

3種 *in vitro* 評価系を用いたポリフェノールの 抗アレルギー活性評価について

田中 守¹⁾ 鈴木大進²⁾ 吉本好延³⁾ 香西はな⁴⁾ 岡本威明⁵⁾

(2016年9月29日受付, 2016年12月15日受理)

Assessment of anti-allergic activity of polyphenols using three *in vitro* assay systems
Mamoru TANAKA¹⁾, Masanobu SUZUKI²⁾, Yoshinobu YOSHIMOTO³⁾, Hana KOZAI⁴⁾
and Takeaki OKAMOTO⁵⁾

(Received: September 29, 2016, Accepted: December 15, 2016)

要 旨

本研究では、抗アレルギー活性を示すポリフェノールの特性及び3種 *in vitro* 評価系の相関関係を明らかにすることを目的とし、14種類のポリフェノールの抗アレルギー活性を評価した。細胞生存率は、14種類中2種類において有意な低下が認められた。細胞内 Ca^{2+} 濃度の評価では、12種類中6種類において有意な低下が認められ、 β -hexosaminidase 放出阻害活性の評価では、12種類中6種類において有意な低下が認められた。ヒアルロニダーゼ阻害活性の評価では、12種類中2種類において40%以上の阻害活性を示した。3種の評価系の相関性を調べたところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度と β -hexosaminidase 放出阻害活性にかなりの相関性 ($R=0.700$) が認められた。

キーワード：ポリフェノール, 抗アレルギー, β -hexosaminidase, 細胞内 Ca^{2+} , ヒアルロニダーゼ

Abstract

In this study, we aimed to search for characteristic of polyphenols with anti-allergic activity using fifteen kinds of polyphenols, and to examine correlation of three types of *in vitro* assay systems, which are based on inhibition of intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) level and β -hexosaminidase release from rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3), and inhibition of hyaluronidase activity. A cell viability was significantly decreased in two of 14 types. $[Ca^{2+}]_i$ was significantly inhibited in six of 12 types. The release of β -hexosaminidase was significantly inhibited in six of 12 types. Hyaluronidase activity was inhibited more than 40% in two of 12 types. In addition, the inhibitory potencies of $[Ca^{2+}]_i$ levels and β -hexosaminidase release were highly correlated with anti-allergic activity ($R=0.700$).

Key words: polyphenol, anti-allergy, β -hexosaminidase, intracellular Ca^{2+} , hyaluronidase

-
- 1) 高知県立大学健康栄養学部・助教・博士
Faculty of Nutrition, University of Kochi. Assistant Professor. Ph. D
 - 2) 高知工業技術センター資源環境課・研究員・博士
Resources and Environment Division, Kochi Prefectural Industrial Technology Center. researcher. Ph. D
 - 3) 聖隷クリストファー大学リハビリテーション学部・准教授・博士
Faculty of Physical Therapy, Seirei Christopher University. Associate Professor. Ph. D
 - 4) 中部大学応用生物学部・講師・博士
College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University. Assistant Professor. Ph. D
 - 5) 愛媛大学教育学部・准教授・博士
Faculty of Education, Ehime University. Associate Professor. Ph. D

緒言

アレルギーにはI型～IV型の4種類があり、通常アレルギー反応と言えば、食物アレルギーや花粉症に代表されるI型アレルギーを示す。I型アレルギー反応には、抗原特異的な抗体IgEと高親和性IgEレセプター(Fc ϵ RI)を持つマスト細胞や好塩基球が関わる。即ち、Fcレセプターを介してマスト細胞や好塩基球に結合しているIgEが抗原によって架橋されると、マスト細胞や好塩基球は活性化され、脱顆粒が起こりヒスタミンやタンパク質分解酵素、あるいはサイトカインのような種々の化学伝達物質を放出する。脱顆粒が起こるメカニズムとして、IgEと抗原が架橋結合するとチロシンキナーゼLynが活性化され、Fc ϵ RIレセプター上の β immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs)及び γ ITAMsをリン酸化する。次いで、Spleen tyrosine kinase (Syk)が γ ITAMsと結合しリン酸化され活性化し、linker for activation of T cellsをリン酸化、phospholipase C γ (PLC γ)をリクルートする。加えて、Lynによって直接活性化されたBruton's tyrosine kinaseもSykとともにPLC γ のリクルートを促進する。これらの結果、リン酸化されたPLC γ によってclassical protein kinase Cが活性化され、Ca²⁺の細胞内流入を促進することで脱顆粒が起こる¹⁾。

