

# ハスカップ抽出物の肥満細胞における脱顆粒抑制作用に関する研究

若生 豊\*

## 要 旨

ハスカップ抽出物の抗アレルギー作用についてラット肥満細胞 (RBL-2H3) の脱顆粒抑制作用により検討した。ハスカップ抽出物を HPLC 分析した結果, 成分のほとんどは cyanidin-3-O- $\beta$ -D-glucoside (C3G) であることが示唆された。ハスカップ抽出物は抗アレルギー作用を示したが, 抽出物中の C3G は消化過程でシアニジンやその分解物に代謝物されることが知られている。ハスカップ由来のどのような成分が抗アレルギー作用を示すかを知る目的から, C3G の粗精製試料とシアニジンが生成されているその加水分解試料の脱顆粒抑制作用を測定し比較した。加水分解試料の方が C3G の粗精製試料と比べ, より高い脱顆粒抑制作用を示し, これらの結果よりハスカップを摂取した際に抗アレルギー作用を発揮する成分はシアニジンである可能性が示唆された。

キーワード: ハスカップ, 抗アレルギー作用, シアニジン-3-グルコシド, RBL-2H3,  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ

## Inhibitory Effect of Haskap Extracts on Antigen-induced Degranulation in Rat Basophilic Leukemia Cell Line RBL-2H3

Yutaka WAKO \*

## ABSTRACT

In this study, we investigated the inhibitory effect of Haskap extracts, on the release of  $\beta$ -hexosaminidase, as a marker of degranulation of RBL-2H3 cells. HPLC profile of extract showed that the main constituent of which is cyanidin-3-O- $\beta$ -D-glucoside (C3G). Haskap extracts, exhibits an anti-allergic effect, and administered C3G is metabolized to cyanidin and other degradation product. To understanding the anti-allergic constituent, we measured the inhibitory activity of partial purified C3G and its hydrolyzate in which cyanidin contained. Hydrolyzate showed more potent inhibition than partial purified C3G. These results suggest that cyanidin is a genuinely active constituent which is accountable for the oral effects of Haskap.

**Keywords** : Haskap, anti-allergic effect, cyanidin-3-O- $\beta$ -D-glucoside, RBL-2H3,  $\beta$ -hexosaminidase

## 1. 緒 言

アレルギー性疾患の患者数は増加傾向が続き、最近では5人に1人は花粉症、食物アレルギー、蕁麻疹、アレルギー喘息や鼻炎など、何らかのアレルギー性疾患を持つとさえ言われている。患者が増加した原因には環境汚染、住居の気密化、ストレスなどが考えられている。

アレルギーは1906年にオーストリアの小児科医ピルケによって提唱され、その後、1966年に石坂公成・照子によってアレルギー症状の起こるメカニズムが医学的に解明された。アレルギーはCoombsとGell<sup>1)</sup>によってI-IV型の4つに分類され、そのうち主たるものはI型アレルギー反応であり、花粉症、アレルギー喘息等のアレルギー性疾患はI型アレルギー反応に属する。I型アレルギー反応の機序として、特定の抗原に感作されたマスト細胞上に外来抗原が反応することによりIgE抗体が架橋を受け、続いて起こる反応によって最終的に脱顆粒が起こり、放出されたヒスタミンや生成されるロイコトリエンによって炎症が惹起されることが知られている(即時相)。近年、I型アレルギーに関する研究が進み、脱顆粒の後にマスト細胞から放出される各種炎症性サイトカイン(TNF, IL-3,4,5,6)がTh2細胞や好酸球を活性化させ、それが抗原暴露から6時間以上経過した後に発現する炎症(遅発相)の原因となっていることが明らかにされつつある<sup>2)</sup>。したがって、肥満細胞はアレルギー予防・治療の重要な標的のひとつとされ、脱顆粒抑制薬はアレルギーに対する治療薬の主要なものである。この中でクロモグリク酸ナトリウム、トラニラスト、アンレキサノクスなどは天然物から単離された成分をリード化合物として創製された医薬品である。最近ではキク科植物由来フラボノイド類、およびショウガ科植物由来フェニルプロパノイド類の脱顆粒抑制効果が確認され、今後さらなる詳細な構造活性相関や作用機序の解明などを経て医薬品へ応用されることが期待されている<sup>3), 4)</sup>。

