

## 食品成分による抗アレルギー作用におけるカリウムチャネルの関与と治療への応用

風間 逸郎

宮城大学看護学群

**概要** ビタミン類の中には、経験的にアレルギー性鼻炎や気管支喘息患者の症状を緩和するものがあることが知られる。ラットの腹膜より単離した肥満細胞に対し、ビタミン C(アスコルビン酸)、ビタミン B<sub>1</sub>(チアミン)、ビタミン B<sub>6</sub>(ピリドキシン)それぞれ 1~10 mM を単独投与、または低用量のアスコルビン酸、ピリドキシンを併用投与したうえでエキソサイトーシスを誘発し、顕微鏡下で脱顆粒現象を観察した。全肥満細胞数に対する脱顆粒した細胞の割合を算出し、これらのビタミン類がエキソサイトーシスの過程に及ぼす作用について定量化し、濃度間での比較を行った。アスコルビン酸とピリドキシンはいずれも、比較的低濃度(1, 2 mM)では肥満細胞からの脱顆粒現象を十分には抑制しなかった。しかし高濃度(5, 10 mM)では、それを大きく抑制し、用量依存性の効果を発揮した。そこで、単独では十分な効果がみられなかった低濃度(1, 2 mM)のアスコルビン酸とピリドキシンを併用投与したところ、肥満細胞の脱顆粒現象を大きく抑制した。とくに、アスコルビン酸 1 mM にピリドキシン 2 mM、または、アスコルビン酸 2 mM にピリドキシン 1 または 2 mM を併用投与した場合、それぞれを単独投与した場合の相加効果以上に、相乗効果を発揮した。ビタミン C、B<sub>6</sub>はいずれも、用量依存性に肥満細胞からの脱顆粒現象を抑制した。文献上、ビタミン C やビタミン B<sub>6</sub>はアレルギー疾患の症状を緩和することが知られるが、本研究の結果より、これらのビタミン類は、肥満細胞からの脱顆粒現象、つまりエキソサイトーシスの過程そのものを直接的に抑えることによって、抗アレルギー作用を発揮すると考えられた。さらに本研究の結果、ビタミン C とビタミン B<sub>6</sub>によって、相加効果でなく、相乗的な抗アレルギー効果が得られた。メカニズムの詳細は明らかではないが、単独投与でみられた肥満細胞のエキソサイトーシスに対する直接的な抑制作用以外にも、多面的な作用機序によって、相乗的な抗アレルギー効果が発揮された可能性が高い。

### 1. 研究目的

食品成分の中でもビタミン類は、生命維持のために重要なはたらきをする生体に不可欠な有機化合物のうち微量なものである。体内でほとんど合成されないか、合成されても必要量に満たないために、必ず外界から摂取しなくてはならない栄養素である。主に生理機能を正常に維持するための栄養素や代謝の補酵素としてはたらいており、エネルギーや体構成成分にはほとんど含まれていない。主なはたらきとして、例えばビタミン C にはコラーゲンの生合成や抗酸化作用、ニトロソアミン生成阻止などの作用、ビタミン B<sub>6</sub>には蛋白質代謝酵素の補酵素やホモシステインをシステインに変換、ヘム前駆物質の合成などの作用があることが知られている。最近では、ビタミン類の摂取に

より、アレルギー性鼻炎や蕁麻疹、気管支喘息などの症状が改善することがわかってきており、抗アレルギー作用も有すると考えられている。ビタミン類が有する抗アレルギー作用のメカニズムについては、例えばビタミン C がヒスタミンを分解する作用を有すること、ビタミン B<sub>6</sub> が肥満細胞からのヒスタミンの遊離を抑制すること、免疫機能を正常に維持することによってアレルギー症状を緩和する効果があることなどが、ヒトや実験動物を用いた研究では明らかになってきた。しかし、これらのビタミン類が肥満細胞そのものに対してどう作用するかについて、細胞レベルで詳細に調べた報告はない。そこで、肥満細胞にビタミン類(ビタミン C、ビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>1</sub>)を直接に投与することで、肥満細胞からのヒスタミンの放出課程(開口分泌現象=エキ

