

# シークワサー果皮・葉抽出物の I 型アレルギー抑制機構の解明 およびその有効活用法の検討

愛媛大学教育学部 家政教育講座  
岡本 威明

## 1. 研究の目的と背景

現代の日本では、花粉症等を含む I 型アレルギー疾患が増加傾向にある。この I 型アレルギーは抗原の侵入により引き起こされる。侵入した抗原により好塩基球表面上に存在する IgE 抗体が架橋され、シグナル伝達が始まることで、アレルギー原因物質が放出される（脱顆粒）。シグナル伝達はプロテインキナーゼが基質タンパク質をリン酸化して、活性化または不活性化することでシグナルを次に伝える。シグナル伝達は  $Ca^{2+}$  依存経路と  $Ca^{2+}$  非依存経路に分けられ、 $Ca^{2+}$  依存経路として Lyn-Syk-LAT 経路および Lyn-Btk-PLC $\gamma$  経路が、 $Ca^{2+}$  非依存経路として Fyn-Gab2-PI3K 経路が存在する<sup>1,2</sup>。これまでに我々は、シークワサー果皮・葉抽出物が、抗原刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を抑制することで脱顆粒反応を阻害することを見出し、また、その効果は果皮よりも葉の方に強く認められることを確認してきた。そこで本研究では、シークワサー果皮・葉抽出物による脱顆粒シグナリング制御機構に関して検討した。

さらに、シークワサー (*Citrus depressa* Hayata) とは、沖縄県特産の小型の柑橘の総称で、沖縄語で「シーサン（酸っぱい）」と「クワースン（食わせる）」を掛け合わせた語である<sup>3,4</sup>。来歴は日本原産のタチバナと中国原産のマンダリンとの雑種であると推定されている。品種・系統数は 130 を超えるが、代表系統として「クガニー」が挙げられる。沖縄県農林水産部の統計によると、平成 26 年度のシークワサー出荷量は 2,777 t であり、そのうち加工用が 2,659 t、生果が 118 t である。シークワサーの搾汁効率は 50% であるため、加工品製造時に発生する果汁搾汁後の残渣の廃棄量は、年間 1,300 t を超えると示唆される。シークワサーの果皮には、果汁や他の柑橘に比べ、血糖値及び血圧上昇抑制作用等を有するノビレチンが多く含まれていることが明らかになっている。よって、本研究では、現在廃棄されているシークワサー搾汁残渣（果皮等）ならびに葉を有効活用し、美味しさならびに健康機能性を有する食品の考案に関しても検討を加えた。

## 2. 研究の方法

### 2-1. シークワサー各種抽出物の調製

シークワサー果皮・葉メタノール抽出物は、高知県工業技術センターから提供された。葉・果皮を 50℃～60℃

で加熱乾燥後、80%メタノール溶液にて抽出を行い、その抽出溶液を真空凍結乾燥により粉末化し各種サンプルとした。各種サンプルは DMSO を用いて溶解し、DMSO 終濃度 0.5% となるように調製した。

### 2-2. 脱顆粒抑制試験と細胞内カルシウム濃度の評価

抗 DNP-IgE 抗体で感作させた RBL-2H3 細胞に葉および果皮抽出液、ノビレチンを作用させた後、DNP-HSA で抗原刺激することで脱顆粒現象を  $\beta$ -hexosaminidase 放出レベルにより評価した。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の測定は、Fluo3-AM を用いて評価した。

### 2-3. 細胞内各種タンパク質のリン酸化調節

RBL-2H3 細胞を用い、シークワサー果皮・葉抽出物刺激による PI3Kp55/p85, Syk, Akt, PLC $\gamma$ 1/2 のリン酸化調節を SDS-PAGE 法および Western Blotting 法を用いて行った。抗原刺激時間 2 分、抗原濃度 0.050  $\mu$ g/mL の条件下で実施した。

### 2-4. 各種シークワサーパウダーの調製

シークワサー果皮パウダーは、(株)CAMUECO（沖縄県那覇市）より購入した。本製品は、沖縄県大宜味村産クガニーの搾汁残渣を熱風乾燥させ、種子と共に粉碎しパウダー化されている。シークワサーの葉は、高知県安芸市の農園より提供された。葉パウダーの製造方法は、採取した葉を 50℃の湯にて洗浄後、高圧蒸気滅菌（オートクレーブ滅菌：120℃、20 分間）を行い、50℃で 6 時間乾燥させた。その後、ミニスピードミルにて粉碎しパウダー化した。果皮パウダーの有する苦味・えぐみの緩和効果を期待して、 $\beta$ -シクロデキストリン（セルデックス B-100：日本食品化工(株)）を使用した。

