

氏 名	かん だ とも まさ 神 田 智 正
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2332 号
学位授与の日付	平 成 12 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	リンゴ由来ポリフェノール成分の特性に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 佐々木隆造	教 授 大 東 肇	教 授 伏 木 亨
--------	--------------------	-----------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

主に植物の二次代謝産物であるポリフェノールは、生体防御や種の保存に関与することが多いとされ、その構造や生理活性は非常にバラエティーに富んでいる。植物ポリフェノールのなかで、フラボノイド類、タンニン類、フェノールカルボン酸類、フェノールアルデヒド類等は医薬品から工業製品まで様々な利用が行われている。リンゴ (*Rosaceae malus sp.*) に関しては、「一日一個のリンゴは医者を選ばせる」と西洋の諺に代表されるように、健康に寄与する食用果実であると広く認識されているが、これまでに機能性成分やその活性という概念に基づいたリンゴの研究は非常に少なく、リンゴ果実を食しての疫学的研究やペクチン（食物繊維）の研究が中心であった。本論文では、リンゴ由来ポリフェノールの成分特性と有用性を明らかにすることを目的とし、主要なポリフェノール成分であるプロアントシアニジン類につき精製、定量や化学的特性を解析するとともに、様々な生理機能性を探索した。内容の主な点は以下の通りである。

第2章では、リンゴ由来ポリフェノール成分が、摘果された未熟果実に高濃度で存在することを見出した。また総ポリフェノールに占める各ポリフェノール成分を解明するとともに、特にリンゴポリフェノール中最も含有量が高くまた植物界で不明な部分を多く残すプロアントシアニジン（縮合型タンニン）を MALDI-TOF MS により分子量を解析した。その結果、リンゴではプロアントシアニジンの中でも構成ユニットがカテキンとエピカテキンに限定されるプロシアニジンのグループのみで構成され、カテキン類を1ユニットとした2量体から15量体までの特徴的構造を有するプロシアニジンで構成されていることを見出した。また各種ポリフェノール成分を定量し、リンゴ由来ポリフェノールの成分構成を明らかにした。

第3章では、リンゴポリフェノールの抗酸化関連機能について評価し、脂肪酸の自動酸化に対する抗酸化作用を有することを示した。ついで、リンゴポリフェノール配合食餌は、血清および肝臓中の過酸化脂質量、血清中 LDL コレステロール及び肝臓内酸化コレステロールの上昇を抑制することを示した。また食肉用豚の食餌にリンゴポリフェノールを配合することにより、豚肉中コレステロールが減少することを見出した。

第4章では、リンゴポリフェノールのアレルギー抑制機能として、炎症に関連する酵素であるヒアルロニダーゼに対する阻害作用や、ラット好塩基球白血病細胞やマスト細胞からのヒスタミン遊離に対する抑制作用を見出した。またその機構は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇抑制によることを発見した。そして主要な活性成分はリンゴポリフェノール中のプロシアニジンであることを証明した。さらに、I型アレルギーモデルマウスを用いた経口投与実験により、リンゴポリフェノールが *in vivo* でアレルギー反応を抑制する効果を持つことを立証し、ヒトアトピー性皮膚炎患者に対する治療効果の評価を行った。

第5章では、*Salmonella typhimurium* と発癌性物質を用いた Ames 法により、リンゴポリフェノールの抗変異原としての評価を行った。その結果、benzo(a)pyrene や Trp-P-1, Trp-P-2 による変異誘導を抑制することを証明した。また主要な活性成分はリンゴポリフェノール中のプロシアニジンであることを見出した。

第6章では、リンゴポリフェノール中、様々な生理機能性が認められたプロシアニジン画分につき、重合度別にプロシアニジンオリゴマーを効率良く分離する方法を開発した。すなわちリンゴポリフェノール画分を合成吸着樹脂カラムに吸着さ

せた後、特定条件のアルコールでプロシアニジン画分を溶出、乾燥した後に溶媒抽出によりオリゴマー画分を調製、さらに順相クロマトグラフィーを応用することでこれまで容易に入手できなかったプロシアニジン2量体から5量体を重合度別に高純度に精製する方法論を確立した。

