

# 温州みかんの抗アレルギー作用

Key Words : 温州みかん ■ 抗アレルギー ■ 植物性フラボノイド

小林 彰子\*1 高柳 雅義\*2 田辺 創一\*3

## はじめに

近年、特に先進国において、アレルギー患者が急増し、大きな社会問題となっている。中でもスギ花粉症は最も多く、最近の調査では日本の成人の5～6人に1人は花粉症を自覚しているという報告がある<sup>1)</sup>。さらに現在花粉症を発症していなくてもスギアレルゲンに反応するスギ花粉症予備軍（スギ花粉に対するIgE抗体を有している人）を加えるとさらに50～60%にも及び、今や国民病といえるほどの社会問題である<sup>1)</sup>。2004年には関係省庁の幹部および花粉症の専門家による花粉症対策研究検討会が設置され、「今期における花粉症に関する政府の取り組み」が発表され<sup>2)</sup>、花粉症対策についての具体的施策が示された。スギ花粉症は2月から4月までの短期間の季節性アレルギーであるが、スギ花粉症に係る直接・間接の医療費は年間総額2,800億円にのぼるとの推計もあり<sup>3)</sup>、国家的損失も多く、また作業効率の低下や外出

ができないなどの生活の質の低下をもたらすことから、根本的治療方法の開発が急務である。現在の花粉アレルギー対策は医師による抗アレルギー薬の投与が中心であるが、これらの医薬品では副作用など患者に対する負担が大きい。

また対症療法であるため、根本的な治療には至らない。そのため、日常的に摂取でき、体質改善といった根本治療に繋がる可能性のある食品の抗アレルギー効果に着目することは、アレルギー対策として有効な手段の1つである。

温州みかんは日本原産のミカン科 (*Rutaceae*) の植物で、500年前中国から伝わり、鹿児島県長島で突然変異によって発生した品種といわれている<sup>4)</sup>。日本では東海・中国地方で商業的に広く栽培され、果実をそのまま、あるいは果汁として食する。海外でもサツمامンダリン (*Satsuma Mandarin*) の名前で知られている。漢方薬では成熟果皮を陳皮と呼び、咳や痰、咽喉痛、食欲不振、腹部膨満感などの治療薬として用いられてきた<sup>5,6)</sup>。日本では美肌効果があることから、入浴剤やハンドクリームなどに用い

\*1 KOBAYASHI Shoko 高崎健康福祉大学 健康福祉学部

\*2 TAKAYANAGI Masayoshi 日東富士製粉 中央研究所 分析・生化学チーム

\*3 TANABE Sohichi 広島大学大学院 生物圏科学研究科

られてきた<sup>5)</sup>。

温州みかんに抗アレルギー作用があることは久保ら<sup>7)</sup>やParkら<sup>8)</sup>によって報告されている。しかし、どの成分が実際に抗アレルギー作用を有し、またどのようなメカニズムで実際に生体内で効いているのかについては、統一見解があまりとられていなかった。ここでは、著者らが得た温州みかんの抗アレルギー成分および作用メカニズムに関する新知見を述べ、さらにそれらを元に活性成分の消化管内における代謝と生体内における作用仮説について報告する。

## 2. 花粉症発症メカニズムと 温州みかんのアレルギー抑制作用

花粉症発症メカニズムについて、図1に簡潔に示した。スギ花粉が鼻や目の粘膜上に付着すると花粉が割れ、アレルゲンが体内へ吸収される。体内に侵入したアレルゲンはマクロファージなどの抗原提示細胞に異物として認識され、貪食された後、アレルゲン分解物がマクロファージ表面上に提示される。この抗原情報をT細胞が特異的に認識し、活性化されIL-4などのサイトカインを産生する。それによりB

細胞が活性化され、B細胞は抗体産生細胞へ分化し、アレルゲン特異的IgE抗体を産生する。IgE抗体は肥満細胞上や好塩基球上のIgEレセプターに結合する。再度アレルゲン(花粉)が侵入した際、肥満細胞上のIgE抗体にアレルゲンが結合し、架橋構造を形成すると、肥満細胞および好塩基球が脱顆粒してメディエーター(ヒスタミンやロイコトリエンなど)が放出され、アレルギーが発症する。

