

信州大学審査学位論文

ナツメヤシ (*Phoenix dactylifera* L.) の果実であるデーツの
免疫調節機能の探索と特性付け

平成 24 年 9 月

唐 澤 幸 司

目次

	頁
緒言	1
第一章 デーツ、プルーンおよびイチジク抽出物添加飼料で飼育した 健全マウスの免疫系	5
材料および方法	6
1. 材料	6
2. 果実抽出物の調製	6
3. マウスの飼育試験	7
4. 脾臓とパイエル板細胞懸濁液の調製	7
5. 細胞の機能解析	10
6. 統計分析	10
結果	11
1. マウスの体重	11
2. 脾臓の IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ 細胞数と IL-4 ⁺ CD4 ⁺ 細胞数	11
3. パイエル板の IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ 細胞数と IL-4 ⁺ CD4 ⁺ 細胞数	11
4. 脾臓の IFN- γ ⁺ CD49b ⁺ 細胞数と IL-12 ⁺ CD11b ⁺ 細胞数	14
5. パイエル板の IFN- γ ⁺ CD49b ⁺ 細胞数と IL-12 ⁺ CD11b ⁺ 細胞数	14
考察	18
要約	21

第二章 デーツ中の細胞性免疫増強成分の同定	22
材料および方法	22
1. 材料	23
2. デーツとプルーン抽出物の分画	23
3. パイエル板細胞懸濁液の調製と培養	24
4. 遺伝子発現解析	25
5. パイエル板細胞の機能解析	26
6. 超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) 解析	26
7. 糖組成解析	28
8. 統計分析	29
結果	29
1. デーツとプルーン分画物が IFN- γ mRNA の発現に及ぼす影響	29
2. デーツ抽出物中のポリフェノールの同定	29
3. デーツ抽出物中に同定されたポリフェノールが IFN- γ mRNA の発現に及ぼす影響	32
4. デーツ抽出物中に同定されたポリフェノールが 各種免疫細胞数に及ぼす影響	32
5. デーツ抽出物の分子量 30,000 Da 以上の画分より得られた沈殿物が 各種免疫細胞数に及ぼす影響	35
6. デーツ抽出物の分子量 30,000 Da 以上の画分中の糖組成の決定	35
考察	35
要約	41

第三章 デーツ抽出物添加飼料で飼育した先天性 I 型アレルギーマウスのアレルギー症状とその関連因子	42
材料および方法	43
1. 材料	43
2. デーツ抽出物の調製	44
3. マウスの飼育試験	44
4. 脾臓細胞懸濁液の調製	47
5. 細胞の機能解析	47
6. 抗体の定量	48
7. 遺伝子発現解析	48
8. 統計分析	49
結果	49
1. マウスの体重	49
2. 耳介の厚さとアレルギースコア	49
3. 血清抗体レベル	52
4. 脾臓中の免疫細胞数	52
5. Btk と Itk mRNA の発現レベル	55
考察	55
要約	60
第四章 デーツ抽出物添加飼料で飼育した後天的 I 型アレルギーマウスのアレルギー症状とその関連因子	61

材料および方法	61
1. 材料	61
2. デーツ抽出物の調製	62
3. マウスの飼育試験	62
4. 脾臓とパイエル板細胞懸濁液の調製	64
5. 細胞の機能解析	64
6. 抗体の定量	65
7. 統計分析	65
結果	65
1. マウスの体重	65
2. くしゃみと鼻の引っかき回数	65
3. 血清抗体レベル	68
4. 脾臓の IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ 細胞数, IL-4 ⁺ CD4 ⁺ 細胞数および IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ /IL-4 ⁺ CD4 ⁺ 細胞比	68
5. 脾臓とパイエル板の免疫細胞数	71
考察	71
要約	76
第五章 デーツ中のアレルギー軽減成分の同定	77
材料および方法	78
1. 材料	78
2. 脾臓細胞懸濁液の調製と培養	78
3. 細胞の機能解析	78

4. 遺伝子発現解析	79
5. 統計分析	79
結果	79
1. データ抽出物中に同定されたポリフェノールが 各種免疫細胞数に及ぼす影響	79
2. データ抽出物中に同定されたポリフェノールが Btk と Itk の mRNA の発現に及ぼす影響	79
考察	81
要約	86
総括	87
Summary	91
謝辞	93
引用文献	94

緒言

デーツは、エジプト文明やメソポタミア文明の壁画にその絵が残されており、北アフリカや中東アジアを中心に紀元前 4000 年頃から栽培されてきたナツメヤシ (*Phoenix dactylifera* L.) の果実である (山形 1988)。一方、デーツの脂質成分に基づく科学的考察では、少なくとも 3500 年前には北アフリカで栽培されていたと考えられる (Copley *et al.* 2001)。なお、現在では中央および南アメリカの一部、および南ヨーロッパでも栽培されている (Hong *et al.* 2006; Rock *et al.* 2009)。

ナツメヤシはヤシ科の常緑高木 (大きいものは 25 メートルになる) であり、砂漠などの乾燥地に自生する。ナツメヤシは、乾燥地の過酷な環境で生育できることから、「生命の樹」とも呼ばれ、その果実であるデーツは「めぐみの果実」と称されている (日本貿易振興機構 2007)。デーツの栄養価は非常に高く、古くからその乾燥物は、砂漠地帯を旅する商人 (キャラバン) の貴重な栄養源となっている (Murofushi 2009)。乾燥デーツは、独特の甘みと香りを有しており、食感的にも優れている。そのため現在では、乾燥デーツは、ジャム、ジュースおよび菓子材料としてヨーロッパやアジアなどの一部の地域で日常的に消費されている。しかし、我が国において、乾燥デーツはほとんど消費されておらず、乾燥果実として一般的にはプルーン (*Prunus domestica* L.) やイチジク (*Ficus carica* L.) がなじみ深い。財務省貿易統計によると、我が国におけるプルーンおよびイチジクの年間収穫量はそれぞれ、約 3,200 トンおよび 13,000 トンであり、年間輸入量はそれぞれ、10,000 トンおよび 1,100 トンである。

近年、アラブ首長国連邦 (UAE) をはじめとする乾燥地の国々では、砂漠の緑化のための国策としてナツメヤシの栽培を推進している。特

に UAE では、数十年前から点滴灌漑システムを取り入れた大規模な国土の緑化が行われており、その成果としておよそ 200,000 ha の緑化に成功している (山本 1997)。UAE の年間デーツ収穫量は 1961 年に 6,000 トンであったものが、2001 年には 318,000 トンと 53 倍に増加している。しかしながら、その輸出量は 5,000 トンにとどまっている。この要因は、デーツはヨーロッパやアジアの一部の地域では日常的に消費されているが、我が国を含む多くの国々では、その消費がほとんどないことによる。しかし、デーツには、炭水化物、タンパク質、脂質、ビタミンおよびミネラルの五大栄養成分が豊富に含まれていることは周知のところである (Murofushi 2009)。合わせて、デーツは果実であることから、ポリフェノールや多糖類などを含み、それらには様々な生理機能があることが示唆される。

一般に、食品成分が生理機能をもつ場合、腸管上皮から吸収された後、体内で機能を発現する場合と、腸管上皮から体内へは吸収されないが、機能を発現する場合とに分けられる。特に免疫系において、前者は全身免疫系、後者は粘膜免疫系に関係する。全身免疫をつかさどる組織は脾臓であり、様々な種類の免疫細胞を貯蔵していることは周知のところである (Mebius & Kraal 2005)。食品成分は、単純拡散あるいは、輸送タンパク質 (トランスポーター) を介してのみ腸管上皮細胞の基底膜側に通過することができるため、一般に低分子の食品成分は、腸管上皮から体内へ吸収され、血液を介して脾臓に達することで全身免疫系に作用する。一方、腸管粘膜免疫を担う組織は腸管関連リンパ組織であり、その一つにパイエル板がある (Guy-Grand & Vassalli 2002)。パイエル板の上皮細胞層には M 細胞と呼ばれる、高分子の食品成分でも取り込み得る細胞が存在することが知られている (Wolf & Bye 1984)。M 細胞に取り込まれた食品成分は、パイエル板での局所免疫系

に作用するだけでなく、パイエル板の免疫細胞がリンパ管や血液を介して他の粘膜組織や脾臓に移行する (Ottaway 1990)。従って、体内に吸収されない高分子の食品成分でも、全身免疫系に影響する場合がある。

近年、免疫疾患の予防や治療のために、一部の食品成分が用いられつつある。免疫疾患の中でも、アトピー性皮膚炎、花粉症およびアレルギー喘息などに代表される I 型アレルギーは、我が国の国民の 3 人に 1 人が罹っていると言われ、非常に患者数が多い。I 型アレルギーは IgE の増加が原因であり、肥満細胞に結合した IgE が抗原と結合することで、ヒスタミンなどの化学伝達物質が放出され、炎症を引き起こすことは周知のところである (Platts-Mills 2001)。このように、I 型アレルギーの免疫学的な発症機序については解明されつつあるが、臨床的に有効な治療法は確立されていない。そのため、抗アレルギー機能を有する食品成分の探索が精力的に行なわれている。その一つとして、ポリフェノールが挙げられる。例えば、様々な果実中に含まれるフェノール酸類の一つであるクロロゲン酸 (Kim *et al.* 2010) や、リンゴ中に含まれるプロシアニジン類 (Akiyama *et al.* 2000) が、マウスにおいて I 型アレルギー症状を軽減することが報告されている。乾燥デザート中には、フェノール酸類やプロシアニジン類などが含まれる (Mansouri 2005; Al-Farsi *et al.* 2005; Hong *et al.* 2006), また重量の 2% という高濃度のポリフェノールを含むという報告 (Vinson *et al.* 2005) がある。このことから、デザートが抗アレルギー機能をもつかどうかは関心のあるところである。しかし、抗アレルギー機能はもとより、デザートの免疫調節機能に関する研究はほとんどされてこなかった。このような背景から、本論文は、近年生産量が著しく伸びているにもかかわらず、その生理的な機能についてほとんど研究されていないデザートの免疫調節機能を、マウスを用いて探索した結果をまとめたものである。

本論文では、緒言に続き、第一章ではデーツ抽出物添加飼料で健常マウスを飼育した場合の免疫系に対する作用を、乾燥果実として我が国でなじみ深いプルーンおよびイチジクとの比較で調べた結果を述べる。次いで、第二章では、デーツ抽出物中の細胞性免疫を増強する成分の同定を行なった結果を述べる。また、第三章では、遺伝的にアレルギー症状を誘発するマウスをデーツ抽出物添加飼料で飼育した場合の、アレルギー症状とその関連因子の変化を調べた結果を述べる。同様に、第四章では、後天的にアレルギー症状を誘発させたマウスをデーツ抽出物添加飼料で飼育した場合の、アレルギー症状とその関連因子の変化を調べた結果を述べる。さらに、第五章では、デーツ抽出物中のアレルギー軽減成分の同定を行なった結果を述べる。最後に、本研究により得られた成果を総括し、その意義を考察する。

第一章 デーツ，プルーンおよびイチジク抽出物添加飼料で飼育した健常マウスの免疫系

中東アジアの人々にとって，デーツは，糖質やミネラルなどの栄養素を豊富に含む食品である (Al-Shahib & Marshall 2003)。またデーツには，抗菌性 (Sallal & Ashkenani 1989) や抗真菌性 (Shraideh *et al.* 1998) の物質が含まれることが知られており，感染症に対する伝統薬としての食品にもなっている。

我が国においてデーツは，一部のソースや焼酎の原料として用いられているが，生果実や乾燥果実として食する習慣はない。我が国において生果実や乾燥果実としてなじみ深い食品にプルーンやイチジクがある。プルーンは西アジアのコーカサス地方が起源であるが (Kayano *et al.* 2004)，今や我が国も含めて世界各地で栽培されている (Kosar *et al.* 2009; Slimestad *et al.* 2009)。インドにおいては，帯下，不規則月経および流産後の衰弱などの治療のためにも用いられてきた。一方，イチジクはヨーロッパのメディテレーニアン地方 (Teixeira *et al.* 2006) をはじめ，我が国を含む世界各地で栽培されている (Guarrera 2005; Chatti *et al.* 2010)。イチジクもまた，呼吸器や鎮痙の薬として伝統的に使用されてきた (Guarrera 2005)。

近年，それらの果実には生活習慣病を予防し得る機能があることが明らかにされつつある。例えば，デーツには血清中のグルコースと脂質レベルを低下させるはたらき (Rock *et al.* 2009)，プルーンには血清中の LDL コレステロール量を低下させるはたらき (Tinker *et al.* 1990) およびイチジクには LDL コレステロール量の指標となるリポタンパク質量を低下させるはたらき (Vinson *et al.* 2005) などがあることが報告されている。しかしながら，デーツ，プルーンおよびイチジクの免疫

調節機能はほとんど知られていなかったと言っても過言ではない。

そこで本章では、それら 3 種類の果実抽出物添加飼料で健常マウス飼育し、脾臓とパイエル板の免疫細胞数を比較した。

材料および方法

1. 材料

Spectra/Por CE 透析チューブ (100-500 MWCO) は Spectrum Laboratories, Inc. (Rancho Dominguez, CA, USA) から得た。フィコエリスリン (PE) 標識抗マウスインターフェロン (IFN)- γ monoclonal antibody (mAb, clone XMG1.2), PE 標識抗マウス インターロイキン (IL)-4 mAb (clone 11B11), PE 標識抗マウス IL-12/IL-23 (p40) mAb (clone C15.6), ビオチン標識抗マウス CD4 mAb (clone RM4-5), ビオチン標識抗マウス CD49b mAb (clone DX5), ビオチン標識抗マウス CD11b mAb (clone M1/70), およびフィコエリスリン/シアニン 5 (PE/Cy5) 標識ストレプトアビジンは, BioLegend (San Diego, CA, USA) より購入した。ブレフェルジン A (BFA), イオノマイシン, ストレプトマイシンおよびフォルボール 12-ミリステート 13-アセテート (PMA) は, 和光純薬工業 (大阪) より得た。IntraPrep は, Beckman Coulter (Marseille, France) より購入した。非働化ウシ胎児血清 (FBS) は, HyClone Laboratories (Logan, UT, USA) から得た。ペニシリンは, MP Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA) より購入した。Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 は, 日水製薬 (東京) より購入した。その他の試薬は全て市販特級試薬を用いた。

2. 果実抽出物の調製

アラブ首長国連邦 (UAE) で収穫された乾燥デーツは丸紅 (東京) から提供された。乾燥プルーンと乾燥イチジクは正栄食品工業 (東京) より購入した。各乾燥果実から種子を除去し、果皮と繊維質を含んだまま約 5×5 mm 四方に切断した。そのうち 1,000 g を 9,000 mL の熱蒸留水で 2 時間還流抽出した。抽出液を遠心分離 ($5,000 \times g$, 30 分間) に供し、上清を回収後凍結乾燥し、各抽出物とした。デーツ、プルーンおよびイチジク各 1,000 g からの抽出物の重量はそれぞれ 675 g, 593 g および 525 g であった。

3. マウスの飼育試験

5 週齢の雄 C3H/HeN 系マウスを、日本 SLC (静岡) より購入し、 23 ± 2 °C の 12 時間明暗周期で、マウス用標準飼料 (オリエンタル酵母, 東京) で 1 週間飼育した。次いで、Fig. 1 に示した手順で試験飼育を行なった。即ち、マウスを 5 匹ずつ 4 群に分け、Table 1 に示した飼料組成の 4 種類の飼料で 5 週間飼育した。なお、各飼料中の糖質とタンパク質の濃度は全て同一にした。飼料と水は自由摂取とし、5 週間飼育後、脾臓と腸管パイエル板を採取し、後述する方法でそれぞれの細胞懸濁液を調製し、機能解析に供した。また、本試験は日本政府が定める「動物の保護および管理に関する法律」と「動物実験の飼養および保管等に関する基準」、並びに信州大学農学部における動物実験のガイドラインに従い、実験動物に対して最善の配慮のもとで行った。

4. 脾臓とパイエル板細胞懸濁液の調製

C3H/HeN 系マウスから無菌的に脾臓とパイエル板を採取し、5% FBS, 100 IU/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地中で滅菌摺りガラスを用いて丁寧に組織を解し、細胞

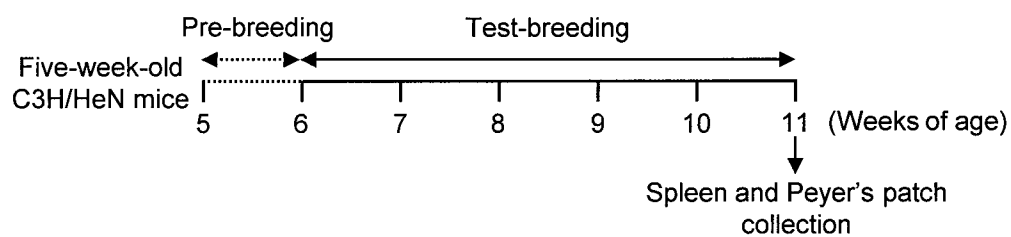


Figure 1. Experimental schedules. After pre-breeding for a week, C3H/HeN mice were given the extract-free (control), date extract-, prune extract-, or fig extract-added diet between 6 and 11 weeks of age. Spleen and Peyer's patch samples were collected at 11 weeks of age.

Table 1. Composition of diets.

	Extract-free (control) diet	Date extract- added diet	Prune extract- added diet	Fig extract- added diet
	%			
Fruit extract	0.0000	10.0000	10.0000	10.0000
β-Corn starch	46.5692	46.5692	46.5692	46.5692
α-Corn starch	15.5000	15.5000	15.5000	15.5000
Ovalbumin	14.0000	13.8720	13.7090	13.8530
Sucrose	10.0000	0.2800	0.4000	0.2800
Cellulose	5.0000	4.8480	4.8910	4.8670
Soy oil	4.0000	4.0000	4.0000	4.0000
AIN-93M mineral mix ^a	3.5000	3.5000	3.5000	3.5000
AIN-93M vitamin mix ^b	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
L-Cystine	0.1800	0.1800	0.1800	0.1800
Choline Bitartrate	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500
TBHQ	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008
Total	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000

^a AIN-93M mineral mix: calcium, 0.52%; phosphorus, 0.23%; potassium, 0.38%; magnesium, 0.05%; sodium, 0.11%; iron, 34.25 ppm; zinc, 36.76 ppm; manganese, 11.09 ppm; copper, 6.73 ppm; cobalt, 0.02 ppm; iodine, 0.21 ppm.

^b AIN-93M vitamin mix: vitamin A, 4.00 IU/g; vitamin D3, 1.00 IU/g; α-tocopherol, 75.00 IU/kg; thiamine, 5.00 ppm; riboflavin, 6.00 ppm; niacin, 30.00 ppm; pantothenic acid, 15.00 ppm; choline, 1000.00 ppm; pyridoxine, 6.00 ppm; folic acid, 2.00 ppm; biotin, 0.20 ppm; vitamin B12, 25.00 µg/kg; vitamin K, 0.86 ppm.

