

博 士 論 文

天然物を利用した機能性食品開発に関する薬学的研究

Pharmaceutical research on development of functional foods
using natural products

2020年3月

孕石 梨愛

松山大学大学院医療薬学研究科

天然物を利用した機能性食品開発に関する薬学的研究

目次

総論の部

緒言	1
----	---

第1章 天然素材の成分解析に基づく特徴成分の探索

クルミの含有成分の解析	4
1-1 抽出・分離精製	6
1-2 化合物の同定	8
1-3 新規化合物の構造解析	
1-3-1 Glansreginin C の構造解析	10
1-3-2 Ellagic acid 4- <i>O</i> -(3'- <i>O</i> -galloyl)- β -D-xyloside の構造解析	13
1-3-3 Platycaryanin A methyl ester の構造解析	17
1-4 クルミ特徴成分の解析	
1-4-1 ナッツ類抽出物との成分比較	20
1-4-2 クルミ市販品中の glansreginin A の定量分析	22
1-4-3 Glansreginin A の抗炎症活性	23
1-5 小括	26

第2章 天然素材の特徴成分を指標にした製品化のための検討	
一機能性河内晩柑果汁の製品化における製法検討一	28
2-1 ジュース調製法による果汁中の柑橘機能性成分の比較	30
2-2 柑橘由来機能性成分の熱安定性	32
2-3 小括	35
まとめ	37
実験の部	41
謝辞	54
本研究に関する論文及び学会発表	55
参考文献	57
化合物番号	65

総論の部

緒言

超長寿社会の進む日本においては、医療保険財政の効率化が課題の一つとしてあげられ、医療機関における後発医薬品の使用促進や一般用医薬品（OTC 医薬品）の普及をはじめ、様々な取り組みがなされている¹⁾。国は「人生 100 年時代」に向けて、人づくり革命として、“高齢者から若者まで、全ての国民に活躍の場があり、全ての人が元気に活躍し続けられる社会、安心して暮らすことのできる社会をつくるためには”について議論がなされ、人生 100 年を見据えた方策を提言しつつある²⁾。それゆえ、健康寿命を延ばすための疾病予防、健康維持・増進のための施策のパラダイムシフトも推測される。このような背景の中、薬局・薬剤師も変革が求められ、「患者のための薬局ビジョン」として目指す姿が示されている¹⁾。具体的には、かかりつけ薬剤師・薬局の意義がより鮮明に示され、「①積極的な健康サポート機能」及び「②高度薬学管理機能を強化・充実すべき機能」として追及している。特に健康サポート機能については、これまでの薬剤師の役割に加え、地域に密着した健康情報の拠点として OTC 医薬品等の適正使用に関する助言や健康に関する相談、情報提供を行うなど、セルフメディケーションの推進のために薬局・薬剤師の活用を促進するとされる。

セルフメディケーション支援の一つに、健康食品の利用があげられる³⁾。健康食品と呼ばれるものについては法律上の定義は無く、広く健康の保持増進に資する食品として販売・利用されているもの全般を指す。現在、市場には多種多様の健康食品が存在するが、そのうち、国の制度として国が定めた安全性や有効性に関する基準等を満たした保健機能食品制度があり、一定の範囲で機能性を表示できる保健機能食品として、特定保健用食品、栄養機能食品、機能性表示食品がある（図）⁴⁾。これらの共通した特徴としては、すべてにその機能における関与成分を明示し、その含有が担保されていることがあげられる。2015 年より制度化された機能性表示食品は、事業者の責任において科学

的根拠に基づいた機能性を表示した食品で、販売前に表示の内容、食品関連事業者に関する基本情報、安全性及び機能性の根拠に関する情報、生産・製造及び品質の管理に関する情報、健康被害の情報収集体制その他必要な事項が消費者庁長官に届け出されたものである⁵⁾。2018年度の機能性表示食品の届出数は1,300件を超え、製品ごとに効果や安全性について国が審査・許可する特定保健用食品、さらに国が基準を定めている栄養機能性食品と、保健機能食品の選択肢が増えすぎ、消費者判断のみでの利用に限界が見えているのが現状である。



図. 健康食品の概要

健康食品の利用について、広島県では2005及び2015年に調査を行い報告している⁶⁾。調査結果をみると、購入先についてはドラッグストアが大半を占め、2015年ではその傾向がさらに約15%増加している。また、購入に際して製品情報の入手先を見ると、約半数が製品の記載情報とある。一方、医師・薬剤師のすすめは、2005年は0%であったものが2015年には約15%となっており、薬剤師の指導が徐々に浸透しつつあるが、健康食品においても安全・適正使用の観点から「薬学的管理」のできる薬剤師の役割として、今後さらにこの傾向を強くする必要性が感じられる。そのためには、薬剤師が製品の内容を科学的に理解し、様々な背景からその有効性や安全性に資するレギュラトリーサイエンスが実践できる能力が求められる。特に健康食品は天然物を利用しているもの

が多いため、天然物の特性を認識し、それを具体的に評価する品質保証のための知識が必須になる。

このような背景から、本研究では機能性食品のレギュラトリーサイエンスに関する研究の一環として、天然物を利活用した機能性食品の開発について、1) 天然素材の成分解析に基づく特徴成分の探索、2) 特徴成分を指標にした製品化のための品質評価について、分子を指標とする薬学的研究を目的に検討を行った。具体的には、1) では世界中で食されているクルミを天然素材として選択し、その本質を明らかにするための成分解析及び特徴的に含まれる成分について精査し、さらに特徴成分とした化合物の生物活性について検討した。2) の成分を指標にした製品化のための検討については、河内晩柑果実を2種の搾汁法（ベルト式圧搾法、JBT法）で調製した製品（ジュース）中の機能性成分（3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, nobiletin, auraptene, naringin, narirutin）の含量を比較し、関与成分に応じた製品化における優位な調製法について検討を行った。

第1章 天然素材の成分解析に基づく特徴成分の探索

－クルミ含有成分の解析－

クルミはクルミ科 (Juglandaceae) クルミ属 (*Juglans*) 植物の堅果中の種子 (仁) の総称で, それを加工したものが栄養価の高いナッツ類の一つとして世界中で食されている (Fig. 1). クルミの種類はいくつかあり, そのうちペルシャグルミ (*Juglans regia* L.) 由来のものが他の種に比べて果実が大きく殻が割れやすいため果樹として営利栽培されている. クルミの生産はアメリカのカリフォルニア州が最も多く, 世界生産の約4割を占め, 次いで中国, トルコの順である⁷⁾. 中国では胡桃仁 (コトウニン) と称し, 薬用として滋養強壮や鎮咳作用などの効能があるとされる⁸⁾.



Fig. 1. Walnut (the Seed of *J. regia*)

クルミの栄養成分をみると, 脂質, たんぱく質, 炭水化物がクルミ 100 g 当たり, それぞれ 68.8 g, 14.6 g, 11.7 g とされ, 脂質が高含量であることがわかる. 脂質の組成は, リノール酸, オレイン酸, α -リノレン酸などの不飽和脂肪酸が多く, その他, アミノ酸,

ビタミン，ミネラル，食物繊維が適量含まれるバランスのとれた食品である^{9,10}。栄養成分以外においては，gallic acid, ellagic acid 等の低分子ポリフェノール類の他，pedunculagin, tellimagrandin I 等の加水分解性タンニンといったポリフェノール類の含有が報告されている^{11,12}。

クルミの生物活性としては，心血管疾患^{13,14}，冠状動脈性心疾患¹⁰，糖尿病¹⁵，肝障害¹⁶，高脂血症及びメタボリックシンドローム¹⁷，炎症¹⁸，アルツハイマー病^{19,20}等の疾患リスクの軽減，及び，腸内環境や代謝の維持^{21,22}等の報告がある。これらの活性には，含有する脂肪酸やポリフェノール類の寄与が考察されている。このように，クルミは様々な活性を有する優れた天然素材であるが，一方で，その二次代謝物に関する報告は少ない。天然素材を利用した機能性食品の開発には，その素材に特徴的な成分の含有を担保に品質評価することが求められてきている。機能性素材としてクルミに着目する場合，その指標となる成分の特徴づけが必要であるが，それを目的とした研究は見あたらない。本研究では，機能性素材としてクルミに着目し，素材に特徴的な成分の解析を目的に含有成分を精査し，3種の新規化合物を含む計30種の化合物を単離，構造解析した。また，クルミの指標に成り得る特徴成分を明らかにするため，他のナッツ類エキスと高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による成分比較を行い，glansreginin A（GA）をクルミに特徴的な成分として見出した。さらに，市販されているクルミ中のGAの含有量を分析し，それらの熱安定性について検討した。次に，クルミ特徴成分としたGAの生物活性について，リポ多糖（LPS）誘発全身性炎症モデルマウスを用いて，脳内の抗炎症を介した脳保護作用を検討した。

本章では，クルミ含有成分の単離と新規化合物の構造解析，指標成分の解析と定量分析，及び特徴成分としたGAの脳保護作用について述べる。

1-1 抽出・分離精製

クルミに特徴的な成分を明らかにするため、二次代謝物として含有する紫外線 (UV) 照射検出成分について精査した。クルミの市販品を 80%メタノール (MeOH) でホモジナイズし、ろ過後、ろ液を濃縮しクルミ含水 MeOH エキス (総エキス) を得た。得られた総エキスについて、Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーを行い、各画分を得た (Fig. 2)。得られた各画分について、逆相 HPLC (RP-1) による分析を行った (Fig. 3)。HPLC クロマトグラムをみると、水分画物以外の画分にピークが観察されたため、これらの画分 (10%~50% MeOH 溶出部及び MeOH 溶出部) について、分離精製を試みた。

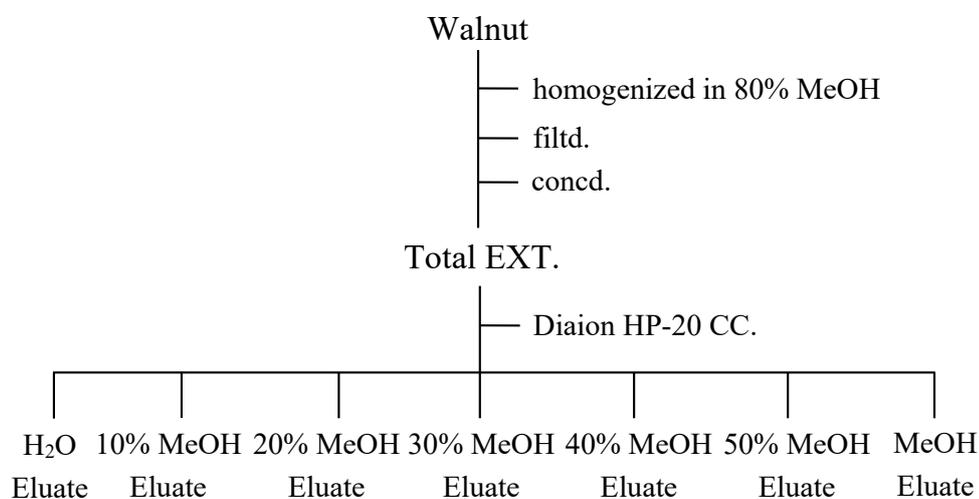


Fig. 2. Extraction and fractionation procedure of walnut

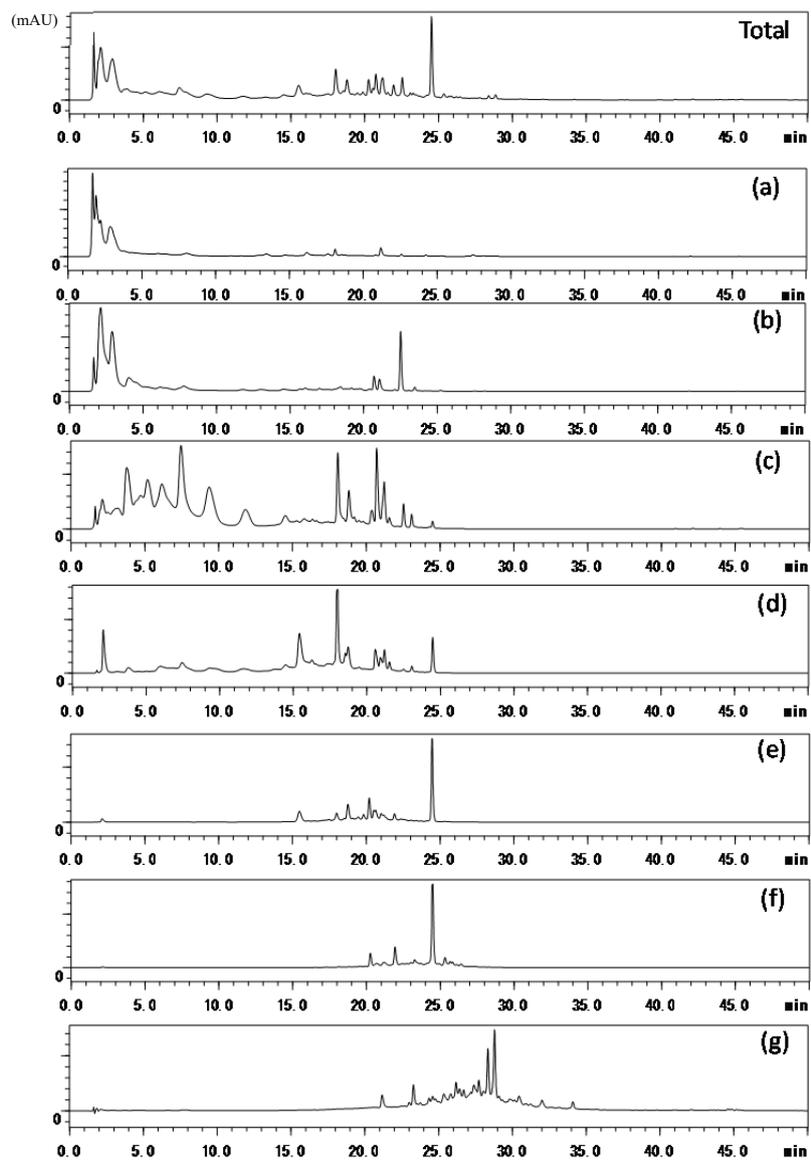


Fig. 3. HPLC chromatograms of fractions from walnut (254 nm; condition, RP-1).

Total: Total Ext., (a): Diaion HP-20 H₂O Eluate, (b): 10% MeOH Eluate, (c): 20% MeOH Eluate, (d): 30% MeOH Eluate, (e): 40% MeOH Eluate, (f): 50% MeOH Eluate, (g): MeOH Eluate.

1-2 化合物の同定

10%~50% MeOH 溶出部及び MeOH 溶出部について、各種カラムクロマトグラフィ（Chromatorex ODS, Sephadex LH-20, Toyopearl HW-40F, YMC GEL ODS）による分離精製を繰り返し、新規化合物 3 種 [glansreginin C (**1**), ellagic acid 4-*O*-(3'-*O*-galloyl)- β -D-xyloside (**2**), platycaryanin A methyl ester (**3**)], 既知化合物 27 種 [glansreginic acid (**4**)^{12, 23}], glansreginin A (**5**)¹², methyl gallate (**6**), ellagic acid (**7**)²⁴, (+)-catechin (**8**)²⁵, blumenol C glucoside (**9**), byzantionoside B (**10**)²⁶, 4'-dihydrophaseic acid β -glucopyranose ester (**11**)²⁷, 5-hydroxytryptamine (**12**)²⁸, valoneic acid dilactone methyl ester (**13**)²⁹, ellagic acid 4-*O*- β -D-xyloside (**14**)³⁰, glansreginic acid 8-*O*- β -D-glucoside (**15**)³¹, glansreginin B (**16**)¹², 1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (**17**), 1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (**18**), 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (**19**)³², strictinin (**20**), isostrictinin (**21**)³³, tellimagrandin I (**22**), tellimagrandin II (**23**)³⁴, casuarictin (**24**), pedunculagin (**25**)³⁵, pterocarinin C (**26**)³⁶, rugosin C (**27**)³⁷, rugosin C methyl ester (**28**), casuarinin (**29**)³⁵, euprostin A (**30**)³⁸] の計 30 種の化合物を得た (Fig. 4). 既知化合物については、HPLC による標品との直接比較または各種スペクトルデータの文献値との比較により同定した。また、既知化合物のうち 6 種 [glansreginic acid (**4**), blumenol C glucoside (**9**), byzantionoside B (**10**), 4'-dihydrophaseic acid β -glucopyranose ester (**11**), glansreginic acid 8-*O*- β -D-glucoside (**15**), pterocarinin C (**26**)] についてはクルミからはじめて単離された。

