

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石川 祐子

---

アレルギー性炎症疾患は、抗原抗体反応を主因とする慢性的な炎症反応と捉えることができる。本論文は、炎症反応に伴って起こる血管透過性亢進、血管拡張、および白血球の血管外遊走のような変化を抑制する活性を持つフラボノイドを探索し、その構造活性相関および抑制機構の検討を行うとともに、アレルギーモデル動物を用いた炎症抑制活性の新規測定手法を開発し、それを用いてフラボノイドの効果を検証したもので3章からなっている。

第1章では、アラキドン酸の代謝によりプロスタグランジン(PG)が合成される際の律速酵素となる、誘導型の脂肪酸シクロオキシゲナーゼ(COX)-2に対するフラボノイドの作用に着目している。ラット炎症性腹腔マクロファージを大腸菌リポ多糖で処理したときの、COX-2タンパク質の発現とPGE<sub>2</sub>産生に対するフラボノイドの効果について検討した結果、供試したフラボノイドのうち16種類にPGE<sub>2</sub>産生抑制活性が認められた。構造別ではフラボンが最も抑制活性が高く、baicalein、chrisin、apigeninなどは、非ステロイド抗炎症剤であるaspirinとほぼ同等の活性を示した。次いで、フラバノンであるeriodictyol、naringenin、イソフラボンであるgenistein、フラボノールである7-hydroxyflavonol、kaempferolなどに高い抑制活性が認められた。抑制活性にはA環の4位のケトン基(オキソ構造)が必須であること、C2-C3位における二重結合は活性を高めること、また水酸基の数や位置により活性に差が認められ、5,7位に水酸基を持つものは有意に活性が高いこと、B環では水酸基を持たないもののほうが高い活性を示すことなどを明らかにした。

COXタンパク質の発現に対する効果をウエスタンブロット法により検討したところ、強い抑制活性を有するapigenin等ではCOX-2タンパク質の発現が常在型のCOX-1に比べ用量依存的に抑制されたのに対し、抑制活性の弱いdaidzeinでは、COX-2タンパク質の発現抑制効果は弱かった。また、細胞透過性の低い配糖体は対応するアグリコンに比べ抑制活性が低いことから、フラボノイドの細胞透過性も活性発現に大きな影響を与えることが示唆された。

第2章では、炎症初期に白血球が血管内皮細胞表面を転がる(ローリング)現象を詳細に解析するために、組織学的手法を用いて白血球の浸潤を測定する方法を開発している。本法を用い、ローリングと血管外遊走の間に約1時間の遅れがあること、白血球の浸潤の開始にはselectinの関与が必須であることを明らかにした。

また、ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いてTNF- $\alpha$ 刺激によるE-selectinの発現に対するフラボノイドの阻害効果を検討した。その結果、fisetin、quercetin、kaempferolおよびbuteinに強い抑制活性が認められたが、イソフラボンやフラバノンの活性は弱いことが見出された。また、フラボノイドA環のC2-C3の二重結合が活性を強め、4位のケトン基が本抑制活

性の発現に必須であると考えられた。B環の水酸基では、4'位単独、もしくは3', 4'のジヒドロキシ構造を有する場合にのみ活性を示し、阻害曲線が典型的なシグモイド曲線を示すことなどから、これらのフラボノイドは、TNF- $\alpha$  の細胞表面レセプターへの結合を阻害する可能性が示唆された。

フラボノイドの炎症抑制効果が細胞系で確認されたことから、第3章では即時型アレルギー反応に対するフラボノイドの効果について動物実験による検討を行っている。即時型アレルギー性炎症では肥満細胞の活性化によりヒスタミン等の放出が起こり、血管透過性亢進と血漿成分の滲出による浮腫が認められる。この浮腫反応を迅速かつ高感度に測定するために、蛍光色素でラベルした牛血清アルブミンを血漿成分の指標とし、炎症部位の皮膚の蛍光強度を直接測定して血漿滲出量を算出する方法を開発した。本測定法を用い、培養細胞試験において効果が確認されたフラボノイドの apigenin および eriodictyol の投与が、卵白アルブミンで免疫した ICR マウスの即時型アレルギー反応による血漿成分の滲出に及ぼす影響を調べた結果、本測定法の実用性ならびに上記フラボノイドのアレルギー性炎症抑制効果を確認することができた。

以上、本論文は、食品由来フラボノイドの構造と血管部位におけるその炎症抑制活性の関係を明らかにし、アレルギー性炎症の症状をフラボノイドによって緩和できる可能性を示唆したもので、学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。