

各種抗酸化剤のマウス接触皮膚炎抑制作用

芳野恭士*、宮内佑子

沼津工業高等専門学校 物質工学科 (〒410-8501 沼津市大岡 3600)

*k-yoshino@numazu-ct.ac.jp

Preventive Effects of Various Antioxidants on Mouse Contact Dermatitis

Kyoji YOSHINO, Yuko MIYAUCHI

Numazu College of Technology (3600 Ooka, Numazu, Shizuoka 410-8501, Japan)

(Received July 30, 2007; Accepted September 4, 2007)

Abstract

The preventive effects of 10 phenolic compounds and 9 non-phenolic antioxidants on mouse contact dermatitis were investigated using an animal disease model of oxazolone-induced mouse ear edema in this study. With percutaneous administration of phenolic compounds at the challenge at a dose of 0.13 mg/ear, the anti-contact dermatitis activities were significantly correlated with the Fe^{2+} -chelating activities but not with the $\text{O}_2^{\cdot -}$ -scavenging activities. In particular, compounds having galloyl moieties in their chemical structures, such as (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate, and 1,2,3,4,6-pentagalloyl glucose, showed strong anti-contact dermatitis activities and Fe^{2+} -chelating activities. Among non-phenolic antioxidants, iron-chelators, hydroxyl radical-scavengers, and a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor showed significant anti-contact dermatitis activities in mice. Administration of iron (III) chloride inversely enhanced mouse contact dermatitis. The percutaneous administration of non-phenolic iron-chelators and (-)-epigallocatechin gallate also showed significant anti-inflammatory activities in a mouse model of arachidonic acid-induced ear edema. Therefore, the iron-chelating activities of some phenolic and non-phenolic compounds are thought to be extremely effective for the prevention of the inflammation caused by oxazolone-induced contact dermatitis in mice.

Keywords: Phenolic compound, Antioxidative activity, Mouse, Contact dermatitis

1. 緒言

近年、アレルギー疾患が急増して大きな社会問題となっており、その背景には環境や生活習慣の変化などがあるものと考えられる[1]。アレルギー反応は、その発症のメカニズムにより I～IV型に分類される[2]。このうち、I型～III型は即時型ア

レルギーと呼ばれ、抗体（イムノグロブリン, Ig）を介して引き起こされる体液性免疫応答である。I型アレルギー反応は、IgEによって起こるもので、気管支喘息やアレルギー性鼻炎で知られている。II型アレルギー反応は、IgMまたはIgGによる細胞溶解反応を起こすもので、溶血性貧血や重症筋

無力症で知られている。III型アレルギー反応は、IgGと抗原の複合体によって起こるもので、急性糸球体腎炎や関節リウマチで知られている。これらに対し、アレルゲンの暴露から発症までが24時間程度と長いIV型アレルギーは、遅延型過敏症として知られている。ツベルクリン反応や結核病変、リウマチ性関節炎、膠原病、うるしや化粧品等で起こる接触皮膚炎などがこれに含まれる。

IV型アレルギーは、リンパ球の一種である1型ヘルパーT細胞が産生する炎症性サイトカインによって引き起こされる、細胞性免疫応答である。IV型アレルギーにおける組織傷害では、各種サイトカインによるT細胞やマクロファージの活性化で起こる炎症が重要な過程と考えられる。炎症時には、マクロファージ等により、スーパーオキシドアニオンラジカル($O_2^{\cdot-}$)やNOといった活性酸素が過剰に産生され、周囲の細胞が傷害される他、細胞外マトリックスであるヒアルロン酸の分解も起こる。また、活性酸素やラジカルは、さらに、過酸化脂質やアラキドン酸代謝物を介して炎症を促進するものと考えられる [3]。茶葉カテキンを含む種々の植物性フェノール化合物には、強い抗酸化作用が認められ [4]、炎症時の活性酸素の生成を抑制することが報告されている [5,6]。また、炎症時のヒアルロン酸の分解も、種々のラジカルスカベンジャーで抑制される [7]。従って、抗酸化物質は、IV型アレルギーにおける炎症を抑制する可能性があるものと考えられる。