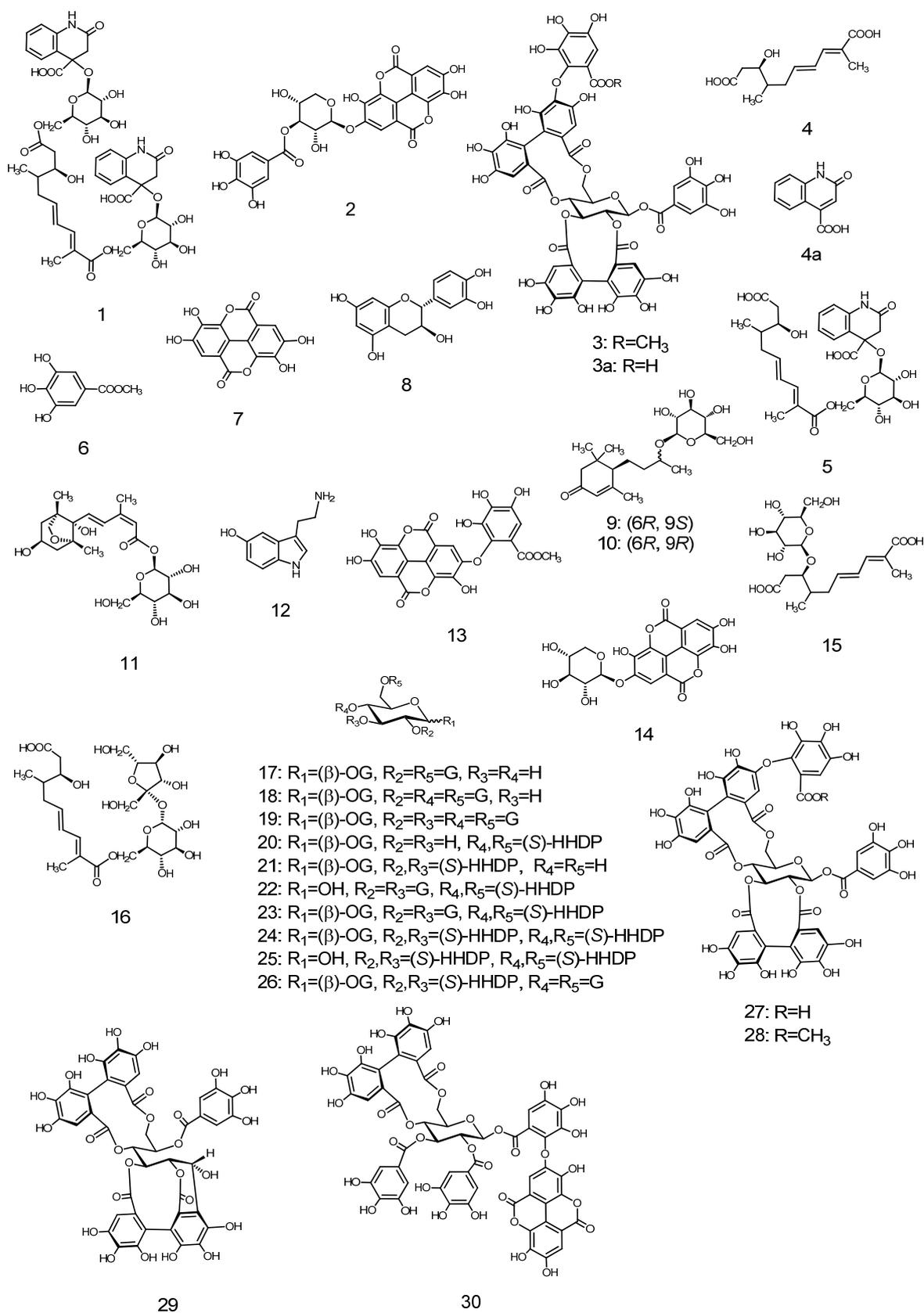
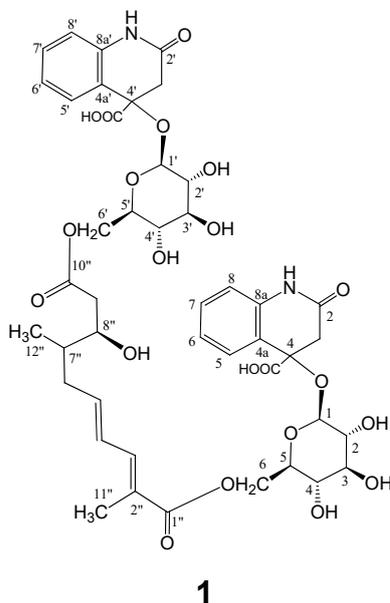


Fig. 4. Structures of compounds 1-30

1-3 新規化合物の構造解析

1-3-1 Glansreginin C の構造解析



Glansreginin C (**1**) は褐色無晶形粉末として得られ、高分解能 (HR)-ESI-MSの測定結果より、 m/z 943.2973に[M-H]⁻イオンピークを示し、分子式C₄₄H₅₂O₂₁N₂の化合物であることが示された。また、UVスペクトルにおいて、213, 264 nmに極大吸収が観察された。

¹H-NMRスペクトル (Fig. 5) において、2つの1,2-置換ベンゼン及び孤立メチレンに由来するプロトンシグナル [δ 6.86, 6.91, 7.03, 7.05, 7.28, 7.31, 7.39 (2H) , 3.17 (4H)] とβ-グルコースに由来するシグナルが観察され、これらは¹H-¹H correlation spectroscopy (COSY) 及びheteronuclear single quantum coherence (HSQC) の測定結果からも支持された。これらの他に互いにカップリングしたオレフィンプロトン (δ 6.22, 6.52, 7.22) , メチレン [δ 2.13, 2.47, 2.54 (2H)] , メチン (δ 1.75, 4.09) , メチルプロトン (δ 0.99) がビニルメチルプロトン (δ 1.94) のシグナルとともにそれぞれ観察された。これらのスペクトルデータは、glansreginin A (**5**)¹²⁾ のものと類似しており、その他のシグナルデータを考え合わせると、**5**の構造にA部分がさらに1つ含む構造が推定された。**1**の構造

は、 ^{13}C -NMRスペクトル (Fig. 6) , さらに酸加水分解の結果, glansreginic acid (4) 及び 4aを確認したことからも支持された。

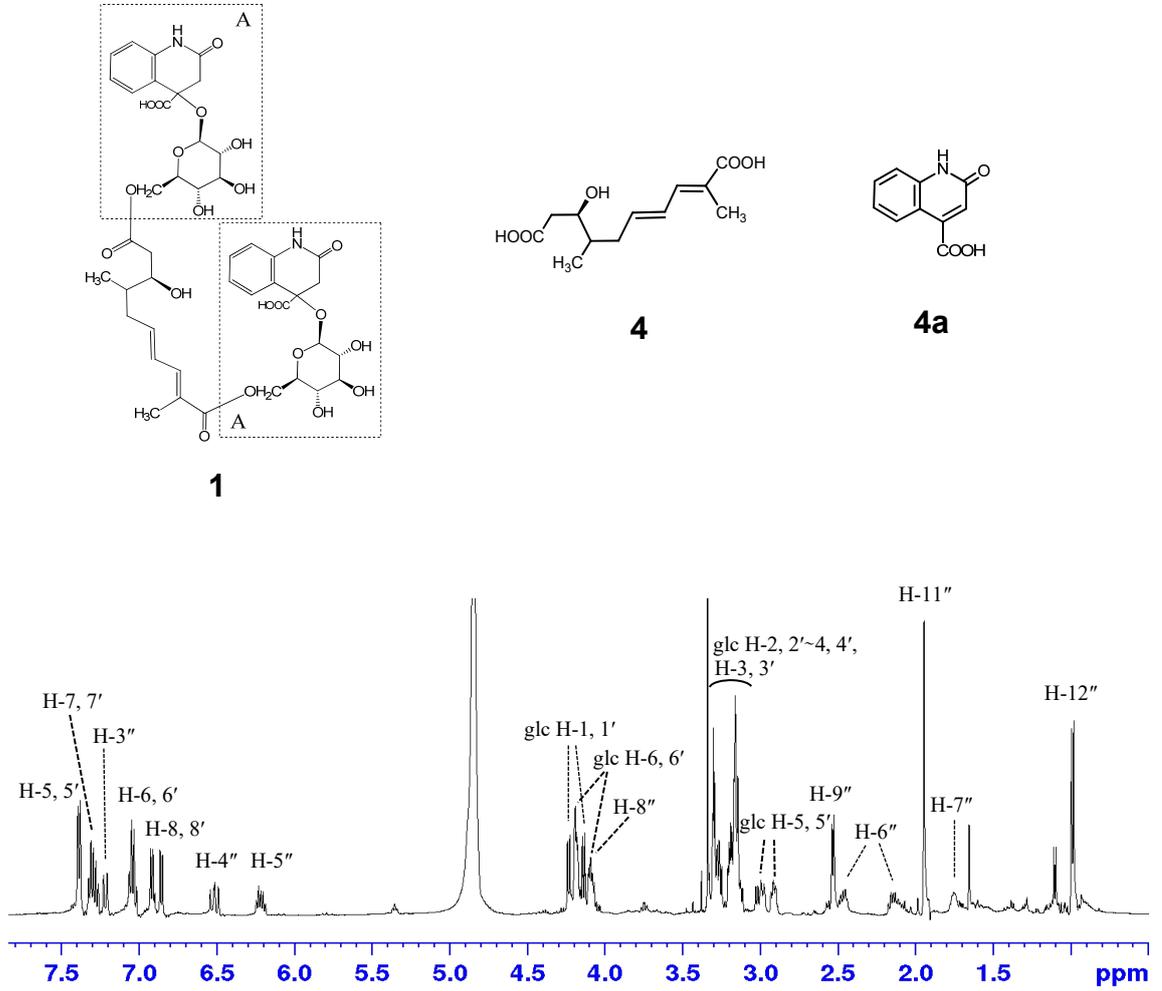


Fig. 5. ^1H -NMR spectrum of **1** (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

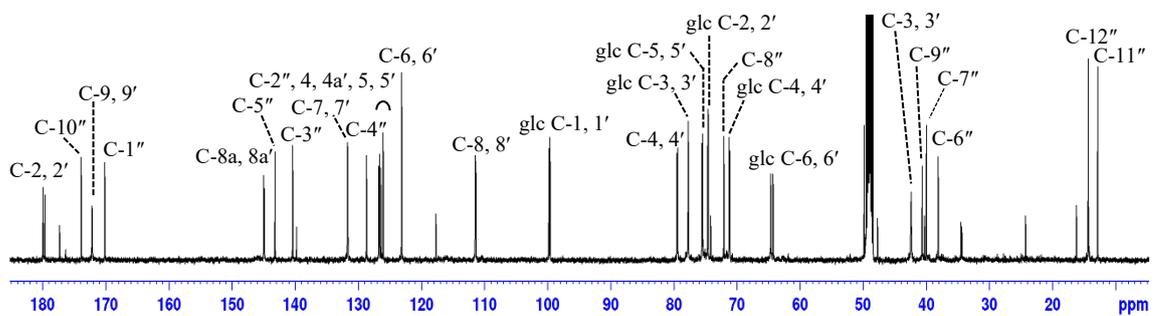


Fig. 6. ^{13}C -NMR spectrum of **1** (126 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

構成糖については、既報³⁹⁾に従い、L-cysteine methyl esterと*o*-tolyl isothiocyanateを用いた糖分解物の誘導体化を試み、HPLC分析 (RP-2) によりD-glucoseであることを確認した。各ユニットのつながりを明らかにする目的で、heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) スペクトルを測定した結果、グルコースのH-1, 1'位 (δ 4.14, 4.23) からA部分のC-4, 4'位 (δ 79.4, 79.5) への相関と、グルコースH-6, 6'位 (δ 4.09, 4.19) からC-1''位及びC-10''位 (δ 170.1, 173.9) への相関が認められた (Fig. 7)。Glucoseの結合様式については、それぞれH-1位のカップリング定数がともに $J = 8.0$ Hzであったことから、 β 配置であることが支持された。なお、C-4, 4'及びC-7''における絶対配置については未確定である。

以上のデータに基づき、特異な長鎖構造をもつジカルボン酸誘導体である本化合物の構造を **1** のように決定し、glansreginin C と命名した。

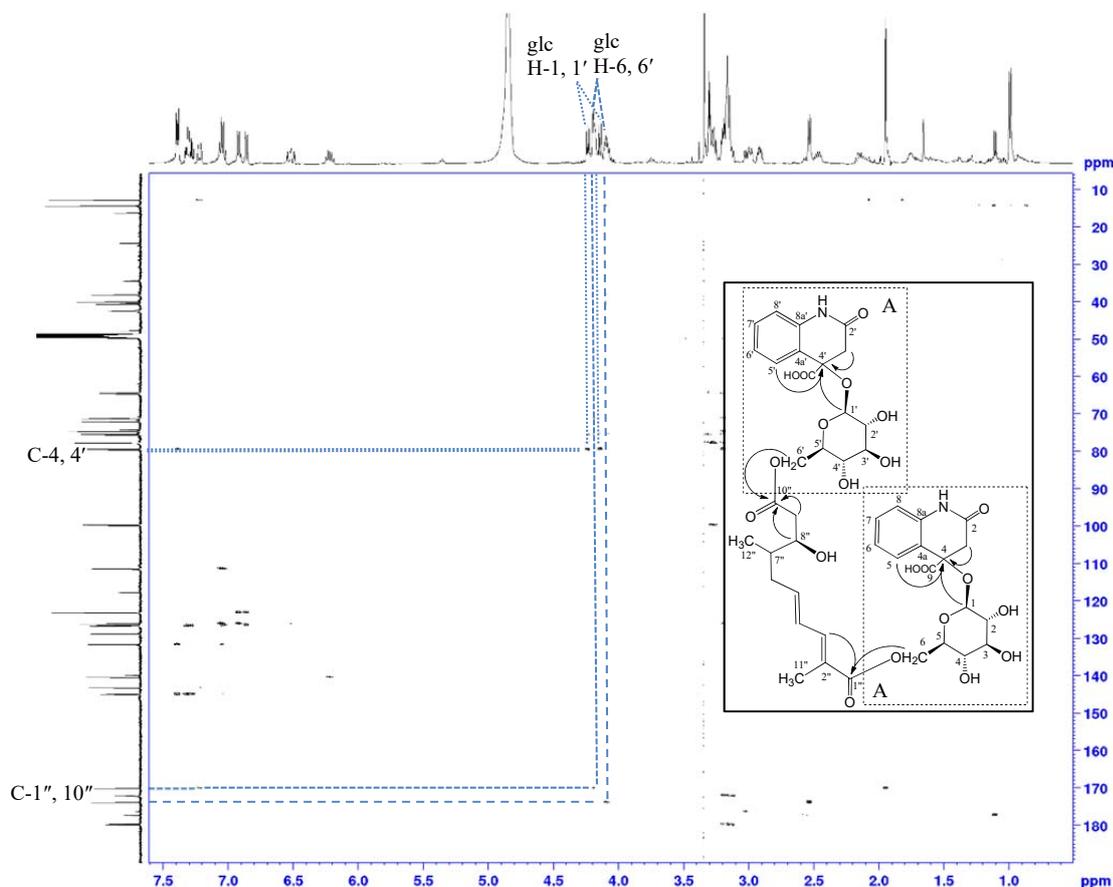
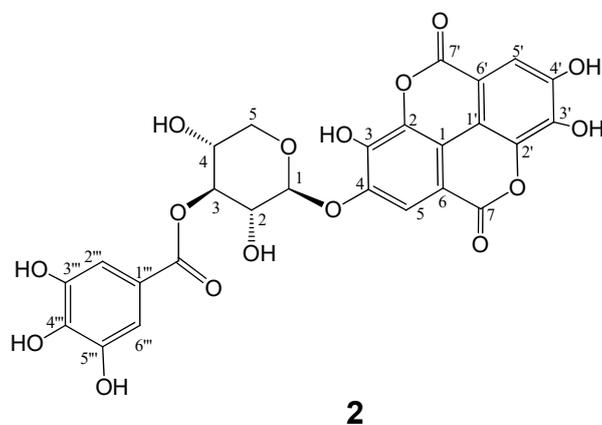


Fig. 7. HMBC spectrum of **1** (500 MHz, MeOH-*d*₄)

1-3-2 Ellagic acid 4-*O*-(3'-*O*-galloyl)- β -D-xyloside の構造解析



Ellagic acid 4-*O*-(3'-*O*-galloyl)- β -D-xyloside (**2**) は淡褐色無晶形粉末として得られ、HR-ESI-MS の測定結果より m/z 580.0522 に[M-H]⁻イオンピークを示し、分子式 C₂₆H₁₈O₁₆ であることが示された。また、UV スペクトルにおいて ellagic acid ユニットに特徴的な 343, 275, 213 nm に極大吸収が観察された。

¹H-NMR (Fig. 8) 及び ¹³C-NMR スペクトル (Fig. 9) において、ellagic acid に由来する芳香族領域の 1H 分のプロトンシグナル (δ 7.47, 7.74) 2つ、12 個の芳香族炭素及び 2 個のカルボニル炭素 [δ 107.3, 109.9, 111.7, 113.6, 113.7, 116.8, 138.0 (2C), 141.4, 145.4, 149.0, 150.1, 161.4, 161.6] が観察された。また、galloyl 基に由来する芳香族領域の 2H 分のプロトンシグナル (δ 7.16), 6 つの芳香族炭素と 1 つのカルボニル炭素 [δ 110.5 (2C), 121.7, 139.8, 146.4 (2C), 168.2], 及び 5 単糖に由来する 5 つのプロトンシグナルと炭素シグナルが観察された。また、HSQC 及び HMBC スペクトル (Fig. 10) の相関においても、ellagic acid ユニットと galloyl 基を有することが支持された。

5 単糖については、¹H-¹H COSY 及び ¹³C-NMR スペクトルのシグナルより、xylose 由来のものと一致した。そこで、既報³⁹⁾に従い、酸分解後、糖を誘導体化して HPLC 分析 (RP-2) した結果、構成糖は D-xylose であることを確認した。結合様式については、

H-1 位のカップリング定数が $J = 7.5$ Hz であったことから、 β 配置であることが示された。各ユニットのつながりについて、HMBC スペクトルの測定の結果、xylose の H-1 (δ 5.07) から ellagic acid の C-4 位 (δ 149.0), xylose の H-3 位 (δ 5.21) から galloyl 基の C-7'' 位 (δ 168.2) に、それぞれ 3-bond coupling の相関が観察された (Fig. 11)。また、rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy (ROESY) の測定から、xylose の H-1 (δ 5.07) と ellagic acid 部分の H-5 (δ 7.74) に相関が見られ、空間的に近接していることが示唆された。

