

大豆イソフラボン類による食物アレルギー性消化器症状の治療効果

山本 武*・門脇 真

富山大学和漢医薬学総合研究所消化管生理学分野

Therapeutic Effect of Soy Isoflavones on Food Allergy Model Mice with Gastrointestinal Symptoms

Takeshi YAMAMOTO* and Makoto KADOWAKI

Division of Gastrointestinal Pathophysiology, Institute of Natural Medicine,
University of Toyama, Toyama 930-0194

ABSTRACT

Over the last some decades, the prevalence of food allergic diseases has been dramatically increasing in advanced countries. However, there is no effective drug for food allergies. We previously reported that Kakkonto has a potential of a therapeutic drug for treatment of food allergic symptoms induced by the disruption of intestinal mucosal immunity. Isoflavones are the major bioactive composition of Kakkonto and they are metabolized to analog of isoflavones by mammalian intestinal flora. Here, we evaluated the effects of soy isoflavones on food allergy model mice with gastrointestinal symptoms. *Methods*: BALB/c mice were systemically sensitized twice with ovalbumin (OVA) and then were repeatedly given OVA by oral intubation (FA mice). Soy isoflavones was orally administered before OVA challenges. *Results*: The FA mice developed food allergic diarrhea after repeated oral challenge with OVA. Several soy isoflavones suppressed the occurrence of allergic diarrhea in the FA mice. In particular, the administration of genistin significantly reduced the incidence of OVA-induced diarrhea. Furthermore, the expressions of IL-4 mRNA and mouse mast cell protease-1 mRNA were significantly upregulated in the proximal colons of the FA mice, which were reduced by genistin. *Conclusion*: Genistin and soy isoflavones have a potential of a therapeutic drug for treatment of food allergic symptoms induced by the disruption of intestinal mucosal immunity. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 102-106, 2011.

Key words : food allergy, diarrhea, intestinal mucosal immunity, isoflavone

*〒930-0194 富山市杉谷2630

近年、我国で急増し新たな国民病とまでいわれているアレルギー性疾患にはアトピー性皮膚炎、ぜんそくなど様々な臓器で多様な症状を発症する疾患が知られており、多くの疫学的な調査研究や基礎研究が精力的に進められている。しかし、様々なアレルギー性疾患が連続して発症する「アレルギーマーチ」の引き金となる疾患である食物アレルギーについては、その詳細な発症機序・病態形成機序の全貌は未だ明らかでなく、未だ有用な治療薬も殆どない。従って、世界的にも基礎研究に基づく治療法の開発が強く求められている。この現状の打開のために、著者はこれまでに、ヒト類似の消化器症状を発症する食物アレルギー性消化器症状発症モデルマウスを用い、病態解析を行い報告している^{1,2)}。さらに、治療薬の探索を行い葛根湯が食物アレルギー性消化器症状に有用であることを明らかにしている¹⁾。

7つの生薬の抽出物により構成されている葛根湯のなかでも、葛根が食物アレルギー性消化器症状に対して主要な治療作用を有することを明らかにしており、葛根は主成分としてPuerarinやDaidzinを含んでいる。また、これらイソフラボンは腸内細菌によりDaidzeinやEquol等に代謝される³⁾。従って、食物アレルギー性消化器症状に対し、これらイソフラボン類の有効性が推測される。これまでに大豆イソフラボン類に対し、様々な生理活性・薬理作用が報告されている。アレルギー性疾患に対しても疫学的調査によりDaidzeinとGenisteinはアレルギー性鼻炎の発症抑制に関与することが報告されている⁴⁾。

そこで本研究では、より有効な治療薬を目指し、大豆イソフラボン類による食物アレルギー性消化器症状の治療効果のスクリーニング、およびその機序の検討を行った。

方 法

モデル作製とイソフラボン処置

アレルゲンとしてovalbumin (OVA)、動物としてBALB/cマウスを用い、OVA/alumによる全身感作を2週間おきに2回行った。その2週間後から、1日おきにOVAの継続的な経口投与を行い、アレルギー性消化器症状を誘発させた (Fig. 1)。この病態モデルに対してOVA投与1時間前に各大豆イソフラボン類を経口投与し、その治療効果を検討した。