我々は温州ミカンの抗アレルギー作用の一つとして肥満細胞や好塩基球の脱顆粒抑制に着目し、温州みかんが脱顆粒を抑制するか否かについて検討した。アレルギー発症の最終段階である肥満細胞の脱顆粒を抑制することができれば、花粉症だけでなくその他のアレルギーにも応用が可能である。我々は、温州みかんサンプルとして、温州みかんパウダー(日東富士製粉(株)製)を用いた。温州みかんパウダーは温州ミカンの果汁のしぼり糟を低温乾燥後粉末化したものである。これまで柑橘類の脱顆粒抑制成分として報告されているヘスペリジン等のフラボノイドは温州ミカンの部位では黄色い外果皮と果肉の間にある白い中果皮やじょうのう膜に多く含まれている。温州みかんパウダーはじょうのう膜を含むため、ヘスペリジン含量も高い(1590mg/100g)。本実験では温州みかん

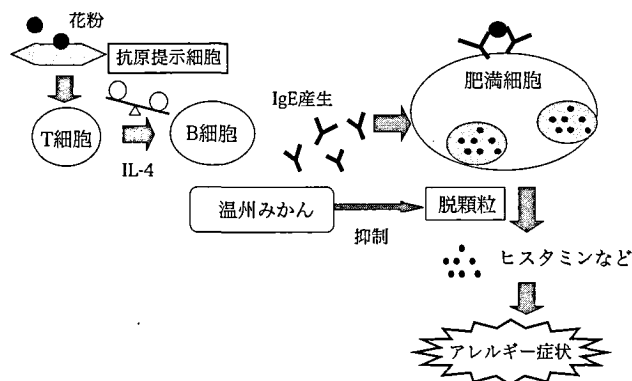


図1 花粉アレルギー発症メカニズムと温州みかんの抑制作用

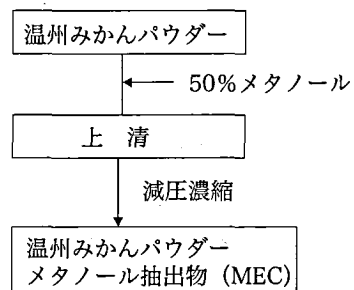


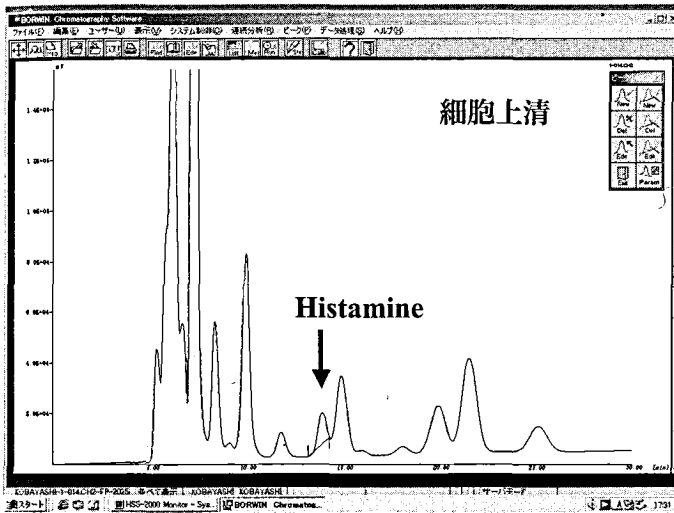
図2 温州みかんパウダーメタノール抽出物 (MEC) の調製

パウダーを50%メタノールで抽出し、その上清を減圧濃縮したものを温州みかんパウダーメタノール抽出物(MEC)として用いた(図2)。

**3. 温州みかんパウダーの花粉症患者好塩基球におけるヒスタミン遊離抑制作用<sup>9)</sup>**

まずは MEC が実際にヒトで効果が得られるかどうかを確認するため、ヒト好塩基球を用いたヒスタミン遊離抑制試験を確立した。花粉症

飛散時期に花粉症患者から採血し、好塩基球画分を分画した。好塩基球培養液に wortmannin を加えたものをポジティブコントロール、無添加のものをネガティブコントロールとし、それぞれ花粉抗原を添加しヒスタミンを放出させ、上清のヒスタミンを HPLC on-column 法で測定した(図3)。MEC を添加したものは、ネガティブコントロールの値に比べて、3例ともスギ花粉抗原刺激によるヒスタミン遊離が抑制されていたことから(図4)、ヒト好塩基球でもヒスタミンの遊離を抑制することが証明された。



