

ザクロ酢のヒスタミン放出抑制活性におけるポリフェノール化合物の寄与

誌名	日本食品科学工学会誌
ISSN	1341027X
巻/号	632
掲載ページ	p. 63-69
発行年月	2016年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



報 文

ザクロ酢のヒスタミン放出抑制活性における ポリフェノール化合物の寄与

宮崎義之¹, 倉田有希江¹, 古賀裕章¹, 山口 智¹, 立花宏文¹, 山田耕路^{1,2*}

¹九州大学大学院農学研究院

²崇城大学生物生命学部

Involvement of Polyphenol Compounds in Histamine Release Suppression by Pomegranate Vinegar

Yoshiyuki Miyazaki¹, Yukie Kurata¹, Hiroaki Koga¹, Satoshi Yamaguchi¹,
Hiroyumi Tachibana¹ and Koji Yamada^{1,2*}

¹ Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

² Faculty of Biotechnology and Life Science, Sojo University, 4-22-1 Ikeda, Nishi-ku, Kumamoto 860-0082

Histamine release by granulocytes is a critical event in the induction of type I allergy. We investigated the effects of four different fruit vinegars made from yama-budo, haskap, blueberry and pomegranate on histamine release by the basophilic leukemia cell line RBL-2H3. Results clearly indicated that these fruit vinegars, especially pomegranate vinegar, have potent inhibitory effects on histamine release. We then performed adsorption chromatography with Diaion HP20 to estimate the bioactive components in pomegranate vinegar; the fraction eluted by 50% ethanol (EtOH) showed the most potent suppressive effect. Next, we subjected the 50% EtOH-fraction to liquid-liquid division with ethyl acetate (AcOEt), and suppressive activity was observed in both the water and AcOEt layer fractions, indicating the existence of multiple bioactive components. Furthermore, suppression of histamine release by each fraction was almost completely abolished by treatment with polyphenol adsorbent polyvinylpyrrolidone. These results suggested that the pomegranate vinegar contains multiple polyphenol compounds involved in the suppression of histamine release by granulocytes.

(Received Jul. 17, 2015; Accepted Oct. 13, 2015)

Keywords : fruit vinegar, pomegranate vinegar, polyphenol, histamine release suppression, RBL-2H3
キーワード : 果実酢, ザクロ酢, ポリフェノール, ヒスタミン放出抑制, RBL-2H3

食品中には多様な生理活性物質が含まれており, なかでも, ポリフェノール化合物は, 制がん^{1)~3)}, 免疫調節^{4)~9)}, 脂質代謝調節^{10)~12)} などの多様な生理活性を示す多機能性因子である. 従って, ポリフェノール化合物に富む食品の機能性評価および活性成分の探索は, われわれの健康維持に大きく貢献すると考えられる^{13)~15)}.

生活および食習慣の変化に伴って, 近年, アレルギー患者の増加が大きな問題となっている. アレルギー反応は, 1963年にP.H.G. GellとR. Coombsによって提唱された分類法によって通常4つのタイプ(I~IV型)に分類されており¹⁶⁾, その内, アレルゲン特異的IgEの誘導と顆粒球によるケミカルメディエーターの放出(脱顆粒)を特徴とするI型アレルギーは, 花粉症や食物アレルギーの原因として多くの人を苦しめている. 脱顆粒の誘導では, 先ず肥満

細胞や好塩基球などの顆粒球に発現する高親和性IgE受容体(FcεRI)にIgEが結合し, それらが特異抗原(アレルゲン)によって架橋されることで, 細胞内シグナル伝達因子(Lyn/SykおよびPLCγなど)が順次活性化される. その結果, 小胞体膜上のカルシウムイオン(Ca²⁺)チャネルが開口して細胞質へのCa²⁺流入が促され, 細胞質内Ca²⁺濃度の上昇が脱顆粒の引き金となる¹⁷⁾. また, この抗原刺激に伴う一連のシグナル応答によって小胞体に貯蔵されたCa²⁺が枯渇すると, 小胞体に存在するCa²⁺センサーが作動し, 形質膜上のCa²⁺チャネルを介した細胞外Ca²⁺の取り込みを誘導することで持続的な脱顆粒の進行に至るとされている¹⁷⁾¹⁸⁾. 従って, 細胞質内Ca²⁺濃度の上昇は, 脱顆粒の惹起に必須の事象であり, それを誘導するシグナル分子の発現や活性, Ca²⁺チャネルの作動および細胞骨格再編

¹ 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1, ² 〒860-0082 熊本県熊本市西区池田 4-22-1