を懸濁させた。同培地で 3 回遠沈洗浄 (1,500 rpm, 5 分間) した後、生細胞が 1.0×10^6 個/mL になるように調製したものを細胞懸濁液とした。

5. 細胞の機能解析

脾臓細胞とパイエル板細胞の細胞表面抗原および細胞内サイトカインの発現は、蛍光免疫染色法により調べた (Tobita *et al.* 2009)。即ち、20 $\mu\text{g/mL}$ BFA, 2 $\mu\text{g/mL}$ イオノマイシン, 20 ng/mL PMA および 10% FBS を含む RPMI-1640 培地に懸濁した細胞浮遊液 (1.0×10^6 個/mL) を 37°C , 5% CO_2 存在下で 4 時間培養した。培養細胞に、100 倍希釈したビオチン標識抗マウス CD4 mAb, ビオチン標識抗マウス CD49b mAb, またはビオチン標識抗マウス CD11b mAb を 10 μL 加えて 4°C で 15 分間放置し、100 倍希釈したストレプトアビジン-PE/Cy5 を 10 μL 加えて 4°C の遮光下で 15 分間放置した。次いで、IntraPrep Reagent 1 を 100 μL 加え、室温遮光下で 15 分間放置後、IntraPrep Reagent 2 を 100 μL 加えて室温遮光下でさらに 5 分間放置した。最後に、100 倍希釈した PE 標識抗マウス IFN- γ mAb, PE 標識抗マウス IL-4 mAb, または PE 標識抗マウス IL-12 mAb を 10 μL 加えて 4°C の遮光下で 15 分間放置した。なお、細胞の洗浄および各抗体の希釈には、5% FBS 含有 Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS) を用いた。細胞数は、Guava personal cell function analyzer (Guava PCA, Guava technologies, Hayward, CA, USA) により測定した。

6. 統計分析

結果は平均値と標準偏差で示し、各群間の比較はダネットの多群比較分散分析 (one-way analysis of variance (ANOVA)) により統計的有意

差の有無を調べた。なお、全ての統計分析は、ystat2004.xls (医学図書出版, 東京), Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) およびエクセル統計 2008 (社会情報サービス, 東京) を用いて行った。

結果

1. マウスの体重

抽出物無添加 (コントロール) 飼料並びにデーツ, プルーンおよびイチジク抽出物添加飼料で飼育したマウスの体重変化を Fig. 2 に示した。Fig. 2 から, 各抽出物添加飼料で飼育したマウスの体重は, コントロール飼料で飼育した場合と比較して有意差はないことがわかる。

2. 脾臓の IFN- γ ⁺CD4⁺ 細胞数と IL-4⁺CD4⁺ 細胞数

コントロール飼料並びにデーツ, プルーンおよびイチジク抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IFN- γ ⁺CD4⁺ 細胞数と IL-4⁺CD4⁺ 細胞数を Fig. 3 に示した。Fig. 3 から, デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IFN- γ ⁺CD4⁺ 細胞数は, コントロール飼料並びにプルーンまたはイチジク抽出物添加飼料で飼育した場合と比較して有意に増加することがわかる ($P < 0.05$)。一方, デーツ, プルーンおよびイチジク抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IL-4⁺CD4⁺ 細胞数は, コントロール飼料で飼育した場合と比較して有意差はないことがわかる。

3. パイエル板の IFN- γ ⁺CD4⁺ 細胞数と IL-4⁺CD4⁺ 細胞数

コントロール飼料並びにデーツ, プルーンおよびイチジク抽出物添加飼料で飼育したマウスのパイエル板の IFN- γ ⁺CD4⁺ 細胞数と

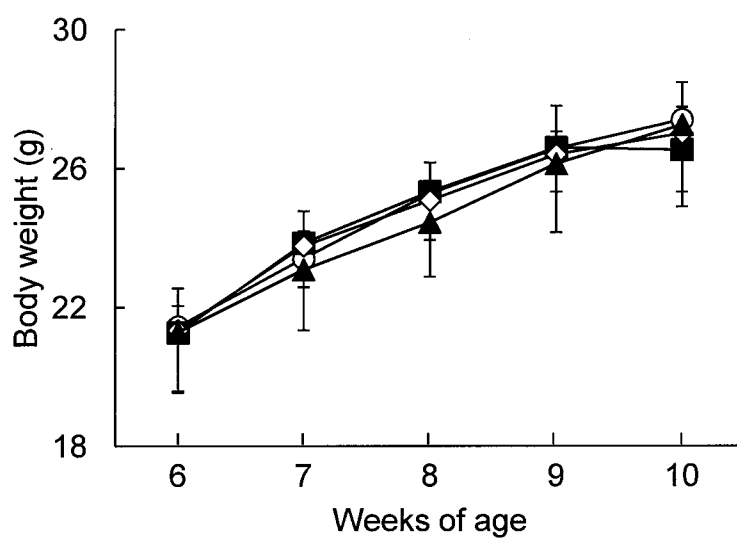


Figure 2. Changes of body weights in C3H/HeN mice given the control, date extract-, prune extract-, or fig extract-added diet. ○, Control; ■, Date extract; ◇, Prune extract; ▲, Fig extract. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 5$).

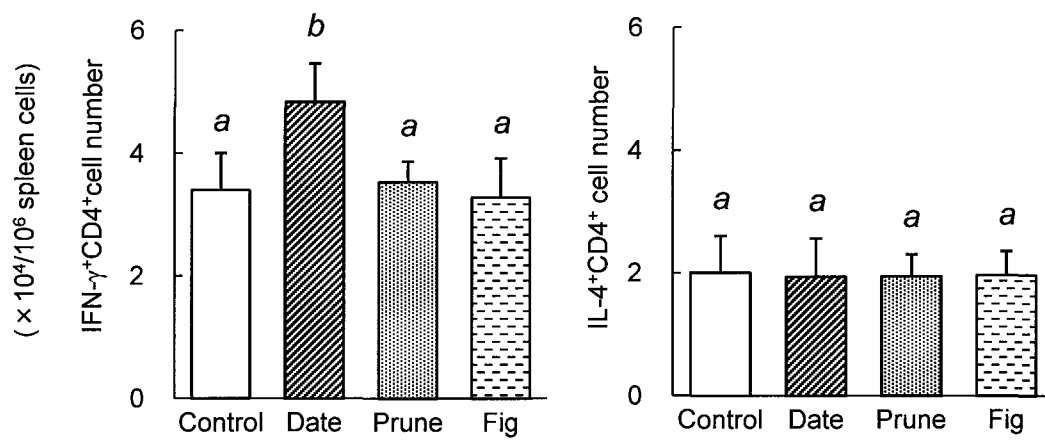


Figure 3. Number of spleen IFN- γ^+ CD4 $^+$ and IL-4 $^+$ CD4 $^+$ cells in C3H/HeN mice given the control, date extract-, prune extract-, or fig extract-added diet. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 5$). Items indicated with different letters (i.e. *a*, *b*) are significantly different ($P < 0.05$).

IL-4⁺CD4⁺ 細胞数を Fig. 4 に示した。Fig. 4 から、デーツ、プルーンおよびイチジク抽出物添加飼料で飼育したマウスのパイエル板の IFN- γ ⁺CD4⁺ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して有意に増加することがわかる。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスのパイエル板の IL-4⁺CD4⁺ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して減少傾向にあることがわかる。

4. 脾臓の IFN- γ ⁺CD49b⁺ 細胞数と IL-12⁺CD11b⁺ 細胞数

コントロール飼料並びにデーツ、プルーンおよびイチジク抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IFN- γ ⁺CD49b⁺ 細胞数と IL-12⁺CD11b⁺ 細胞数を Fig. 5 に示した。Fig. 5 から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IFN- γ ⁺CD49b⁺ 細胞数は、コントロール飼料並びにプルーンまたはイチジク抽出物添加飼料で飼育した場合と比較して増加傾向にあることがわかる。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IL-12⁺CD11b⁺ 細胞数は、コントロール飼料並びにプルーンまたはイチジク抽出物添加飼料で飼育した場合と比較して有意に増加することがわかる。

5. パイエル板の IFN- γ ⁺CD49b⁺ 細胞数と IL-12⁺CD11b⁺ 細胞数

コントロール飼料並びにデーツ、プルーンおよびイチジク抽出物添加飼料で飼育したマウスのパイエル板の IFN- γ ⁺CD49b⁺ 細胞数と IL-12⁺CD11b⁺ 細胞数を Fig. 6 に示した。Fig. 6 から、デーツとプルーン抽出物添加飼料で飼育したマウスのパイエル板の IFN- γ ⁺CD49b⁺ 細胞数は、コントロール飼料またはイチジク抽出物添加飼料で飼育した場合と比較して有意に増加することがわかる。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスのパイエル板の IL-12⁺CD11b⁺ 細胞数は、コ

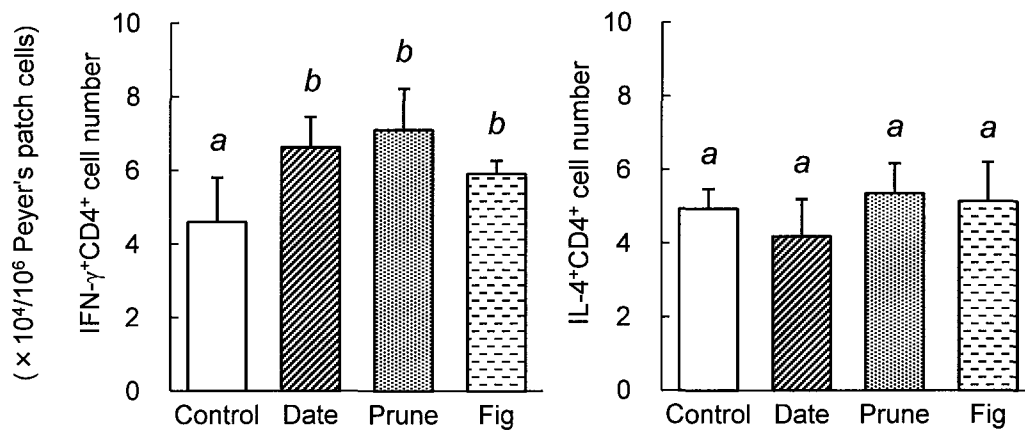


Figure 4. Number of Peyer's patch IFN- γ ⁺CD4⁺ and IL-4⁺CD4⁺ cells in C3H/HeN mice given the control, date extract-, prune extract-, or fig extract-added diet. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 5$). Items indicated with different letters (i.e. *a*, *b*) are significantly different ($P < 0.05$).

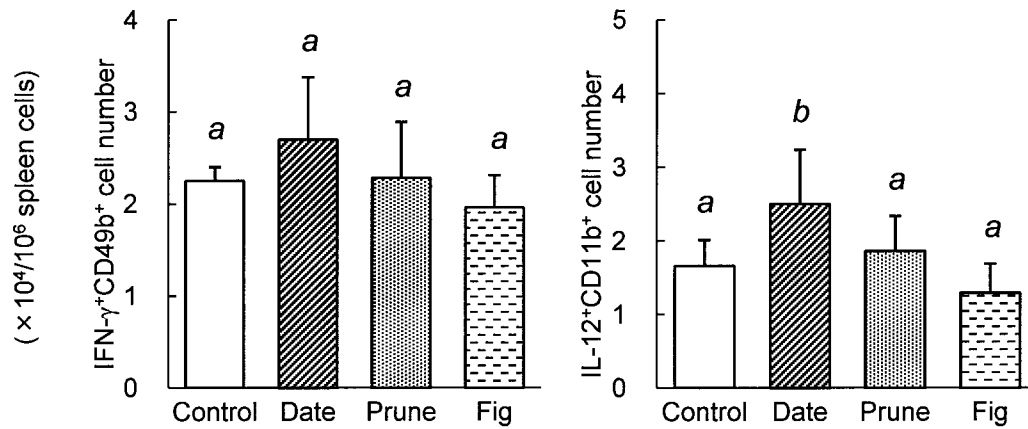


Figure 5. Number of spleen IFN- γ ⁺CD49b⁺ and IL-12⁺CD11b⁺ cells in C3H/HeN mice given the control, date extract-, prune extract-, or fig extract-added diet. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 5$). Items indicated with different letters (i.e. *a*, *b*) are significantly different ($P < 0.05$).

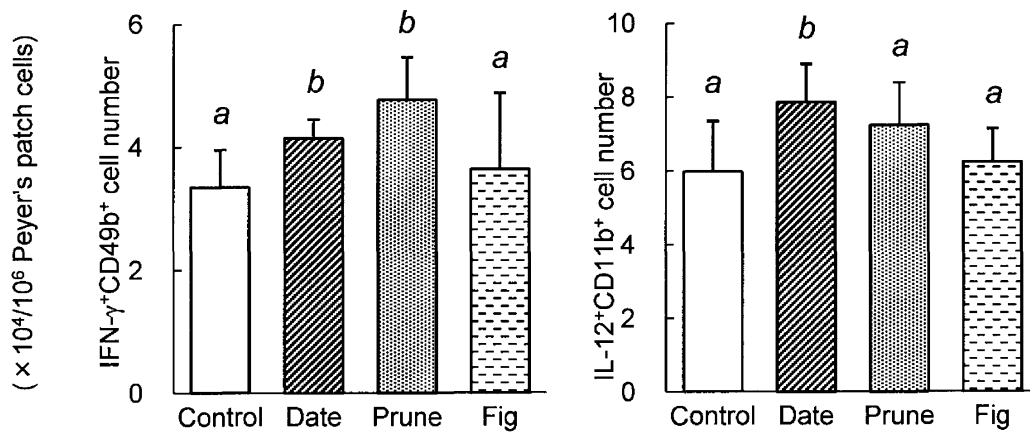


Figure 6. Number of Peyer's patch IFN- γ ⁺CD49b⁺ and IL-12⁺CD11b⁺ cells in C3H/HeN mice given the control, date extract-, prune extract-, or fig extract-added diet. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 5$). Items indicated with different letters (i.e. *a*, *b*) are significantly different ($P < 0.05$).

ントロール飼料並びにプルーンまたはイチジク抽出物添加飼料で飼育した場合と比較して有意に増加することがわかる。

考察

デーツ抽出物添加飼料で飼育した C3H/HeN 系マウスのパイエル板の $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+$ 細胞数, $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD49b}^+$ 細胞数および $\text{IL-12}^+\text{CD11b}^+$ 細胞数は, コントロール飼料で飼育した場合と比較して有意に増加した (Fig. 4 と Fig. 6)。また, プルーンおよびイチジク抽出物添加飼料で飼育したマウスのパイエル板の $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+$ 細胞数, 並びにプルーン抽出物添加飼料で飼育したマウスのパイエル板の $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD49b}^+$ 細胞数は, コントロール飼料で飼育した場合と比較して有意に増加した (Fig. 4 と Fig. 6)。しかしながら, 脾臓の $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+$ 細胞数および $\text{IL-12}^+\text{CD11b}^+$ 細胞数を有意に増加させたのはデーツ抽出物添加飼料で飼育した場合のみであった (Fig. 3 と Fig. 5)。

CD11b はマクロファージと樹状細胞の典型的な細胞膜表面抗原である (Ammon *et al.* 2000)。IL-12 はそれらの細胞により産生される主要サイトカインの一つである (Fearon & Locksley 1996)。また, CD49b はナチュラルキラー (NK) 細胞の細胞膜表面抗原であり (Biron *et al.* 1999), $\text{IFN-}\gamma$ は NK 細胞や 1 型ヘルパー T (Th1) 細胞により産生されるサイトカインである (Fearon & Locksley 1996)。一般に, IL-12 は NK 細胞の増殖と活性化を誘導し, それにより NK 細胞は $\text{IFN-}\gamma$ を産生することが知られている (Fearon & Locksley 1996)。即ち, $\text{IL-12}^+\text{CD11b}^+$ 細胞の増加, つまりマクロファージ数の増加は, NK ($\text{IFN-}\gamma^+\text{CD49b}^+$) 細胞数の増加を導く。このことと, 本章で得られた結果から, デーツ抽出物とプルーン抽出物はパイエル板において, マク

ロファージによる IL-12 を誘導し、NK 細胞の活性化にはたらくことが示唆される。しかし、イチジク抽出物は IL-12⁺CD11b⁺ 細胞数に影響を及ぼさないことが示唆される。

マクロファージの産生する IL-12 は、ナイーブ T (Th0) 細胞から Th1 細胞へ分化を促進、即ち IFN- γ ⁺CD4⁺ 細胞数を増加させる (Abbas *et al.* 1996)。このことと、本章で得られた結果より、デーツ抽出物は脾臓とパイエル板の両方において、Th0 細胞を Th1 細胞へ誘導することが示唆される。また、プルーン抽出物およびイチジク抽出物はパイエル板において、Th0 細胞を Th1 細胞へ誘導することが示唆される。

既に述べたように、脾臓は全身免疫に深く関わり、パイエル板は腸管の粘膜免疫に関わる (Mebius & Kraal 2005)。デーツ抽出物は、脾臓とパイエル板の両方に対して、IFN- γ ⁺CD4⁺ 細胞数、IFN- γ ⁺CD49b⁺ 細胞数および IL-12⁺CD11b⁺ 細胞数を有意に増加、または増加させる傾向にあった。このことから、デーツ抽出物中の活性成分には低分子成分が含まれ、それが体内に吸収された後脾臓に達し、そこでそれらの細胞数を増加させることが推察される。一方、プルーン抽出物は、パイエル板に対してはそれら細胞数を有意に増加、または増加させる傾向にあったが、脾臓に対しては影響を及ぼさなかった。このことは、プルーン抽出物中の活性成分は高分子成分であり、それがパイエル板に対して作用するが、低分子成分は含まれないことが推察される。

マクロファージと NK 細胞は自然細胞免疫系における感染防御反応の第 1 戦で作用することは周知のところである (Taylor *et al.* 2005)。合わせて、マクロファージと NK 細胞は、腫瘍細胞に対しても細胞傷害を示し生体防御に寄与している (Biron *et al.* 1999)。このことと、本章で得られた結果から、デーツ抽出物は脾臓とパイエル板において、

マクロファージによる IL-12 を誘導し, NK 細胞の活性化にはたらく
ことで細胞性免疫を増強することが示唆される。

要約

C3H/HeN 系マウスの飼育試験において、デーツ抽出物は、プルーンやイチジク抽出物と異なり、脾臓において細胞性免疫に関わる細胞数を増加させた。また、デーツ抽出物は、プルーンやイチジク抽出物と同様にパイエル板において細胞性免疫に関わる細胞数を増加させた。これらの結果から、デーツ抽出物は、全身および粘膜免疫系の両方において、細胞性免疫を増強することが示唆される。

第二章 デーツ中の細胞性免疫増強成分の同定

前章において、デーツ抽出物は、C3H/HeN 系マウスの脾臓およびパイエル板の Th1 細胞数、NK 細胞数およびマクロファージ数を有意に増加および増加傾向にさせた。デーツ抽出物中の成分のうち、何がそれらの作用にはたらくのかは関心のあるところである。

一般に、果実の主要成分は、糖類、多糖類およびポリフェノールである。一般的な果実に含まれる多糖類であるペクチンは、ラットにおいて IFN- γ などのサイトカインの発現を増加させること (Inngjerdigen *et al.* 2007)、また、 β -グルカン¹は、マクロファージを増加させ、細菌および原生動物に対して抗感染性をもつことが報告されている (Yun *et al.* 1997; Liang *et al.* 1998)。さらに、ポリフェノールを多く含むココア果実抽出物をラットに摂取させると、IFN- γ を発現する細胞数を増加させること (Ramiro-Puig & Castell 2009)、また、メリンジョ果実抽出物が、マウスパイエル板細胞培養系において IFN- γ などのサイトカインの発現を増加させること (Kato *et al.* 2011) などが知られている。このように、果実抽出物に含まれる多糖類やポリフェノールが細胞性免疫に関わる細胞数やサイトカン量を増加することが知られており、デーツ抽出物にもそれらが含まれることが推察される。

そこで本章では、デーツ抽出物を限外濾過に供することで分子量分画物の調製を行ない、各分子量画分の IFN- γ 発現に及ぼす影響を調べた。さらに、IFN- γ 発現に誘導作用が見られた画分については、その成分の同定を行なった。

材料および方法

1. 材料

Spectra/Por CE 透析チューブ (100-500 MWCO) は Spectrum Laboratories, Inc. (Rancho Dominguez, CA, USA) から得た。限外濾過膜 YM-1, PLCC, PLGC および YM-30 は Millipore (Billerica, MA, USA) より購入した。Trypsin は Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) から得た。TRIzol Reagent, dNTP, および M-MLV reverse transcriptase は Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) から購入した。SYBR premix Ex Taq mixture はタカラバイオ (滋賀)より得た。Sep-pak C18 cartridge は Waters (Milford, MA, USA) から購入した。プロトカテキュ酸 (protocatechuic acid), ペラルゴニン (pelargonin), カフェ酸 (caffeic acid), フェルラ酸 (ferulic acid), および クロロゲン酸 (chlorogenic acid) はフナコシ (東京) より購入し, シリンガ酸 (syringic acid) は和光純薬工業 (大阪) から得た。ABEE labeling kit は J-オイルミルズ (東京) より購入した。細胞の機能解析に用いた各抗体と固定液, 細胞の活性化試薬, および培地用の試薬は第一章に準じた。その他の試薬は全て市販特級試薬を用いた。

2. デーツとプルーン抽出物の分画

デーツ (675 g) とプルーン (593 g) 抽出物を 2,500 mL の蒸留水に溶解し, Spectra/Por CE dialysis tubing 100-500 Da MWCO 内に注入し, 蒸留水に対して 15 °C で 16 時間透析した。透析残液を Stirred Ultrafiltration Cell (Model 8200; Amicon, Danvers, MA, USA) と 4 種類の濾過膜, 即ち 1,000 (YM-1), 5,000 (PLCC), 10,000 (PLGC), and 30,000 (YM-30) Da MWCO を用いて限外濾過した。まず透析残液を最大 MWCO 膜 (30,000 Da) に透過させた。濾過残液と透過液を別々に回収し, 次に上記膜の透過液を 10,000 Da の濾過膜に透過させた。さらに

10,000 Da の透過液を 5,000 Da の濾過膜に、5,000 Da の透過液を 1,000 Da の濾過膜に順に透過させた。各膜上の残液を 10 mL の蒸留水に懸濁し凍結乾燥し、30,000 Da 以上 (30,000 Da 濾過残液)、10,000 ~ 30,000 Da (30,000 Da 透過液 ~ 10,000 Da 濾過残液)、5,000 ~ 10,000 Da (10,000 Da 透過液 ~ 5,000 Da 濾過残液)、1,000 ~ 5,000 Da (5,000 Da 透過液 ~ 1,000 Da 濾過残液)、および 500 ~ 1,000 Da (1,000 Da 濾過残液) の 5 画分を得た。デーツ抽出物の各画分の収量は、それぞれ 1.91 g, 1.48 g, 0.14 g, 0.59 g, および 1.80 g で、プルーンでは 1.10 g, 0.20 g, 0.03 g, 0.12 g, および 2.96 g であった。

次にデーツ抽出物の分子量 30,000 Da 以上の画分 (0.5 g) を 20 mL の 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) に溶解し、硫酸アンモニウムを 70% 濃度になるまで添加して 4 °C で 16 時間静置した。次いで遠心分離 (20,000 × g, 30 分間) を行ない、生じた沈殿を上記緩衝液に溶解し、Spectra/Por CE dialysis tubing 100-500 MWCO 内に注入して上記緩衝液に対して 15 °C で 16 時間透析した。透析残液を凍結乾燥し、70% 硫酸アンモニウム沈殿画分として 0.14 g 回収した。同様に、デーツ抽出物の分子量 30,000 Da 以上の画分 (0.5 g) を 20 mL の 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.6) に溶解し、0.01% (w/w) の濃度でトリプシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加して 25 °C で 16 時間静置した。エタノールを 70% 濃度になるまで添加して 4 °C で 1 時間静置し、遠心分離 (5,000 × g, 20 分間) を行なった。生じた沈殿を凍結乾燥し 70% エタノール沈殿画分として 0.31 g 回収した。

