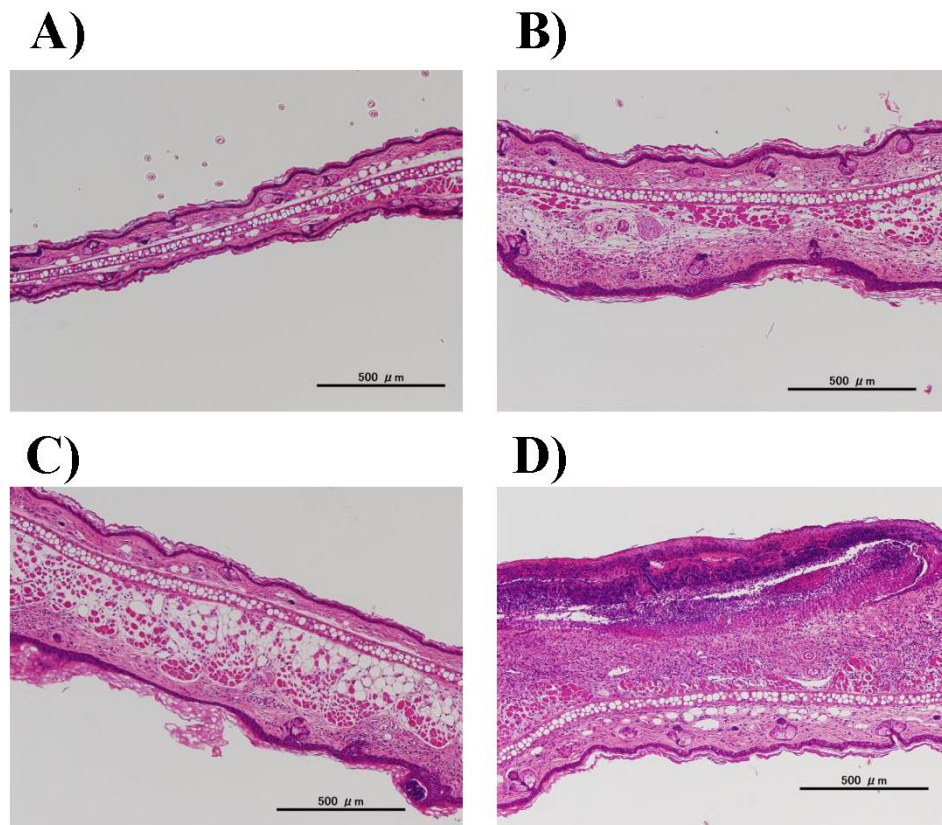


Figure 2-3. Histopathological images of DNFB-challenged mouse ears.

Notes: Mice were sensitized and challenged as described in Fig. 2-1. Ear tissues were collected 24 h after the third challenge and fixed with zinc for 24 h. Paraffin-embedded ear tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. A) Control group. B) 0.15% DNFB group. C) 0.3% DNFB group. D) 0.5% DNFB group. Scale bars, 500 μm .

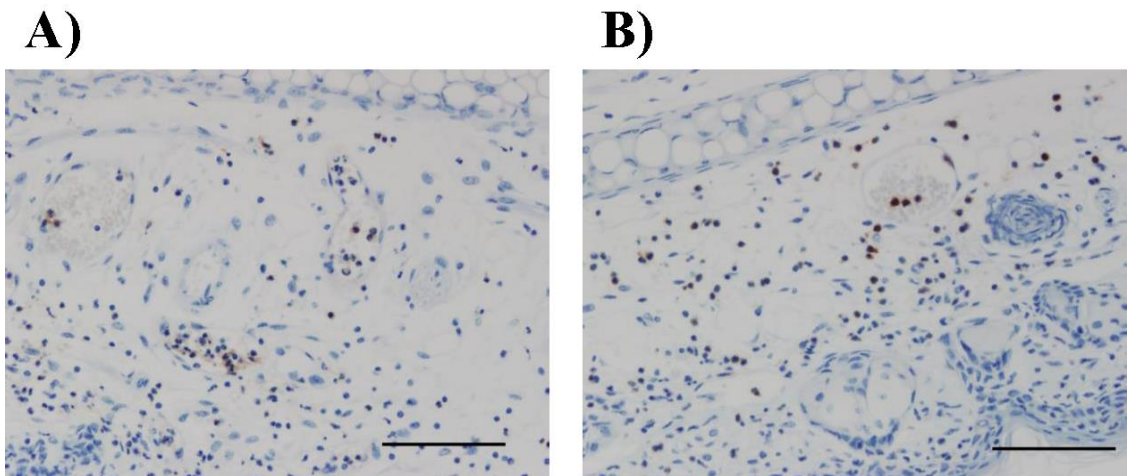


Figure 2-4. Immunohistochemical stained images of DNFb-challenged mouse ears.

Notes: Paraffin-embedded ear tissue sections were prepared as described in the figure legend of Figure 2-3. These sections were immunohistochemically (IHC) stained with an anti-Gr-1 antibody. A) 0.15% DNFb group. B) 0.3% DNFb group. Scale bars, 200 μ m.

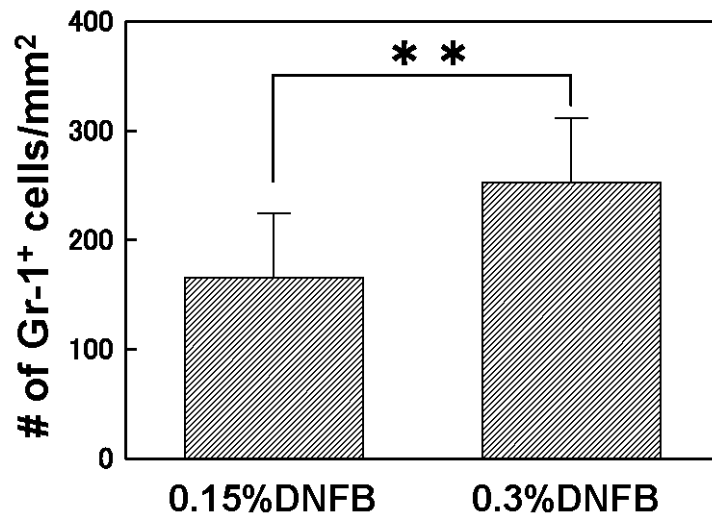


Figure 2-5. The number of Gr-1-positive cells infiltrating into ear tissues.

Notes: The number of Gr-1-positive cells were counted on the immunohistochemical stained images. Each value represents the mean \pm SD of measurements from six mice each. ** $p < 0.01$.

第3章 大豆及び大豆イソフラボンの接触過敏症抑制効果

3.1. 要約

接触過敏症（CHS）動物実験系は、ヒトでのアレルギー性接触皮膚炎のモデル動物実験系として最もよく用いられる。本章では、ジニトロフルオロベンゼン（DNFB）によるCHS動物実験系を用いて、大豆及び大豆イソフラボン（SI）摂取のCHS抑制効果を研究した。実験の結果、DNFBによる耳介の腫れは、大豆摂取群とSI摂取群で抑制された。病理組織学的検討から、大豆及びSI摂取による耳介の腫れの緩和とGr-1陽性細胞の耳介組織への浸潤の抑制が示された。遺伝子発現解析から、大豆摂取したマウスの耳介組織で*Cc124*の遺伝子発現抑制が示された。以上の結果から、大豆及びSIの摂取は、好酸球を動員する*CcL24*の遺伝子発現を抑制することからCHSが緩和されると考えられた。

3.2. 序論

MF（オリエンタル酵母）は、齧歯動物用飼料として広く使われている。MFなどの齧歯動物用飼料には、たんぱく質源として大豆タンパク質が配合されることからSIを含むことが報告されている³⁷⁾。そのため、MFのSI含量が高いことからMFにはCHS抑制効果があるとの仮説を立てた。そこで本章では、MF飼料と市販のSIを用いて大豆とSIのCHS抑制効果を検討した。