本研究は花粉症改善にハスカップが有効であるとの体験談が寄せられたことに基づき、ハスカップ成分の有効性を検証することを目的として企てられたものである。

ハスカップ(Haskap)は、スイカズラ科に属する1~2mの落葉低木で、*Lonicera caerulea* L. var. *emphyllocaryx* Nakai(和名:クロミノウグイスカズラ)と*L.caerulea* L. var. *edulis*(和名:ケヨノミ)の総称である。ハスカップは5月頃開花し、1カ月後に成熟し1.0~1.5cmほどの円形、長円形、紡錘形など多様な形状をした青紫色の果実となる。一般的には、紡錘形が多い(Fig.1)。ハスカップは、北海道の東胆振地域に広がる勇払原野や羊蹄山、夕張岳などの高山帯に自生しており、一般に原野などの低地ではクロミノウグイスカズラが多く、高山帯ではケヨノミが多い。北海道以外に、国外では千島、サハリン、朝鮮半島、中国東北部、東シベリアなどに分布している。北海道の先住民であるアイヌ

民族が、その果実を採取し、利用していたことから、その名称は、胆振地方のアイヌ語で「木の上にたくさんなるもの」という意味の「ハシカプ」に由来するといわれている。耐寒性に優れているが、耐暑性は低い。美唄市が全道一のハスカップ産地であり、千歳、苫小牧などでも栽培されており、本州では、青森(岩木山麓)、長野、岩手、新潟でも栽培が行われているが、本州の平地での栽培は困難とされている。



Fig.1 *Lonicera caerulea* L. var. *emphyllocaryx* Nakai

ハスカップはブルーベリー等と類縁の果実であり、その有効成分の主体は赤、青、紫系統の色素のアントシアニンであり、フラバン骨格を持ったフラボノイド系ファイトケミカルである。フラボノイドについては1990年代に始まった疫学調査を端緒として、その疾病予防効果が注目され多くの知見が得られている。試験管レベルのラジカル消去活性、抗変異原性、抗腫瘍作用、抗炎症作用や、動物実験によるがんリスク低減作用、動脈硬化リスク低減作用、脂質代謝改善作用、記憶学習能向上作用、アレルギー炎症低減化作用などが認められることが明らかになっている。これらの生理機能の基盤となるフラボノイドの共通した特性は化学面ではフェノール性水酸基による還元性であり、物理面では疎水性平面構造である。フェノール性水酸基は強い水素(電子)供与性すなわち還元性を有するため、さまざまなラジカル種に水素原子あるいは電子を供与して安定化し、いわゆるラジカル補足作用を示す。一方フラボノイドは疎水性であり、その平面構造のために生体膜と相互作用を示し、あるいは膜内へ局在分布している。従って細胞質や核内レセプターと結合し様々な生理機能を発揮していることが明らかにされている。アントシアニンの抗アレルギー作用についても、シアニジンがマスト細胞の細胞膜へ作用し、 $Ca^{2+}$ の流入を制御し肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制していると推測されている。しかしながら、これらの化学的特性や物理的特性は水酸基の結合位置や二重結合の有無、配糖体とアグリコンの別、糖の種類や結合位置により様々に変化する。

ハスカップのアントシアニン関するこれまでの研究より、その大部分は、シアニジン-3-グルコシドであるこ

とが知られている。その他には、シアニジンジグルコシドなどが認められており、アントシアニン以外の低分子ポリフェノールとしては、クロロゲン酸が多く、(+)カテキン、プロシアニジン B1、没食子酸などが同定されている。A. Chaovanalkit ら<sup>5)</sup>は、主要アントシアニンのシアニジン-3-グルコシド以外に、シアニジン-3-ルチノシド、シアニジン-3,5-ジグルコシド、ペラルゴニジン-3-グルコシド、ペオニジン-3-グルコシド、ペオニジン-3-ルチノシド、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、ケルセチン-3-ルチノシドとケルセチン-3-グルコシドを同定している。

本研究では、前述のように花粉症改善にハスカップが有効であるとの体験談が寄せられたことに基づき、ハスカップ成分の有効性を確認することを目的とし、ハスカップ成分の分析と肥満細胞の脱顆粒抑制作用よりその有効性を考察した。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 材料