*連絡先 (Corresponding author), yamada67@bio.sojo-u.ac.jp

成などの Ca^{2+} 依存性の最終的な脱顆粒機構は、I型アレルギー治療における標的として注目されている¹⁹⁾。

脱顆粒に関わるシグナル経路の解明および脱顆粒抑制因子の探索には、培養細胞を用いた *in vitro* 試験系が有用であり、様々なヒトおよび実験動物由来の初代培養細胞および樹立細胞株が用いられてきた¹⁴⁾。なかでも、ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 は、抗原または抗体による IgE 架橋刺激によって脱顆粒が誘導される細胞株であり、数多くの研究に利用されている。一方、 Ca^{2+} チャネルの透過性を亢進させる A23187 などのカルシウムイオノフォアは、IgE 架橋刺激に伴うシグナル伝達をバイパスして直接的に細胞質内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることで脱顆粒を誘導することが知られており、脱顆粒抑制成分の探索やそれら成分の作用機構の解明に有用である。先の研究で我々は、茶ポリフェノールやフラボノイドなどの食品成分が、細胞質内 Ca^{2+} 濃度の上昇以降の脱顆粒機構を阻害することでケミカルメディエーターの一種であるヒスタミンの放出を抑制し、抗アレルギー活性を発現することを報告している⁸⁾⁹⁾²⁰⁾²¹⁾。

食酢は、調味料として古い歴史を有し、その体調節機能が注目されてきた。たとえば、食酢の主成分である酢酸を実験動物に摂食させることで、肥満や糖尿病の発症抑制、血清脂質改善および高血圧予防などの効果を発揮することが報告されている^{22)~24)}。また、黒酢においては、制がん活性が報告されている²⁵⁾²⁶⁾。通常の食酢は白米を原料として酢酸発酵を行うが、黒酢は玄米等を原料としているため、ぬか由来の生理活性成分も含まれており、抗がん作用の活性本体の一つはポリフェノール化合物であると考えられている²⁵⁾。また、酢の原料となるリンゴやブドウなどの果実には、ビタミンやミネラルに加え、さまざまな生理活性成分が含まれており、種々の果実を原料にして製造される果実酢には多様な生理活性成分が存在するものと考えられる。例として、リンゴ果汁中に存在するポリフェノール成分が抗アレルギー効果を有することが報告されている^{27)~29)}。しかしながら、果実酢のなかでも、山ブドウ、ブルーベリー、ハスカップ、ザクロを原料として製造された果実酢の体調節機能については、これまでほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、これらの果実酢の抗アレルギー効果を明らかにするため、I型アレルギー発症機構の最終段階であるヒスタミン放出に及ぼす影響を比較検討した。

実験方法

1. 果実酢試料の調製

山ブドウ酢、ブルーベリー酢、ハスカップ酢、ザクロ酢は(有)九州酢造より提供を受けた。果実酢に対する比較対照として、ミツカン社より市販されている穀物酢を使用した。これらの酢は、1 mol/L NaOH およびその希釈液を

用いて pH6 付近に調整した後、超純水を加えて原液の2倍希釈液を調製した。

2. 細胞の培養

ラット好塩基球様白血球細胞株 RBL-2H3 は、JCRB 細胞バンクより入手した。細胞は、5% ウシ胎児血清 (Biowest 社) を添加した RPMI-1640 培地を用い、5% CO_2 存在下、37°C で培養した。

3. 総ポリフェノール含量の測定

Folin-Ciocalteu's phenol reagent および没食子酸は、ナカライテスク社より購入した。上記のように pH を 6 付近に調整した各果実酢サンプルおよび検量線作成のための没食子酸溶液 (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を Nunc 社製 96 穴プレートに分注し、Folin-Ciocalteu's phenol reagent を添加した。室温で 3 分間反応させた後、40% Na_2CO_3 溶液を加え、反応を停止させた。室温で 1 時間静置した後、プレートリーダー (2104 EnVision, Perkin Elmer 社) を用いて 665 nm における吸光度を測定した。サンプル中の総ポリフェノール含量は没食子酸当量として算出した。

4. Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) 処理

フェノール性物質を吸着する性質からポリフェノール除去剤として食品製造および研究に用いられている PVPP は、ナカライテスク社より購入した。500 mg の PVPP を 50 mL 容遠沈管に入れ、超純水で膨潤させた後、1400 \times g で 10 分間遠心分離して上清を捨て、1 mol/L NaOH にて pH を 6 付近に調整したザクロ酢原液を 5 mL 加えた。4°C で 24 時間転倒攪拌した後、1400 \times g で 10 分間遠心分離して上清を回収し、超純水で膨潤させた 250 mg の PVPP に加えた。4°C で 24 時間転倒攪拌した後、1400 \times g で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。上清を凍結乾燥機 (FZ-6, Labconco 社) にて凍結乾燥した後、5 mL の超純水に再溶解したものをザクロ酢原液の PVPP 処理画分とした。また、下記ザクロ酢分画物の PVPP 処理も同様に行った。