3.3. 実験方法

3.3.1. 材料と方法

MF と F2PLD1 は、オリエンタル酵母から購入し、ソヤフラボン HG (以下, HG) は不二製油から提供を受けた。

3.3.2. 試薬

2,4-Dinitrofluorobenzene (以下, DNFB) は、関東化学から購入した。Anti-mouse Ly-6G (Gr-1) 抗体は eBioscience から、Biotin Mouse Anti-rat IgG2b は日本 BD から購入した。

3.3.3. SI 含量

SI 含量の測定は、Kudou らの方法を用いた²⁸⁾。

3.3.4. マウス

6 週齢雌 BALB/c マウスを日本エスエルシーから購入した。マウスには、MF あるいは F2PLD1 と給水瓶で酸性水を自由摂取させた。なお、本動物実験は、川崎医療福祉大学動物実験委員会 (承認番号: 13-011), 及び川崎医科大学動物実験委員会 (承認番号: 15-007) の承認を得て実施した。

3.3.5. 接触過敏症動物実験系

F2PLD1 と酸性水摂取 (ネガティブコントロール (ネガコン) 群, $n = 3$ とポジティブコントロール (ポジコン) 群, $n = 6$), MF と酸性水摂取 (大豆摂取群, $n = 6$), F2PLD1 と 0.1% HG 溶液摂取 (SI 摂取群, $n = 6$) の 4 群に分けて実験を行った。実験スケジュールを Fig. 3-1A に示す。感作は、実験 0 日目と 1 日目に毛を剃った胸部に 0.5% DNFB (アセトン: オリーブ油 (4:1) に溶解) を 50 μL /匹を滴下して行った。チャレンジ

は、実験 5 日目と 12 日目に両耳の背側に 20 μ L の 0.15% DNFB を滴下した。耳介の厚みは、マイクロメータ（ソフトタッチマイクロ CLM, ミットヨ）を使用して測定した。耳介の腫れは、チャレンジ 24 時間後の耳介の厚みからチャレンジ前の耳介の厚みを差し引いて求めた。

3.3.6. 耳介組織の観察

2 回目のチャレンジをおこなった 24 時間後にマウス耳介を採取し、IHC Zinc Fixative（日本 BD）で 24 時間固定をおこなった後にパラフィン包埋切片（3 μ m）を作製した。

組織切片の染色は、ヘマトキシリン・エオジン（HE）と免疫組織化学

（immunohistochemical; IHC）染色を行った。HE 染色をおこなった耳介組織は、10 倍対物レンズを使用して光学顕微鏡で組織観察した。IHC 染色は、ベンタナ XT システム ディスカバリー（ロシュ・ダイアグノスティックス）を使用しておこなった。一次抗体として anti-mouse Ly-6G (Gr-1) 抗体を用い、二次抗体として biotin mouse anti-rat IgG2b を使用した。また、ヘマトキシリンで核の染色をおこなった。IHC 染色した組織切片は、40 倍対物レンズを使用して光学顕微鏡で観察し、210 μ m 四方中の染色された細胞を数え、1 切片につき 5 箇所細胞数の平均を求めた。

3.3.7. 遺伝子発現解析

マウスの耳組織試料は、DNFB で 2 回目のチャレンジをおこなった 24 時間後に採取した。RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit（Qiagen）を使用して、耳組織からトータル RNA を精製した。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析は Filgen に依頼し、GeneChip® Mouse Gene ST Array（アフィメトリクス）を使用して行われた。

3.3.8. 統計分析

結果は、平均値 \pm SEM で示した。統計解析には、Origin 8.5J（OriginLab）を使用して一次元配置分散分析を行い、その後に Tukey 検定でポストホックテストをおこなった。

3.4. 研究結果

3.4.1. SI 含量

SI は, MF に 51.2 mg/100 g (0.0512%) 含まれており, F2PLD1 では検出されなかった。HG には, 54.4%の SI が含まれていた。そのため, マウスに与える HG の濃度は 0.1%で行うこととした。

3.4.2. 大豆と SI 摂取の DNFB によって誘発された耳介の腫れに対する抑制効果

0.5%DNFB で感作したマウスを実験 5 日目と 12 日目に 0.15%DNFB でチャレンジした。2 回目のチャレンジをおこなった 24 時間後の耳介の腫れを評価したところ, ポジコン群と比較して大豆または SI 摂取群で耳介の腫れが有意に抑制された (Fig. 3-1)。

3.4.3. 大豆と SI 摂取の耳介組織の腫れと Gr-1 陽性炎症細胞の浸潤抑制効果

DNFB で 2 回目のチャレンジをおこなった 24 時間後に耳介組織を採取して, 組織切片を作製した。まず, 組織切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) で染色した後に耳介組織の観察をおこなった。ネガコン群の耳介組織と比較すると, ポジコン群では耳介組織の腫れと多くの炎症細胞の浸潤が観察された。また, ポジコン群と比較すると, 大豆と SI 摂取群で耳介組織の腫れに低下が見られた (Fig. 3-2)。

次に, 抗 Gr-1 抗体を用いて耳介組織に浸潤した炎症細胞の IHC 染色を行った (Fig. 3-3A)。IHC 画像で, 青色に染まった部分はヘマトキシリンで染色された核であり, 褐色に染まった細胞は耳介組織に浸潤した炎症細胞と考えられる。耳介組織に浸潤した Gr-1 陽性炎症細胞の数は, コントロール群で 366 ± 40 個/mm², 大豆摂取群で 203 ± 50 個/mm², SI 摂取群で 223 ± 51 個/mm²であった。大豆と SI 摂取群は, コントロール群と比較して耳介組織に浸潤した炎症細胞の数に有意な減少がみられた (Fig. 3-3B)。

3.4.3. CHS マウス耳介組織における大豆摂取による遺伝子発現抑制効果

大豆摂取による CHS の抑制効果のメカニズムを明らかにするために、DNA マイクロアレイを使用して遺伝子発現解析を行った。DNFB で 2 回目のチャレンジをおこなった 24 時間後の耳介組織を試料として、ポジコン群と大豆摂取群のマウスについて調べた。ポジコン群のマウスに対して大豆摂取群のマウスでの遺伝子発現比が 0.5 以下であった遺伝子を Table 3-1 に、抑制されたサイトカイン遺伝子を Table 3-2 にそれぞれ示す。その結果、大豆摂取により好酸球を抑制する *Cc124* 遺伝子が抑制されることが示された。

3.5. 考察

本章では、大豆または SI の摂取により CHS が抑制されることを示した。組織病理学的検討から、大豆と SI の摂取により耳介組織の腫れと浸潤する Gr-1 陽性免疫細胞の数が低下することを示した。これらの結果は、ゲニステイン投与が DHS 反応を抑制する報告と一致している。Verdrengh らは、オキサゾロンにより DHS 反応がゲニステイン投与マウスで抑制されることを示した。ゲニステイン投与は、オキサゾロン特異的 IgG の産生も抑制した²⁵⁾。他の報告として、Yellayi はゲニステインが 4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニルアセチルスクシンイミドによる DHS 反応を抑えることを卵巣切除したマウスで示した。8-80mg/kg のゲニステインを投与したマウスで、DHS 反応が 46-67%減少した。病理組織学的検査から、ゲニステインを投与したマウスで、炎症部位に浸潤した炎症細胞数が低下し、リンパ節の CD4 と CD8 陽性 T 細胞が減少した。ゲニステインの作用は、エストロゲン受容体 (ER) と非 ER の両方の経路によるものであった²⁶⁾。本章の研究では、ゲニステインでなく SI 混合物を使用した。また、大豆はサポニン、ステロール、リグナンといったいくつかの他の植物化学物質を含有している⁴⁸⁾。今後、SI の異性体と他の大豆の植物化学物質について研究を行う必要がある。

大豆と SI 摂取による免疫制御効果におけるメカニズムには、サイトカインやケモカインの制御が関与していると考えられる。本章では、DNA マイクロアレイ解析から大豆摂取マウスはポジコンマウスに比較して、耳介組織における *Ccl24*, *Xcl1*, *Ifng* と *Ccl17* の遺伝子発現が低下することを示した。本研究と同様の実験系において、CCL24 の mRNA とタンパク質の発現が大豆と SI 摂取群において抑制されたことが示されている。