**HPLC 条件**

カラム: Shodex Asahipak ODP-50 4E  
 カラム温度: 40°C  
 溶離液: 18%アセトニトリル-50mM 四ホウ酸ナトリウム, 1mM o-phthalaldehyde, 1mM N-acetyl-L-cysteine  
 流速: 0.5ml/min.  
 検出: 蛍光 (Ex 340nm, Em 450nm)  
 ヒスタミン retention time: 14.3分

図3 HPLC on-column 法によるヒスタミン測定

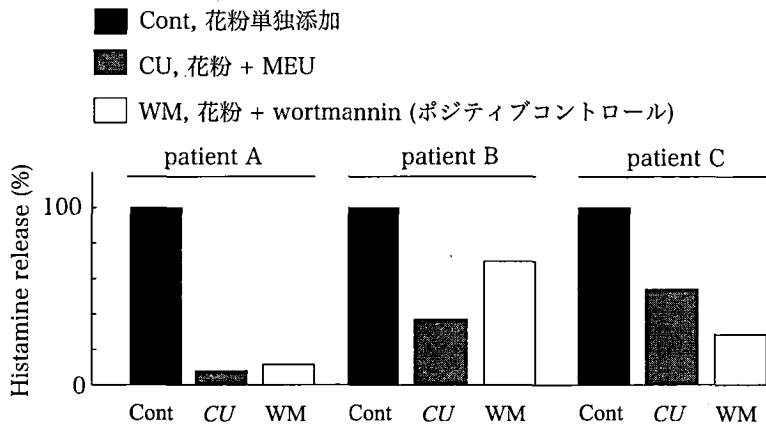


図4 MEC の脱顆粒抑制作用

4. 温州みかんパウダーの  
RBL-2H3 細胞脱顆粒抑制効果<sup>9)</sup>

患者由来の新鮮な全血を用いる検討では、メカニズム解明には实际的でないため、肥満細胞モデルである、ラット好塩基性白血球細胞株 RBL-2H3 細胞株を用いることにした。脱顆粒抑制試験の手順は図5の通りである<sup>10)</sup>。培養した RBL-2H3 細胞に抗 dinitrophenyl (DNP)-IgE 抗体を感作させ、被験サンプルを添加し10 分間プレインキュベーションした。その後、

DNP-human serum albumin (HSA) で抗原刺激し、脱顆粒を起こさせた。30 分後、回収した上清の  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ活性およびヒスタミン量測定を両方行った。 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼは脱顆粒の際にヒスタミンと同時に放出される酵素で、基質 (*p*-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside) と反応させた生成物を 405nm で簡便に測定できる。また、ヒスタミン量はヒト好塩基球を用いたヒスタミン遊離試験と同様の HPLC-on column 法で測定した。ヒスタミン遊離結果では、MEC は濃度依存的な阻害活性を示した (図6)。さらに添加濃度