ハスカップは生産されている方より直接提供頂いたものを使用した。ラット好塩基球様細胞株 RBL2H3 (以下 RBL-2H3) は (独) 医薬基盤研究所培養資源研究室・JCRB 細胞バンクより購入した。牛胎仔血清 (FBS) および培養液 (Dulbecco's modified Eagle's medium ;DMEM) は Gibco (Grand Island, NY) より購入した。抗 DNP-IgE 抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA) より購入した。DNP-labeled human serumalbumin は Sigma (Grand Island, NY) より購入した。さらに抗酸化能測定試薬 (SOD Assay Kit-WST) は Dojindo (Tabaru, Japan) より購入した。

### 2.2 試料の調製と配糖体からのアグリコンの調製

ハスカップを凍結乾燥後、3 倍量の 80% メタノールで加熱抽出、減圧濃縮により溶媒を除き濃縮し試料とした。抽出液の乾燥重量を測定し、重量濃度 10mg/ml となるように濃度調整し、分注して使用時まで -80℃ で保存した。また、一部の試料を水で平衡化した疎水性樹脂 HP20 のカラム乗せ、非吸着の水溶性成分を水で除いた後、80% メタノールで溶出した部分を回収し粗フラボノイド画分を調製した。また、酸加水分解によりアグリコンの調製を行った。試料溶液中の塩酸濃度を 1M の濃度に調整し 85℃ で 30 分間加水分解し、反応後中和した。

### 2.3 HPLC によるフラボノイドの分析

HPLC (高速液体クロマトグラフィー) は島津製作所の LC-9 を用いた。カラムは ODS 樹脂の TSKgel ODS-120T (4.6 × 250mm, Tosoh) を使い、流速は 0.8 ml/min とした。溶出条件は、0.1% ギ酸を含む水および 0.6% ギ酸アセトニトリルの水-アセトニトリルによる二液グ

ラジェント溶出を行った。検出は波長 515nm の紫外吸収により観察した。

### 2.4 スーパーオキシドラジカル消去活性

市販のキット (SOD Assay Kit-WST) を利用し NBT 法ホルマザンを WST-1 ホルマザンに置き換えた改良法に従った。キサンチン - キサンチンオキシダーゼをスーパーオキシド生成系とし、WST-1 ホルマザンのスーパーオキシドによる還元反応で生じる発色を測定した。消去活性 (阻害活性) は、スーパーオキシド生成系に試料を加えた群 (sample)、スーパーオキシド生成系のみからなる群 (blank1)、キサンチンと試料からなる群 (blank2)、キサンチンのみからなる群 (blank3) の各反応系の吸光度測定結果より、次に示す式に従い求めた。試料は 80% エタノール溶液に溶解し調製した。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{[(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})]}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

### 2.5 細胞培養と脱顆粒抑制活性の測定

脱顆粒抑制活性は、脱顆粒中の酵素  $\beta$ -hexosaminidase の放出阻害活性で評価した。ラット好塩基球様細胞株 RBL2H3 は 10% ウシ胎児血清を含む Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM, Sigma) で継代培養した。24 ウエルマイクロプレートに  $2.5 \times 10^5$  cells/well で細胞を播種し、一晚培養した。50ng/ml の抗 DNP-IgE 抗体 (Sigma) を添加 2 時間培養後、細胞を 1.5ml の Modified Tyrode (MT) buffer (137mmol/l NaCl, 2.7mmol/l KCl, 1.8mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 1mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 5.6mmol/l glucose, 20mmol/l HEPES, 0.1% BSA, pH6.8) で 2 回洗浄した。MT buffer で溶解したサンプルを添加し 10 分間反応後、50ng/ml の DNP-labeled human serum albumin (Sigma) を加え、さらに 30 分間反応させた。サンプルを含まない MT buffer を添加し同様に反応させたものをコントロールとした。培養上清を回収後、細胞を 0.1% Triton X-100/MT buffer 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 ウエルプレートに移し、37℃ で 5 分間加温後、50 $\mu$ l の 0.1mol/l citrate buffer, pH4.5 に溶解した 3.3 mmol/l p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside を加え、37℃ で 25 分間反応させた。反応溶液に 100 $\mu$ l の 2.0mol/l glycine buffer, pH 10.4 を加えて反応を停止後、プレートリーダーで 415 nm の吸光度を測定した。 $\beta$ -hexosaminidase 放出率を以下の式