CCL24 (eotaxin-2) は、CC ケモカイン族に属しているサイトカインのひとつである。CCL24 はケモカイン受容体 CCR3 と相互作用して好中球のケモタキシスを誘導する⁴⁹⁾。アレルギー性反応によるマウスの肺における好酸球の増加は、CCL11 (eotaxin) と CCL24 によって抑制されているが、CCL24 は主要な役割を果たしている^{50,51)}。一方、BALB/c マウスでトリニトロクロロベンゼンによって誘発された CHS について、33 のケモカイン

遺伝子について発現が調べられた。その結果、11 遺伝子の発現が確認されたが、*Cc111* と *Cc124* の発現は確認されなかった⁵²⁾。しかしながら、本章の研究では、DNA マイクロアレイ解析において CHS の惹起による耳介組織での *Cc124* 遺伝子発現が示された。従って、CHS における CCL24 の役割は、アレルギー性喘息のモデルマウス実験系と比べて不明な点が多いことからさらに研究の必要がある。

好酸球はアレルギー性の炎症において重要な細胞である⁵³⁾。本研究において、大豆と SI を摂取したマウスで Gr-1 陽性炎症細胞の耳介組織への浸潤が減少した。先行研究において、SI とゲニステイン投与はオバルブミンによって誘発された気道過敏症 (AHR) を低減すること、好酸球の浸潤が減少することが示された²⁹⁾。また、AHR 抑制効果は、100 mg/kg での SI と 30 mg/kg でのゲニステインで同等の結果が示されたことから、主にゲニステインの効果であることが示唆された。さらに、SI とゲニステインは *Cc111* 遺伝子の発現抑制を示した。他の研究では、ゲニステインはリポキシゲナーゼ活性化を抑制することによってアレルギー性喘息を低減したことを報告している³⁰⁾。

市販齧歯動物用飼料のほとんどは、大豆たんぱく質がタンパク質源として配合されている理由から、SI の含量 (平均 39.4 mg~82.9 mg/100g) が高いことが報告されている⁵⁴⁾。本章の研究において、大豆が配合されている MF と大豆が配合されていない F2PLD1 の 2 つの市販飼料を使用した。MF には、大豆たんぱく質が配合されており、最も広く使われている飼料のひとつである。SI の測定をおこなったところ、MF では 51.2mg/100g の SI が検出され、F2PLD1 では検出されなかった。本章の研究において、マウスの一日平均飼料摂取量は 1.9g/匹であった。従って、0.97mg の SI が MF の摂取により毎日消費されたことから、マウスの SI 摂取量はおよそ 49 mg SI/kg 体重/日と推定される。アジア地域の成人で、SI 摂取量は 30~40 mg/日と報告されている⁵⁵⁾。このヒトでの SI 摂取量と比較すると、本章の研究で得られたマウスでの SI 摂取量はヒトで 120 L の豆乳に含まれる SI 量に相当することから、非常に多いと考えられる。しかしながら、本章では MF が CHS を抑制したことから、大豆に CHS 抑制効果があることを示した。また、大豆の成分のひとつである SI が主に CHS 抑制しており、*Cc124* 遺伝子を抑制すること

が明らかとなった。これらの結果は、SI 摂取により ACD が抑制される可能性を示している。今後、低用量での SI の効果とヒトでの ACD 抑制効果を研究する必要がある。

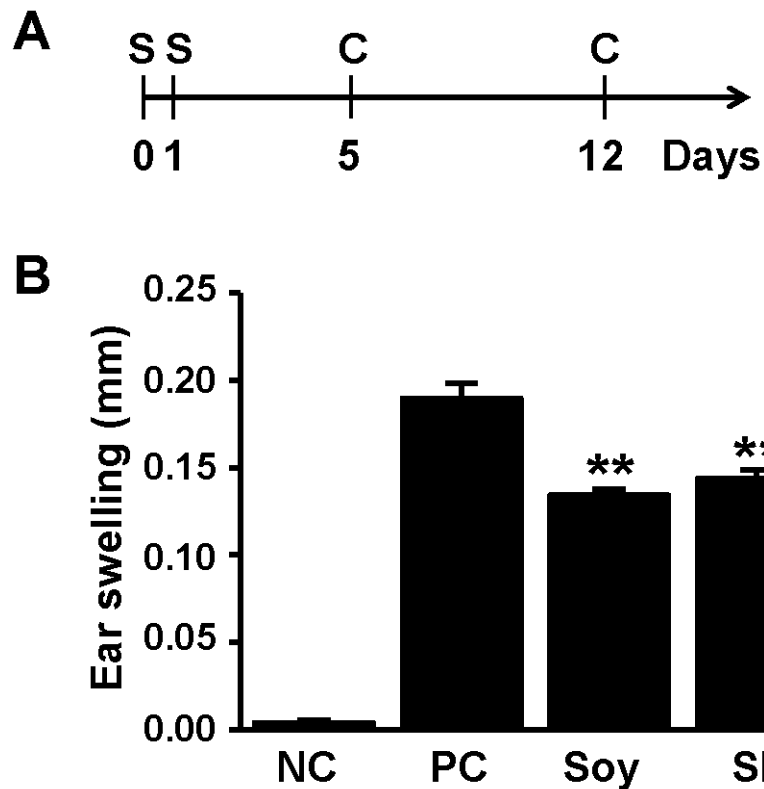


Figure 3-1. Feeding mice with soybean and SI attenuates ear swelling due to contact allergy.

Notes: BALB/c mice were fed either MF/acidified-water (soy-treated group, n = 6), F2PLD1/0.1% Soyaflavone HG (soy isoflavone-(SI)-treated group, n = 6), or F2PLD1/acidified-water (negative control group, n = 3, and positive control group, n = 6). Mice in each group were sensitized (S) with 0.5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), and were challenged (C) with 0.15% DNFB. The negative control mice were sensitized and challenged with vehicles. Ear thickness was measured using a micrometer and ear swelling was calculated as the difference in ear thickness before and after the challenge. A) Experimental protocol. B) Ear swelling 24 h after the second DNFB-challenge. NC, negative control group; PC, positive control group; Soy, soy-treated group; SI, SI-treated group. Each value represents the mean \pm SEM. Data are representative of three independent experiments with similar results. ** $p < 0.01$ vs. the positive control.

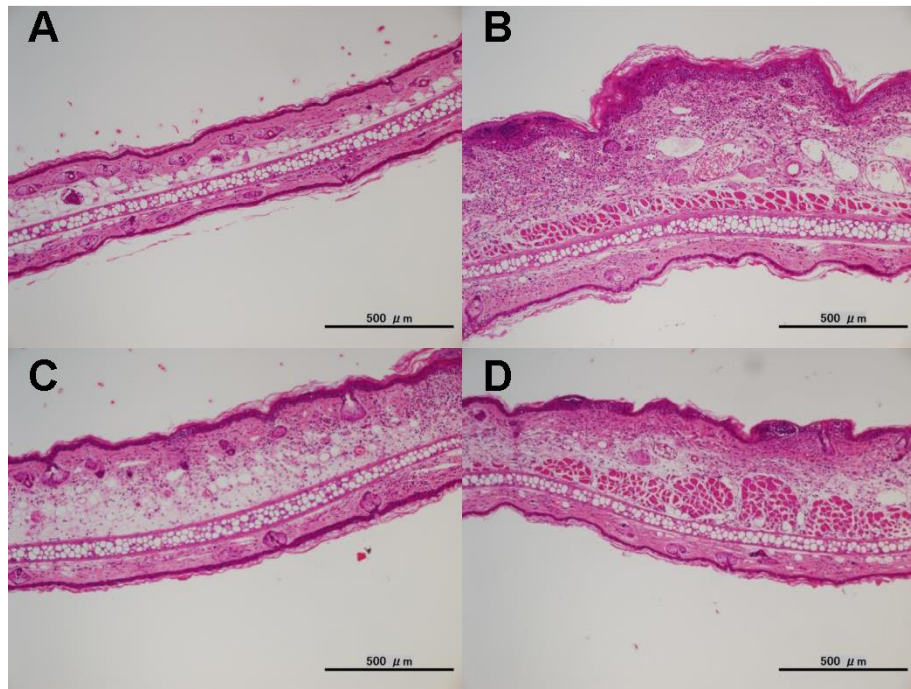


Figure 3-2. Histopathological images of DNFB-challenged mouse ears.