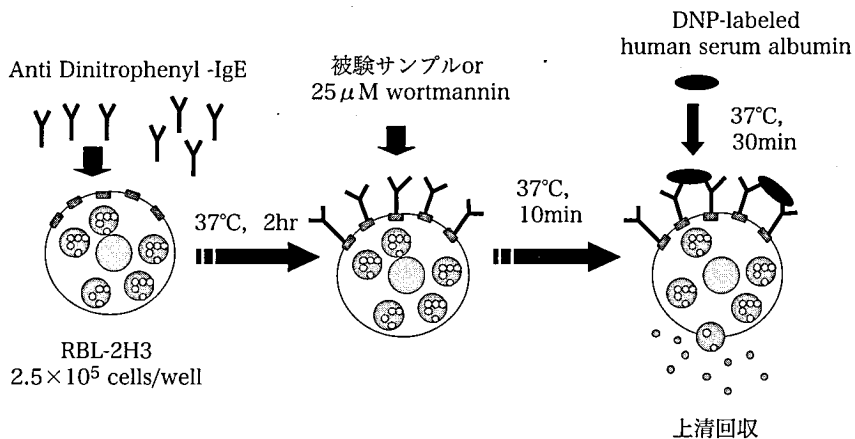


図5 RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制活性 測定法

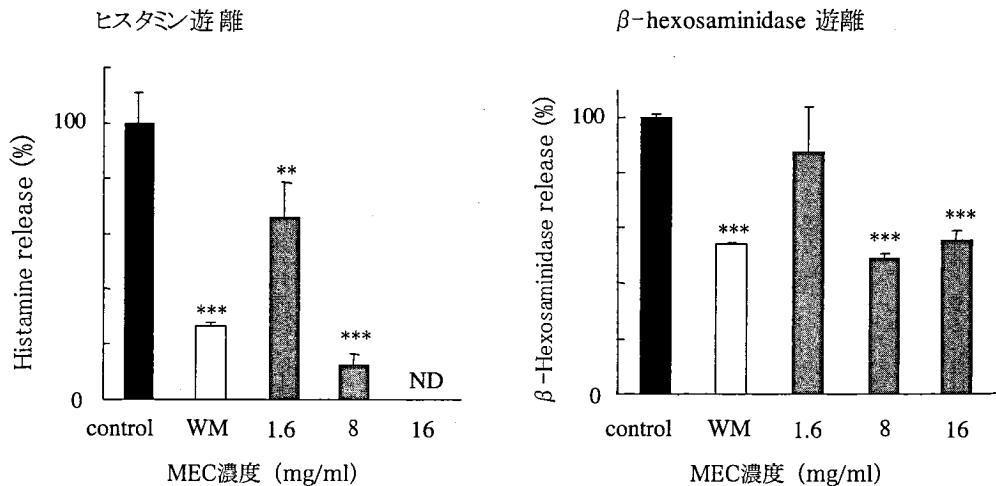


図6 MEC の RBL-2H3 細胞脱顆粒抑制活性

8mg/ml 以上では wortmannin よりも強い阻害活性を示した。 $\beta$ ヘキソサミニダーゼ遊離においても、MEC 添加濃度 8mg/ml と 16mg/ml で wortmannin 同等の阻害活性を示した。

次にパウダー中の活性成分を検討した。温州みかんには柑橘類特有のフラボノイドが含まれている。今まで報告のある主なフラボノイドを図7に示した。これらのフラボノイドを用いて同様の脱顆粒抑制試験を行った。その結果、ヒスタミン遊離および $\beta$ -ヘキソサミニダーゼともに、アグリコンであるノビレチンおよびヘス

ペレチンでは 500  $\mu$ M 添加で強い阻害活性を示したが、配糖体であるヘスペリジンは活性を示さなかった (図8)。

5. 脱顆粒抑制温州みかん含有フラボノイドの作用メカニズム<sup>9)</sup>

MEC に含まれるフラボノイドの脱顆粒抑制時における細胞内シグナル伝達機構を解明するため、RBL-2H3 の細胞内タンパク質のリン酸化状態について検討した。脱顆粒抑制試験後の RBL-2H3 細胞のタンパク質を抽出し、Luminex (日立ソフト社製) を用いた磁気ビーズ法にて細胞内タンパク質 Akt のリン酸化レベルを測定した (図9)。その結果、wortmannin、ノビレチン、ヘスペレチン添加では Akt のリン酸化が抑制された。一方、配糖体のヘスペリジンの抑制効果は低かった。図10にマスト細胞上の IgE レセプターである Fc $\epsilon$ RI を介するシグナル伝達について示した。今回の実験では、ノビレチンおよびヘスペレチンが wortmannin と同様に PI3 キナー