これまで、食品由来のカテキンやフラボノイド等、多数のポリフェノール化合物が抗アレルギー活性を示すことが報告され²⁻¹³⁾、抗アレルギー活性の評価を行う際には、脱顆粒中のヒスタミンや β -hexosaminidase、ヒアルロニダーゼといった酵素を指標とした細胞培養実験系や動物実験系を用いて評価がなされてきた²⁻¹⁵⁾。*in vitro*評価系において、マスト細胞のモデル細胞系であるラット好塩基球様細胞株RBL-2H3 (RBL-2H3)は、I型アレルギーに対する細胞内のシグナル伝達や脱顆粒抑制といった抗アレルギー活性の評価をする上で広く用いられている^{2-3,6-7,9,11-13,16-18)}。ヒアルロニダーゼは、ヒアルロン酸を分解する酵素で

生体に広く存在しており、生体内におけるヒスタミンの放出に先立ち活性が上昇するとされている¹⁴⁾。加えて、ヒアルロニダーゼは炎症時に活性化され、組織の構造を破壊し、炎症を進めさせるとも考えられており、ヒアルロニダーゼ阻害活性は、脱顆粒後の抗アレルギー活性を評価することが出来る^{6,14-15,19)}。本研究では、抗アレルギー活性を示すポリフェノールの特性及び作用点の異なる3種類の*in vitro*評価系、即ち、ラット好塩基球様細胞株RBL-2H3を用いた細胞内Ca²⁺濃度上昇抑制及び β -hexosaminidase放出阻害活性とヒアルロニダーゼ阻害活性評価の相関関係を明らかにすることを目的とし、14種類のポリフェノールの抗アレルギー評価を行った。これまで、複数のポリフェノールをこれら3種類の*in vitro*評価系で同時に抗アレルギー活性を比較した報告はない。

実験方法

1. 試料

ポリフェノール試料として、Synephrine、 β -CaryophylleneはTCI製のものを、Tangeretin、Hesperidin、Myricetinは和光純薬製のものを、Sinensetin、(+)-catechin、(-)-epigallocatechin gallate、(-)-epigallocatechin、(-)-epicatechin、(-)-epicatechin gallateはフナコシ製のものを、Rutin、Tannic acid、Curcuminはナカライテスク製のものをを用いた。それぞれのポリフェノールの特徴を表1に示す。

2. 細胞培養

ラット好塩基球様細胞株RBL-2H3 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分与)は、37°C、5% CO₂条件化、10% ウシ胎児血清 (FBS, Sigma-Aldrich) 及び100 U/mlのペニシリン-ストレプトマイシン (ナカライテスク) を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, ナカライテスク) で継代培養した。

3. 細胞生存率の測定

細胞生存率は、生細胞数測定試薬SF (ナカラ

表1. 各種ポリフェノールの特徴

No.	ポリフェノール名	分類	配糖体	メトキシ基数 (メチル化水酸基)	ヒドロキシ基数
1	Synephrine	アルカロイド類		0	2
2	Sinensetin	O-メチル化フラボン(フラボノイド類)		5	0
3	Tangeretin	O-メチル化フラボン(フラボノイド類)		5	0
4	(+)-catechin	フラバノール(カテキン)類		0	5
5	(-)-epigallocatechin gallate	フラバノール(カテキン)類		0	8
6	(-)-epigallocatechin	フラバノール(カテキン)類		0	6
7	(-)-epicatechin	フラバノール(カテキン)類		0	5
8	(-)-epicatechin gallate	フラバノール(カテキン)類		0	8
9	β -Caryophyllene	セスキテルペン(テルペン類)		0	1
10	Rutin	フラボノール類	○	0	9
11	Tannic Acid	フェニルカルボン酸		0	25
12	Hesperidin	フラバノン類	○	1	8
13	Curcumin	ジケトン類		2	3
14	Myricetin	フラボノール類		0	6