Notes: Mice were sensitized and challenged as described in Fig. 3-1. Ear tissues were collected 24 h after the second challenge and fixed with zinc for 24 h. Paraffin-embedded ear tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. A) Negative control. B) Positive control. C) Soy-treated. D) Soy isoflavone-(SI)-treated. Scale bars, 500 μm .

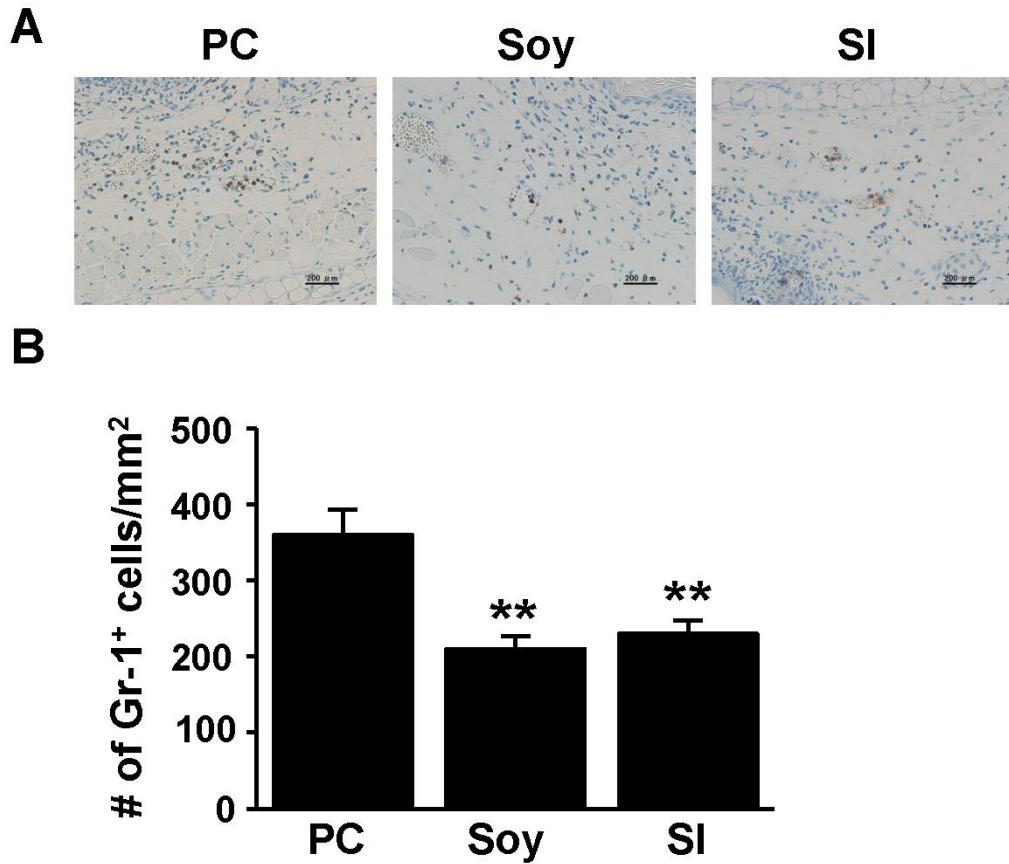


Figure 3-3. Feeding mice with soybean and SI inhibits the infiltration of myeloid immune cells.

Notes: Paraffin-embedded ear tissue sections were prepared as described in the figure legend of Figure 3-2. These sections were immunohistochemically (IHC) stained with an anti-Gr-1 antibody. A) IHC-stained ear tissue images. PC, positive control; Soy, soy-treated; SI, soy isoflavone-(SI)-treated. Gr-1-positive cells were stained dark-brown and cell nuclei were stained blue with hematoxylin. Scale bars, 200 µm. B) The number of Gr-1-positive cells infiltrating into ear tissues. PC, positive control group; Soy, soy-treated group; SI, SI-treated group. Each value represents the mean \pm SEM of measurements from six mice each. Data are representative of two independent experiments with similar results. ** $p < 0.01$ vs. the positive control.

Table 3-1. Down-regulated genes in the soy-treated mouse compared with the positive control determined by DNA microarray.

Gene description	Gene symbol	Ratio
synaptic nuclear envelope 1	<i>Syne1</i>	0.36
glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya)	<i>Ear1</i>	0.44
fetuin beta	<i>Col23a1</i>	0.45
prolactin family 2, subfamily c, member 2	<i>Gsta1</i>	0.48
keratin associated protein 22-2	<i>Fetub</i>	0.48
RIKEN cDNA 1110025L11 gene	<i>Prl2c2</i>	0.49

Table 3-2. Cytokine genes downregulated in the soy-treated mouse compared with the positive control as determined by DNA microarray analysis.

Cytokine	Gene symbol	Ratio
Chemokine (C-C motif) ligand 24	<i>Ccl24</i>	0.59
Chemokine (C motif) ligand 1	<i>Xcl1</i>	0.68
Interferon- γ	<i>Ifng</i>	0.70
Chemokine (C-C motif) ligand 17	<i>Ccl17</i>	0.71

第4章 ザクロポリフェノール濃縮物の接触過敏症抑制効果

4.1. 要約

マウスを用いた CHS 動物実験系を使用して、ザクロポリフェノール濃縮物 (pomegranate polyphenol concentration; PPC) 摂取の CHS 抑制効果を研究した。DNFB による耳介の腫れは、0.01%PPC と 0.2%PPC 摂取群で抑制された。組織病理学的検査から、耳介組織の腫れは軽減され、浸潤した Gr-1 陽性細胞の数が低下した。遺伝子発現解析の結果、耳介組織において *Cxc13* と *Cxc12* の遺伝子発現がポジコン群と比べて 0.2%PPC 摂取マウスで抑制された。以上の結果から、PPC の摂取により、好中球を動員する *Cxc13* と *Cxc12* 遺伝子が抑制されることから、CHS が抑制されると考えられた。

4.2. 諸言

先のマウスを用いた CHS 動物実験系を用いた研究において、0.2%PPC 摂取群で CHS 抑制効果が示された。給水瓶でマウスに PPC 溶液を自由摂取させると、一日平均摂水量は 4~5g/匹である。従って、0.2%PPC 摂取群のマウスでは 1 日に 5~6mg のポリフェノールが消費され、およそ 280 mg/kg 体重/日のポリフェノールを摂取したと推定される。

一方、ザクロジュースのポリフェノールの含量は 0.2%~1.0%であることから、コップ 1 杯 (200 mL) のザクロジュースには 0.4~2.0g のポリフェノールが含まれることになる。以上のことから、0.2%PPC 摂取群のマウスが摂取したと推定されるポリフェノール量は食事の量としては多いことが考えられる。

そこで本章では、0.01%PPC と 0.2%PPC 摂取群で CHS 抑制効果を研究した。さらに、PPC の CHS 抑制メカニズムを明らかにするために、耳介組織における遺伝子発現について検討した。

4.3. 実験方法

4.3.1. 材料

市販のザクロジュース 3 倍濃縮物から、クロマトグラフィーを用いてポリフェノール濃縮物 (PPC) を得た。没食子酸エチルを基準物質としてポリフェノール量をフォリン-デニス法で測定したところ、PPC に含まれているポリフェノール量は 59.5%であった。

4.3.2. マウス

6 週齢雌 BALB/c マウスを日本エスエルシーから購入した。マウスには、F2PLD1 (オリエンタル酵母) と酸性水を自由摂取させた。なお、本動物実験は、川崎医療福祉大学動物実験委員会 (承認番号: 13-011), 及び川崎医科大学動物実験委員会 (承認番号: 14-019) の承認を得て実施した。

