

# 食品成分による炎症・アレルギーの抑制

—果実および果実に含まれるフラボノイドの炎症・アレルギー抑制効果—

## 1. はじめに

近年、花粉症やアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性炎症疾患の罹患者は増加の一途をたどっており、厚生労働省の統計によれば、現在では日本人の1/3は何らかのアレルギー様症状を持っていると考えられるなど（図1）、大きな社会的問題となっている。

しかし、この統計から見られるように、症状があっても医療機関への受診をしない患者も多く、食事やサプリメントによりアレルギーの症状を抑えたいという要求が強いことから、アレルギー症状を抑制する作用を有する食品（抗アレルギー食品）に対する需要は高いと考えられる。

アレルギーは、元来、生体を防御するための抗原抗体反応に基づく免疫応答であるが、そのなかでも生体に過剰な傷害を与える応答をアレルギーと呼んでいる。アレルギー反応は、古くからその機序に基づくCoombs&Gellの分類（表1）により分けられている。この中でも狭義のアレルギーとして扱われるIgE抗体依存性の即時型アレルギー反応（I型アレルギー）を対象とした抗アレルギー活性の研究が最も進んでおり、甜茶やシソ<sup>1)</sup>をはじめとするヒスタミン遊離阻害活性を有する食品成分が報告されている。

また、アレルギーは炎症反応の一種、つまりアレルギー反応により起きた炎症がいつまでも継続しているという慢性的炎症状態として捉えることができる。そ

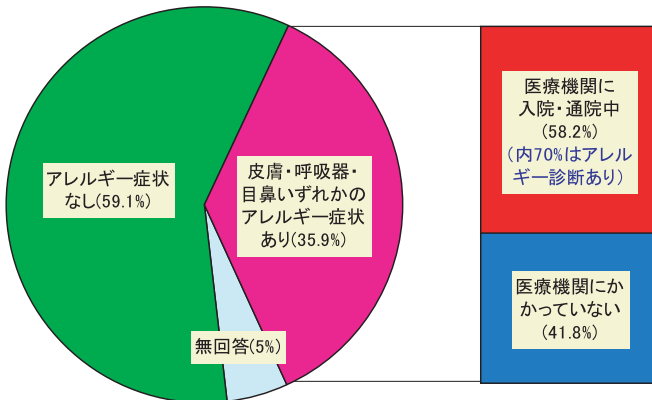


図1 アレルギー様症状の有無とその診断割合  
（平成15年度 厚生労働省保健福祉動向調査概況より作成）

表1 Coombs&amp;Gellによるアレルギー反応の分類

アレルギーの型	反応のメカニズム	疾患の例
I型(即時型・アナフィラキシー型)	抗原の進入に対して産生されたIgE抗体がマスト細胞や好塩基球に結合した状態で、再度アレルギーが進入した際にヒスタミン等のメディエータが遊離	アナフィラキシー・急性じんましん
II型(細胞障害型)	自己の細胞膜成分に対するIgGやIgEなどの抗体を介して、炎症細胞や補体の作用により細胞が融解する	自己免疫性溶血性貧血・血液型不適合輸血・重筋無力症
III型	可溶性抗原と抗体の反応により形成された免疫複合体が炎症細胞や補体により攻撃を受けて起きる	全身性エリスマトーデス・関節リウマチ・膠原病などの自己免疫疾患
IV型(遅延型)	抗原の再侵入の際に感作されたT細胞が遊走し、炎症を起こす	接触性皮膚炎・ツベルクリン反応

ここで、我々は、炎症そのものを抑制することにより、アレルギーの症状を抑制、緩和することができると考え、炎症抑制活性を有する食品の探索を行った。

炎症は、外界からの様々な刺激によって引き起こされる組織傷害に対する生体防衛反応と定義されており、その初期には図2に模式図として示したような反応が認められる。例えば、炎症初期の血管透過性亢進期には、外界からの刺激を受けた肥満細胞からのヒスタミン等の遊離を通じて、血管拡張や血管透過性の亢進が起こり、それに引き続き好中球やマクロファージのような炎症細胞が炎症局所へ浸潤する。

これらの白血球は活性化を受け、アラキドン酸代謝物（プロスタグランジン (prostaglandin:PG)、ロイコトリエン (leukotriene:LT) 等) や活性酸素 ( $O_2^-$ 、 $OH\cdot$ 、 $H_2O_2$ 等)、あるいはサイトカインのような種々のケミカルメディエータの産生が誘導される。このように、炎症初期には様々な細胞、並びにそれらの産生するケミカルメディエータ等が複雑に絡み合った反応が起きている。

そこで、炎症反応の制御においては、これらのケミカルメディエータの動態を把握することが重要であり、特に $PGE_2$ は他のメディエータの作用を増強し、炎症の進展に寄与していることが分かっている。また、白血球が炎症局所へ浸潤するためには、血管内皮細胞表面への白血球接着分子の発現が必須である。そこで、今回、炎症抑制活性成分の探索において、ラット炎症性腹腔マクロファージを用いた $PGE_2$ の産生、およびヒト臍帯静脈内皮細胞における白血球接着分子の発現の2つを指標として用い、果実およびそれらに含有されるフラボノイドについて、抑制活性を有する成分の探索を行った。