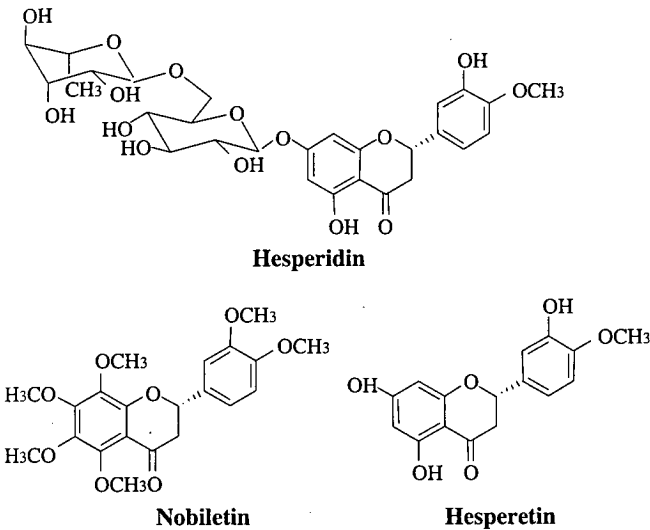


図7 MEC に含まれる主なフラボノイド

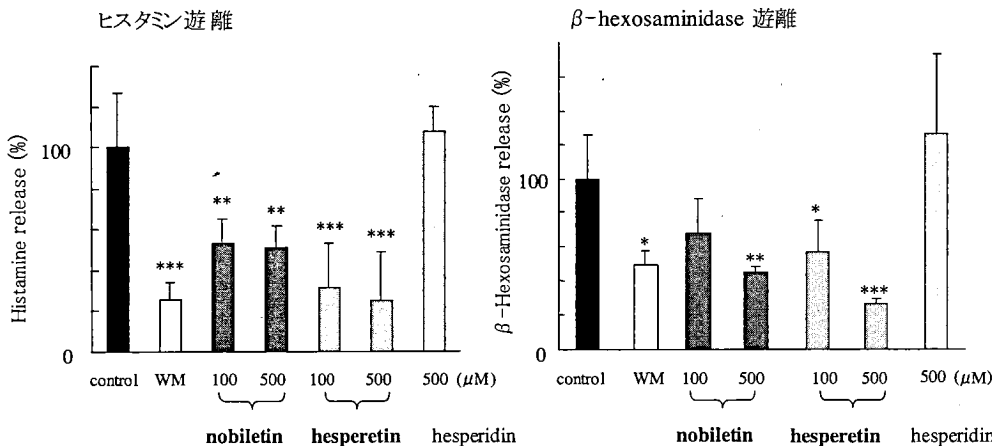


図8 MEC に含まれる化合物の脱顆粒抑制

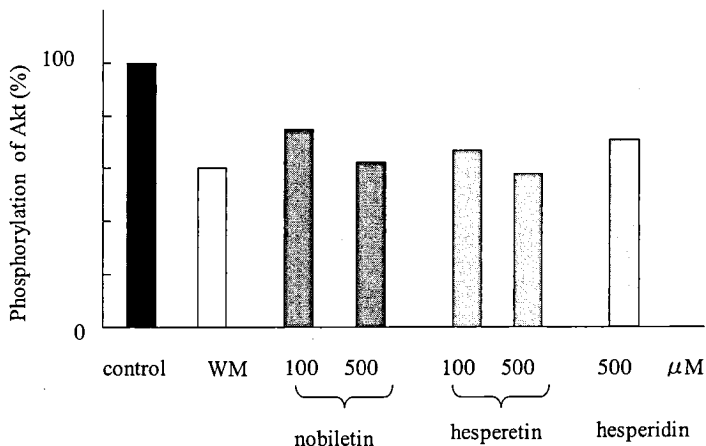


図9 フラボノイド添加によるリン酸化Akt濃度

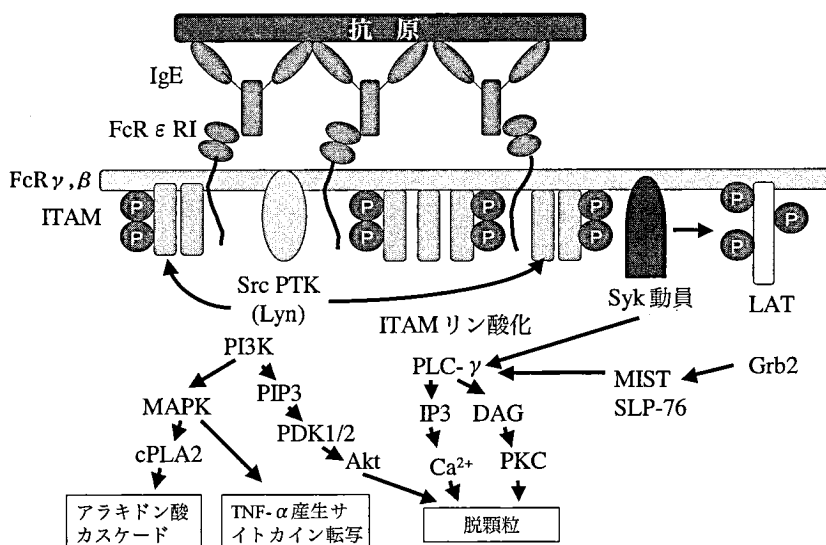


図10 マスト細胞のFcεRIを介するシグナル伝達  
 (「免疫学イラストマップ(鳥山一編), 羊土社(2004)」から一部改変)