イテスク)を用い、操作手順に沿って行った。即ち、RBL-2H3は細胞培養用96ウェルマイクロプレートに 6.0×10^4 cells/ well 播種し、37°C、5% CO₂ 条件化で一晩培養した。100 μ l の PBS で2回洗浄した後、10% FBSを含むDMEMで50 ng/mLに溶解した抗DNP-IgE抗体(Sigma-Aldrich)を添加し2時間培養後、細胞を200 μ l の Modified Tyrode (MT) 緩衝液(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 5.6 mmol/L glucose, 20 mmol/L HEPES, 0.1% BSA, pH 6.8)で2回洗浄した。MT 緩衝液で溶解した100 μ l のポリフェノール試料を添加し10分間反応後、50 ng/mLのDNP-labeled human serum albumin (DNP-HSA, Sigma-Aldrich)を10 μ l 加え、さらに30分間反応させた。200 μ l の PBS で2回洗浄後、10 μ l の生細胞数測定試薬 SF を含む DMEM 100 μ l を細胞に加え37°C、30分間反応させた。その後、直ちに xMarkTM マイクロプレート吸光分光光度計 (Bio-Rad Laboratories) で450 nm の吸光度を測定した。なお、ポリフェノール試料を含まない10% FBSを含むDMEMを添加し、同様に反応させたコントロールの吸光度を100%とし、コントロールに対する割合で算出した。

4. 細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) の測定

[Ca²⁺]_i は Calcium Kit-Fluo 3 (同仁化学) を用い、Ishida らの方法¹⁶⁾ に沿って行った。上記同様に、RBL-2H3は細胞培養用96ウェルブラックマイクロプレートに播種し、抗DNP-IgE抗体で感作した。その後、細胞を200 μ l の PBS で2回洗浄した後、100 μ l の Fluo 3 AM で1時間反応させた。反応後、200 μ l の PBS で2回洗浄し、PBS で溶解した100 μ l のポリフェノール試料を添加し10分間反応後、MT 緩衝液で0.625 μ g/ml に調整したDNP-HSAを10 μ l 加え、直ちに蛍光強度を蛍光・発光マイクロプレートリーダー (Thermo) で485 nm, 538 nm の吸光度を測定した。測定値はDNP-HAS 刺激前の吸光度を1とし、5分後の相対値を表した。なお、ポリフェノール試料を含まないPBSを添加し、同様に反応させたものをコントロールとし、DNP-HSAを含まないMT 緩衝液を添加し、同様に反応させたものをブランクとした。

5. β -hexosaminidase の放出阻害活性

脱顆粒阻害作用は、脱顆粒中の酵素 β -hexosaminidase の放出阻害活性で評価した¹⁷⁾。即ち、24ウェルマイクロプレートに 2.5×10^5 cells/well で細胞を播種し、一晩培養した。1

ml の PBS で 2 回洗浄した後, 10% FBS を含む DMEM で 50 ng/mL に溶解した抗 DNP-IgE 抗体を添加し 2 時間培養後, 細胞を 1.5 mL の MT 緩衝液で 2 回洗浄した。MT 緩衝液で溶解した 490 μ l のポリフェノール試料を添加し 10 分間反応後, 50 ng/mL の DNP-HSA を 10 μ l 加え, さらに 30 分間反応させた。ポリフェノール試料を含まない MT 緩衝液を添加し同様に反応させたものをコントロールとした。培養上清を回収後, 細胞を 0.1% Triton X-100/MT 緩衝液で溶解することで細胞溶解液を得た。培養上清及び細胞溶解液それぞれ 50 μ L を 96 ウェルプレートに移し, 37°C で 5 分間加温後, 50 μ L の 0.1 mol/L クエン酸緩衝液, pH 4.5 に溶解した 3.3 mmol/L *p*-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside を加え, 37°C で 25 分間反応させた。反応溶液に 100 μ L の 2.0 mol/L グリシン緩衝液, pH 10.4 を加えて反応を停止後, 405 nm の吸光度を測定した。 β -hexosaminidase 放出率を以下の式により求め, コントロールの β -hexosaminidase 放出率を 100% として, ポリフェノール試料の β -hexosaminidase 放出阻害活性を計算した。