5. Diaion HP20 を用いた分画

合成吸着樹脂 Diaion HP20 (三菱化学社) は、100% メタノール (以下、MeOH と表記) で一晚膨潤させた後、ガラスカラム (内径 4 cm) に充填し、カラム内を超純水にて置換した。充填高は 35 cm であり、充填容積は 439.8 cm^3 であった。ザクロ酢原液 (pH 3.02) 400 mL をカラムに注入し、超純水を 1600 mL、50% および 100% エタノール (以下、EtOH と表記)、100% アセトン (以下、 Me_2CO と表記) をそれぞれ 1200 mL 流して吸着物質を溶出した。溶出物をロータリーエバポレーター (東京理化工学社) を用いて濃縮した後、凍結乾燥により乾燥物を得た。乾燥物を超純水に再溶解し、1 mol/L NaOH およびその希釈液を用いて pH 6 付近に調整し、超純水を追加して pH 調整前の 2 倍希釈液を作成した。なお、水面分については、凍結乾燥において完全に乾燥しなかったため、正確な乾燥重量を測定することが出来なかった。そこで、超純水 400 mL に再

溶解することで実験当初のザクロ酢原液に近似の濃度とし、その後の実験に供した。

6. 液-液抽出

上記のザクロ酢 50% EtOH 分画物を水に溶解 (5 mg/mL) して 100 mL を分液ロートに入れ、続いて 100% 酢酸エチル以下、AcOEt と表記) 200 mL を添加した後、30 秒間はげしく攪拌して 1 分間静置する操作を 3 回行った。その後、室温にて 1 時間静置することで AcOEt 層と水層を分離した。AcOEt 層を回収した後、水層に新たな 100% AcOEt 200 mL を加え、再び同様の抽出および分離操作を行った。回収した水層は、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮した後、凍結乾燥を行い乾燥物を得た。また、AcOEt 層は合して、同様に乾燥物を得た。それぞれ得られた乾燥物を超純水に再溶解し、pH を 6 付近に調整して下記の細胞実験に用いた。

7. ヒスタミン放出試験

Tyrode 緩衝液は、NaCl 8.0145 g, KCl 0.201 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0624 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.203 g, NaHCO_3 1.008 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.265 g を超純水に溶解し、1 mol/L HCl を用いて pH 7.4 に調整後、1 L にメスアップすることで調製し、 -30°C に保存し、使用直前に常温に戻して使用した。カルシウムイオノフォア A23187 (Sigma 社) は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して -20°C で保存し、使用直前に Tyrode 緩衝液で $50 \mu\text{M}$ となるように希釈して用いた。

培養した RBL-2H3 細胞を回収し、細胞密度 2.0×10^6 cells/mL となるよう Tyrode 緩衝液に再懸濁した。エッペンドルフチューブに、Tyrode 緩衝液 0.27 mL および 20 mM CaCl_2 0.11 mL を分注し、上記で得られたサンプルもしくはコントロールとして超純水 0.11 mL を添加した。これに、0.5 mL の細胞懸濁液を加え、 37°C で 20 分間静置した後、 $50 \mu\text{M}$ A23187 を終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるように添加し、さらに 37°C で 30 分間静置した。水中に移して 5 分間静置することで反応を停止させ、 4°C 、 $300 \times g$ で 5 分間遠心分離を行った。上清 1 mL を回収し、下記の方法によりヒスタミン量を測定した。サンプル処理および脱顆粒誘導刺激の後、細胞の形態を光学顕微鏡で観察し、急性の細胞毒性が無いことを確認した。

8. ヒスタミンの定量

ヒスタミンの定量は、Shore らの方法³⁰⁾に従って実施した。1-ブタノール (BtOH) およびクロロホルム (CHCl_3) を 3:2 (v/v) の割合で混合して B-C 液を調製した。また、蛍光ラベル剤として 0.2% o-phthalaldehyde (和光純薬工業)/MeOH 溶液を使用直前に調製し、遮光下で使用した。15 mL 容のネジロガラス試験管に、ヒスタミンを含む上記の試験上清 1 mL, NaCl 0.77 g, Tyrode 緩衝液 1 mL, 5 mol/L NaOH 0.5 mL, B-C 液 5 mL を加えた。Automatic mixer S-200 (TAITEC 社) を用いて 5 分間攪拌した後、 $800 \times g$ で 10 分間遠心分離を行った。上層の有機溶媒層を

表 1 RBL-2H3 細胞のヒスタミン放出に及ぼす果実酢の影響

サンプル名	相対ヒスタミン放出量 (% of control)	総ポリフェノール含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
穀物酢	116 \pm 15	53 \pm 4
山ブドウ酢	59 \pm 3**	237 \pm 3
ハスカップ酢	65 \pm 4**	918 \pm 33
ブルーベリー酢	54 \pm 6**	732 \pm 31
ザクロ酢	-4 \pm 6***	1778 \pm 12

結果は、無添加区 (control) の平均値を 100 とした時の相対値で示した (mean \pm SD, $n=3$)。統計処理は、対照 (穀物酢) 区に対して、Student's *t*-検定により行った (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