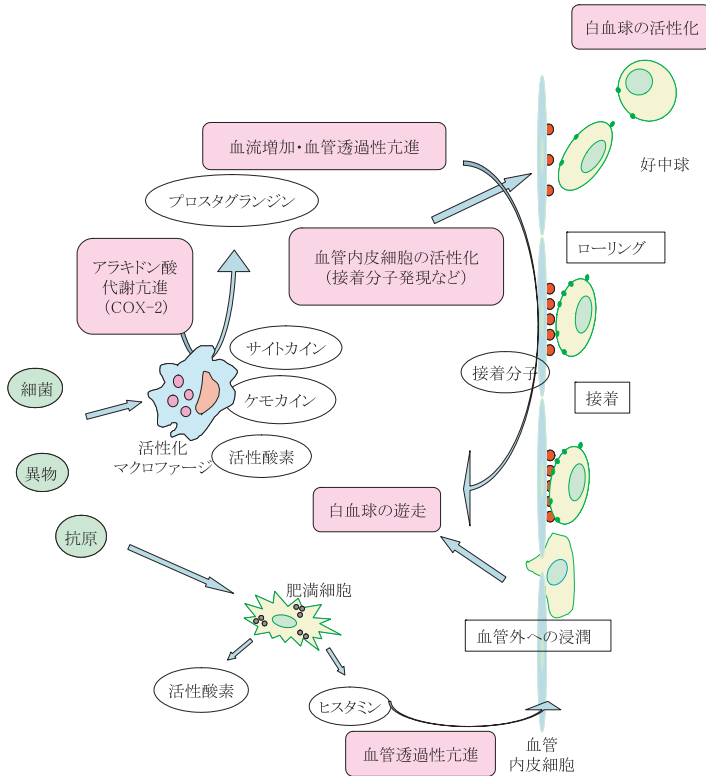


図2 炎症初期に起こる生体防御反応（模式図）

## 2. ラット炎症性腹腔マクロファージの $\text{PGE}_2$ 産生に対するフラボノイドの効果

プロスタグランジン類は、細胞膜リン脂質の第2位からホスホリパーゼ $\text{A}_2$ により遊離されたアラキドン酸から生成される。このとき、律速となる酵素が脂肪酸シクロオキシゲナーゼ（COX）である。COXには、常在型のCOX-1および誘導型のCOX-2と呼ばれる2種類のアイソザイムが存在する。COX-1から産生されるPGは、血管拡張や胃粘膜の保護等の働きを持ち、生体の恒常性に重要な役割を果たしているのに対し、COX-2から産生されるPGは炎症局所等において、生体防御に関与する。そのため、COX-2を選択的に阻害することができれば、副作用のない抗炎症薬として有効と考えられる。

そこで、ラット炎症性腹腔マクロファージを用い、大腸菌リポ多糖により誘導された $\text{PGE}_2$ 産生に与える効果について、果実およびフラボノイドとその類似化合物を用いて検討した。

表2 供試果実の一覧 (太字は2次スクリーニングにも使用)

核果類	モモ(2種)・スモモ・ブルーン・オウトウ・アンズ・ヤマモモ(2種)・ウメ 2種)
仁果類	リンゴ(3種)・カリン・ピワ・ナシ・クラブアップル・サイダーアップル
種実類	クリ・ギンナン
柑橘類	ウンシュウミカン・タンゴール
液果類	ブドウ
小果樹	フサスグリ(2種)・ラズベリー・ハスカップ・スグリ・クワ・アロニア
その他	カキ・ザクロ・キウイフルーツ・イチジク
熱帯果樹	マンゴー(2種)・ホワイトサボテ・パパイヤ・カニステル・マンゴスチン・アボカド・パイナップル・ピタヤ・タマリロ・ココヤシ・パッションフルーツ・バナナ

### 1) 果実類のPGE<sub>2</sub>産生抑制活性

表2に一次スクリーニングに用いた40種(47品種)の果実をそれぞれの分類ごとに示した。一次スクリーニングにおいては、それぞれの果実を水および80%エタノールで抽出したものを用いた。さらに、一次スクリーニングの結果から、ある程度のPGE<sub>2</sub>産生抑制活性が認められた約20種(表中に太字で表示)を選び、用量依存性を調べた。

その結果、ブルーベリーやフサスグリ、リンゴの水抽出物で10~30%程度、ブルーベリーやリンゴのエタノール抽出物では20%前後、PGE<sub>2</sub>産生を抑制する効果が認められた(図3,4)。

しかし、低濃度では産生抑制効果を示すにもかかわらず、高濃度にした場合には、逆に産生を増強するものも存在するなど、明らかな用量依存性は認められなかった。

この理由としては、今回試験に用いた試料が粗抽出物であるために、高濃度では増強活性成分が強く作用することや試料採取時のLPS汚染などが原因と考えられた。

### 2) フラボノイドのPGE<sub>2</sub>産生抑制活性

前項の結果により果実類から活性を指標に有効成分を単離することが困難であったことから、果実類に含有されるフラボノイドについて、PGE<sub>2</sub>の産生抑制効果を検討することとした。

そこで、39種のフラボノイドおよびその類似化合物、ならびに比較対照として、非ステロイド抗炎症薬(NSAID:Non steroidal anti-inflammatory drug)であるAspirin<sup>®</sup>、およびCOX-2の選択的阻害剤であるNS-398についてもあわせて試験を行った。

表3に試験に用いたフラボノイドの慣用名およびその化学構造式を示した。こ

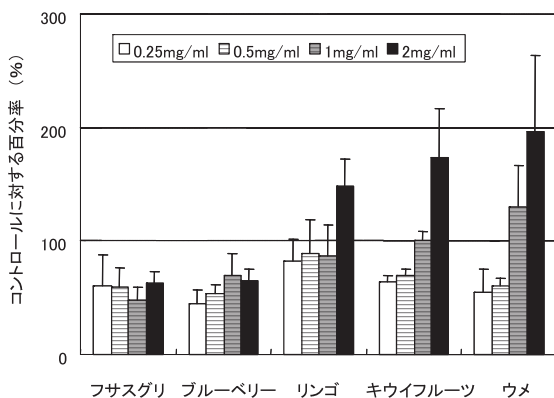


図3 PGE<sub>2</sub>産生量に対する果実水抽出物の影響

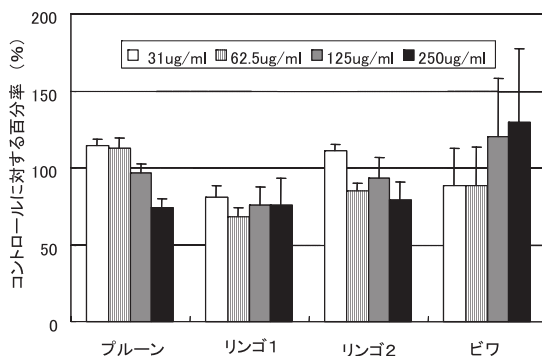


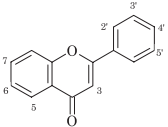
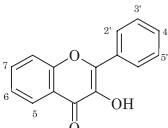
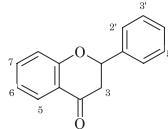
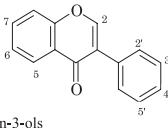
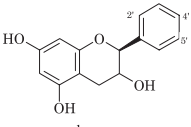
図4 PGE<sub>2</sub>産生量に対する果実エタノール抽出物の影響