以上のデータに基づき、**2** の構造を ellagic acid 4-*O*-(3'-*O*-galloyl)- β -D-xyloside と決定した。

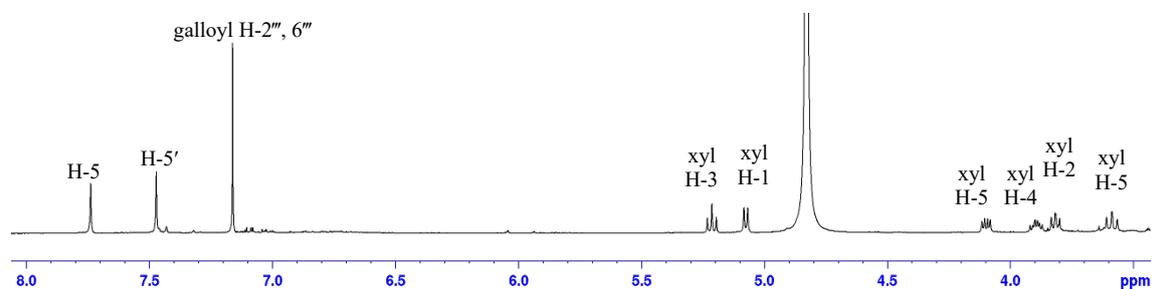


Fig. 8. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **2** (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

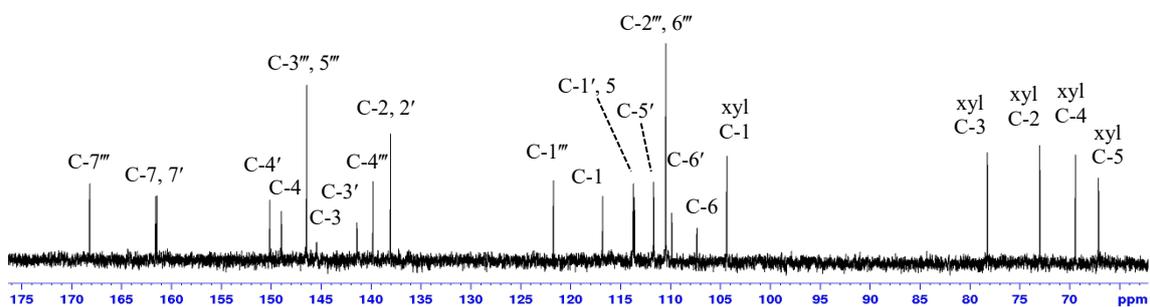


Fig. 9. ^{13}C -NMR spectrum of **2** (126 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

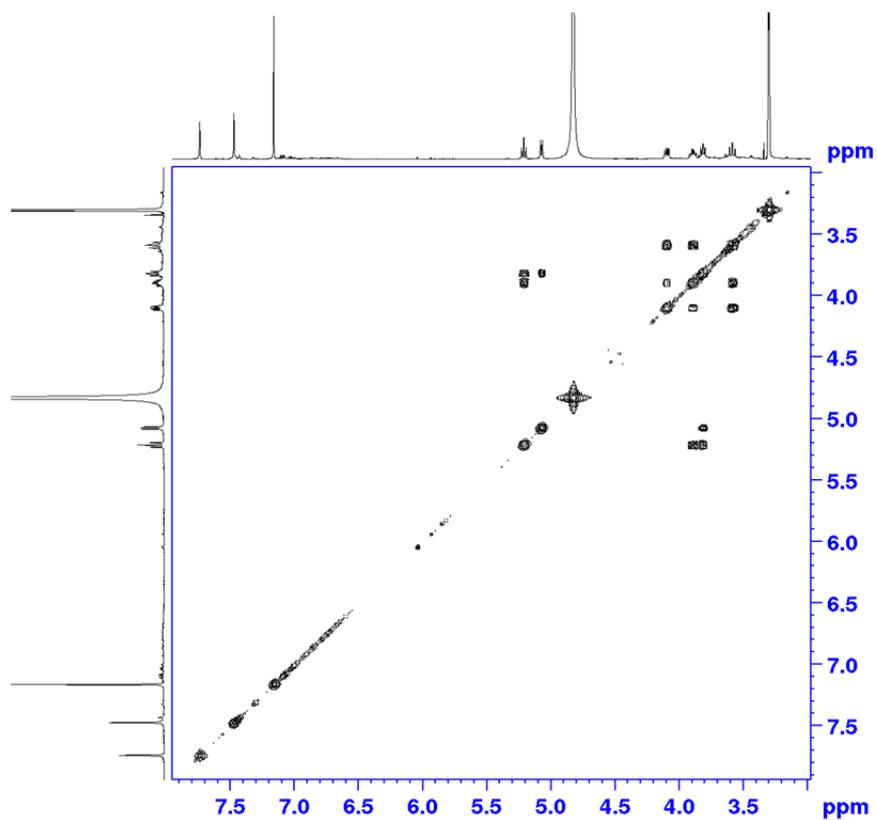


Fig. 10. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum of **2** (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

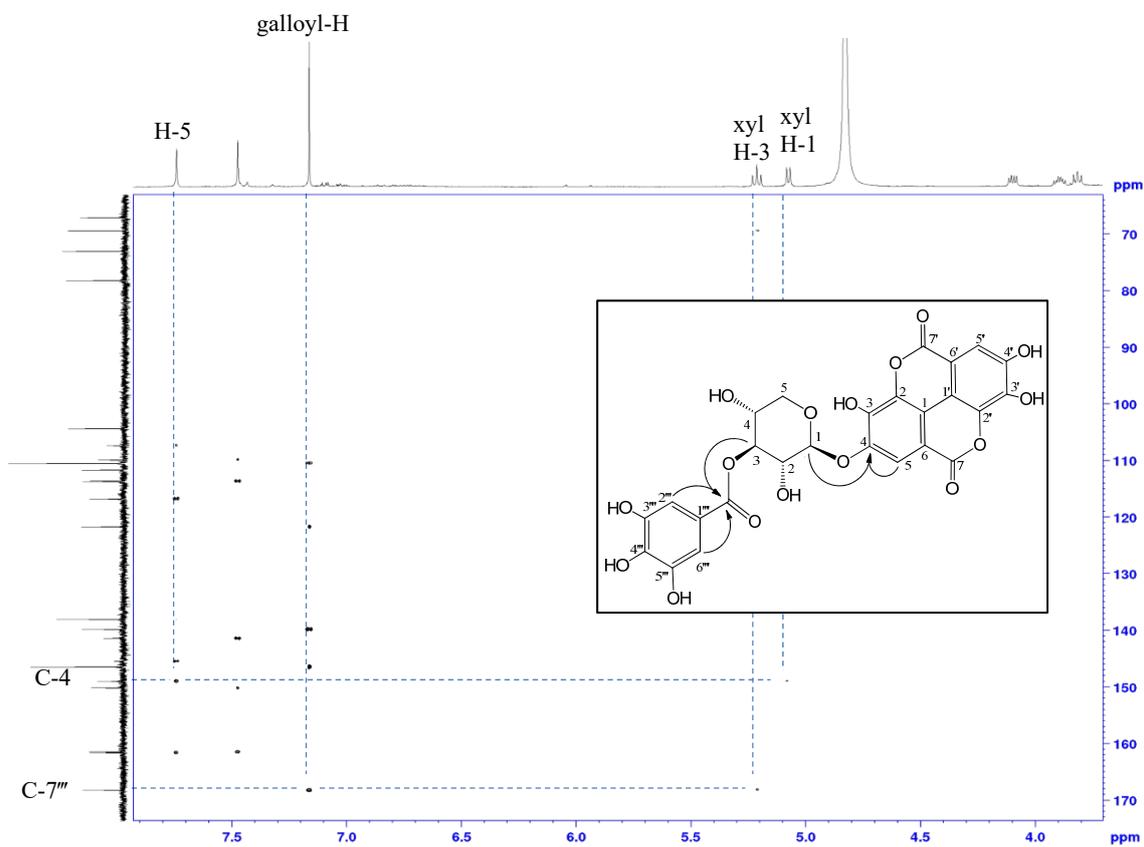
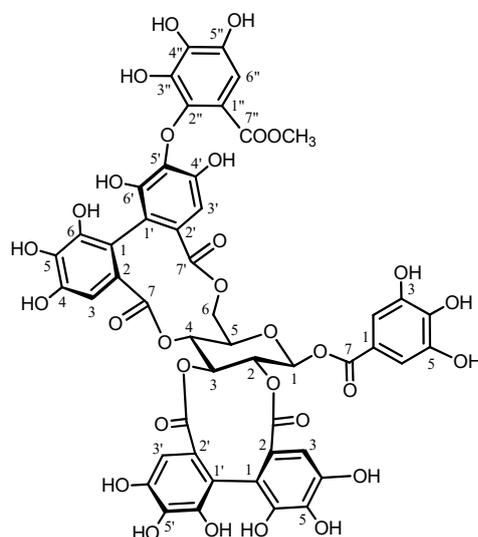


Fig. 11. HMBC spectrum of **2** (500 MHz, MeOH- d_4)

1-3-3 Platycaryanin A methyl ester の構造解析



3

Platycaryanin A methyl ester (**3**) は、褐色無晶形粉末として得られ、HR-ESI-MS の測定結果より、 m/z 1117.1002 に[M-H]⁻イオンピークを示したことから、分子式は C₄₉H₃₄O₃₁ であることが示された。また、UV スペクトルにおいて 280, 222 nm に極大吸収が観察された。

¹H-NMR スペクトル(Fig. 12)において、芳香族領域に galloyl 基由来のシグナル(δ 7.16, 2H, s) 及び hexahydroxydiphenoyl (HHDP) 及び tergalloyl 基由来のシグナル [δ 6.87, 6.59, 6.57, 6.46, 6.39 (各 1H, s)] と 6 単糖のプロトンシグナルが観察され、クルミから単離報告のある tergalloyl 基を有する platycaryanin A (**3a**)⁴⁰⁾ とほぼ類似したシグナルパターンを示した。異なる箇所をみると、¹H-NMR 及び ¹³C-NMR スペクトル(Fig. 13)において、メトキシ基 1 個に相当するシグナル (δ_H 3.82, δ_C 52.9) が観察されることから、**3a** のメチルエステル体であることが示唆された。Tergalloyl 基はリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で、Smiles 転位反応により valoneoyl 基へ異性化することが知られており⁴¹⁾、**3** についても valoneoyl 基に置き換わった rugosin C methyl ester (**28**) へ異性化することが

考えられる. そこで, **3** をリン酸緩衝液中 (pH 7.4), 室温下で反応し, 逆相 HPLC (RP-3) でモニターしたところ, 反応開始 3 時間後に **28** と一致したピークを確認した (Fig. 14).

一方で, 本分離精製には含水 MeOH を使用して行っており, それゆえ **3** は **3a** の抽出及びカラム操作等の調製時に生じたアーティファクトの可能性もある. そこで, クルミ原料について MeOH を使用しない条件 (70%含水アセトン) で抽出し, その抽出物について HPLC 分析を行った. その結果, **3** に相当するピークが観察されたことから, 本化合物は天然物であることが示唆された.

以上のデータにより, **3** の構造を platycaryanin A methyl ester と決定した.

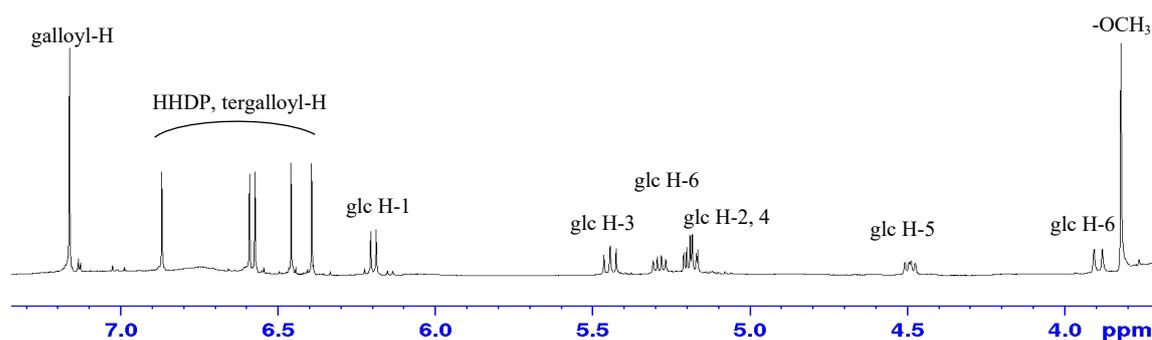


Fig. 12. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **3** (500 MHz, Acetone- d_6 + D_2O)

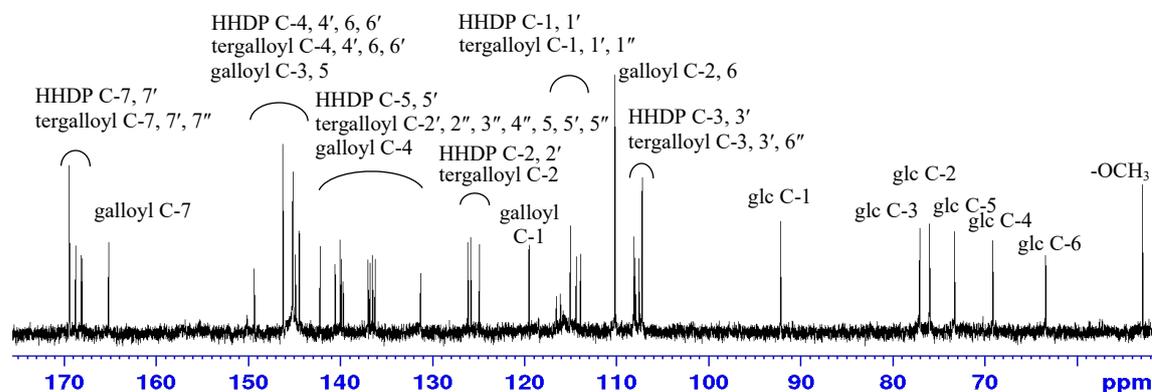
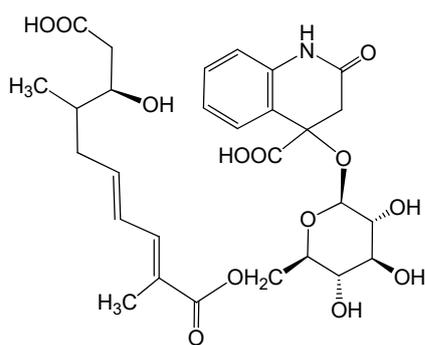


Fig. 13. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of **3** (126 MHz, Acetone- d_6 + D_2O)

1-4 クルミ特徴成分の解析

1-4-1 ナッツ類抽出物との成分比較

クルミ含有成分として30種の化合物を明らかにした。そこで、それら化合物をもとに、クルミに特徴的な成分を検討することとした。入手した6種のナッツ類（アーモンド、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ、カシューナッツ、ピーカンナッツ、マカダミアナッツ）について、クルミ抽出物とHPLC（RP-4）による成分比較を行った。各種溶媒で試料調製をし、適切な分析条件について検討したところ、50% MeOHで調製したエキスで、クルミにのみ顕著に認められるピークが保持時間25分付近に観察された（Fig. 15）。これまで同定した化合物を標品とし照合させたところ、このピークは、glansreginin A (**5**) であることが明らかとなった。本ピークは他のナッツ抽出物において主ピークとして観察されず、また**5**はクルミから単離、構造決定されている化合物であることから¹²⁾、クルミに特徴的な成分としてクルミ製品の開発の際の指標になり得ることが示唆された。



5

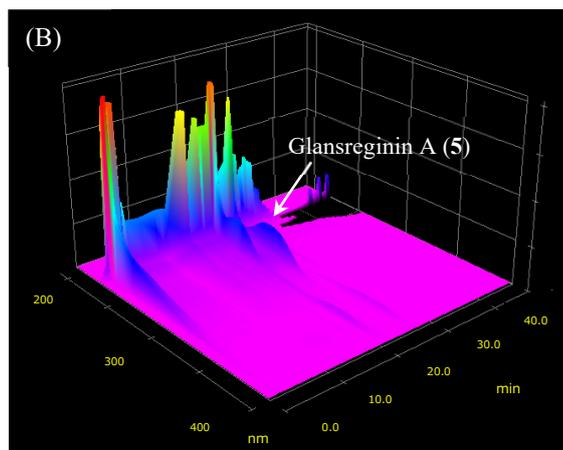
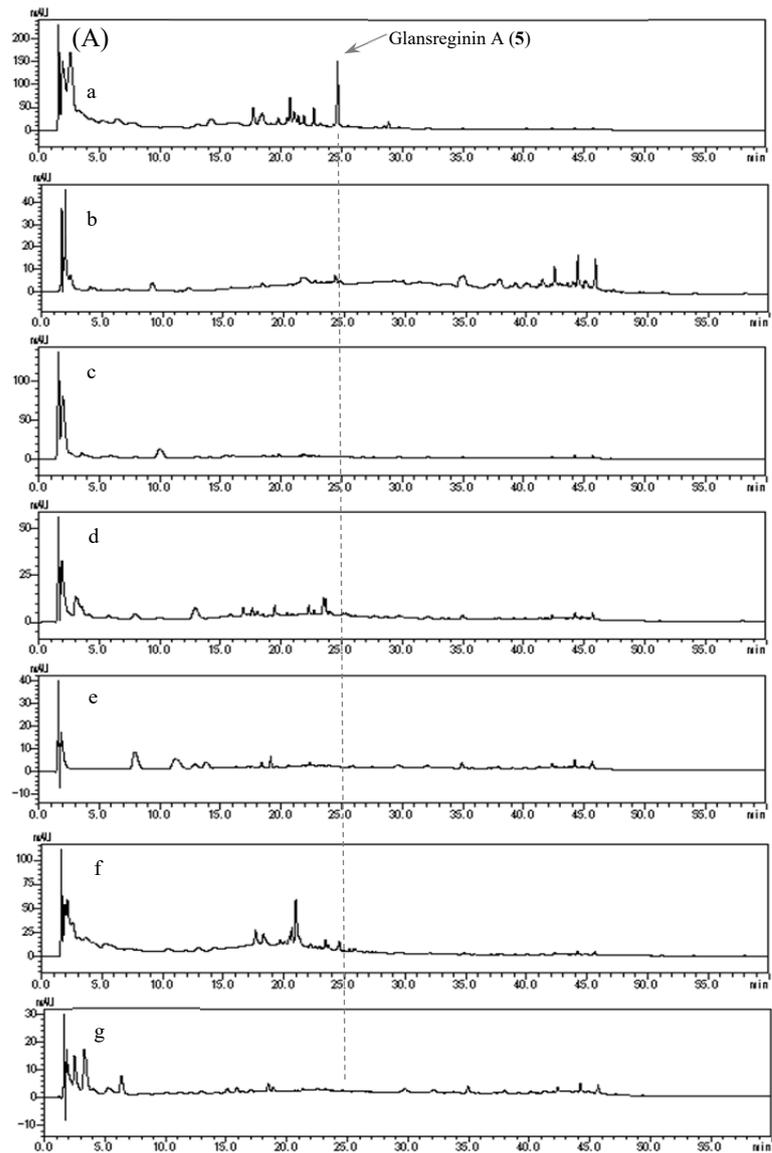


Fig. 15. HPLC chromatograms of nut extracts (RP-4)

(A) a: walnut, b: almond, c: pistachio, d: hazelnut, e: cashew nut, f: pecan nut, g: macadamia nut

(B) 3D chromatogram detected at 200-400 nm of walnut extract.