### 2-5. 各種シークワサーパウダーを活用した料理の開発

果皮・葉パウダーの活用を、主食、飲料、おかず、調味料、デザート・おやつ の 5 つのカテゴリーごとに検討した。

## 3. 研究内容

シークワサー果皮・葉抽出物は、PI3K p55/p85, PLC $\gamma$ 1, Akt のリン酸化誘導を下方制御したが、Syk, PLC $\gamma$ 2 のリン酸化誘導には影響を与えなかった。したがって、シークワサー果皮・葉抽出物はシグナル伝達の

Ca<sup>2+</sup> 依存経路と Ca<sup>2+</sup> 非依存経路の両方を阻害することで、脱顆粒を抑制することが示唆された。本実験で明らかとなったシークワサー果皮・葉抽出物による脱顆粒シグナリング制御機構は、ポリメトキシフラボノイドであるノビレチンによるものと似た挙動を示した。

シークワサー果皮パウダーの苦味・えぐみの緩和には「β-シクロデキストリン」や「酢」の添加が有効であり、ドレッシング、ココアパン、チョコレートなどの調理に活用できることが明らかとなった。一方、葉パウダーに関しては、チョコレート、クッキー、シフォンケーキなどの調理に活用できることが明らかとなった。

## 4. 研究の実施経過

### 4-1. シークワサー果皮・葉抽出物の脱顆粒抑制能と細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度調節との関連

シークワサー果皮・葉抽出物に添加濃度依存的な脱顆粒抑制効果が認められ、葉抽出物 250 μg/mL 刺激下では、Control と比較すると、約 70% の強い抑制効果を示した (IC<sub>50</sub> 値: 葉抽出物 107 μg/mL, 果皮抽出物 470 μg/mL) (図 1)。

シークワサー果皮・葉抽出物は、どちらも添加濃度依存的に細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇を抑制し、果皮よりも葉の方がより低濃度で抑制効果を示した。よって、シークワサー果皮・葉抽出物による脱顆粒抑制効果はカルシウム依存的であることが明らかとなった (図 2)。

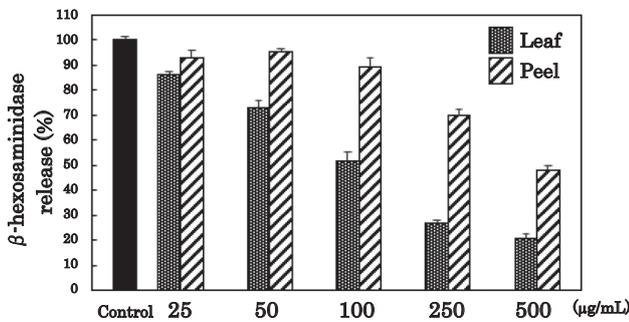


図 1 シークワサー果皮・葉抽出物による濃度依存的な脱顆粒抑制効果

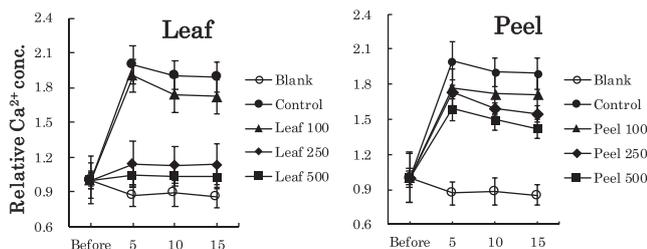


図 2 シークワサー果皮・葉抽出物による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度抑制効果

### 4-2. シークワサー果皮・葉に含まれる 3 種のポリメトキシフラボノイド類の測定

HPLC 分析の結果、シークワサー果皮・葉メタノール抽出物のノビレチン含有量はそれぞれ 0.91 × 10<sup>3</sup> mg/100 g, 1.8 × 10<sup>3</sup> mg/100 g, タンゲレチン含有量は 0.46 × 10<sup>3</sup> mg/100 g, 1.5 × 10<sup>3</sup> mg/100 g であった。ノビレチン量は葉の方が果皮と比べて 2 倍、タンゲレチン含有量は葉の方が 3 倍多く認められた。