β -hexosaminidase 放出阻害活性は以下の式により求めた。

$$\beta\text{-hexosaminidase 放出率} = \frac{\text{培養上清の吸光度}}{\text{培養上清の吸光度} + \text{細胞溶解液の吸光度}} \times 100$$

6. ポリフェノールのヒアルロニダーゼ阻害活性

ヒアルロニダーゼ阻害活性は, 前田ら¹⁴⁾の方法により行った。すなわち, 各抽出液 0.1 ml に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解した 4 mg/ml のヒアルロニダーゼ溶液 (Sigma-Aldrich) を 0.05 ml 加えた。37°C で 20 分間放置した後, 0.5 mg/ml の Compound 48/80 (Sigma-Aldrich) を 0.1 ml 加えた。さらに, 37°C で 20 分間放置した後,

0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解した 0.8 mg/ml のヒアルロン酸 (和光純薬) を 0.25 ml 加えた。37°C で 40 分間放置した後, 0.1 ml の 0.4 N の水酸化ナトリウムを加えた。0.1 ml のホウ酸溶液 (pH 9.1) を添加し, 沸騰水浴中で 3 分間加熱後, 室温まで冷却した。試験管を水中に移し, *p*-DAD 試薬 (和光純薬; *p*-DAD 5 g, 10 N 塩酸溶液 6 ml, 酢酸 44 ml を混合し, 使用直前に酢酸で 10 倍に希釈した。) を 6 ml 加えた。37°C で 20 分間放置した後, 585 nm の吸光度を測定した。なおそれぞれのブランクは酵素溶液の代わりに 0.1 M 酢酸緩衝液を用いた。

阻害率は以下の式により求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100$$

- A) コントロール溶液の吸光度
- B) コントロール溶液のブランクの吸光度
- C) 試料溶液の吸光度
- D) 試料溶液のブランクの吸光度

7. 統計処理

測定値は平均 \pm 標準偏差で示した。統計ソフトは SPSS Statistics 21 を使用した。独立多群の差の検定には一元配置の分散分析 (ANOVA) を用い, その後, Post hoc 検定として Dunnett 法を用いた。相関係数については Pearson の相関係数を用いた。危険率は 5% 未満で有意差ありと判断した。

結果

1. 細胞生存率

図 1 に, ポリフェノールの細胞生存率を示す。14 種類のポリフェノールのうち, (-)-epigallocatechin, Tannic acid において有意に細胞生存率の低下が認められた ($p < 0.05$)。従って, (-)-epigallocatechin, Tannic acid は, RBL-2H3 を用いた評価系で抗アレルギー効果を評価することが出来ないため, 以後の評価から除外した。

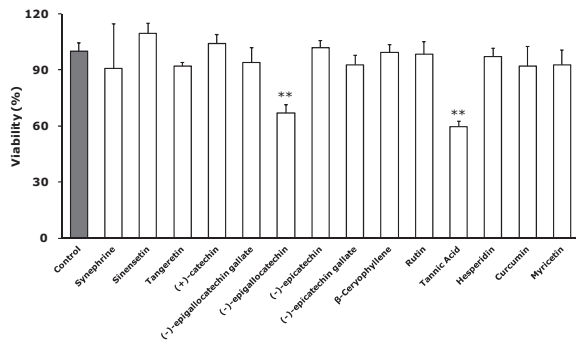


図 1. 各種ポリフェノールが RBL-2H3 細胞の生存率に及ぼす効果
試料濃度：100 μmol/L
測定値は 3 連の実験の平均値であり，エラーバーは平均値±標準偏差を表す。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，vs. control

