

# 大豆イソフラボンのアレルギー関連メディエーター放出抑制作用 に関する研究

高杉美佳子\*<sup>1</sup>・島田和子<sup>1</sup>・山田耕路<sup>2</sup>

<sup>1</sup>山口県立大学生生活科学部 <sup>2</sup>九州大学大学院農学研究院

## Studies on Inhibitory Effect of Soy Isoflavones on Release of Allergy-related Mediators from Rat Peritoneal Exudate Cells

Mikako TAKASUGI<sup>1</sup>, Kazuko SHIMADA<sup>1</sup> and Koji YAMADA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Human Life Science, Yamaguchi Prefectural University, Yamaguchi 753-8502

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

### ABSTRACT

Effect of soy isoflavones and their derivative equol on release of allergy-related mediators from rat peritoneal exudates cells (PEC) were examined. One hundred  $\mu$ M of soy isoflavones and equol had no effect on histamine release from rat PEC. Though soy isoflavone glycosides, daizin and genistin did not have effect on leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) release from rat PEC, their aglycon, daizein and genistein inhibit LTB<sub>4</sub> release at 100  $\mu$ M. The inhibitory effect of genistein was greater than that of daizein. One hundred  $\mu$ M of equol inhibited LTB<sub>4</sub> release completely, and the effect was dose-dependent. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 99-102, 2002.

Key words : soy isoflavone, allergy, histamine, leukotriene B<sub>4</sub>

花粉症や食物アレルギーの罹患率が増加傾向にあり、その対応が急務となっている。花粉症や食物アレルギーはI型アレルギーに分類される。I型アレルギーは、アレルゲン特異的IgE抗体二分子が肥満細胞表面上の高親和性IgE受容体に結合し、新たに侵入したアレルゲンにより架橋され、ヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターが放出されることにより発症する<sup>1)</sup>。これらの一連の過程のいずれかを阻害することによりアレルギー症状が緩和されると考えられ、コルチコステロイド、エビネフリン、ヒスタ

ミン拮抗剤、ロイコトリエン合成阻害剤などがアレルギーの治療において利用されている<sup>2)</sup>。またこれらの薬品に加えて、茶ポリフェノールであるエピガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、エピガロカテキン、フラボノイドの一種であるケンフェロール、ケルセチン、ミリセチン、ルテオリンなどにもケミカルメディエーター放出阻害活性が見出されている<sup>3)</sup>。

食品中には種々の生体機能調節因子が存在しており、これらの因子を含む食品の摂取が生体機能の維持、疾病予防、体質改善をもたらすという概念が提唱されている。大豆イソフラボンは抗ガン作用、骨粗鬆症予防作用などが見出されており、生体機能調節作用が期

\*〒753-8502 山口市桜島3-2-1

待される食品成分の一つである<sup>4,6)</sup>。茶ポリフェノールなどと同じフラボノイドの一種である大豆イソフラボンがケミカルメディエーター放出抑制活性を有する可能性があると考えられた。そこで本研究では、大豆イソフラボンであるゲニスチン、ダイジン、ゲニステイン、ダイゼイン、およびこれらの代謝産物であるエクオールについてヒスタミンおよびロイコトリエン<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 放出抑制効果を検討した。

## 方 法

### 実験材料と試薬

大豆イソフラボンはゲニスチン、ダイジン、ゲニステインおよびダイゼインをフジッコより、エクオールをApin Chemicalsより購入した。イソフラボンは最も濃い場合で終濃度100 μMとなるように調製したが、ゲニスチンは溶解度が低かったため終濃度10 μMとして実験に用いた。カルシウムイオノフォアA23187、LTB<sub>4</sub>およびヒスタミンジヒドロ塩酸塩はSigmaより、プロスタグランジンB<sub>2</sub> (PGB<sub>2</sub>) はCayman Chemical Companyより、*o*-フタルアルデヒド (OPA) はナカライテスクより購入した。タイロド緩衝液 (pH 7.4) は137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> となるように調製した。

### ラット腹腔内渗出細胞 (PEC) の調製

Sprague-Dawley系雄ラット (8~10週齢) の腹腔に0.1% D-グルコース, 0.1%魚ゼラチン (Sigma) および0.1%ウシ血清アルブミンを含むタイロド緩衝液を注入し、渗出細胞を回収した。総細胞数が $2 \times 10^6$  cells/mLとなるようにタイロド緩衝液に再懸濁し、肥満細胞として実験に用いた<sup>7)</sup>。

### ヒスタミンの測定

$1 \times 10^6$  cellsのPECに1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 μMカルシウムイオノフォアA23187, 100 μMの濃度の大豆イソフラボン (ゲニスチンは10 μM) を加え, 37°Cで20分間反応させた後, 4°C, 200×gで5分間遠心分離し, 上清を回収した。上清中のヒスタミン量を蛍光法で測定した<sup>8)</sup>。ヒスタミン放出量は, 細胞中の総ヒスタミン量からカルシウムイオノフォアA23187を加えていないときの放出量を差し引いたものを100%としたときの相対放出量として表した。総ヒスタミン量の測定にはPECを超音波破碎して遠心分離した上清を用いた。