のうち、抑制活性を有するフラボノイドについては、用量依存的な抑制曲線から算出したIC<sub>50</sub> (50%阻害濃度) 値をあわせて示した。

フラボノイドをサブクラス毎に検討したところ、フラボンではluteolinを除く全てに抑制活性が認められた。しかし、フラボノールでは3-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavonol, galangin, kaempferolおよびquercetinの5種類のみが抑制活性を示した。また、quercetinとrutin (quercetin 3-rutinoside) やquercitrin (quercetin 3-rhamnoside) のように、配糖体は対応するアグリコンと比較するとPGE<sub>2</sub>産生に対し、やや促進もしくは非常に弱い抑制を示した (データ省略)。

フラバノンにおいても、naringeninやhesperetinのようなアグリコンは抑制活性を有するが、それに対する配糖体、naringin (naringenin-O-7-neohesperidoside)

**表 3** Chemical structure and 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the various flavonoids tested for the inhibition of PGE<sub>2</sub> biosynthesis in rat peritoneal macrophage stimulated by LPS.

Subclass (Chemical formula)	Name	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	Substitutions		
			OH residues	OCH <sub>3</sub>	Others
	5-Hydroxyflavone	10.6±3.9 <sup>b</sup>	5		
	7-Hydroxyflavone	5.2±2.2 <sup>b</sup>	7		
	Chrysin	2.8±0.4 <sup>b</sup>	5,7		
	Baicalein	2.5±0.9 <sup>b</sup>	5,6,7		
	Apigenin	3.3±2.0 <sup>b</sup>	5,7,4'		
	7,3',4'-Trihydroxyflavone	36.3±18.8 <sup>c</sup>	7,3',4'		
	Luteolin	>1000	5,7,3',4'		
	3-Hydroxyflavone	30.6±26.8 <sup>c</sup>	3		
	7-Hydroxyflavonol	10.7±6.6 <sup>b</sup>	3,7		
	Galangin	14.3±2.6 <sup>bc</sup>	3,5,7		
	Kaempferol	13.1±1.7 <sup>b</sup>	3,5,7,4'		
	Fisetin	>1000	3,7,3',4'		
	Morin	>1000	3,5,7,2',4'		
	Quercetin	13.9±2.3 <sup>bc</sup>	3,5,7,3',4'		
	Isorhamnetin	>1000	3,5,7,4'	3'	
	Rutin	>1000	5,7,3',4'		3-rutinoside
	Quercitrin	>1000	5,7,3',4'		3-rhamnoside
	Robinetin	>1000	3,7,3',4',5'		
	Quercetagenin	>1000	3,5,6,7,3',4'		
Myricetin	>1000	3,5,7,3',4',5'			
	Naringenin	7.9±1.9 <sup>b</sup>	5,7,4'		
	Naringin	>1000	5,4'		7-neohesperidoside
	Eriodictyol	7.2±1.7 <sup>b</sup>	5,7,3',4'		
	Hesperetin	8.4±1.3 <sup>b</sup>	5,7,3'	4'	
	Hesperidin	>1000	5,3'	4'	7-rutinoside
		Daidzein	37.6±14.3 <sup>c</sup>	7,4'	
Daizin		>1000	4'		7-glucoside
Genistein		7.2±2.3 <sup>b</sup>	5,7,4'		
Genistin		>1000	5,4'		7-glucoside
		(+)-Catechin	>1000	3,5,7,3',4'	
	(-)-Epicatechin	>1000	3,5,7,3',4'		
	Epigallocatechin	>1000	3,5,7,3',4',5'		
	Epicatechin-3-gallate	>1000	5,7,3',4'		3-gallate
	Epigallocatechin-3-gallate	>1000	5,7,3',4',5'		3-gallate
Other compounds	Chlorogenic acid	>1000			
	Cyanidine chloride (anthocyanin)	>1000			
	Phloretin (dihydrochalcone)	>1000			
	Phloridin	>1000			
	Resveratrol (Stilbene)	7.6±1.9 <sup>b</sup>			
	COX-2 selective inhibitor	NS-389	<0.1 <sup>a</sup>		
NSAID	Aspirin	2.9±2.1 <sup>b</sup>			

<sup>a</sup>The values of IC<sub>50</sub> were analyzed by Fisher's PLSD test.

やhesperidin (hesperetin-*O*-7-rutinoside) では、抑制活性は認められなかった。イソフラボンでは、genisteinの方がdaidzeinに比べIC<sub>50</sub>で約5倍の強い抑制活性を示したが、それぞれの7-*O*-glucoside配糖体であるgenisteinおよびdaidzeinでは、全く抑制活性が認められないか、逆に増加の傾向が確認された。ResveratrolおよびCOX阻害剤であるAspirin<sup>®</sup>およびNS-398では強くPGE<sub>2</sub>産生を抑制したが、実験に用いたその他のフラボノイド、例えばフラバン-3-オール (catechin, epicatechin, epigallocatechin他) やアントシアニン、またその類似化合物ではLPS誘導によるPGE<sub>2</sub>産生抑制活性は認められなかった。

IC<sub>50</sub>で比較した場合、フラボンおよびフラバノンはLPS誘導によるPGE<sub>2</sub>産生に対し、最も強い抑制効果を示し、その数値は2.5-36.3μMの範囲であった。次いで活性の高いグループはフラボノールであり、その数値は10.7-30.6μMの範囲であった。また、イソフラボンでは、その値は7.2-37.6μMと広範囲に分布した。スチルベンに属するresveratrolのIC<sub>50</sub>およびその阻害曲線はgenisteinのそれに非常に良く類似していた。Aspirin<sup>®</sup>やNS-398では、非常に強い抑制を示し、それぞれのIC<sub>50</sub>は2.9μMおよび0.1μM以下であったが、一部のフラボノイドではAspirin<sup>®</sup>に準ずる阻害活性を示した。

