

|           |                                                                               |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | まつもと ひとし<br>松 本 均                                                             |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                                                                     |
| 学 位 記 番 号 | 論 農 博 第 2477 号                                                                |
| 学位授与の日付   | 平 成 15 年 3 月 24 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    | Physiological Effects of Blackcurrant Anthocyanins<br>(カシスに含まれるアントシアニン類の生理機能) |

|        |                      |           |           |
|--------|----------------------|-----------|-----------|
| 論文調査委員 | (主 査)<br>教 授 桑 原 保 正 | 教 授 大 東 肇 | 教 授 宮 川 恒 |
|--------|----------------------|-----------|-----------|

### 論 文 内 容 の 要 旨

ブルーベリー (*Vaccinium angustifolium*, *V. ashei*, *V. corymbosum*) は視覚改善効果のある食品として有名であるが、その有効性に関する科学的データはなく、別種ビルベリー (*V. myrtillus*) のデータが用いられている。一方、視覚改善効果に対するビルベリーの有効成分はアントシアニン (以下 AC と略す) とされるが、有効性試験はすべて AC 濃縮物 (含量25%) で行われており、有効成分そのものの証明はない。そこで同じベリー類でも AC 含量が高く、組成に特徴のあるカシス (*Ribes nigrum*) に注目し、その生理機能を検討した。

カシス濃縮果汁 (AC 含量0.6%) より、AC 成分を Nanofiltration 膜分離法とイオン交換クロマトグラフ法で濃縮し、食品組成物の AC 濃縮粉末 (AC 含量10.8%, BCA) を調製した。AC は delphinidin-3-rutinoside (D3R), delphinidin-3-glucoside (D3G), cyanidin-3-rutinoside (C3R) および cyanidin-3-glucoside (C3G) で構成され、 $\beta$ -glucosidase (アーモンド由来, Sigma) 並びに hesperidinase (タナベ2号, 田辺製薬) 処理と HPLC による分画、結晶化を組み合わせ、それぞれ AC4 種の結晶として調製することに成功した。

ラットに D3R, C3R および C3G を、ヒトに BCA をそれぞれ経口投与したが、ラットの C3G 投与区でメチル化体を検出したものの、ヒトではすべて代謝されず、そのまま有効成分として機能すると推論した。体内の滞留時間は糖成分で異なり、glucoside より rutinoside の方が長い傾向力があつた。

ヒトによる BCA の摂取実験で、暗順応改善効果、屈折値低下抑制効果などの視覚改善効果を立証した。

過酸化水素ラジカル消去活性を chemiluminescence 法で調べると、AC 類の中では、アグリコンとして delphinidin が、配糖体としては rutinoside が最も強い活性を示すことを示した。BCA 摂取によりヒト血漿中の過酸化水素ラジカル消去活性が増大することを確認したが、血中 AC 濃度との相関は低く、代謝物などの存在が示唆される結果となった。

網膜桿体中の rhodopsin (視物質) は光を受容し、いくつかの段階を経由して情報伝達し、opsin と 11-*cis*-retinal に分解される。両分解産物はその後 rhodopsin に再生される。暗順応速度はこの再生速度に関連すると推定されている。暗順応改善効果の作用機作とその有効成分を考察するため、カエル網膜 rhodopsin の再生速度に対する結晶 AC の影響を検討した。Rhodopsin を抽出し、白色光に暴露して opsin を調製した。また all-*trans*-retinal は、光異性化後、暗所で HPLC 分画して 11-*cis*-retinal を調製した。あらかじめ AC を加えた opsin 溶液に、11-*cis*-retinal を 4°C で加えて反応させ、rhodopsin の再生量を経時的に 500 nm の吸光度で測定した。その結果、delphinidin 配糖体での再生速度は対照区と同じであったが、cyanidin 配糖体は再生を有意に促進した。Opsin と 11-*cis*-retinal との結合は中間体を介した 2 段階反応 (前半は疎水的な結合、後半は Schiff 塩基を介した結合) とされている。再生の初速度を C3R 添加区と対照区で 11-*cis*-retinal の濃度を変え計測したところ、C3R 添加は opsin から中間体生成過程を約 2.4 倍増加させた。BCA の暗順応改善効果は、opsin と 11-*cis*-retinal の結合の際に形成される中間体の生成を cyanidin 類が加速することに起因することを立証した。