### LTB<sub>4</sub>の測定

LTB<sub>4</sub>の測定はMatsuo *et al.*<sup>7)</sup>の方法に準じて行った。 $2 \times 10^6$  cellsのPECに1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 μMカルシウム

イオノフォアA23187, 種々の濃度の大豆イソフラボンを含むタイロド緩衝液50 μLを加え, 37°Cで20分間反応させた。内部標準となるPGB<sub>2</sub> (250 ng) を含むアセトニトリル-メタノール混合液 (6 : 5, vol/vol) 50 μLを加えて反応を停止させ, 0°C, 9,000×gで10分間遠心分離した上清中のLTB<sub>4</sub>量を高速液体クロマトグラフィーで分析した。

### 統計処理

実験結果の統計処理にはDuncanのnew multiple range testを用いた<sup>9)</sup>。

## 結果と考察

大豆イソフラボンを終濃度10または100 μMでPECに添加し, カルシウムイオノフォアA23187で刺激したときに細胞外に放出されたヒスタミン量を測定した (Fig. 1)。その結果, 10 μMゲニスチンでわずかにヒスタミン放出量が増加する傾向を示したものの, 顕著なヒスタミン放出調節作用は認められなかった。

大豆イソフラボンを終濃度10または100 μMでPECに添加し, カルシウムイオノフォアA23187で刺激した時に細胞外に放出されたLTB<sub>4</sub>濃度を測定した。カルシウムイオノフォアA23187のみをPECに添加し, そのときに放出されたLTB<sub>4</sub>量を1とした相対放出量をFig. 2に示した。大豆イソフラボンの配糖体であるダイジンおよびゲニスチンは終濃度100あるいは10 μMにおいてPECからのLTB<sub>4</sub>放出に大きな影響を及ぼさなかった。また, これらのアグリコンであるダイゼインを終

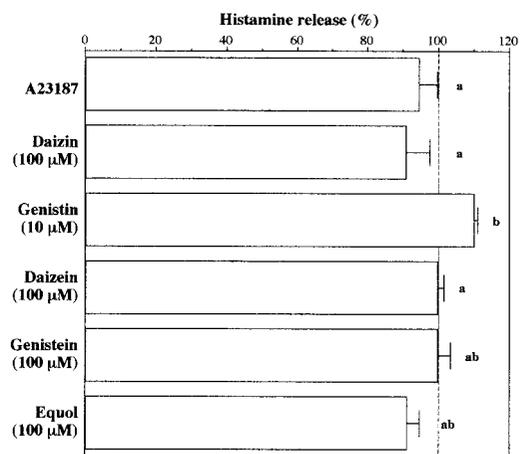


Fig. 1. Effect of soy isoflavones on histamine release from rat PEC. Results are means  $\pm$  SE (n=3 or 4). Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$ .

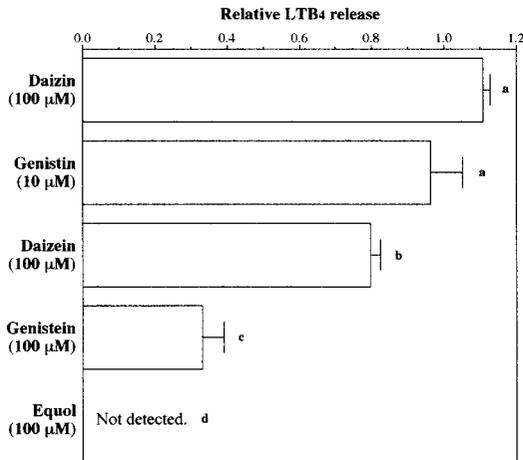


Fig. 2. Effect of soy isoflavones on LTB<sub>4</sub> release from rat PEC. Results are means ± SE (n=3 or 4). Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$ .

濃度100 μMでPECに添加した場合はLTB<sub>4</sub>放出量を79%に抑制し、ゲニステインを添加した場合にはLTB<sub>4</sub>放出量を33%に抑制した。大豆イソフラボンの代謝産物であるエクオールを終濃度100 μMでPECに添加し、カルシウムイオノフォアA23187で刺激した場合、LTB<sub>4</sub>放出を完全に抑制した。

さらにこれらの大豆イソフラボンのLTB<sub>4</sub>放出調節作用における濃度依存性を検討した。その結果、ダイゼインおよびゲニステインは、終濃度10 μM以下ではLTB<sub>4</sub>放出調節作用が認められなかった（結果は示さず）。

一方、エクオールは添加濃度に依存してLTB<sub>4</sub>放出を抑制し、終濃度10 μMでは54%、1 μMでは69%にそれぞれ抑制し、終濃度0.1 μMでも抑制傾向を示した（Fig. 3）。