### 3) プロスタグランジン産生抑制活性とCOX-2発現量

以上のように、いくつかのフラボノイドにおいてPGE<sub>2</sub>産生抑制活性が明らかになったことから、その作用メカニズムを明らかにすることを目的とし、COX-2蛋白質の発現との関係を調べるために、COX-2蛋白質のウエスタンブロットを行った結果を図5に示した。

強い産生抑制活性を有するグループに属するapigenin, 7-hydroxyflavonolおよびeriodictyolはCOX-2蛋白質の発現が常在型のアイソザイムであるCOX-1に比べ、抑制されることが確認された。例えば、apigeninにおけるCOX-2/COX-1比は0.4μMから40μMの濃度の範囲で2.8から0.1と用量依存的に低下していた。同様に7-hydroxyflavonolおよびeriodictyolにおいてもそれぞれ1.7から0.4, 10.0から5.0と低下していた。それに対し、PGE<sub>2</sub>産生抑制の弱いグループに属するdaidzeinでは、COX-2蛋白質の発現抑制効果は弱く、COX-2/COX-1比は2.8から11.0であった。

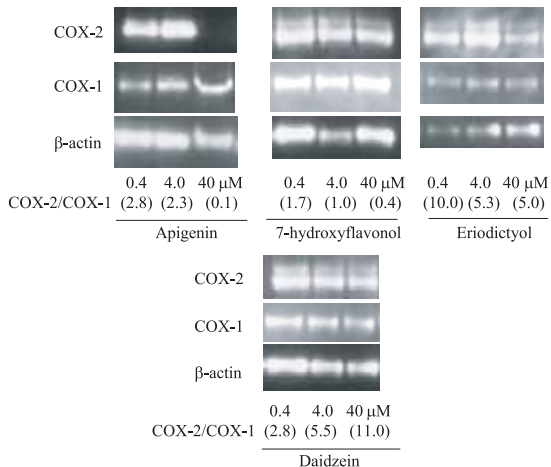


図5 Western blot analysis of COX-1, -2 in rat peritoneal macrophages.  
(Upper part: strongly suppressive flavonoids,  
Lower part: lesser effective flavonoid)

Activated peritoneal macrophages were collected from soluble starch and bacto-peptone injected SD rats. Macrophages were incubated with several concentrations of flavonoids for 14 h in the presence and absence of 1 μg/ml of LPS as stimulator.

After washing, the cells were lysised. The cell lysates were analyzed by Western blot as described in Materials and Methods.

### 3. ヒト臍帯静脈内皮細胞における白血球接着分子E-selectin発現に対するフラボノイドの効果

次に、抗炎症作用探索のための指標として白血球浸潤に着目し、その抑制についての検討を行った。炎症反応は、先に述べたように血管透過性の亢進、それに引き続く白血球の炎症局所への浸潤、そして治癒という3つの過程に大きく分けることができる。アレルギー性炎症や慢性炎症においては、血管透過性の亢進と白血球の浸潤が、白血球から遊離される走化因子等により、繰り返り起こっていると考えられる。つまり、炎症局所への白血球遊走がこの複雑な反応の制御を担っていると言っても過言ではない。

白血球の炎症局所への遊走は、いくつかの過程を経て起こる。最初に、生体何らかの刺激を受けると、血管内を血流に沿って流れている白血球は血管壁付近を流れるようになり、次に血管内皮細胞表面を転がる現象が起こる。この現象をローリング (rolling) と呼んでいる。次に、白血球は内皮細胞表面に接着 (adhesion) し、内皮細胞間を通過した後、血管周囲の結合組織を通り、最後に炎症局所に向かって移動していく。浸潤の初めの段階であるローリング反応には、接着因子であるselectin familyと呼ばれるP-selectin (CD62P), L-selectin



(CD62L) およびE-selectin (CD62E) というレクチンに類似した糖鎖構造を持つ  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の蛋白が関与する。これらのselectinのうち、L-selectinは恒常的に白血球の細胞表面に発現している。それに対し、P-selectinは血小板の $\alpha$ -顆粒内および血管内皮細胞のWeibel-Palade小体に不活性型で存在し、E-selectinは通常、発現していない。腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$  やIL(Interleukin)-1のような炎症性サイトカインは、まずP-selectin分子を活性化して内皮細胞の表面に発現させ、それに引き続きE-selectinの発現を誘導することが知られている。

このローリング反応は、白血球の血管外浸潤と炎症局所への集積に必須であり、野菜や果実等植物由来のいくつかのフラボノイドで、内皮細胞表面の接着分子発現を抑制することが報告されている。このことから、接着分子の発現抑制により、白血球の浸潤を減少させ、抗炎症や抗アレルギーにつながられるものと期待される。また、フラボノイド等の機能性成分が吸収され、血中に移行した場合、最初に作用する細胞は血管内皮細胞であると考えられることから、TNF- $\alpha$  により惹起されたヒト臍帯静脈内皮細胞(Human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) 表面におけるE-selectinの発現に対する効果を検討することとした。

#### 1) 果実類の白血球接着分子発現に対する効果

前項と同様に約40種の果実の水およびエタノール抽出物について、白血球接着分子発現に対する効果を検討したが、抑制活性を有するものは認められなかった。

#### 2) 白血球接着分子発現に対するフラボノイドの効果

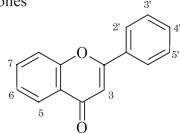
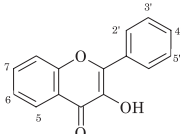
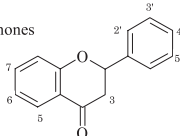
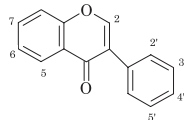
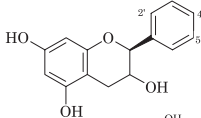
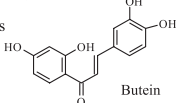
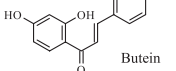
本実験に用いたフラボノイドの化学構造および慣用名を表4に示した。TNF- $\alpha$  刺激による白血球接着分子E-selectin発現において、フラボンに属するluteolinとapigeninは、もっとも強い抑制活性を示し、 $\text{IC}_{50}$ はそれぞれ0.7および1.1  $\mu\text{M}$ であった。次に抑制活性の強いグループとしては、fisetin (0.8 $\mu\text{M}$ )、quercetin (4.5  $\mu\text{M}$ ) およびkaempferol (4.3 $\mu\text{M}$ ) などのフラボノール、さらにchalconeに属するbutein (1.5 $\mu\text{M}$ ) が挙げられる。イソフラボンとフラバノンの上の3つのサブクラスよりもやや活性が弱く、genistein (13.8 $\mu\text{M}$ )、eriodictyol (70.6 $\mu\text{M}$ ) であったが、それ以外のフラボノイドでは全く発現抑制活性を示さないか、非常に弱かった。