我々は、茶カテキンにマウス接触皮膚炎を抑制する効果のあることを報告しており [8,9]、この作用にも抗酸化作用による炎症の抑制が関与していることが予想される。そこで、フェノール化合物を中心に、種々の抗酸化剤のマウス接触皮膚炎抑制作用を測定し、抗酸化作用と接触皮膚炎抑制作用との関連性について検討を行った。

2. 実験

2. 1 試料及び実験動物

マウスの炎症モデルに対する効果を、以下の市販の化合物について検討した。フェノール化合物として、3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシトルエン (BHT)、(-)-エピカテキン (EC)、(-)-エピカテキンガレート (ECG)、(-)-エピガロカテキン (EGC)、(-)-エピガロカテキンガレート (EGCG)、1,2,3,4,6-ペンタガロイルグルコース (PGG)、フロログルシノール、プロトカテキュ酸、ピロカテコール、トロロックス (系統名 6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸) を用いた。また、非フェノール性の抗酸化剤としてフェニドン (系統名 1-フェニル-3-ピラゾリドン)、バソフェナントロリンスルホン酸、デフェロキサミンメシレート、D-マンニトール、安息香酸ナトリウム、チオ尿素、L-メチオニン、 β -カロチン、L-ヒスチジンを、さらに、酸化促進剤として塩化第二鉄を用いた。その他の試薬については、市販特級品を用いた。マウスは、日本 SLC 社より購入した5週齢の雄性 ICR 系マウスを用いた。実験中のマウスの取り扱いは、「沼津工業高等専門学校における動物実験に関する指針」の規定に従った。

2. 2 マウス接触皮膚炎抑制作用の測定

マウス接触皮膚炎の検定については、オキサゾロン誘発マウス耳介浮腫法に準拠して行った [10]。すなわち、第1日目に、0.5%オキサゾロン溶液 0.1mL を用いて、マウスの剃毛した腹部に初期感作を行った。オキサゾロンは、和光純薬工業社製のものを用いた。5日後、0.5%オキサゾロン溶液 20 μ L でマウスの右耳介にチャレンジを行った。その24時間後、右耳介重量(WR)と左耳介重量(WL)を測定した。マウスの匹数は、各群5匹とした。被検試料は、チャレンジ溶液に耳介あたり 0.13mg となるよう添加し、右耳に経皮投与した。試料を投与しないコントロール群の耳介肥厚率を100%とし、これと試料投与群の耳介肥厚率を比較することで、マウス接触皮膚炎抑制作用を評

価した。耳介の肥厚率は、以下の式を用いて算出した。

$$\text{耳介肥厚率(\%)} = \left[\frac{(\text{WR}_{\text{試料}} - \text{WL}_{\text{試料}}) / \text{WL}_{\text{試料}}}{(\text{WR}_{\text{コントロール}} - \text{WL}_{\text{コントロール}}) / \text{WL}_{\text{コントロール}}} \right] \times 100$$

また、抑制率(\%)は、以下の式を用いて算出した。

$$\text{接触皮膚炎抑制率(\%)} = 100 - \text{耳介肥厚率}$$

2. 3 Fe²⁺-キレート作用の測定

Fe²⁺-キレート作用については、酒石酸鉄法を用いた[11]。0.1mg/mLの各種フェノール化合物溶液0.33mLに、0.05 M リン酸緩衝液 (pH7.5) 0.5mL 及び酒石酸鉄溶液 0.17mL を加えた。酒石酸鉄溶液は、硫酸第一鉄・7水和物 100mg と酒石酸カリウムナトリウム 500mg を水に溶解し、全量 100mL として調製した。反応溶液の吸光度を、540nm で測定した。対照として、酒石酸鉄溶液または被検試料溶液を加えない反応系を用いた。得られた吸光度から両対照の吸光度を引いた値を、試料のFe²⁺-キレート作用の強さを表す値として、EGCG 相当量で表記した。