1-4-2 クルミ市販品中の glansreginin A の定量分析

クルミ特徴成分として見出したglansreginin A (GA) (5) について、クルミ市販品中の含有を確認するため、市販の生クルミ2製品（製品A, B）、これらをオーブンでローストしたもの（製品A', B'）、さらに市販のローストクルミ2製品（製品1, 2）について、50% MeOHで抽出した試料溶液を調製し、HPLC分析（RP-4）による絶対検量線法により定量分析を行った。標品は、単離したGAを用いた。その結果、クルミ1 g中のGAの量は0.77～1.14 mg/gとなり、すべての試料で定量値が算出できることが確認できた。

生クルミとオーブンでローストしたものを比較すると、熱処理によるGAの定量値への影響はなく、熱に安定であることが示唆された。また、クルミ1粒中のGAの量は1.76～2.81 mgであることが明らかとなった（Table 1）。

本結果から、クルミ市販品における定量分析が可能であることが示され、GAがクルミの指標となる特徴成分として支持された。

Table 1. Amounts of glansreginin A in commercial walnuts

	Products	GA (mg/g)	Average weight of a walnut (g)	GA in a walnut (mg/piece)
Raw walnuts	A	0.77	2.86	2.20
	B	1.10	2.54	2.81
Roasted walnuts	A'	0.94	2.65	2.50
	B'	1.04	2.34	2.44
	1	0.83	2.13	1.76
	2	1.14	2.24	2.56

1-4-3 Glansreginin A の抗炎症活性

クルミの特徴成分としてglansreginin A (GA) (5) が示唆され、それゆえ、これを分析評価することでクルミ由来の素材であることを担保することができる。一方で、本研究では、GA自体の生物活性についても検討することとした。活性については、近年、神経疾患、生活習慣病、がん、自己免疫疾患など、多くの疾患は体内の慢性炎症が起因していることが指摘されていることから⁴²⁾、抗炎症作用に着目した。試験は *in vivo*試験として、リポ多糖 (LPS) 誘発全身性炎症モデルマウスを用いた脳保護作用について検討することとした⁴³⁾。

6週齢の雄ICRマウスを用いて、対象 (CON) 群、LPS群、GA低用量投与群 (GA-L)、GA高用量投与群 (GA-H) とし、経口投与開始後7日目にLPS群、GA-L群、GA-H群にLPSを腹腔内投与し、投与開始8日目にオープンフィールドテストによる行動実験、9日目に解剖を行い、脳組織を免疫組織化学染色した。

オープンフィールドテストによる行動実験の結果、LPS群はLPSの投与により全身性炎症を起こしてsickness behaviorを示し、CON群と比較して総不動時間が長い結果となった (** $p<0.01$)。一方、GA投与群であるGA-L群 ([#] $p<0.01$)、GA-H群 ([#] $p<0.05$) ではこれが有意に抑制された (Fig. 16)。それゆえ、GAの投与がLPS誘発性の不動時間の延長を抑制することが示唆された。

次に脳切片を採取し、Iba1 抗体を用いて免疫組織化学染色した結果、海馬においてCON群で静止型であるラミファイド型であったミクログリアが、LPSの投与により活性型であるアメボイド型となっていることが確認された (Fig. 17)。この免疫陽性シグナルを数値化すると、LPS群のシグナル強度がGA-L群で減少し ($p=0.056$)、さらに、GA-H群では有意に減少 ([#] $p<0.01$) していることが示された。

以上の結果から、GA が抗炎症作用を持ち、脳内において抗炎症作用を示すことが示唆された。

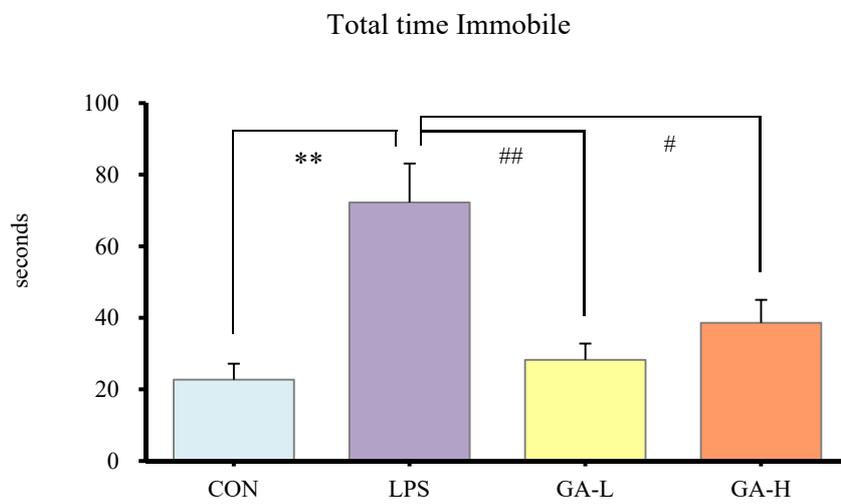


Fig. 16. Total time of immobility in the open field test

The values are mean \pm SEM. The symbols indicate significant difference for the following conditions: CON vs. LPS (** $p < 0.01$), LPS vs. GA-L (## $p < 0.01$), and LPS vs. GA-H (# $p < 0.05$).

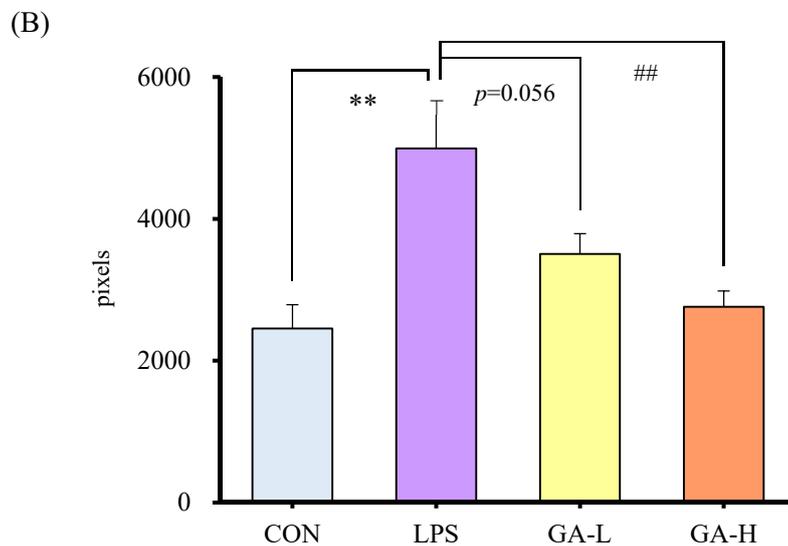
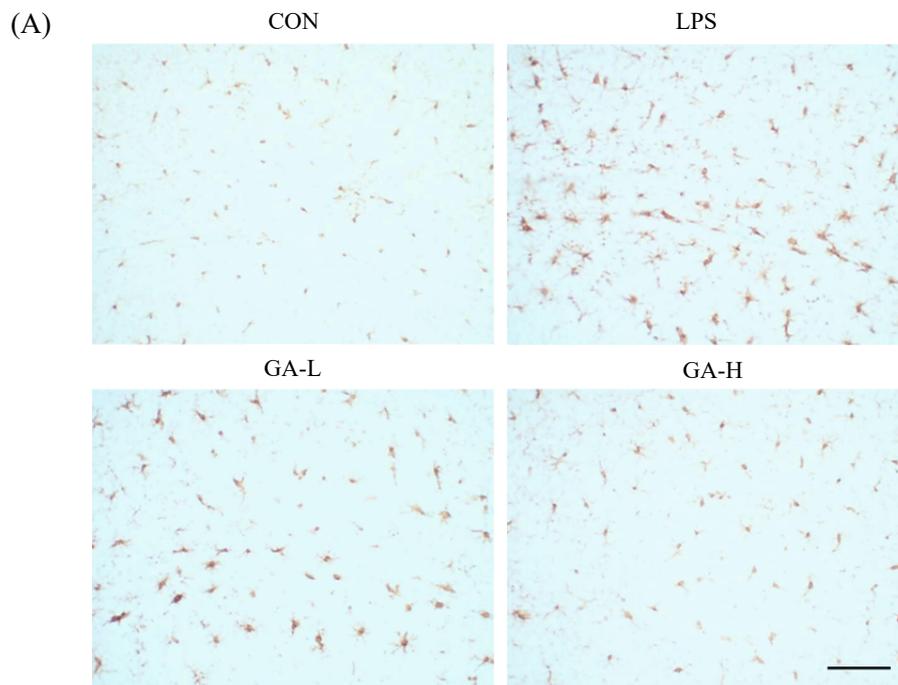


Fig. 17. Effects of glansreginin A (5) on Iba1 immunoreactivity in the hippocampus
 (A) Sagittal sections were stained with the anti-Iba1 antibody. Scale bar = 100 μ m.
 (B) Quantitative analysis of Iba1-positive signals using ImageJ software. The values are mean \pm SEM. The symbols indicate significant difference for the following conditions: CON vs. LPS (** p <0.01) and LPS vs. GA-H (## p <0.01).

1-5 小括

クルミに特徴的な成分を明らかにする目的で、二次代謝物として含有する UV 照射検出成分について精査した結果、新規化合物 3 種及び既知化合物 27 種〔glansreginic acid (4), glansreginin A (5), methyl gallate (6), ellagic acid (7), (+)-catechin (8), blumenol C glucoside (9), byzantionoside B (10), 4'-dihydrophaseic acid β -glucopyranose ester (11), 5-hydroxytryptamine (12), valoneic acid dilactone methyl ester (13), ellagic acid 4-*O*- β -D-xyloside (14), glansreginic acid 8-*O*- β -D-glucoside (15), glansreginin B (16), 1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (17), 1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (18), 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (19), strictinin (20), isostrictinin (21), tellimagrandin I (22), tellimagrandin II (23), casuarictin (24), pedunculagin (25), pterocarinin C (26), rugosin C (27), rugosin C methyl ester (28), casuarinin (29), euprostin A (30)〕の計 30 種を単離、構造解析した。新規化合物 **1** は、特異な長鎖構造をもつジカルボン酸の配糖体で、glansreginin C と命名した。新規化合物 **2** は、エラグ酸配糖体モノガレートで、ellagic acid 4-*O*-(3'-*O*-galloyl)- β -D-xyloside と決定した。新規化合物 **3** は、platycaryanin A (**3a**) のメチルエステル体で、アーティファクトではなく天然物であることが示唆され、platycaryanin A methyl ester と決定した。また既知化合物のうち、glansreginic acid (4), blumenol C glucoside (9), byzantionoside B (10), 4'-dihydrophaseic acid β -glucopyranose ester (11), glansreginic acid 8-*O*- β -D-glucoside (15), pterocarinin C (26) は、クルミからはじめて単離された化合物である。

含有成分として明らかにした30種の化合物をもとに、6種のナッツ類（アーモンド、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ、カシューナッツ、ピーカンナッツ、マカダミアナッツ）について、クルミ抽出物とのHPLCによる成分比較を行った。その結果、クルミにのみ顕著に認められるピークが観察され、glansreginin A (**5**) のピークであることが明らかと

なった。本ピークは他のナッツ抽出物において主ピークとして観察されず、また**5**はクルミから単離、構造決定されている化合物であることから、クルミに特徴的な成分として適当であることがいえる。さらに、**5**について、クルミ市販品中の含有を確認するため、市販の生クルミ（及びそのロースト品）及びローストクルミについて定量分析を行った結果、クルミ1g中の**5**の量は0.77~1.14 mg/g（クルミ1粒に換算すると1.76~2.81 mg/個）で、すべての試料で定量分析することができた。また、熱処理による**5**の定量値への影響はなく、熱に安定であることが示唆された。このように、安定かつ定量分析が可能であることから、**5**がクルミの指標となる特徴成分として支持された。

クルミの特徴成分として**5**が提案されたことから、その生物活性について検討することとした。活性については、様々な疾患に対して慢性炎症の起因が影響していることが指摘されていることを踏まえ、抗炎症作用に着目し、*in vivo*試験としてLPS誘発全身性炎症モデルマウスを用いた脳保護作用について検討した。オープンフィールドテストによる行動実験の結果、**5**の投与がLPS誘発性の不動時間の延長を抑制することが示唆された。また、海馬におけるミクログリアのLPS誘発性過剰活性化を有意に抑制していることが示された。このように、**5**が抗炎症作用を持ち、脳内においても活性を示すことが示唆された。

第2章 天然素材の特徴成分を指標にした製品化のための検討

－機能性河内晩柑果汁の製品化における製法検討－

柑橘類の果皮には、ポリメトキシフラボン類やそれらの水酸化体が豊富に含まれることが知られており、抗がん、抗炎症、抗酸化活性等の様々な生物活性に寄与していることが報告されている⁴⁴⁾。最近の研究では、ポリメトキシフラボン類が脳機能活性に寄与していることも知られており⁴⁵⁾、その中で特に nobiletin (5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone; NBT) は認知症予防に対する研究が精力的になされており、体内動態についても検討されている⁴⁶⁻⁴⁹⁾。近年、愛媛県が生産高全国1位である河内晩柑 (*Citrus kawachiensis*)⁵⁰⁾ の果皮成分中のポリメトキシフラボン類 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF) 及び aurochrysin (AUR) に脳保護作用の可能性が報告された⁵¹⁻⁵⁶⁾。さらに、AUR が高含量に含まれる河内晩柑ジュースを調製し、マウスへの投与による試験、さらにヒト臨床試験を実施し、抗炎症、記憶力の維持に有意な活性があることが報告されている^{57,58)}。天然物を機能性素材として開発する場合、関与成分の含有を確認して製品化する必要性が求められている。河内晩柑には AUR が他の柑橘類と比較して含量が高く、活性への寄与も示唆されていることから本柑橘の特徴成分の一つとしてあげられ、AUR の含有により同等性が確保され、品質評価への有用性が考察される。

本研究では、これまでの研究背景から機能性素材として河内晩柑に着目し、ジュースとしての製品化を例に、その調製法に関する検討について AUR をはじめとする柑橘機能成分の含有量を指標に実施した。具体的には、一般的なジュースの搾汁法として知られている2つの搾汁法〔ベルト式搾汁法と JBT (以前 FMC, 通称: インライン) 搾汁法⁵⁹⁾〕(Fig. 18) で調製したジュースについて、AUR をはじめとする柑橘機能成分の含有量を HPLC で検討した。

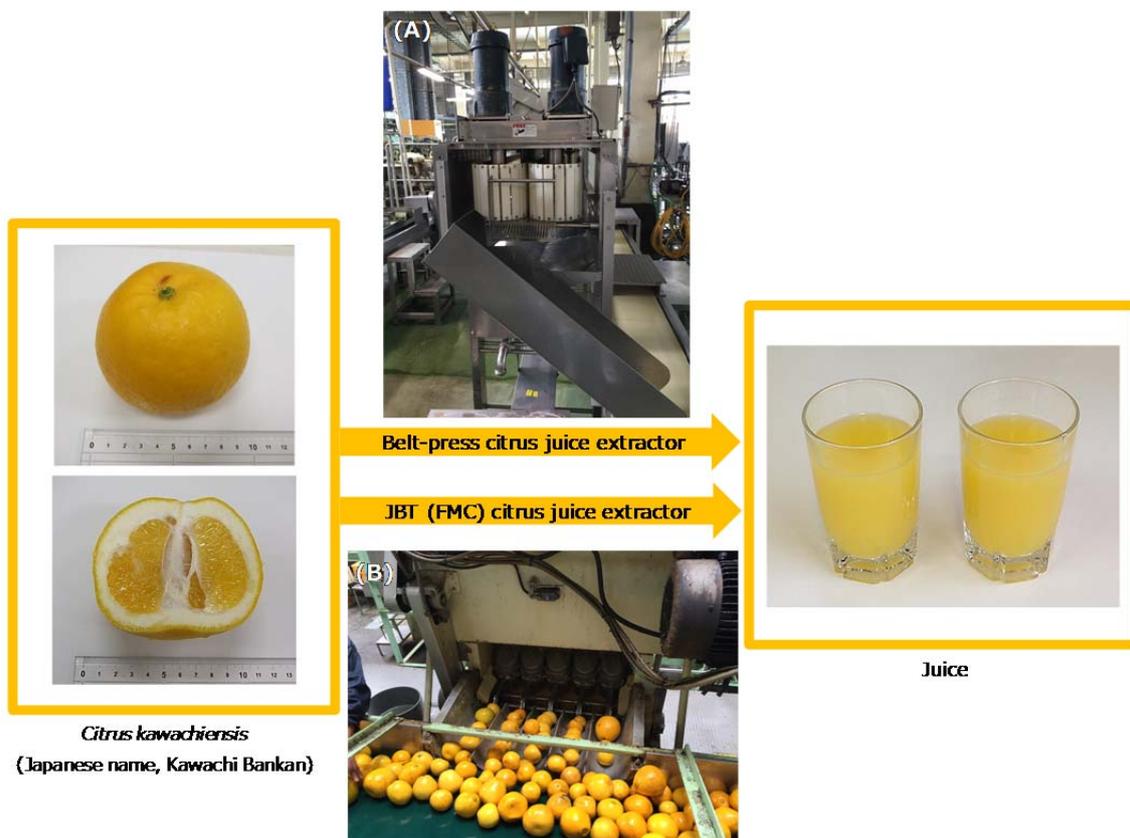


Fig. 18. Fruit of *Citrus kawachiensis* and the juice extractors: (A) belt-press extractor; (B) JBT extractor.