下流のAktのリン酸化を抑制したことから、ヘスペレチンやノビレチンはPI3キナーゼを阻害することにより、アラキドン酸カスケード、TNF-α産生サイトカイン転写、脱顆粒のステップを抑制していることが示唆された。

## 6. 温州ミカンの脱顆粒抑制成分

温州みかんの脱顆粒抑制成分は *in vivo* での passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応測定から、配糖体フラボンであるヘスペリジンとされていた<sup>7)</sup>。しかし、近年 Park ら<sup>9)</sup> および Lee ら<sup>11)</sup> により、実際に生体内で抑制成分として働いているのはヘスペレチンであることが明らか

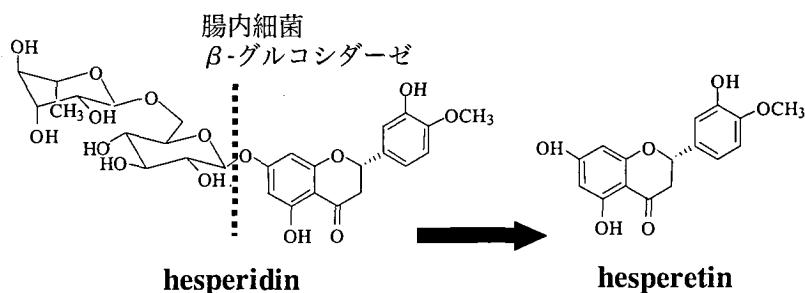


図11 ヘスペリジンの消化管内代謝

かとなった。我々の RBL-2H3 細胞を用いた実験においてもアグリコンであるヘスペレチンおよびノビレチンはヒスタミンの遊離を抑制したが、配糖体であるヘスペリジンに活性は認められなかった。温州みかんに含まれるフラボノイド含量を比較すると、圧倒的に配糖体のヘスペリジンが多く、ヘスペレチンやノビレチンは少量しか含まれていない<sup>12)</sup>。しかし、経口摂取した場合、温州みかんに多く含まれているヘスペリジンは腸内細菌の産生するグルコシダーゼにより、糖が切断され、ヘスペレチンとして吸収される(図11)<sup>8,11)</sup>。Lee ら<sup>11)</sup>は、ヒトの腸内細菌を分離後、温州ミカンの抽出液とインキュベートし、多くのヘスペレチンが生成することを確認した。また、ヘスペリジンを経口摂取したラットの尿中からは、ヘスペリジンは検出されず、ヘスペレチンのみが検出することを確認した。Ameer ら<sup>13)</sup>は、ヒトが柑橘系ジュースやヘスペリジンを経口摂取した場合、消化管内で容易にヘスペレチンに変換されることを報告している。また、フラボノイドの多くは、開環反応や水酸基のメチル化などを経て抱合・排出されるが、ヘスペレチンはアグリコンのまま血中に多く観察される<sup>14)</sup>。

以上のことから、温州みかんに含まれるヘスペリジンそのものに抗アレルギー作用はないが、経口摂取した場合、腸内細菌によって代謝され、アグリコンとなったヘスペレチンは高い活性を持つことが明らかとなった。今後、フラ