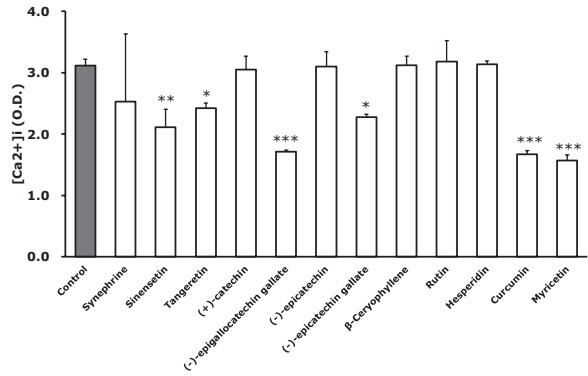


図 2. 各種ポリフェノールが RBL-2H3 細胞の[Ca²⁺]_iに及ぼす効果
試料濃度：100 μmol/L
測定値は 3 連の実験の平均値であり，エラーバーは平均値±標準偏差を表す。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，vs. control

2. [Ca²⁺]_i

図 2 に，ポリフェノールの [Ca²⁺]_i を示す。12種類 のポリフェノールのうち，Sinensetin, Tangeretin, (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epicatechin gallate, Curcumin, Myricetin において有意に [Ca²⁺]_i の低下が認められた ($p < 0.05$)。

3. β-hexosaminidase 放出阻害活性

図 3 に，ポリフェノールの β-hexosaminidase 放出阻害活性を示す。12種類 のポリフェノールのうち，Synephrine, Tangeretin, (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epicatechin gallate, Curcumin, Myricetin において有意に β-hexosaminidase 放出活性の低下が認められた ($p < 0.05$)。

4. ヒアルロニダーゼ阻害活性

図 4 に，ポリフェノールのヒアルロニダーゼ阻害活性を示す。12種類 のポリフェノールのうち，(-)-epigallocatechin gallate, (-)-epicatechin gallate において 40% 以上，(+)-catechin, (-)-epicatechin において 30% 以上の阻害活性を示した。

5. 3種類の抗アレルギー活性評価の相関

図 5 に，3種類の抗アレルギー活性評価の相関を示す。細胞生存率を考慮し，細胞毒性が認められた試料を除外し相関性を調べたところ，[Ca²⁺]_i と β-hexosaminidase 放出阻害活性との間にはかなりの相関性が認められた (図 5 A, $R=0.700$)。

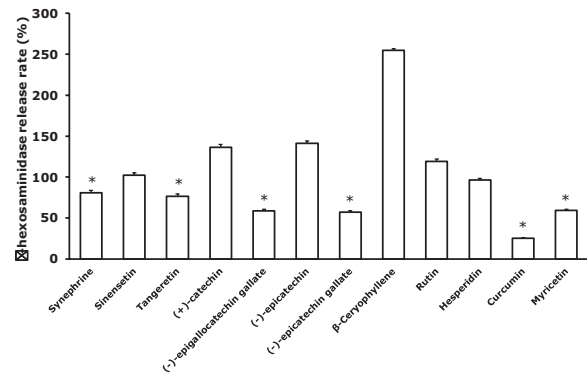


図 3. 各種ポリフェノールが RBL-2H3 細胞の脱顆粒に及ぼす効果
試料濃度：100 μmol/L
測定値は 3 連の実験の平均値であり，エラーバーは平均値±標準偏差を表す。* $p < 0.001$ ，vs. control

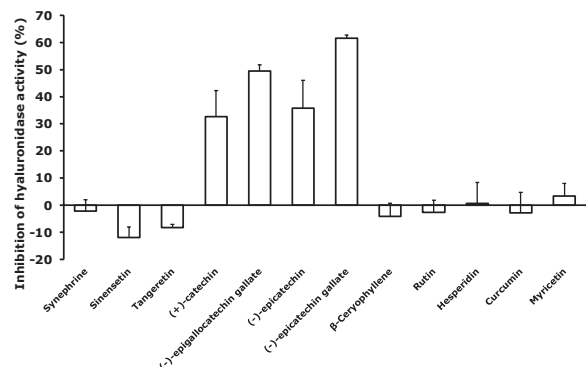


図 4. 各種ポリフェノールがヒアルロニダーゼ阻害活性に及ぼす効果
試料濃度：100 μmol/L
測定値は繰り返し 3 回行った実験の平均値であり，エラーバーは平均値±標準偏差を表す。

