

レモン (*Citrus limon*) 特有のフラボノイドに関する研究  
ー成分分析・分子特性・機能性に基づく有用性の評価ー

県立広島大学大学院  
総合学術研究科  
生命システム科学専攻

博 士 論 文

平成 27 年 3 月  
(2015 年)

山 本 涼 平

# 目次

## 第1章 緒論

1-1	レモンの歴史的背景と国内生産	1
1-2	レモンの品種について	4
1-3	カンキツ類とポリフェノール	5
1-4	カンキツ類とリモノイド	9
1-5	レモンの成分と概要	10
1-6	本研究について	11

## 第2章 レモンの成分分析における HPLC プロファイリング法の確立 およびエリオシトリンの分離精製

2-1	はじめに	13
2-2	本章における研究の目的	14
2-3	実験方法	
2-3-1	試料	15
2-3-2	試料調製	16
2-3-3	HPLC分析条件の設定	16
2-3-4	エリオシトリンの単離と物性の確認	19
2-3-5	統計処理	20
2-4	結果	
2-4-1	フラボノイドの成分分析	21
2-4-2	リモノイドの成分分析	22
2-4-3	ビタミンCおよびクエン酸の分析	23
2-4-4	エリオシトリンの抽出条件と単離精製	24
2-4-5	エリオシトリンの基本的な物性評価	26
2-5	小括	29

## 第3章 エリオシトリンからの効率的モノグルコシド生成

3-1	はじめに	31
3-2	本章における研究の目的	34
3-3	実験方法	
3-3-1	試料	35

3-3-2	HPLC 分析条件の設定	35
3-3-3	エリオシトリンの酸加水分解	36
3-3-4	酵素活性の測定	36
3-3-5	エリオシトリンの酵素処理と変換物の単離精製	36
3-3-6	$\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性試験	37
3-3-7	統計処理	37
3-4	結果	
3-4-1	標準物質の HPLC プロファイル	39
3-4-2	エリオシトリンの酸加水分解	40
3-4-3	エリオシトリンの酵素水解	42
3-4-4	エリオジクチオールとエリオジクチオール 7-O-グルコシドの精製	46
3-4-5	$\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の評価	47
3-4-6	レモンフラボノイドの $\alpha$ -グルコシダーゼに対する阻害様式	48
3-5	小括	50

## 第4章 レモンフラボノイドの生物活性の評価

4-1	はじめに	52
4-2	本章における研究の目的	60
4-3	実験方法	
4-3-1	試薬および機器	61
4-3-2	DPPH ラジカル消去活性試験	63
4-3-3	$\beta$ -カロテン褪色抑制活性試験	63
4-3-4	ABTS ラジカル消去活性試験	64
4-3-5	WST-1 法を用いた細胞障害性の評価	65
4-3-6	過酸化水素とドキソルビシンによる細胞障害に対する フラボノイドの細胞保護作用	66
4-3-7	細胞内吸収量の測定とラットにおける吸収代謝評価	67
4-3-8	統計処理	68
4-4	結果	
4-4-1	DPPH ラジカル消去活性試験	69
4-4-2	$\beta$ -カロテン褪色抑制活性試験	70
4-4-3	ABTS ラジカル消去活性試験	73
4-4-4	レモンフラボノイドおよびその誘導体の細胞障害性の評価	75
4-4-5	過酸化水素およびドキソルビシン誘導性酸化障害に対する レモンフラボノイドの細胞保護効果の評価	78

4-4-6	レモンフラボノイドの細胞内取り込み量の評価	83
4-4-7	ラットにおけるエリオシトリンの吸収動態の解析	87
4-5	小括	91
<b>第5章 レモン品種間差異の分析とその応用</b>		
5-1	はじめに	96
5-2	本章における研究の目的	100
5-3	実験方法	
5-3-1	試料	101
5-3-2	サンプルの調製	101
5-3-3	統計処理	102
5-4	結果	
5-4-1	レモンのフラボノイドに関する系統または品種間の差異	103
5-4-2	含有フラボノイドの主成分分析と新品種イエローベルの特徴付け	110
5-4-3	レモン中のフラボノイドの成熟時期による分布の変化	115
5-5	小括	116
<b>第6章 総括</b>		118
謝辞		120
引用文献		121