ソサイトーシス)にどう影響するかを明らかにしたいと考え、本研究を行うことにした。

## 2. 研究方法

### 2.1 肥満細胞の単離と脱顆粒現象の観察

25 週齢以上の雄性 Wister rat の腹膜を、細胞外液 (NaCl, 145; KCl, 4.0; CaCl<sub>2</sub>, 1.0; MgCl<sub>2</sub>, 2.0; HEPES, 5.0 mM; BSA, 0.01%; pH 7.2) で洗浄し、洗浄液から肥満細胞を単離した。単離した後、ビタミン類(ビタミン C; アスコルビン酸, ビタミン B<sub>6</sub>; ピリドキシン, ビタミン B<sub>1</sub>; チアミン)を含む細胞外液中に拡散し、細胞含有液とした。これらの肥満細胞に対し、顕微鏡下でエキソサイトーシスを誘発し、脱顆粒現象を観察した。なお、本細胞を用いた以下の実験は、細胞採取後 8 時間以内に、室温(22~24°C)条件下で行った。

### 2.2 電氣的細胞膜容量の測定

EPC-9 patch-clamp amplifier system (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) を用いたホールセル・パッチクランプ法によって電氣的細胞膜容量(membrane capacitance: Cm)を測定した。パッチパイペット内に電極内液(K-glutamate, 145; MgCl<sub>2</sub>, 2.0; HEPES, 5.0 mM; pH 7.2)を満たした時の電気抵抗は 4~6 MΩ であった。細胞外液中に浮遊させた肥満細胞に対してギガセルを作成した後、電極内に陰圧を加えて細胞膜の一部を破壊し、ホールセル・モードとした。内因性にエキソサイトーシスを誘発するために、電極内液中に GTP-γ-S 100 μM を加え、細胞膜の破壊と同時に、細胞内への灌流を開始した。測定には、Lock-in amplifier を用いて、800 Hz の正弦曲線の矩形波パルスで -80 mV の保持電位で補正した。電氣的細胞膜容量(Cm)、シリーズコンダクタンス(series conductance: Gs)、膜コンダクタンス(membrane conductance: Gm)を 120 秒間連続して記録した。なお測定中、アクセス抵抗(series resistance: Rs)は 10 MΩ 以下に保った。

### 2.3 統計学的解析方法

得られたデータは、PulseFit software (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) 及び Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を用いて解析した。また、Student の t test による両方向の分散分析を用いて統計学的有意差を検証した。p 値 0.05 以下で統計学的に有意であると判断した。