3. パイエル板細胞懸濁液の調製と培養

6 週齢の雄 C3H/HeN 系マウスよりパイエル板を無菌的に採取し、第一章に準じてパイエル板細胞懸濁液を調製した。パイエル板細胞懸

濁液 1,000 μL を平底 24 ウェルマイクロプレート (Sarstedt, Newton, NC, USA) に分注し, 最終濃度 0, 50 および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように 0.15 M NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.2) に溶解した果実抽出物, または最終濃度 4 nmol/mL になるようにジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した標準ポリフェノールを加え, 5% CO_2 存在下で 24 時間 (遺伝子発現解析) または 48 時間 (細胞機能解析) 培養した。DMSO の最終濃度は 0.01% とし, その濃度においては細胞毒性がないことを確認した。

4. 遺伝子発現解析

遺伝子発現レベルは, リアルタイム逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により解析した。即ち, 培養したパイエル板細胞を PBS (pH 7.2) で遠心洗浄を行い, TRIzol Reagent 1 mL を加え, 5 分間室温に放置した。放置後, クロロホルム 200 μL を加え, 15 秒間攪拌して 3 分間室温に放置した。次いで, 遠心分離を行い, 回収した水層にイソプロピルアルコール 500 μL を加えて 15 秒間攪拌後, 10 分間室温に放置した。放置後, 遠心分離により得られた沈殿に, 75% エタノール-25% ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理水 1 mL を加えて分離し, 得られた沈殿を総 RNA とした。得られた総 RNA は DEPC 処理水に溶解させた。総 RNA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に対して, DEPC 水 3.5 μL と 10 μM オリゴ d(T)₁₈ プライマー 0.5 μL を加え, 65 °C で 5 分間加熱後, 直ちに氷冷した。氷冷後, First strand buffer 2 μL , 0.1 M DTT 1 μL および 10 mM dNTP Mix 0.5 μL の混合液に M-MLV 逆転写酵素 0.5 μL を溶解した溶液 4 μL を添加して, RT 反応を行った。RT 反応は, 42 °C 50 分間 および 75 °C 15 分間で, PTC-200 Peltie Thermal Cycler (エムジェイジャパン株式会社, 東京) を用いて行った。次いで, 得られた cDNA 1 μL

に対して 2 × SYBR Premix Ex Taq mixture 12.5 μL, 超純水 9.5 μL および各種プライマー Forward と Reverse をともに 1 μL ずつ添加して PCR 反応を行った。使用したプライマーの塩基配列は, IFN- γ に関しては Mizutani *et al.* (2007) に, GAPDH に関しては Tobita *et al.* (2006) に従った。プライマー塩基配列の詳細は Table 2 に示した。PCR 反応は, Thermal Cycler Dice Real Time TP800 system (タカラバイオ) を用いて, 95 °C 5 秒間および 60 °C 30 秒間の反応を 40 回行った。遺伝子発現は, 比較 Ct 法 ($\Delta\Delta Ct$ 法) によって相対的定量を行った。遺伝子発現レベルの補正リファレンス遺伝子は, GAPDH を用いた。なお, 各遺伝子の発現は, 果実抽出物/ポリフェノール無添加の場合を 1 とした時の相対的発現レベルで示した。

5. パイエル板細胞の機能解析

パイエル板細胞の細胞表面抗原と細胞内サイトカインの染色方法は, 第一章に準じた。細胞数は, Guava PCA (Guava Technologies) により測定した。

6. 超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) 解析

デーツ抽出物 (2 g) を 0.1% ギ酸含有蒸留水に溶解させ, C-18 Sep-Pak (10 g) カートリッジ (Waters, Milford, MA, USA) 上にアプライした。C-18 Sep-Pak (10 g) カートリッジはあらかじめメタノールで活性化させ, 0.1% ギ酸含有蒸留水で平衡化させた。80 mL の 0.1% ギ酸含有水をカートリッジに通すことで非吸着成分を洗い流し, 次いで 120 mL の 50% メタノールを通すことで吸着成分を溶出させた。溶出液はロータリーエヴァポレーターで真空濃縮し, 凍結乾燥させて粗ポリフェノール画分を得た。収量は 107.8 mg であった。粗ポリフェノ

Table 2. Primer sequences in this study.

Target		Sequence (5' – 3')
IFN- γ	Sense	AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG
	Antisense	GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG
Btk	Sense	CCG TGT CTG TGT TTG CTA
	Antisense	GGT AAT ACT GGC TCT GTG
Itk	Sense	CTC CGC TAT CCA GTT TGC TCC
	Antisense	GTC CTT GTT GAG CCA GTA GCC
GAPDH	Sense	CCA CAG TCC ATG CCA TCA CTG CC
	Antisense	GGT CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG

ール画分は 200 mg/mL の濃度でメタノールに溶解し、UPLC に供した。UPLC による分析は ACQUITY™ UPLC システム (Waters) および BEH C18 カラム (2.1 mm I.D. × 50 mm, 1.7 μm; Waters) を用いて行なった。オートサンプラーとカラムの温度はそれぞれ 20 °C と 40 °C に設定した。移動相は、(A) 液として 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 含有水、(B) 液として 0.1% TFA 含有アセトニトリルを用い、0.50 mL/min の溶出速度に設定した。グラジエント溶出は、(B) 濃度 5–15% を 0–10 分、(B) 濃度 15–95% を 10–12 分、そして初期条件に戻るプログラムに設定した。溶出液は 254 nm の吸光度と、200–400 nm のスペクトルを測定するフォトダイオードアレイ検出器 (PDA) を用いた。

7. 糖組成解析

糖組成の解析は Yasuno *et al.* (1999) の方法に従った。即ち、デーツ抽出物の分子量 30,000 Da 以上画分 (5 μg) を 4-アミノ安息香酸エチルエステル (ABEE) 標識化キットを用いて、加水分解および標識化した。即ち、8M TFA と蒸留水を 6 対 4 の割合で混合し、10 μL の分子量 30,000 Da 以上画分溶液を添加して、100 °C で 3 時間処理した。溶液を蒸発させ、イソプロパノールを 40 μL 添加し、再び蒸発させた。次いで、ピリジンとメタノールを 1 対 9 の割合で混合した溶液を 40 μL 添加し、15 秒間攪拌した。さらに無水酢酸を 10 μL 添加して 25 °C で 30 分間反応させた。溶液を蒸発させ、蒸留水に溶解した。ABEE 変換単糖は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析した。HPLC は SCL-10AVP システムコントローラー (島津製作所、京都) を用い、LC-10AD 液送ユニット (島津製作所) と RF-10A 検出器 (島津製作所) の組み合わせにより解析した。カラムは ODS-80Ts (4.6 mm I.D. × 150 mm; 東ソー、東京) を用いた。カラム温度は 30 °C に設

定した。溶出は、7% アセトニトリルを含む 0.2 M ホウ酸カリウムバッファー (pH 8.9) を用い、溶出速度は 1.0 mL/min に設定した。溶出液は蛍光 (305 nm の励起波長; 360 nm の放出波長) を測定した。

8. 統計分析

統計分析の方法は第一章に準じた。

結果

1. デーツとプルーン分画物が IFN- γ mRNA の発現に及ぼす影響

デーツとプルーン分画物がマウスパイエル板細胞培養系での IFN- γ mRNA 発現に及ぼす影響を Fig. 7 に示した。Fig. 7 から、デーツ抽出物分画物の分子量 500 Da から 1,000 Da の低分子画分と、30,000 Da 以上の高分子画分が、抽出物無添加並びに 1,000 Da から 5,000 Da, 5,000 Da から 10,000 Da, または 10,000 Da から 30,000 Da の分子量画分と比較して、有意に IFN- γ mRNA 発現レベルを増加させることがわかる。一方、プルーン抽出物の分子量 10,000 Da から 30,000 Da と、30,000 Da 以上の高分子画分が、抽出物無添加並びに 500 Da から 1,000 Da, 1,000 Da から 5,000 Da, または 5,000 Da から 10,000 Da の分子量画分と比較して、有意に IFN- γ mRNA 発現レベルを増加させることがわかる。

2. デーツ抽出物中のポリフェノールの同定

デーツ抽出物中のポリフェノールを UPLC で同定した結果を Fig. 8 に示した。Fig. 8 から、10 以上のピークがデーツ抽出物中に検出されることがわかる。そのうち標準ポリフェノールのリテンションタイ

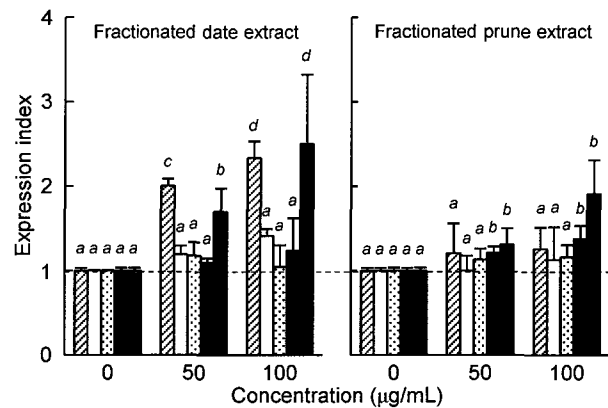


Figure 7. Relative expression of IFN- γ mRNA in C3H/HeN mouse Peyer's patch cells cultured with 50 or 100 $\mu\text{g/mL}$ of each fractionated extract. Peyer's patch cells were cultured with each fractionated extract for 24 h. The fraction with a molecular mass from 500 Da to 1,000 Da, the fraction with a molecular mass from 1,000 Da to 5,000 Da, the fraction with a molecular mass from 5,000 Da to 10,000 Da, the fraction with a molecular mass from 10,000 Da to 30,000 Da, and the fraction with a molecular mass greater than 30,000 Da are presented as the hatched, open, black-dotted, solid, and shaded columns, respectively. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 3$). Items indicated with different letters (i.e. *a*, *b*, *c*, *d*) are significantly different ($P < 0.05$).

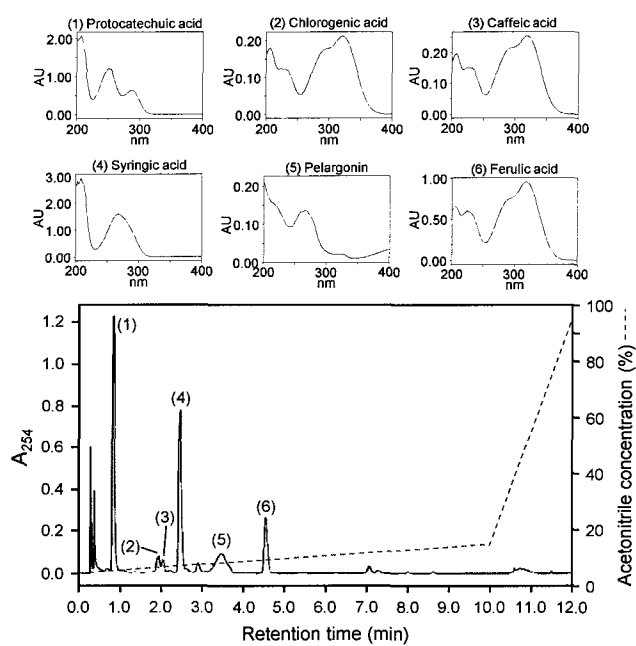


Figure 8. Spectra (upper) and chromatograms (lower) of the fraction with crude date polyphenols analyzed by UPLC. (1) protocatechuic acid, (2) chlorogenic acid, (3) caffeic acid, (4) syringic acid, (5) pelargonin, and (6) ferulic acid.

ムと、200 から 400 nm の UV 吸収スペクトルとの比較から、6 種類を同定した。即ち、(1) プロトカテキュ酸、(2) クロロゲン酸、(3) カフェ酸、(4) シリンガ酸、(5) ペラルゴニンおよび (6) フェルラ酸である。他のピークは同定できなかった。

3. デーツ抽出物中に同定されたポリフェノールが IFN- γ mRNA の発現に及ぼす影響

デーツ抽出物中に同定された 6 種類のポリフェノールがマウスパリエル板細胞培養系での IFN- γ mRNA の発現に及ぼす影響を Fig. 9 に示した。Fig. 9 から、クロロゲン酸、カフェ酸、ペラルゴニンおよびフェルラ酸が、ポリフェノール無添加、プロトカテキュ酸およびシリンガ酸と比較して有意に IFN- γ mRNA の発現レベルを増加させることがわかる。

4. デーツ抽出物中に同定されたポリフェノールが各種免疫細胞数に及ぼす影響

デーツ抽出物中に同定された 6 種類のポリフェノールのうち、IFN- γ mRNA の発現レベルを増加させる 4 種類のポリフェノールが、マウスパリエル板細胞培養系での各種免疫細胞数に及ぼす影響を Fig. 10 に示した。Fig. 10 から、ポリフェノール無添加、ペラルゴニンまたはフェルラ酸と比較して、クロロゲン酸とカフェ酸が IFN- γ^+ CD4 $^+$ 細胞数を有意に増加させることがわかる。また、ポリフェノール無添加またはカフェ酸と比較して、クロロゲン酸、ペラルゴニンおよびフェルラ酸が IFN- γ^+ CD49b $^+$ 細胞数を有意に増加させることがわかる。さらに、ポリフェノール無添加またはペラルゴニンと比較して、クロロゲン酸、カフェ酸およびフェルラ酸が IL-12 $^+$ CD11b $^+$ 細胞数を有意に

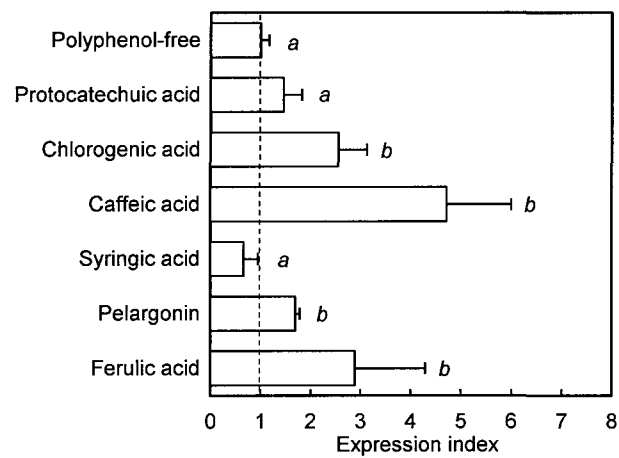


Figure 9. Relative expression of IFN- γ mRNA in C3H/HeN mouse Peyer's patch cells cultured with six kinds of polyphenols identified in the date extract. Peyer's patch cells were cultured with 4 μ M of each polyphenol for 24 h. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 3$). Items indicated with different letters (i.e. *a*, *b*) are significantly different ($P < 0.05$).

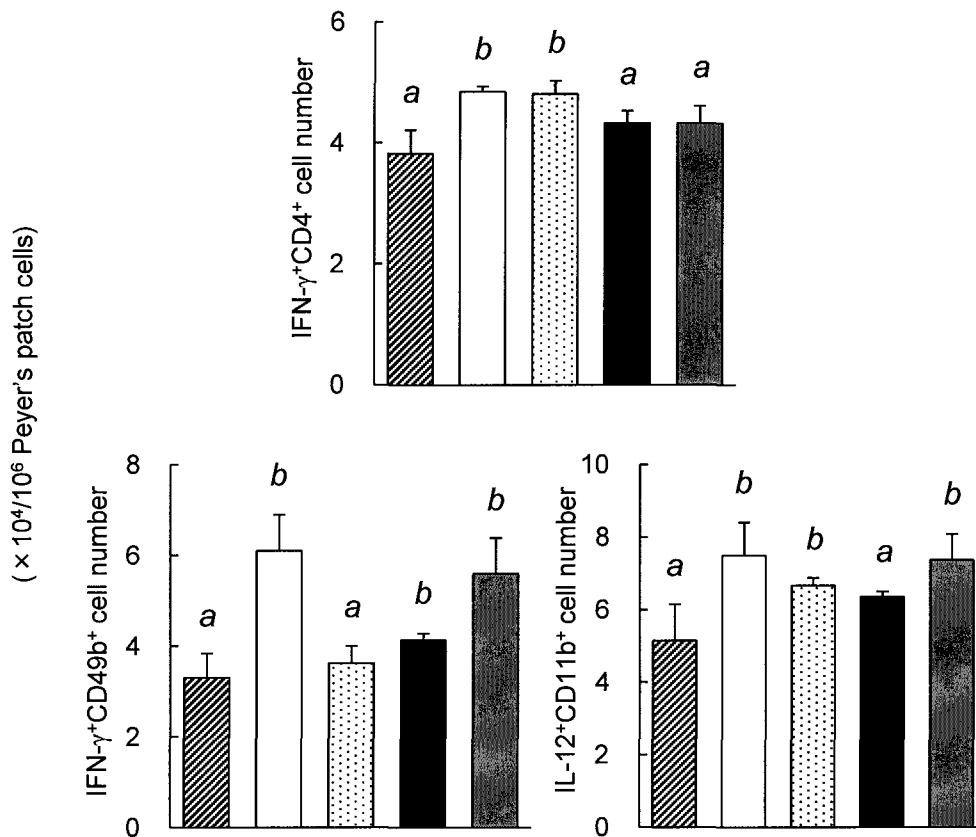


Figure 10. Number of immunocompetent cells in C3H/HeN mouse Peyer's patch cells cultured with four kinds of polyphenols identified in the date extract. Peyer's patch cells were cultured with 4 μ M of each polyphenol for 48 h. Polyphenol-free, chlorogenic acid, caffeic acid, pelargonin, and ferulic acid are presented as the hatched, open, black-dotted, solid, and shaded columns, respectively. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 3$). Items indicated with different letters (i.e. *a*, *b*) are significantly different ($P < 0.05$).

増加させることがわかる。

5. デーツ抽出物の分子量 30,000 Da 以上の画分より得られた沈殿物が各種免疫細胞数に及ぼす影響

デーツ抽出物の分子量 30,000 Da 以上の画分より得られた、トリプシン処理後のエタノール沈殿物および硫酸アンモニウム沈殿物が、マウスパイエル板細胞培養系での各種免疫細胞数に及ぼす影響を Fig. 11 に示した。Fig. 11 から、エタノール沈殿物が、沈殿物無添加と比較して、 $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD49b}^+$ および $\text{IL-12}^+\text{CD11b}^+$ 細胞数を有意に増加させることがわかる。一方、硫酸アンモニウム沈殿物は、沈殿物無添加と比較して有意差はないことがわかる。

6. デーツ抽出物の分子量 30,000 Da 以上の画分中の糖組成の決定

デーツ抽出物の分子量 30,000 Da 以上の画分中の糖組成を HPLC により同定した結果を Fig. 12 に示した。Fig. 12 から、デーツ抽出物の分子量 30,000 Da 以上の画分の分解後 ABEE 標識産物中には、2 つの小さなピークと 1 つの大きなピークが検出されることがわかる。小さなピークの 1 つは ABEE 変換ガラクトロン酸のリテンションタイムと一致し、大きなピークは ABEE 変換グルコースのリテンションタイムと一致した。もう一つの小さなピークは同定できなかった。

考察

デーツ抽出物の分子量 500 Da から 1,000 Da の画分と 30,000 Da 以上の画分の 2 画分が、抽出物無添加および他の分子量画分と比較して $\text{IFN-}\gamma$ mRNA の発現を有意に増加させた (Fig. 7)。この結果から、

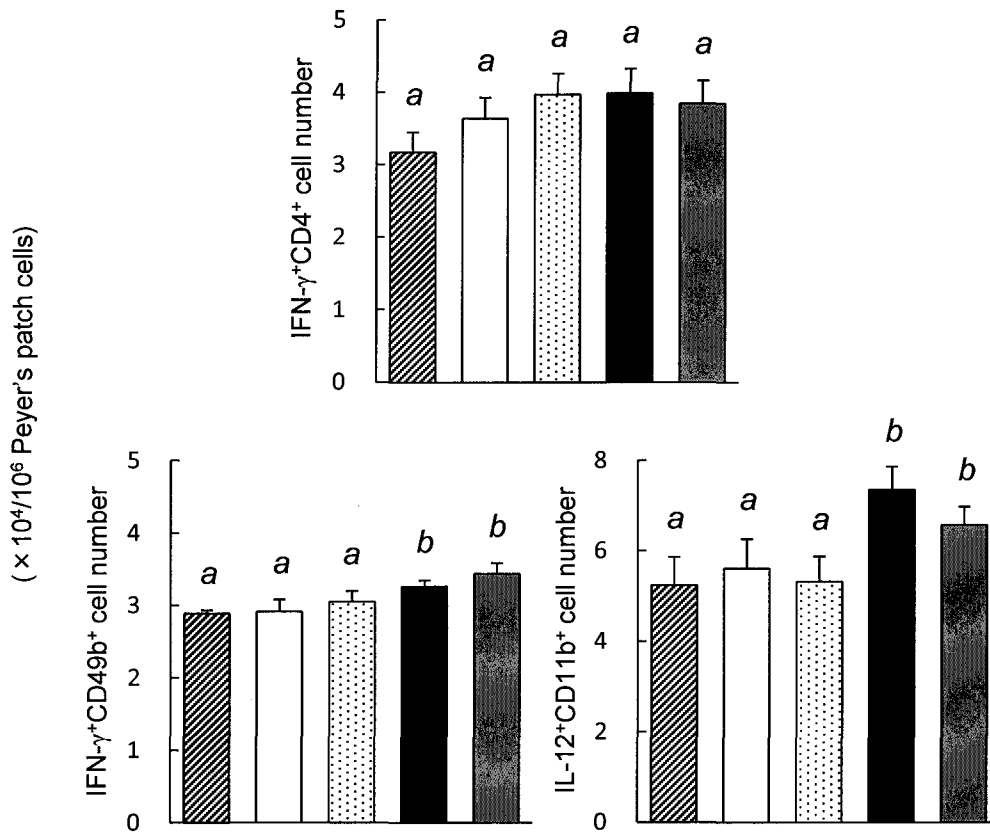


Figure 11. Number of immunocompetent cells in C3H/HeN mouse Peyer's patch cells cultured with two precipitates of the date extract fraction with a molecular mass greater than 30,000 Da. Peyer's patch cells were cultured with 50 or 100 μ g/mL of each precipitate for 48 h. The precipitate-free, 50 μ g/mL of ammonium sulfate precipitate, 100 μ g/mL of ammonium sulfate precipitate, 50 μ g/mL of ethanol precipitate, and 100 μ g/mL of ethanol precipitate are presented as the hatched, open, black-dotted, solid, and shaded columns, respectively. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 3$). Items indicated with different letters (i.e. *a*, *b*) are significantly different ($P < 0.05$).