4 mL 回収し、予め 0.1 mol/L HCl 1.5 mL およびヘプタン (C_7H_{16}) 2 mL を分注した 15 mL 容ネジロガラス試験管に添加した。Automatic mixer S-200 で 5 分間攪拌した後、 $800 \times g$ で 10 分間遠心分離を行った。下層の HCl 層を 1 mL を回収し、予め 1 mol/L NaOH 0.15 mL を分注したガラス試験管に添加した。これに 0.2% o-phthalaldehyde/MeOH 溶液 0.1 mL を加えて攪拌し、室温で 5 分間静置して反応させた。次に、0.5 N H_2SO_4 0.14 mL を加えて反応を停止させ、氷上で 30 分間静置した。蛍光強度の測定は、分光蛍光度計 RF-1500 (島津製作所) を用い、励起波長 360 nm、蛍光波長 440 nm にて測定した。

9. 統計処理

統計処理には Student's *t*-検定を用い、有意差検討を行った。

実験結果

1. 果実酢のヒスタミン放出抑制活性

はじめに、RBL-2H3 細胞のカルシウム流入刺激に伴うヒスタミン放出に及ぼす穀物酢および各種果実酢の影響を検討した (表 1)。その結果、対照として用いた穀物酢の存在下では、無添加区と同等のヒスタミン放出が認められたのに対して、果実酢を添加した場合のヒスタミン放出量は、穀物酢と比較していずれも有意に低い値を示した。なかでも、ザクロ酢の存在下では、ヒスタミン放出が完全に抑制された。

同様のヒスタミン放出抑制活性がカテキン類やフラボノイドなどのポリフェノール類に報告されていることから、各試料中の総ポリフェノール含量を測定した (表 1)。その結果、ザクロ酢のポリフェノール含量が最も高く、穀物酢の 30 倍以上のポリフェノールを含んでいた。また、ハスカップ酢およびブルーベリー酢のポリフェノール含量は穀物酢の 10 倍以上であり、山ブドウ酢のポリフェノール含量は穀物酢の 4 倍程度であった。従って、ザクロ酢の高いヒスタミン放出抑制活性は、ポリフェノール化合物に起因する可能性が高いものと推察されたが、ポリフェノール含量が比較的低い山ブドウ酢がハスカップ酢やブルーベリー酢と同等の抑制活性を示したことから、ポリフェノールの

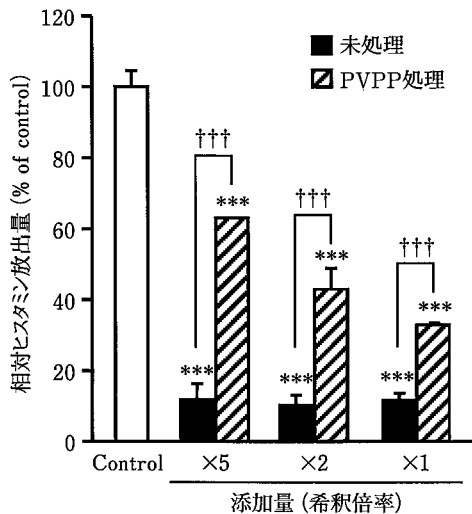


図1 ギャクロ酢のヒスタミン放出抑制活性に及ぼすPVPP処理の影響

結果は、無添加区 (control) の平均値を100とした時の相対値で示した (mean±SD, n=3). *** p <0.001 (control vs 各サンプル), ††† p <0.001 (未処理 vs PVPP処理) (Student's t -test).

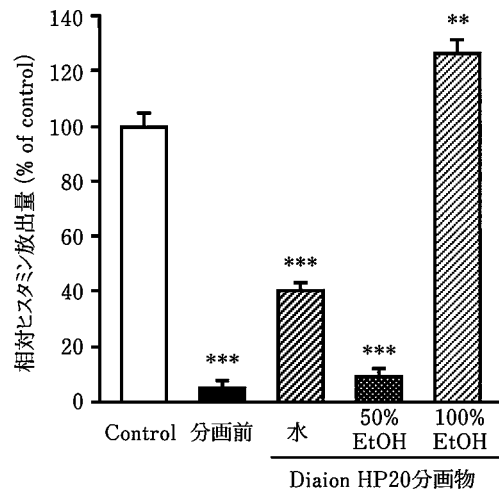


図2 RBL-2H3細胞のヒスタミン放出に及ぼすギャクロ酢のDiaion HP20分画物の影響

分画前サンプルおよび水画分は原液, 50% EtOH画分および100% EtOH画分は終濃度100 μ g/mLにて試験を実施した. 結果は、無添加区 (control) の平均値を100とした時の相対値で示した (mean±SD, n=3). 統計処理は、無添加区に対して、Student's t -検定により行った (** p <0.01, *** p <0.001).