リアルタイムPCRによるmRNA発現量の定量

病態モデルおよび各大豆イソフラボン類投与群よ

り近位腸管を摘出し、RNA I Super (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いてRNAを抽出した。各サンプルのtotal RNAを使用し、PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio, Kyoto, Japan) を用いて逆転写反応を行った。得られたcDNAを使用し、SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio) を用いてリアルタイムPCRを行った。測定結果はすべてハウスキーピング遺伝子であるglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量で補正した。IL-4, mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) およびGAPDHの各遺伝子のプライマーは以下のものを用いた。IL-4 forward: 5'-GGTCTCAACCCCCAGCTAGT-3', IL-4 reverse: 5'-GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT-3', mMCP-1 forward: 5'-CCATCTGAAGATCATCACGGACA-3', mMCP-1 reverse: 5'-ACATCATGAGCTCCAAGGGTGAC-3', GAPDH forward: 5'-TGACCACAGTCCATGCCATC-3', GAPDH reverse: 5'-GACGGACACATTGGGGGTAG-3'。

結果と考察

OVAの腹腔内投与後、OVAの経口投与を繰り返すことによりBALB/cマウスにアレルギー性消化器症状として下痢が惹起された。この下痢症状はOVAの経口投与の30分～1時間後に誘発された。下痢を発症したマウスの糞便は、正常対照マウスの固化した糞便に比べ、水分を多く含んだ水様便となった (Fig. 2A)。アレルギー性下痢症状陽性マウスの割合は経口投与回数を重ねると共に増加し、6回目のOVA経口投与時にはほぼ100%のマウスに下痢が誘導された (Fig. 2B)。

病態モデルマウスに対し、大豆イソフラボン類であるPuerarin, Daidzein, Genistein, Glycitein, Daidzin, Genistin, Glycitin, Equolを5 mg/kgの用量でOVA投与の1時間前に経口投与した。この結果、Puerarin, Genistein, Daidzin, Genistin, Equol投与により、アレルギー性消化器症状は抑制された。特に、Genistin投与では、抑制効果が顕著であった (Fig. 3)。

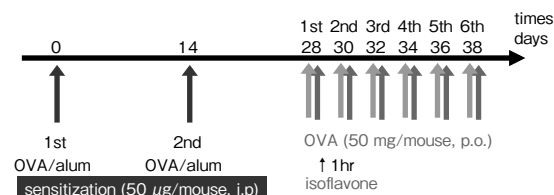


Fig. 1. Experimental protocol. Induction method of food allergy in BALB/c mouse.

従って、大豆イソフラボン類は食物アレルギー性消化器症状に有効であり、特に、Genistinは有効であることが示唆された。

そこで、Genistinの効果について詳細な検討を行った。Genistinを1 mg/kgもしくは5 mg/kgの用量での経口投与により、消化器症状の発症率の上昇は抑制された (Fig. 4)。この抑制効果は、濃度依存性が示された (Fig. 4)。

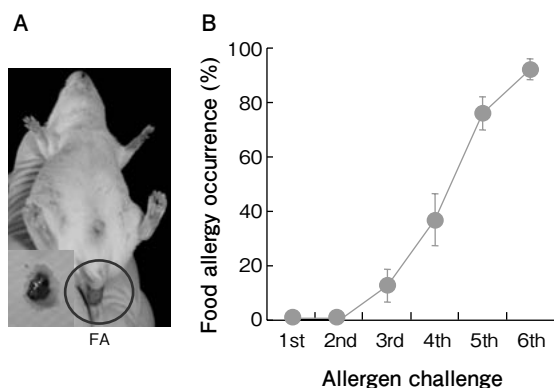


Fig. 2. Induction of allergic diarrhea. (A) Typical photographs are shown of a mouse that had severe allergic diarrhea. (B) Repeated oral OVA (50 mg) challenges resulted in allergic diarrhea.