4.3.3. 接触過敏症モデル動物実験系

酸性水摂取 (ネガティブコントロール (ネガコン), $n = 3$ とポジティブコントロール (ポジコン), $n = 6$), 0.01%PPC 摂取群 ($n = 6$), 0.2%PPC 摂取群 ($n = 6$) の 4 群に分けて実験を行った。実験スケジュールを Fig. 4-1 に示す。感作は、実験 0 日目と 1 日目に毛を剃った胸部に 0.5% DNFB (アセトン: オリーブ油 (4:1) に溶解) を 50 μL / 匹を滴下して行った。チャレンジは、実験 5 日目と 12 日目に両耳の背側に 20 μL の 0.15% DNFB を滴下した。耳介の厚みは、マイクロメータ (ソフトタッチマイクロ CLM, ミツトヨ) を使用して測定した。耳介の腫れは、チャレンジ 24 時間後の耳介の厚みからチャレンジ前の耳介の厚みを差し引いて求めた。

4.3.4. 耳介の組織観察方法

2 回目のチャレンジをおこなった 24 時間後にマウス耳介を採取し、IHC Zinc Fixative (日本 BD) で 24 時間固定をおこなった後にパラフィン包埋切片 (3 μm) を作製した。

組織切片の染色は、ヘマトキシリン・エオジン (HE) と免疫組織化学

(immunohistochemical; IHC) 染色を行った。HE 染色した耳介組織は、10 倍対物レンズを使用して光学顕微鏡で組織観察した。IHC 染色は、ベンタナ XT システム ディスカバリー (ロシュ・ダイアグノスティックス) を使用して行った。一次抗体として anti-mouse Ly-6G (Gr-1) (eBioscience) を用い、二次抗体として biotin mouse anti-rat IgG2b (日本 BD) を使用した。また、ヘマトキシリンで核の染色をおこなった。IHC 染色した組織切片は、40 倍対物レンズを使用して光学顕微鏡で観察し、210 μ m 四方中の染色された細胞を数えた。細胞数の測定は、1 切片につき 5 箇所行った。

4.3.7. 遺伝子発現解析方法

マウスの耳組織試料は、DNFB で 2 回目のチャレンジをおこなった 24 時間後に採取した。RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) を使用して、耳組織からトータル RNA を精製した。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析は Filgen に依頼し、**GeneChip® Mouse Gene ST Array** (アフィメトリクス) を使用して行われた。

4.3.8. 統計分析方法

結果は、平均値 \pm SEM で示した。統計解析には、Origin 8.5J (OriginLab) を使用して一次元配置分散分析を行い、その後に Tukey 検定でポストホックテストをおこなった。

4. 4. 研究結果

4. 4. 1. PPC 摂取による耳介の腫れに対する抑制効果

DNFB で誘導される耳介の腫れに対する PPC 摂取の抑制効果を検討した。0.5%DNFB で感作したマウスを、実験 5 日と 12 日に 0.15%DNFB でチャレンジした。2 回目のチャレンジをおこなった 24 時間後の耳介の腫れは、ポジコン群 (0.206 ± 0.007 mm) と比較して 0.01%PPC (0.153 ± 0.011 mm) と 0.2%PPC 摂取群 (0.136 ± 0.005 mm) で有意に抑制された ($p < 0.01$, Fig. 4-1)。すなわち、ポジコン群と比較して、耳介の腫れは 0.01%PPC 摂取群で 25.7%, 0.2%PPC 摂取群で 34.0%抑制されることが示された。

4. 4. 1. PPC 摂取による耳介組織の腫れと Gr-1 陽性炎症細胞の浸潤抑制効果

DNFB で 2 回目のチャレンジをおこなった 24 時間後に耳介試料を採取して、耳組織の組織病理学的観察をおこなった。まず、HE 染色した耳介組織の観察をおこなった。ネガコン群の耳介組織と比較すると、ポジコン群では耳介組織の腫れと多くの炎症細胞の浸潤が観察された。また、ポジコン群と比較すると、0.01%PPC と 0.2%PPC 摂取群で耳介組織の腫れに低下が見られた (Fig. 4-2)。

次に、抗 Gr-1 抗体を用いて耳介組織に浸潤した炎症細胞の IHC 染色を行った (Fig. 4-3A)。IHC 画像で、青色に染まった部分はヘマトキシリンで染色された核であり、褐色に染まった細胞は耳介組織に浸潤した炎症細胞と考えられる。Figure 4-3B に、IHC 染色された Gr-1 陽性炎症細胞数を示した。耳介組織に浸潤した炎症細胞の数は、ポジコン群で 346 ± 25 細胞/mm², 0.01%PPC 群で 253 ± 21 細胞/mm², 0.2%PPC 群で 221 ± 26 細胞/mm²であった。ポジコン群と比較して 0.01%PPC 群と 0.2%PPC 群では、耳介組織に浸潤した炎症細胞の数が有意に低下していた ($p < 0.01$)。

4. 4. 2. PPC 摂取の耳介組織での遺伝子発現に対する効果

PPC 摂取における CHS 抑制効果のメカニズムを明らかにするために、耳介組織中の遺

伝子発現解析をおこなった。2回目のチャレンジをおこなった24時間後にポジコン群と0.2%PPC摂取マウスの耳介を採取して、DNAマイクロアレイを使用して耳介組織中の遺伝子発現解析をおこなった。発現比が0.5以下であった遺伝子をTable 4-1に示し、抑制されたサイトカイン遺伝子をTable 4-2に示した。遺伝子発現解析の結果、PPC摂取により好中球を動員するケモカインである*Cxcl3*と*Cxcl2*の遺伝子が抑制されることが示された。

4.5. 考察

本章では、0.01%PPC 摂取群で CHS が抑制されることを示した。0.01%PPC 摂取群が摂取したザクロポリフェノール量は、ヒトでコップ 1 杯のザクロジュースに含まれる量に相当する。さらに、PPC 摂取は耳介組織の腫れと好中球やマクロファージなどの Gr-1 陽性炎症細胞の浸潤を低下させた。

PPC 摂取による CHS 抑制効果のメカニズムには、サイトカインやケモカインの制御が関与していると考えられる。本章では、DNA マイクロアレイ解析から 0.2%PPC 摂取マウスはポジコンマウスと比較して、耳介組織において好中球を動員する *Cxcl13* と *Cxcl12* の遺伝子発現が低下することを示した。リアルタイム PCR を使用した研究において、*Cxcl13* と *Cxcl12* の遺伝子がポジコンと比較して 0.01%と 0.2%PPC 摂取群で有意に低下していた（長野ら、未発表データ）。CXC ケモカインリガンド 2/3 (CXCL2/3) は、CXC ケモカインに属するケモカインであり、CXC ケモカイン受容体 2 (CXCR2) と相互作用をして好中球の遊走を誘導する⁵⁶⁾。

好中球の炎症部位への浸潤は、CHS の炎症の増悪に重要とされている⁵⁷⁾。それ故、CXCL1, CXCL2, CXCL3 などの好中球を動員するケモカインを制御することは、CHS の抑制につながる。Biedermann らは、TNCB 誘導 CHS を解析することで好中球の炎症部位への浸潤は TNF- α と CXCL2 による共同作用であることを発見した。すなわち、好中球の炎症部位への浸潤は、抗 CXCL2 抗体を用いることで 60%以上減少すること、肥満細胞欠失マウスで 80%以上減少した⁵⁸⁾。また、FITC による耳介の腫れは、抗 CXCL1 抗体と抗 CXCL2 抗体を用いること、肥満細胞欠失マウスで抑制されることが報告されている⁵⁹⁾。一方、CXCL1, CXCL2, CXCL3 のレセプターである CXCR2 を欠失するノックアウトマウスで、皮膚への好中球の浸潤が抑制された⁶⁰⁾。さらに、EP3 は、4 種類あるプロスタグランジン E₂ のレセプターのひとつである。EP3 特異的アンタゴニストは、*Cxcl11* と *Cxcl12* の遺伝子発現を抑制することで CHS を抑制することが示されている⁶¹⁾。