2. 4 O₂⁻-捕捉作用の測定

O₂⁻-捕捉作用については、Nishikimi ら[12]の方法に従った。0.1mg/mL の被検試料溶液または水 0.5mL と、0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) 0.5mL を混合した。この溶液を 30°C、5 分間インキュベートした後、15μM フェナジンメトスルフェート溶液、200μM ニトロブルーテトラゾリウム溶液、750μM 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド溶液をそれぞれ0.5mL ずつ加え、混合した。すばやく、560nm における吸光度の変化を 10 分間測定した。水を用いた空試験と試料溶液を加えた試験で吸光度の経時変化量を比較した。O₂⁻ 捕捉率は、以下の式を用いて算出した。

$$\text{O}_2^{\cdot-}\text{-捕捉率(\%)} = \left[\frac{(\Delta\text{OD}_{\text{水}} - \Delta\text{OD}_{\text{試料}}) / \Delta\text{OD}_{\text{水}}}{\Delta\text{OD}_{\text{水}}} \right] \times 100$$

2. 5 マウス耳介におけるアラキドン酸誘発炎症抑制作用の測定

マウスのアラキドン酸誘発耳介炎症の検定に

ついては、Young ら[13]及び Opas ら[14]の方法に従って行った。2.0%アラキドン酸溶液 20μL でマウスの右耳介にチャレンジを行い、その 1 時間後、右耳介重量(WR)と左耳介重量(WL)を測定した。マウスの匹数は、各群 5 匹とした。被検試料は、チャレンジ溶液に耳介あたり 0.13mg となるよう添加し、右耳に経皮投与した。試料を投与しないコントロール群の耳介肥厚率を 100%とし、これと試料投与群の耳介肥厚率を比較することで、マウスのアラキドン酸誘発耳介炎症抑制作用を評価した。耳介の肥厚率は、以下の式を用いて算出した。

$$\text{耳介肥厚率(\%)} = \left[\frac{(\text{WR}_{\text{試料}} - \text{WL}_{\text{試料}}) / \text{WL}_{\text{試料}}}{(\text{WR}_{\text{コントロール}} - \text{WL}_{\text{コントロール}}) / \text{WL}_{\text{コントロール}}} \right] \times 100$$

陽性対照としては、ステロイド性抗炎症剤として知られるヒドロコルチゾンを用いた。また、アラキドン酸及び試料のどちらも投与しない健常マウスについても、耳介重量の測定を行った。

2. 6 統計処理

データは、平均値±標準誤差で表した。2 群間の平均値の差の検定にはノンパラメトリック法であるマンホイットニーの U 検定を用い、2 群間の相関性の検定には F-検定を用いた。いずれの場合も、p<0.05 以下を統計学的に有意であるとした。

3. 結果及び考察

3. 1 フェノール化合物のマウス接触皮膚炎抑制作用と抗酸化作用の関連性

フェノール化合物は、そのフェノール性水酸基がラジカル分子に電子を供与することでフェノキシラジカルを生じ、共鳴構造による安定化または二量体への重合化を起こして、ラジカルを消去するものと考えられている。また、フェノール性水酸基は、鉄をキレートすることでも抗酸化作用を示す[15,16]。そこで、Figure 1 に化学構造を示した 10 種のフェノール化合物について、経皮投与によるマウス接触皮膚炎抑制作用と、Fe²⁺-キレ