## 略語一覽

ABTS : 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

AsA : Ascorbic acid

BHA : Butylated hydroxyanisole

BHT : Dibutyl hydroxytoluene

CA : Citric acid

CBG : Cytosolic  $\beta$ -glucosidase

CGTase : Cyclodextrin glucanotransferase

CH<sub>3</sub>COOH : Acetic acid

CH<sub>3</sub>Cl : Chloroform

CH<sub>3</sub>CN : Acetonitrile

DMEM : Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DOX : Doxorubicin

DPPH : 2, 2-Diphenyl-picryl-hydrazyl

EGCG : Epigallocatechin gallate

EDO : Eriodictyol

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EMIQ : Enzymatically modified isoquercitrin

EPA : Environmental protection agency

ERI : Eriocitrin

ESR : Electron spin resonance

EtOH : Ethanol

FBS : Fetal bovine serum

GATT : General agreement on tariffs and trade

GLUT : Glucose transporter

GST : Glutathione S-transferase

HEPES : 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid

HL-60 : Human promyelocytic leukemia cells

HPLC : High performance liquid chromatography

HSP : Hesperidin  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Sulfuric acid  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : Phosphoric acid  
IC<sub>50</sub> : 50% Inhibitory concentration  
IEC-6 : Rat small intestine epithelial cells  
LC<sub>50</sub> : 50% Lethal concentration  
LDL : Low-density lipoprotein  
LMO : Limonin  
LPH : Lactase phlorizin hydrolase  
MeOH : Methanol  
MS : Mass spectrometry  
NHP : Neohesperidin  
NRT : Narirutin  
NRG : Naringin  
ODS : Octadecylsilyl  
OECD : Organization for economic co-operation and development  
OPP : Orthophenyl phenol  
ORAC : Oxygen radical absorption capacity  
PBS : Phosphate buffered saline  
POD : Peroxidase  
PMS : 1-Methoxy-5-methyl phenazinium methyl sulfate  
ROS : Reactive oxygen species  
SGLT1 : Sodium-dependent glucose transporter  
TBZ : Thiabendazole  
TLC : Thin-layer chromatography  
TRAP : Total peroxy radical-trapping parameter  
UGT : UDP-Glucuronosyltransferase  
WST1 : 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium  
monosodium salt (Water soluble tetrazolium)

## 第1章 緒言

### 1-1 レモンの歴史的背景と国内生産

レモン (*Citrus limon*) は暖かい気候で育つミカン科ミカン属の植物であり、温暖で水はけが良く平均気温が15℃以上の地域で良く育つと言われている。日本では広島県を中心とした瀬戸内地方や和歌山県、愛知県などを中心に関東以南の比較的温暖な地域で生産されている。レモンが日本に伝わったのは1873年頃であり、明治時代の初めに静岡県熱海に來た外国人がレモンの種を庭先に播いたのが始まりだと言われている<sup>1,2)</sup>。その後 1886年に和歌山県、そして1898年には広島県に伝わると、徐々に気候の条件が良い瀬戸内を中心に本格的に栽培されるようになった。日本は1955年に関税および貿易に関する一般協定 (GATT: General Agreement on Tariffs and Trade) に加盟すると、さらに1960年の「貿易為替自由化計画大綱」により徐々に輸入の自由化を進めることとなる。これに伴い1964年にレモンの輸入が自由化になると、単価が安く価格で勝るアメリカ産などの輸入品が主流となり、次いで1981年の大寒波が拍車をかけるようにして国内のレモン生産は著しく減少していった。しかしながら、2009年の統計 (農林水産省および財務省の統計情報) によると、1981年には234トンだったレモンの収穫量は、全体的な消費量が増加するとともに2000年には4,455トン、さらに2009年には9,438トンと生産量が劇的に伸びており、国内レモンの生産量が増加していることがうかがえる (Fig. 1-1)。この背景には昭和50年代 (1975年以降) に問題となった、輸入レモンから防カビ剤が検出された事例が挙げられる。この事例を機に徐々に消費者の食資源に対する安全性への関心が高まってきたことが、国内産レモンの需要が増加した一つの大きな要因であると言える。