組成もまた重要であると考えられた. そこで本研究では、最も強いヒスタミン放出抑制活性が認められたギャクロ酢について、ポリフェノール成分に着目して以降の検討を進めた.

2. ギャクロ酢のヒスタミン放出抑制作用と活性成分

まず、ギャクロ酢のヒスタミン放出抑制活性におけるポリフェノール成分の関与を明確にするため、ポリフェノール吸着剤であるPVPPを用いてギャクロ酢中のポリフェノールを除去し、ヒスタミン放出抑制活性の比較測定を行った. 図1に示すように、未処理のギャクロ酢では希釈倍率に関わらずほぼ同等の強いヒスタミン放出抑制活性を認めた. 一方、ギャクロ酢のヒスタミン放出抑制活性は、PVPP処理によって顕著に減弱したものの、controlと比較すると、濃度依存かつ有意なヒスタミン放出抑制が観察された. これにより、ギャクロ酢のヒスタミン放出抑制作用の発現にポリフェノール化合物が関与することが示唆されたが、PVPP処理により除去されない活性成分も存在するものと考えられた.

3. ギャクロ酢中のヒスタミン放出抑制成分の分画

次に、上記のギャクロ酢を処理することでPVPPに吸着したポリフェノール成分の回収を試みたが、PVPPと吸着物との結合は強固であり、生理活性成分を溶離することはできなかった. そこで、より温和なポリフェノール吸着物質である合成吸着樹脂Diaion HP20を用いてポリフェノール成分の分離を試みた. Diaion HP20は、種々のポリフェノール化合物を吸着するが、EtOH濃度を変えることで吸着物を分別して溶離させることができ³⁾、ポリフェノール化合物の多くは50%以下のEtOH濃度で溶離する. そこ

で、Diaion HP20を充填したカラムにギャクロ酢を添加した後、水、50% EtOH、100% EtOH、100% Me₂COの4種類の溶媒で連続的に溶出した. その結果、非吸着成分が含まれる水画分の回収量が最も多く、水画分は完全な乾燥物が得られず厳密な収量を求めることが出来なかったが、約98%の成分が水画分に回収された. また、50% EtOH画分に1%、100% EtOH画分に0.1%、100% Me₂CO画分に0.2%が回収された.

各分画物のヒスタミン放出に及ぼす影響を検討した結果、ポリフェノール成分が溶出されたと考えられる50% EtOH画分に最も強いヒスタミン放出抑制活性が認められた (図2). また、Diaion HP20吸着物質の大部分を占める水画分も、50% EtOH画分に比べると弱いものの、有意なヒスタミン放出抑制活性を示し、非ポリフェノール化合物の中にも活性成分が存在することが再確認された. しかし、50% EtOH画分を水画分と同様の操作で終濃度100 μ g/mLに調製するためには、計算上、400mLの水に溶解した原液を更に数10倍に希釈する必要があることから、上記試験で認められたギャクロ酢の脱顆粒抑制活性において、50% EtOH溶出成分の寄与が最も高いものと推察された. 一方、100% EtOH画分には抑制活性は認められず、ヒスタミン放出量はむしろ増加していた. また、100% Me₂CO溶出画分では、ヒスタミン放出に対する影響が全く認められなかった (data not shown).

4. Diaion HP20分画物の液-液抽出

続いて、液-液抽出法を用いて生理活性物質のさらなる分画を行った. 500mgの50% EtOH溶出物を液-液抽出に供し、AcOEt層に62.2mg、水層に393.6mgが回収され

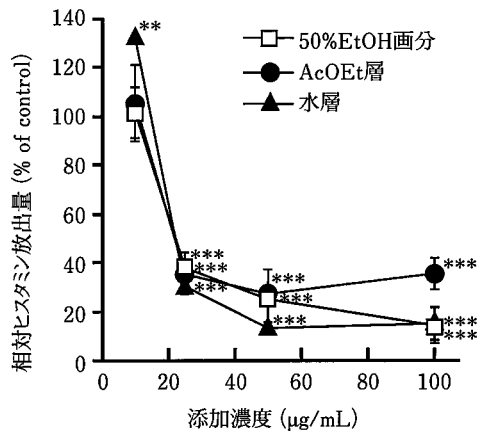


図 3 RBL-2H3 細胞のヒスタミン放出に及ぼす 50% EtOH 溶出画分とその液-液抽出物の影響

各サンプルは、図中に示す終濃度 (10~100 μg/mL) にて試験を実施した。結果は、無添加区 (control) の平均値を 100 とした時の相対値で示した (mean±SD, n=3)。統計処理は、無添加区に対して、Student's *t*-検定により行った (***p* < 0.01, ****p* < 0.001)。

た。これらの抽出乾燥物を再溶解してヒスタミン放出に及ぼす影響について検討した結果、いずれの場合も終濃度 10 μg/mL では抑制活性を示さず、25 μg/mL 以上で有意にヒスタミンの放出を抑制した (図 3)。また、高濃度領域では、水層抽出物がより強い抑制活性を示した。