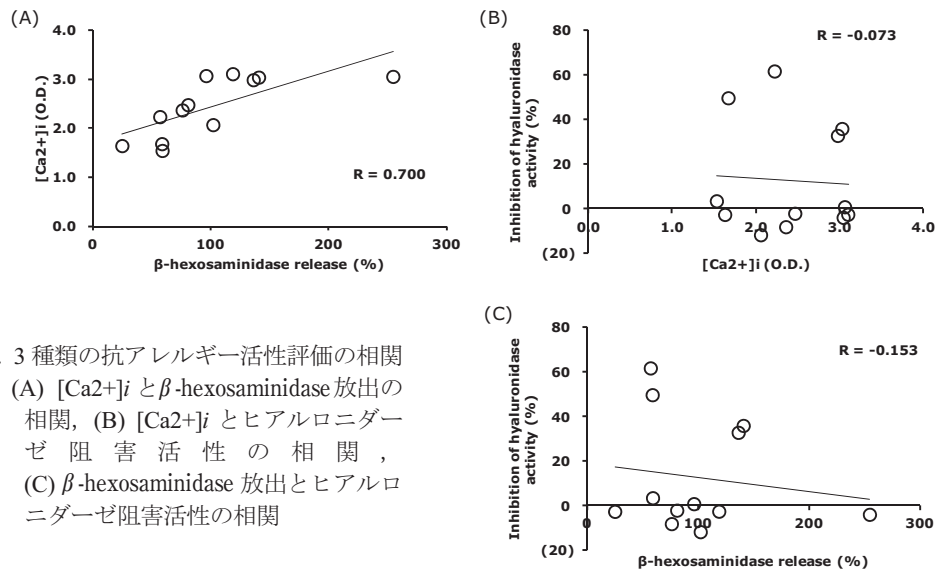


図5. 3種類の抗アレルギー活性評価の相関
 (A) $[Ca^{2+}]_i$ と β -hexosaminidase放出の相関, (B) $[Ca^{2+}]_i$ とヒアルロニダーゼ阻害活性の相関,
 (C) β -hexosaminidase放出とヒアルロニダーゼ阻害活性の相関

一方, $[Ca^{2+}]_i$ とヒアルロニダーゼ阻害活性及び β -hexosaminidase放出阻害活性とヒアルロニダーゼ阻害活性との間にほとんど相関が認められなかった。(図5 B, C)。

考察

本研究結果より, 活性に強弱はあるものの(-)-epigallocatechin gallate, (-)-epicatechin gallateは3種類の作用点の異なる評価法において, Tangeretin, Curcumin, Myricetinは2種類の作用点の異なる評価法において抗アレルギー活性を示した。

本研究で用いたポリフェノールのうち, これまでにTangeretin¹²⁾や(-)-epigallocatechin gallate^{4,8)}, (-)-epicatechin gallate⁸⁾, Curcumin⁹⁾, Myricetin^{3,7)}が抗アレルギー活性を示すことが報告されている。これらの結果^{3-4,7-9,12)}は, β -hexosaminidase放出阻害活性評価の結果とよく一致するものであり, $[Ca^{2+}]_i$ においても大部分で一致した。トリフェノール構造は, 抗アレルギー活性に必要であると推察されており⁸⁾, (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epicatechin gallate, Myricetinが本構造を持つことから, 本研究からもその重要性が示唆された。一方, ヒアルロニダーゼ阻害活性においては, ガロイル基を有するポリフェノールでのみ強い阻害活性が認め

