

# ラット好塩基球様細胞株RBL-2H3の脱顆粒に及ぼす有機酸・短鎖脂肪酸の影響と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の関係

## Relationship between the Antiallergic Effects of Organic Acids and Short-Chain Fatty Acids and Intracellular Ca<sup>2+</sup> Concentration in Rat Basophilic Leukemia Cell Line RBL-2H3

横山 さや香<sup>1)</sup>

Sayaka YOKOYAMA

三宅 香穂<sup>2)</sup>

Kaho MIYAKE

田中 守<sup>2)3)</sup>

Mamoru TANAKA

### 要 旨

腸内細菌が産生する有機酸・短鎖脂肪酸は、腸管免疫に重要な役割を果たすことが知られている。しかし、有機酸・短鎖脂肪酸の抗アレルギー効果についてはあまり報告されていない。本研究では、有機酸・短鎖脂肪酸が体内に取り込まれ、マスト細胞に作用することで、アレルギーを抑制するのではないかとの仮説を立て、ラット好塩基球様細胞株RBL-2H3細胞を用いて、有機酸・短鎖脂肪酸の脱顆粒抑制効果および細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度に及ぼす影響について検討した。9種類の有機酸・短鎖脂肪酸を用いて、RBL-2H3細胞への細胞毒性を評価した後、各種成分刺激による抗アレルギーの評価として脱顆粒抑制試験、脱顆粒抑制メカニズムの評価として細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の測定を行った。脱顆粒抑制試験は、有機酸・短鎖脂肪酸の種類により、脱顆粒抑制効果に差が認められたため、脱顆粒抑制効果が強かった6サンプルに絞り、同濃度で比較した結果、コハク酸>酢酸>イソ酪酸=イソ吉草酸>酪酸=吉草酸の順に脱顆粒抑制効果が強いことが明らかとなった。β-hexosaminidase放出率と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の相関について検討した結果、非常に強い正の相関が見られた (p<0.05, R=0.97)。以上の結果から、有機酸・短鎖脂肪酸には抗アレルギー効果が認められ、有機酸・短鎖脂肪酸の抗アレルギー効果にはCa<sup>2+</sup>濃度が関係していることが示唆された。

### はじめに

わが国では、アレルギー疾患を有する者の増加が見られ、現在では国民の2人に1人が何らかのアレルギー疾患に罹患しているとい

われている<sup>1)</sup>。アレルギーとは異物の侵入から生体を守るために機能している免疫反応が生体に不利に働く場合のことをいう。免疫学的機序の違いにより、I～IV型に分類され、

<sup>1</sup>金城学院大学生活環境学部

<sup>2</sup>中部大学大学院応用生物学研究科

<sup>3</sup>中部大学大学院応用生物学部

狭義のアレルギーといえば、食物アレルギーや花粉症などのI型アレルギーのことを指す<sup>2)</sup>。食物アレルギーは腸管から吸収されたアレルゲンに対する過剰な免疫反応であり<sup>3)</sup>、アレルギーの発症・増悪には腸管を介したアレルゲンの侵入が影響しているといわれている<sup>4)</sup>。

腸管は栄養素の消化吸収と同時に多くの細菌やウイルスなどの外来異物にも曝露されている。そのため、腸管には免疫の働きを担う細胞や抗体が存在しており、腸管免疫系は生体防御の最前線とされている<sup>5,6)</sup>。腸管免疫系の維持には腸内細菌が重大な役割を担っており、ヒトの消化管内には500~1000種類もの腸内細菌が1兆個存在しているといわれている<sup>4)</sup>。食事、生活習慣、薬物投与などの外的要因によって腸内細菌の働きが偏重すると腸内環境が悪くなり、宿主にさまざまな影響を与えることが知られており<sup>4)</sup>、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎の発症に腸内細菌が関与していることが報告されている<sup>7,8)</sup>。また、腸内細菌は宿主にとって有用あるいは有害な作用を抑制する代謝産物を産生し<sup>9)</sup>、腸内環境の改善だけでなく、生理機能、薬効、発がん、免疫応答、感染抵抗性、老化などに関与する<sup>4)</sup>。腸内細菌は、難消化性炭水化物を主なエネルギー源として増殖し、酢酸やプロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸や、乳酸やコハク酸のような有機酸を産生する<sup>10)</sup>。有機酸・短鎖脂肪酸は大腸から吸収された後、大部分が門脈を経由して肝臓へ送られ、一部は大腸上皮細胞に取り込まれ、残りが血中に輸送され末梢組織に至ることが明らかとなっている<sup>10,11)</sup>。末梢組織、すなわち全身の皮下組織および粘膜にはマスト細胞が幅広く分布しており、マスト細胞の細胞膜上に発現している高親和性IgE受容体(FcεRI)が、抗原により架橋されることでマスト細胞が活性