## 3. 研究結果と考察

### 3.1 ビタミン類が有する肥満細胞安定化作用についての検討

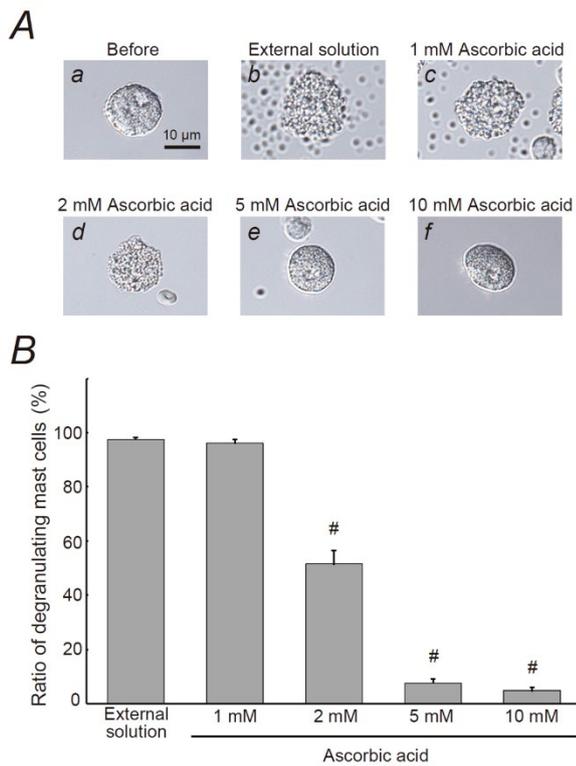
1~10 mM のビタミン C (アスコルビン酸)、ビタミン B<sub>6</sub> (ピリドキシン)、ビタミン B<sub>1</sub> (チアミン) を用いて、肥満細胞からの脱顆粒現象に対する影響を調べた。その結果、アスコルビン酸、ピリドキシンともに、低用量では肥満細胞からの脱顆粒現象を抑制しなかったが、高用量では有意に抑制し、用量依存性の効果を示した (Fig.1, Fig.2)。これまで、これらのビタミン類は、アレルギー性鼻炎や蕁麻疹、気管支喘息などのアレルギー疾患の症状を緩和することが知られてはいたが、そのメカニズムは明らかでなかった。本研究の結果より、アスコルビン酸やピリドキシンは、肥満細胞からの脱顆粒現象、つまりエキソサイトーシスの過程そのものを直接的に抑えることによって、抗アレルギー効果を発揮することが明らかになった。従って、いわゆる抗ヒスタミン薬のように、ヒスタミンの刺激によって各臓器で出現した症状を対症的に抑えるだけでなく、肥満細胞のレベルからアレルギー反応を根本的に抑えることができると考えられた。

### 3.2 ビタミン類の併用効果についての検討

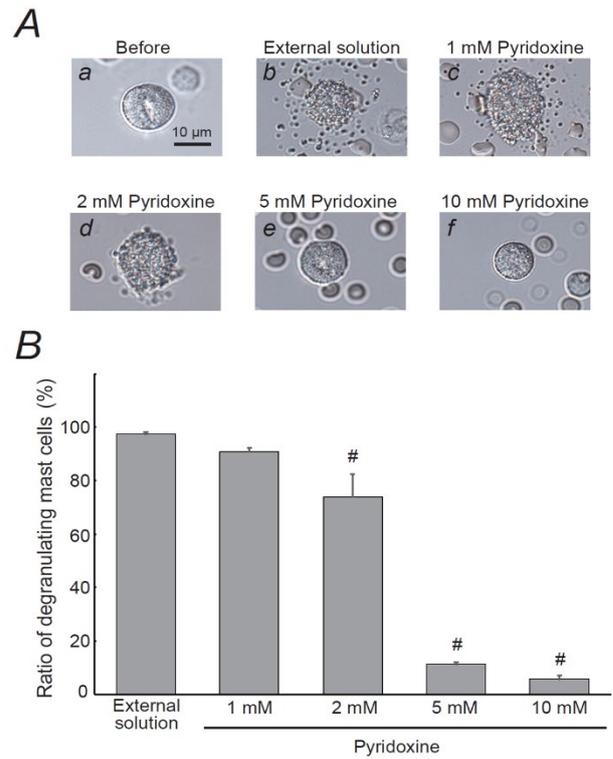
本研究の結果、比較的低濃度(1~2 mM)のビタミン類を単独で投与しても、肥満細胞の脱顆粒現象に対する抑制効果は十分には認められなかった (Fig.1, Fig.2)。そこで、低用量同士のアスコルビン酸およびピリドキシンを併用投与したところ、肥満細胞の脱顆粒現象を大きく抑制し、相加効果にとどまらず、相乗効果が認められた (Fig.3)。

これまで臨床研究を含め、アレルギー症状に対してアスコルビン酸とピリドキシンの併用投与を試したという報告はない。従って、本研究結果は、これらのビタミンの併用効果について、初めて肥満細胞レベルで実証しえた効果であるといえる。