さらに、それぞれ PVPP 処理を行った後にヒスタミン放出抑制活性を測定した結果、いずれの試料においても PVPP 処理によってほぼ完全に活性が消失することが明らかとなった (図 4)。これらの結果から、ザクロ酢には溶解性の異なる生理活性成分が混在していることが示唆され、特に、ザクロ酢中の水溶性ポリフェノール化合物がヒスタミン放出の抑制に大きく寄与するものと推察された。

考 察

食酢は調味料として古くから利用されており、食塩の添加量を抑えることができるので高血圧や胃がんの予防に効果的である。また、その主成分である酢酸は、肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧などの疾病に対する予防効果が注目されている^{22)~24)}。日本で利用されている食酢の多くは、白米を原料とする穀物酢であるが、他の素材を用いた食酢も健康志向食品として利用されており、果実を醸造原料とする種々の果実酢が、日本だけでなく世界中で製造されている。欧米では、特にリンゴ酢や赤ワイン酢が古くから利用され、それらの果実酢が抗アレルギー活性や血圧低下作用などを有することが報告されている。なかでも、リンゴ酢中に存在すると考えられるポリフェノール成分の抗アレルギー効果が注目されている²⁷⁾²⁸⁾。本研究では、山ブドウ、ブルーベリー、ハスカップおよびザクロを原料として製造された果実酢のヒスタミン放出抑制活性について検討

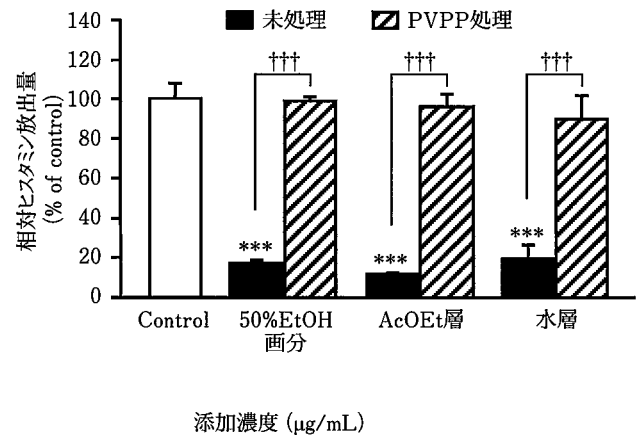


図 4 50% EtOH 溶出画分とその液-液抽出物のヒスタミン放出抑制効果に及ぼす PVPP 処理の影響

結果は、無添加区 (control) の平均値を 100 とした時の相対値で示した (mean±SD, n=3)。****p* < 0.001 (control vs 各サンプル), †††*p* < 0.001 (未処理 vs PVPP 処理) (Student's *t*-test)。

し、なかでもザクロ酢が強いヒスタミン放出抑制効果を有することを明らかにした。

果実酢の原料となる果実には、多様なポリフェノール成分が含まれており、ヒスタミンやロイコトリエンの放出抑制を通じて抗アレルギー作用を発揮することが知られている⁹⁾²⁹⁾。本研究で検討した結果、ザクロ酢のヒスタミン放出抑制活性がフェノール性成分を吸着する PVPP で処理することで大きく減弱すること、Diaion HP20 樹脂に吸着し 50% EtOH によって溶出される画分に強いヒスタミン放出抑制活性が回収されること³⁰⁾、また、この画分の抑制活性が PVPP 処理によってほぼ完全に失われたことなどから、ザクロ酢に含まれるポリフェノール化合物がヒスタミン放出抑制作用における主要な生理活性成分であることが示唆された。

ザクロ酢の原料であるザクロ果実には、生理活性成分として種々のポリフェノール成分が存在している³²⁾。その内、ケルセチン、ルテオリンおよびエビガロカテキン 3-ガレート (EGCG) については、今回の試験と同様に、A23187 誘導性のヒスタミン放出に対する抑制活性が報告されており⁸⁾²⁰⁾³³⁾、Ca²⁺ 細胞質流入以降の脱顆粒誘導機構に作用してヒスタミン放出の抑制に働いた可能性があると考えられた。一方、EGCG やデルフィニジンは、ヒト肥満細胞株 HMC-1 における IgE 受容体 FcεRI の発現を抑制することが報告されており³⁴⁾、ヒスタミン放出誘導シグナルの最上流に対して作用することが示唆されている。従って、いくつかのポリフェノール成分については、複数の作用点に働きかけることで脱顆粒の抑制に寄与し得るものと推察された。

加えて、ザクロ酢を PVPP で処理してもヒスタミン放出抑制活性が完全には消失しなかったことから、ザクロ酢に

は非ポリフェノール性の生理活性成分も存在することが示唆された。ザクロ酢には複数のヒスタミン放出抑制物質が存在することから、それらの生理活性成分の相加あるいは相乗効果により、他の果実酒と比較してより強い生理活性を示した可能性が考えられた。