2-1 ジュース調製法による果汁中の柑橘機能性成分の比較

一般的な柑橘ジュースの搾汁機として使われるベルト式及びJBT式の2種の搾汁装置を用いて河内晩柑果実のジュースを調製し、得られた各ジュースを試料として、逆相HPLC分析 (RP-5) を行った (Fig. 19). 検出されたピークについては、これまで単離した柑橘成分を標品として照合し、13種の化合物 [HMF (31), NBT (32), coniferin (33), isoconiferin (34), narirutin 4'-O- β -D-glucoside (35), naringin 4'-O- β -D-glucoside (36), syringin (37), narirutin (NRTN) (38), naringin (NGIN) (39), marmin (40), 6',7'-dihydroxybergamottin (41), AUR (42), bergamottin (43)] を同定した²⁷⁾. 主な検出成分は、いずれの搾汁法に

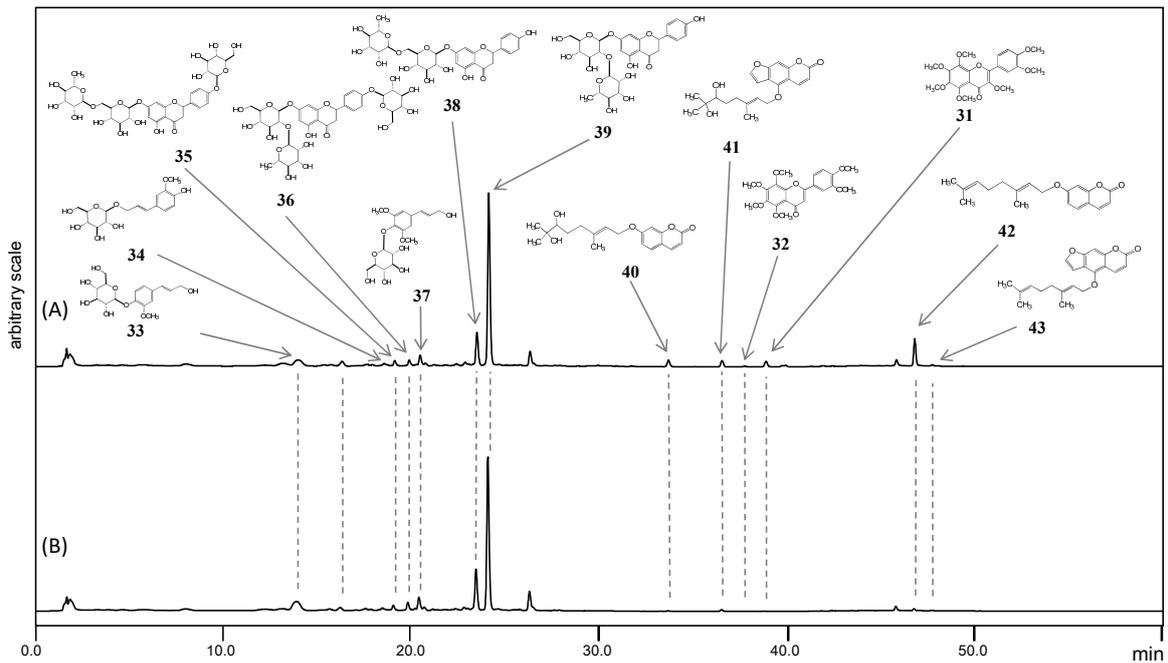


Fig. 19. HPLC chromatograms of the juice prepared by (A) belt-press extractor and (B) JBT (at 280 nm; RP-5). Chemical structures of the identified compounds were indicated in (A).

においても果汁の主成分である**39**で、次いで**38**であった。主に果皮成分とされる**42**及び**31**などのポリメトキシフラボン類は、ベルト式では明確なピークとして観察されたが、JBT式ではごくわずかな検出であった。そこで、搾汁法による成分含量を比較検討するため、**31**、**32**、**38**、**39**、**42**の5成分量について定量分析を行った (Fig. 20)。その結果、果皮成分である**31**、**32**、**42**についてはベルト式で調製した果汁の含有量が高く、**42**では約2倍、**31**及び**32**では約7倍高含量であることが示された。一方、果皮及び果汁成分である**38**及び**39**はインライン式で調製した方が約1.5~2倍含有量が高い結果となった。これは、ベルト式は果皮に直接圧力がかかり、それにより果皮成分が搾りだされることによる結果と考えられる。このように、搾汁法により対象となる機能関与成分の調製量が異なることを示すことができ、これらを使い分けることにより、機能性食品としての製品の効率化を向上させる例を科学的に示すことができた。

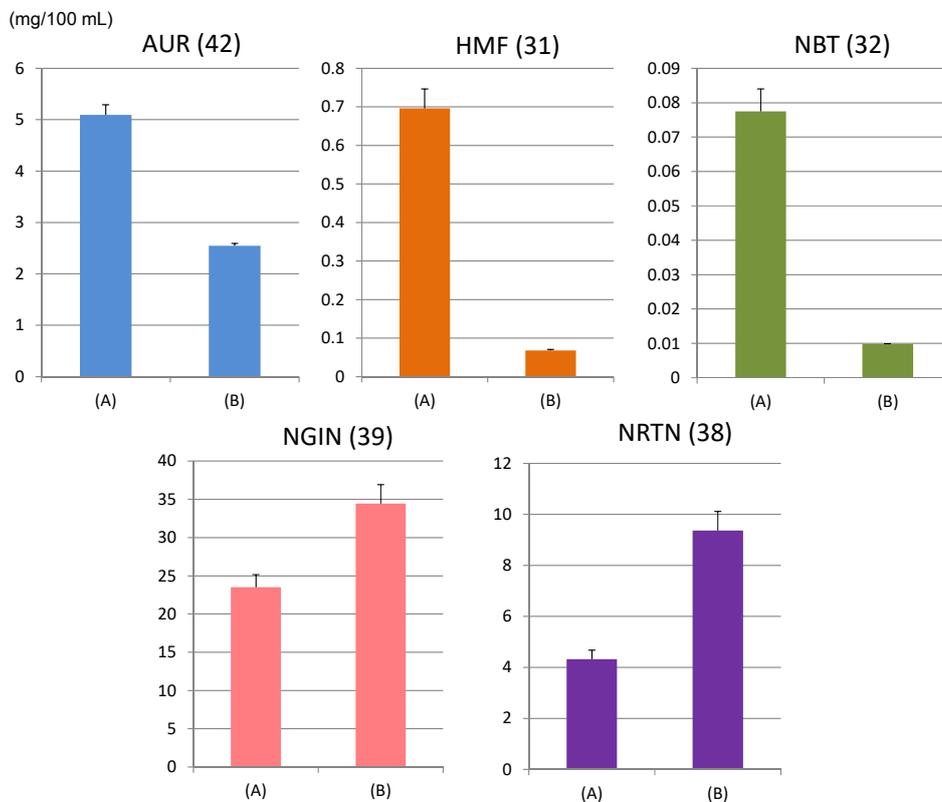


Fig. 20. AUR, HMF, NBT, NGIN, and NRTN contents in the juice squeezed by (A) belt-press extractor and (B) JBT extractor.

2-2 柑橘由来機能性成分の熱安定性

柑橘由来の機能性成分5種 (31, 32, 38, 39, 42) について、ジュース中における熱安定性について検討した。ベルト式搾汁法により調製した河内晩柑ジュースを試料とし、密栓した試験管に入れ、沸騰水浴中で5成分の経時変化を逆相HPLC (RP-5) で分析した (Fig. 21)。その結果、3, 6時間後においても、各化合物のピークは観察され、ピークパターンはほぼ同じであったが、6時間後に42のピークが小さくなっていることがみられた。また、反応3時間後から分解物とみられるピークAが出現し、6時間後にそのピークは大きくなって観察された。このピークをカラムクロマトグラフィーにより単離し、NMR等の機器分析データに基づき構造解析した結果、5-hydroxymethyl-2-furaldehyde⁶⁰⁾と同定した。本化合物は糖の分解物として報告があり⁶¹⁾、それゆえ、ジュース中の糖が熱処理により分解したものと考えられる。

熱処理したジュース中の各化合物の含量率の経時変化をみると、42は3時間以降、分解が認められ、6時間後には約30%、10時間後には約40%の分解が認められた。これは42がクマリン骨格を有し、それゆえ、ラクトン構造が加水分解により分解したものと考えられる。一方、他の4化合物については、10時間後においても安定であることが示された (Fig. 22)。

さらに、アルコール中における熱安定性について検討するため、5化合物のエタノール中における熱安定性 (~80°C) を検討した。その結果、24時間後の熱処理においても分解は確認されず、アルコール中では安定であることが示唆された (Fig. 23)。

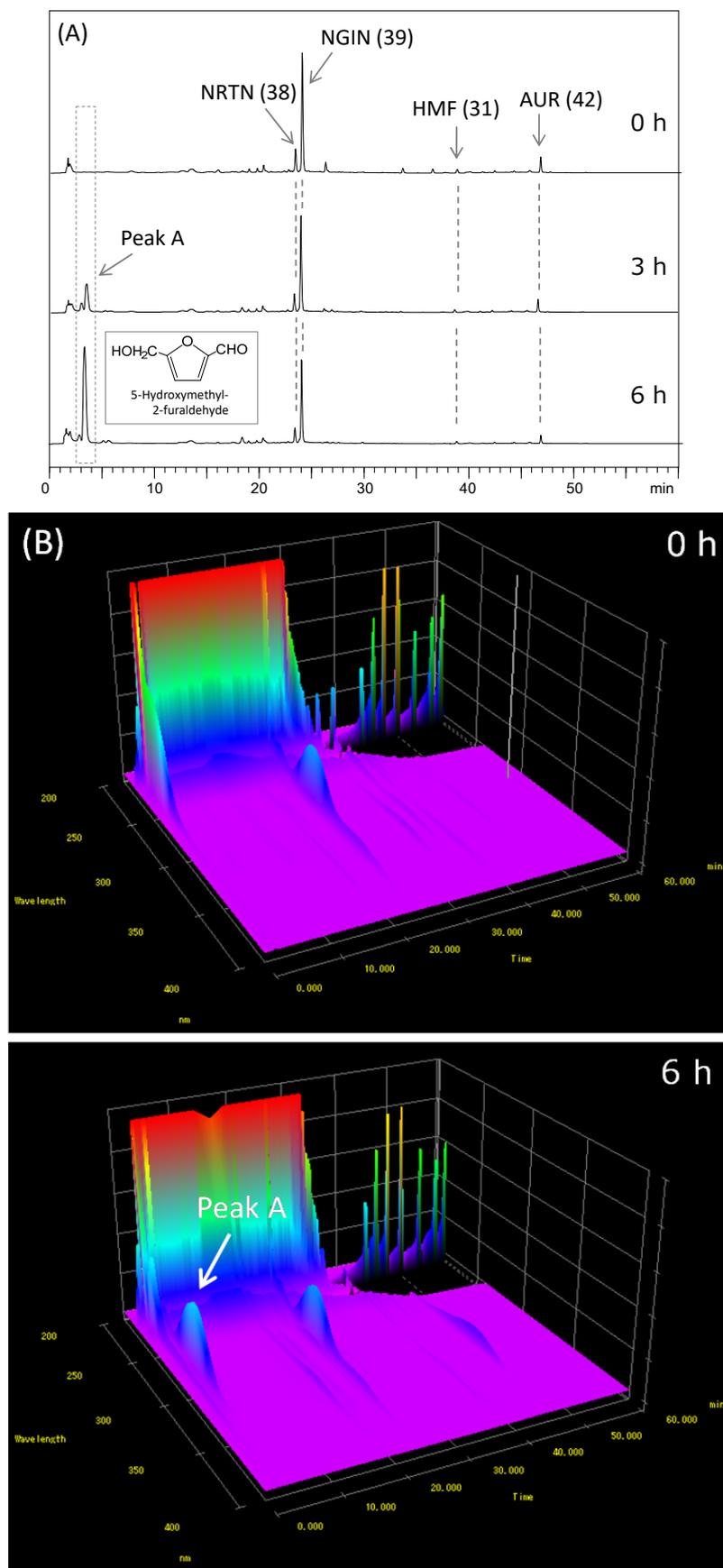


Fig. 21. (A) HPLC chromatograms (RP-5) and (B) 3D chromatograms of the juices following the heat treatment. The chemical structure of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde is indicated.

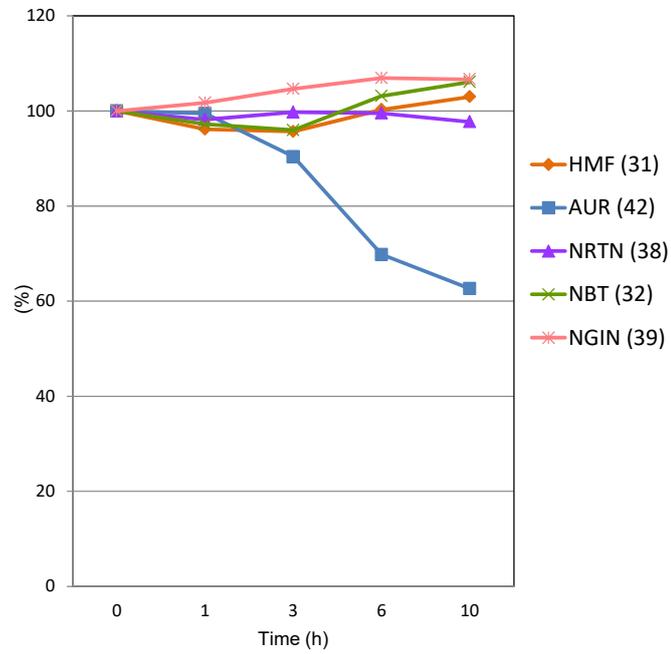


Fig. 22. Time course of the content ratio of five citrus constituents in the heat-treated juice.

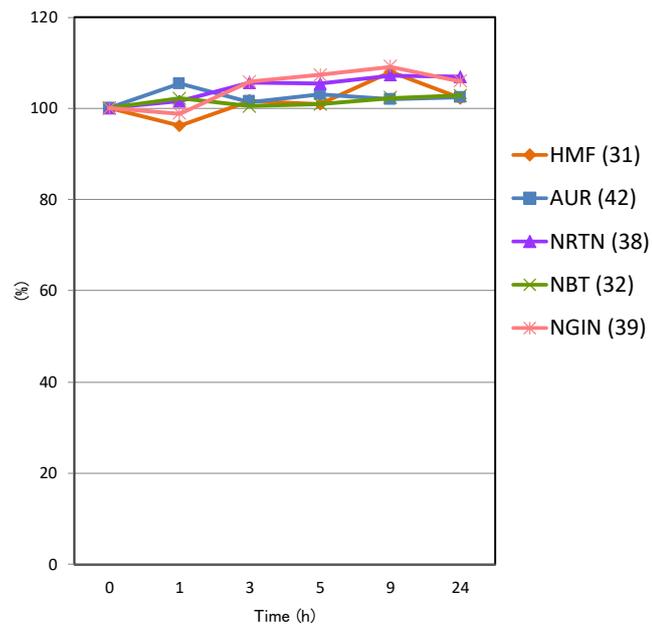


Fig. 23. Time course of the content ratio of five citrus constituents in ethanol.