られた。Kakegawaら¹⁹⁾は, 数種のタンニン類について, 肥満細胞ヒスタミン遊離抑制活性及びヒアルロニダーゼ阻害活性を調べた結果, ガロイル基を有するタンニン類に強い活性が存在することを報告している。さらに, 山本ら⁸⁾は, ラットマスト細胞を使ったヒスタミン遊離試験結果から, 緑茶に含まれる(-)-epigallocatechin gallateがヒスタミン遊離を強く抑制すること, (-)-epigallocatechin gallateのガロイル基がその活性に重要であると同時に, それを介して細胞膜に安定化などに関与していると考察している。本研究においても, ガロイル基を有するポリフェノールの構造がヒアルロニダーゼ阻害活性に大きく関係していることが推測された。一方, Curcuminにも抗アレルギー活性が認められたが, 上述のようなトリフェノールやガロイル基以外の別の構造が関係していることが推測されるが, 本研究結果からは明らかにすることが出来なかった。

本研究結果より, 配糖体のRutinやHesperidinは, いずれの評価系においても抗アレルギー活性が認められなかった。一方, RBL-2H3細胞を用いた研究により, RutinのアグリコンであるQuercetin及びHesperidinのアグリコンであるhesperetinの抗アレルギー活性が報告されている^{3,18)}。このことから, 糖鎖の有無が抗アレルギー活性に重要であることが考えられた。メトキ

シ基数及びヒドロキシ基数と抗アレルギー活性との間に相関性は認められなかった。

Ca^{2+} は細胞内シグナル伝達を担う代表的なセカンドメッセンジャーの一つであり、マスト細胞や好塩基球における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は脱顆粒前に上昇することが知られている。一方、 Ca^{2+} に非依存的な経路によって脱顆粒が起こることも報告されている¹⁾。脱顆粒の結果放出される酵素として β -hexosaminidase が挙げられ、同様に、ヒアルロニダーゼも、生体内におけるヒスタミンの放出に先立ち活性が上昇するとされている¹⁴⁾。ヒアルロニダーゼ阻害活性に関しては、マスト細胞からのヒスタミン遊離抑制活性と相関性があることが Kakegawa らにより報告されている¹⁹⁾。本研究結果より、3種類の *in vitro* 評価系の中で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と β -hexosaminidase 放出阻害活性との間にはかなりの相関性 ($R=0.700$) が認められた。このことから、抗アレルギー活性を持つポリフェノールの大部分は、 Ca^{2+} に依存的な経路によって脱顆粒が起こることが示唆された。一方、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及び β -hexosaminidase とヒアルロニダーゼ阻害活性との間に相関性は認められなかった。今回行った3種評価法のうち、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と β -hexosaminidase 放出阻害活性は RBL-2H3 をベースとした評価系で、脱顆粒前にポリフェノールを作用させていることに対し、ヒアルロニダーゼ阻害活性は、細胞を使用せず、脱顆粒後に放出されるとされている酵素とポリフェノールを作用させた後、基質と反応させ評価する点で異なり、評価間での相関性が認められなかったと考えられる。相関性は認められなかったものの、本研究結果より、(-)-epigallocatechin gallate や (-)-epicatechin gallate のようなガロイル基を有するポリフェノールは今回行ったすべての評価法において、抗アレルギー活性を示した。(-)-epigallocatechin gallate や (-)-epicatechin gallate の脱顆粒抑制やガロイル基を有するポリフェノールのヒアルロニダーゼ阻害活性は、すでに先行研究^{4,8,19)} で報告されており、本研究結果と一致した。一方、(-)

-epigallocatechin gallate は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を抑制しないとの報告²⁰⁾ もあり、本研究結果と異なった。 Ca^{2+} プローブや各種実験条件が異なっていたことが理由に挙げられるが、本研究からは理由を明らかにすることが出来なかった。これらガロイル基を有するポリフェノールは、一連の I 型アレルギー反応において、 Ca^{2+} に依存的な経路、そして複数の作用点で抑制的に働くことが示唆された。

結論として、抗アレルギー活性を示すポリフェノール及び作用点の異なる3種類の *in vitro* 評価系の特性を示した。本研究は、今後新たに抗アレルギー活性を有する食品や有用植物等を探索するための基礎資料となる。