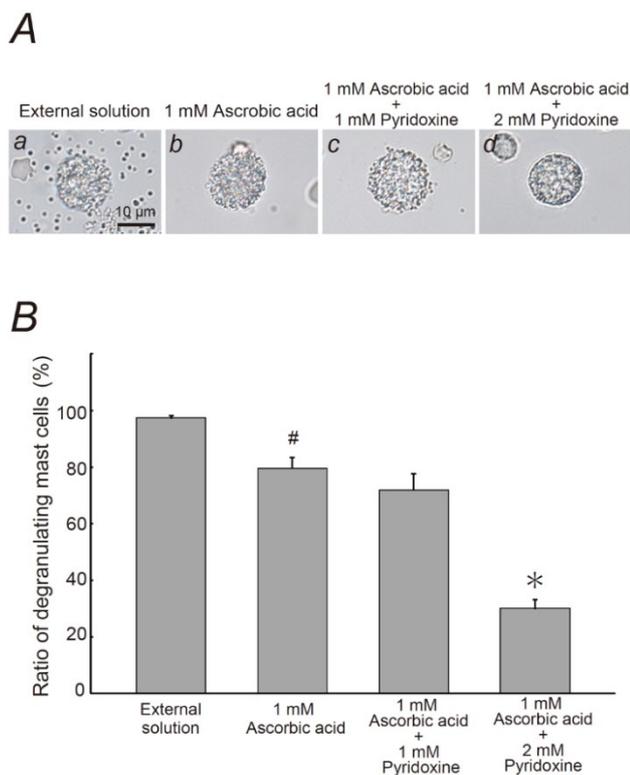
なお、アスコルビン酸が抗アレルギー作用を発揮する別のメカニズムとして、これまでの報告によれば、肥満細胞から放出されたヒスタミンを分解するという機序も明らかになっている。本研究で、アスコルビン酸とピリドキシンにより相加効果でなく、相乗効果が得られたメカニズムの詳細は明らかではないが、単独投与でみられた肥満細胞のエキソサイトーシスに対する直接的な抑制作用以外にも、多面的な作用機序によって、相乗的な抗アレルギー効果が発揮された可能性が高い。



**Fig. 1** Effects of ascorbic acid on mast cell degranulation. (A) High dose ascorbic acid suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells. (B) Ascorbic acid dose-dependently suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells.



**Fig. 2** Effects of pyridoxine on mast cell degranulation. (A) High dose pyridoxine suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells. (B) Pyridoxine dose-dependently suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells.



**Fig. 3** Synergistic effects of ascorbic acid and pyridoxine on mast cell degranulation. (A) 1 mM ascorbic acid with 2 mM pyridoxine markedly suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells. (B) 2 mM pyridoxine synergistically potentiated the effect of 1 mM ascorbic acid on mast cell degranulation.

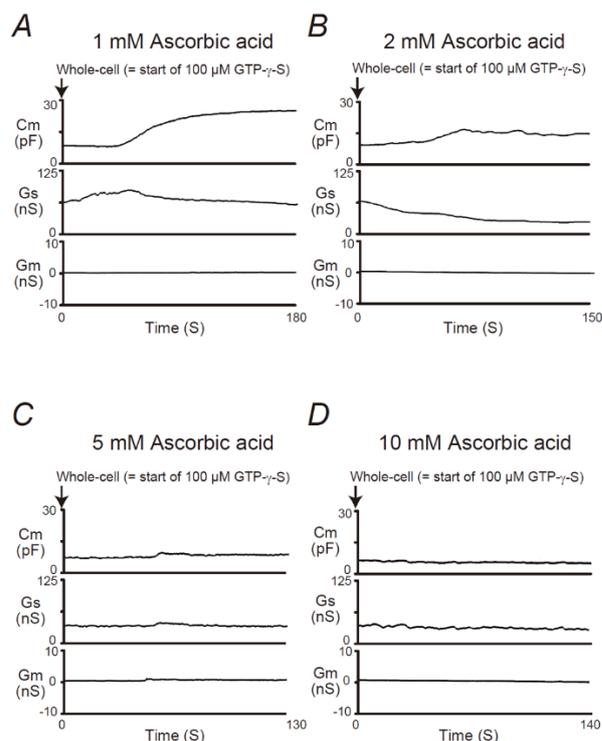
### 3.3 アスコルビン酸が有する肥満細胞安定化作用についての電気生理学的検討