水晶体の屈折値は、毛様体平滑筋の収縮弛緩により調節される。BCA 摂取による屈折値低下の抑制効果について、作用機作とその有効成分を検討した。毛様体筋は endothelin-1 によって収縮し、NO 発生剤、K<sup>+</sup>channel 阻害剤、 $\beta$ -adre-

noceptor 阻害剤などで弛緩する。ウシ眼球から摘出した毛様体筋は、endothelin-1 で収縮させた後、D3R ( $10^{-5}$ M) を作用させると、弛緩する。この作用機作を種々の阻害剤を用いて調べた。NOS 阻害剤 (NG-nitro-L-arginine (NOARG)), NO 消去剤, guanylate cyclase 阻害剤, および選択的 endothelin-B (ETB) 受容体阻害剤は阻害作用を示した。NOARG による阻害は L-arginine の過剰添加により消失した。一方,  $K^+$ channel 阻害剤,  $\beta$ -adrenoceptor 阻害剤および cyclooxygenase 阻害剤は、影響を与えなかった。以上の結果, D3R は ETB 受容体を刺激し, NO を放出させ, そのため毛様体平滑筋が弛緩する機構が示唆された。本効果は C3R でも見られたが, カシスの他のポリフェノール成分 myricetin-3-rutinoside および quercetin-3-rutinoside では見られず, AC 特有の効果であると結論した。

以上のように, AC 特に C3R および D3R の視覚改善効果が立証された。

## 論文審査の結果の要旨

ブルーベリーは、視覚改善効果のある機能性食品として大きな市場を形成しているが、その有効性は厳密には証明されていない。検証が進まない最大の原因は有効成分とされるアントシアニン (AC) が15成分と多岐にわたり、個々の AC の調製が困難なことに起因する。本研究では AC 組成が4成分と単純なカシスに着目し、加えて酵素処理を施し、より単純化した AC 混合物から、HPLC で精製し、結晶標品とした AC4 種を用い、その視覚に対する生理機能を検討し、有効性を証明した。本論文の評価すべき点は次のとおりである。

1. カシス濃縮果汁より、AC 成分を濃縮した食品組成物 (BCA) を調製した。さらに酵素反応、分画、結晶化を組み合わせ、カシスに含まれる AC 4 種を結晶として調製することに成功した。
2. カシスの主要な AC である D3R および C3R は、ラットとヒトでは代謝されず、血中に移行し、尿中へ排泄されることを示した。ヒトではすべて代謝されず、そのまま有効成分として機能すると推論した。体内の滞留時間は糖成分で異なり、glucoside より rutinoside の方が長い傾向を認めた。
3. ヒトボランティアによる BCA の摂取実験で、暗順応改善効果、屈折値低下抑制効果などの視覚改善効果を立証した。
4. 過酸化水素ラジカルの消去活性を chemiluminescence 法で調べた。AC 類の中では、アグリコンとして delphinidin が、配糖体としては rutinoside が最も強い活性を示すことを示した。BCA 摂取によりヒト血漿中の消去活性が増大することを確認したが、血中 AC 濃度との相関は低く、代謝物などの存在が示唆された。
5. BCA の暗順応改善効果が、opsin と 11-*cis*-retinal の結合で形成される中間体生成を cyanidin 類が加速することに起因することを、カエル網膜での rhodopsin 再生速度に対する結晶 AC の影響を検討して、立証された。Delphinidin 配糖体での再生速度は対照区と同じであったが、cyanidin 配糖体は再生を有意に促進し、中でも C3R 添加は opsin から中間体生成の過程を2.4倍増加させた。
6. 水晶体の屈折値低下の抑制効果は、AC 類が endothelin-B 受容体を刺激し NO を放出させ、眼球の毛様体筋を弛緩させることによるものであることを、種々の阻害剤の影響を調べて立証した。

以上のように、本論文はカシスに含まれる AC4 成分を結晶として効率良く調製し、その視覚改善効果を詳細に検討し、ブルーベリーの機能性食品としての有効性を立証したものであり、天然物化学、栄養学および生理学分野に寄与するところが多い。

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15年2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。