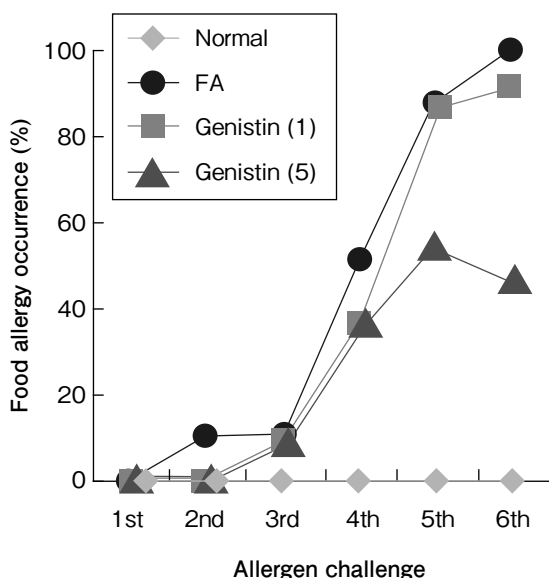


Fig. 4. Occurrence of allergic diarrhea and the effect of genistin to induction of food allergy (FA) in BALB/c mouse. Repeated oral OVA (50 mg) challenges resulted in allergic diarrhea in FA mice. The occurrence of OVA-induced diarrhea was significantly suppressed by preadministration of genistin.

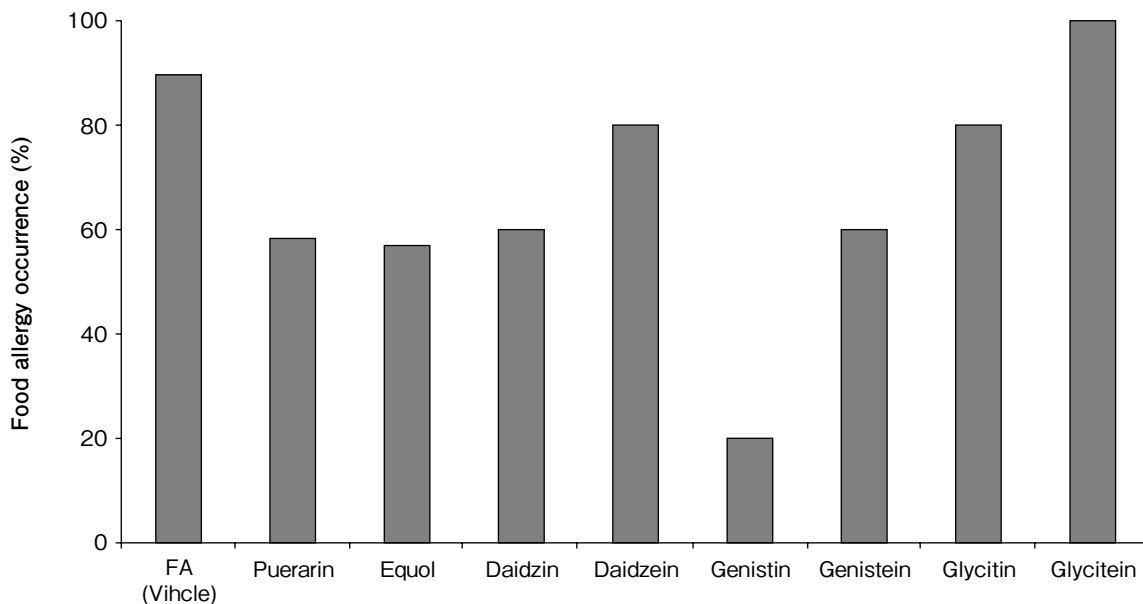


Fig. 3. Occurrence of allergic diarrhea and the effect of isoflavones in BALB/c mouse. Each isoflavones (5 mg/kg) was administered orally 1 h before OVA oral challenges. The administration of several isoflavones reduced the incidence of OVA-induced diarrhea.

食物アレルギーの発症には腸管粘膜免疫系の重要性が示唆されており⁵⁾、我々もこの食物アレルギー性消化器症状の発症に、腸管粘膜免疫系のTh2型免疫応答の過剰な亢進が関与することを明らかにしている¹⁾。そこで、Genistin投与による近位結腸でのIL-4 mRNA発現量の変化を測定した (Fig. 5)。Genistin投与は、FA群で増加したIL-4 mRNA発現量を明らかに減少させた (FA群: 108.5 ± 29.7 , Genistin群: 23.0 ± 14.8)。