肥満細胞におけるエキソサイトーシスの過程では、分泌顆粒の細胞膜への融合に伴って、細胞膜の表面積が増加する。それによりこの過程は、電気生理学的にも、細胞膜容量; membrane capacitance ( $C_m$ ) の継時的な増加として捉えられる。そこで本研究では、肥満細胞のエキソサイトーシスの過程そのものに対するアスコルビン酸の効果を明らかにするために、本薬剤の存在下で肥満細胞のエキソサイトーシスを誘発し、電気的細胞膜容量の変化を、パッチクランプ法を用いて測定した (Fig.4)。その結果、比較的低濃度のアスコルビン酸の存在下では、肥満細胞からの脱顆粒現象、およびエキソサイトーシスに伴う細胞膜容量の増加とともに、ほとんど抑制されなかった。しかし、高濃度のアスコルビン酸の存在下では、肥満細胞からの脱顆粒現象、および細胞膜容量の増加とともに、ほぼ完全に抑制された (Fig.4)。このことから、アスコルビン酸は、濃度依存性にエキソサイトーシスに伴う細胞膜容量の増加を有意に抑制し、肥満細胞安定化作用を発揮することが明らかになった。

### 3.4 肥満細胞安定化作用のメカニズムについての検討

アドレナリンは、アレルギーの重症型であるアナフィラキシーに対する第一選択薬として用いられている。われわれが行った研究の結果、アドレナリンは用量依存性にエキソサイトーシスに伴う細胞膜容量の増加を有意に抑制し、肥満細胞安定化作用を発揮することが明らかになった<sup>(1)</sup>。本作用は主にアドレナリン  $\beta_2$  受容体を介するが、最近、肥満細胞膜表面にはアドレナリン  $\alpha_1$  受容体も発現することが明らかになっている。そこで、肥満細胞安定化作用における  $\alpha_1$  受容体の関与を明らかにするため、選択的  $\alpha_1$  受容体阻害薬である Prazosin の存在下で、肥満細胞の脱顆粒現象に伴う細胞膜容量の変化を調べた (Fig.5)。

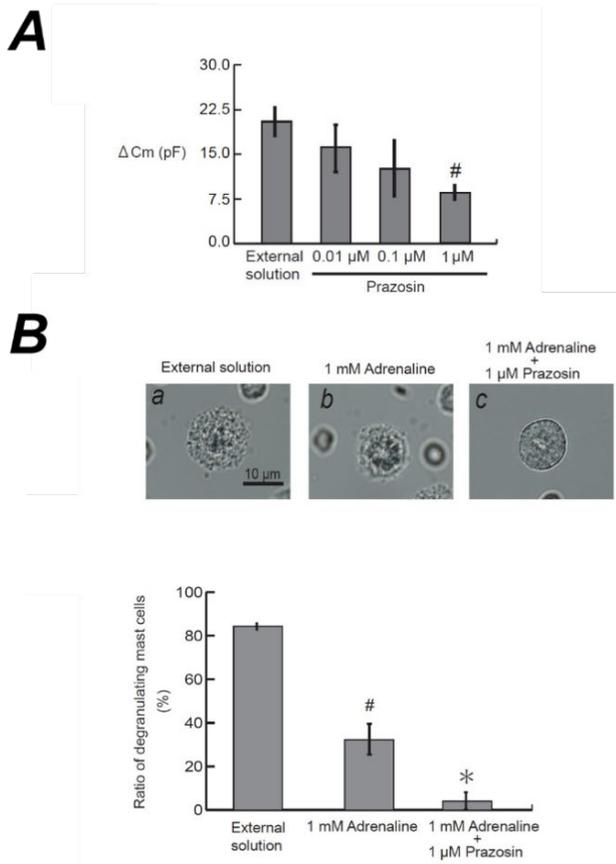
その結果、Prazosin は用量依存性に細胞膜容量の増加を抑制し、肥満細胞安定化作用を発揮した (Fig.5A)。さらに Prazosin の存在下でアドレナリンの作用を調べたところ、Prazosin はアドレナリンによる肥満細胞安定化作用を著しく増幅させることも明らかになった (Fig.5B)。