以上の結果は大豆イソフラボンアグリコンおよびその代謝産物であるエクオールがLTB<sub>4</sub>放出抑制作用を

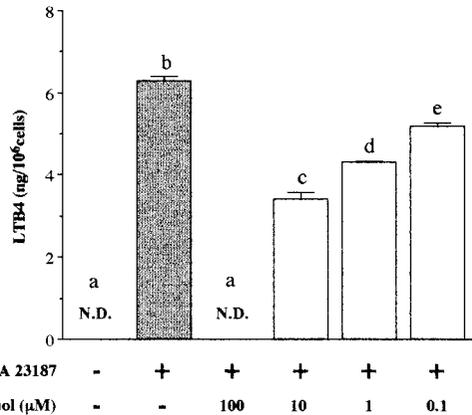


Fig. 3. Dose-dependent effect of equol on LTB<sub>4</sub> release from rat PEC. Results are means ± SE (n=3 or 4). Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$ . N.D.; not detected.

通じて抗アレルギー効果をもたらす可能性を示唆するものである。今回の実験では大豆イソフラボン配糖体は顕著なLTB<sub>4</sub>放出調節作用を示さなかったが、生体内に取り込まれたイソフラボン配糖体はアグリコンおよびその代謝産物のエクオールまで代謝されるため、大豆イソフラボン類を摂取することにより抗アレルギー効果が得られる可能性が高い。LTB<sub>4</sub>は、細胞膜リン脂質のアラキドン酸から5-リポキシゲナーゼ（5-LOX）の作用により生成される。5-LOXによる反応は、その過程でラジカルを発生し、ヒドロペルオキシドを生成する<sup>10</sup>。大豆イソフラボンにはフリーラジカル捕捉作用を含む抗酸化作用が報告されている<sup>11</sup>。本実験において、大豆イソフラボンはヒスタミン放出調節作用を有しておらず、LTB<sub>4</sub>放出抑制作用のみが認められたことから、大豆イソフラボンは抗酸化活性を通じてLTB<sub>4</sub>放出抑制作用を発現していると考えられるが、詳しいメカニズムについてはさらなる検討を要する。

## 要 約

大豆イソフラボンおよびその代謝物であるエクオールのアレルギー関連メディエーター放出に及ぼす影響について検討した。大豆イソフラボンおよびエクオールは終濃度100 μMでPECからのヒスタミン放出に影響を及ぼさなかった。大豆イソフラボンの配糖体であるダイゼインおよびゲニステインはPECからのLTB<sub>4</sub>放出に影響を及ぼさなかったが、アグリコンであるダイゼインおよびゲニステインは終濃度100 μMでPECからのLTB<sub>4</sub>放出を抑制し、その程度はゲニステインの方が強かった。また、エクオールは終濃度100 μMでLTB<sub>4</sub>放出を完全に抑制し、その効果は添加濃度に依存していた。

## 文 献

- 1) Metcalfe DD (1991) : Food allergy. *Curr Opin Immunol*, **3**, 881-886.
- 2) Bochner BS and Lichtenstein LM (1991) : Anaphylaxis. *N Engl J Med*, **324**, 1785-1790.
- 3) Yamada K, Tachibana H, Matsuo N, Nishiyama K and Sugano M (1999) : Structure-activity relationship of immunoregulatory factors in foodstuffs. *Food Sci Technol Res*, **5**, 1-8.
- 4) Stephen B (1995) : Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr*, **125**, 777S-783S.
- 5) 森田恭子, 濱松由子, 木戸慎介, 竹谷 豊, 宮本賢一, 武田英二 (1999) : 大豆由来イソフラボンによる骨代謝調節機序. 大豆たん白質研究, **2**, 76-82.
- 6) 松崎 茂, 佐賀 烈, 市村 薫 (1999) : 大豆に含まれる骨粗鬆症の予防に有効な成分についての研究. 大豆たん白質研究, **2**, 83-87.
- 7) Matsuo N, Yamada K, Yamashita K, Shoji K, Mori M and Sugano M (1996) : Inhibitory effect of tea polyphenols on histamine and leukotriene B<sub>4</sub> release from rat peritoneal exudate cells. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal*, **32**, 340-344.
- 8) Tachibana H, Sunada Y, Miyase T, Sano M, Maeda-Yamamoto M and Yamada K (2000) : Identification of a methylated tea catechin as an inhibitor of degranulation in human basophilic KU812 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**, 452-454.
- 9) Duncan DB (1955) : Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, **11**, 1-42.
- 10) Chamulitrat W and Mason RP (1989) : Lipid peroxy radical intermediates in the peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenase. *J Biol Chem*, **264**, 20968-20973.
- 11) Fukushima D (2001) : Recent progress in research technology on soybeans. *Food Sci Technol Res*, **7**, 8-16.