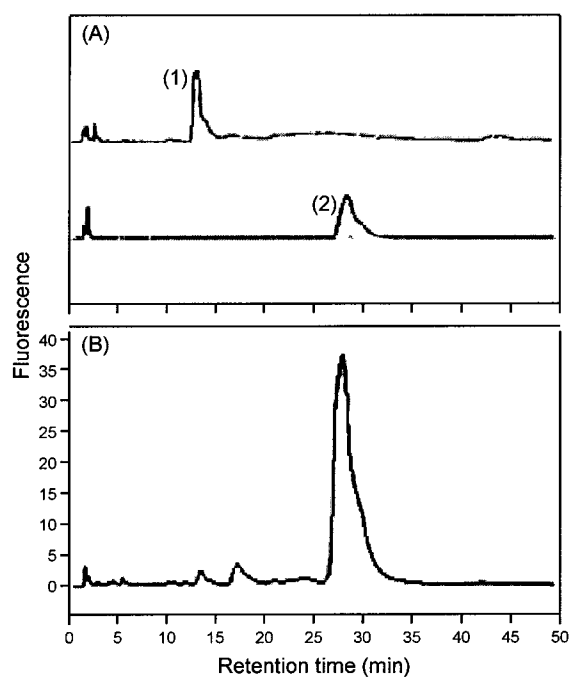


Figure 12. Chromatograms of ABEE-converted standard monosaccharides (A) and ABEE-converted degradation products of the date extract fraction with a molecular mass greater than 30,000 Da (B) on HPLC. Peaks: (1) ABEE-converted galacturonic acid, (2) ABEE-converted glucose.

デーツ抽出物中の少なくとも 2 種類の成分が IFN- γ mRNA の発現を刺激することが示唆される。さらに、それらのデーツ抽出物中の成分は、第一章において、デーツ抽出物添加飼料で飼育した C3H/HeN 系マウスにおける脾臓とパイエル板の IFN- γ^+ CD4 $^+$ 細胞数とパイエル板の IFN- γ^+ CD49b $^+$ 細胞数の増加にはたらいたことが示唆される。一般に、低分子成分は腸管から体内に吸収されやすいため、デーツ抽出物中の低分子成分が脾臓の免疫細胞に影響したことが推察される。一方、プルーン抽出物の分子量 10,000 Da から 30,000 Da の画分と 30,000 Da 以上の画分の 2 画分が、抽出物無添加および他の分子量画分と比較して IFN- γ mRNA の発現を有意に増加させた (Fig. 7)。この結果から、プルーン抽出物中の少なくとも 2 種類の高分子成分が IFN- γ mRNA の発現を刺激することが示唆される。それらのプルーン抽出物中の成分は、プルーン抽出物添加飼料で飼育した C3H/HeN 系マウスにおけるパイエル板の IFN- γ^+ CD4 $^+$ 細胞数と IFN- γ^+ CD49b $^+$ 細胞数の増加にはたらいたことが示唆される。一方、脾臓のそれらの細胞数は有意に増加しなかったことから、プルーン抽出物中の活性成分は、高分子であるために体内には吸収されず、脾臓のそれらの免疫細胞に影響を与えなかったことが推察される。

一般に、果実中に含まれる低分子成分は主にポリフェノールである。デーツは、プロトカテキュ酸、カフェ酸、シリンガ酸、フェルラ酸、プロシアニジン類、およびケルセチングルコース配糖体などが報告されている (Mansouri 2005; Al-Farsi *et al.* 2005; Hong *et al.* 2006)。本研究において、我々はデーツ中に 6 種類のポリフェノールを同定した。加えて、我々は、クロロゲン酸とペラルゴニンが新規デーツポリフェノールであることを確認した (Fig. 8)。本研究で同定された 6 種類のポリフェノールが、マウスパイエル板細胞培養系における

IFN- γ mRNA の発現に及ぼす影響を調べたところ、クロロゲン酸、カフェ酸、ペラルゴニンおよびフェルラ酸が、ポリフェノール無添加、プロトカテキユ酸およびシリング酸と比較して、有意に IFN- γ mRNA の発現を高めた (Fig. 9)。加えて、クロロゲン酸とカフェ酸は、ポリフェノール無添加、ペラルゴニンおよびフェルラ酸と比較して IFN- γ^+ CD4 $^+$ 細胞数を有意に増加させた。さらに、クロロゲン酸、ペラルゴニン、およびフェルラ酸は、ポリフェノール無添加およびカフェ酸と比較して IFN- γ^+ CD49b $^+$ 細胞数を有意に増加させた (Fig. 10)。第一章において、デーツ抽出物添加飼料で飼育した C3H/HeN 系マウスでは、コントロール飼料で飼育したそれらと比較して、脾臓の IFN- γ^+ CD4 $^+$ 細胞数、並びにパイエル板の IFN- γ^+ CD4 $^+$ 細胞数および IFN- γ^+ CD49b $^+$ 細胞数は有意に高く、脾臓の IFN- γ^+ CD49b $^+$ 細胞数は増加傾向にあった。これらのことから、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスにおいて、脾臓の IFN- γ^+ CD4 $^+$ 細胞数の増加はクロロゲン酸とカフェ酸のはたらきに、脾臓の IFN- γ^+ CD49b $^+$ 細胞数の増加はクロロゲン酸、ペラルゴニンおよびフェルラ酸のはたらきに起因することが示唆される。クロロゲン酸、カフェ酸、およびフェルラ酸はフェノール酸類と呼ばれる低分子のポリフェノールに、また、ペラルゴニンはフラボノイドと呼ばれる高分子のポリフェノールに分類される。ポリフェノールの中には、摂取した際に、腸管上皮細胞においてグルクロン酸基または硫酸基により抱合されることで、管腔内へ排出されやすいものもある (Yamamoto *et al.* 1999; Shimizu *et al.* 2004)。しかし、フェノール酸類は抱合されないものが多く、またペラルゴニンは抱合されうる 3, 7, 3' および 4' 位の炭素に結合する水酸基のうち、3 位の水酸基は糖が付加し、3' 位の水酸基は欠落していることから、抱合されにくい構造であることが推察される。これらのことから、上記の 4 種

類のポリフェノールは、腸管から体内へ吸収されやすいことが推察される。

一般に、果実中の高分子成分はタンパク質と多糖である。我々は、デーツ抽出物の分子量 30,000 Da 以上の画分中に硫酸アンモニウム、もしくはトリプシン処理した後にエタノールを加えることで、主体はタンパク質の硫酸アンモニウム沈殿物と、主体は多糖のエタノール沈殿物の 2 種類の沈殿物を調製した。トリプシン処理した後のエタノール沈殿物は、沈殿物無添加と比較して IFN- γ ⁺CD49b⁺ 細胞数および IL-12⁺CD11b⁺ 細胞数を有意に増加させた。しかし、硫酸アンモニウム沈殿物はそれらの細胞数に対してほとんど影響を与えなかった (Fig. 11)。加えて、HPLC 分析から、デーツ抽出物中の分子量 30,000 Da 以上の画分は主にグルコースからなっていた (Fig. 12)。デーツは β -グルカンを含み (Ishurd *et al.* 2002; Ishurd & Kennedy 2005), また、マクロファージの遊走を活性化させることが報告されている (Puri *et al.* 2000)。グルカンはグルコースから構成される多糖であることは周知のところである (Akramiene *et al.* 2007)。これらのことから、デーツ抽出物が IFN- γ ⁺CD49b⁺ 細胞数および IL-12⁺CD11b⁺ 細胞数を増加させるはたらきは、一部は β -グルカンにも起因することが示唆される。

要約

デーツ抽出物の分子量 500 Da から 1,000 Da の画分と 30,000 Da 以上の画分の 2 画分が IFN- γ mRNA の発現を高めた。デーツ抽出物中の低分子画分の成分の一つに含まれるポリフェノールとして、プロトカテキュ酸、クロロゲン酸、カフェ酸、シリンガ酸、ペラルゴニンおよびフェルラ酸を同定した。第一章での、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスにおける、脾臓とパイエル板の IFN- γ^+ CD4 $^+$ 細胞数の増加はクロロゲン酸とカフェ酸のはたらきに、脾臓とパイエル板の IFN- γ^+ CD49b $^+$ 細胞数の増加はクロロゲン酸、ペラルゴニンおよびフェルラ酸のはたらきに起因することが示唆される。また、デーツ抽出物中の高分子画分の成分の一つとして多糖類が示唆され、 β -グルカンであることが推察された。同様に、第一章での、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスにおける、パイエル板の IFN- γ^+ CD4 $^+$ 細胞数と IFN- γ^+ CD49b $^+$ 細胞数の増加は、一部はその多糖類に起因することが示唆される。

第三章 デーツ抽出物添加飼料で飼育した先天性 I 型アレルギーマウスのアレルギー症状とその関連因子

アレルギーは、その発症のメカニズムの違いにより I 型～ IV 型に大別される (Riedl & Casillas 2003)。アレルギー性鼻炎、喘息、およびアトピー性皮膚炎などは、一般に I 型 (即時性) アレルギーに分類される。通常、免疫系はそれに関与する物質により細胞性免疫機構と液性免疫機構に大別され、それらはヘルパー T 細胞のサブセットである Th1 細胞と Th2 細胞により調節されるとともに、Th1 細胞は IFN- γ を産生することで、Th2 細胞は IL-4 を産生することで互いの分化を制御し合っている (Zhou *et al.* 2009)。Th2 細胞は IL-4, IL-5 などのサイトカインを分泌し、これらのサイトカインの刺激を受けて B 細胞は抗原特異な免疫グロブリン (Ig) E を産生する (Rousset *et al.* 1991; Vercelli 1995)。分泌された IgE は肥満細胞上の Fc ϵ RI 受容体に結合し、抗原が再び侵入するとその IgE に抗原が結合することで化学伝達物質であるヒスタミンやロイコトリエンが肥満細胞から大量に放出され I 型アレルギーを引き起こす (Metcalf *et al.* 1997)。

この Th1 細胞と Th2 細胞の関係を考慮すると、Th1 細胞からの IFN- γ 産生を促進することで Th2 細胞の分化を抑制し、アレルギー症状を軽減できることが考えられる。第一章において、デーツ抽出物は、C3H/HeN 系マウスの脾臓とパイエル板の Th1 細胞数を増加させることが明らかになった。また、第二章において、デーツ抽出物中に同定されたクロロゲン酸とカフェ酸は、Th1 細胞数を増加させることが明らかになった。これらのことから、デーツ抽出物が Th1/Th2 バランスの改善を通してアレルギー性免疫反応を抑制するはたらきをもつことが推察される。

NC/Nga 系マウスは 1957 年に名古屋大学の近藤らの研究グループにより純系化されたヒトアトピー性皮膚炎モデルマウスである。NC/Nga 系マウスは先天的に高い IgE 産生能を有するとともに、ダニ抗原に対して高い感受性を示すことから、ダニに暴露しやすい空気中の微生物制御を行っていない環境下での飼育、ダニ抗原の連続塗布あるいはその皮内注射により皮膚炎を誘起することができる (Sasakawa *et al.* 2001; Matsuoka *et al.* 2003)。

そこで本章では、デーツ抽出物添加飼料での飼育が、ダニ抗原の皮内注射により皮膚炎を発症した NC/Nga 系マウスのアレルギー症状とその関連因子に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

1. 材料

ダニ抗原 (*Dermatophagoides farina*, Df) は LSL (東京) より得た。PE 標識抗マウス IL-4 mAb (clone 11B11), PE 標識抗マウス IFN- γ mAb (clone XMG1.2), ビオチン標識抗マウス CD4 mAb (clone RM4-5), ビオチン標識抗マウス CD45R/B220 (B220) mAb (clone RA3-6B2), ビオチン標識抗マウス CD117 (clone 2B8), および PE/Cy5 標識ストレプトアビジン は BioLegend (San Diego, CA, USA) より購入した。ヤギ抗マウス Fc ϵ RI α (clone G-14) および PE 標識抗ヤギ IgG は, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より得た。ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート (Tween 80) は, 和光純薬工業 (大阪) より購入した。ヤギ抗マウス IgE, HRP 標識抗マウス IgE および IgG は Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA) より, TMB は KPL (Gaithersburg, MD, USA) より, BSA は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,

USA) より、それぞれ購入した。細胞の機能解析に用いた固定液、細胞の活性化試薬、および培地用の試薬は第一章に準じた。その他の試薬は全て市販特級試薬を用いた。

2. デーツ抽出物の調製

アラブ首長国連邦 (UAE) で収穫された乾燥デーツは丸紅 (東京) から提供された。乾燥果実から種子を除去し、果皮と繊維質を含んだまま約 5×5 mm 四方に切断した。そのうちの 1,000 g を 9,000 mL の熱蒸留水で 2 時間還流抽出した。抽出液を遠心分離 ($5,000 \times g$, 30 分間) に供して上清を回収し、次いで限外濾過器 (Model UHP-150K; アドバンテック東洋, 東京) に設置した Molecular/Por Ultrafiltration Membrane MWCO 500 (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) 限外濾過膜を用いて限外濾過した。膜上の残液を 500 mL の蒸留水に溶解し、凍結乾燥してデーツ抽出物として回収した。その重量は 70 g であった。

3. マウスの飼育試験

5 週齢、雄 NC/Nga 系マウスを、日本チャールズリバー (神奈川) より購入し、マウス用標準飼料 (オリエンタル酵母) で 1 週間飼育した。次いで、Fig. 13 に示した手順で試験飼育を行なった。即ち、マウスを 2 群に分け、Table 3 に示した飼料組成の 2 種類の飼料、即ち、抽出物無添加飼料 ($n = 4$) もしくはデーツ抽出物添加飼料 ($n = 5$) で 15 週間飼育した。6 週齢目から週に 1 回、 $5 \mu\text{g}$ の Df を滅菌生理食塩水 $10 \mu\text{L}$ に溶解し、マウスの右耳介部分に皮内注射した (Sasakawa *et al.* 2001)。飼育期間中の飼料と水は自由摂取とし、12 時間/12 時間の明暗周期、 23 ± 2 °C の条件下で飼育した。飼育後、マウスの門脈下

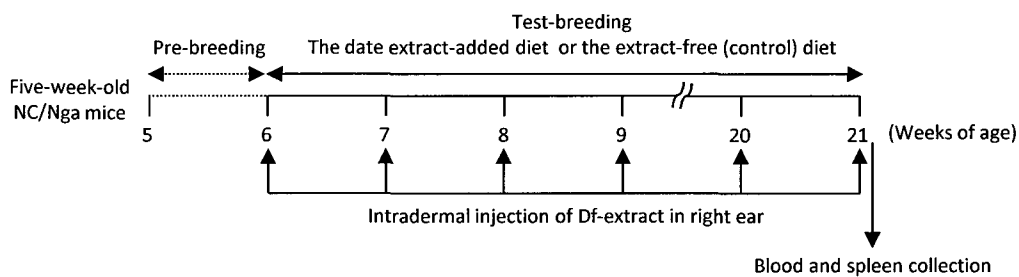


Figure 13. Experimental schedules. After pre-breeding for a week, NC/Nga mice were given the extract-free (control, $n = 4$) or date extract-added ($n = 5$) diet, and intradermally injected with $5 \mu\text{g}$ of Df-extract dissolved in $10 \mu\text{L}$ of saline solution into the ventral side of the right ear weekly between 6 and 21 weeks of age. Blood, spleen and Peyer's patch samples were collected at 21 weeks of age.

Table 3. Composition of diets.

	Control diet (without date extract)	Test diet (with date extract)
	%	
Date extract	0.000	1.000
Ovalbumin	25.000	24.000
Dextrin	32.738	32.738
Sucrose	27.112	27.112
RP mineral mix #10 ^a	3.750	3.750
Corn oil	3.750	3.750
Lard	3.750	3.750
Powdered cellulose	2.250	2.250
RP vitamin mix ^b	1.500	1.500
Choline chloride	0.150	0.150
Total	100.000	100.000

^a RP mineral mix #10: calcium, 0.6%; phosphorus, 0.4%; potassium, 0.4%; magnesium, 0.07%; sodium, 0.21%; chlorine, 0.24%; fluorine, 5.0 ppm; iron, 60 ppm; zinc, 21 ppm; manganese, 65 ppm; copper, 15.0 ppm; cobalt, 3.2 ppm; iodine, 0.57 ppm; chromium, 3.0 ppm; molybdenum, 0.82 ppm; selenium, 0.23 ppm.

^b RP vitamin mix: vitamin K, 10.4 ppm; thiamin hydrochloride, 20.6 ppm; riboflavin, 20.0 ppm; niacin, 90 ppm; pantothenic acid, 55 ppm; choline chloride, 1400 ppm; folic acid, 4.0 ppm; pyridoxine, 16.5 ppm; biotin, 0.4 ppm; vitamin B12, 20 mcg/kg; vitamin A, 22.1 IU/g; vitamin D3, 2.2 IU/g; vitamin E, 50 IU/kg; ascorbic acid, 0.0 ppm.