**Fig. 4** Effects of ascorbic acid on membrane capacitance. High dose ascorbic acid (5, 10 mM) suppressed the GTP- $\gamma$ -S-induced increase in the membrane capacitance.

## 4. 結論及び今後の課題

食品成分のうちカフェインやカテキンだけでなく<sup>(2)</sup>、ビタミン類の中にも、肥満細胞安定化作用を有するものがあることが明らかになった。本研究により、ビタミン C (アスコルビン酸) やビタミン B<sub>6</sub> (ピリドキシン) は、肥満細胞におけるエキソサイトーシスの過程そのものを阻害することによって、用量依存性に抗アレルギー効果を発揮した。さらに、低用量同士のビタミン類を併用することによって、抗アレルギー作用を増強させる効果があることが明らかになった。一方で、今回、肥満細胞安定化作用におけるアドレナリン  $\alpha_1$  受容体の関与も明らかになった。本受容体は、K<sub>Ca</sub>3.1 などのカリウムチャネルやカルシウムチャネル、NaK-ATPase などの輸送体との相互作用が知られている。これまでヒト肺由来肥満細胞で報告されてきたことと同様の知見をラット腹膜由来肥満細胞でも確かめることにより、肥満細胞安定化作用におけるこれらのイオンチャネルや輸送体の関与など、詳細なメカニズムについても明らかにしていきたい。



**Fig. 5** Effects of prazosin on mast cell-stabilization.  
 (A) Prazosin dose-dependently suppressed the GTP-g-S-induced increase in the membrane capacitance.  
 (B) Prazosin synergistically potentiated the effect of 1 mM adrenaline on mast cell degranulation.

## 5. 文献

1. Abe N, Toyama H, Ejima Y, Saito K, Tamada T, Yamauchi M et al. alpha 1-Adrenergic Receptor Blockade by Prazosin Synergistically Stabilizes Rat Peritoneal Mast Cells. *Biomed Res Int* 2020;2020:3214186.
2. Yashima M, Sato Y, Kazama I. Catechin synergistically potentiates mast cell-stabilizing property of caffeine. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2021;17:1.

## Anti-Allergic Effects of Food Constituents

Itsuro Kazama

Miyagi University, School of Nursing

### Summary

Besides the physiological properties, studies revealed the roles of vitamins, such as ascorbic acid (vitamin C) and pyridoxine (vitamin B<sub>6</sub>), in ameliorating the symptoms of allergic disorders. In the present study, using the differential-interference contrast (DIC) microscopy, we examined the effects of these vitamins on the degranulation from rat peritoneal mast cells. Both vitamins dose-dependently decreased the numbers of degranulating mast cells. At higher concentrations (5, 10 mM), they markedly suppressed the numbers of degranulating mast cells. At relatively lower concentrations (1, 2 mM), pyridoxine did not significantly affect the numbers of degranulating mast cells. Surprisingly, however, pyridoxine with such low doses synergistically augmented the suppressive effects of ascorbic acid. These results provided *in vitro* evidence that vitamins, such as ascorbic acid and pyridoxine, dose-dependently inhibited the process of exocytosis. Pyridoxine alone with lower doses did not stabilize mast cells. However, it synergistically potentiated the mast cell-stabilizing property of ascorbic acid.