2-3 小括

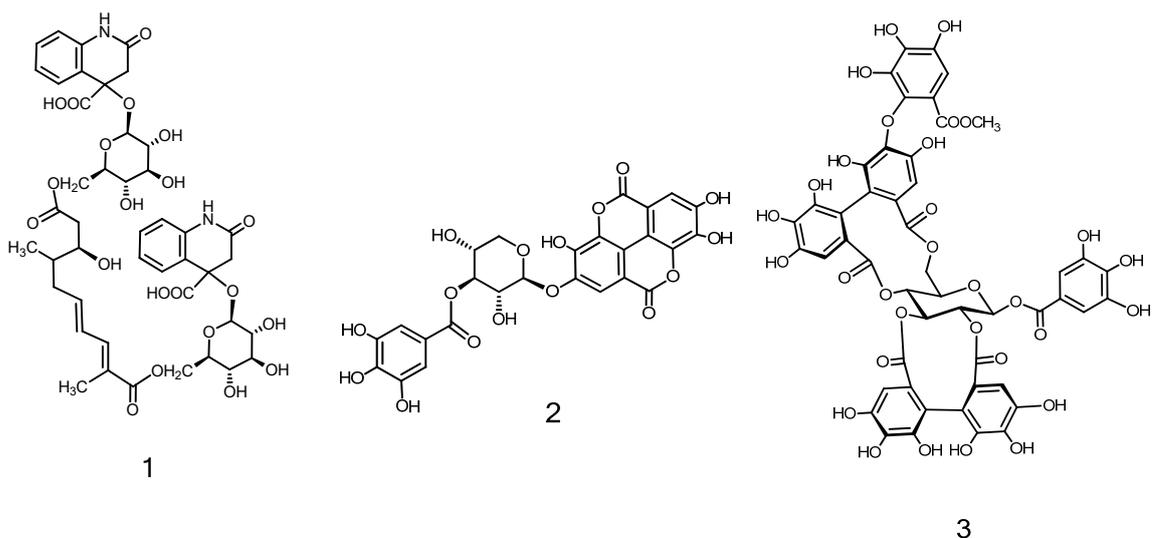
柑橘類のジュースの搾汁機として使われるベルト式及びJBT式の2種の装置を用いて河内晩柑果実のジュースを調製し、得られた各ジュースを試料とし、逆相HPLC分析を行った。検出されたピークについては、これまで単離した柑橘成分を標品として照合し、13種の化合物〔HMF (31), NBT (32), coniferin (33), isoconiferin (34), narirutin 4'-O-β-D-glucoside (35), naringin 4'-O-β-D-glucoside (36), syringin (37), NRTN (38), NGIN (39), marmin (40), 6',7'-dihydroxybergamottin (41), AUR (42), bergamottin (43)]を同定した。主検出成分は、いずれの搾汁法においても果汁の主成分である39で、次いで38であった。搾汁法による成分含量の違いを比較検討するため、31, 32, 38, 39, 42の5成分量について定量分析を行い、31, 32, 42については、ベルト式で調製した果汁の含有量が高く、42では約2倍、31及び32では約7倍高含量であることが示された。一方、果皮及び果汁成分である38, 39は、JBT式で調製した方が約1.5~2倍含有量が高い結果となった。

さらに、柑橘由来の機能性成分5種 (31, 32, 38, 39, 42) について、ジュース中における熱安定性について検討した。ベルト式搾汁法により調製した河内晩柑ジュースを試料とし、密栓した試験管に入れ、沸騰水浴中での経時変化を逆相HPLCで分析した結果、3, 6時間後においても、各化合物のピークは観察され、ピークパターンはほぼ同じであったが、6時間後に42のピークが小さくなっていることがみられた。また、反応3時間後から分解物とみられるピークが出現し、このピークについて分解物を単離し、NMR等の機器分析データに基づき構造解析した結果、5-hydroxymethyl-2-furaldehydeと同定した。熱処理したジュース中の各化合物の含量率の経時変化をみると、42は3時間以降、分解が認められ、6時間後には約30%、10時間後には約40%の分解が認められた。さらに、アルコール中における熱安定性について検討するため、5化合物のエタノール

中における熱安定性（～80℃）を検討した結果、24時間後の熱処理においても分解は確認されず、アルコール中では安定であることが示唆された。

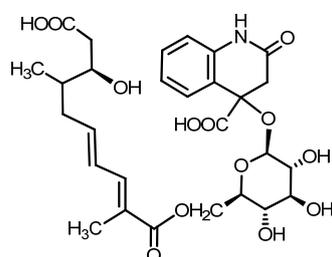
まとめ

本研究では、クルミに特徴的な成分を明らかにする目的で、二次代謝物として含有する UV 照射検出成分について精査した結果、3 種の新規化合物及び既知化合物 27 種の計 30 種を単離、構造解析した。新規化合物 **1** は、特異な長鎖構造をもつジカルボン酸の配糖体で、glansreginin C と命名した。新規化合物 **2** は、エラグ酸配糖体モノガレートで、ellagic acid 4-*O*-(3'-*O*-galloyl)- β -D-xyloside と決定した。新規化合物 **3** は、platycaryanin A のメチルエステル体で、アーティファクトではなく天然物であることが示唆され、platycaryanin A methyl ester と決定した。



クルミに特徴的な成分を明らかにするため、6種のナッツ類とクルミ抽出物のHPLCによる成分比較を行った結果、クルミにのみ顕著に認められるピークが観察され、glansreginin A (**5**) のピークであることを同定した。また**5**について、クルミ市販品中の含有を確認するため、市販の生クルミ（及びそのロースト品）及びローストクルミについて定量分析を行った結果、クルミ1g中の**5**の量は0.77~1.14 mg/g（クルミ1粒に換算すると1.76~2.81 mg/個）で、すべての試料で定量分析することができた。また、熱処理による**5**の定量値への影響はなく、熱に安定であることが示唆された。このように、安

定かつ定量分析が可能であることから、**5**はクルミの指標となる特徴成分として支持される。

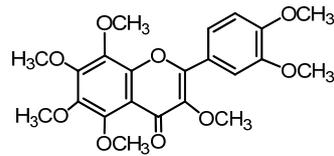


5

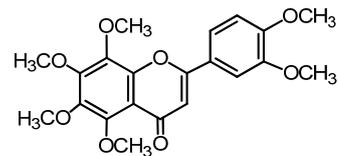
5の生物活性について、*in vivo*試験としてLPS誘発全身性炎症モデルマウスを用いた脳保護作用について検討した結果、オープンフィールドテストによる行動実験では、**5**の投与がLPS誘発性の不動時間の延長を抑制することが示された。また、免疫組織化学染色により、海馬におけるミクログリアのLPS誘発性活性を有意に抑制していることが示された。この結果から、**5**が抗炎症作用を持ち、脳内において抗炎症作用を示すことが示唆された。

柑橘類のジュースの搾汁機として使われるベルト式及びJBT式の2種の装置を用いて河内晩柑果実のジュースを調製し、HPLC分析を行った。検出されたピークについては、これまで単離した柑橘成分を標品として照合し、主検出成分はいずれの搾汁法においても果汁の主成分であるnaringin (**39**) で、次いでnarirutin (**38**) であった。搾汁法による成分含量の違いを比較検討するため、3,5,6,7,8,3',4'- heptamethoxyflavone (HMF) (**31**), nobiletin (**32**), **38**, **39**, auraptene (**42**) の5成分量について定量分析を行い、**31**, **32**, **42**については、ベルト式で調製した果汁の含有量が高く、**42**では約2倍、**31**及び**32**では約7倍高含量であることが示された。一方、果皮及び果汁成分である**38**, **39**はJBT式で調製した方が約1.5~2倍含有量が高い結果となった。さらに、柑橘由来の機能性成分5種 (**31**,

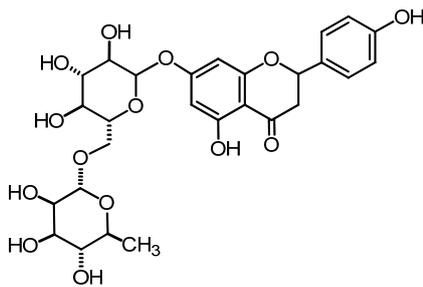
32, 38, 39, 42) について、ジュース中における熱安定性について検討した。ベルト式搾汁法により調製した河内晩柑ジュースを試料とし、密栓した試験管に入れ、沸騰水浴中での5成分の経時変化をHPLCで分析した。その結果、3, 6時間後においても、各化合物のピークは観察され、ピークパターンはほぼ同じであったが、6時間後に42のピークが小さくなっていることがみられた。



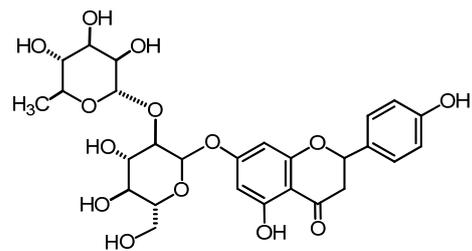
31



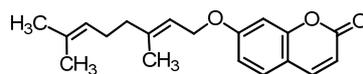
32



38



39



42

熱処理したジュース中の各化合物の含量率の経時変化をみると、42は3時間以降、分解が認められ、6時間後には約30%、10時間後には約40%の分解が認められた。さらに、アルコール中における熱安定性について検討するため、5化合物のエタノール中における熱安定性を検討した結果、24時間後の熱処理においても分解は確認されず、アルコール中では安定であることが示唆された。

本研究において、天然物を機能性食品として開発する場合、素材の特徴成分の同定、製品中における機能性成分の含有に関して、分子を指標にした薬学的検討についての一例を示すことができた。これらは天然物を機能性素材として開発する場合、その品質保証につながるレギュラトリーサイエンスに資する一データになり得ることが期待される。

実験の部

NMR スペクトルは Bruker AVANCE500 (Bruker BioSpin, Billerica, MA, U.S.A., $^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 126 MHz) を用い, 溶媒シグナルをそれぞれ δ_{H} 3.30, δ_{C} 49.0 (MeOH- d_4), δ_{H} 2.04, δ_{C} 29.8 (acetone- d_6) に設定し, 測定を行った. ケミカルシフトはすべて TMS (tetramethylsilane) を基準にシフト値を δ (parts per million) 値で表示した.

旋光度は JASCO P-1020 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) を用いて測定した.

UV スペクトルは Shimadzu UVmini-1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) 及び JASCO V-530 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) を用いて測定した.

MS スペクトルは micrOTOF-Q [Bruker Daltonics, Billerica, MA, U.S.A., ESI-MS, HR-ESI-MS (positive, negative) : solvent acetonitrile or MeOH] を用いて測定した.

カラムクロマトグラフィーの充填剤は, Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan), Chromatorex ODS (Fuji Silysia Chemical Ltd., Aichi, Japan), Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), Toyopearl HW-40F (Tosoh, Tokyo, Japan), YMC GEL ODS (YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan), Sep-Pak Plus tC18 cartridge (Waters, Milford, MA, USA) を用いた.

溶媒の濃縮, 留去は, すべて 40°C 以下のロータリーエバポレーターを用いて行った.

HPLC は以下の条件で測定した.

逆相 (Reversed phase) HPLC

【RP-1】

Column: L-column ODS (5 μm , 150 mm \times 2.1 mm i.d. Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan)

Temperature: 40°C

Pump: LC-20AB (Shimadzu)

Injection volume: 2 μ L

Flow rate: 0.3 mL/min

Detector: SPD-M20A (UV 254 nm, Shimadzu)

Mobile phase: 5% acetic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B) [gradient: 0–30 min, 0–50% B in A, 30–35 min, 50–85% B in A, 35–40 min, 85% B in A, 40–50 min, 85–100% B in A]

【RP-2】

Column: YMC-pack ODS-AQ (5 μ m, 150 mm \times 2.0 mm i.d.) (YMC Co. Ltd.)

Temperature: 35°C

Pump: LC-20AT (Shimadzu)

Flow rate: 0.2 mL/min

Detector: SPD-20A (UV 250 nm, Shimadzu)

Mobile phase: 10 mM phosphate buffer: acetonitrile (75:25)

【RP-3】

Column: YMC-pack ODS-AQ (5 μ m, 150 mm \times 2.0 mm i.d.) (YMC Co. Ltd.)

Temperature: 40°C

Pump: LC-20AT (Shimadzu)

Flow rate: 0.2 mL/min

Detector: SPD-20A (UV 280 nm, Shimadzu)

Mobile phase: 10 mM phosphate buffer: acetonitrile (8:2)

【RP-4】

Column: L-column ODS (5 μ m, 150 mm \times 2.1 mm i.d. Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan)

Temperature: 40°C

Pump: LC-20AB (Shimadzu)

Injection volume: 2 μ L

Flow rate: 0.3 mL/min

Detector: SPD-M20A (UV 200–400 nm, Shimadzu)

Mobile phase: 5% acetic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B) [gradient: 0–30 min, 0–50% B in A, 30–35 min, 50–85% B in A, 35–40 min, 85% B in A, 40–50 min, 85–90% B in A, 50–55 min, 90–100% B in A, 55–60 min, 100% B in A]

【RP-5】

Column: L-column ODS (5 μ m, 150 mm \times 2.1 mm i.d. Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan)

Temperature: 40°C

Pump: LC-20AB (Shimadzu)

Injection volume: 2 μ L

Flow rate: 0.3 mL/min

Detector: SPD-M20A [UV 320 nm (AUR), 340 nm (HMF), 330 nm (NBT), and 280 nm (NGIN and NRTN), Shimadzu]

Mobile phase: 5% acetic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B) [gradient: 0–30 min, 0–50% B in A, 30–35 min, 50–85% B in A, 35–40 min, 85% B in A, 40–50 min, 85–90% B in A, 50–55 min, 90–100% B in A, 55–60 min, 100% B in A]

【RP-6】

Column: L-column ODS (5 μ m, 150 mm \times 2.1 mm i.d. Chemicals Evaluation and Research

Institute, Tokyo, Japan)

Temperature: 40°C

Pump: LC-20AB (Shimadzu)

Injection volume: 2 μ L

Flow rate: 0.3 mL/min

Detector: SPD-M20A (UV 254 nm, Shimadzu)

Mobile phase: 0.1% formic acid in distilled water (solvent A), 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B) [gradient: 0–30 min, 0–50% B in A, 30–35 min, 50–85% B in A, 35–40 min, 85% B in A, 40–50 min, 85–90% B in A, 50–55 min, 90–100% B in A, 55–60 min, 100% B in A]

第1章の実験

試料

ナッツ類7種 [クルミ, アーモンド, ピスタチオ, ピーカンナッツ (アメリカ産), カシューナッツ (インド産), ヘーゼルナッツ (トルコ産), マカダミアナッツ (オーストラリア産)] は, LOHAS (Sapporo, Japan) より購入したものを用いた. サルモネラ・ティフィムリウム由来のリポポリサッカライド (LPS) は, Sigma-Aldrich社 (St. Louis, MO, USA) 製を用いた.

クルミの抽出・分画

クルミ可食部 (4.5 kg) を80% MeOH (20 L) 中でホモジナイズし, ろ過後, 濃縮し,

80% MeOHエキス (199.8 g) を得た. 80% MeOHエキス (190 g) をDiaion HP-20カラムクロマトグラフィー (ϕ 5.5×40 cm) を行い, H₂O, 含水MeOH (10%→20%→30%→40%→50%), MeOH (各3 L) で順次溶出させ, H₂O画分 (137.3 g), 10% MeOH画分 (9.1 g), 20% MeOH画分 (7.4 g), 30% MeOH画分 (8.1 g), 40% MeOH画分 (6.8 g), 50% MeOH画分 (5.9 g), MeOH画分 (10.1 g) を得た.

10% MeOH画分 (4.0 g) をYMC GEL ODSカラムクロマトグラフィー (ϕ 1.1×40 cm) に付し, H₂O, 含水MeOH (10%→20%→30%→40%→50%), MeOHで順次溶出させ, 10% MeOH溶出部からglansreginic acid 8-*O*- β -D-glucoside (**15**) (93.2 mg) を得た.

30% MeOH画分 (5.0 g) をSephadex LH-20 (ϕ 2.2×30 cm) 及びYMC GEL ODSカラムクロマトグラフィー (ϕ 1.1×40 cm) に付し, ellagic acid (**7**) (1.8 mg), 5-hydroxytryptamine (**12**) (9.5mg), casuarictin (**24**) (697.6 mg) を得た.

40% MeOH画分 (5.0 g) をToyopearl HW-40F (ϕ 2.2×40 cm), Sephadex LH-20 (ϕ 1.1×40 cm), 及びYMC GEL ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 1.1×40 cm) に付し, platycaryanin A methyl ester (**3**) (6.7 mg), glansreginin A (**5**) (526.6 mg), ellagic acid (**7**) (2.1 mg), 1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (**18**) (32.9 mg), 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (**19**) (3.8 mg), tellimagrandin II (**23**) (76.1 mg), casuarictin (**24**) (153.6 mg), pterocarinin C (**26**) (12.0 mg), rugosin C (**27**) (22.4 mg), euprostin A (**30**) (14.0 mg) を得た.

50% MeOH画分 (4.0 g) をYMC GEL ODS (ϕ 2.5×40 cm), Sephadex LH-20 (ϕ 1.1×40 cm, ϕ 2.2×30 cm), Chromatorex ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 1.1×40 cm) に付し, glansreginin C (**1**) (32.3 mg), ellagic acid 4-*O*-(3'-*O*-galloyl)- β -D-xyloside (**2**) (6.0 mg), platycaryanin A methyl ester (**3**) (12.0 mg), glansreginic acid (**4**) (9.6 mg), glansreginin A (**5**) (866.6 mg), ellagic acid (**7**) (116.1 mg), blumenol C glucoside (**9**) 及びbyzantionside B (**10**) 混合物 (22.8 mg), 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (**19**) (18.2 mg), rugosin

C methyl ester (**28**) (46.5 mg) を得た.

MeOH画分 (2.0 g) をToyopearl HW-40Fカラムクロマトグラフィー (φ 2.5×40 cm) に付し, 含水MeOH (60%→70%), MeOHで順次溶出させ, 60% MeOH溶出部から valoneic acid dilactone methyl ester (**13**) (7.8 mg) を得た.

さらに, クルミ (100 g) について80% MeOHエキス (6.6 g) を抽出し, 同様にDiaion HP-20カラムクロマトグラフィー (φ 3.0×40 cm) に付した. 10~40% MeOH画分をYMC GEL ODS (φ 1.1×20 cm, φ 1.1×40 cm), Sephadex LH-20 (φ 1.1×40 cm), Chromatorex ODSカラムクロマトグラフィー (φ 1.1×40 cm) に付し, glansreginin A (**5**) (9.6 mg), methyl gallate (**6**) (5.4 mg), (+)-catechin (**8**) (1.4 mg), 4'-dihydrophaseic acid β-glucopyranose ester (**11**) (2.5 mg), ellagic acid 4-*O*-β-D-xyloside (**14**) (10.3 mg), glansreginic acid 8-*O*-β-D-glucoside (**15**) (1.5 mg), glansreginin B (**16**) (1.7 mg), 1,2,6-tri-*O*-galloyl-β-D-glucose (**17**) (1.0 mg), 1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl-β-D-glucose (**18**) (1.9 mg), strictinin (**20**) (5.2 mg), isostrictinin (**21**) (3.9 mg), tellimagrandin I (**22**) (5.6 mg), tellimagrandin II (**23**) (3.3 mg), casuarictin (**24**) (15.9 mg), pedunculagin (**25**) (35.4 mg), rugosin C (**27**) (3.2 mg), casuarinin (**29**) (1.0 mg) を得た.