ザクロ酢のヒスタミン放出抑制機能における作用機構を解明するためには、生理活性成分の分離同定が不可欠である。今後は、さらに精製を進めて生理活性物質の同定を試みると共に、脱顆粒に関わる細胞内シグナル伝達経路における作用点の検討および生体内効果の確認などを行う必要がある。

要 約

本研究では、食酢の体調調節機能の解明を目的として、各種果実酢のヒスタミン放出抑制活性について検討した。まず、山ブドウ、ハスカップ、ブルーベリー、ザクロを原料とする4種類の果実酢がラット好塩基球様白血病細胞株 RBL-2H3 のヒスタミン放出に及ぼす影響を検討したところ、各果実酢がヒスタミン放出抑制活性を有することが明らかとなり、特にザクロ酢で極めて強い活性が認められた。そこで、Diaion HP20 を用いてザクロ酢中の生理活性成分のクロマト分離を試みた結果、50% EtOH 溶出画分に強いヒスタミン放出抑制活性が認められた。さらに、本50% EtOH 溶出画分を液-液抽出によって分画し、ザクロ酢には水溶性の異なる複数のヒスタミン放出抑制成分が存在することを明らかにした。また、各画分のヒスタミン放出抑制活性が PVPP で処理することによってほぼ完全に消失したことから、ポリフェノール化合物が主要な活性成分であることが示唆された。これらの結果から、ザクロ酢にはヒスタミン放出抑制に寄与する複数のポリフェノール成分が存在し、他の食酢と比較して強い抗アレルギー作用を発揮する可能性があることが示唆された。

文 献

- 1) Gorlach, S., Fichna, J. and Lewandowska, U., Polyphenols as mitochondria-targeted anticancer drugs. *Cancer Lett.*, **366**, 141-149 (2015).
- 2) Turrini, E., Ferruzzi, L. and Fimognari, C., Potential effects of pomegranate polyphenols in cancer prevention and therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, Article ID938475 (2015).
- 3) Diaconeasa, Z., Leopold, L., Ruginã, D., Ayvaz, H. and Socaciu, C., Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 2352-2365 (2015).
- 4) Molina, N., Bolin, A.P. and Otton, R., Green tea polyphenols change the profile of inflammatory cytokine release from lymphocytes of obese and lean rats and protect against oxidative damage. *Int. Immunopharmacology*, **28**, 985-996 (2015).
- 5) Karuppagounder, V., Arumugam, S., Thandavarayan, R.A., Pitchaimani, V., Sreedhar, R., Afrin, R., Harima, M., Suzuki,

- H., Nomoto, M., Miyashita, S., Suzuki, K. and Watanabe, K., Resveratrol attenuates HMGB1 signaling and inflammation in house dust mite-induced atopic dermatitis in mice. *Int. Immunopharmacology*, **23**, 617-623 (2014).
- 6) Li, L., Wang, L., Wu, Z., Yao, L., Wu, Y., Huang, L., Liu, K., Zhou, X. and Gou, D., Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis. *Scientific Reports*, **4**, Article ID6234 (2014).
- 7) Seong, A.R., Yoo, J.Y., Choi, K., Lee, M.H., Lee, Y.H., Lee, J., Jun, W., Kim, S. and Yoon, H.G., Delphinidin, a specific inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses inflammatory signaling via prevention of NF- κ B acetylation in fibroblast-like synoviocyte MH7 A cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **410**, 581-6 (2011).
- 8) Matsuo, N., Yamada, K., Shoji, K., Mori, M. and Sugano, M., Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: The structure-inhibitory activity relationship. *Allergy*, **52**, 58-64 (1997).
- 9) Yamada, K., Shoji, K., Mori, M., Ueyama, T., Matsuo, N., Oka, S., Nishiyama, K. and Sugano, M., Structure-activity relationship of polyphenols on inhibition of chemical mediator release from rat peritoneal exudate cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, **35**, 169-174 (1999).
- 10) Chen, S., Zhao, X., Ran, L., Wan, J., Wang, X., Qin, Y., Shu, F., Gao, Y., Yuan, L., Zhang, Q. and Mi, M., Resveratrol improves insulin resistance, glucose and lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Dig. Liver Dis.*, **47**, 226-232 (2015).
- 11) Sun, X., Yamasaki, M., Katsube, T. and Shiwaku, K., Effects of quercetin derivatives from mulberry leaves: Improved gene expression related hepatic lipid and glucose metabolism in short-term high-fat fed mice. *Nutr. Res. Pract.*, **9**, 137-143 (2015).
- 12) Hernández, Á., Remaley, A.T., Farràs, M., Fernández-Castillejo, S., Subirana, I., Schröder, H., Fernández-Mampel, M., Muñoz-Aguayo, D., Sampson, M., Solà, R., Farré, M., de la Torre, R., López-Sabater, M.C., Nyyssönen, K., Zunft, H.J., Covas, M.I. and Fitó, M., Olive oil polyphenols decrease LDL concentrations and LDL atherogenicity in men in a randomized controlled trial. *J. Nutr.*, **145**, 1692-1697 (2015).
- 13) Khan, N. and Mukhtar, H., Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci.*, **81**, 519-533 (2007).
- 14) Finn, D.F. and Walsh, J.J., Twenty-first century mast cell stabilizers. *Br. J. Pharmacology*, **170**, 23-37 (2013).
- 15) Fang, J., Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition*, **31**, 1301-1306 (2015).
- 16) Coombs, R.R. A. and GELL, P.G. H., The classification of allergic reactions underlying disease. In "Clinical Aspects of Immunology, 1st ed." (Blackwell), pp. 317-337 (1963).
- 17) Wernersson, S. and Pejler, G., Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 478-494 (2014).
- 18) Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M. and Kurosaki, T., Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat. Immunol.*, **9**, 81-88 (2008).
- 19) Harvima, I.T., Levi-Schaffer, F., Draber, P., Friedman, S., Polakovicova, I., Gibbs, B.F., Blank, U., Nilsson, G. and Maurer, M., Molecular targets on mast cells and basophils for novel therapies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **134**, 530-544 (2014).
- 20) Fujimura, Y., Umeda, D., Kiyohara, Y., Sunada, Y., Yamada,