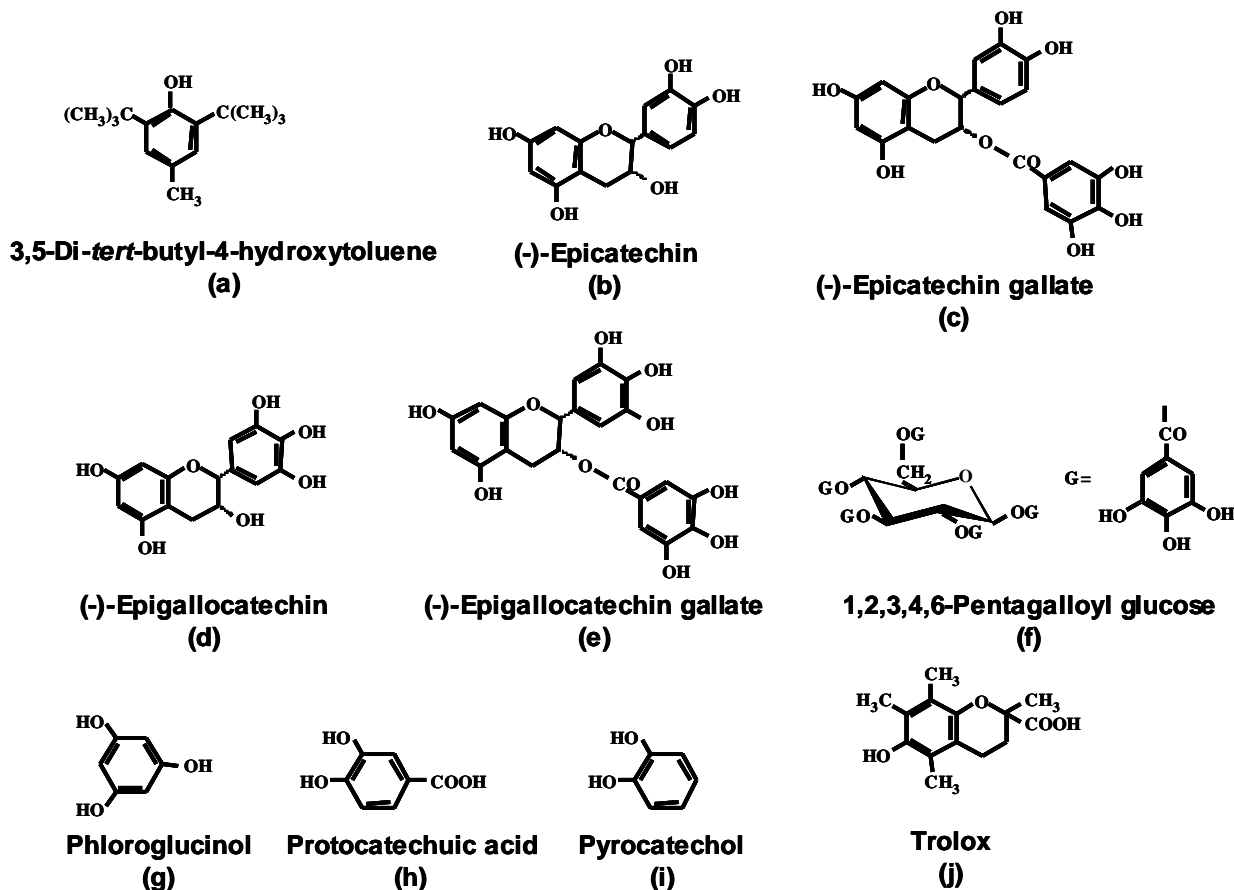


Figure 1 Chemical structures of phenolic compounds.

ート作用及び $O_2^{\cdot -}$ -捕捉作用の強さをそれぞれ測定し、その関連性を検討した。Figure 2 に示すように、10 種のフェノール化合物におけるマウス接触皮膚炎抑制作用と Fe^{2+} -キレート作用との間の相関係数は、 $\gamma=0.87(p<0.01)$ で、両者の間に正の有意な相関が見られた。一方、マウス接触皮膚炎抑制作用と $O_2^{\cdot -}$ -捕捉作用との間の相関係数は $\gamma=0.36$ で、両者の間に有意な相関は見られなかった。これらの結果から、フェノール化合物におけるマウス接触皮膚炎抑制作用には、特に Fe^{2+} -キレート作用の関与が大きいものと考えられる。また、特に強いマウス接触皮膚炎抑制作用と Fe^{2+} -キレート作用を示したのは ECG、EGCG 及び PGG (Figure 2 中の化合物 c, e, f) の 3 つであり、これらの化合物の化学構造中には共通してガロイル基が含まれていることから、これらの作用にガロイル基が重要な役割を果たしているもの