化し、ヒスタミン、セロトニン、種々のプロテアーゼなどを細胞外に放出する脱顆粒反応や炎症性サイトカインが産生される。この活性化はI型アレルギーの原因にもなる<sup>12)</sup>。これらのことから、腸内細菌によって産生される有機酸・短鎖脂肪酸が血中に輸送され末梢組織に至ることで、マスト細胞に影響を与え、アレルギーを抑制するのではないかとの仮説を立てた。本研究では、マスト細胞や好塩基球と同様の機能を有しているラット好塩基球様細胞株RBL-2H3を用い、有機酸・短鎖脂肪酸の脱顆粒抑制効果および細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度に及ぼす影響について検討した。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 培養細胞

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

### 2-2. 使用サンプル(図1)

本研究で用いた有機酸・短鎖脂肪酸は、乳酸、コハク酸、ギ酸(和光純薬株式会社)、吉草酸、イソ吉草酸、酪酸、イソ酪酸、プロピオン酸(東京化成工業株式会社)および酢酸(米山製品工業株式会社)を使用した。サンプルはコハク酸のみ40 mMに、その他は4 Mになるようエタノール(富士フィルム和光純薬株式会社)で溶解し、50 μLずつ分注し、-20℃で保存した。使用時はエタノール濃度0.5%となるように用事調製した。

### 2-3. 細胞生存率評価

細胞生存率の評価は、Cell Counting Kit-8(同

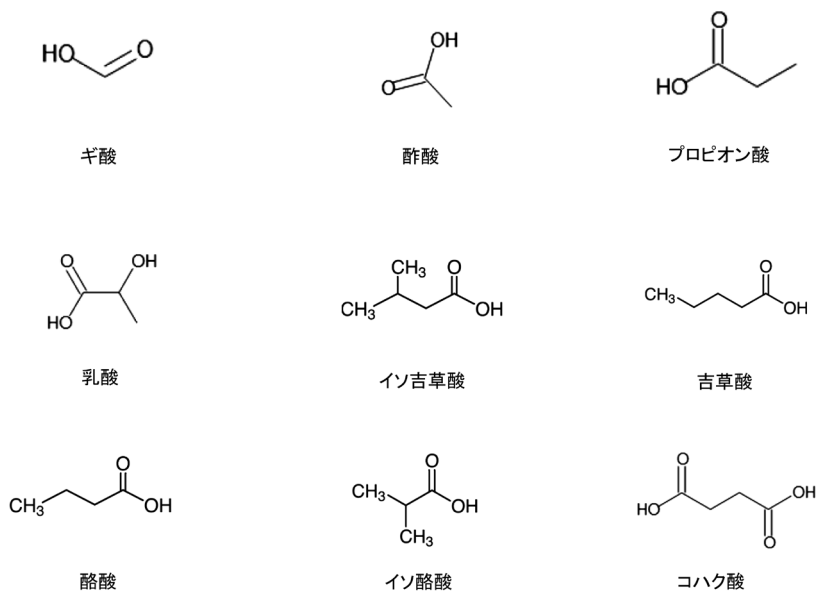


図1. 有機酸・短鎖脂肪酸の構造式

仁化学研究所)を用いて、操作手順に沿って行った。すなわち、RBL-2H3は細胞培養用96ウェルマイクロプレートに $6.0 \times 10^4$  cells/well播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件化で一晩培養した。100 μLのphosphate Buffered saline (PBS, 富士フィルム和光純薬株式会社)で2回洗浄した後、10% FBSを含むDMEMで50 ng/mLに溶解した抗DNP-IgE抗体 (Sigma-Aldrich) を添加し2時間培養後、細胞を200 μLのMT (Modified Tyrode) 緩衝液 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5.6 mmol/L glucose, 20 mmol/L HEPES, 0.1% BSA, pH 6.8) で2回洗浄した。MT緩衝液で各濃度に調製した100 μLの有機酸・短鎖脂肪酸試料を添加し10分間反応後、50 ng/mLのDNP-labeled human serum albumin (DNP-HSA, Sigma-Aldrich) を10 μL加え、さらに30分間反応させた。200 μLのPBSで2回洗浄後、10 μLのCell Counting Kit-8を含むDMEM 100 μLを細胞に加え37°C、30分間反応させた。その後、直ちにPOWERSCAN<sup>®</sup>

HTマイクロプレートリーダー (Bio Tek Instruments) で450 nmの吸光度を測定した。なお、有機酸・短鎖脂肪酸試料を含まない10% FBSを含むDMEMを添加し、同様に反応させたControlの吸光度を100%とし、細胞生存率を算出した。