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



により求め、コントロールの  $\beta$ -hexosaminidase 放出率を 100% として、サンプルの  $\beta$ -hexosaminidase 放出阻害活性を計算した。測定は酵素反応が吸光度と直線関係にある範囲で行った。サンプルは RBL-2H3 の細胞溶解液を用い、 $\beta$ -hexosaminase 阻害率の酵素活性を直接阻害しない濃度を検討し、試験に使用した。

### 3. 実験結果

#### 3.1 ハスカップフラボノイドの HPLC 観察

本研究ではハスカップに抗アレルギー成分が含まれているかを明らかにすることを目的としており、初めにハスカップ抽出液中のポリフェノールの成分について HPLC により確認を行なった。ハスカップの粗フラボノイド試料を逆相 HPLC 分析に付し、515 nm で観察したクロマトグラムを Fig.1 a に示した。ハスカップのフラボノイドの 80% 程度は Cyanidin-3-glucoside から成ることが知られており、ピーク面積比率が約 70% を占めている保持時間約 16.3 分のピークをそれと判断した。

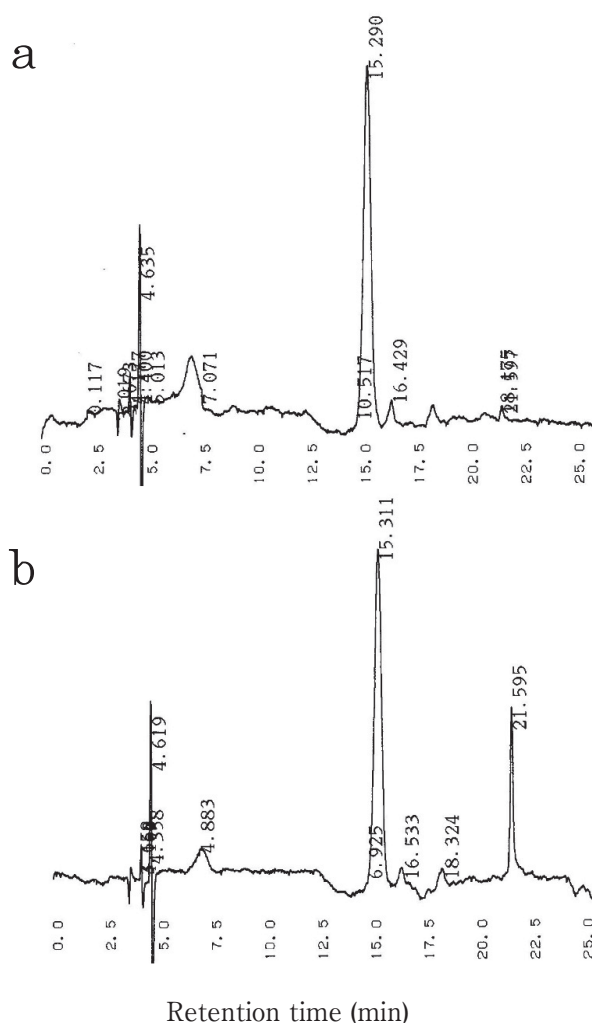


Fig.2 HPLC profiles of Hascap extracts with TSKgel 120T column monitored at 515nm. Untreated Hascap extracts (a) and its hydrolyzate (b). Cyanidin-3-glucoside (RT:15.3min), Cyanidin (RT:21.6min).

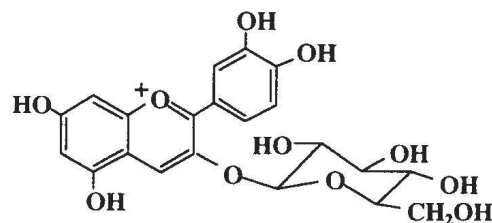


Fig.3 Structure of Cyanidin-3-glucoside

また、保持時間 6～7 分に認められるピークは流出位置よりハスカップに含まれるとされるクロロゲン酸、あるいはカテキンと考えられた。Cyanidin-3-glucoside のピークの後方には保持時間約 16 分や 18 分の小さなピークが観察され、これらは糖の結合部位の異なる Cyanidin 配糖体であることが考えられた。