### 4. 果実類およびフラボノイドの炎症抑制活性と作用機序

#### 1) 果実類の炎症抑制活性

カンキツ(特に果皮)は、果実類の中でも高い炎症抑制活性を示すことが知られている。そこで、落葉果樹を中心に、熱帯・亜熱帯果樹を含め40種の果実の抗炎症作用を調べたところ、フサスグリやブルーベリーなどの小果樹類の水抽出物やプルーン・リンゴなどのエタノール抽出物に $\text{PGE}_2$ 産生抑制活性が認められた。

表 4 Chemical structure and 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the various flavonoids tested for the inhibition of E-selection expression in HUVECs stimulated by TNF- $\alpha$ .

Subclass (Chemical formula)	Name	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Substitutions		
			OH residues	OCH <sub>3</sub>	Others
Flavones 	5-Hydroxyflavone	>1000	5		
	7-Hydroxyflavone	>1000	7		
	3-Methoxyflavone	>1000		3	
	3',4'-Dihydroxyflavone	>1000	3',4'		
	Chrysin	>1000	5,7		
	Baicalein	>1000	5,6,7		
	Apigenin	1.1 $\pm$ 0.3	5,7,4'		
	7,3',4'-Trihydroxyflavone	>500	7,3',4'		
	Luteolin	0.7 $\pm$ 0.04	5,7,3',4'		
Flavonols 	3-Hydroxyflavone	>1000	3		
	7-Hydroxyflavonol	>1000	3,7		
	Galangin	>1000	3,5,7		
	Kaempferol	4.3 $\pm$ 1.1	3,5,7,4'		
	Fisetin	0.8 $\pm$ 0.2	3,7,3',4'		
	Morin	>1000	3,5,7,2',4'		
	Quercetin	4.5 $\pm$ 1.0	3,5,7,3',4'		
	Isorhamnetin	>1000	3,5,7,4'	3'	
	Rutin	>1000	5,7,3',4'		3-rutinoside
	Quercitrin	>1000	5,7,3',4'		3-rhamnoside
	Robinetin	>1000	3,7,3',4',5'		
	Quercetagenin	>1000	3,5,6,7,3',4'		
	Myricetin	>1000	3,5,7,3',4',5'		
Flavanones 	Naringenin	>500	5,7,4'		
	Naringin	>1000	5,4'		7-neohesperidoside
	Eriodictyol	70.6 $\pm$ 50.3	5,7,3',4'		
	Hesperetin	>1000	5,7,3'	4'	
	Hesperidin	>1000	5,3'	4'	7-rutinoside
Isoflavones 	Daidzein	>1000	7,4'		
	Genistein	13.8 $\pm$ 6.5	5,7,4'		
	Formononetin	>1000	7	4'	
	Biochanin A	>1000	5,7	4'	
Flavan-3-ols 	(+)-Catechin	>1000	3,5,7,3',4'		
	(-)-Epicatechin	>1000	3,5,7,3',4'		
Chalcones 	Phloretin	>1000			
	Butein	1.5 $\pm$ 0.2			
Other polyphenols 	Chlorogenic acid	>1000			
	Resveratrol	>500			

しかし、今回は粗抽出物を用いた試験であったため、用量依存的な抑制傾向は明らかではなかった。

また、血管内皮細胞における白血球接着分子の発現を抑制する果実は認められなかった。

## 2) フラボノイドの炎症抑制活性と作用機序

### 2) - 1 フラボノイドのPGE<sub>2</sub>産生抑制活性

フラボノイドの構造とPGE<sub>2</sub>産生抑制効果について構造活性相関を中心に検討を行った。

フラボノイドはフラボノイド骨格と呼ばれるA, B, Cの3環からなる構造を有し、骨格上の違いによりサブクラスに分類されている。また、表3に示したように、様々な位置に水酸基の配位が見られ、さらにその誘導体が存在する。本実験に用いたフラボノイドのうち、フラバン-3-オールおよびアントシアニンに属するものにはLPS刺激マクロファージにおけるPGE<sub>2</sub>産生抑制効果は認められず (IC<sub>50</sub>で1000μM以上)、その他のフラボンやフラボノール、フラバノール等にも抑制が認められた。このことから、PGE<sub>2</sub>産生抑制活性を示すためには4位のケトン基(オキソ構造)が必須であること、またC2-C3位における二重結合は抑制活性を強めることが明らかになった。Landolfiらは、フラボノイドのC2-C3の二重結合が欠けると脂肪酸シクロオキシゲナーゼ経路によるPGE<sub>2</sub>産生抑制活性が低下することを報告<sup>2)</sup>している。本試験のラット炎症性腹腔マクロファージにおけるPGE<sub>2</sub>産生抑制に関する結果においても、有意差は認められないものの、同様の傾向が確認された。

フラボノイドのPGE<sub>2</sub>産生抑制活性は、水酸基の位置や数にも影響を受けており、例えば、A環の5位と7位の水酸基は大きな影響を与えることが明らかになった。今回抑制活性を示したフラボノイドでのIC<sub>50</sub>の比較によれば、5,7位の両方に水酸基を有するフラボノイドは、7位のみ、もしくはいずれの水酸基も持たないものに比べ、有意に高い抑制活性を示した。また、5位に水酸基を持たないイソフラボンよりも水酸基を有する方が高い活性を示した。また、フラボンとフラボノールでは、B環の水酸基も活性に強く関わり、3',4'位に水酸基を持つものよりも、水酸基を持たないものの方が高い活性を示した。また、2',4'位や3個以上の水酸基を有するフラボノイドは、全く活性を示さなかった。MutohらはCOX-2の転写活性に対するフラボノイドの構造活性相関を検討し、5位および7位の水酸基での電子密度が低いほど抑制活性が強いことを示し<sup>3)</sup>、本試験とほぼ同様の結果を得ていることから、フラボノイドの構造とPGE<sub>2</sub>産生抑制活性の関係は、これらの電子密度への影響から推測できる可能性がある。