#### 2-4. 脱顆粒抑制試験

脱顆粒阻害作用は、脱顆粒中の酵素β-hexosaminidaseの放出活性で評価した。すなわち、24ウェルマイクロプレートに $2.5 \times 10^5$  cells/wellで細胞を播種し、一晩培養した。1 mLのPBSで2回洗浄した後、10% FBSを含むDMEMで50 ng/mLに溶解した抗DNP-IgE抗体を添加し2時間培養後、細胞を1.5 mLのMT緩衝液で2回洗浄した。MT緩衝液で溶解した490 μLの有機酸・短鎖脂肪酸試料を添加し10分間反応後、50 ng/mLのDNP-HSAを10 μL加え、さらに30分間反応させた。有機酸・短鎖脂肪酸試料を含まないMT緩衝液を添加し同様に反応させたものをControlとした。

培養上清を回収後、細胞を0.1% Triton X-100（富士フイルム和光純薬株式会社）/MT緩衝液で溶解することで細胞溶解液を得た。培養上清および細胞溶解液それぞれ50  $\mu$ Lを96ウェルプレートに移し、37°Cで5分間加温後、50  $\mu$ Lの0.1 mol/Lクエン酸緩衝液（pH 4.5）に溶解した3.3 mmol/L *p*-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside（富士フイルム和光純薬株式会社）を加え、37°Cで25分間反応させた。反応溶液に100  $\mu$ Lの2.0 mol/Lグリシン緩衝液（pH 10.4）を加えて反応を停止後、405 nmの吸光度を測定した。 $\beta$ -hexosaminidase放出率を以下の式により求め、Controlの $\beta$ -hexosaminidase放出率を100%として、有機酸・短鎖脂肪酸試料の $\beta$ -hexosaminidase放出活性を算出した。

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

## 2-5. 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度（[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>）の測定

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>はCalcium Kit-Fluo 4（同仁化学研究所）を用いて、操作手順に沿って行った。RBL-2H3は細胞培養用96ウェルブラックマイクロプレートに播種し、抗DNP-IgE抗体で感作した。その後、細胞を200  $\mu$ LのPBSで2回洗浄した後、100  $\mu$ LのFluo 4-AMで1時間反応させた。反応後、200  $\mu$ LのPBSで2回洗浄し、PBSで溶解した100  $\mu$ Lの有機酸・短鎖脂肪酸試料を添加し10分間反応後、MT緩衝液で0.625  $\mu$ g/mLに調製したDNP-HSAを10  $\mu$ L加え、直ちに蛍光強度をSynergy<sup>TM</sup> HTXマイクロプレートリーダーおよびGen5<sup>TM</sup>ソフトウェアを用いて、励起波長485/20 nm、蛍光波長538/20 nm、Gain 40の吸光度を測定した。測定値はDNP-HSA刺激前の吸光度を1とし、

5分後の相対値を表した。なお、有機酸・短鎖脂肪酸試料の代わりにPBSを添加し、同様に反応させたものをControlとした。

## 2-6. 統計処理

測定値は平均 $\pm$ 標準偏差で示した。統計ソフトはSPSS Statistics 25を使用した。独立多群の差の検定には一元配置の分散分析（ANOVA）を用いた。その後、Post hoc検定として細胞生存率と脱顆粒抑制試験、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度はDunnett法を用い、各サンプル2 mMの脱顆粒抑制試験ではTukeyを用いた。危険率5%未満で有意差ありと判断した。脱顆粒抑制試験と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の相関係数についてはPearsonの相関係数を用いた。

## 3. 結果

### 3-1. 細胞生存率

表1に有機酸・短鎖脂肪酸の細胞生存率を示す。Controlと比較して、プロピオン酸を除く、すべてのサンプルの添加濃度の範囲で細胞毒性は認められなかった（ $p < 0.05$ ）。以上の結果から、脱顆粒抑制試験に使用するサンプルの濃度を10 mM、5 mM、1 mM、0.5 mM、0.25 mMおよび0.125 mM、コハク酸のみ2 mM、1 mM、0.5 mM、0.25 mM、0.125 mMおよび0.0625 mMとし、細胞生存率が80%以下であった10 mMのプロピオン酸は除外し、脱顆粒抑制試験を行った。

### 3-2. 脱顆粒抑制試験

表2に $\beta$ -hexosaminidase放出活性に及ぼす有機酸・短鎖脂肪酸の影響について示す。吉草酸、イソ酪酸、酢酸、プロピオン酸およびギ酸においては、Controlと比較して5-10 mMで $\beta$ -hexosaminidase放出活性の有意な低下が認められた（ $p < 0.05$ ）。イソ吉草酸、酪酸および乳酸においてはControlと比較して