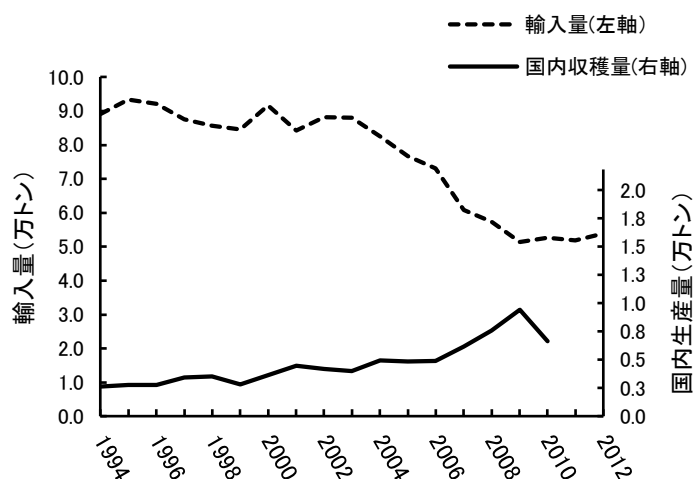


Fig. 1-1 レモンの輸入量と国内生産量の推移

(農林水産省・財務省統計より)

一般的にレモンの原産国は地中海沿岸地方だと思われがちであるが、その原産はインド北東部のヒマラヤ地方だと考えられている。そこから10世紀ごろに中国へ、そしてアラビア半島を介して12世紀頃にアラビア人によりスペインをはじめとするヨーロッパに伝えられた<sup>3)</sup>。当初は観賞用や装飾用としての用途や、手術用具の殺菌や食中毒の解毒剤など薬用として使われたが、栽培が盛んになるにつれて食用にも用いられるようになった<sup>4,5)</sup>。初めは地中海地帯中心に栽培されていたが、コロンブスの大航海時代（15～17世紀）にはアメリカに伝わり栽培されるようになった。その後、気候がより適したカリフォルニア州を中心に栽培されるようになり、さらに南米のブラジルやアルゼンチンに伝播した。現在の主要な生産国は、2011年の統計（FAO 統計データベース）によるとメキシコ（214万トン、15.5%）、インド（210万トン、15.2%）、中国（131万トン、9.5%）、アルゼンチン（122万トン、8.8%）、ブラジル（112万トン、8.1%）の順となっており、熱帯や亜熱帯地域が主な生産国となっている。しかしながら、日本のレモン生産量は0.03%（4,578トン）と世界的には非常に少ない（Fig. 1-2）。また、輸出入の面から見ても、生産量が高まり輸入量との差が顕著に縮まった2009年でさえも、海外からのレモン総輸入量が約51,400トンであるのに対して、国内生産は9,400トンと5分の1に満たない量である（Fig. 1-1）。このように、国内のレモン消費の大部分はアメリカ産やチリ産などの輸入レモンに頼っているのが現状である。

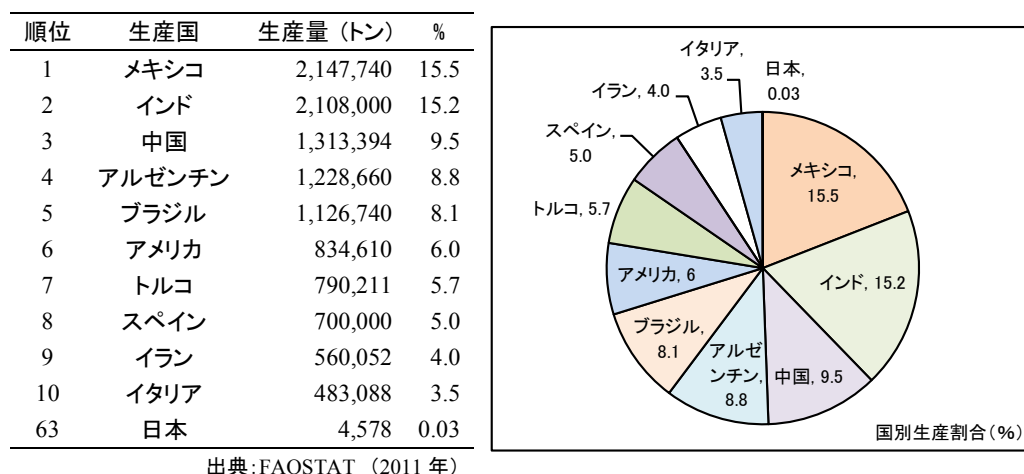


Fig. 1-2 レモンの主な生産国とその割合 (%)