また、Kalkbrennerらは単離したCOX酵素の活性阻害とフラボノイドの構造について、平面構造をとらないフラボノイド(catechin, epicatechin)の方が、

平面構造をとるフラボノイド (galangin, quercetin等) よりも抑制活性が強いとしており<sup>4)</sup>, この点では本試験と異なる結果を示している。しかし, フラボンにおけるB環の*o*-ジフェノール構造やフラボノールにおけるA環5, 7位の水酸基の抑制活性への影響については同様の結果であることから, 細胞刺激による結果と単離された酵素活性阻害では若干の差異は認められるものの, フラボノイドのPGE<sub>2</sub>産生抑制活性についてはかなり類似した結果が得られた。

## 2)ー2 フラボノイドのPGE<sub>2</sub>産生抑制作用機序

フラボノイドの抑制作用機序については, resorcin構造を有するフラボノイドであるquercetin, kaempferol, genisteinやresveratrolが大腸がん細胞において, COX-2プロモーター活性を抑制する効果が確認されており<sup>5)</sup>, 本実験においても, これらのフラボノイドは高いPGE<sub>2</sub>産生抑制効果を示した。この結果より, フラボノイドのPGE<sub>2</sub>産生抑制活性は, LPS刺激マクロファージでのCOX-2プロモーター活性抑制に起因する可能性が示唆された。

また, COXは酸素添加酵素であることから, フラボノイドの抗炎症活性が抗酸化活性に由来する可能性があると考えられた。例えば, フラボノイドのラジカル消去活性は良く知られているが, LPSシグナルによって誘導されるNF- $\kappa$ Bの活性化がラジカル消去能を有する化合物により抑制されることが報告されている<sup>6)</sup>。また, フラボノイドのラジカル消去活性には, B環の3', 4'位に配位した水酸基が非常に重要な働きを示すとされている<sup>7)</sup>。しかし, 本実験においては, 前述のようにB環の水酸基を持たない方が3', 4'位に水酸基を持つものより活性が高いことから, フラボノイドの抗酸化活性がPGE<sub>2</sub>産生に関与する可能性はあまり大きくないと考えられた。

さらに, quercetin, genistein, apigeninおよびresveratrol等のフラボノイドはチロシンキナーゼ蛋白発現阻害を有することが報告されている<sup>8)</sup>が, この酵素は, シグナル伝達において大変重要な役割を持つことから, これらのフラボノイドの示す強いPGE<sub>2</sub>産生抑制活性が, LPS由来のチロシンキナーゼシグナル伝達系を介したCOX-2蛋白発現阻害によるものである可能性もある。本実験において, スチルベンに属するresveratrolのPGE<sub>2</sub>産生抑制活性はgenisteinに匹敵するIC<sub>50</sub>を示しており, resveratrolの示すPGE<sub>2</sub>産生抑制効果の一部が, チロシンキナーゼ阻害に由来すると考えられた。また, フラボノイドの一種であるwogonin (5, 7-dihydroxy-8-methoxyflavone) は, 皮膚炎症の亜急性期にCOX-2のmRNA誘導を抑制したり, 急性炎症時のPGE<sub>2</sub>含量の増加を抑制することが報告されている<sup>9)</sup>。これらの結果から, 特定のフラボノイドでは炎症反応におけるCOX-2のmRNAレベルの上昇を抑制する可能性が類推された。

LPSで刺激したマクロファージにおいては, PGE<sub>2</sub>産生量の増加と比例してCOX-2蛋白質発現の増大が認められる。本実験では, 数種のフラボノイドにお

いてCOX-2蛋白質量がコントロールに比べ減少しており、PGE<sub>2</sub>産生量の減少が、COX-2蛋白質発現のレベルと相関することが明らかになった。

また、COX-2の誘導を阻害することによりアレルギー性炎症反応を抑制できることは良く知られている<sup>10)</sup>。これらの知見はアレルギーにおける抗原抗体反応によって起こる炎症の繰り返しにおいて、誘導されたCOX-2が重要な働きをすることを示唆している。本試験において、PGE<sub>2</sub>産生抑制を強く抑制したapigeninやgenisteinなどのフラボノイドはCOX-1蛋白質発現に影響を与えることなく、COX-2蛋白質の発現を抑制しており、これらのフラボノイドのPGE<sub>2</sub>産生抑制機序はCOX-2蛋白質の発現抑制であることが示唆された。

LPS刺激したラット炎症性腹腔マクロファージにおいて、フラボノイドはCOX-2由来のPGE<sub>2</sub>産生を抑制するが、COX-1由来のPGE<sub>2</sub>産生はほとんど抑制しておらず、COX-2の選択的阻害剤であるNS-398と同じ効果を示した。NS-398処理によりPGE<sub>2</sub>産生は強く抑制され、そのIC<sub>50</sub>は0.1μM以下であった。非ステロイド抗炎症薬であるアスピリンはCOX-1とCOX-2の両者を不可逆的に不活化することにより、PGE<sub>2</sub>産生を抑制する。いくつかのフラボノイドではアスピリンとほぼ匹敵するIC<sub>50</sub>を示したが、その作用機序は酵素の不可逆的不活化とは異なると考えられた。

また、用量反応曲線およびWestern blot法を用いてCOX-2蛋白質の発現を調べた結果では、40μMのapigenin（フラボン）はPGE<sub>2</sub>産生を強く阻害するだけでなく、COX-2蛋白質の発現も抑制した。それに対し、40μMの7-hydroxyflavonol（フラボノール）やeriodictyol（フラバノン）は、PGE<sub>2</sub>産生を阻害するが、COX-2蛋白質の発現抑制は弱かった。このことから、フラボンのPGE<sub>2</sub>産生抑制作用機序はCOX-2蛋白質の発現抑制であるが、フラボノールやフラバノンの作用機序は、Kalkbrennerらの報告<sup>4)</sup>と同様に、PGE合成酵素やホスホリパーゼA<sub>2</sub>活性の阻害等に由来する可能性があると考えられた。