### 4-3. ノビレチンの脱顆粒抑制効果

シークワサー果皮・葉に多く含まれるノビレチンの脱顆粒抑制効果を再確認したところ、100 μM 刺激下で Control と比較すると、約 67% の強い抑制能を示した (図 3)。

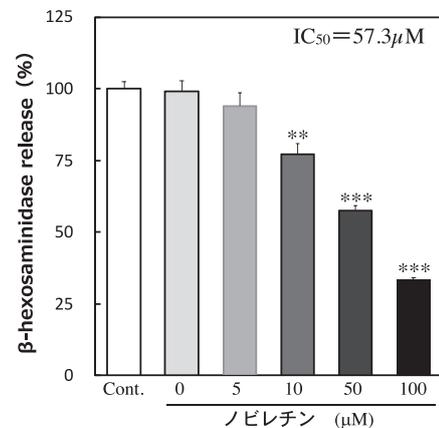


図 3 ノビレチンの脱顆粒抑制効果

### 4-4. 脱顆粒シグナル伝達に及ぼすシークワサー果皮・葉抽出物の影響

RBL-2H3 細胞において、シークワサー果皮・葉抽出物によって、抗原刺激による PI3K のリン酸化誘導が抑制されるか否かの検討を、SDS-PAGE 法ならびに Western Blotting 法を用いて行った (図 4)。

その結果、シークワサー葉抽出物による p-PI3K p85 発現の下方制御傾向が認められ、p-PI3K p55 発現においては有意な下方制御が認められた。また、シークワサー果皮抽出物による p-PI3K p85 および p-PI3K p55 発現の有意な下方制御も認められた。これらの結果から、シークワサー果皮・葉抽出物は PI3K のリン酸化誘導を抑制することが明らかとなった。また、ノビレチン刺激においても、p-PI3K p85 発現、p-PI3K p55 発現ともに下方制御した。さらに、シークワサー葉抽出物とノビレチンの比較を行ったところ、p-PI3K p85 発現においてはノビレチンが最も下方制御しているのに対し、p-PI3K p55 発現においてはどれも同等の強さの下方制御傾向が認められた。

次に、シークワサー果皮・葉抽出物により Syk のリン酸化誘導が抑制されるか否かの検討を行った。その結果、

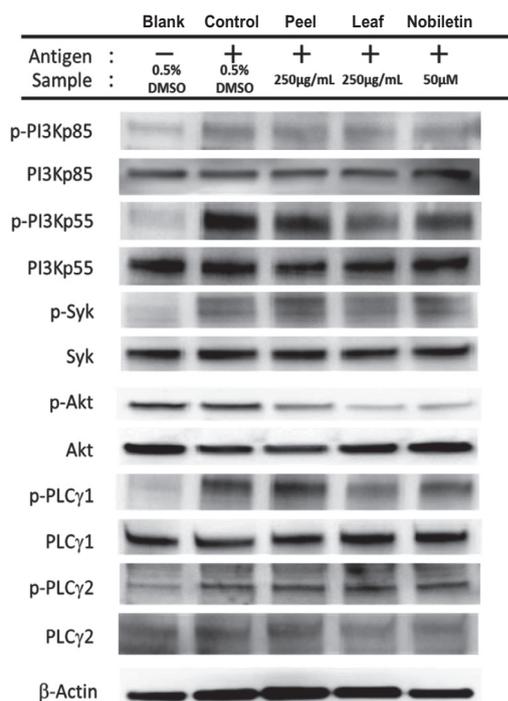


図4 シークワーサー果皮・葉抽出物による各種キナーゼのリン酸化制御

シークワーサー果皮・葉抽出物による p-Syk 発現の下方制御は認められなかった。また、ノビレチンにおいても p-Syk 発現の下方制御は認められなかった。

また、Akt のリン酸化誘導に与える影響について検討した。その結果、シークワーサー果皮・葉抽出物による p-Akt 発現の下方制御が認められた。また、ノビレチンが Akt のリン酸化誘導を抑制することが確認できた。シークワーサー葉抽出物およびノビレチンの Akt のリン酸化レベルを比較すると、p-Akt 発現において、シークワーサー葉抽出物はノビレチンとほぼ同程度の脱顆粒抑制効果を有していることが分かった。