表1. 有機酸・短鎖脂肪酸によるRBL-2H3細胞への影響

	Control	0.0625 mM	0.125 mM	0.25 mM	0.5 mM	1 mM	5 mM	10 mM
吉草酸	100 ± 7.3	117 ± 5.4	134 ± 14.5	131 ± 10.2	136 ± 14.3	120 ± 4.9	104 ± 6.3	90 ± 10.0
イソ吉草酸	100 ± 12.9	123 ± 16.0	139 ± 8.7	136 ± 21.0	128 ± 17.5	133 ± 17.2	110 ± 24.5	103 ± 4.8
酪酸	100 ± 8.1	126 ± 4.4	139 ± 3.4	122 ± 19.7	137 ± 13.6	125 ± 12.6	135 ± 17.3	92 ± 6.6
イソ酪酸	100 ± 6.1	155 ± 9.2	132 ± 6.1	155 ± 15.2	152 ± 14.8	152 ± 12.6	141 ± 17.1	116 ± 2.8
酢酸	100 ± 19.5	127 ± 18.4	100 ± 20.9	173 ± 40.1	151 ± 41.4	136 ± 30.1	161 ± 40.4	156 ± 5.6
プロピオン酸	100 ± 5.8	124 ± 13.4	120 ± 24.9	120 ± 22.7	111 ± 25.5	108 ± 12.2	109 ± 18.7	76 ± 3.6
ギ酸	100 ± 4.2	130 ± 12.2	121 ± 15.5	106 ± 2.9	138 ± 25.6	132 ± 19.1	140 ± 17.7	126 ± 18.7
乳酸	100 ± 2.0	139 ± 4.0	151 ± 15.1	126 ± 32.7	172 ± 14.8	147 ± 10.9	161 ± 26.8	142 ± 11.8

	Control	0.0625 mM	0.125 mM	0.25 mM	0.5 mM	1 mM	2 mM
コハク酸	100 ± 21.0	90 ± 44.7	86 ± 16.9	104 ± 42.5	116 ± 34.6	119 ± 46.3	110 ± 14.1

RBL-2H3細胞を一晩培養し、抗体で感作させた後、サンプルを10分間添加した。抗原で刺激し、試薬により発色させた後、吸光度を測定し、細胞生存率を算出した。試料はMT緩衝液で各濃度に希釈した。データは試料無添加 (Control) を100%とし、相対値の平均±標準偏差 (n=3) 表す。

表2. RBL-2H3細胞のβ-hexosaminidase放出率に及ぼす有機酸・短鎖脂肪酸の影響

	Control	0.125 mM	0.25 mM	0.5 mM	1 mM	5 mM	10 mM
吉草酸	100.0 ± 1.6	115.9 ± 3.3	106.3 ± 4.0	108.4 ± 3.2	98.7 ± 3.1	4.3 ± 0.4 *	n.d.
イソ吉草酸	100.0 ± 7.8	97.4 ± 1.8	101.4 ± 4.1	95.7 ± 3.2	90.0 ± 3.3 *	8.9 ± 2.2 *	n.d.
酪酸	100.0 ± 4.4	102.8 ± 5.0	97.1 ± 9.0	95.6 ± 6.9	87.5 ± 2.2 *	n.d.	n.d.
イソ酪酸	100.0 ± 25.0	83.3 ± 26.9	75.8 ± 2.9	97.2 ± 25.1	81.5 ± 6.4	4.2 ± 4.0 *	16.4 ± 11.3 *
酢酸	100.0 ± 1.2	95.3 ± 3.0	105.6 ± 1.6	100.5 ± 3.8	101.7 ± 3.6	11.1 ± 0.6 *	1.5 ± 1.0 *
プロピオン酸	100.0 ± 1.2	109.6 ± 4.5	111.0 ± 5.0	106.6 ± 0.6	110.9 ± 1.5	90.5 ± 1.4 *	—
ギ酸	100.0 ± 2.0	104.5 ± 1.0	104.1 ± 2.6	101.9 ± 1.8	96.6 ± 2.5	54.5 ± 0.8 *	n.d.
乳酸	100.0 ± 4.8	109.2 ± 0.6	107.9 ± 3.9	97.6 ± 2.5	91.0 ± 3.4 *	11.2 ± 1.0 *	n.d.

	control	0.125 mM	0.25 mM	0.5 mM	1 mM	2 mM
コハク酸	100.0 ± 4.1	94.8 ± 4.8	92.1 ± 2.6 *	87.3 ± 3.7 *	48.0 ± 1.2 *	2.6 ± 0.7 *

RBL-2H3細胞を一晩培養し、抗体で感作させた後、サンプルを10分間添加した。抗原で刺激し、上清回収後、基質溶液により発色させ、吸光度を測定し、β-hexosaminidase放出率を算出した。試料はMT緩衝液で希釈した。データは試料無添加 (Control) を100%とし、相対値の平均±標準偏差 (n=3) を表し、—:未測定, n.d.:検出圏外を表す。