部より血液を採取および脾臓を摘出し、それぞれ抗体の分析および細胞の機能解析に用いた。なお、血液は 4 °C, 450 × g で 60 分間遠心分離を行い、得られた上清を血清として実験に使用するまで -30 °C で保存した。

なお、本試験は日本政府が定める「動物の保護および管理に関する法律」と「動物実験の飼養および保管等に関する基準」、並びに信州大学農学部における動物実験のガイドラインに従い、実験動物に対して最善の配慮のもとで行った。

4. 脾臓細胞懸濁液の調製

NC/Nga 系マウスより脾臓を無菌的に採取し、第一章に準じて脾臓細胞懸濁液を調製した。

5. 細胞の機能解析

脾臓細胞の表面抗原および細胞内サイトカインを発現する細胞の検出は、蛍光免疫染色法により調べた。即ち、FcεRIα⁺CD117⁺ 細胞については、5% FBS を含む HBSS で 100 倍希釈した CD117 mAb を 10 μL 加えて 4 °C で 15 分間放置し、次いで上記希釈液で 100 倍希釈したストレプトアビジン-PE/Cy5 を 10 μL 加えて 4 °C の遮光下で 15 分間放置した。さらに、上記希釈液で 100 倍希釈したヤギ抗マウス FcεRIα を 10 μL 加えて 4 °C の遮光下で 15 分間放置した後、最後に上記希釈液で 100 倍希釈した PE 標識抗ヤギ IgG を 10 μL 加えて 4 °C の遮光下で 15 分間放置した。

一方、IFN-γ⁺CD4⁺ 細胞および IL-4⁺CD4⁺ 細胞の染色方法は、第一章に準じた。細胞数は、Guava PCA (Guava technologies) により測定した。

6. 抗体の定量

血清中の総 IgE レベルは、マウス酵素免疫測定法 (ELISA) 定量キット (Bethyl Laboratories) の使用方法に準じて測定した。なお、試験には 0.05% Tween 20 および 2% ポリビニルピロリドン (PVP) を含む PBS によって、予備実験で決定した最適の倍率に希釈した血清 (500 倍希釈) を用いた。

Df 特異 IgE レベルは、ELISA によって調べた。即ち、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Df を含む 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) 100 μL を 96 ウェルマイクロプレート (Nunc) の各ウェルに分注し、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。0.05% Tween20 を含む PBS (PBS-T) で洗浄した後、0.4% BSA を含む 0.1 M 炭酸緩衝液 300 μL を加え、25 $^{\circ}\text{C}$ で 120 分間静置した。再び PBS-T で洗浄した後、2% PVP を含む PBS-T で 250 倍希釈したマウス血清 100 μL を各ウェルに分注し、25 $^{\circ}\text{C}$ で 120 分間反応させた。さらに、PBS-T で洗浄した後、2% PVP を含む PBS-T で 125 倍に希釈した HRP 標識抗マウス IgE 溶液 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL を各ウェルに分注し、25 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間反応させた。次いで、PBS-T で洗浄した後、TMB 溶液 100 μL を各ウェルに分注し、完全に遮光して 25 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間反応させた後、4N 硫酸 100 μL を各ウェルに分注して反応を停止させ、直ちに Bio-Rad モデル 550 マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories) を用いて、450 nm における吸光度を測定した。

7. 遺伝子発現解析

RT 反応とリアルタイム RT PCR 反応は第二章に準じて行なった。使用したプライマーの塩基配列は、Bruton's tyrosine kinase (Btk) および Interleukin-2-inducible T cell kinase (Itk) に関しては Lucas *et al.* (2007) に、GAPDH に関しては Tobita *et al.* (2006) に従った。各プライ

マーの配列の詳細は Table 2 に示した。

8. 統計分析

右耳介の厚さとアレルギースコアの群内の分散分析は、Repeated measures ANOVA により解析し、有意差が認められた上で、群間の分散分析 (Two-way ANOVA) により解析を行なった。解析時には、飼料と週齢を独立した変数として扱った。2 群間の分散分析はスチューデントの t 検定により解析を行なった。その他の統計分析の方法は第一章に準じた。

結果

1. マウスの体重

抽出物無添加 (コントロール) 飼料およびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの体重変化を Fig. 14 に示した。Fig. 14 から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの体重は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して有意差はないことがわかる。

2. 耳介の厚さとアレルギースコア

コントロール飼料およびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの飼育期間中の右耳介の厚さとアレルギー症状の変化を Fig. 15 に示した。Repeated measures ANOVA による解析から、無添加飼料で飼育したマウスおよびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスのどちらにおいても、有意差があった。Fig. 15 から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの耳介の厚さは、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、11 から 21 週齢で有意に薄いことがわかる。また、デーツ抽出物

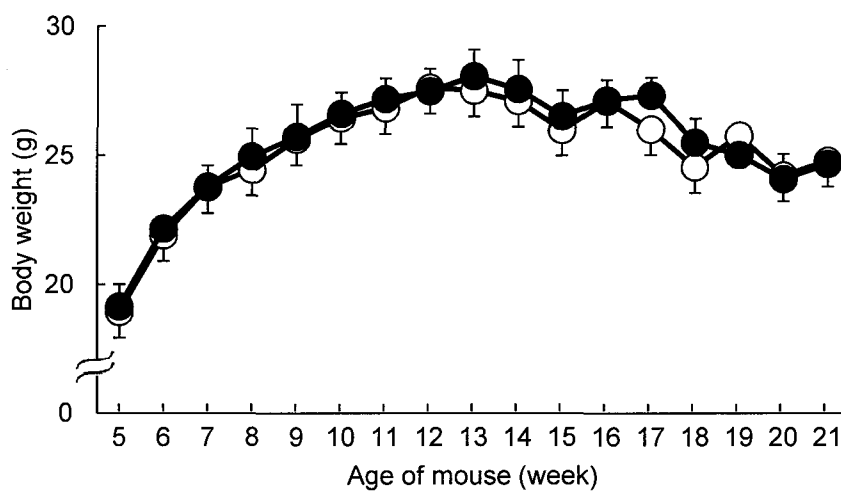


Figure 14. Changes of body weights in NC/Nga mice given the control (the blank circle) or date extract-added (the filled circle) diet. Data are presented as the mean \pm SD. ($n = 4$ for the control diet, $n = 5$ for the date extract-added diet).

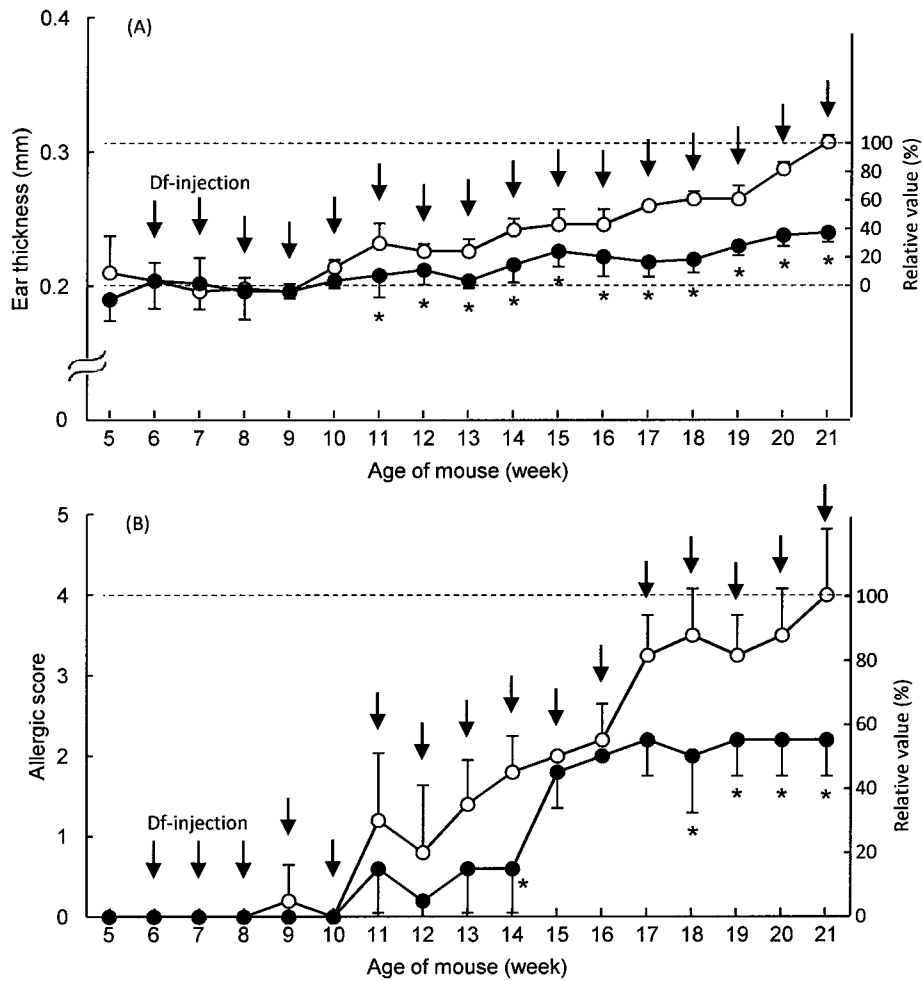


Figure 15. Ear thickness (A) and allergic score (B) of NC/Nga mice given the control (the blank circle) or date extract-added (the filled circle) diet. Ear thickness and allergic score were counted weekly 24 h after each intradermal injection. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 4$ for the control diet, $n = 5$ for the date extract-added diet). * $P < 0.05$.

添加飼料で飼育したマウスのアレルギースコアは、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、14 週齢および 18 から 21 週齢で有意に低いことがわかる。

3. 血清抗体レベル

コントロール飼料およびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの血清総 (A) およびダニ抗原 (Df) 特異 (B) IgE レベルを Fig. 16 に示した。Fig. 16 から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの血清総 IgE レベルは、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、有意に低下することがわかる。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの血清 Df 特異 IgE レベルは、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、有意に低下することがわかる。

4. 脾臓中の免疫細胞数

コントロール飼料およびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+$ 細胞数 (A), $\text{IL-4}^+\text{CD4}^+$ 細胞数 (B), $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+\text{CD117}^+$ 細胞数 (C) および $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+/\text{IL-4}^+\text{CD4}^+$ 細胞比 (D) を Fig. 17 に示した。Fig. 17 から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+$ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、有意に増加することがわかる。一方、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの $\text{IL-4}^+\text{CD4}^+$ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、有意に減少することがわかる。さらに、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+/\text{IL-4}^+\text{CD4}^+$ 細胞比は、コントロール飼料で飼育した場合よりも高いことがわかる。加えて、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+\text{CD117}^+$ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、有意に減少することが

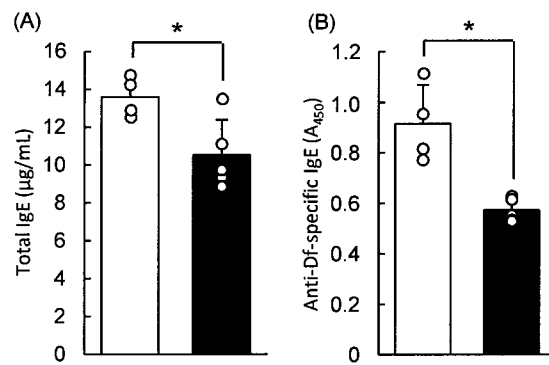


Figure 16. Serum level of total (A) and Df-specific (B) IgE in NC/Nga mice given the control (the blank column) or date extract-added (the filled column) diet. Data are presented the mean \pm SD ($n = 4$ for the control diet, $n = 5$ for the date extract-added diet). * $P < 0.05$.

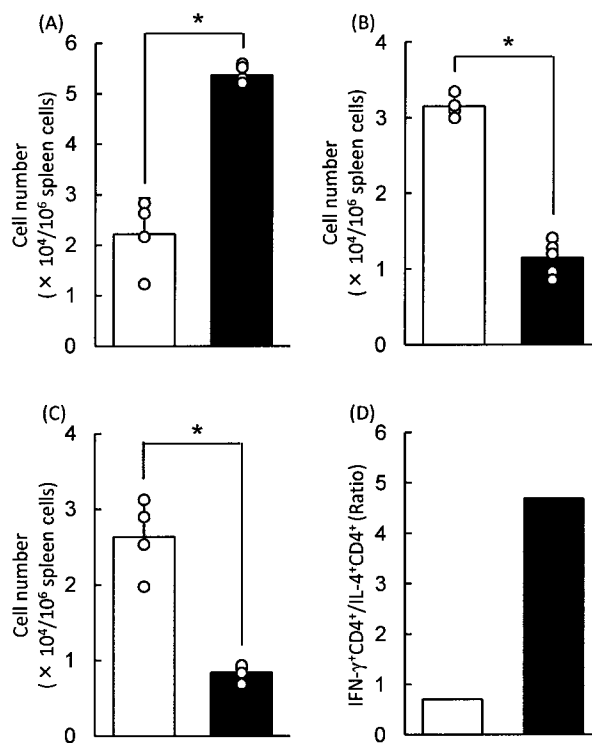


Figure 17. Number of immunocompetent cells in the spleens of NC/Nga mice given the control (the blank column) and date extract-added (the filled column) diet. (A) IFN- γ^+ CD4 $^+$ cells; (B) IL-4 $^+$ CD4 $^+$ cells; (C) Fc ϵ RI α^+ CD117 $^+$ cells. Th1/Th2 balance (D) is shown as the mean of the number of IFN- γ^+ CD4 $^+$ cells against that of the number of IL-4 $^+$ CD4 $^+$ cells. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 4$ for the control diet, $n = 5$ for the date extract-added diet). * $P < 0.05$.

わかる。

5. Btk と Itk mRNA の発現レベル

コントロール飼料およびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓中 Btk (A) および Itk (B) mRNA の発現レベルを Fig. 18 に示した。Fig. 18 から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの Btk および Itk mRNA の発現レベルは、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、有意に減少することがわかる。

考察

既に述べたように、NC/Nga 系マウスにダニ抗原 (Df) を連続的に皮内注射することにより皮膚炎を誘起することができる (Sasakawa *et al.* 2001; Matsuoka *et al.* 2003)。加えて、Matsumoto *et al.* (1999) は、皮膚炎を発症していない NC/Nga 系マウスの血清中の総 IgE 量は 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以下であるのに対し、皮膚炎を発症したマウスでは 1 $\mu\text{g/mL}$ 以上であることを報告している。従って、本章では Sasakawa *et al.* (2001) と Matsuoka *et al.* (2003) の方法に従って、Df を耳介に皮内注射したところ、コントロール飼料で飼育したマウスの血清総 IgE 量は $13.59 \pm 1.08 \mu\text{g/mL}$ であった (Fig. 16)。これらのことから、Df の皮内注射によって適切に I 型アレルギー反応が引き起こされたことが示唆される。

デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの体重は、コントロール飼料で飼育したマウスと比較して統計的有意な差はなかった (Fig. 14)。この結果から、デーツ抽出物添加飼料での飼育は、栄養価の違いやストレスによる影響がないことが示唆される。

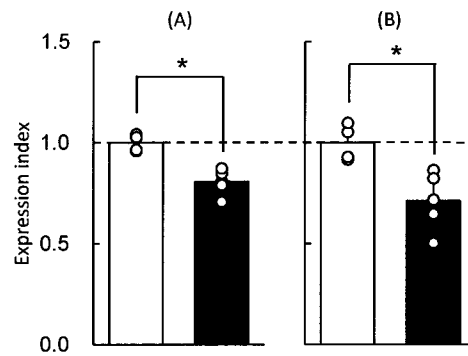


Figure 18. Relative expression of Btk (A) and Itk (B) mRNAs in spleen cells of NC/Nga mice given the control (the blank column) and date extract-added (the filled column) diet. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 4$ for the control diet, $n = 5$ for the date extract-added diet). * $P < 0.05$.

デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの耳介の厚さとアレルギースコアは、コントロール飼料で飼育した場合よりも優位に減少した (Fig. 15)。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの血清 Df 特異 IgE レベルは、コントロール飼料で飼育したマウスと比較して有意に低かった (Fig. 16)。NC/Nga 系マウスにおいて、皮膚炎の発達は血清 IgE レベルの上昇に起因することが明らかにされている (Matsuda *et al.* 1997; Matsumoto *et al.* 1999)。このことと、本章で得られた結果から、デーツ抽出物添加飼料でのマウスの飼育は、Df 特異 IgE の産生の抑制を通して皮膚炎の症状を軽減させたことが示唆される。

皮膚炎症状が発達している NC/Nga 系マウスの脾臓において、CD4 陽性細胞は IFN- γ をほとんど発現せず、IL-4 および IL-5 を主に発現していることが知られている (Matsumoto *et al.* 1999)。そして、既に述べたように、IL-4 や IL-5 は IgE の産生を刺激することが報告されている (Platts-Mills 2001)。デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IFN- γ ⁺CD4⁺ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合よりも有意に増加した (Fig. 17A)。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IL-4⁺CD4⁺ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合よりも有意に減少した (Fig. 17B)。したがって、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IFN- γ ⁺CD4⁺/IL-4⁺CD4⁺ 細胞数比は、コントロール飼料で飼育した場合よりも顕著に高まった (Fig. 17D)。これらのことと、本章で得られた結果から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスにおける血清 Df 特異 IgE レベルの減少は、Th2 細胞数の減少に起因することが示唆される。

I 型アレルギーの発症は、最終的には肥満細胞の脱顆粒によって引き起こされる。脱顆粒には、高親和性 IgE 受容体である Fc ϵ RI が肥満細胞上に発現することが必要である (Platts-Mills 2001)。高親和性 IgE

受容体を発現する肥満細胞は通常、FcεRIα と CD117 の両方の細胞表面における発現に基づいて定義づけられる (Brown *et al.* 2008)。デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の FcεRIα⁺CD117⁺ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合よりも有意に減少した (Fig. 17C)。この結果から、デーツ抽出物添加飼料でのマウスの飼育は、高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数を減じることが示唆され、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスにおけるアレルギー症状軽減効果は、一部は、高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数の減少に起因することが示唆される。

肥満細胞上の FcεRI と IgE 複合体の凝集を介した、肥満細胞による抗原の認識は、非受容体型チロシンキナーゼである Btk や Itk に代表される Tec ファミリーキナーゼの活性化を引き起こす (Kawakami & Galli 2002)。Btk は、肥満細胞においては、脱顆粒、脂質メディエーターの産生およびサイトカインの産生を制御する (Ellmeier *et al.* 2011)。また、B 細胞においては、B 細胞受容体 (BCR) を介した細胞外 Ca²⁺ の流入を誘導することで B 細胞の分化に関わっている (Rawlings *et al.* 1993; Fluckiger *et al.* 1998)。Itk は肥満細胞および T 細胞において、サイトカインの産生を負に制御する (Ellmeier *et al.* 2011; Fowell *et al.* 1999)。特に T 細胞において、Itk は T 細胞受容体 (TCR) を介したシグナルを通して、PKCγ のリン酸化を促進する (Schwartzberg *et al.* 2005)。そのシグナルが伝達された T 細胞は IL-4 などの Th2 サイトカインを産生し、自身の Th2 細胞への分化に重要な役割を果たす (Fowell *et al.* 1999; Schaeffer *et al.* 2001)。デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓 Btk と Itk mRNA の発現レベルは、コントロール飼料で飼育した場合よりも有意に減少した (Fig. 18)。これらのことから、デーツ抽出物添加飼料での飼育は、T 細胞におい

ては IL-4 などのサイトカインの産生を抑制し、B 細胞においては BCR を介した Ca^{2+} 流入を阻害して B 細胞の分化を抑制することが示唆される。また、肥満細胞においては、脱顆粒、脂質メディエーター産生およびサイトカイン産生を抑制することが示唆される。

マウスのデーツ抽出物添加飼料の平均摂食量は、一匹当たり 2.86 g/日であったため、デーツ抽出物の平均摂取量は 0.0286 g/日であった。このデーツ抽出物の量は、ヒトにおいては、体重 (60 kg) 換算で 57.2 g/日、小腸の表面積換算で 5.72 g/日に相当する。一方、我々は、約 6 g から 60 g の食品素材を毎日摂取することは可能であると考えられる。特に果実においては、果汁入りジュースとして摂取することは容易である。このことから、ヒトにおいてもデーツ抽出物を摂取することにより I 型アレルギーを軽減でき得ることが推察される。

本章の結果から、Df の連続皮内注射により皮膚炎を誘導した NC/Nga 系マウスにおいて、デーツ抽出物添加飼料での飼育は、Th2 細胞数の減少による血清抗原特異 IgE の減少と高親和性 IgE 受容体発現肥満細胞数の減少を介して、I 型アレルギー症状を軽減することが示唆される。また、デーツ抽出物添加飼料での飼育は、Th2 細胞のサイトカイン発現とその分化にはたらく Itk と、B 細胞の分化と肥満細胞の脱顆粒にはたらく Btk の発現の抑制を介して、I 型アレルギー症状を軽減することが示唆される。

要約

ダニ抗原 (Df) の連続皮内注射により I 型アレルギーを誘導した NC/Nga 系マウスをデーツ抽出物添加飼料で飼育すると、コントロール飼料での飼育と比較して、有意にアレルギー症状が軽減した。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育すると、血清総および Df 特異 IgE レベルが減少した。加えて、脾臓の Th1 細胞数は有意に増加、Th2 細胞数は有意に減少した。同様に、脾臓の高親和性 IgE 受容体発現肥満細胞数は有意に減少した。さらに、脾臓の Btk と Itk mRNA の発現レベルは有意に減少した。これらのことから、デーツ抽出物は、Df で誘導した NC/Nga 系マウスにおいて Th2 細胞数の減少による血清 Df 特異 IgE の減少と、高親和性 IgE 受容体発現肥満細胞数の減少を介して I 型アレルギー症状を軽減することが示唆される。また、デーツ抽出物は、肥満細胞の脱顆粒の抑制を通すことによっても、I 型アレルギー症状を軽減することが示唆される。

第四章 デーツ抽出物添加飼料で飼育した後天的 I 型アレルギーマウスのアレルギー症状とその関連因子

第三章では、デーツ抽出物添加飼料での飼育が、NC/Nga 系マウスのアレルギー症状を軽減するとともに、その作用は Th2 細胞数の減少による IgE 産生の減少と、高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数の減少に起因することを示した。

一方、アレルギー症状は、遺伝的要因もさることながら、生活環境や食事などの後天的な感作によって発症することが一般的である。後天的アレルギーの評価系として、ダニ抗原と水酸化アルミニウムを BALB/c 系マウスの腹腔内に投与することにより、ダニ抗原に対する後天的 I 型アレルギー性鼻炎を誘導できることが知られている (Zhou *et.al.* 2008)。

そこで本章では、デーツ抽出物添加飼料での飼育が、ダニ抗原により後天的に I 型アレルギーを誘発したマウスのアレルギー症状と免疫系に及ぼす影響を調べたのでその結果について述べる。

材料および方法

1. 材料

ダニ抗原 (Df) は LSL (東京) より得た。PE 標識抗マウス IL-4 mAb (clone 11B11), PE 標識抗マウス IFN- γ mAb (clone XMG1.2), PE 標識抗マウス CD80 mAb (clone 16-10A1), ビオチン標識抗マウス CD4 mAb (clone RM4-5), ビオチン標識抗マウス CD45R/B220 (B220) mAb (clone RA3-6B2), ビオチン標識抗マウス CD117 (clone 2B8), ビオチン標識抗マウス CD11b mAb (clone M1/70) および PE/Cy5 標識ストレプトアビ

ジンは, BioLegend (San Diego, CA, USA) より購入した。ヤギ抗マウス FcεRIα (clone G-14) および PE 標識抗ヤギ IgG は, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より得た。ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート (Tween 80) は, 和光純薬工業 (大阪) より購入した。ヤギ抗マウス IgE, HRP 標識抗マウス IgE および IgG は Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA) より, TMB は KPL (Gaithersburg, MD, USA) より, BSA および水酸化アルミニウムゲルは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より, それぞれ購入した。細胞の機能解析に用いた固定液, 細胞の活性化試薬, および培地用の試薬は第一章に準じた。その他の試薬は全て市販特級試薬を用いた。

2. デーツ抽出物の調製

デーツ抽出物の調製方法は第三章に準じた。

3. マウスの飼育試験

4 週齢, 雄 BALB/c 系マウスは, 日本 SLC (静岡) より購入し, マウス用標準飼料 (オリエンタル酵母) で 1 週間飼育した。次いで, Fig. 19 に示した手順で試験飼育を行なった。即ち, マウスを 5 匹ずつ 2 群に分け, Table 3 に示した飼料組成の 2 種類の飼料で 6 週間飼育した。Df 20 μg と水酸化アルミニウムゲル 2 mg を含む生理食塩水 200 μL を, 全てのマウスにおいて 5, 6 および 7 週齢時に各 1 回ずつ腹腔内注射し, Df に感作させた。次いで, Df 100 μg を含む滅菌蒸留水 10 μL を, 全てのマウスにおいて 8 ~ 11 週齢の間に週 1 回ずつ鼻腔内投与することでアレルギー性鼻炎を誘発した。くしゃみと鼻の引っかかり回数は Df の鼻腔内投与終了の 1 分後から, 30 分間測定した。飼育期間中の試験飼料および水は自由摂取とし, 12 時間 / 12 時間の明暗

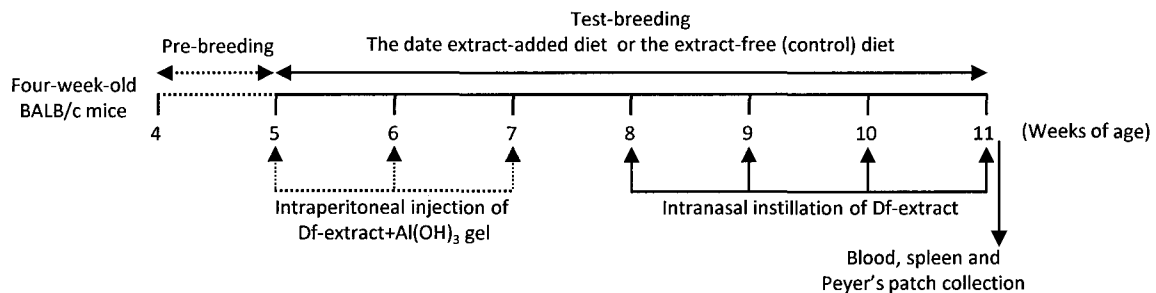


Figure 19. Experimental schedules. After pre-breeding for a week, BALB/c mice were given the extract-free (control) or date extract-added diet between 5 and 11 weeks of age. The mice were intraperitoneally injected with 200 μ L saline solution containing 100 μ g Df-extract and 2 mg aluminum hydroxide gel at 5, 6 and 7 weeks of age, and intranasally challenged by instillation with 20 μ L distilled water containing 20 μ g Df-extract between 8 and 11 weeks of age. The number of sneezing and nose-rubbing was counted for 30 min after 1 min from the intranasal instillation. Blood, spleen and Peyer's patch samples were collected at 11 weeks of age.