さらに、PLCγ1 のリン酸化誘導が抑制されるか否かの検討を行ったところ、シークワーサー果皮・葉抽出物による p-PLCγ1 発現の下方制御が認められた。また、ノビレチンが PLCγ1 のリン酸化誘導を抑制することが確認できた。シークワーサー葉抽出物およびノビレチンの PLCγ1 のリン酸化レベルを比較すると、p-PLCγ1 発現においてはシークワーサー葉抽出物の方がノビレチンよりも強く下方制御していることが認められた。

最後に、PLCγ2 のリン酸化誘導が抑制されるか否かの検討を行った結果、シークワーサー果皮・葉抽出物による p-PLCγ2 発現の下方制御は認められなかった。また、ノビレチンにおいても p-PLCγ2 発現の下方制御は認められず、PLCγ2 のリン酸化誘導を抑制しなかった。

図5に、シークワーサー果皮・葉抽出物による脱顆粒シグナリング制御機構の概略図を示した。

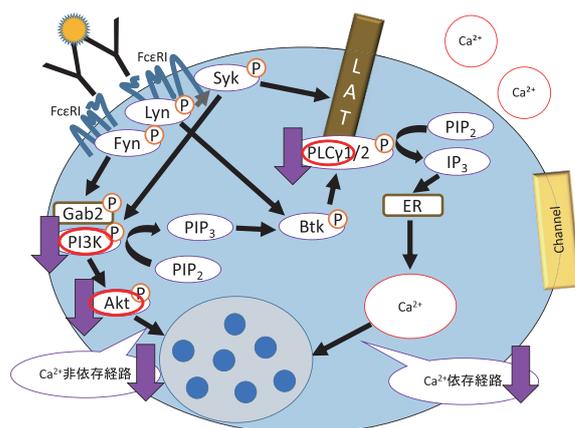


図5 シークワーサー果皮・葉抽出物による脱顆粒シグナル伝達制御

#### 4.5. シークワーサー果皮・葉パウダーを活用した調理法の考案と工夫

果皮パウダーの添加が可能な料理のスクリーニングを、主食・飲料・おかず・調味料・デザート・おやつに着目して実施した。スクリーニングの対象とした料理は、主食として、パン（プレーンパン・カレーパン・青汁あんパン・ココアパン）、麺（うどん・パスタ）、飲料として、コーヒー、青汁、ココア、おかずとして、ゴーヤーチャンプルー、カレー、調味料として、みそ、ドレッシング、デザート・おやつとして、チョコレート、羊羹、豚まん、ヨーグルトであった。これらの中から、美味しさや喫食の手軽さ、果皮パウダーの配合濃度、喫食頻度の多さを考慮し、適したものを選択した。その結果、ドレッシング、パン、チョコレートが適当であると判断された。パンに関しては、ココアパウダーによって、苦味とえぐみが緩和されたように感じられたため、ココアパンにてレシピを最適化した。果皮パウダーを用いたドレッシングとココアパンの調理レシピを図6に示す。

ドレッシング		ココアパン	
穀物酢	23ml	強力粉	160g
砂糖	5g	ドライイースト	1.5g
塩	2.5g	水	70ml
果皮パウダー	1g	塩	1.5g
オリーブオイル	3ml	砂糖	25g
ごま油	0.5ml	卵	25g
おろしにんにく	0.7g	マーガリン	20g
こしょう	少々	スキムミルク	12g
果皮パウダー配合率: 2.8% (総重量比)		ココアパウダー	7.5g
		はちみつ	15g
		果皮パウダー	1.6g
		環状オリゴ糖	3.2g
		果皮パウダー配合率: 1% 環状オリゴ糖配合率: 2% (強力粉重量比)	

図6 シークワーサー果皮パウダーを利用した調理レシピ

官能検査の結果, チョコレートに関しては, カカオマス含量 56% のチョコレートの重量に対し, 果皮パウダー配合率 4%,  $\beta$ -シクロデキストリン (環状オリゴ糖) 配合率 5% で作成されたものが最も高評価であった。葉パウダーを用いた調理レシピの考案は, 現在検討中である。