\*p < 0.05 vs Control

1-10 mMで $\beta$ -hexosaminidase放出活性の有意な低下が認められた ( $p < 0.05$ )。コハク酸においてはControlと比較して0.25-2 mMで $\beta$ -hexosaminidase放出活性の有意な低下が認められた ( $p < 0.05$ )。有機酸・短鎖脂肪酸の脱顆粒抑制効果の強さを求めるため、各サンプルの $\beta$ -hexosaminidase放出活性を50%阻害するIC<sub>50</sub> (Half maximal inhibitory concentration) で評価したところ、吉草酸3.06 mM, イソ吉草酸2.97 mM, 酪酸2.56 mM, イソ酪酸2.65 mM, 酢酸3.28 mM, プロピオン酸7.67 mM, ギ酸5.31 mM, 乳酸3.05 mM, コハク酸1.09 mMであった。各サンプルの $\beta$ -hexosaminidase放出活性の結果から、有機酸・短鎖脂肪酸の抗アレルギー効果の順位付けを行うため、1 mMと5 mMで比較し、吉草酸, イソ吉草酸, 酪酸, イソ酪酸, 酢酸およびコハク酸に絞り、6種類のサンプルを2 mMに調製し、脱顆粒抑制試験を行った。

図2に6種類のサンプル2 mMでの $\beta$ -hexosaminidase放出活性を示す。吉草酸と酪酸, イソ吉草酸とイソ酪酸の間に有意な差は認められなかったが、コハク酸, 酢酸, イソ酪酸とイソ吉草酸, 酪酸と吉草酸の間では有意な差が認められた ( $p < 0.05$ )。このことからコハク酸 > 酢酸 > イソ酪酸 = イソ吉草酸 > 酪酸 = 吉草酸の順に脱顆粒抑制効果が強いことが明らかになった。

### 3-3. 細胞内Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 濃度の測定

図3に抗原刺激後の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に及ぼす有機酸・短鎖脂肪酸の影響を示す。抗原を添加する前を0分とし、抗原添加後1分毎に測定した。すべてのサンプルにおいてControlと比較して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度に有意な差は認められなかったものの、コハク酸と酢酸では細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が低下する傾向がみられた。

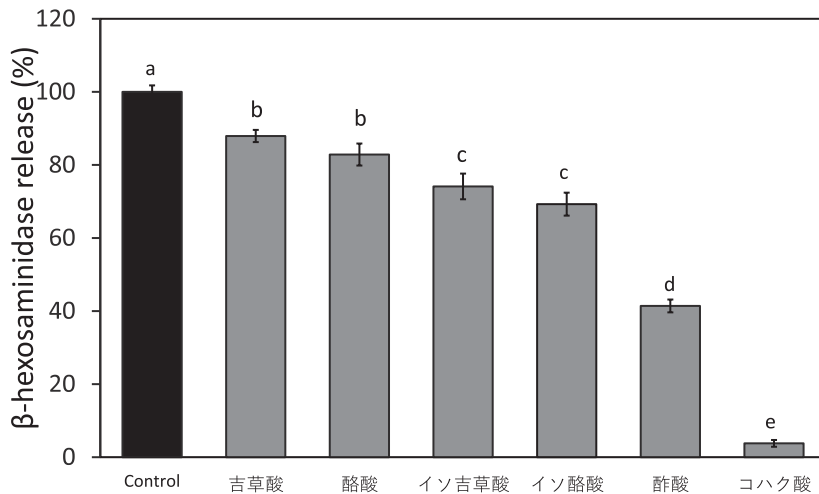


図2. 6種類の有機酸・短鎖脂肪酸がRBL-2H3細胞の $\beta$ -hexosaminidase放出率に及ぼす影響

RBL-2H3細胞を一晩培養し、抗体で感作させた後、サンプルを10分間添加した。抗原で刺激し、上清回収後、基質溶液により発色させ、吸光度を測定し、 $\beta$ -hexosaminidase放出率を算出した。試料はMT緩衝液で希釈し、2 mMとした。データは試料無添加 (Control) を100%とし、相対値の平均 $\pm$ 標準偏差 (n=3) を表す。

異符号間に有意差あり ( $p < 0.05$ )

### 3-4. $\beta$ -hexosaminidase放出率と細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の相関

脱顆粒抑制効果が強かったサンプルの2 mMの $\beta$ -hexosaminidase放出率と抗原添加後1

分の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の相関について検討した(図4)。結果,  $\beta$ -hexosaminidase放出率と細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度には非常に強い正の相関が認められた ( $p < 0.05, R = 0.97$ )。