周期, 23 ± 2 °C の条件下で飼育した。飼育後, マウスの門脈下部より採取した血液, 脾臓および腸管パイエル板は, それぞれ抗体の分析および細胞の機能解析に用いた。血液は 4 °C, $450 \times g$ で 60 分間遠心分離を行い, 得られた上清を血清として実験に使用するまで -30 °C で保存した。

なお, 本試験は日本政府が定める「動物の保護および管理に関する法律」と「動物実験の飼養および保管等に関する基準」, 並びに信州大学農学部における動物実験のガイドラインに従い, 実験動物に対して最善の配慮のもとで行った。

4. 脾臓とパイエル板細胞懸濁液の調製

BALB/c 系マウスより脾臓とパイエル板を無菌的に採取し, 第一章に準じて脾臓とパイエル板の細胞懸濁液を調製した。

5. 細胞の機能解析

脾臓およびパイエル板細胞の表面抗原および細胞内サイトカインを発現する細胞の検出は, 蛍光免疫染色法により調べた。即ち, $CD11b^+CD80^+$ 細胞については, 5% FBS を含む HBSS で 100 倍希釈したビオチン標識抗マウス $CD11b$ mAb を 10 μ L 加えて 4 °C で 15 分間放置し, 次いで上記希釈液で 100 倍希釈したストレプトアビジン-PE/Cy5 と 4 °C の遮光下で 15 分間放置した。さらに, 上記希釈液で 100 倍希釈した PE 標識抗マウス $CD80$ mAb を 10 μ L 加えて 4 °C の遮光下で 15 分間放置した。 $IFN-\gamma^+CD4^+$ 細胞および $IL-4^+CD4^+$ 細胞の染色方法は, 第一章に準じた。また, IgE^+B220^+ 細胞および $Fc\epsilon RI\alpha^+CD117^+$ 細胞の染色方法は, 第三章に準じた。細胞数は, Guava PCA (Guava technologies) により測定した。

6. 抗体の定量

血清中の総および Df 特異 IgE レベルは、マウス酵素免疫測定法 (ELISA) 定量キット (Bethyl Laboratories) を用いて、第三章の方法に準じて測定した。

7. 統計分析

くしゃみと鼻の引っ掻き回数の群内の分散分析は、Repeatedmeasures ANOVA により解析し、有意差が認められた上で、群間の分散分析 (Two-way ANOVA) により解析を行なった。解析時には、飼料と週齢を独立した変数として扱った。その他の統計分析の方法は第三章に準じた。

結果

1. マウスの体重

抽出物無添加 (コントロール) 飼料およびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの体重変化を Fig. 20 に示した。Fig. 20 から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの体重は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して統計的有意差はないことがわかる。

2. くしゃみと鼻の引っかき回数

コントロール飼料およびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスのくしゃみ (A) と鼻の引っかき (B) 回数を Fig. 21 に示した。Repeated measures ANOVA による解析から、無添加飼料で飼育したマウスおよびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスのどちらにおいても、有意差があった。Fig. 21 から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの

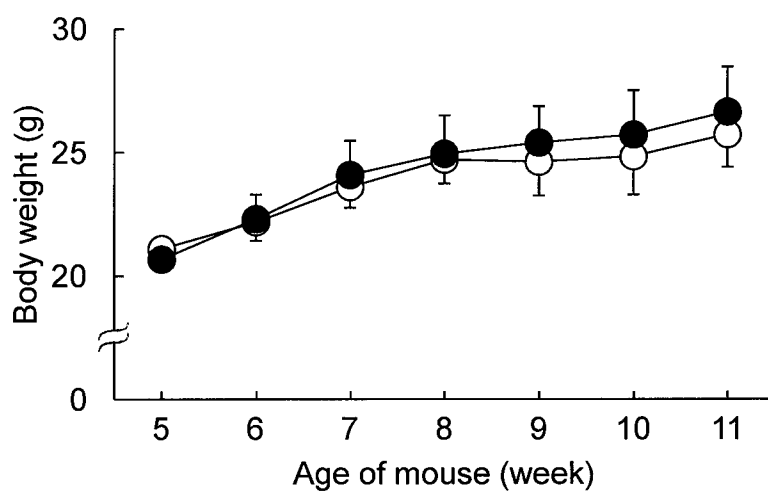


Figure 20. Changes of body weights in BALB/c mice given the control (the blank circle) or date extract-added (the filled circle) diet. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 5$).

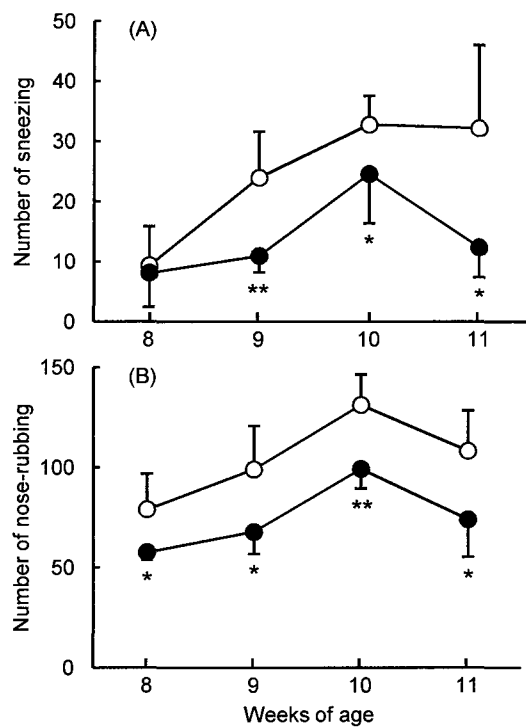


Figure 21. Number of sneezing (A) and nose-rubbing (B) in BALB/c mice given the control (the blank circle) or date extract-added (the filled circle) diet. Sneezing and nose-rubbing events were counted for 30 min after 1 min of the intranasal instillation with Df-extract. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

くしゃみの回数は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、9 から 11 週齢の間で有意に低下することがわかる。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの鼻の引っかき回数は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、8 から 11 週齢の間で有意に低下することがわかる。

3. 血清抗体レベル

コントロール飼料およびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの血清総 (A) およびダニ抗原 (Df) 特異 (B) IgE レベルを Fig. 22 に示した。Fig. 22 から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの血清総 IgE レベルは、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、有意に低下することがわかる。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの血清 Df 特異 IgE レベルは、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、有意に低下することがわかる。

4. 脾臓の $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+$ 細胞数, $\text{IL-4}^+\text{CD4}^+$ 細胞数および $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+/\text{IL-4}^+\text{CD4}^+$ 細胞比

コントロール飼料およびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+$ 細胞数 (A), $\text{IL-4}^+\text{CD4}^+$ 細胞数 (B) および $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+/\text{IL-4}^+\text{CD4}^+$ 細胞比 (C) を Fig. 23 に示した。Fig. 23 から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+$ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、有意に増加することがわかる。一方、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの $\text{IL-4}^+\text{CD4}^+$ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して、有意に減少することがわかる。さらに、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+/\text{IL-4}^+\text{CD4}^+$ 細胞比は、コントロール飼料で飼育した場合よ

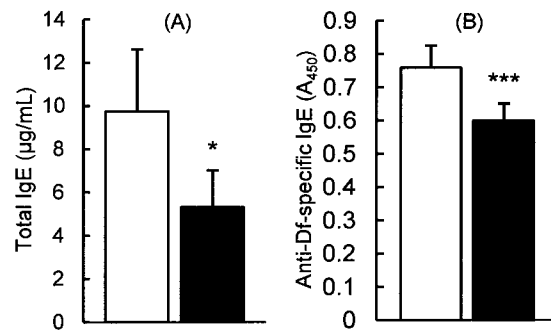


Figure 22. Serum level of total (A) and Df-specific (B) IgE in BALB/c mice given the control (the blank column) or date extract-added (the filled column) diet. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 5$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$.

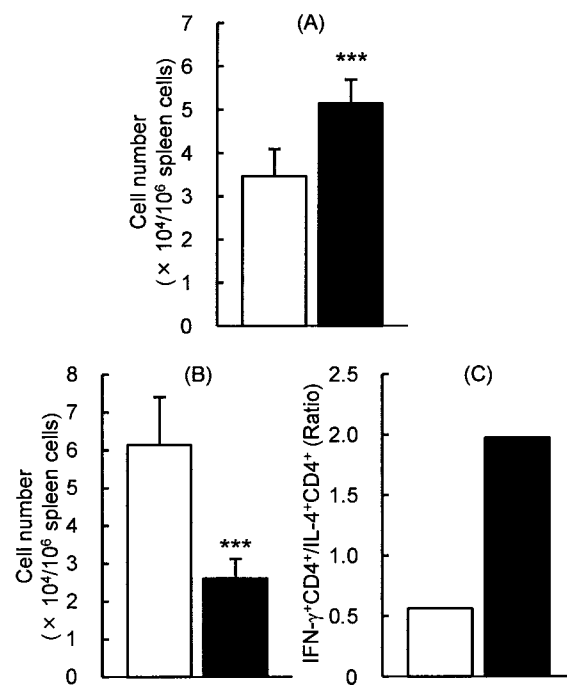


Figure 23. Spleen Th1/Th2 balance in BALB/c mice given the control (the blank column) or date extract-added (the filled column) diet. (A) Spleen IFN- γ ⁺CD4⁺ cells; (B) IL-4⁺CD4⁺ cells. Th1/Th2 balance (C) is shown as the mean of the number of IFN- γ ⁺CD4⁺ cells against that of the number of IL-4⁺CD4⁺ cells. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 5$). *** $P < 0.005$.

りも高いことがわかる。

5. 脾臓とパイエル板の免疫細胞数

コントロール飼料およびデーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の $CD80^+CD11b^+$ 細胞数 (A), IgE^+B220^+ 細胞数 (B) および $Fc\epsilon RI\alpha^+CD117^+$ 細胞数 (C), または, パイエル板の $CD80^+CD11b^+$ 細胞数 (D), IgE^+B220^+ 細胞数 (E) および $Fc\epsilon RI\alpha^+CD117^+$ 細胞数 (F) を Fig. 24 に示した。Fig. 24 から, デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓およびパイエル板の IgE^+B220^+ 細胞数と $Fc\epsilon RI\alpha^+CD117^+$ 細胞数は, コントロール飼料で飼育した場合と比較して, 有意に減少することがわかる。しかし, デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓およびパイエル板の $CD80^+CD11b^+$ 細胞数は, コントロール飼料で飼育した場合と比較して有意差はないことがわかる。

考察

アレルギーは 2 種類のタイプに分類され, それらは遺伝的および後天的アレルギー症状の発症を示す。前者は自然にアレルギー症状を発達するのに対し, 後者はあらかじめ抗原の感作によってアレルギー症状を示す。本章では, デーツ抽出物添加飼料での飼育が, ダニ抗原により後天的に I 型アレルギーを誘発した BALB/c 系マウスのアレルギー症状と免疫系に及ぼす影響を調べた。既に述べたように, BALB/c 系マウスにダニ抗原 (Df) と水酸化アルミニウムゲルの混合物を腹腔内注射した後, Df 水溶液を鼻腔内投与することにより, アレルギー性鼻炎を誘導することができる。また, Df 抗原を免疫していない BALB/c 系マウスの血清中の総 IgE 量は $0.2 \mu\text{g/mL}$ 以下であるのに

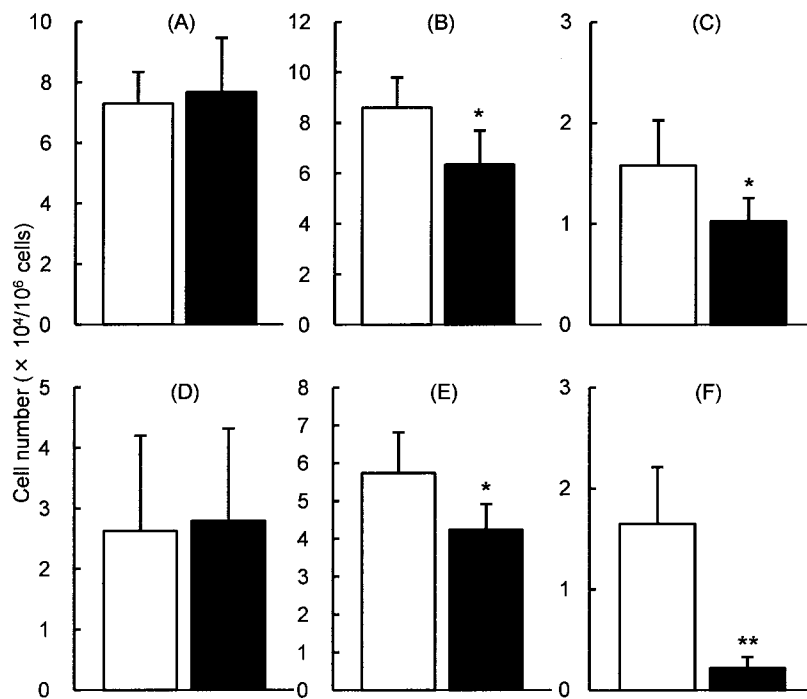


Figure 24. Number of immunocompetent cells in the spleens and Peyer's patches in BALB/c mice given the control (the blank column) or date extract-added (the filled column) diet. (A) Spleen CD80⁺CD11b⁺ cells; (B) spleen IgE⁺B220⁺ cells; (C) spleen FcεRIα⁺CD117⁺ cells; (D) Peyer's patch CD80⁺CD11b⁺ cells; (E) Peyer's patch IgE⁺B220⁺ cells; (F) Peyer's patch FcεRIα⁺CD117⁺ cells. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

対し、免疫したマウスでは 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であることが報告されている (Zhou *et al.* 2008)。従って、本章では Zhou *et al.* (2008) の方法に従って、BALB/c 系マウスを Df で処理したところ、コントロール飼料で飼育したマウスの血清総 IgE 量は $9.75 \pm 2.87 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった (Fig. 22)。これらのことから、Df の腹腔内注射による免疫と、その後の鼻腔内投与により、I 型アレルギー反応を適切に誘導できたことが示唆される。

デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの体重は、コントロール飼料で飼育したマウスと比較して有意な差はなかった (Fig. 20)。この結果から、デーツ抽出物添加飼料での飼育は、栄養価の違いやストレスによる影響がないことが示唆される。デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスのくしゃみと鼻の引っかき回数は、コントロール飼料で飼育した場合よりも有意に減少した (Fig. 21)。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの Df 特異 IgE レベルは、コントロール飼料で飼育したマウスと比較して有意に低かった (Fig. 22)。これらの結果から、デーツ抽出物添加飼料での飼育は、Df 特異 IgE の産生の抑制を通してくしゃみと鼻の引っかき回数を減少させたことが示唆される。

既に述べたように、Th2 細胞によって産生される IL-4, IL-5 および IL-13 は IgE の産生を刺激することが知られている (Platts-Mills 2001)。特に、IL-4 は IgE の産生において重大な役割を果たす (Shang *et al.* 2004)。対照的に、Th1 細胞から産生される IFN- γ は Th2 細胞の IL-4 の産生を抑制する (Pène *et al.* 1988a; Pène *et al.* 1988b)。デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IFN- γ^+ CD4⁺ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合よりも有意に増加した (Fig. 23A)。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IL-4⁺CD4⁺ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合よりも有意に減少した (Fig. 23B)。したがって、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の

IFN- γ ⁺CD4⁺/IL-4⁺CD4⁺ 細胞数比は、コントロール飼料で飼育した場合よりも顕著に高まった (Fig. 23C)。これらのことから、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの血清 Df 特異 IgE レベルの減少は、Th2 細胞数の減少に起因することが示唆される。

脾臓は全身免疫系として、パイエル板は腸管の粘膜免疫系として、重要な役割を果たしている (Kraal *et al.* 2006)。また、IgE⁺B220⁺ 細胞は IgE 産生 B 細胞であることは周知のところである (Manetz & Meade 1999)。デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓とパイエル板の IgE⁺B220⁺ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合よりも有意に減少した (Fig. 24B, E)。これらのことから、デーツ抽出物添加飼料でのマウスの飼育は、全身および腸管粘膜免疫系の両方において、IgE 産生 B 細胞数を減じることが示唆される。

既に述べたように、I 型アレルギーの発症は、肥満細胞の脱顆粒によって引き起こされる。脱顆粒には、高親和性 IgE 受容体である Fc ϵ RI が肥満細胞上に発現することが必要である (Platts-Mills 2001)。高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞は通常、Fc ϵ RI α と CD117 の両方の細胞表面発現に基づいて定義づけられる (Brown *et al.* 2008)。デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓とパイエル板の Fc ϵ RI α ⁺CD117⁺ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合よりも有意に減少した (Fig. 24C, F)。これらの結果から、デーツ抽出物添加飼料での飼育は、全身および腸管粘膜免疫系の両方において、高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数を減じることが示唆され、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスにおけるアレルギー症状軽減効果は、一部は、高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数の減少に起因することが示唆される。

腸管は、体外からの食物や腸内細菌と接することから、パイエル板

などのリンパ組織を発達させることで免疫臓器としてもはたらいている (村上 & 上野川 1992)。本章の結果では、脾臓に加えて、パイエル板の IgE 産生 B 細胞数および高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数が減少した。このことから、デーツ抽出物添加飼料での飼育により、腸管におけるアレルギー反応を軽減でき得ることが推察できる。

体内に侵入した抗原は抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞によって貪食される。次いで、活性化したマクロファージや樹状細胞からの抗原提示により刺激を受けた Th2 細胞は、B 細胞の増殖や IgE へとクラススイッチを促進する Th2 サイトカインを分泌する (Punnonen *et al.* 1994)。抗原提示はヘルパー T 細胞側の T 細胞受容体 (TCR) と抗原提示細胞側の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 間において行われるが、抗原提示細胞表面に存在する補助分子が相互的に作用することでヘルパー T 細胞が活性化する (Rothstein & Sayegh 2003)。CD80 および CD86 は抗原提示に関わる最も重要な補助分子である (Hofer *et al.* 1998)。デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓とパイエル板の CD80⁺CD11b⁺ 細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合と比較して有意に増減しなかった (Fig. 24A, D)。これらの結果から、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスにおけるアレルギー症状軽減効果は、抗原提示細胞数には起因しないことが示唆される。