- K. and Tachibana, H., The involvement of the 67 kDa laminin receptor-mediated modulation of cytoskeleton in the degranulation inhibition induced by epigallocatechin-3-O-gallate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 524-531 (2006).
- 21) 山田耕路, 澤 智子, 村山加奈子, 山口 智, 宮崎義之, 立花宏文, 不知火姫菊の花弁および葉抽出液のヒスタミン放出抑制効果. 日本食品科学工学会誌, **59**, 394-400 (2012).
- 22) Yamashita, H., Fujisawa, K., Ito, E., Idei, S., Kawaguchi, N., Kimoto, M., Hiemori, M. and Tsuji, H., Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1236-1243 (2007).
- 23) Fushimi, T., Suruga, K., Oshima, Y., Fukihara, M., Tsukamoto, Y. and Goda, T., Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet. *Brit. J. Nutri.*, **95**, 916-924 (2006).
- 24) Kondo, S., Tayama, K., Tsukamoto, Y., Ikeda, K. and Yamori, Y., Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2690-2694 (2001).
- 25) Nanda, K., Miyoshi, N., Shimoji, Y., Tamura, Y., Nishikawa, Y., Uenakai, K., Kohno, H. and Tanaka, T., Extract of vinegar "Kurosu" from unpolished rice inhibits the proliferation of human cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **23**, 69-75 (2004).
- 26) Shimoji, Y., Sugie, S., Kohno, H., Tanaka, T., Nanda, K., Tamura, Y., Nishikawa, Y., Hayashi, R., Uenakai, K. and Ohigashi, H., Extract of vinegar "Kurosu" from unpolished rice inhibits the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **22**, 591-597 (2003).
- 27) Tokura, T., Nakano, N., Ito, T., Matsuda, H., Nagasako-Akazome, Y., Kanda, T., Ikeda, M., Okumura, K., Ogawa, H. and Nishiyama, C., Inhibitory effect of polyphenol-enriched apple extracts on mast cell degranulation in vitro targeting the binding between IgE and FcεRI. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1974-1977 (2005).
- 28) Zuercher, A.W., Holvoet, S., Weiss, M. and Mercenier, A., Polyphenol-enriched apple extract attenuates food allergy in mice. *Clin. Exp. Allergy*, **40**, 942-950 (2010).
- 29) Nakano, N., Nishiyama, C., Tokura, T., Nagasako-Akazome, Y., Ohtake, Y., Okumura, K. and Ogawa, H., Procyanidin C1 from apple extracts inhibits FcεRI-mediated mast cell activation. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **147**, 213-221 (2008).
- 30) Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohn, V.H., A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127**, 182-186 (1959).
- 31) 松尾友明, 高津友子, 伊藤三郎, 合成多孔性樹脂の園芸生産物への利用 1. ポリフェノール成分の吸着と回収, 鹿児島大学農学部学術報告, **33**, 21-28 (1983).
- 32) Lansky, E.P. and Newman, R.A., Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. Ethnopharmacol.*, **109**, 177-206 (2007).
- 33) Kimata, M., Shichijo, M., Miura, T., Serizawa, I., Inagaki, N. and Nagai, H., Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin. Exp. Allergy*, **30**, 501-508 (2000).
- 34) Tamura, S., Yoshihira, K., Fujiwara, K. and Murakami, N., New inhibitors for expression of IgE receptor on human mast cell. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 2299-2302 (2010).

(平成 27 年 7 月 17 日受付, 平成 27 年 10 月 13 日受理)