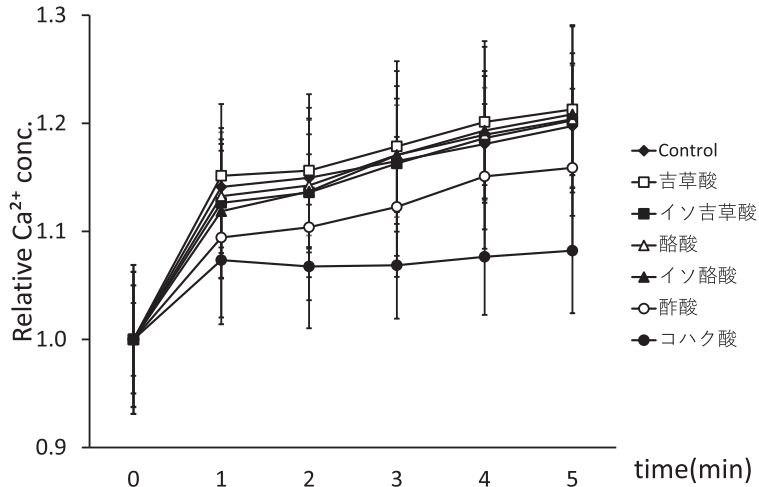


図3. RBL-2H3細胞の抗原刺激後の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に及ぼす有機酸・短鎖脂肪酸の影響

RBL-2H3細胞を一晩培養し, 抗体で感作させた後, 発色試薬で1時間反応させた。サンプルを10分間添加し, 吸光度を測定した後, 抗原を添加し1分毎に吸光度を測定した。抗原添加前を1として, 抗原添加後の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の相対値を算出した。試料は2 mMとなるようMT緩衝液で希釈した。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 ( $n=3$ ) 表す。

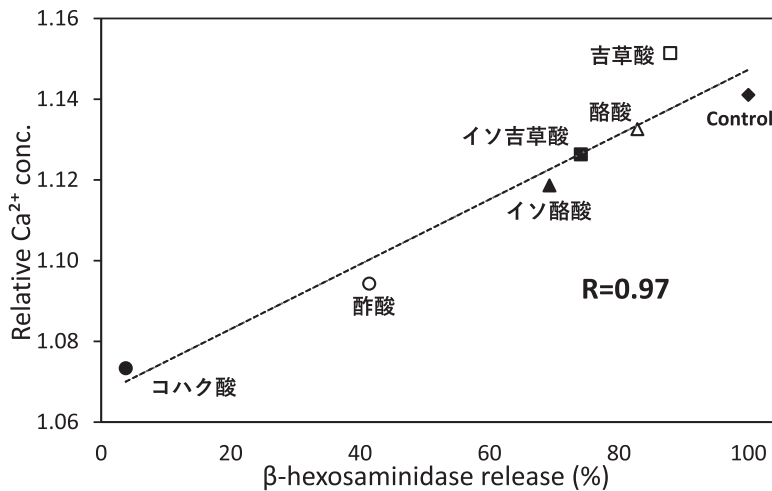


図4.  $\beta$ -hexosaminidase放出率と細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の相関

有機酸・短鎖脂肪酸試料濃度2 mMの $\beta$ -hexosaminidase放出率と添加後1分の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の結果で相関を検討した。

#### 4. 考察

これまで、食品由来のカテキンやフラボノイド等、多数のポリフェノール化合物が抗アレルギー活性を示すことが報告されている<sup>13-16)</sup>が、腸内細菌が作り出す有機酸・短鎖脂肪酸の抗アレルギー効果についてはほとんど報告されていない。腸管免疫系の維持には腸内細菌が重大な役割を担っており<sup>4)</sup>、腸内細菌が産生する代謝産物は腸内環境だけではなく、宿主の免疫応答に有益な効果を発揮する<sup>4, 9)</sup>。腸内細菌によって産生された有機酸・短鎖脂肪酸は大腸から吸収された後、一部が血中に輸送され末梢組織に至ることが明らかとなっている<sup>10-11)</sup>。本研究では、有機酸・短鎖脂肪酸がRBL-2H3の脱顆粒抑制に及ぼす影響について検討した。その結果、有機酸・短鎖脂肪酸の脱顆粒抑制効果とその抑制には細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が関係していることが明らかとなった。

はじめに、脱顆粒抑制試験に使用する有機酸・短鎖脂肪酸の濃度を決定するために細胞生存率を調べた。結果、10 mMのプロピオン酸を除いたすべてのサンプルの添加濃度範囲においてControlと比較して細胞毒性は認められなかった。この結果から脱顆粒抑制評価を行うサンプルの濃度を決定した。脱顆粒抑制試験ではβ-hexosaminidaseを指標として放出活性測定を行った。β-hexosaminidaseは、ヒスタミンと同様に抗原刺激などにより早期に脱顆粒されるため、抗アレルギーの指標として用いられている<sup>17)</sup>。β-hexosaminidase放出活性を調べることで各サンプルの脱顆粒抑制効果の有無について検討したところ、有機酸・短鎖脂肪酸の種類により、脱顆粒抑制に差が見られ、コハク酸>酢酸>イソ酪酸=イソ吉草酸>酪酸=吉草酸の順に脱顆粒抑制効果が強いことが明らかになった。先行研究では、酪酸や吉草酸<sup>18)</sup>、コハク酸<sup>19)</sup>といった