また、この病態モデルにおけるアレルギー性消化器症状発症には、腸管の粘膜型マスト細胞が関与することを明らかにしている¹⁾。そこで、近位結腸へのマス

ト細胞の浸潤を、粘膜型マスト細胞に特異的に発現するマストセルプロテアーゼ1 (mMCP-1) を指標とし mRNA発現量を測定した (Fig. 6)。Genistin投与は、FA群で増加したmMCP-1 mRNA発現量を明らかに減少させた (FA群: $17,768.5 \pm 2,067.8$, Genistin群: $2,475.5 \pm 1,460.3$)。

従って、Genistinは、Th2型免疫応答の過剰亢進やマスト細胞の浸潤増多などの腸管粘膜免疫系の破綻を改善することにより、食物アレルギー性消化器症状を治療することが示唆された。

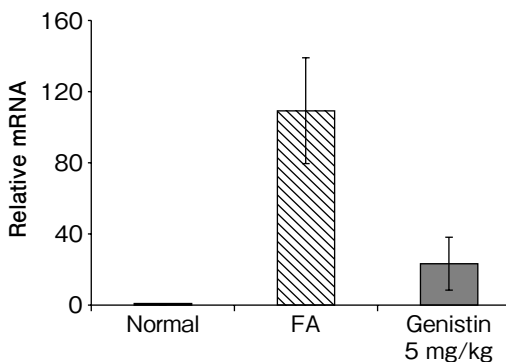


Fig. 5. Effect of genistin on the expression of IL-4 mRNA in the proximal colon. IL-4 mRNA was significantly upregulated in FA mice. Genistin reduced the enhanced expression of this cytokines.

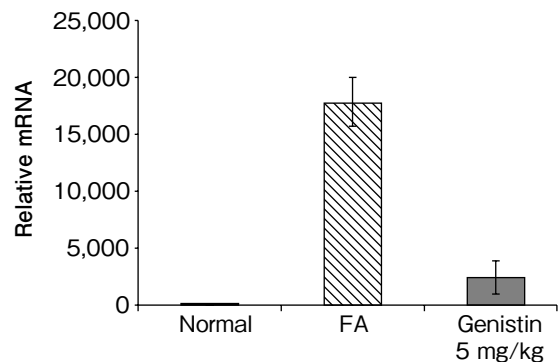


Fig. 6. Effect of genistin on the expression of mMCP-1 mRNA in the proximal colon. mMCP-1 mRNA was significantly upregulated in FA mice. Genistin reduced the enhanced expression of this mRNA.

要 約

本研究では、食物アレルギー性消化器症状を発症する病態モデルマウスを用いて大豆イソフラボン類の有用性を検討した。いくつかの大豆イソフラボン類はアレルギー性消化器症状の治療効果を示し、なかでもGenistinは強い治療効果を示した。Genistinにより、近位結腸でのIL-4 mRNA発現量の抑制とmMCP1 mRNA発現が抑制されることから、Genistinは腸管粘膜免疫系を制御することにより治療効果を示すことが示唆された。

文 献

- 1) Yamamoto T, Fujiwara K, Yoshida M, Kageyama-Yahara N, Kuramoto H, Shibahara N and Kadowaki M (2009): Therapeutic effect of kakkonto in a mouse model of food allergy with gastrointestinal symptoms. *Int Arch Allergy Immunol*, **148**, 175-185.
- 2) Yamamoto T, Kuramoto H and Kadowaki M(2007): Downregulation in aquaporin 4 and aquaporin 8 expression of the colon associated with the induction of allergic diarrhea in a mouse model of food allergy. *Life Sci*, **81**, 115-120.
- 3) Jin JS, Nishihata T, Kakiuchi N and Hattori M (2008): Biotransformation of C-glucosylisoflavone puerarin to estrogenic (3S)-equol in co-culture of two human intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull*, **31**, 1621-1625.
- 4) Miyake Y, Sasaki S, Ohya Y, Miyamoto S, Matsunaga I, Yoshida T, Hirota Y and Oda H; the Osaka Maternal and Child Health Study Group (2005): Soy, isoflavones, and prevalence of allergic rhinitis in Japanese women. *J Allergy Clin Immunol*, **115**, 1176-1183.
- 5) MacDonald TT and Monteleone G (2005): Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, **307**, 1920-1925.