フラボノイドの体内への吸収や生理活性の発現では、糖を持たないアグリコンやグルクロン酸等の抱合体の形状のフラボノイドが関わりとされている。そこで、ハスカップの粗フラボノイド画分よりアグリコンの調製を試み、粗フラボノイド画分を加水分解し、そのクロマトグラムを未処理試料と比較した (Fig.1 b)。保持時間 21.6 分のピークの面積比は 2% から 15.6% と著しく増大していることから、このピークを Cyanidin に由来するピークと推定し、アグリコンが生じているものと判断した。

#### 3.2 ハスカップフラボノイドの脱顆粒抑制活性

$\beta$ -hexosaminidase は、マスト細胞の顆粒中に豊富に存在し、アレルギー反応においてはマスト細胞が活性化され、ヒスタミンのような化学伝達物質とともに放出されることから、マスト細胞の脱顆粒現象を把握する適当な評価法として広く用いられている。本研究においては継代の可能なマスト細胞の系統である RBL-2H3 を用い、

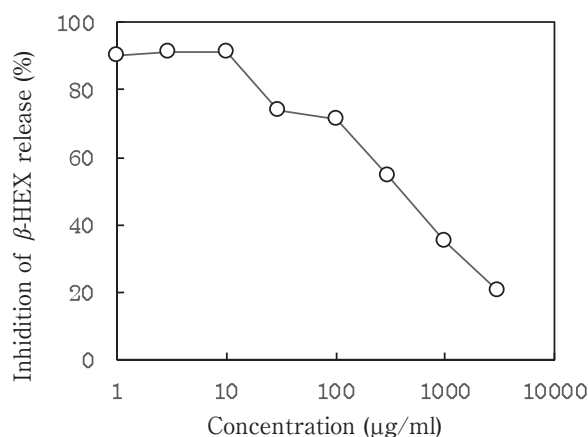


Fig.4 Inhibitory effect of Hascap extracts on  $\beta$ -hexosaminidase release from the RBL-2H3 cells. Cells were treated with 1-3000  $\mu$ g/ml of extracts. Results are means of two experiments.

放出される  $\beta$ -hexosaminidase の酵素活性を測定することにより、放出抑制作用の評価を行った。ハスカップのメタノール抽出物の抑制効果を濃度 1 ~ 3000  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で検討し、その結果を Fig.4 に示した。酵素の放出活性は対象と比較して 30 $\mu\text{g/ml}$  から低下が認められ、容量作用に従い低下し 3000 $\mu\text{g/ml}$  では 20%まで抑制したが、抑制効果の現れ方は緩慢で、300 $\mu\text{g/ml}$  の濃度においても抑制は 54%に過ぎず、その効果は限られたものと考えられた。

### 3.3 配糖体およびアグリコンの脱顆粒抑制活性と抗酸化活性

一般に体内のフラボノイドの生理的濃度は数  $\mu\text{M}$  ~ 数十  $\mu\text{M}$  程度とされ、またほとんどが抱合体として存在する。抱合体は疎水性が低く細胞内には取り込まれにくい。従ってフラボノイドの生理作用を検討する際は、濃度と存在形状を考慮し調べる必要がある。ハスカップ抽出液の脱顆粒抑制活性は前節 3.2 に示したように、活性は認められるもののその効力、いわゆる比活性は低く生体内の存在量では効果は期待できない結果であった。そこで次に、ハスカップの粗フラボノイド画分とそれを酸加水分解しアグリコンを含む試料を調製し、それらの脱顆粒抑制作用を検討し、その結果を Fig.5 に示した。未処理の粗フラボノイド画分では 100 $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で作用が認められたのに対し、加水分解試料では 30 $\mu\text{g/ml}$  から低下が認められ脱顆粒抑制活性  $\text{IC}_{50}$  は約 100 $\mu\text{g/ml}$  程度であった。アグリコンである Cyanidin 自体の  $\text{IC}_{50}$  を明らかにすることは出来なかったが、procyanidin の多量体で約 40 $\mu\text{g/ml}$  ~ 60 $\mu\text{g/ml}$  と報告されている。ハスカップの加水分解試料では HPLC 分析より アグリコンの存在量はピークの面積比から推測し 15%程度と見積もられるので、Cyanidin の  $\text{IC}_{50}$  は、procyanidin と同程度の値を示すものと考えられた。