また、今回の検討に用いたような*in vitro*試験ではフラボノイドの細胞膜透過性も活性発現に大きな影響を与えると考えられる。いくつかのフラボノイドでは、配糖体はそれに対応するアグリコンに比較し、効果が小さい。例えば、quercetinはPGE<sub>2</sub>産生抑制活性がIC<sub>50</sub>で13.9μMであるのに対し、その配糖体であるrutinやquercitrinは1000μM以上で、ほとんど活性は認められなかった。さらに、genisteinやdaidzeinに対するgenistinおよびdaidzinについても同様の傾向が認められた。配糖体とアグリコンについてのこのような抑制活性の違いには、細胞膜透過性が寄与しているものと考えられた<sup>11)</sup>。フラボノイドの細胞膜透過性は、フラボノイドの疎水性の強さに大きく影響されており、疎水性の強さは水酸基の数および糖の配位等によって左右される。このことが、B環に3以上の水酸基を有するフラボノイドにPGE<sub>2</sub>産生抑制効果が認められなかった理由の一つと考えられた。

さらに、近年では*in vivo*におけるフラボノイドの代謝についての研究も進んでいる。植物や食品に含有されるフラボノイドは、フラバン-3-オール (catechin等)を除き、配糖体 (rhamnoside, glucoside, hesperidoside等) の形で存在することが多く、本実験のような*in vitro*試験では、フラボノイド配糖体はPGE<sub>2</sub>産生抑制活性を示さないことから、生体内で作用しにくいとも考えられる。これに対し、*in vivo*で経口投与されたフラボノイドは、量的には非常に少ないが、加水分解されたアグリコンの形で吸収されると考えられている。さらに、Erlundらのquercetinとrutin (quercetin-3-O-rutinoside) に関する薬学的な知見によれば、quercetinとrutinを経口投与した場合、quercetinのグルクロン酸抱合体もしくは硫酸抱合体のみが血中に認められ、rutinは検出されていないことから、体内においてフラボノイドはアグリコンの抱合体として存在することが示唆されている<sup>12)</sup>。しかし、炎症局所においてはβ-glucuronidase活性の亢進に伴い、フラボノイド抱合体がアグリコンに脱抱合されることが確認されており<sup>13)</sup>、また、血清中のquercetinとその抱合体 (B環もしくは3位に抱合) は、大腸がん細胞に対し、無刺激状態およびinterleukin-1βにより誘導された状態のいずれにおいてもCOX-2のmRNA発現量を低下させることが報告されている<sup>14)</sup>。以上のような知見から、フラボノイドの経口摂取による吸収量は低値であると推察されるが、血液中に確認される量でも十分な抗炎症活性を示すと考えられる。

## 2) - 3 フラボノイドの白血球接着分子抑制活性と作用機序

フラボノイドのサブクラスのうち、フラボン、フラボノール、フラバノン、イソフラボンおよびchalconeに属する数種のフラボノイドが、TNF-α刺激による白血球接着分子E-selectin発現を抑制することが認められた。本結果をフラボノイドの構造と比較して考えた場合、フラボノイドA環に存在するC2-C3の2重結合を持つグループの方が単結合のグループよりも強い活性を示した。さらに、4位のケトン基は、本抑制活性の発現に必須であると考えられた。

また、AおよびC環においては、3位に水酸基を有するフラボノールは同じ構造で水酸基を持たないフラボンよりもやや活性が劣り、フラバン3-オールは活性を示さなかった。さらに、6位の水酸基を有するものは活性を持たないことから、本活性の発現に水酸基の数や位置が重要な役割を示していることが明らかになった。また、B環の水酸基では、4'位単独、もしくは3',4'位のジヒドロキシ構造を取る場合には活性を示すが、全く水酸基を持たないか、メトキシ基である場合には抑制活性が認められなかった。

構造活性相関の点では前項で検討したPGE<sub>2</sub>の産生抑制に類似するところも見受けられるが、イソフラボンやフラバノンの抑制活性が低いことなどから、PGE<sub>2</sub>産生抑制とは異なる作用機序により白血球接着分子発現抑制活性を示している可能性も示唆された。



近年、ChoiらはフラボノイドとICAM (intracellular cell adhesion molecule)-1, VCAM (vascular cell adhesion molecule)-1およびE-selectin等の細胞接着分子発現との関係について調べ、luteolinやapigenin, quercetinは細胞接着分子の転写抑制により、単球の接着を阻害すると報告しているが<sup>15)</sup>、本試験でもほぼ同様の結果が得られており、それ以外の発現抑制が認められたフラボノイドの作用機序も同じく転写抑制であると考えられた。

フラボノイド配糖体とそれに対応するアグリコンを比較すると、配糖体では阻害活性が認められなかった。これは、前章に述べたのと同様に、配糖体とアグリコンの細胞膜透過性の違いに起因しているものと考えられた。

## 5. ICRマウスを用いたフラボノイドのアレルギー性炎症抑制効果の検討

前項までに述べたように、一部のフラボノイドに炎症抑制効果が認められたことから、動物モデルを用い、実際にアレルギー性炎症を惹起した際にフラボノイドがどのような効果を示すかを検討した。

フラボノイドの炎症抑制活性に関する研究では、前述のように細胞レベルでの報告は多いが、動物への投与による活性を検討した報告はあまり多くない。本試験では、卵白アルブミン (OVA) を抗原としてFIA (フロイント不完全アジュバント) とのエマルジョンをICRマウスの腹腔内に投与することにより感作を行い、同時に皮下へフラボノイドを投与した。感作成立 (開始2週間) 後、背部皮内に抗原を接種することにより即時型アレルギー反応を惹起し、遊離したヒスタミンによる血管透過性の亢進に対するフラボノイド投与の影響を明らかにすることを目的とした。

その結果、血漿成分の滲出量を炎症強度の指標として測定したところ、図6に示したように、供試したapigenin, eriodictyolのいずれも、0.5 $\mu$ MのOVA投与を行った部位で、コントロールに比較して有意に血漿成分の滲出量が抑制され、フラボノイドの炎症抑制効果が動物レベルで確認された。一方、血清中のIgG<sub>1</sub>, IgE抗体量およびOVA特異的IgG<sub>1</sub>抗体価については差が認められず、炎症抑制作用機序についてはさらなる検討が必要であると考えられた。