本章の研究において、PPC 摂取マウスでは Gr-1 陽性炎症細胞の耳介組織への浸潤を

低下させることを示した。また、遺伝子発現解析から好中球を動員する CXCL2/3 の遺伝子発現を抑制することを示した。従って、PPC 摂取により耳介組織での CXCL2/3 の発現が抑制されることから、CHS が抑制されるものと考えられた。さらに、ヒトでコップ 1 杯分のザクロジュースに含まれるポリフェノール量で CHS 効果が示された。それ故、本章の研究から、食生活にザクロジュースを取り入れることによりアレルギー性接触皮膚炎の緩和と予防効果が期待される。

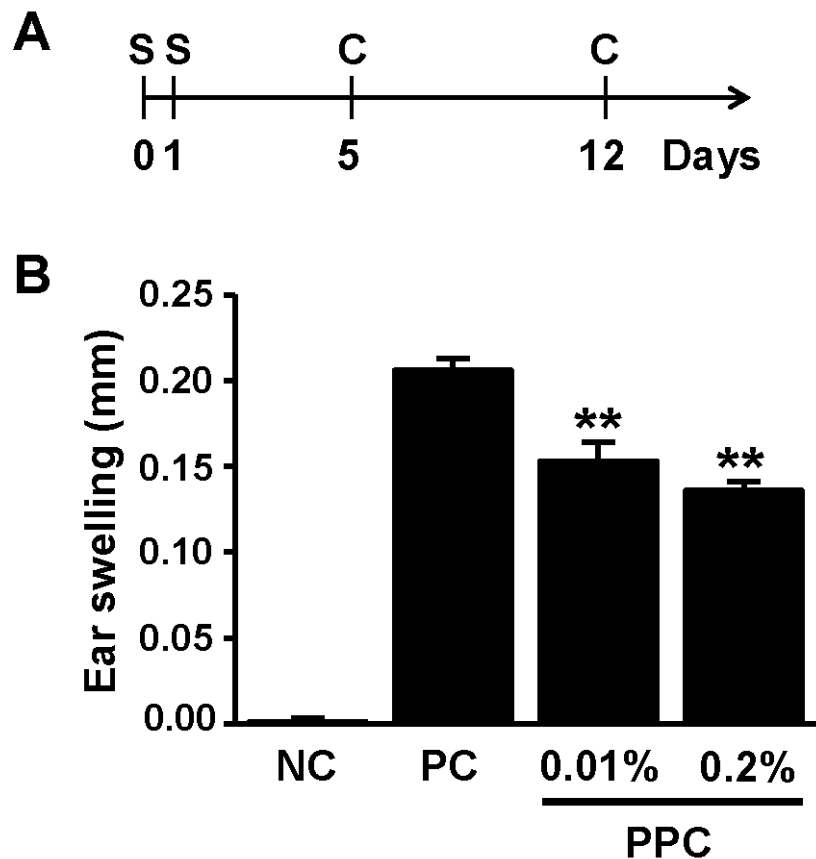


Figure 4-1. Feeding mice with 0.01% and 0.2% PPC attenuates ear swelling due to contact allergy.

Notes: The mice were divided into four groups, which were fed either 0.2% PPC (0.2% PPC-treated group, n = 6), 0.01% PPC (0.01% PPC-treated group, n = 6) or acidified-water (negative control group, n = 3, and positive control group, n = 6). Mice in each group were sensitized (S) with 0.5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), and were challenged (C) with 0.15% DNFB. The negative control mice were sensitized and challenged with vehicles. Ear thickness was measured using a micrometer and ear swelling was calculated as the difference in ear thickness before and after the challenge. A) Experimental protocol. B) Ear swelling 24 h after the second DNFB-challenge. NC, negative control group; PC, positive control group; 0.01% PPC, 0.01% PPC-treated group; 0.2% PPC, 0.2% PPC-treated group. Each value represents the mean \pm SEM. Data are representative of three independent experiments with similar results. ** $p < 0.01$ vs. the positive control.

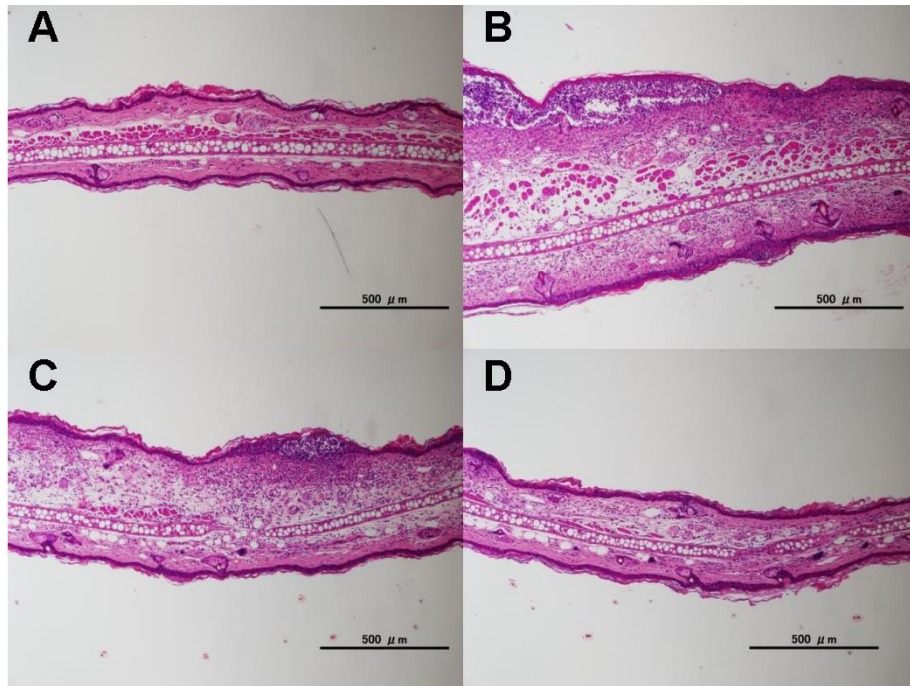


Figure 4-2. Histopathological images of DNFb-challenged mouse ears.

Notes: Mice were sensitized and challenged as described in Fig. 1. Ear tissues were collected 24 h after the second challenge and fixed with zinc for 24 h. Paraffin-embedded ear tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. A) Negative control. B) Positive control. C) 0.01% PPC-treated. D) 0.2% PPC-treated. Scale bars, 500 μm .

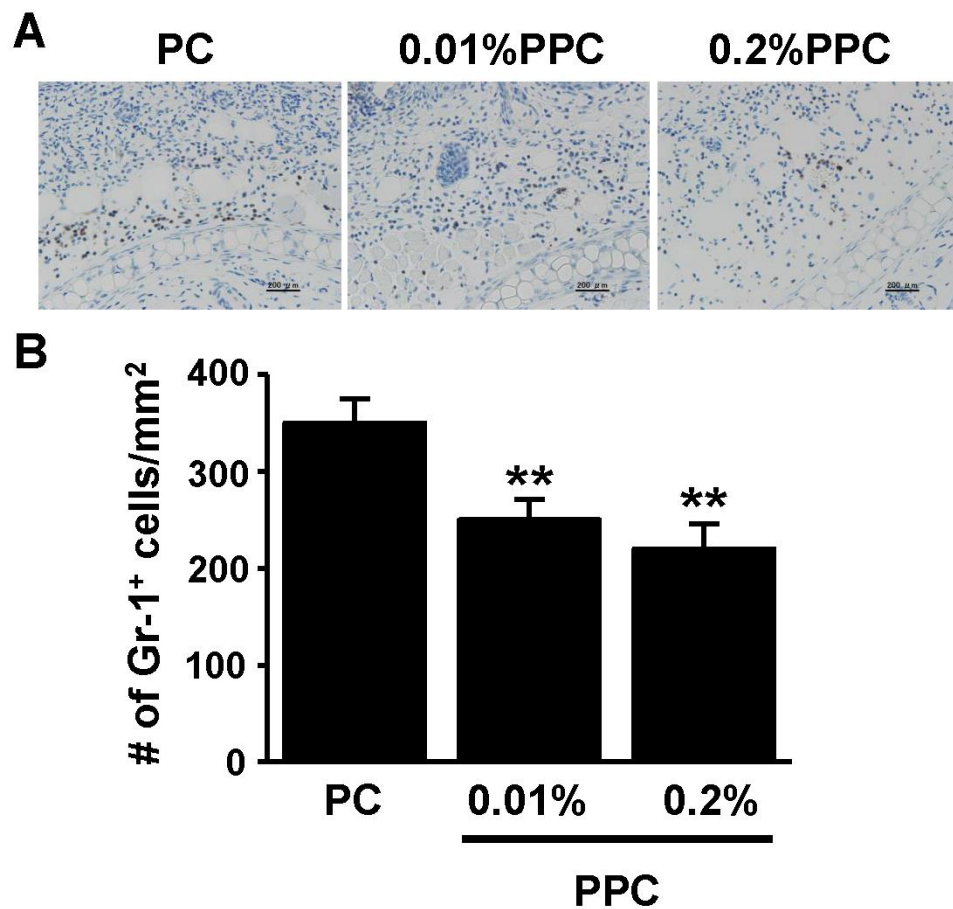


Figure 4-3. Feeding mice with 0.01% and 0.2% PPC inhibits the infiltration of myeloid immune cells.