第7章では、リンゴポリフェノールのコレラ毒素（ADP-リボシル化酵素）阻害効果を調べた。その結果リンゴポリフェノールはADP-リボシル化阻害活性を有し、そしてプロシアニジン画分のみが阻害活性を有することを発見した。さらにプロシアニジンは重合度の増加にともない阻害活性が強くなることを示し、ポリフェノールの生理活性における分子構造の重要性を示した。

論文審査の結果の要旨

近年、食品成分が生活習慣病の予防などに深く関わっていることを示す研究報告が増加し、健康に大きく寄与していることが明らかになってきている。特に植物成分では、ビタミン類や食物繊維に加え、カロチノイドやポリフェノール類の健康に対する研究が盛んになっている。本論文は、リンゴ由来のポリフェノールに関する研究を行い、その成分組成や構造特性を解明するとともに抗酸化作用やアレルギー抑制作用などの生理活性を有することを証明した。さらに、これらの生理活性を担う重要なポリフェノールであるプロシアニジンの重合度別精製法を確立したものであり、評価される主な点は以下の通りである。

1. リンゴ栽培過程で摘果される未熟果実に、成熟果実の10倍以上のポリフェノールが存在することを見出し、その主要な構成成分としてのプロアントシアニジン画分を精製し、HPLCやMALDI-TOF MSを用いた解析によりカテキン類を1ユニットとした2量体から15量体までの特徴的構造を有するプロシアニジンの混合物であることを明らかにした。

2. 脂肪酸の自動酸化系を用いてリンゴポリフェノールの抗酸化作用を明らかにした。またラットを用いて酸化コレステロールが誘発する生体内脂質代謝変動に対するリンゴポリフェノールの影響を解析した。その結果、リンゴポリフェノールは、血清及び肝臓中の過酸化脂質量、血中LDLコレステロール、肝臓内酸化コレステロールの上昇を抑制することを示した。さらに食用肉豚の食餌にリンゴポリフェノールを配合することにより、豚肉中コレステロールが減少することを示した。

3. ラット好塩基球白血球細胞（RBL-2H3）の抗原抗体反応系やラット腹腔マスト細胞の脱顆粒反応系において、リンゴポリフェノールがヒスタミン遊離反応を抑制することを示した。またその機構としてRBL-2H3細胞内でのカルシウムイオン濃度の上昇抑制によることを見出し、この活性はリンゴポリフェノール中のプロアントシアニジンによることを示した。さらにI型アレルギーモデルマウスへの経口投与実験により、リンゴポリフェノールが生体でのアレルギー反応を抑制することを発見した。そして、ヒトアトピー性皮膚炎患者に対し外用による二重盲検試験を行った結果、リンゴポリフェノールが治療効果を持つことを示した。

4. 変異原アッセイ（Ames法）により、リンゴポリフェノールがbenzo(a)pyreneやTrp-P-1、Trp-P-2の変異原性を抑制することを示した。またこの活性はリンゴポリフェノール中のプロシアニジンであることを示すと同時に、変異原性を抑制する機構について考察した。

5. リンゴポリフェノールの中で特に有効な活性がみられたプロシアニジンオリゴマー画分につき、重合度別に効率良く分離する方法を開発した。すなわち、合成吸着樹脂精製、溶媒抽出、順相クロマトグラフィーを組み合わせることで、これまで容易に入手できなかったプロシアニジン2量体から5量体を高純度に精製することに成功した。

6. リンゴポリフェノールがコレラ毒素（ADP-リボシル化酵素）に対して阻害活性を有することを発見した。各種ポリフェノールのうち、プロシアニジン画分にのみ活性があることを示した。さらにプロシアニジンは重合度の増大とともに阻害活性が上昇することを明らかにし、ポリフェノールの生理活性発現における分子構造の重要性を指摘した。

以上のように本論文は、リンゴポリフェノールの成分特性を解明し、様々な生理機能を発見している。そして、これまで不明な点を多く残していたプロアントシアニジンの構造特性並びに生理機能を明らかにした。さらにプロシアニジンオリゴマーを高効率で精製する方法を開発したものであり、食品科学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成12年7月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力

が十分あるものと認めた。