本研究は平成27年度高知県立大学「科研費」獲得支援助成事業補助金により実施された。

参考文献

- 1) Kraft S, Kinet (2007) New developments in Fcepsilon R1 regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* **7** : 365-367.
- 2) Kanda T, Akiyama H, Yanagida A, et al (1998) Inhibitory effects of apples polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **62** : 1284-1289.
- 3) Alexandrakis M, Singh L, Boucher W, et al (1999) Int. Differential effect of flavonoids on inhibition of secretion and accumulation of secretory granules in rat basophilic leukemia cells. *J Immunopharmacol* **21** : 379-390.
- 4) Fujimura Y, Tachibana H, Maeda-Yamamoto M, et al (2002) Antiallergic effects of (-)-epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate, suppresses FcepsilonRI expression in human

- basophilic KU812 cells. *J Agric Food Chem* **50** : 5729-5734.
- 5) Inoue T, Sugimoto Y, Masuda H, et al (2002) Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. *Biol Pharm Bull* **25** : 256-259.
 - 6) Choo MK, Park EK, Yoon HK, et al (2002) Antithrombotic and antiallergic activities of daidzein, a metabolite of puerarin and daidzin produced by human intestinal microflora. *Biol Pharm Bull* **25** : 1328-1332.
 - 7) Matsuda H, Morikawa T, Tao J, et al (2002) Bioactive constituents of Chinese natural medicines. VII. Inhibitory of degranulation in RBL-2H3 cells and absolute stereostructures of three new diarylheptanoid glycosides from the bark of *Myrica rubra*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **50** : 208-215.
 - 8) 山本(前田)万里, 佐野満昭, 他(2003) 緑茶の抗アレルギー・がん転移抑制因子. *化学と生物* **41** : 442-447.
 - 9) Matsuda H, Tewtrakul S, Morikawa T, et al (2004) Anti-allergic principles from Thai zedoary: structural requirement of curcuminoids for inhibition of degranulation and effect on the release of TNF-alpha and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorg Med Chem* **15** : 5891-5898.
 - 10) Katayama S, Mine Y (2006) Quillaja saponin can modulate ovalbumin-induced IgE allergic responses through regulation of Th1/Th2 balance in a murine model. *J Agric Food Chem* **54** : 3271-3276.
 - 11) Yamada P, Ono T, Shigemori H et al (2012) Inhibition effect of tannins from galls of *carpinus tschonoskii* on the degranulation of RBL-2H3 cells. *Cytotechnology* **64** : 349-356.
 - 12) Jang SE, Ryu KR, Park SH, et al (2013) Nobiletin and tangeretin ameliorate scratching behavior in mice by inhibiting the action of histamine and the activation of NF- κ B, AP-1 and p38. *Int Immunopharmacol* **17** : 502-507.
 - 13) Onishi S, Nishi K, Yasunaga S (2014) Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, exerts anti-allergic effect by suppressing activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Funct Foods* **6** : 606-614.
 - 14) 前田有美恵, 山本政利, 増井俊夫, 他(1990) 茶抽出液のHyaluronidase阻害活性. *食衛誌* **31** : 233-237.
 - 15) 星野香織, 穂山 浩, 合田幸広, 他(1998) 3種 *in vitro* 試験法による10種野菜抽出液の抗アレルギー活性評価について. *食衛誌* **39** : 72-77.
 - 16) Ishida M, Nishi K, Watanabe H (2013) Inhibitory effect of aqueous spinach extract on degranulation of RBL-2H3 cells. *Food Chem* **136** : 322-327.
 - 17) 田中 守, 山岸賢司, 菅原卓也, 他(2012) ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 の脱顆粒に及ぼすカゼイン由来ペプチドおよび関連アミノ酸の影響. *日食科工誌* **59** : 556-561.
 - 18) Kobayashi S, Tanabe S (2006) Evaluation of the anti-allergic activity of Citrus unshiu using rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells as well as basophils of patients with seasonal allergic rhinitis to pollen. *Int J Mol Med* **17** : 511-515.
 - 19) Kakegawa H, Matsumoto H, Endo K, et al (1985) Inhibitory effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesentery mast cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **33** : 5079-5082.
 - 20) Matsuo N, Yamada K, Shoji K, et al (1997)

Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy* **52** : 58-64.