## 5. 研究から得た結論・考察

RBL-2H3 細胞においてシークワサー果皮・葉抽出物は PI3K p85/p55 のリン酸化誘導を有意に下方制御した。またシークワサー果皮・葉抽出物は, Akt および PLC $\gamma$ 1 のリン酸化誘導を下方制御する傾向がみられ, 特にシークワサー葉抽出物は PLC $\gamma$ 1 のリン酸化誘導を有意に下方制御した。これらのことから, シークワサー果皮・葉抽出物は脱顆粒シグナリングにおける Ca<sup>2+</sup> 依存経路と Ca<sup>2+</sup> 非依存経路の両方を阻害することで, 脱顆粒を抑制していることが示唆された。一方で, シークワサー果皮・葉抽出物は Syk および PLC $\gamma$ 2 のリン酸化誘導を下方制御しなかった。このことから, シークワサー果皮・葉抽出物は Syk より下流のシグナルに影響を与えていることが推察された。先行研究により, ノビレチンは PI3K p55/p85 および Akt, PLC $\gamma$ 1 のリン酸化誘導を下方制御し, Syk および PLC $\gamma$ 2 のリン酸化誘導に影響を与えないことが明らかとなっており<sup>5,6</sup>, シークワサー果皮・葉抽出物による脱顆粒シグナリング制御機構は, ノビレチンによるものと似た挙動を示していた。

シークワサー葉抽出物ならびにノビレチン刺激における p-PLC $\gamma$ 1 および p-Akt 発現において, シークワサー葉抽出物刺激群の方がノビレチン刺激群よりも減弱していた。本実験で添加したシークワサー果皮・葉抽出物中のノビレチン, タンゲレチン含有量は, HPLC 分析によって確認した。タンゲレチンは, ノビレチンと同様に柑橘類中に含まれるポリメトキシフラボノイドであり, ノビレチンとはほぼ同程度の脱顆粒抑制活性を示すことが分かっている<sup>10</sup>。

HPLC 分析結果によるとシークワサー葉メタノール抽出物のノビレチン含有量は  $1.8 \times 10^3$  mg/100 g, タンゲレチン含有量は  $1.5 \times 10^3$  mg/100 g であった。本実験で作用させたノビレチンのモル濃度は 50  $\mu$ M であったが, シークワサー葉抽出物 (終濃度 250  $\mu$ g/mL) 中に含まれるノビレチンのモル濃度は 11.2  $\mu$ M, タンゲレチンのモル濃度は 10.1  $\mu$ M と推定された。これらの結果をもとに, シークワサー葉抽出物がノビレチンよりも強く脱顆粒シグナリングに影響を与えた要因を考察すると, シークワサー葉抽出物に含まれるノビレチンとタンゲレチンによる相加効果が考えられる。また, シークワサー葉抽出物に含まれるノビレチン, タンゲレチン以外の成分がアレルギー抑制効果に関係していることも推測される。その成分とは抗アレルギー効果を打ち消すものではない, もしくはノビレチン, タンゲレチンの抗アレルギー効果を増強する働きを有しているのではないかと考える。

調理加工実験においては, 苦味とえぐみの緩和には「 $\beta$ -シクロデキストリン:環状オリゴ糖」と「酢」が有効であることがわかった。

「ココアパン」は,  $\beta$ -シクロデキストリンを添加することによって, 果皮パウダーによる苦味・えぐみが緩和され, 美味しく調理することができた。 $\beta$ -シクロデキストリンは, 7 個のブドウ糖が環状構造を成しており, 環状の内側に苦味・えぐみの分子が取り込まれることによって, それらの味覚受容が緩和したと考えられる。

また, ドレッシングの作成において, 酢の添加により果皮パウダーによる苦味・えぐみを緩和したが, その科学的根拠は, まだ明らかにされていない。しかし, コーヒーやゴーヤーの苦味改善に酢が活用されている等の先行研究は報告されているため, それらを参考にし解明していきたい。

## 6. 残された問題, 今後の課題

シークワサー果皮・葉抽出物における脱顆粒シグナリング制御機構の解明により, シークワサー果皮・葉抽出物は Syk のリン酸化誘導に影響を与えないことが明らかになったことから, シークワサー果皮・葉との機能性フードペアリングを検討するために, Syk のリン酸化誘導を下方制御する食品との組み合わせがよいと考えられる。また, シークワサー果皮・葉抽出物は PLC $\gamma$ 1 のリン酸化誘導を下方制御する一方で, PLC $\gamma$ 2 に影響を与えなかった。これらの結果より, PLC $\gamma$ 2 のリン酸化誘導を下方制御する食品を組み合わせることで, より強い脱顆粒抑制効果をもたらすことができるのではないかと推察される。シークワサー果皮・葉抽出物と組み合わせることで, 抗アレルギー効果の相加・相乗効果を発揮することのできる食品としては, Syk と PLC $\gamma$ 2 のリン酸化誘導を下方制御する  $\beta$ -ラクトグロブリンやホウレンソウなどが挙げられる<sup>7-9</sup>。