Notes: Paraffin-embedded ear tissue sections were prepared as described in the figure legend of Fig. 2. These sections were immunohistochemically (IHC) stained with an anti-Gr-1 antibody. A) IHC-stained ear tissue images. PC, positive control; 0.01% PPC, 0.01% PPC-treated; 0.2% PPC, 0.2% PPC-treated. Gr-1-positive cells were stained dark-brown and cell nuclei were stained blue with hematoxylin. Scale bars, 200 μ m. B) The number of Gr-1-positive cells infiltrating into ear tissues. PC, positive control group; 0.01% PPC, 0.01% PPC-treated group; 0.2% PPC, 0.2% PPC-treated group. Each value represents the mean \pm SEM of measurements from six mice each. Data are representative of two independent experiments with similar results. ** $p < 0.01$ vs. the positive control.

Table 4-1. Genes downregulated in the 0.2% PPC-treated mouse compared with the positive control as determined by DNA microarray analysis.

	Gene symbol	Ratio
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	<i>Cxcl3</i>	0.37
Keratin 1	<i>Krt1</i>	0.42
Synaptic nuclear envelope 1	<i>Syne1</i>	0.46
Filaggrin	<i>Flg</i>	0.48

Table 4-2. Cytokine genes downregulated in the 0.2% PPC-treated mouse compared with the positive control as determined by DNA microarray analysis.

Cytokine	Gene symbol	Ratio
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	<i>Cxcl3</i>	0.37
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	<i>Cxcl2</i>	0.57
Interleukin 1 family, member 5 (delta)	<i>Il1f5</i>	0.58
Chemokine (C-C motif) ligand 3	<i>Ccl3</i>	0.67
Interferon gamma	<i>Ifng</i>	0.70
Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>	0.71

謝辞

本研究の終わりに臨み、医療福祉大学の臨床栄養全般についての貴重な知識のご教授と、研究行うあたり研究方針及び実験方法等、川崎医療福祉大学医療技術研究科山田 作夫教授、宮田 富弘教授、長野 隆男教授に衷心より感謝の意を表します。

また、後輩の皆様に心より感謝いたします。

引用文献

- [1] 矢上晶子, 松永佳世子: 接触皮膚炎. 西間三馨, 秋山一男, 太田健編, アレルギー総合ガイドライン 2013, 初版, 協和企画, 東京, 358–367, 2013.
- [2] Kaplan DH, Igyarto BZ, Gaspari AA: Early immune events in induction of allergic contact dermatitis. *Nature Reviews Immunology*, **12**, 114–124, 2012.
- [3] Peiser M, Tralau T, Heidler J, Api AM, Arts JHE, Basketter DA, English J, Diepgen TL, Fuhlbrigge RC, Gaspari AA, Johansen JD, Karlberg AT, Kimber I, Lepoittevin JP, Liebsch M, Maibach HI, Martin SF, Merk HF, Platzek T, Rustemeyer T, Schnuch A, Vandebriel RJ, White IR, Luch A: Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **69**, 763–781, 2012.
- [4] Vocanson M, Hennino A, Rozières A: Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*, **64** (12), 1699–1714, 2009.
- [5] Inagaki N and Nagai H: Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment: mouse models for the development of remedies for human allergic dermatitis. *Journal of Pharmacological Sciences*, **110**, 251–259, 2009.
- [6] Honda T, Egawa G, Grabbe S and Kabashima K: Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: Toward the understanding of allergic contact dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, **133**, 303–315, 2013.
- [7] Bhol KC and Schechter PJ: Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *British Journal of Dermatology*, **152** (6), 1235–1242, 2005.
- [8] Yuan XY, Liu W, Zhang P, Wang RY and Guo JY: Effects and mechanisms of aloperine on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced allergic contact dermatitis

- inBALB/c mice. *European Journal of Pharmacology*, **629**(1–3), 147–152, 2010.
- [9] Ishida T, Nishiumi S, Tanahashi T, Yamasaki A, Yamazaki A, Akashi T: Linoleoyl ethanolamide reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages and ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact dermatitis in mice. *European Journal of Pharmacology*. **699**, 6–13, 2013.
- [10] Karsak M, Gaffal E, Date R, Wang-Eckhardt L, Rehnelt J, Petrosino S, Starowicz K, Steuder R, Schlicker E, Cravatt B, Mechoulam R, Buettner R, Werner S, Marzo VD, Tüting T, Zimmer A: Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science*, **316**, 1494–1497, 2007.
- [11] Gaffal E, Cron M, Glodde N, Tüting T: Anti-inflammatory activity of topical THC in DNFB-mediated mouse allergic contact dermatitis independent of CB1 and CB2 receptors. *Allergy*, **68**(8), 994–1000, 2003.
- [12] Duan J, Sugawara T, Sakai S, Aida K and Hirata T: Oral glucosylceramide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene induced inflammatory response in mice by reducing TNF- α levels and leukocyte infiltration. *Lipids*, **46** (6), 505–512, 2011.
- [13] Sakai S, Sugawara T and Hirata T: Inhibitory effect of dietary carotenoids on dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**(5), 1013–1015, 2011.
- [14] Setchell KDR, Cassidy A: Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *The Journal of Nutrition*, **129**, 758S–767S, 1999.
- [15] Messina M: Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, **100**, 423S–430S, 2014.
- [16] Nagata C, Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Tamakoshi A, Matsuo K, Wakai K, Tsugane S, and Sasazuki S: Soy intake and breast cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese

- population. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, **44**, 282–295, 2014.
- [17] Li SH, Liu XX, Bai YY, Wang XJ: Effect of oral isoflavone supplementation on vascular endothelial function in postmenopausal women: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **91**, 480–486, 2010.
- [18] Alekel DL, Van Loan MD, Koehler KJ, Hanson LN, Stewart JW, Hanson KB, Kurzer MS, Peterson CT: The soy isoflavones for reducing bone loss (SARBL) study: a 3-y randomized controlled trial in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **91**, 218–230, 2010.
- [19] Taku K, Melby MK, Kronenberg F, Kurzer MS, and Messina M: Extracted or synthesized soybean isoflavones reduce menopausal hot flash frequency and severity: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Menopause*, **19**, 776–790, 2010.
- [20] Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M: Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *The Journal of Nutrition*, **130**, 1695–1699, 2000.
- [21] Murphy PA, Barua K, Hauck CC: Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. *Journal of Chromatography B*, **777**(1-2), 129–138, 2002.
- [22] Masilamani M, Wei J, Sampson HA: Regulation of the immune response by soybean isoflavones. *Immunologic Research*, **54**, 95–110, 2012.
- [23] Sakai T, Kogiso M: Soy isoflavones and immunity. *The Journal of Medical Investigation*, **55**, 167–173, 2008.
- [24] Cooke PS, Selvaraj V, Yellayi S: Genistein, estrogen receptors, and the acquired immune response. *The Journal of Nutrition*, **136**, 704–708, 2006.
- [25] Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R, Tarkowski A: Genistein as an