この結果から、フラボノイドの投与により動物モデルを用いた即時型アレルギーによる炎症を抑制できる可能性が期待され、炎症抑制効果を示す物質の探索に際し、細胞レベルでのPGE<sub>2</sub>産生抑制活性やE-selectin発現抑制活性などを指標として用いることができると考えられた。しかし、実際の即時型アレルギー反応による血管透過性亢進を抑制する作用機序についてはまだ不明な点が多く残されており、今後さらなる研究が必要である。

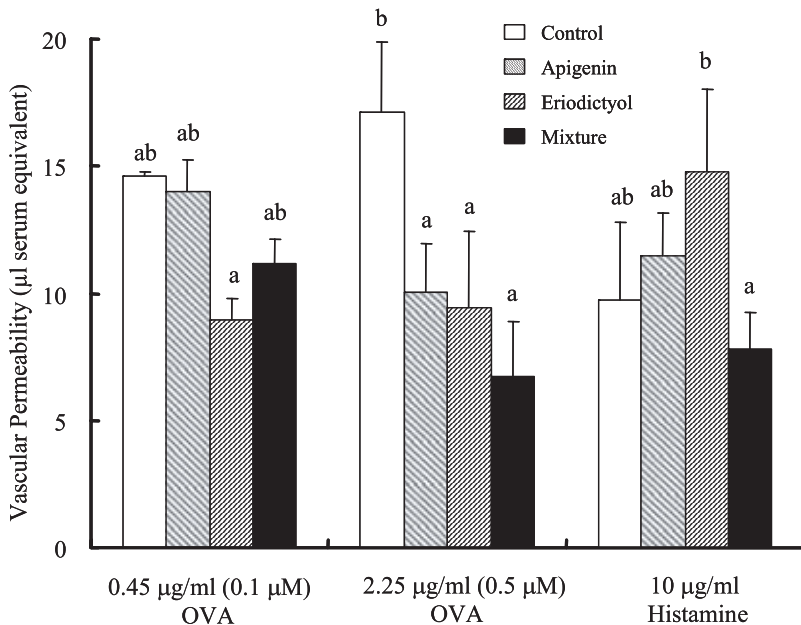


図6 Plasma leakage by injections of OVA and histamine in ICR mice.

FITC BSA were injected to OVA sensitized ICR mice from a tail vein under light ether anesthesia. The animals were injected with OVA (antigen) and histamine solution into the dorsal skin. After 30 min, the mice were sacrificed by cardiac puncture.

The plasma leakage of the injected sites of skin were measured as the rate of fluorescence intensity of the skin and 50 µl of serum. Values were expressed as mean ± standard error (n = 6). Zero on the x-axis refers to skin sites injected with Tyrode's solution only.

The values sharing unlike letter differ significantly (p < 0.05).

## 5. おわりに

以上のように、炎症に関わるケミカルメディエータ産生および白血球浸潤を指標として、フラボノイドの炎症抑制効果についてその構造活性相関や作用機序について検討を行なった。その中で、いくつかのフラボノイドに抗炎症活性が確認されたことから、アレルギー動物モデルを用い、即時型アレルギー反応における血管透過性亢進に対するフラボノイドの効果を検討した。その結果、実際にアレルギー性炎症の抑制にフラボノイドが有効であることが確認された。

アレルギー性炎症疾患罹患患者の増加に伴い、その症状を和らげることのできる、



いわゆる「抗アレルギー食品」の需要は今後さらに増加し、機能的食品の中でも大きな位置を占めるようになって考えられる。そこで、このような需要の増大や機能的食品への期待に対し、どのように対応していくかがこれからの大きな課題である。

そこで、現在行っている細胞や動物を用いるスクリーニングを一步進め、ヒトでの効果が期待できるような新たなスクリーニング手法の開発を行う。ヒトへの外挿が可能なスクリーニング手法を用いてアレルギー抑制成分の探索を行なうことにより、アレルギー患者の生活の質を向上させる食品開発を目標に研究を遂行していく。

(食品機能部 機能成分研究室 石川 祐子)

### 引用文献

- 1) Makino T, Furuta A, Fujii H, Nakagawa T, Wakushima H, Saito K, Kano Y. (2001) Effect of oral treatment of *Perilla frutescens* and its constituents on type-I allergy in mice. *Biol Pharm Bull.* 24: 1206-1209.
- 2) Landolfi R, Mower RL, Steiner M (1984) Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 33: 1525-1530.
- 3) Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K (2000) Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 686-691.
- 4) Kalkbrenner F, Wurm G, Bruchhausen F (1992) *In vitro* inhibition and simulation of purified prostaglandin endoperoxide synthase by flavonoids: structure-activity relationship. *Pharmacol.* 44: 1-12.
- 5) Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K (2000) Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis* 21: 959-963.
- 6) Shrh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phyto-chemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat. Res.* 480-481: 243-268.
- 7) Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K (2001) Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals

and LDL oxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 47: 357-362.

- 8) Palmieri L, Mameli M, Ronca G (1999) Effect of resveratrol and some other natural compounds on tyrosine kinase activity and on cytoskeleton. *Drugs Exp. Clin. Res.* XXV: 79-85.
- 9) Chi YS, Cheon BS, Kim HP (2001) Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1195-1203.
- 10) Oguma T, Asano K, Shiomi T, Fukunaga K, Suzuki Y, Nakamura M, Matsubara H, Sheldon HK, Haley KJ, Lilly CM, Drazen JM, Yamaguchi K (2002) Cyclooxygenase-2 expression during allergic inflammation in guinea-pig lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165: 382-386.
- 11) Walgren RA, Walle UK, Walle T (1998) Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1721-1727.
- 12) Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpää J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A (2000) Pharmacokinetics and disposition: Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56: 545-553.
- 13) Shimoi K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, Nakayama T, Kinoshita N (2001) Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab. Dispos.* 29: 1521-1524.
- 14) O'Leary KA, Pascual-Teresa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G (2004) Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat. Res.* 551: 245-254.
- 15) Choi JS, Choi YJ, Park SH, Lee YJ, Kang YH (2002) Selection of flavonoids inhibiting expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in human vascular endothelial cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 1134-1141.