個々の有機酸・短鎖脂肪酸の抗アレルギーが報告されているが、今回の実験結果から有機酸・短鎖脂肪酸の中でもコハク酸が最も脱顆粒抑制効果が強いことが明らかとなった。

Ca<sup>2+</sup>は細胞内シグナル伝達における主要なセカンドメッセンジャーであり、様々な免疫細胞の生理機能に重要な役割を果たす<sup>20)</sup>ことが知られている。アレルゲンが好塩基球およびマスト細胞の細胞表面上のIgEと結合することによりFcεRIが架橋されると、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を経て脱顆粒に至る<sup>21)</sup>。脱顆粒の発生には細胞内Ca<sup>2+</sup>が上昇するCa<sup>2+</sup>依存的な機構と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇しないCa<sup>2+</sup>非依存的な機構がある<sup>12)</sup>。細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の測定を行うことで、有機酸・短鎖脂肪酸の脱顆粒抑制経路を明らかにできると考えた。脱顆粒抑制評価と同じ濃度で、脱顆粒時の有機酸・短鎖脂肪酸の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を測定し、β-hexosaminidase放出活性と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の相関を調べたところ、非常に強い正の相関が認められ、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を抑制したもほど脱顆粒抑制効果が強いことが明らかになった。このことから、有機酸・短鎖脂肪酸はCa<sup>2+</sup>依存的な機構によって脱顆粒を抑制することが示唆された。これまでに、コハク酸を摂取させたアレルギーモデルマウスのアナフィラキシー症状が抑制されるという報告があり、Kim *et al.*はこのアナフィラキシー抑制作用はマスト細胞内のcAMPの増加によりヒスタミンの放出を抑制したためである<sup>19)</sup>と考察している。cAMPによるヒスタミンの遊離作用には小胞体(ER)からのCa<sup>2+</sup>遊離抑制が関与していると言われている<sup>22)</sup>。細胞質内のCa<sup>2+</sup>濃度の上昇には細胞内Ca<sup>2+</sup>の貯蔵庫であるERからの放出と細胞外からのCa<sup>2+</sup>の流入といった主に2つの経路が存在する<sup>18)</sup>。本研究ではどちらの経路によるCa<sup>2+</sup>の上昇を抑制したのかは明らかにできなかった



が、コハク酸を含む抗アレルギー効果の認められた有機酸・短鎖脂肪酸には $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇抑制が関係していることが推測された。

ヒト体内での短鎖脂肪酸濃度は、主な産生部位である近位結腸では酢酸69 mmol/L、プロピオン酸25 mmol/L、酪酸26 mmol/Lであるが、末梢血にはわずかししか短鎖脂肪酸が輸送されないため、酢酸0.070 mmol/L、プロピオン酸0.005 mmol/L、酪酸0.004 mmol/Lと末梢血での濃度は低い<sup>4)</sup>。このことから、本研究で脱顆粒抑制効果が認められた有機酸・短鎖脂肪酸の濃度は、体内における濃度より高いと考えられる。一方、今回の研究デザインは、腸内細菌が産生する有機酸・短鎖脂肪酸の影響を検討したが、有機酸・短鎖脂肪酸は経口摂取も可能であり、小腸などから取り込まれ、抗アレルギー効果を発揮することも十分に考えられる。有機酸・短鎖脂肪酸の受容体としてGタンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor: GPR)であるGPR41やGPR43, GPR109Aなどが報告されており、免疫細胞にはGRP43, GRP109Aが発現している<sup>23,24)</sup>。本研究では明らかにできなかったが、有機酸・短鎖脂肪酸は短鎖脂肪酸受容体を介してRBL-2H3細胞に作用し、受容体の発現量の違いや取り込まれやすさによって作用に差が出たのではないかと考えられる。

結論として、RBL-2H3細胞を用いて9種類の有機酸・短鎖脂肪酸(乳酸, コハク酸, ギ酸, 吉草酸, イソ吉草酸, 酪酸, イソ酪酸, 酢酸およびプロピオン酸)の抗アレルギー効果を検討した。脱顆粒抑制活性を指標とした抗アレルギー評価を行ったところ、有機酸・短鎖脂肪酸の種類により、脱顆粒抑制活性が異なった。脱顆粒抑制活性が強かった6サンプルに絞って同濃度で比較した結果、コハク酸>酢酸>イソ酪酸=イソ吉草酸>酪酸=吉草酸の順に強いことが明らかとなった。有機