ボノイドの抗アレルギー作用は消化管内における腸内細菌の代謝や、安定性、腸管吸収機構等を含めた体内動態評価が重要であると考えられる。

#### おわりに

近年、植物性フラボノイドの抗アレルギー作用が注目されており、①好塩基球や肥満細胞からの IL-4 および IL-13 (B 細胞を IgE 産生細胞へ分化促進するサイトカイン) の産生を抑制するもの<sup>15,16)</sup>、②FcεRI(高親和性 IgE レセプター) 発現を抑制するもの<sup>17,18)</sup>、③ヒスタミン放出に関わる細胞内シグナル伝達を抑制するもの<sup>19)</sup>、④アラキドン酸カスケードを阻害するもの<sup>20)</sup>、などが次々と発見され、メカニズムも分子レベルで明らかにされている。特に緑茶のメチル化カテキンは②および③を抑制することが解明され、メチル化カテキンを多く含む花粉症症状改善を目的とした「べにふうき緑茶」が開発・商品化された。また、温州みかんに含まれるノビレチンは、シクロオキシゲナーゼ-2 タンパク質の発現を抑制することにより、プロスタグランジン E2 の産生を阻害し、炎症を抑制することが報告されている<sup>21)</sup>。今回我々が温州みかんから見出した抗アレルギー作用は③であるが、今後はさらに、温州みかんの抗アレルギー作用について、研究を進めていきたいと考えている。

..... 文 献 .....

- 1) 奥田稔編, 鼻アレルギー診療ガイドライン - 通年性鼻炎と花粉症 -, ライフサイエンス, 2002年版
- 2) 関係省庁了解, 今期における花粉症に関する政府の取り組み, 2005, <http://www8.cao.go.jp/cstp/kentoukai/torikumi.pdf>
- 3) 科学技術庁 (現文部科学技術省), 「スギ花粉症克服に向けての総合研究」成果報告書, 2000.
- 4) Sugiura M., Matsumoto H., and Yan, M., *J. Health Sci.*, **48**: 366-369 (2003)
- 5) Higashi-Okai K, Kamimoto K, Yoshioka A, and Okai Y, *Phytother. Res.* **16**: 781-784 (2002)
- 6) 吉川雅之, 食品と科学, **48**, 25-27 (2006)
- 7) Kubo M, Yano M, and Matsuda H, *Yakugaku Zasshi.*, **109**: 835-847 (1989)
- 8) Park S-H, Park E-K, and Kim D-H, *Planta Med* **71**: 24-27 (2005)
- 9) Kobayashi S, and Tanabe S, *Int J Mol Med*, **17**: 511-515 (2006)
- 10) Watanabe J, Shinmoto H, and Tsushida T, *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 1-6 (2005)
- 11) Lee N-K, Choi S-H, Park S-H, Park E-K, and Kim D-H, *Pharmacology*, **71**: 174-180 (2004)
- 12) 久保道徳, 藤田 忠, 西村幸容, 得永雅士, 松田秀秋, 我藤 雄, 友廣教道, 佐々木勝昭, 宇都宮直樹, *Natural Medicines*, **58**: 284-294 (2004)
- 13) Ameer B, Weintraub RA, Johnson JV, Yost RA, and Rouseff RL, *Clin Pharmacol Ther*, **60**: 34-40 (1996)
- 14) Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Edward S, Debnam ES, Srail SK, and Rice-Evans C, *FEBS Letters* **458**: 224-230 (1999)
- 15) Higa S, Hirano T, Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Suemura M, Kawase I, and Tanaka T, *J Allergy Clin Immunol*, **111**: 1299-1306 (2003)
- 16) Tachibana H, Kubo T, Miyase T, Tanino S, Yoshimoto M, Sano M, Yamamoto-Maeda M, and Yamada K, *Biochem Biophys Res Commun*, **280**: 53-60 (2001)
- 17) Yano S, Tachibana H, and Yamada K, *J Agric Food Chem*, **53**: 1812-1817 (2005)
- 18) Fujimura Y, Tachibana H, and Yamada Y, *FEBS Lett*, **556**: 204-210 (2004)
- 19) Maeda-Yamamoto M, Inagaki N, Kitaura J, Chikumoto T, Kawahara H, Kawakami Y, Sano M, Miyas, T, Tachibana H, and Kawakami T, *J Immunol*, **172**: 4486-4492 (2004)
- 20) Honma M, Minami M, Taniguchi C, Oka K, Moritra S, Niitsuma T, and Hayashi T, *Planta Med*, **66**: 88-91 (2000)
- 21) Murakami A, Nakamura Y, Torikai K, Tanaka T, Koshiba T, Koshimizu K, Kuwahara S, Takahashi Y, Ogawa K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Mimaki Y, Sashida Y, Kitanaka S, and Ohigashi H, *Cancer Res* **60**: 5059-66 (2000)