本章の結果から、Df の免疫により後天的に I 型アレルギー性鼻炎を誘導した BALB/c 系マウスにおいて、デーツ抽出物添加飼料での飼育は、Th2 細胞数の減少による IgE 産生 B 細胞数の減少に起因する血清 Df 特異 IgE の低下だけではなく、高親和性 IgE 受容体発現肥満細胞の減少を介して I 型アレルギー性鼻炎の症状を軽減することが示唆される。

要約

ダニ抗原 (Df) の免疫により後天的に I 型アレルギー性鼻炎を誘導した BALB/c 系マウスをデーツ抽出物添加飼料で飼育すると、くしゃみの回数および鼻の引っかけ回数はコントロール飼料での飼育と比較して有意に減少した。また、血清総および Df 特異 IgE レベルは有意に減少した。加えて、脾臓の $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD4}^+$ 細胞数は有意に増加し、 $\text{IL-4}^+\text{CD4}^+$ 細胞数は有意に減少した。同様に、脾臓とパイエル板の $\text{IgE}^+\text{B220}^+$ 細胞数および $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+\text{CD117}^+$ 細胞数は有意に減少した。これらのことから、デーツ抽出物は、Th2 細胞数の減少による IgE 産生 B 細胞数の減少に起因する血清抗原特異 IgE の低下だけでなく、高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数の減少を介して I 型アレルギー性鼻炎の症状を軽減することが示唆される。また、デーツ抽出物は、全身および腸管粘膜免疫系の両方において I 型アレルギー症状を軽減することが示唆される。

第五章 デーツ中のアレルギー軽減成分の同定

第三章および第四章において、デーツ抽出物は、NC/Nga 系マウスおよび BALB/c 系マウスにおいて、Th2 細胞数の減少による IgE 産生細胞数の減少に起因する血清抗原特異 IgE の低下と肥満細胞数の減少を介してアレルギー症状を軽減することが示唆された。デーツ抽出物中の成分のうち、何がそれらの作用に起因するかは関心のあるところである。

近年、いくつかの果実抽出物がアレルギー症状を減じることが報告されている。Kim *et al.* (2009) は、サルナシ (*Actinidia arguta*) の水抽出物が、IgE の減少を通してマウスの喘息症状を改善することを報告している。Lee *et al.* (2009) は、多くの果実や野菜抽出物中に同定されるポリフェノールであるレスベラトロールが、IL-4やIL-5といったTh2サイトカインを抑制し、さらに気道過剰感応性、好酸球増加および粘膜過剰分泌を抑制してマウスの喘息症状を軽減することを報告している。さらに、ケルセチン 3-D- グルコシドに富む椿 (*Camellia japonica*) やナナカマド (*Sorbus commixta*) 抽出物が、肥満細胞内のシグナル伝達因子のリン酸化を阻害することで、アレルギー反応を抑制することを報告している (Lee *et al.* 2008; Yu *et al.* 2011)。このように、一部のポリフェノールが、遺伝子の発現やタンパク質の機能阻害を引き起こしてアレルギー反応を抑制することは周知の事実である。

本章では、BALB/c 系および NC/Nga 系マウスにおけるアレルギー症状の軽減に関わる免疫細胞数の減少と Tec ファミリーキナーゼ遺伝子の発現の減少に起因するデーツ抽出物中の成分の同定を行なう目

的から、デーツ抽出物中に同定されたポリフェノールが C3H/HeN 系マウスの脾臓細胞培養系における各種免疫細胞数と、Btk と Itk の mRNA の発現に及ぼす作用を調べたので、それらの結果を以下に述べる。

材料および方法

1. 材料

細胞の機能解析に用いた各抗体と固定液、細胞の活性化試薬、および培地用の試薬は第一章に準じた。遺伝子発現の解析に用いた各試薬と標準ポリフェノールは第二章に準じた。その他の試薬は全て市販特級試薬を用いた。

2. 脾臓細胞懸濁液の調製と培養

C3H/HeN 系マウスよりパイエル板を無菌的に採取し、第一章に準じてパイエル板細胞懸濁液を調製した。脾臓細胞懸濁液 1,000 μ L を平底の 24 ウェルマイクロプレート (Sarstedt) に分注し、最終濃度 4 nmol/mL になるように ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した標準ポリフェノールを加え、5% CO₂ 存在下で 24 時間 (遺伝子発現解析) または 48 時間 (細胞機能解析) 培養した。DMSO の最終濃度は 0.01% とし、その濃度においては細胞毒性がないことを確認した。

3. 細胞の機能解析

IgE⁺B220⁺ および Fc ϵ R1 α ⁺CD117⁺ 細胞の染色方法は、第三章に準

じた。細胞数は、Guava PCA (Guava technologies) により測定した。

4. 遺伝子発現解析

RT 反応とリアルタイム RT PCR 反応は第二章に準じて行なった。使用した各プライマー配列の詳細は Table 2 に示した。

5. 統計分析

統計分析の方法は第一章に準じた。

結果

1. デーツ抽出物中に同定されたポリフェノールが各種免疫細胞数に及ぼす影響

デーツ抽出物中に同定された 6 種類のポリフェノールがマウス脾臓細胞培養系での各種免疫細胞数に及ぼす影響を Fig. 25 に示した。Fig. 25 から、クロロゲン酸、ペラルゴニンおよびフェルラ酸は、ポリフェノール無添加、プロトカテキュ酸、カフェ酸またはシリンガ酸と比較して、 $\text{IgE}^+\text{B220}^+$ 細胞数を有意に減少させることがわかる。一方、クロロゲン酸とペラルゴニンは、ポリフェノール無添加、プロトカテキュ酸、カフェ酸、シリンガ酸またはフェルラ酸と比較して、 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+\text{CD117}^+$ 細胞数を有意に減じることがわかる。

2. デーツ抽出物中に同定されたポリフェノールが Btk と Itk の mRNA の発現に及ぼす影響

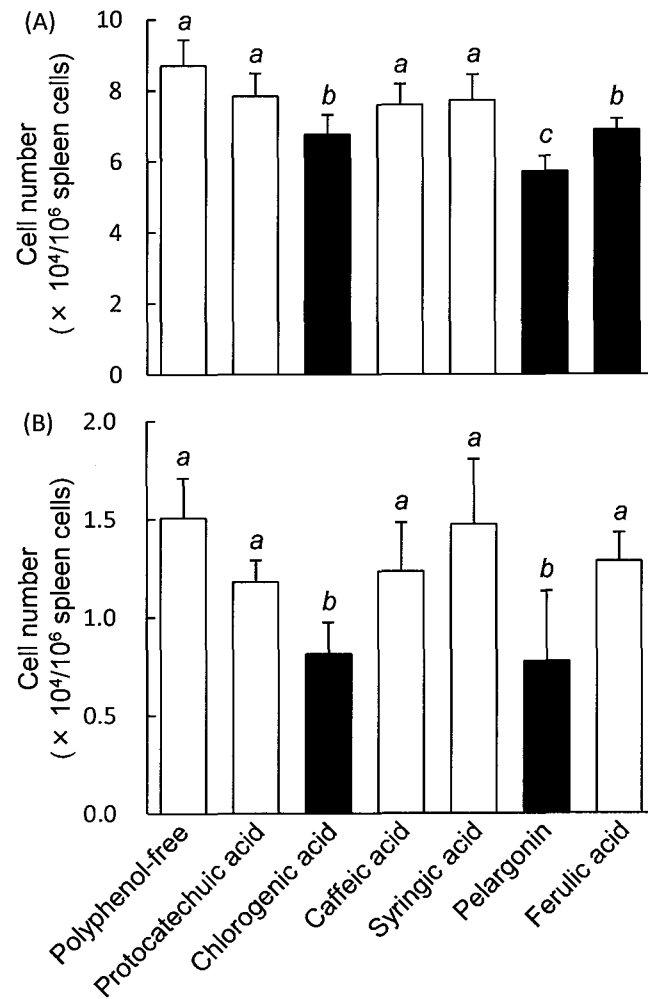


Figure 25. Number of IgE⁺B220⁺ (A) and FcεRIα⁺CD117⁺ (B) cells in C3H/HeN mouse spleen cells cultured with six kinds of polyphenols identified in the date extract. Spleen cells were cultured with 4 μM of each polyphenol for 48 h. Data are presented as the mean ± SD (*n* = 5). Items indicated with different letters (i.e. *a*, *b*, *c*) are significantly different (*P* < 0.05).

デーツ抽出物中に同定された 6 種類のポリフェノールがマウス脾臓細胞培養系での Btk と Itk mRNA の発現に及ぼす影響を Fig. 26 に示した。Fig. 26 から、ペラルゴニン、ポリフェノール無添加、プロトカテキユ酸、クロロゲン酸、カフェ酸、シリング酸またはフェルラ酸と比較して、Btk mRNA 発現レベルを有意に減少させることがわかる。一方、クロロゲン酸とペラルゴニンは、ポリフェノール無添加、プロトカテキユ酸、カフェ酸、シリング酸またはフェルラ酸と比較して、Itk mRNA の発現レベルを有意に減じることがわかる。

考察

第三章および第四章において、デーツ抽出物は Th2 細胞数の減少による IgE 産生細胞数の減少に起因する血清抗原特異 IgE の低下と肥満細胞数の減少を介してアレルギー症状を軽減することが示唆された。また、第三章において、Btk と Itk mRNA の発現レベルの減少を介してアレルギー症状を軽減することが示唆された。本章では、それらの免疫細胞数と mRNA の発現レベルの減少にはたらき得る成分の同定を試みた。デーツ抽出物中に同定された 6 種類のポリフェノールを添加して培養した C3H/HeN 系マウスの脾臓細胞培養系において、クロロゲン酸、ペラルゴニンおよびフェルラ酸が IgE⁺B220⁺ 細胞数を有意に減少させ、また、クロロゲン酸とペラルゴニンが FcεRIα⁺CD117⁺ 細胞数を有意に減少させた (Fig. 25)。クロロゲン酸は、Signal transducer and activator of transcription-6 (STAT-6) および c-Jun N-terminal kinase (JNK) の発現抑制を通して IgE の産生を抑制し、

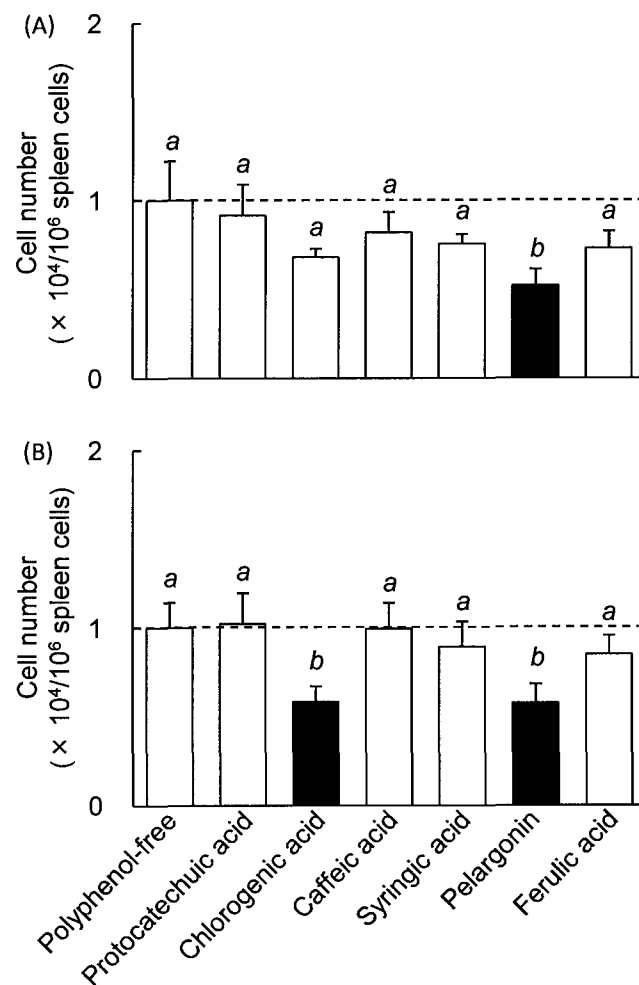


Figure 26. Relative expression of Btk (A) and Itk (B) mRNAs in C3H/HeN mouse spleen cells cultured with six kinds of polyphenols identified in the date extract. Spleen cells were cultured with 4 μ M of each polyphenol for 24 h. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 3$). Items indicated with different letters (i.e. *a*, *b*) are significantly different ($P < 0.05$).

BALB/c 系マウスのアレルギー性喘息様症状を減少させることが報告されている (Kim *et al.* 2010)。IgE の産生は樹状細胞の Th2 細胞への抗原提示, 次いで Th2 細胞から B 細胞への伝達により引き起こされる。B 細胞内では, IL-4 を介する刺激と、CD40 を介する刺激が伝達されるが (Vinuesa *et al.* 2010), IL-4 を介する刺激は転写因子 STAT-6 を活性化することで (Takeda *et al.* 1997), また CD40 を介する刺激は Mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路の JNK などの活性化を経て転写因子 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) を活性化することで (Geha *et al.* 2003; Gururajan *et al.* 2005), IgE の産生を促進する。本章の結果から, クロロゲン酸は IgE⁺B220⁺ 細胞数を減少させた。これらのことから, クロロゲン酸は, STAT-6 および JNK の発現抑制を通して IgE⁺B220⁺ 細胞数を減少させたことが推察される。一方, ペラルゴニンとフェルラ酸は, IgE 産生細胞数および/もしくは高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数を減少させた。ペラルゴニンとフェルラ酸がそれらの細胞数の減少を介して, アレルギー症状を軽減させ得る報告は未だなされていない。このことから, デーツ抽出物は, アレルギー軽減に寄与し得る新規の 2 種類のポリフェノールを含むことが示唆される。

既に述べたように, 肥満細胞上の Fc ϵ RI と IgE 複合体の凝集を介した, 肥満細胞による抗原の認識は, 非受容体型チロシンキナーゼである Btk や Itk に代表される Tec ファミリーキナーゼの活性化を引き起こす (Kawakami & Galli 2002)。Btk は, 肥満細胞においては, 脱顆粒, 脂質メディエーターの産生およびサイトカインの産生を制御する (Ellmeier *et al.* 2011)。また, B 細胞においては, B 細胞の分化に関わっ

ている (Rawlings *et al.* 1993; Fluckiger *et al.* 1998)。Itk は T 細胞において、自身の Th2 細胞への分化に重要な役割を果たす (Fowell *et al.* 1999; Schaeffer *et al.* 2001)。デーツ抽出物中に同定された 6 種類のポリフェノールを添加して培養した C3H/HeN 系マウスの脾臓細胞培養系において、ペラルゴニンが Btk mRNA の発現レベルを有意に減少させた。また、クロロゲン酸とペラルゴニンが Itk mRNA の発現レベルを有意に減少させた (Fig. 26)。クロロゲン酸とペラルゴニンがそれら遺伝子の mRNA の発現の減少を介して、アレルギー症状を軽減させ得る結果は未だ報告されていない。これらのことから、デーツ抽出物は、アレルギー軽減に寄与し得る新規の 2 種類のポリフェノールを含むことが示唆される。

IgE 産生細胞数と高親和性 IgE 受容体発現肥満細胞数を減少させ、Btk と Itk の mRNA の発現を減少させたクロロゲン酸、ペラルゴニンおよびフェルラ酸の濃度は、それぞれ、1.42 $\mu\text{g/ml}$ 、2.52 $\mu\text{g/ml}$ および 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であった。一方で、フォーリンチオカルト法による分析の結果、飼育試験の飼料に用いたデーツ抽出物の総ポリフェノール量は、1 g あたり 32.07 mg フェルラ酸当量であった。1,000 g のデーツ果実から 70 g のデーツ抽出物が得られたため、1 g のデーツ果実には 2.24 mg フェルラ酸当量のポリフェノールが含有されている計算になった。Al-Farsi *et al.* (2005) は、デーツ果実 1 g 中に 2.17 から 3.43 mg フェルラ酸当量のポリフェノールが含有されていると報告している。従って、飼育試験で用いたデーツ抽出物のポリフェノール量は、Al-Farsi *et al.* の報告の範囲内であった。また、UPLC の面積値を用いた解析から、デーツ抽出物 1 g あたりのプロトカテキュ酸、クロロゲン酸、カ

フェ酸, シリンガ酸, ペラルゴニンおよびフェルラ酸の含有量は, それぞれ, 10.78 mg, 0.88 mg, 0.74 mg, 7.55 mg, 3.64 mg および 3.15 mg であった。一方, 第三章および第四章において, デーツ抽出物添加飼料の平均摂食量は, NC/Nga 系マウス一匹当たり 2.86 g/日および BALB/c 系マウス一匹当たり 2.36 g/日であった。デーツ抽出物の添加量は 1% であったため (Table 3), クロロゲン酸, ペラルゴニンおよびフェルラ酸の平均摂取量は, マウス一匹当たりそれぞれ, NC/Nga 系マウス; 25.2 μ g/日, 104.1 μ g/日および 90.1 μ g/日, BALB/c 系マウス; 20.8 μ g/日, 85.9 μ g/日および 74.3 μ g/日であったと計算される。このポリフェノールの量は, C3H/HeN 系マウスの脾臓細胞培養系に添加した量を上回ると推察される。これらのことから, 第三章および第四章において, デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスにおける IgE 産生細胞数と高親和性 IgE 受容体発現肥満細胞数の減少, および Btk と Itk mRNA の発現の減少は, クロロゲン酸, ペラルゴニンおよびフェルラ酸のはたらきであったことが示唆される。

本章の結果から, デーツ抽出物中に同定されたクロロゲン酸, ペラルゴニンおよびフェルラ酸は, IgE 産生細胞数と肥満細胞数の減少, および Btk と Itk mRNA の発現レベルを減少させた。これらのことから, デーツ抽出物は, IgE 産生細胞数と高親和性 IgE 受容体発現肥満細胞数の減少, および Btk と Itk mRNA の発現の減少にはたらく新規の 3 種類のポリフェノールを含むことが示唆される。

要約

デーツ抽出物中に同定された 6 種類のポリフェノールを添加して培養した C3H/HeN 系マウスの脾臓細胞培養系において、クロロゲン酸、ペラルゴニンおよびフェルラ酸が $\text{IgE}^+\text{B220}^+$ 細胞数を有意に減少させ、クロロゲン酸とペラルゴニンが $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+\text{CD117}^+$ 細胞数を有意に減少させた。また、ペラルゴニンが Btk mRNA の発現レベルを有意に減少させ、クロロゲン酸とペラルゴニンが Itk mRNA の発現レベルを有意に減少させた。これらのことから、デーツ抽出物中に同定された 3 種類のポリフェノールは、Th2 細胞の分化、B 細胞の分化、および高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞の分化と脱顆粒を抑制することで、アレルギー症状を軽減することが示唆される。クロロゲン酸に加えて、ペラルゴニンとフェルラ酸はアレルギー軽減作用をもつ新規ポリフェノールであることが示唆される。

総括

従来、食品素材中に含まれる成分は、主として生体構成素材や生体エネルギーの供給源として考えられてきた。しかし近年では、いくつかの食品成分が様々な生体反応を直接あるいは間接的に調節することが解明されつつあり、病気の予防や改善に寄与し得る生理機能をもつ食品素材が普及しつつある。

一方、生理機能をもつ成分を含有する食品素材の栽培と調達が実用化上の課題として挙げられる。本研究の食品素材として用いたデーツ果実は、その樹木であるナツメヤシが砂漠の緑化のための大規模な栽培を推進されており、近年の生産量は著しく伸びているため有効利用が望まれている。また、中東アジア地域において、デーツは古くから風邪や感染症などに対する民間薬として用いられてきたことから、免疫調節機能を有することが推察されていたにもかかわらず、それに関する研究はほとんどなされてこなかった。そこで、本論文はデーツ果実の免疫調節機能の探索と特性付けを解析し、生理機能をもつ食品素材として利用することを目的に検討した成果をまとめたものである。

まず、本論文の第一章では、C3H/HeN 系マウスの飼育試験において、デーツ抽出物はプルーンやイチジク抽出物よりも強く脾臓の細胞性免疫を高めることを明らかにした。また、デーツ抽出物はプルーンやイチジク抽出物と同様にパイエル板の細胞性免疫を高めることを明らかにした。これらのことから、デーツは全身および粘膜免疫系の両方において、細胞性免疫を増強することが示唆された。

続いて第二章では、デーツ抽出物の低分子成分と高分子成分が細胞

性免疫の増強に作用することを示した。デーツ抽出物中の低分子成分として、プロトカテキュ酸、クロロゲン酸、カフェ酸、シリンガ酸、ペラルゴニン、およびフェルラ酸を UPLC により同定した。そのうち、細胞性免疫の増強は、クロロゲン酸、カフェ酸、ペラルゴニンおよびフェルラ酸のはたらきに起因することを明らかにした。一方、デーツ抽出物中の高分子成分として β -D-グルカンを推定した。その高分子多糖類も細胞性免疫の増強にはたらくことを明らかにした。これらのことから、デーツは全身および粘膜免疫系の両方において細胞性免疫を増強するが、それはデーツに含まれるポリフェノールと β -D-グルカンのはたらきによることが示唆された。