得られた既知化合物については, 各種機器分析スペクトルデータを文献値または標品との直接比較により同定した.

Glansreginin C (**1**)

褐色無晶形粉末. UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ): 264 (4.38), 213 (4.89). $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ -143° ($c = 0.1$, MeOH). HR-ESI-MS m/z : 943.2973 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, calculated for $\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{O}_{21}\text{N}_2-\text{H}$: 943.2990) and 967.2941 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, calculated for $\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{O}_{21}\text{N}_2+\text{Na}$: 967.2955).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH- d_4) δ : 7.39 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5, 5'), 7.31, 7.28 (each 1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-7, 7'), 7.22 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-3''), 7.05, 7.03 (each 1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-6, 6'),

6.91, 6.86 (each 1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8, 8'), 6.52 (1H, dd, $J = 11.0, 15.0$ Hz, H-4''), 6.22 (1H, dt, $J = 15.0, 7.5$ Hz, H-5''), 4.23, 4.14 (each 1H, d, $J = 8.0$ Hz, glc H-1, 1'), 4.19, 4.09 (each 2H, m, glc H-6, 6'), 4.09 (1H, m, H-8''), 3.31, 3.19 (each 1H, m, glc H-4, 4'), 3.27 (2H, m, glc H-2, 2'), 3.17 (4H, m, H-3, 3'), 3.16 (2H, m, glc H-3, 3'), 2.98, 2.92 (each 1H, m, glc H-5, 5'), 2.54 (2H, m, H-9''), 2.47, 2.13 (each 1H, m, H-6''), 1.94 (3H, s, H-11''), 1.75 (1H, m, H-7''), 0.99 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-12''). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOH- d_4) δ : 179.9, 179.6 (C-2, 2'), 173.9 (C-10''), 172.1 (2C) (C-9, 9'), 170.1 (C-1''), 145.0, 144.9 (C-8a, 8a'), 143.2 (C-5''), 140.4 (C-3''), 131.7, 131.6 (C-7, 7'), 128.7 (C-4''), 126.8, 126.7 (C-5, 5'), 126.4, 126.1 (C-4a, 4a'), 126.1 (C-2''), 123.1 (2C) (C-6, 6'), 111.5, 111.4 (C-8, 8'), 99.8, 99.6 (glc C-1, 1'), 79.5, 79.4 (C-4, 4'), 77.74, 77.70 (glc C-3, 3'), 75.5, 75.4 (glc C-5, 5'), 74.7, 74.6 (glc C-2, 2'), 72.1 (C-8''), 71.2, 71.1 (glc C-4, 4'), 64.6, 64.3 (glc C-6, 6'), 42.44, 42.38 (C-3, 3'), 40.7 (C-9''), 40.0 (C-7''), 38.1 (C-6''), 14.3 (C-12''), 12.8 (C-11'').

Ellagic acid 4-*O*-(3'-*O*-galloyl)- β -D-xyloside (**2**)

淡褐色無晶形粉末。UV λ_{max} (MeOH) nm (log ϵ): 343 (4.03), 275 (4.54), 258(4.53). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 35^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH). HR-ESI-MS m/z : 585.0525 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{O}_{16}-\text{H}$: 585.0522) and 609.0465 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{O}_{16}+\text{Na}$: 609.0487).

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, MeOH- d_4) δ : 7.74 (1H, s, H-5), 7.47 (1H, s, H-5'), 7.16 (2H, s, galloyl H-2''', 6'''), 5.21 (1H, t, $J = 9$ Hz, xyl H-3), 5.07 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, xyl H-1), 4.10(1H dd, $J = 5, 10.5$ Hz, xyl H-5), 3.89 (1H, ddd, $J = 5, 9, 9.5$ Hz, xyl H-4), 3.81 (1H, dd, $J = 7.5, 9$ Hz, xyl H-2), 3.58 (1H, brt, $J = 10.5$ Hz, xyl H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOH- d_4) δ : 168.2 (galloyl C-7'''), 161.6(C-7), 161.4 (C-7'), 150.1 (C-4'), 149.0 (C-4), 146.4 (2C, galloyl C-3''', 5'''), 145.4 (C-3), 141.4 (C-3'), 139.8 (galloyl C-4'''), 138.0 (2C, C-2, 2'), 121.7 (galloyl C-1'''), 116.8 (C-1), 113.7, 113.6 (C-5, 1'), 111.7(C-5'), 110.5 (2C, galloyl C-2''', 6'''), 109.9 (C-6'), 107.3 (C-6), 104.3

(xyl C-1), 78.2 (xyl C-3), 73.0 (xyl C-2), 69.4 (xyl C-4), 67.1 (xyl C-5).

Platycaryanin A methyl ester (**3**)

褐色無晶形粉末. UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ): 280 (4.48), 222 (4.97). $[\alpha]_{\text{D}}^{24} +21^{\circ}$ ($c = 0.1$, MeOH). HR-ESI-MS m/z : 1117.1002 ($[M-H]^{-}$, calculated for $C_{49}H_{34}O_{31}-H$: 1117.1011).

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O , 9:1) δ : 7.16 (2H, s, galloyl-H), 6.87, 6.59, 6.57, 6.46, 6.39 (each 1H, HHDP and tergalloyl-H), 6.20 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, glc H-1), 5.44 (1H, dd, $J = 8.5, 10$ Hz, glc H-3), 5.29 (1H, dd, $J = 7, 13$ Hz, glc H-6), 5.19 (1H, t, $J = 10$ Hz, glc H-4), 5.18 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, glc H-2), 4.49 (1H, brdd, $J = 7, 10$ Hz, glc H-5), 3.89 (1H, d, $J = 13$ Hz, glc H-6), 3.82 (3H, s, $-\text{OCH}_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O , 9:1) δ : 169.5 (2C), 168.8, 168.2, 168.1 (HHDP C-7, 7', s, $-\text{OCH}_3$), 165.2 (galloyl C-7), 149.3 (2C), 146.2 (2C), 145.2, 145.1 (2C), 144.9, 144.5, 144.4 (HHDP C-4, 4', 6, 6', tergalloyl C-4, 4', 6, 6', galloyl C-3, 5), 142.2, 140.6, 140.0, 139.9, 139.7, 137.0, 136.8, 136.5, 136.2, 131.3 (HHDP C-5, 5', tergalloyl C-2', 2'', 3'', 4'', 5, 5', 5'', galloyl C-4), 126.1, 125.8, 124.9 (HHDP C-2, 2', tergalloyl C-2), 119.5 (galloyl C-1), 116.5, 116.1, 115.0, 114.4, 113.9 (HHDP C-1, 1', tergalloyl C-1, 1', 1''), 110.2 (2C) (galloyl C-2, 6), 108.1, 108.0, 107.6, 107.2 (2C) (HHDP C-3, 3', tergalloyl C-3, 3', 6''), 92.2 (glc C-1), 77.1 (glc C-3), 76.0 (glc C-2), 73.3 (glc C-5), 69.1 (glc C-4), 63.4 (glc C-6), 52.9 ($-\text{OCH}_3$).

Glansreginin A (**5**)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH- d_4) δ : 7.42 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-5), 7.24 (1H, dt, $J = 1.5, 7.5$ Hz, H-7), 7.19 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-3''), 7.00 (1H, dt, $J = 1.5, 7.5$ Hz, H-6), 6.82 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-8), 6.48 (1H, dd, $J = 11.5, 15.0$ Hz, H-4''), 6.19 (1H, dt, $J = 7.0, 15.0$ Hz, H-5''), 4.21 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, glc H-1), 4.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, glc H-6), 4.15 (1H, dd, $J = 4.5, 12.0$ Hz, glc H-6), 3.93 (1H, dt, $J = 4.5, 8.0$ Hz, H-8''), 3.25-3.34 (2H, m, glc H-2, 4), 3.17 (1H, brt, glc H-3),

3.04 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-3), 2.96 (1H, m, glc H-5), 2.92 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-3), 2.42 (1H, m, H-6''), 2.37 (2H, m, H-9''), 2.11 (1H, m, H-6''), 1.93 (3H, s, H-11''), 1.71 (1H, m, H-7''), 0.94 (3H, d, H-12'') . ^{13}C -NMR (126 MHz, MeOH- d_4) δ : 180.4 (C-2), 179.1 (C-10''), 175.2 (C-9), 170.1 (C-1''), 144.6 (C-8a), 143.6 (C-5''), 140.5 (C-3''), 131.2 (C-7), 128.6 (C-4''), 127.1 (C-5), 127.0 (C-4a), 125.9 (C-2''), 122.9 (C-6), 111.3 (C-8), 100.0 (glc C-1), 80.4 (C-4), 77.7 (glc C-3), 75.6 (glc C-5), 74.7 (glc C-2), 72.5 (C-8''), 71.3 (glc C-4), 64.4 (glc C-6), 44.9 (C-3), 41.7 (C-9''), 39.7 (C-7''), 38.2 (C-6''), 14.4 (C-12''), 12.8 (C-11'').

Glansreginin C (1) の酸加水分解

Glansreginin C (1) (0.2 mg) を H₂O (0.2 mL) 及び 1 mol/L HCl (0.1 mL) に溶解し、沸騰水浴中で 3 時間加熱した。反応液を HPLC 分析 (RP-6) し、glansreginic acid (4) 及び 4a を確認した。

Glansreginin C (1), ellagic acid 4-O-(3'-O-galloyl)- β -D-xyloside (2) の糖の確認

Glansreginin C (1), ellagic acid 4-O-(3'-O-galloyl)- β -D-xyloside (2) (各 1.0 mg) に、それぞれ 1 mol/L HCl (0.2 mL) を加えて沸騰水浴中で加水分解し、Amberlite IRA400 で中和した。反応液を留去後、それぞれの残渣に L-cysteine methyl ester hydrochloride・ピリジン溶液 (5 mg/mL) (0.2 mL) を加え、60°C の水浴中で 1 時間加熱した。反応後、*o*-tolyl isothiocyanate (5 mg/mL) (0.2 mL) を加え、60°C の水浴中でさらに 1 時間加熱した。反応溶液を HPLC 分析 (RP-2) した結果、1 は D-glucose 誘導体の標品と、2 は D-xylose 誘導体の標品とそれぞれ一致した。

Platycaryanin A methyl ester (3) から rugosin C methyl ester (28) への異性化反応

Platycaryanin A methyl ester (3) (0.1 mg) を 0.05 mol/L リン酸 buffer (pH 7.4) (0.1 mL)

に溶解し、室温で3時間反応させた。反応液を HPLC 分析 (RP-3) したところ、反応物のピークは rugosin C methyl ester (**28**) のものと一致した。

HPLC 分析におけるナッツ類の試料溶液の調製

粉碎したクルミ及び6種のナッツ (各 100 mg) を、50% MeOH (1.0mL) で5分間超音波処理により抽出した。遠心分離後、上澄みを試料溶液とし、HPLC 分析 (RP-4) を行った。Glansreginin A (**5**) の同定には、単離した化合物を使用した。

定量分析におけるクルミ市販品の試料溶液の調製

生クルミ2製品 (製品 A, B) 及びそれらロースト品 (オーブンで 150°C, 15 分間ロースト, 製品 A', B') について、各 10 粒を粉碎した。それぞれ 1 g を秤量し、50% MeOH (10 mL) で超音波処理 (5 分) した後、遠心分離 (3,000 g, 5 分間, 室温) して上澄みを得た。残渣に 50% MeOH (10 mL) を加え、同様の抽出操作を2回繰り返して上澄みを 50 mL に定容し、試料溶液とした。標品とした glansreginin A (**5**) は、単離した化合物を使用した。

マウスへの glansreginin A (**5**) 及びリポ多糖 (LPS) の投与

6 週齢の雄 ICR マウスは、日本 SLC (Hamamatsu, Japan) から購入したものをを用いた。マウスは、23°C ± 1°C, 12 時間明暗サイクルの条件下、動物実験室で管理し、水と餌は試験期間中自由に摂取させた。すべての動物実験は、松山大学動物実験委員会による動物実験ガイドラインに従い、プロトコル 16013 に沿って行った。

マウスを、対照 (CON) 群 (n=6), LPS 群 (n=7), glansreginin A (GA) 低濃度投与群 (GA-L) 群 (n=6), 及び GA 高濃度投与群 (GA-H) (n=6) の 4 群に分けた。CON 群及び LPS 群には溶媒 (5% dimethyl sulfoxide/H₂O), GA-L 群及び GA-H 群にはそれぞれ

れ 50 mg/kg, 100 mg/kg の glansreginin A 溶液を 8 日間経口投与した。7 日目に, LPS 群, GA-L 群, GA-H 群に対して LPS (1 mg/kg) を, CON 群には生理食塩水を腹腔内投与した。腹腔内投与翌日, オープンフィールドテストを行い, 試験翌日に解剖した。

オープンフィールドテスト

オープンフィールドテストは, 70 × 70 × 50 cm (L × W × H) の装置を用いた。マウスを装置の中央に置き, 10 分間の行動を測定した。総不動時間は, USB デジタルカメラに接続された ANY-maze ビデオトラッキングシステム (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) を使用して分析した。

免疫組織化学染色

マウスの解剖時, 氷冷したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で灌流をし, 脳を採取後, 4% paraformaldehyde/PBS で固定した。その後, 30 μm の厚さの矢状断切片を作製し, 5% ヤギ正常血清でブロッキングを行った。その後, 抗 Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) ウサギポリクローナル抗体 (Wako, Osaka, Japan) と EnVision-plus system-HRP-labeled polymer (抗ウサギ; Dako, Glostrup, Denmark) 及び DAB (SK-4100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて免疫染色を行った。画像は, 顕微鏡 (CX21; Olympus, Tokyo, Japan) を使用して得た。免疫反応性シグナルは ImageJ ソフトウェアを用いて定量した。

統計分析

各群のデータは, 平均±SEM として表した。データは, 対応のない t 検定または Dunnett's 多重比較検定 (Prism6; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) により分析した。 p 値が 0.05 未満の結果を有意とみなした。

第 2 章の実験

試料

河内晩柑 (*C. kawachiensis*) の果実は、2014 年 6 月に愛媛県八幡浜市で収穫されたものを用いた。ベルト式柑橘搾汁機 (Model No. SFP-2200; IKAWA IRON WORKS CO., LTD., Tokushima, Japan) 及び JBT (旧 FMC) 柑橘搾汁機 (Model No. 291/391; John Bean Technologies Corporation, Chicago, IL, USA) を用いて搾汁した。搾汁率は、それぞれベルト式では 35.4% (v/w), JBT 式では 54.0% (v/w) であり、排出された果汁量より算出した。

HMF (31), NBT (32), coniferin (33), isoconiferin (34), narirutin 4'-*O*- β -D-glucoside (35), naringin 4'-*O*- β -D-glucoside (36), syringin (37), NRTN (38), NGIN (39), marmin (40), 6',7'-dihydroxybergamottin (41), AUR (42), bergamottin (43) の標品は、河内晩柑果皮より単離したものを用いた。定量分析に用いた 31, 32, 38, 39, 42 の標品は、和光純薬工業株式会社製 (Osaka, Japan) を使用した。

ジュース中成分の比較

ジュース (各 50 μ L, 2 サンプル) に同量の MeOH を加え、超音波処理したものをフィルター濾過 (0.22 μ m) し、試料溶液を調製した。標準品は、MeOH で希釈して標準溶液を 0.1~10 μ g/mL 濃度範囲で調製し、検量線を作成した。HPLC 分析は RP-5 の条件で行った。定量分析は絶対検量線法により行った。

ジュース及び柑橘由来成分の加熱処理

ジュース (2 mL) をスピッツ管に密閉し、沸騰水浴中で加熱した。加熱後 1, 3, 6, 10 時間後に HPLC 分析 (RP-5) をし、経時変化を測定した。熱分解後のジュースを YMC

GEL ODS-AQ 12S50 カラムクロマトグラフィー (ϕ 1.1 × 36 cm) に付し,
5-hydroxymethyl-2-furaldehyde を得た.

5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde: $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 9.53 (1H, s, -CHO), 7.37 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-3), 6.57 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-4), 4.60 (2H, s, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 153.9 (C-2), 124.8 (C-3), 110.9 (C-4), 163.2 (C-5), 57.6 (C-6), 179.4 (-CHO).

各柑橘類成分〔HMF (**31**), NBT (**32**), NRTN (**38**), NGIN (**39**), AUR (**42**)〕はエタノール (1.0 mg/mL) (2 mL) に溶解し、スピッツ管で密封して水浴中で加熱 ($\sim 80^\circ\text{C}$) した。加熱後 1, 3, 6, 10, 24 時間後に HPLC 分析 (RP-5) を行った。

謝辞

本研究の遂行ならびに論文作成にあたり，広範に及ぶ知識の御教授及び細かな実験手法や考察に至るまで，天然物研究のすべての段階において，いかなる時も終始熱心に御指導，御鞭撻を賜りました松山大学薬学部 天倉吉章教授に深厚なる謝意を表します。

各種機器分析の測定，解析方法をはじめ，細部にわたる数多くの的確な御助言を賜り，終始丁寧な御指導賜りました松山大学薬学部 好村守生准教授に深く感謝致します。また，温かく見守って下さった松山大学薬学部 生薬学研究室諸氏に感謝致します。

学部入学当時より，天然物研究から学生生活の心得に至るまで，多岐にわたる多くの御指導，御鞭撻を賜りました岡山大学 吉田隆志名誉教授（前松山大学薬学部教授）に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり，動物実験及び柑橘由来成分の検討において御協力頂き，丁寧な御指導及び御助言を賜りました松山大学薬学部薬理学研究室 古川美子教授，中島光業教授，奥山聡准教授に深く感謝致します。研究遂行にあたり，クルミの含有成分の解析において，特別な御協力及び御助言を賜りました岡山県立大学保健福祉学部 伊東秀之教授に深く感謝致します。河内晩柑果汁の製法検討において，御協力及び御助言賜りました愛媛県産業技術研究所 福田直大氏，玉井敬久氏に感謝致します。

奨学金給付による御支援を賜りました日本薬学会長井記念薬学研究奨励（Nagai Memorial Research Scholarship from the Pharmaceutical Society of Japan）に感謝の意を表します。

最後に，学生生活を支えてくれた家族に感謝致します。

本研究に関する論文及び学会発表

論文発表

1. 第1章

Rie Haramiishi, Satoshi Okuyama, Morio Yoshimura, Mitsunari Nakajima, Yoshiko Furukawa, Hideyuki Ito, Yoshiaki Amakura, Identification of the characteristic components in walnut and anti-inflammatory effect of glansreginin A as an indicator for quality evaluation, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **84**, 187-197 (2020).