酸・短鎖脂肪酸の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を評価し、脱顆粒抑制活性との相関性を調べたところ、非常に強い正の相関が認められた( $p < 0.05$ ,  $R = 0.97$ )。以上の結果から有機酸・短鎖脂肪酸の抗アレルギー効果には細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が関係していることが示唆された。

## 5. 参考文献

- 1) 厚生労働省. アレルギー疾患の現状等. <https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10905100-Kenkoukyoku-Ganshippeitaisakuka/0000111693.pdf> (2023年11月3日閲覧)。
- 2) 岡庭豊 (2017) 病気が見える免疫・膠原病・感染症・第1版. p 32-34. 株式会社メディックメディア, 東京。
- 3) 小林彰子, 渡辺純, 田辺創一 (2003) アレルギー腸管透過抑制の評価系構築と活性成分<論説・解説>. *New Food Industry*. **45**(9): 33
- 4) 南久則 (2018) 消化管からみた健康・栄養. p5, p244-55. 株式会社建帛社, 東京。
- 5) 大島茂, 渡辺守 (2015) 腸管免疫と腸内細菌の密接な関わり合い. *日本内科学雑誌*. **104**(1): 81-85
- 6) 池田義雄 (2009) ルミナコイドの保健機能と応用 - 食物繊維を超えて -. p243-244. 株式会社シーエムシー出版, 東京。
- 7) Taniuchi S, Hattori K, Yamamoto A, *et al.* (2005) Administration of Bifidobacterium to Infants with Atopic Dermatitis: Changes in Fecal Microflora and Clinical Symptoms. *J Appl Res*. **5**(2): 387-396.
- 8) B Bjorksten, E Sepp, K Julge, T Voor, *et al.* (2001) Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J. Allergy Clin. Immunol*. **108**(4): 516-520.
- 9) 光岡知足 (1994) 腸内フローラと食餌. p2-3. 学会出版センター, 東京。
- 10) 坂田隆, 市川宏文 (1997) 短鎖脂肪酸の生理活性. *日本油化学会誌*. **46**(10): 143-254.
- 11) 原健次 (2000) 生理活性脂質短鎖脂肪酸の生化学と応用. p49-51. 株式会社幸書房, 東京。
- 12) 西田圭吾 (2012) マスト細胞依存的なアレルギー応答におけるアダプター分子のGab2の役割. *日本薬理学雑誌*. **133**(4): 413-418.

ラット好塩基球様細胞株RBL-2H3の脱顆粒に及ぼす有機酸・短鎖脂肪酸の影響と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の関係 (横山さや香ほか)

- 13) 田中守, 鈴木大進, 吉本好延, 香西はな, 岡本威明 (2016) 3種in vitro評価系を用いたポリフェノールの抗アレルギー活性評価について. 高知県立大学紀要 健康栄養学部編. **66** : 1-9.
- 14) Maeda-Yamamoto M, Inagaki N, Kitaura J, *et al.* (2004) O-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells. *J Immunol.* **172**(7): 4486-4492.
- 15) 小砂 憲一 (1994) シソの抗アレルギー成分について. 日本化粧品技術者会誌. **27**(4) : 604-607.
- 16) Kanda T, Akiyama H, Yanagida A, *et al.* (1998) Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* **62**(7): 1284-1289.
- 17) 高野克彦 (2009) 肥満細胞からの炎症メディエータ放出抑制物質探索に関する基礎研究. 北陸大学紀要. **33** : 23-30.
- 18) K Nagata, D Ando, T Ashikari *et al.* (2024) Butyrate, valerate, and niacin ameliorate anaphylaxis by suppressing IgE-dependent mast cell activation: Roles of GPR109A, PGE<sub>2</sub>, and epigenetic regulation. *J. Immunol.* **212**(5): 771-784.
- 19) Kim HM, Jung HS, Shin HY, *et al.* (1999) Inhibition of mast cell-dependent anaphylaxis by succinic acid. *Pharmacol Toxicol.* **84**(4): 154-158.
- 20) 馬場義裕 (2011) 免疫細胞におけるストア作動性カルシウム流入の役割. 日本薬理学雑誌. **137** : 202-206.
- 21) 川崎梓, 原崇, 城斗志夫 (2014) RBL-2H3細胞およびラット腹腔浸出細胞に対するL-アミノ酪酸のヒスタミン遊離抑制作用. 日本食品科学工学誌. **61**(8) : 362-366.
- 22) 田坂賢二 (1991) ヒスタミン遊離をめぐる最近の展開. 日本薬理学雑誌. **98** : 197-207.
- 23) 三好 真琴, 宇佐美 眞, 藤原 麻有 (2013) 腸内細菌と脂質代謝. 静脈経腸栄. **28**(4) : 915-921.
- 24) 小澤 健 (2016) 短鎖脂肪酸受容体. アレルギー. **65**(9) : 1230-1230.