さらに、第三章ではデーツ抽出物添加飼料での飼育が NC/Nga 系マウスの皮膚炎の症状と免疫系に及ぼす影響を示した。即ち、ダニ抗原 (Df) の連続皮内注射により皮膚炎を発症した NC/Nga 系マウスをデーツ抽出物添加飼料で飼育すると、アレルギー症状の軽減、血清総および Df 特異 IgE レベルが低下することを明らかにした。また、脾臓の Th2 細胞数は、デーツ抽出物添加飼料での飼育によって減少することを明らかにした。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の IgE 産生 B 細胞数および高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数は、コントロール飼料で飼育した場合よりも有意に減少することを明らかにし、さらに、脾臓の Btk と Itk mRNA の発現レベルを有意に減少することを明らかにした。これらのことから、デーツ抽出物添加飼料での飼育は、Th2 細胞数の減少による IgE 産生 B 細胞数の減少に起因する血清抗原特異 IgE の低下と、高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数の減少を介してアレルギー症状を軽減し、それ

は Btk と Itk mRNA の発現の減少にも起因することが示唆された。

そして、第四章ではデーツ抽出物添加飼料での飼育が後天的に誘導した BALB/c 系マウスのアレルギー症状と免疫系に及ぼす影響を示した。即ち、Df の免疫によりアレルギー性鼻炎を誘導した BALB/c 系マウスをデーツ抽出物添加飼料で飼育すると、くしゃみの回数、鼻の引っかき回数および血清 OVA 特異 IgE レベルはコントロール飼料での場合よりも有意に減少し、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓の Th1/Th2 細胞比は、コントロール飼料での場合よりも高いことを明らかにした。また、デーツ抽出物添加飼料で飼育したマウスの脾臓とパイエル板の IgE 産生 B 細胞数および高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数は、コントロール飼料での場合よりも有意に減少することを明らかにした。これらのことから、デーツ抽出物添加飼料での後天的にアレルギーを誘導したマウスの飼育は、Th2 細胞数の減少による IgE 産生 B 細胞数の減少に起因する血清抗原特異 IgE の低下だけではなく、高親和性 IgE 受容体を発現する肥満細胞数の減少を介してアレルギー症状を軽減することが示唆された。また、全身および腸管粘膜免疫系の両方においてアレルギー症状を軽減することが示唆された。

最後に、第五章ではデーツ抽出物中に同定された 3 種類のポリフェノールは、Th2 細胞の分化、B 細胞の分化、および高親和性 IgE 受容体発現肥満細胞の分化と脱顆粒を抑制することで、アレルギー症状を軽減することを明らかにした。特に、ペラルゴニンとフェルラ酸はアレルギー軽減作用をもつ新規デーツポリフェノールであることが示唆された。

以上のように、本論文ではデーツ抽出物添加飼料での飼育が、マウスの細胞性免疫を増強し、また I 型アレルギー症状を軽減できることを明らかにした。本研究の結果から、デーツは、細胞性免疫を増強し、またアレルギーを軽減する機能性素材としての利用が期待できると考えられる。

Summary

The effects of oral ingestion of a hot water extract from matured fruit of the date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) on the cellular immune system were investigated in comparison to those of prune and fig fruit in C3H/HeN mice. The number of spleen IFN- γ^+ CD4 $^+$, IFN- γ^+ CD49b $^+$ and IL-12 $^+$ CD11b $^+$ cells was highest in mice given the date extract-added diet. Polyphenols identified in the date extract, such as chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid, significantly increased the number of IFN- γ^+ CD49b $^+$ cells, while chlorogenic acid, pelargonin and ferulic acid significantly enhanced that of IL-12 $^+$ CD11b $^+$ cells. On the other hand, a 70% ethanol-insoluble date extract treated with trypsin significantly increased the number of IFN- γ^+ CD49b $^+$ and IL-12 $^+$ CD11b $^+$ cells. These results indicate that some polyphenols and polysaccharides present in the date extract stimulate the cellular immune system in mice.

On the other hand, the effects of oral ingestion of the date extract on allergic responses were investigated in mite-induced NC/Nga and mite-sensitized BALB/c mice. The ear thickness and allergic score were significantly reduced in NC/Nga mice given the date extract-added diet than in those given the extract-free diet. Sneezing and nose rubbing events in BALB/c mice given the date extract-added diet were significantly lower than in those given the extract-free diet. The serum total and mite antigen-specific immunoglobulin (Ig) E levels, and the number of spleen interleukin (IL)-4 $^+$ CD4 $^+$ and Fc ϵ RI α^+ CD117 $^+$ cells was significantly lower

in both mice given the date extract-added diet than in those given the extract-free diet. In addition, the expression level of Btk and Itk mRNAs in spleen cells of NC/Nga mice was significantly lower than in those given the extract-free diet. Chlorogenic acid, pelargonin and ferulic acid significantly reduced the number of IL-4⁺CD4⁺ and IgE⁺B220⁺ cells, while chlorogenic acid and pelargonin significantly decreased the number of FcεRIα⁺CD117⁺ cells in C3H/HeN mouse spleen cell cultures. In addition, chlorogenic acid and/or pelargonin decreased the expression level of Btk and Itk mRNAs. These results suggest that some polyphenols in the date may reduce allergic symptoms in mice via a decrease in the number of Th2 cells, IgE-producing plasma cells and high-affinity IgE receptor-expressing mast cells, and a suppression of the inflammatory signalling cascade in allergy-associated cells.

In conclusion, we propose that date fruit may be used as one of an effective immunomodulator for enhancing the cellular immune system and suppressing the type I allergic responses.

謝辞

本研究において、また本論文をまとめるにあたり終始懇切丁寧なる御指導を賜りました主指導教員の信州大学大学院農学研究科機能性食料開発学専攻 大谷 元 教授に心より感謝申し上げます。

また、本論文を仕上げるにあたり、御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました信州大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 廣田 満 教授ならびに信州大学大学院農学研究科機能性食料開発学専攻 南 峰夫 教授に深く感謝申し上げます。

日頃から多大なるご協力を戴きました信州大学大学院農学研究科機能性食料開発学専攻 下里 剛士 准教授、信州大学大学院農学研究科機能性食料開発学専攻 河原 岳志 助教ならびに信州大学大学院農学研究科機能性食料開発学専攻 食品機能学研究室の皆様にご礼申し上げます。

終わりにあたり、本研究の機会を賜りこれまでに多大な御理解と御支援を賜りました伊那食品工業株式会社 代表取締役会長 塚越 寛 氏、代表取締役社長 井上 修 氏、常務取締役 埋橋 祐二 氏、取締役 唐沢 正樹 氏ならびに上席研究員 小島 正明 氏に深く感謝いたします。加えて、本研究を実施するにあたり御協力を戴きました伊那食品工業株式会社 社員の皆様に感謝いたします。

最後に、いつも陰ながら支えてくれた家族に感謝する。

引用文献

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-793.
- Akiyama H, Sakushima J, Taniuchi S, Kanda T, Yanagida A, Kojima T, Teshima R, Kobayashi Y, Goda Y, Toyoda M. 2000. Antiallergic effect of apple polyphenols on the allergic model mouse. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **23**, 1370-1373.
- Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. 2007. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina* **43**, 597-606.
- Al-Farsi M, Alasalvar C, Morris A, Baron M, Shahidi F. 2005. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 7592-7599.
- Al-Shahib W, Marshall RJ. 2003. The fruit of the date palm: its possible use as the best food for the future? *International Journal of Food Sciences & Nutrition* **54**, 247-259.
- Ammon C, Meyer SP, Schwarzfischer L, Krause SW, Andreesen R, Kreutz M. 2000. Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* **100**, 364-369.
- Biron, CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology* **17**, 189-220.

- Brown MA, Sayed BA, Christy A. 2008. Mast cells and the adaptive immune response. *Journal of Clinical Immunology* **28**, 671-676.
- Chatti K, Baraket G, Ben AA, Saddoud O, Mars M, Trifi M, Salhi HA. 2010. Development of molecular tools for characterization and genetic diversity analysis in Tunisian fig (*Ficus carica*) cultivars. *Biochemical Genetics* **48**, 789-806.
- Copley MS, Rose PJ, Clampham A, Edwards DN, Horton MC, Evershed RP. 2001. Detection of palm fruit lipids in archaeological pottery from Oaser Ibrim, Egyptian Nubia. *Proceedings of the Royal Society B* **268**, 593-597.
- Ellmeier W, Abramova A, Schebesta A. 2011. Tec family kinases: regulation of FcεRI-mediated mast-cell activation. *FEBS Journal* **278**, 1990-2000.
- Fearon DT, Locksley RM. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**, 50-53.
- Fluckiger AC, Li Z, Kato RM, Wahl MI, Ochs HD, Longnecker R, Kinetic JP, Witte ON, Scharenberg AM, Rawlings DJ. 1998. Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *EMBO Journal* **17**, 1973-1985.
- Fowell DJ, Shinkai K, Liao XC, Beebe AM, Coffman RL, Littman DR, Locksley RM. 1999. Impaired NFATc translocation and failure of Th2 development in Itk-deficient CD4⁺ T cells. *Immunity* **11**, 399-409.
- Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. 2003. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nature Reviews. Immunology* **3**, 721-732.
- Guarrera PM. 2005. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia* **76**, 1-25.

- Gururajan M, Chui R, Karuppanan AK, Ke J, Jennings CD, Bondada S. 2005. c-Jun N-terminal kinase (JNK) is required for survival and proliferation of B-lymphoma cells. *Blood* **106**, 1382-1391.
- Guy-Grand D, Vassalli P. 2002. Gut intraepithelial lymphocyte development. *Current Opinion in Immunology* **14**, 255-259.
- Hofer MF, Jirapongsananuruk O, Trumble AE, Leung DY. 1998. Upregulation of B7.2, but not B7.1, on B cells from patients with allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **101**, 96-102.
- Hong YJ, Tomas-Barberan FA, Kader AA, Mitchell AE. 2006. The flavonoid glycosides and procyanidin composition of Deglet Noor dates (*Phoenix dactylifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 2405-2411.
- Inngjerdingen KT, Patel TR, Chen X, Kenne L, Allen S, Morris GA, Harding SE, Matsumoto T, Diallo D, Yamada H, Michaelsen TE, Inngjerdingen M, Paulsen BS. 2007. Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. *Glycobiology* **17**, 1299-1310.
- Ishurd O, Sun C, Xiao P, Ashour A, Pan Y. 2002. A neutral beta-D-glucan from dates of the date palm, *Phoenix dactylifera* L. *Carbohydrate Research* **337**, 1325-1328.
- Ishurd O, Kennedy JF. 2005. The anti-cancer activity of polysaccharide prepared from Libyan dates (*Phoenix dactylifera* L.). *Carbohydrate Polymers* **59**, 531-535.
- Kato H, Samizo M, Kawabata R, Takano F, Ohta T. 2011. Stilbenoids from the melinjo (*Gnetum gnemon* L.) fruit modulate cytokine production in murine Peyer's patch cells ex vivo. *Planta Medica* **77**, 1027-1034.

- Kawakami T, Galli SJ. 2002. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nature Reviews. Immunology* **2**, 773-786.
- Kayano S, Kikuzaki H, Ikami T, Suzuki T, Mitani T, Nakatani N. 2004. A new bipyrrrole and some phenolic constituents in prunes (*Prunus domestica* L.) and their oxygen radical absorbance capacity (ORAC). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **68**, 942-944.
- Kim D, Kim SH, Park EJ, Kang CY, Cho SH, Kim S. 2009. Anti-allergic effects of PG102, a water-soluble extract prepared from *Actinidia arguta*, in a murine ovalbumin-induced asthma model. *Clinical & Experimental Allergy* **39**, 280-289.
- Kim HR, Lee DM, Lee SH, Seong AR, Gin DW, Hwang JA, Park JH. 2010. Chlorogenic acid suppresses pulmonary eosinophilia, IgE production, and Th2-type cytokine production in an ovalbumin-induced allergic asthma: activation of STAT-6 and JNK is inhibited by chlorogenic acid. *International Immunopharmacology* **10**, 1242-1248.
- Kosar S, Fatima I, Mahmood A, Ahmed R, Malik A, Talib S, Chouhdary MI. 2009. Purunusides A-C, alpha-glucosidase inhibitory homoisoflavone glucosides from *Prunus domestica*. *Archives of Pharmacal Research* **32**, 1705-1710.
- Kraal G, Samsom JN, Mebius RE. 2006. The importance of regional lymph nodes for mucosal tolerance. *Immunological Reviews* **213**, 119-130.
- Lee JH, Kim JW, Ko NY, Mun SH, Kim DK, Kim JD, Kim HS, Lee KR, Kim YK, Radinger M, Her E, Choi WS. 2008. *Camellia japonica* suppresses immunoglobulin E-mediated allergic response by the inhibition of Syk

- kinase activation in mast cells. *Clinical and Experimental Allergy* **38**, 794-804.
- Lee M, Kim S, Kwon OK, Oh SR, Lee HK, Ahn K. 2009. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. *International Immunopharmacology* **9**, 418-424.
- Liang J, Melican D, Cafro L, Palace G, Fisette L, Armstrong R, Patchen ML. 1998. Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. *International Journal of Immunopharmacology* **20**, 595-614.
- Lucas JA, Felices M, Evans JW, Berg LJ. 2007. Subtle defects in pre-TCR signaling in the absence of the Tec kinase Itk. *Journal of Immunology* **179**, 7561-7567.
- Manetz TS, Meade BJ. 1999. Development of a flow cytometry assay for the identification and differentiation of chemicals with the potential to elicit irritation, IgE-mediated, or T cell-mediated hypersensitivity responses. *Toxicological Sciences* **48**, 206-217.
- Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E, Kefalas P. 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry* **89**, 411-420.
- Matsuda H, Watabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. 1997. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice.

- International Immunology* **9**, 461-466.
- Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, Sato H, Itakura A, Sawada J, Ushio H, Suto H, Mitsuishi K, Hikasa Y, Matsuda H. 1999. IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *Journal of Immunology* **162**, 1056-1063.
- Matsuoka H, Maki N, Yoshida S, Arai M, Wang J, Oikawa Y, Ikeda T, Hirota N, Nakagawa H, Ishii A. 2003. A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Allergy* **58**, 139-145.
- Mebius RE, Kraal G. 2005. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews. Immunology* **5**, 606-616.
- Metcalf DD, Baram D, Mekori YA. 1997. Mast cells. *Physiological Reviews* **77**, 1033-1079.
- Mizutani A, Ohnuki H, Kawahara T, Otani H. 2007. Cow's IgG1 and its proteolytic digests stimulate immunoglobulin formation in mouse spleen cell cultures. *Milchwissenschaft* **62**, 9-12.
- 村上浩紀, 上野川修一. 1992. 食品と生体防御. pp. 47-61, 講談社, 東京.
- Murofushi M. 2009. Understanding the benefits of dates. "Nutritional Quality" 日本大学食物栄養学科編.
- 日本貿易振興機構. 2007. デーツのおはなし. 日本貿易振興機構貿易開発部開発支援課編.
- Ottaway CA. 1990. Immunology and immunopathology of the liver and

- gastrointestinal tract. pp. 49-69, edited by Targan SR & Shanahan F. Igaku Shoin, New York.
- Pène J, Rousset F, Brière F, Chrétien I, Bonnefoy JY, Spits H, Yokota T, Arai N, Arai K, Banchereau J, De Vries EJ. 1988. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons γ and α and prostaglandin E2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 6880-6884.
- Pène, J.; Rousset, F.; Brière, F.; Chrétien, I.; Paliard, X.; Banchereau, J.; Spits, H.; De Vries, J. E. 1988. IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma. *Journal of Immunology* **141**, 1218-1224.
- Platts-Mills TA. 2001. The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **164**, 1-5.
- Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, de Vries JE. 1994. Role of interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells. *Allergy* **49**, 576-586.
- Puri A, Sahai R, Singh KL, Saxena RP, Tandon JS, Saxena KC. 2000. Immunostimulant activity of dry fruits and plant materials used in indian traditional medical system for mothers after child birth and invalids. *Journal of Ethnopharmacology* **71**, 89-92.
- Ramiro-Puig E, Castell M. 2009. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *British Journal of Nutrition* **101**, 931-940.
- Rawlings DJ, Saffran DC, Tsukada S, Largaespada DA, Grimaldi JC, Cohen L, Mohr RN, Bazan JF, Howard M, Copeland NG, Jenkins NA, Witte ON.

1993. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* **261**, 358-361.
- Riedl MA, Casillas AM. 2003. Adverse drug reactions: types and treatment options. *American Family Physician* **68**, 1781-1790.
- Rock W, Rosenblat M, Borochoy-Neori H, Volkova N, Judeinstein S, Elias M, Aviram M. 2009. Effects of date (*Phoenix dactylifera* L., Medjool or Hallawi Variety) consumption by healthy subjects on serum glucose and lipid levels and on serum oxidative status: a pilot study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 8010-8017.
- Rothstein DM, Sayegh MH. 2003. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Immunological Reviews* **196**, 85-108.
- Rousset F, Robert J, Andary M, Bonnin JP, Souillet G, Chrétien I, Brière F, Pène J, Vries JE. 1991. Shifts in interleukin-4 and interferon-gamma production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **87**, 58-69.
- Sallal A-KJ, & Ashkenani A. 1989. Effect of date extract on growth and spore germination of *Bacillus subtilis*. *Microbios* **59**, 203-210.
- Sasakawa T, Higashi Y, Sakuma S, Hirayama Y, Sasakawa Y, Ohkubo Y, Goto T, Matsumoto M, Matsuda H. 2001. Atopic dermatitis-like skin lesions induced by topical application of mite antigens in NC/Nga mice. *International Archives of Allergy and Immunology* **126**, 239-247.
- Schaeffer EM, Yap GS, Lewis CM, Czar MJ, McVicar DW, Cheever AW, Sher A, Schwartzberg PL. 2001. Mutation of Tec family kinases alters T

- helper cell differentiation. *Nature immunology* **2**, 1183-1188.
- Schwartzberg PL, Finkelstein LD, Readinger JA. 2005. TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation. *Nature Reviews. Immunology* **5**, 284-295.
- Shang XZ, Armstrong J, Yang GY, Volk A, Li J, Griswold DE, Emmell E, Li L. 2004. Regulation of antigen-specific versus by-stander IgE production after antigen sensitization. *Cellular Immunology* **229**, 106-116.
- Shimizu K, Ashida H, Matsuura Y, Kanazawa K. 2004. Antioxidative bioavailability of artemisinin in Brazilian propolis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **424**, 181-188.
- Shraideh ZA, Abu-Elteen KH, Sallal AK. 1998. Ultrastructural effects of date extract on *Candida albicans*. *Mycopathologia* **142**, 119-123.
- Slimestad R, Vangdal E, Brede C. 2009. Analysis of phenolic compounds in six Norwegian plum cultivars (*Prunus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 11370-11375.
- Takeda K, Kishimoto T, Akira S. 1997. STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *Journal of Molecular Medicine* **5**, 317-326.
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology* **23**, 901-944.
- Teixeira DM, Patão RF, Coelho AV, da Costa CT. 2006. Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *Journal of*

Chromatography A **1103**, 22-28.

Tinker LF, Schneeman BO, Davis PA, Gallaher DD, Waggoner CR. 1991. Consumption of prunes as a source of dietary fiber in men with mild hypercholesterolemia. *The American Journal of Clinical Nutrition* **53**, 1259-1265.

Tobita K, Kawahara T, Otani H. 2006. Bovine beta-casein (1-28), a casein phosphopeptide, enhances proliferation and IL-6 expression of mouse CD19⁺ cells via Toll-like receptor 4. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8013-8017.

Tobita K, Yanaka H, Otani H. 2009. Heat-treated *Lactobacillus crispatus* KT strains reduce allergic symptoms in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 5586-5590.

Vercelli D. 1995. Regulation of IgE synthesis in humans. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* **9**, 1-6.

Vinson JA, Zubik L, Bose P, Samman N, Proch J. 2005. Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition* **24**, 44-50.

Vinuesa CG, Linterman MA, Goodnow CC, Randall KL. 2010. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunological Reviews* **237**, 72-89.

Wolf JL, Bye WA. 1984. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Annual Review of Medicine* **35**, 95-112.

山形孝夫. 1988. 世界大百科事典. 平凡社, 東京.

山本福壽. 1997. 沙漠の植物. 市民公開講座テキスト.

- Yamamoto N, Moon JH, Tsushida T, Nagao A, Terao J. 1999. Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **372**, 347-354.
- Yasuno S, Kokubo K, Kamei M. 1999. New method for determining the sugar composition of glycoproteins, glycolipids, and oligosaccharides by high-performance liquid chromatography. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**, 1353-1359.
- Yu T, Lee YJ, Jang HJ, Kim AR, Hong S, Kim TW, Kim MY, Lee J, Lee YG, Cho JY. 2011. Anti-inflammatory activity of *Sorbus commixta* water extract and its molecular inhibitory mechanism. *Journal of Ethnopharmacology* **134**, 493-500.
- Yun CH, Estrada A, Van Kessel A, Gajadhar AA, Redmond MJ, Laarveld B. 1997. β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4) oat glucan enhances resistance to *Eimeria vermiformis* infection in immunosuppressed mice. *International Journal for Parasitology* **27**, 329-337.
- Zhou C, Kang XD, Chen Z. 2008. A synthetic Toll-like receptor 2 ligand decreases allergic immune responses in a mouse rhinitis model sensitized to mite allergen. *Journal of Zhejiang University Science B* **9**, 279-285.
- Zhou L, Chong MM, Littman DR. 2009. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* **30**, 646-655.