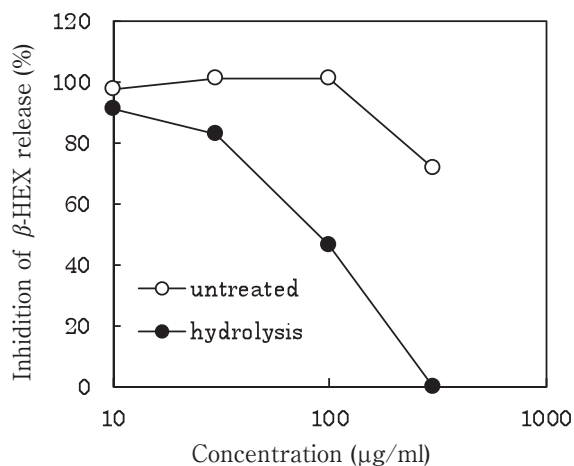


Fig.5 Comparison of inhibitory effect on  $\beta$ -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells between treated with Hascap extracts (○) and its hydro-lyzate (●). Results are means of two experiments.

ハスカップの主なフラボノイドである Cyanidin-3-glucoside は強い抗酸化作用が知られている。脱顆粒抑制作用に対する抗酸化作用の関わりについては知見が無いが、抗酸化作用の顕著な成分が脱顆粒抑制作用を示している例もあり、今回調製したハスカップの粗フラボノイド試料およびその加水分解処理を行った試料について、スーパーオキシドラジカル消去作用による抗酸化活性を調べ、その結果を Fig.6 に示した。試料濃度濃度 0.1 ~ 1000  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で検討した結果、未処理および加水分解処理した試料の間に全く差は認められず、脱顆粒抑制作用で見られたような効果の違いは観察されないことから、抗酸化作用と脱顆粒抑制作用はパラレルな関係には無いことが示唆された。また、 $\text{IC}_{50}$  値は両者とも概ね 30  $\mu\text{g/ml}$  程度と考えられた。

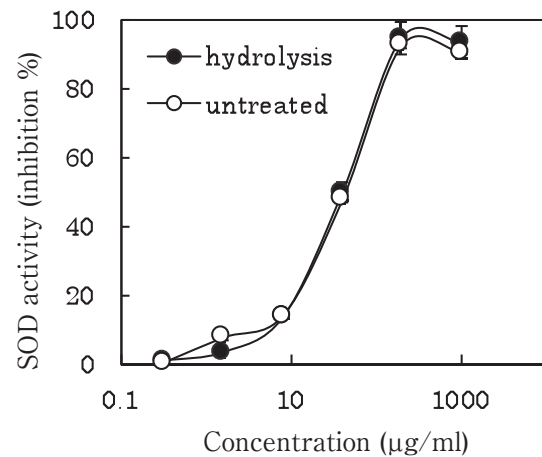


Fig.6 Comparison of superoxide radical scavenging activity between Hascap extracts (○) and its hydro-lyzate (●). Results are means S.E. from three experiments.

## 4. 考察

花粉症の有病率は全国で 20%を超え約 2400 万人の有病者がいるとされ、花粉の飛散期間は多くの国民が悩まされている<sup>6)</sup>。また、植物種子が稔る秋口から初冬の時期もこれらを原因とするアレルゲンが飛散し欧米で“bean fever”と称せられるアレルギー症状を示す人も多い。膨大な人数の有病者が存在する現状では、全員が医療機関の診療を受けることには限界があり、症状の軽度な場合容易に取り入れられる有効な対策を見出すことは大いに意義のあることと考えられる。食品のアレルギー改善効果についても研究がなされており現在、甜茶や菊花などに効果のあることが知られている。本研究は花粉症改善にハスカップが有効であるとの体験談が寄せられたことに基づき、ハスカップ成分の有効性を確認することを目的とし、ハスカップ成分の分析と肥満細胞の脱顆粒抑制作用より有効性を考察した。