と考えられる。

Fe^{2+} -キレート剤の抗炎症作用のメカニズムとしては、 $O_2^{\cdot -}$ から過酸化水素を介してヒドロキシラジカル ($OH\cdot$) への変換を行う鉄触媒型 Harber-Weiss 反応を阻害することにより、 $OH\cdot$ の示す細胞傷害作用や血管透過性亢進作用等を抑制することが考えられる。また、 Fe^{2+} は酸素分子と配位結合してペリフェリルイオンを形成し、ラジカル連鎖反応を開始させるため、 Fe^{2+} -キレート剤はラジカル連鎖反応の比較的初期の段階を効果的に阻害するものと考えられる。

3. 2 フェノール化合物以外の抗酸化剤または酸化促進剤のマウス接触皮膚炎に対する作用

フェノールの構造を持たない数種の抗酸化剤について、マウス接触皮膚炎抑制作用を測定した結果を Table 1 に示す。オキサゾロン誘発のマウス接触皮膚炎では、他の炎症と同様にアラキド

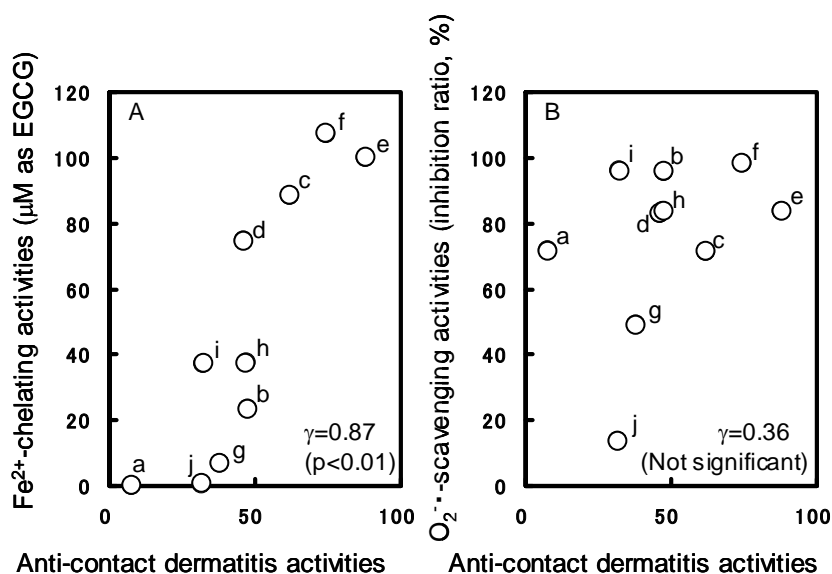


Figure 2 Correlations between preventive effects on mouse contact dermatitis and antioxidative activities of phenolic compounds.

A; Anti-contact dermatitis activities (inhibition ratio, %, at 0.13 mg/ear, *per cutem*) versus Fe²⁺-chelating activities (μM as EGCG at 0.033 mg/mL), B; Anti-contact dermatitis activities versus O₂^{-•}-scavenging activities (inhibition ratio, %, at 0.020 mg/mL). Alphabetical symbols in this figure correspond to those in Figure 1.

ン酸代謝物がケミカルメディエーターとして働いているものと考えられている[17]。実際に、アラキドン酸代謝物の生成酵素であるリポキシゲナーゼ及びシクロオキシゲナーゼの阻害剤とし

て知られるフェニドンの経皮投与は、マウス接触皮膚炎を有意に抑制した。茶ポリフェノールにも、両酵素の阻害作用のあることが報告されており[18]、この作用はカテキン類の示したマウス接触

Table 1 Effects of some antioxidative and prooxidative compounds on mouse contact dermatitis.