よって今後は, シークワサー果皮・葉を用いた料理や食品開発を行う上で, シークワサー果皮・葉抽出物と抗アレルギー効果の相加・相乗効果が期待できる他食品との組み合わせによる脱顆粒シグナリング制御機構を解明していくことが必要であろう。

また, 果皮パウダーを用いた食品の考案を進める中で, 果皮パウダー特有の苦味・えぐみの緩和が最大の難点であった。それに比べ, シークワサー葉は果皮に比べ苦味が少なく, パウダー化の際にも種が入ることもないため, えぐみも果皮パウダーほど感じられない。しかし, 搾汁残渣という廃棄物の直接的な削減にはつながらず, 葉の採取段階から人件費などのコストが発生する。

よって, 今後はシークワサー葉などの材料供給の問題点や, 年齢・性別による食品の趣向の系統などを調査しつつ, シークワサー葉・果皮パウダーの効果的な活用方法について, さらなる検討を加えていきたい。

## 7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびに関係の皆様には厚く御礼申し上げます。

## 8. 参考文献

- 1 宇井理生, 現代化学増刊 34 —細胞内シグナル伝達—, 9章, 山村博平, 東京化学同人, 92-105 (1997)
- 2 平野俊夫, 理研ニュース—サイトカインシグナルから亜鉛シグナルへ—, 独立行政法人理化学研究所, No.294 December, 5-7 (2005)
- 3 内間直仁, 野原三義, 沖縄語辞典—那覇方言を中心に—, 120 (2006)
- 4 太田英明, “沖縄産シークワシャー果実の魅力: その機能性と品種判別技術”, シリーズ—研究小集会 (第6回) 果汁部会, (2012)
- 5 Onishi, S., Nishi, K., Yasunaga, S., Muranaka, A., Maeyama, K., Kadota, A. & Sugahara, T., Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, exerts anti-allergic effect by suppressing activation of phosphoinositide 3-kinase., *J. Funct Foods*, **6**, 606-614 (2014)
- 6 安永翔, 門田歩, 菅原卓也, 柑橘果皮成分の抗アレルギー効果の解明, 生物機能研究, **19**, 1-5 (2015)
- 7 Nishi, K., Teranishi, M., Yasunaga, S., Iitsuka, M., Matsumoto, S. & Sugahara, T., The major whey protein  $\beta$ -lactoglobulin inhibits IgE-mediated degranulation of RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis in mice., *Int. Dairy J.*, **39**, 89-95 (2014)
- 8 Ishida, M., Nishi, K., Watanabe, H. & Sugahara, T., Inhibitory effect of aqueous spinach extract on degranulation of RBL-2H3 cells., *Food Chem.*, **136**, 322-327 (2013)
- 9 Yasunaga, S., Kadota, A., Kikuchi, T., Kubo, C., Nishi, K. & Sugahara, T., Effect of concurrent administration of nobiletin and  $\beta$ -lactoglobulin on the symptoms of Japanese cedar pollinosis models in mice., *J. Funct Foods*, **22**, 389-397 (2016)
- 10 Jang, S. E., Ryu, K. R., Park, S. H., Chung, S., Teruya, Y., Han, M. J., Woo, J. T. & Kim, D. H., Nobiletin and tangeretin ameliorate scratching behavior in mice by inhibiting the action of histamine and the activation of NF- $\kappa$ B, AP-1 and p38., *Int Immunopharmacol.*, **17**, 502-507 (2013)

## 9. 研究発表

- (1) 「シークワシャー葉・果皮抽出物によるI型アレルギー抑制機構の解明」, 岡本威明, 河原林桃子, 柏木愛梨,

- 田中守, 垣田浩孝, 第65回 日本家政学会中国・四国支部大会, 2018年9月 (高知)
- (2) 「シークワシャー果皮・葉パウダーの抗アレルギー効果の解明とその有効利用法の検討」, 岡本威明, 第4回四国オープンイノベーションワークショップ, (徳島)
  - (3) 「シークワシャー果皮および葉抽出物による脱顆粒シグナリング制御の解明」, 岡本威明, 柏木愛梨, 田中守, 日本家政学会第71回大会, 2019年5月 (徳島)