2. 第2章

Rie Haramiishi, Morio Yoshimura, Satoshi Okuyama, Naohiro Fukuda, Takahisa Tamai, Mitsunari Nakajima, Yoshiko Furukawa, Yoshiaki Amakura, Effects of production-line squeezing techniques and heat treatment on functional components of *Citrus kawachiensis* (Kawachi bankan) fruits, *Food. Sci. Technol. Res.*, **25**, 809-815 (2019).

学会発表

1. 孕石梨愛, 奥山 聡, 好村守生, 中島光業, 古川美子, 伊東秀之, 天倉吉章, クルミ特徴成分の解析と抗炎症活性, 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2019年11月9日 (高松: サンポートホール高松)
2. 山田梨愛, 半田洋士, 中村昌文, 好村守生, 伊東秀之, 天倉吉章, クルミ特徴成分の解析と生理活性, 日本薬学会第137年会, 2017年3月27日 (仙台: 東北大学)
3. 山田梨愛, 好村守生, 半田洋士, 中村昌文, 天倉吉章, 穀類・ナッツ類の AhR 活

性とクルミの活性成分の探索，日本薬学会第 136 年会，2016 年 3 月 29 日（横浜：
パシフィコ横浜）

4. 山田梨愛，杉脇秀美，福田直大，玉井敬久，好村守生，奥山 聡，中島光業，古川
美子，天倉吉章，河内晩柑ジュースの成分プロファイリングと安定性，日本農芸化
学会中四国支部第 44 回講演会，2016 年 1 月 23 日（岡山：岡山県立大学）

参考文献

- 1) 厚生労働省, 患者のための薬局ビジョン～「門前」から「かかりつけ」、そして「地域」へ～, 平成 27 年 10 月 23 日.
- 2) 首相官邸, 人生 100 年時代構想会議中間報告, 平成 29 年 12 月.
- 3) 畝山智香子, いわゆる「健康食品」について薬剤師が知っておくべきこと. *薬学雑誌*, **138**, 1509-1510 (2018).
- 4) 厚生労働省, 「健康食品」のホームページ. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/hokenkinou/index.html.
- 5) 消費者庁, 機能性表示食品の届出等に関するガイドライン, 平成 27 年 3 月 30 日制定.
- 6) 広島県健康福祉局薬務課, 健康食品の利用に係る県民実態調査(アンケート)結果, 平成 28 年 5 月.
- 7) 一般社団法人農山漁村文化協会編, 地域食材大百科第 3 巻「果実・木の実, ハーブ」, 農山漁村文化協会, pp. 139-142 (2010).
- 8) 上海科学技術出版社 小学館編, 中薬大辞典第二巻, pp. 853-855 (1985).
- 9) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会, 日本食品標準成分表 2015 年版(七訂), 平成 27 年 12 月.
- 10) Feldman EB., The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *J. Nutr.*, **132**, 1062S-1101S (2002).
- 11) Fukuda T., Ito H., Yoshida T., Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry*, **63**, 765-801 (2003).

- 12) Ito H., Okuda T., Fukuda T., Hatano T., Yoshida T., Two novel dicarboxylic acid derivatives and a new dimeric hydrolyzable tannin from walnuts. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 672-679 (2007).
- 13) Guasch-Ferré M., Li J., Hu FB., Salas-Salvadó J., Tobias DK., Effects of walnut consumption on blood lipids and other cardiovascular risk factors: an updated meta-analysis and systematic review of controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, **108**, 174-187 (2018).
- 14) Kris-Etherton PM., Walnuts decrease risk of cardiovascular disease: A summary of efficacy and biologic mechanisms. *J. Nutr.*, **144**, 547S-554S (2014).
- 15) Arab L., Dhaliwal SK., Martin CJ., Larios AD., Jackson NJ., Elashoff D., Association between walnut consumption and diabetes risk in NHANES. *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, **34**: e3031 (2018).
- 16) Shimoda H., Tanaka J., Kikuchi M., Fukuda T., Ito H., Hatano T., Yoshida T., Walnut polyphenols prevent liver damage induced by carbon tetrachloride and D-galactosamine: Hepatoprotective hydrolyzable tannins in the kernel pellicles of walnut. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 4444-4449 (2008).
- 17) Shimoda H., Tanaka J., Kikuchi M., Fukuda T., Ito H., Hatano T., Yoshida T., Effect of polyphenol-rich extract from walnut on diet-induced hypertriglyceridemia in mice via enhancement of fatty acid oxidation in the liver. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1786-1792 (2009).
- 18) Luo T., Miranda-Garcia O., Adamson A., Hamilton-Reeves J., Sullivan DK., Kinchen JM., Shay NF., Consumption of walnuts in combination with other whole foods produces physiologic, metabolic, and gene expression changes in obese C57BL/6J high-fat-fed male mice. *J. Nutr.*, **146**, 1641-1650 (2016).

- 19) Muthaiyah B., Essa MM., Lee M., Chauhan V., Kaur K., Chauhan A., Dietary supplementation of walnuts improves memory deficits and learning skills in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, **42**, 1397-1405 (2014).
- 20) Muthaiyah B., Essa MM., Chauhan V., Chauhan A., Protective effects of walnut extract against amyloid beta peptide-induced cell death and oxidative stress in PC12 cells. *Neurochem. Res.*, **36**, 2096-2103 (2011).
- 21) Byerley LO., Samuelson D., Blanchard E., Luo M., Lorenzen BN., Banks S., Ponder MA., Welsh DA., Taylor CM., Changes in the gut microbial communities following addition of walnuts to the diet. *J. Nutr. Biochem.*, **48**, 94-102 (2017).
- 22) Papoutsi Z., Kassi E., Chinou I., Halabalaki M., Skaltsounis LA., Moutsatsou P., Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483. *Br. J. Nutr.*, **99**, 715-722 (2008).
- 23) Macmillan J., Suter PJ., The structure of a C₁₂-acid from the seed of *Phaseolus multiflorus*. *Tetrahedron*, **23**, 2417-2419 (1967).
- 24) Jurd L., Plant polyphenols. I. The polyphenolic constituents of the pellicle of the walnut (*Juglans regia*). *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 3445-3448 (1956).
- 25) Nonaka G., Ezaki E., Hayashi K., Nishioka I., Flavanol glucosides from rhubarb and *Rhaphiolepis umbellata*. *Phytochemistry*, **22**, 1659-1661 (1983).
- 26) Matsunami K., Otsuka H., Takeda Y., Structural revisions of blumenol C glucoside and byzantionoside B., *Chem Pharm Bull.*, **58**, 438-441 (2010).
- 27) Amakura Y., Yoshimura M., Ouchi K., Okuyama S., Furukawa Y., Yoshida T., Characterization of constituents in the peel of *Citrus kawachiensis* (Kawachibankan). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1977-1980 (2013).

- 28) Daly JW., Witkop B., Selective exchange of nuclear protons in hydroxyindoles. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 1032-1033 (1967).
- 29) Granica S., Czerwińska MF., Piwowarski JP., Ziaja M., Kiss AK., Chemical composition, antioxidative and anti-inflammatory activity of extracts prepared from aerial parts of *Oenothera biennis* L. and *Oenothera paradoxa* Hudziok obtained after seeds cultivation. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 801-810 (2013).
- 30) Tanaka T., Jiang Z-H., Kouno I., Distribution of ellagic acid derivatives and a diarylheptanoid in wood of *Platycarya strobilacea*. *Phytochemistry*, **47**, 851-854 (1998).
- 31) Hegde VR., Pu H., Patel M., Jachens A., Gullo VP., Chan TM., A new antitumor compound from the plant *Oryctanthus* sp. as a VEGF receptor binding inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 4907-4909 (2005).
- 32) Haddock EA., Gupta RK., Al-Shafi SMK., Haslam E., Magnolato D., The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants. Part 1. Introduction. Naturally occurring galloyl esters. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1982**, 2515-2524 (1982).
- 33) Okuda T., Yoshida T., Hatano T., Yazaki K., Ashida M., Ellagitannins of the Casuarinaceae, Stachyuraceae and Myrtaceae. *Phytochemistry*, **21**, 2871-2874 (1982).
- 34) Wilkins CK., Bohm BA., Ellagitannins from *Tellima grandiflora*, *Phytochemistry*, **15**, 211-214 (1976).
- 35) Okuda T., Yoshida T., Ashida M., Yazaki K., Tannins of *Casuarina* and *Stachyurus* species. Part 1. Structures of pedunculagin, casuarictin, strictinin, casuarinin, casuariin, and stachyurin, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1983**, 1765-1772 (1983).
- 36) Yoshida T., Ohbayashi H., Ishihara K., Ohwashi W., Haba K., Okano Y., Shingu T., Okuda T., Tannins and related polyphenols of Melastomataceous Plants. I. Hydrolyzable tannins from *Tibouchina semidecandra* COGN. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2233-2240 (1991).

- 37) Okuda T., Hatano T., Yazaki K., Ogawa N., Rugosin A, B, C and praecoxin A, tannins having a valoneoyl group. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4230-4233 (1982).
- 38) Namba O., Yoshida T., Liu Y., Chen L., Okuda T., Prostratins A and B: New hydrolysable tannin monomer and trimer from *Euphorbia prostrata* and *Loropetalum chinense*. *Planta Med.*, **56**, 587 (1990).
- 39) Tanaka T., Nakashima T., Ueda T., Tomii K., Kouno I., Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 899-901 (2007).
- 40) Tanaka T., Kirihara S., Nonaka G., Nishioka I., Tannins and related compounds. CXXIV. Five new ellagitannins, platycaryanins A, B, C, and D, and platycariin, and a new complex tannin, strobilanin, from the fruits and bark of *Platycarya strobilacea* SIEB et ZUCC., and biomimetic synthesis of C-glycosidic ellagitannins from glucopyranose-based ellagitannins. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1708-1716 (1993).
- 41) Yoshida T., Maruyama T., Nitta A., Okuda T., Eucalbanins A, B and C, monomeric and dimeric hydrolyzable tannins from *Eucalyptus alba* REINW. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1750-1754 (1992).
- 42) Medical Tribune, 2010. 2. 11, p.39.
- 43) Noh H., Jeon J., Seo H., Systemic injection of LPS induces region-specific neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in normal mouse brain. *Neurochem. Int.*, **69**, 35-40 (2014).
- 44) Murakami A., Ohigashi H., Anti-inflammatory and anticarcinogenesis potentials of citrus coumarins and polymethylated flavonoids. In *Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease: Food Factors and Gene Interactions*; Mine Y., Miyashita K., Shahidi F., Eds.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, pp. 311–324 (2009).

- 45) Spencer JPE., Vauzour D., Rendeiro C., Flavonoids and cognition: The molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Arch. Biochem. Biophys.*, **492**, 1–9 (2009).
- 46) Onozuka H., Nakajima A., Matsuzaki K., Shin R-W., Ogino K., Saigusa D., Tetsu N., Yokosuka A., Sashida Y., Mimaki Y., Yamakuni T., Ohizumi Y., Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A β pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **326**, 739–744 (2008).
- 47) Nakajima A., Aoyama Y., Nguyen T-TL., Shin E-J., Kim H-C., Yamada S., Nakai T., Nagai T., Yokosuka A., Mimaki Y., Ohizumi Y., Yamada K., Nobiletin, a citrus flavonoid, ameliorates cognitive impairment, oxidative burden, and hyperphosphorylation of tau in senescence-accelerated mouse. *Behav. Brain Res.*, **250**, 351–360 (2013).
- 48) Saigusa D., Shibuya M., Jinno D., Yamakoshi H., Iwabuchi Y., Yokosuka A., Mimaki Y., Naganuma A., Ohizumi Y., Tomioka Y., Yamakuni T., High-performance liquid chromatography with photodiode array detection for determination of nobiletin content in the brain and serum of mice administrated the natural compound. *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 3635–3641 (2011).
- 49) Singh SP., Wahajuddin, Tewari D., Patel K., Jain GK., Permeability determination and pharmacokinetic study of nobiletin in rat plasma and brain by validated high-performance liquid chromatography method. *Fitoter.*, **82**, 1206–1214 (2011).
- 50) 農林水産省生産局園芸作物課 平成 28 年特産果樹生産動態等調査, 令和元年 7 月.
- 51) Okuyama S., Shimada N., Kaji M., Morita M., Miyoshi K., Minami S., Amakura Y., Yoshimura M., Yoshida T., Watanabe S., Nakajima M., Furukawa Y., Heptamethoxyflavone a citrus flavonoid, enhances brain-derived neurotrophic factor production and neurogenesis in the hippocampus following cerebral global ischemia in mice. *Neurosci. Lett.*, **528**, 190–195 (2012).

- 52) Okuyama S., Morita M., Miyoshi K., Nishigawa Y., Kaji M., Sawamoto A., Terugo T., Toyoda N., Makihata N., Amakura Y., Yoshimura M., Nakajima M., Furukawa Y., 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, on protection against memory impairment and neuronal cell death in a global cerebral ischemia mouse model. *Neurochem. Int.*, **70**, 30–38 (2014).
- 53) Sawamoto A., Okuyama S., Yamamoto K., Amakura Y., Yoshimura M., Nakajima M., Furukawa Y., 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, ameliorates corticosterone-induced depression-like behavior and restores brain-derived neurotrophic factor expression, neurogenesis, and neuroplasticity in the hippocampus. *Molecules*, **21**, 541 (2016).
- 54) Okuyama S., Miyoshi K., Tsumura Y., Amakura Y., Yoshimura M., Yoshida T., Nakajima M., Furukawa Y., 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus polymethoxylated flavone, attenuates inflammation in the mouse hippocampus. *Brain Sci.*, **5**, 118–129 (2015).
- 55) Okuyama S., Fukata T., Nishigawa Y., Amakura Y., Yoshimura M., Yoshida T., Nakajima M., Furukawa Y., Citrus flavonoid improves MK-801-induced locomotive hyperactivity: Possible relevance to schizophrenia. *J. Funct. Foods*, **5**, 2002–2006 (2013).
- 56) Okuyama S., Morita M., Kaji M., Amakura Y., Yoshimura M., Shimamoto K., Ookubo Y., Nakajima M., Furukawa Y., Auraptene acts as an anti-inflammatory agent in the mouse brain. *Molecules*, **20**, 20230-20239 (2015).
- 57) Okuyama S., Katoh M., Kanzaki T., Kotani Y., Amakura Y., Yoshimura M., Fukuda N., Tamai T., Sawamoto A., Nakajima M., Furukawa Y., Auraptene/naringin-rich fruit juice of *Citrus kawachiensis* (Kawachi Bankan) prevents ischemia-induced neuronal cell death in mouse brain through anti-inflammatory responses, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **65**, 66-71 (2019).

- 58) Igase M., Okada Y., Ochi M., Igase K., Ochi H., Okuyama S., Furukawa Y., Ohyagi Y., Auraptene in the peels of *Citrus kawachiensis* (Kawachibankan) contributes to the preservation of cognitive function: A randomized, placebo-controlled, double-blind study in health volunteers. *J. Prev. Alz. Dis.*, **5**, 197-201 (2018).
- 59) Ohta H., Tonohara K., Kohno K., Ifuku Y., Influence of several types of juice extractors on yield and quality characteristics of yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) juice. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **30**, 629-635 (1983).
- 60) Kulkarni A., Yokota T., Suzuki S., Etoh H., Subcritical water extraction of barley to produce a functional drink. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 236-239 (2008).
- 61) Urashima T., Suyama K., Adachi S., Identification of some volatile compounds formed from lactose monohydrate during pyrolysis. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **57**, 641-647 (1983).

化合物番号

- 1 Glansreginin C
- 2 Ellagic acid 4-*O*-(3'-*O*-galloyl)- β -D-xyloside
- 3 Platycaryanin A methyl ester
- 4 Glansreginic acid
- 5 Glansreginin A
- 6 Methyl gallate
- 7 Ellagic acid
- 8 (+)-Catechin
- 9 Blumenol C glucoside
- 10 Byzantionoside B
- 11 4'-Dihydrophaseic acid β -glucopyranose ester
- 12 5-Hydroxytryptamine
- 13 Valoneic acid dilactone methyl ester
- 14 Ellagic acid 4-*O*- β -D-xyloside
- 15 Glansreginic acid 8-*O*- β -D-glucoside
- 16 Glansreginin B
- 17 1,2,6-Tri-*O*-galloyl- β -D-glucose
- 18 1,2,4,6-Tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose
- 19 1,2,3,4,6-Penta-*O*-galloyl- β -D-glucose
- 20 Strictinin
- 21 Isostrictinin
- 22 Tellimagrandin I

- 23 Tellimagrandin II
- 24 Casuarictin
- 25 Pedunculagin
- 26 Pterocarinin C
- 27 Rugosin C
- 28 Rugosin C methyl ester
- 29 Casuarinin
- 30 Euprostin A
- 31 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone
- 32 Nobiletin
- 33 Coniferin
- 34 Ioconiferin
- 35 Narirutin 4'-*O*- β -D-glucoside
- 36 Naringin 4'-*O*- β -D-glucoside
- 37 Syringin
- 38 Narirutin
- 39 Naringin
- 40 Marmin
- 41 6',7'-Dihydroxybergamottin
- 42 Auraptene
- 43 Bergamottin