Samples	Ear swelling ratio, %	(Inhibition ratio, %)
Control (oxazolone only)	100.0 ± 4.1	
Lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor		
Phenidone	65.0 ± 28.9*	(35.0)
Iron-chelators		
Bathophenanthroline sulfonate	69.7 ± 20.9*	(30.3)
Deferoxamine mesylate	85.3 ± 5.8*	(14.7)
OH•-scavengers		
D-Mannitol	76.8 ± 19.9*	(16.0)
Sodium benzoate	57.8 ± 22.5*	(42.2)
Thiourea	41.8 ± 11.1**	(58.2)
¹O₂ OH•-scavenger		
L-Methionine	77.3 ± 30.0*	(22.7)
¹O₂ -scavengers		
β-Carotene	96.7 ± 24.8	(3.3)
L-Histidine	104.6 ± 38.3	(-4.6)
Prooxidative compound		
FeCl ₃	121.2 ± 18.7*	(-21.2)

Mean ± SEM. N=5. Dose; 0.13 mg/ear, *per cutem*.

Statistically significant difference from the control value; * p<0.05, ** p<0.01.

皮膚炎抑制作用にも関与しているものと考えられる。

Fe²⁺/Fe³⁺-キレート剤として知られるバソフェナントロリンスルホン酸及びデフェロキサミンメシレート、OH[·]-捕捉剤として知られるD-マンニトール、安息香酸ナトリウム、チオ尿素、一重項酸素(¹O₂)またはOH[·]-捕捉剤として知られるL-メチオニンの経皮投与は、いずれもマウス接触皮膚炎を有意に抑制した。逆に、塩化第二鉄の経皮投与は、マウス接触皮膚炎を有意に促進した。これらの結果は、オキサゾロン誘発のマウス接触皮膚炎において、鉄及びそれにより生成するOH[·]のような活性酸素が重要な役割を果たしており、鉄-キレート作用やOH[·]-捕捉作用を持つ化合物の経皮投与が、その抑制に有効であることを示唆している。特に、マウス接触皮膚炎の抑制に対するFe²⁺/Fe³⁺-キレート作用の有効性については、3.1の項で報告したFe²⁺-キレート作用の有効性を裏付けるものである。3.1の項では、フェノール化合物のFe²⁺-キレート作用について検討したが、Fe²⁺とFe³⁺の2種類の鉄イオンは、動物体内ではミトコンドリアの電子伝達系等で相互変換されるため、生体に同様の影響を与えるものと考えられている。そのため、Fe²⁺-キレート作用とFe³⁺-キレート作用についても、生体内では同様の効果を示すものと考えられる。従って、本実験で用いたFe²⁺/Fe³⁺-キレート剤については、Fe²⁺とFe³⁺のどちらをより強くキレートするかは問題とならないため、以後、単に鉄-キレート剤あるいは鉄-キレート作用と表記することとする。

ところで、Figure 2においては、フェノール化合物のマウス接触皮膚炎抑制作用とOH[·]の前駆体であるO₂^{-·}の捕捉作用との間には有意な相関は見られなかった。O₂^{-·}は生体内の水溶性の環境では比較的安定と考えられ、炎症における細胞傷害を起こす本体がOH[·]であるためにOH[·]-捕捉剤の効果が強く認められたものと思われる。し

かし、Figure 2に示すように、強いO₂^{-·}-捕捉作用を示すフェノール化合物の多くが強いマウス接触皮膚炎抑制作用も示しており、鉄やOH[·]ほどではなくともO₂^{-·}もマウス接触皮膚炎に関与しているものと考えられる。これに対し、紫外線暴露等で問題となる¹O₂の捕捉剤として知られるβ-カロチン及びL-ヒスチジンには、有意なマウス接触皮膚炎の抑制作用は見られず、この活性酸素種はオキサゾロン誘発のマウス接触皮膚炎には関与しないものと考えられる。