- anti-inflammatory agent. *Inflammation Research*, **52**, 341–346, 2003.
- [26] Yellayi S, and Zakroczymski MA: The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice. *Journal of Endocrinology*, **176**, 267–274, 2003.
- [27] Miyake Y, Sasaki S, Ohya Y, and Miyamoto S: Soy, isoflavones, and prevalence of allergic rhinitis in Japanese women: The Osaka Maternal and Child health Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **115**(6), 1176–1183, 2005.
- [28] Hirayama F, Lee AH, Binns CW, Hiramatsu N, Mori M, Nishimura K: Dietary intake of isoflavones and polyunsaturated fatty acids associated with lung function, breathlessness and the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease: possible protective effect of traditional Japanese diet. *Molecular Nutrition and Food Research*, **54**(7), 909–917, 2010.
- [29] Bao ZS, Hong L, Guan Y, Dong XW: Inhibition of airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling by soy isoflavone in a murine model of allergic asthma. *International Immunopharmacology*, **11** (8), 899–906, 2011.
- [30] Kalhan R, Smith LJ, Nlend MC, Nair A, Hixon JL, Sporn, PHS: A mechanism of benefit of soy genistein in asthma: inhibition of eosinophil p38-dependent leukotriene synthesis. *Clinical Experimental Allergy*, **38** (1), 103–112, 2007.
- [31] Kogiso M, Sakai T, Mitsuya K, Komatsu T, and Yamamoto S: Genistein suppresses antigen-specific immune responses through competition with 17 β -estradiol for estrogen receptors in ovalbumin-immunized BALB/c mice. *Nutrition*, **22**, 802–809, 2006.
- [32] Zhang T, Pan W, Takebe M, Schofield B, Sampson H, Li XM: Therapeutic effects of a fermented soy product on peanut hypersensitivity is associated with modulation of T-helper type 1 and T-helper type 2 responses. *Clinical Experimental Allergy*, **38** (11), 1808–1818, 2008.

- [33] Morimoto M, Watanabe T, Yamori M, Takebe M, Wakatsuk Y: Isoflavones regulate innate immunity and inhibit experimental colitis. *Journal of Gastroenterology*, **24**, 1123–1129, 2009.
- [34] Aviram M, and Rosenblat M: Pomegranate protection against cardiovascular diseases. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: Article ID 382763.
- [35] Faria A, Conceicao C: The bioactivity of pomegranate: impact on health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **51**, 626–634, 2011.
- [36] Ghosh D, Scheepens A: Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research*, **53**, 322–331. 2009.
- [37] Cerdá B, Espín JC, Parra S, Martínez P, Tomás-Barberán FA: The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolized into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *European Journal of Nutrition*, **43**, 205–220, 2004.
- [38] Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D: Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *Journal of Nutrition*, **136**, 2481–2485, 2006.
- [39] Susanne U, and Mertens A: Absorption, metabolism, and antioxidant effects pomegranate polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54 (23)**, 8956-8961, 2006.
- [40] Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf L: Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum L.*) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 8956–8961,

2006.

- [41] González-Sarrías A, Giménez-Bastida JA: Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. *Molecular Nutrition and Food Research*, **54**, 311–322, 2010.
- [42] Espín JC, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA: Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, **15**, 2013.
- [43] Heber D: Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Letters*, **269** (2-8), 262–268, 2008.
- [44] Larrosa M, García-Conesa MT: Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**(6), 513–539, 2010.
- [45] Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, **44**, 1150–1160, 2011.
- [46] Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T: Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds. *Agricultural and Biological Chemistry*, **55**, 2227–2233, 1991.
- [47] Nagano T, Wu W, Kazunobu Tsumura K, Yonemoto-Yano H, Kamada T, Haruma K: The inhibitory effect of soybean and soybean isoflavone diets on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press.
- [48] Kang J, Badger TM, Ronis MJJ, Wu X: Non-isoflavone phytochemicals in soy and their health effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(14), 8119–8133, 2010.

- [49] Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS: Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **119** (6), 1303–1310, 2007.
- [50] Ochkur SI, Jacobsen EA, Protheroe CA, Biechele TL, Pero RS, McGarry MP: Coexpression of IL-5 and Eotaxin-2 in Mice Creates an Eosinophil-Dependent Model of Characteristics of Severe Asthma Coexpression of IL-5 and eotaxin-2 in mice creates an eosinophil-dependent model of respiratory inflammation with characteristics of severe asthma. *The Journal of Immunology*, **178**, 7879–7889, 2007.
- [51] Zimmermann N, Hogan SP, Mishra A, Brandt EB, Bodette TR, Pope SM, Finkelman FD, Rothenberg ME: Murine eotaxin-2: a constitutive eosinophil chemokine induced by allergen challenge and IL-4 overexpression. *The Journal of Immunology*, **165**, 5839–5846, 2000.
- [52] Mitsui G, Mitsui K, Hirano T, Ohara O, Kato M, Niwano Y: Kinetic profiles of sequential gene expressions for chemokines in mice with contact hypersensitivity. *Immunology Letters*, **86** (2-3), 191–197, 2003.
- [53] Pope SM, Zimmermann N, Stringer KF, Karow ML, Rothenber ME: The eotaxinchemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *The Journal of Immunology*, **175**, 5341–5350, 2005.
- [54] Brown NM, and Setchell KDR: Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Laboratory Investigation*, **81**(5), 735–747, 2001.
- [55] Messina M, Nagata C, and Wu AH: Estimated Asian adults soy protein and isoflavone intakes. *Nutrition and Cancer*, **55** (1), 1–12, 2006.
- [56] Rittner HL, Brack A, Stein C: Pain and the immune system. *British Journal of Anaesthesia*, 101 (1), 40–4, 2008.
- [57] Dilulio, NA, Engeman T, Armstrong D, Tannenbaum C, Hamilton A, Fairchild

- RL: $\text{Gro}\alpha$ -mediated recruitment of neutrophils is required for elicitation of contact hypersensitivity. *European Journal of Immunology*, 29, 3485–3495 1999.
- [58] Biedermann T, Kneilling M, Mailhammer R, Maier K, Sander CA, Kollias G, Kunkel SL, Hültner L, Röcken M: Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *The Journal of Experimental Medicine*, 192 (10), 1441-1452.
- [59] Takeshita K, Yamasaki T, Nagao K, Sugimoto H, Shichijo M, Gantner F, Bacon KB: CRTH2 is a prominent effector in contact hypersensitivity-induced neutrophil inflammation. *International Immunology*, 16 (7), 947-959, 2004.
- [60] Cattani F, Gallese A, Mosca M, Buanne P, Biordi L, Francavilla S, Coletti G, Pellegrini L, Melillo G, Bertini R: The role of CXCR2 activity in the contact hypersensitivity response in mice. *European Cytokine Network*, 17 (1), 42-48, 2006.
- [61] Honda T, Matsuoka T, Ueta M, Kabashima K, Miyachi Y, Narumiya S, Prostaglandin E₂-EP3 signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124 (4), 809-818, 2009.

本研究に関する論文および学会発表

本研究に関する論文発表

- [1] 烏 烏日娜, 武政 睦子, 長野 隆男: 接触過敏症モデル動物実験系に与えるジニトロフルオロベンゼンの影響, 川崎医療福祉学会誌, 第 25, 第 1 号, 113-119, 2015.
- [2] Nagano T, Wu W, Kazunobu Tsumura K, Yonemoto-Yano H, Kamada T, Haruma K: The inhibitory effect of soybean and soybean isoflavone diets on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press.

学会における発表

口頭発表

- [1] 烏 烏日娜, 西田 典永, 長野 隆男: 接触過敏症モデル動物実験系におけるザクロポリフェノールと大豆効果, 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 酪農学園大学, 2014 年 5 月 31 日.
- [2] 烏 烏日娜, 長野 隆男: 大豆及び大豆イソフラボンを摂取すると CCL24 の抑制により接触過敏症が抑制される, 岡山バイオアクティブ研究会第 48 回シンポジウム, 岡山県天神山文化プラザ, 2015 年 11 月 15 日.