ハスカップはブルーベリー等と類縁の果実であり、有

効成分の主体はアントシアニンである<sup>7)</sup>。ハスカップのメタノール抽出物の逆相 HPLC 分析結果より、従来報告があるように Cyanidin-3-glucoside がフラボノイドの大半を占めていることを確認した。健康食品で広く利用されているブルーベリーは数種類のアントシアニンより構成されていて、成分組成上に違いがある。Cyanidin-3-glucoside については複数の生理作用が知られ報告されており、抗アレルギー作用の報告も成されているが<sup>8)</sup>、本研究でもハスカップの抽出物について、その作用の力価を試験管内の脱顆粒抑制活性の評価より考察を試みた。メタノール抽出物の抑制活性の IC<sub>50</sub> 値は概ね 300 µg/ml 程度であり (Fig.1), 粗フラボノイド画分とした試料ではさらに大きな値となっている (Fig.1)。しかし、これらは食品中に配糖体としての形態で存在している際の値であり、生体内では配糖体が外れたアグリコンとして作用していることが予想されることより、アグリコンの抑制活性を推察する目的で、一部がアグリコンへ分解された試料の活性を調べ、IC<sub>50</sub> は配糖体と比べ大幅に低下し (約 100µg/ml) アグリコンの比活性は高いことが示唆されて。Cyanidin の IC<sub>50</sub> は実測に至っていないが、数 µg ~ 数十 µg/ml 程度と考えられる。一方、体内ではフラボノイドは抱合体として存在しているが、アントシアニン類は他のフラボノイドと異なり、糖が外れると開環して分解し、アグリコンもその抱合体も体内には存在せず、ごく一部が配糖体のままで取り込まれるとする報告がある<sup>9)</sup>。従って、アントシアニン類の作用発現機構の詳細は未だ明らかにされていないが、食べ続けたり、一度に多量に摂取すると、目や皮膚などの抹消組織に蓄積し、例えば目の網膜では蓄積したアントシアニンが抗酸化的にロドプシンの変性を抑えると推測されている。肥満細胞への作用も同様に起きていることが考えられる。

アントシアニンは強い抗酸化作用が知られており、抗酸化能が生理作用の原理となっている場合も多い。ハスカップの主なフラボノイドである Cyanidin-3-glucoside の脱顆粒抑制作用に対する抗酸化作用の関わりについての知見は無いが、抗酸化作用の顕著な成分が脱顆粒抑制作用を示している例もあり、ハスカップの粗フラボノイド試料およびその加水分解処理を行った試料について、スーパーオキシドラジカル消去作用による抗酸化活性を調べた (Fig.6)。未処理および加水分解処理した試料の

間に全く差は認められず、脱顆粒抑制作用で見られたような効果の違いは観察されないことから、抗酸化作用と脱顆粒抑制作用はパラレルな関係には無いことが示唆された。脱顆粒抑制作用はマスト細胞の膜の安定化、すなわち、細胞内への Ca<sup>2+</sup> の流入阻害や細胞内 Ca<sup>2+</sup> ストアからの Ca<sup>2+</sup> 遊離の阻害によるイオンの制御がその仕組みと考えられていて、ここでは抗酸化作用以外の働きも介在していることが示唆された。

以上のことより、アグリコンであるシアニジンおよびその配糖体の脱顆粒抑制作用の力価 IC<sub>50</sub> は、シアニジンでは数 µg ~ 数十 µg/ml 程度であり、配糖体ではそれより 1 オーダー以上弱く、フラボノイドの一般的な生理的体内存在量を考慮すると、粘膜組織に蓄積したハスカップのアントシアニンが何らかの仕組みでアグリコンとなりマスト細胞に作用し脱顆粒を抑制していることが考えられた。今後シアニジンの生体内への吸収・代謝の動態や作用発現機序がより詳細に明らかにされることが期待される。

## 5. 参考文献

- 1) Coombs R. R. A., Gell P.G.H., Edited by Gell P. G. H. and Coombs R. R. A., p575, Blackwell Scientific Publication, Oxford (1968).
- 2) Kaplan A. P., Kuna P.: *Allergy*, 53, 27-32 (1998);
- 3) H.Matsuda., T.Morikawa. et al.: *Med.Chem.*10:3123-3128 (2002)
- 4) H.Matsuda., T.Morikawa. et al.: *Bioorg.Med.Chem. Lett.* 13: 3197-3202 (2003)
- 5) Chaovanalkit, A. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 52, 848-852 (2004).
- 6) 吉田博一, 清水宏明, 他, : アレルギー, 45, 49-61 (1996).
- 7) 佐藤充克. アントシアニン—食品の色と健康、建帛社、p. 106-123 (2000).
- 8) C. T. Aliment., : *Campinas* : 32, 43-46 (2012)
- 9) S.Passamonti, U.Vrhovsek, et al.: *FEBS Lett.*, 544, 210-213 (2003).