3.3 マウス耳介におけるアラキドン酸誘発炎症に対する鉄-キレート剤の抑制作用

マウス耳介におけるアラキドン酸誘発炎症に対する、鉄-キレート剤の影響を検討した結果をFigure 3に示す。既知のステロイド性抗炎症剤のヒドロコルチゾンの経皮投与では、有意な抗炎症作用が見られた。また、EGCG、バソフェナントロリンスルホン酸及びデフェロキサミンメシレートといった鉄-キレート作用を持つ化合物も、経皮投与で有意な抗炎症作用を示した。これらの結

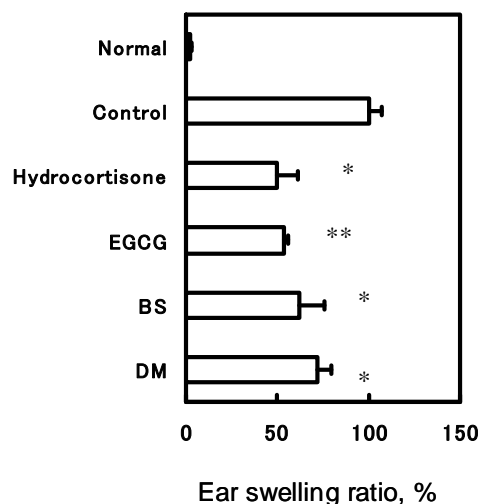


Figure 3 Preventive effects of iron-chelators on mouse ear inflammation induced by arachidonic acid. BS; Bathophenanthroline sulfonate, DM; Deferoxamine Mesylate. Dose; 0.13 mg/ear, *per cutem*. Mean \pm SEM. N=5. "Control" was treated with arachidonic acid only. Statistically significant difference from the control value; * p<0.05, ** p<0.01.

果から、鉄-キレート剤の抗炎症作用がそのマウス接触皮膚炎抑制作用に関与している可能性が高いことが、あらためて示唆された。本炎症モデルでは、炎症発現のケミカルメディエーターとして、アラキドン酸代謝物のなかでもプロスタグランジンの関与が大きく、その抑制にはシクロオキシゲナーゼ阻害剤が有効とされている。そこで、シクロオキシゲナーゼ阻害作用を持つフェニドンを用いて同様の実験を行ったところ、やはり有意な抗炎症作用が認められた（抑制率 35.0%, $p < 0.05$ ）。EGCG は、今回用いた試料の中で特に強い抗炎症作用を示したが、これは EGCG が鉄-キレート作用とシクロオキシゲナーゼ阻害作用の両方の作用を持つことによるものと考えられる。

4. まとめ

種々のフェノール化合物及び非フェノール性抗酸化剤の経皮投与による、マウス接触皮膚炎の抑制作用について検討した。

その結果、10種のフェノール化合物では、マウス接触皮膚炎抑制作用と Fe^{2+} -キレート作用の強さとの間に有意な正の相関が見られたが、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ -捕捉作用の強さとの間には有意な相関は認められなかった。特に、化学構造中にガロイル基を持つフェノール化合物で、強いマウス接触皮膚炎抑制作用と Fe^{2+} -キレート作用が見られた。

9種の非フェノール性の抗酸化剤と酸化促進剤の塩化第二鉄について、マウス接触皮膚炎に対する影響を検討した結果、 OH^{\cdot} -捕捉剤と鉄-キレート剤に有意な抑制効果が見られ、塩化第二鉄では逆に有意な促進効果が見られた。また、アラキドン酸代謝酵素阻害剤でも、有意な抑制効果が見られた。

EGCG 及び非フェノール性の鉄-キレート剤の経皮投与は、ステロイド系抗炎症剤やアラキドン酸代謝酵素阻害剤と同様、アラキドン酸誘発のマウス耳介炎症を抑制した。

以上の結果から、茶カテキンを始めとするフェノール化合物に認められたマウス接触皮膚炎抑制作用には、サイトカイン産生・分泌の抑制[19]の他、鉄-キレート作用、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ -捕捉作用、 OH^{\cdot} -捕捉作用またはアラキドン酸代謝酵素阻害作用などが関与するものと考えられ、炎症を抑制する抗酸化作用としては特にその鉄-キレート作用が重要であることが示唆された。

参考文献

- 1) 東京都アレルギー性疾患対策検討委員会, 都におけるアレルギー性疾患対策の在り方最終報告 (2001).
- 2) R.R.A. Coombs, P.G.H. Gell, The classification of allergic reactions underlying disease, in *Clinical Aspects of Immunology*, ed. by R.R.A. Coombs, P.G.H. Gell, Philadelphia, F.A. Davis, pp.317-337 (1963).
- 3) 大柳善彦, 活性酸素の炎症への種々の関与様式, 炎症, vol.3, pp.377-378 (1983).
- 4) 芳野恭士, 杉浦由佳, 篠原千恵, 廣田雅恵, フェノール化合物の抗酸化作用の測定と定量法に関する研究, 技術・教育研究論文誌, vol.11, pp.59-70 (2004).
- 5) M.M.-Y. Chan, C.-T. Ho, H.-I. Huang, Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production, *Cancer Lett.*, vol.96, pp.23-29 (1995).
- 6) A. Sarkar, A. Bhaduri, Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species: Comparison with its individual catechin constituents and green tea, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol.284, pp.173-178 (2001).
- 7) R.A. Greenwald, W.W. Moy, Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid, *Arthritis Rheum.*, vol.23, pp.455-463 (1980).
- 8) M. Suzuki, K. Yoshino, T. Miyase, M. Sano,

- Inhibitory effects of tea catechins and *O*-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate on type-IV allergy, *J. Agric. Food Chem.*, vol.48, pp.5649-5653 (2000).
- 9) K. Yoshino, K. Ogawa, T. Miyase, M. Sano, Inhibitory effects of the C-2 epimeric isomers of tea catechins on mouse type IV allergy, *J. Agric. Food Chem.*, vol.52, pp.4660-4663 (2004).
- 10) H. Nakamura, S. Motoyoshi, K. Ishii, Y. Seto, M. Shimizu, Anti-inflammatory activity of a topical glucocorticoid, fludrocortide tape in experimental animals, *Folia Pharmacol. Japon.*, vol.76, pp.595-607 (1980).
- 11) 岩浅 潔, 鳥井秀一, 酒石酸鉄による茶タンニンの比色定量法, *茶業技術研究*, vol.26, pp.87-91 (1962).
- 12) M. Nishikimi, N.A. Rao, K. Yagi, The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol.46, pp.849-854 (1972).
- 13) J.M. Young, D.A. Spires, C.J. Bedord, B. Wagner, S.J. Ballaron, L.M. De Young, The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid, *J. Invest. Dermatol.*, vol.82, pp.367-371 (1984).
- 14) E.E. Opas, R.J. Bonney, J.L. Humes, Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid, *J. Invest. Dermatol.*, vol.84, pp.253-256 (1985).
- 15) M. J. Hynes, M. O. Coinceanainn, The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin, *J. Inorg. Biochem.*, vol.85, pp.131-142 (2001).
- 16) Q. Guo, B. Zhao, M. Li, S. Shen, W. Xin, Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, vol.1304, pp.210-222 (1996).
- 17) H. Nakamura, S. Motoyoshi, K. Ishii, T. Kadokawa, Inhibitory effect of AD-1590, a non-steroidal anti-inflammatory drugs, on allergic inflammation in mice and rats, *Folia Pharmacol. Japon.*, vol.92, pp.29-38 (1988).
- 18) S.K. Katiyar, R. Agarwal, S. Ekker, G.S. Wood, H. Mukhtar, Protection against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-caused inflammation in SENCAR mouse ear skin by polyphenolic fraction isolated from green tea, *Carcinogenesis*, vol.14, pp.361-365 (1993).
- 19) 芳野恭士, 米山智亮, アレルギーと茶カテキン, *沼津工業高専研究報告*, vol.37, pp.187-192 (2003).