一方で国内に注目してみると、2009年の農林水産省の統計における国内総生産量は9,438トンとなっており、県別の生産量は広島県（5,542トン）、愛媛県（2,268トン）、和歌山県（516トン）、熊本県（234トン）の順である。つまり国内の60%が広島県で生産されており、広島県はレモンの主要な生産地となっている（Fig. 1-3）。その中でも、尾道市瀬戸田町（瀬戸田レモン）や呉市豊町大長地区（大長レモン）などは県内の主な産地となっており、また全国的にも有名なブランドである。



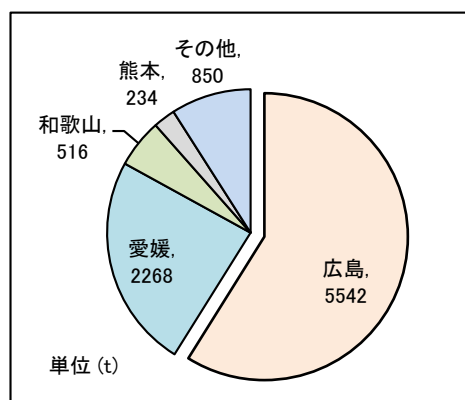


Fig. 1-3 レモンの県別国内生産量  
(平成 21 年農林水産省統計より)

現在の日本国内ではレモンの多くを輸入に頼っていることを示したが、ほとんどのカンキツ類は輸入の際に、防腐、またカビ防止などの目的に農薬が使用されている。カンキツ類に用いられている主な防腐剤としてオルトフェニルフェノール (OPP)、チアベンダゾール (TBZ)、イマザリル (Imazalil) などがあり (Fig. 1-4)、近年はこれらの表記を売り場で良く目にするようになった。日本では本来、1969年に収穫後の果実に農薬を使用することが禁止されたにも関わらず、1975年に輸入果実 (グレープフルーツ、オレンジ、レモン) から OPP が検出され大きな問題となった (日米レモン戦争<sup>6)</sup>)。しかしながら、アメリカとの貿易不均衡問題などを背景に1977年に OPP を、次いで1978年に TBZ を、そして1992年にはイマザリルを、これらが農薬であるにも関わらず“食品添加物”として認可した。日本では農薬を収穫後の果実に使用することは禁止されており、そのための外交措置であった。しかしながらその後の毒性に関する研究において、これらの農薬が強い毒性 (発癌性や腎毒性など) を持つという報告<sup>7-9)</sup>が見られるようになり、国は1991年より危険性の高い食品添加物の物質名の表示を義務付けた。このようにして継続的に輸入を続けるために今なおその使用が認められたままとなっており、実際には安価な輸入カンキツ類を選ぶか、値段は高いがより安心な国産カンキツ類を選ぶかは消費者にその選択が求められているのが現状であると言える。しかしながら、これらの農薬についての毒性や安全性については様々な情報が混在しており、正確にはまだ解明されておらず不明瞭な点が多い。こうしたことから少しずつ輸入レモンに対する安全性が懸念されはじめ、改めてポストハーベスト農薬の心配がない国産レモンが見直されるようになった。さらに近年では、食の安全志向に加えて、安心安全な食生活を通して健康を保とうとする傾向が強まっている中で、よりその需要が高まっている。このような背景から、国内産レモンの生産量の増加や消費の増加が顕著になりつつあり、広島県では県内の特産品でもあるレモンを「皮まで食べられるレモン」として広めようとする働きが盛んになっている。

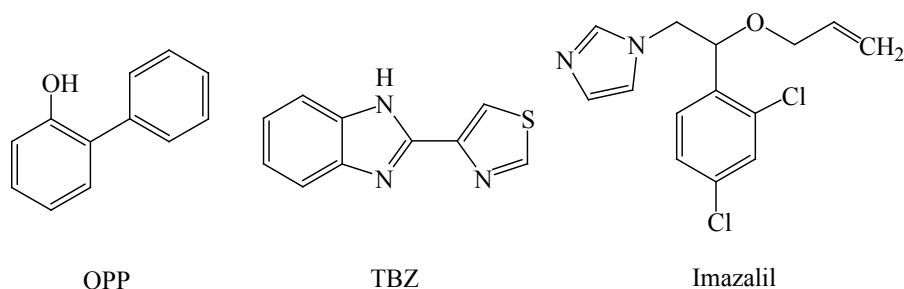


Fig. 1-4 輸入カンキツに用いられるポストハーベスト農薬と化学構造

## 1-2 レモンの品種について

現在日本で生産されているレモンの品種はリスボンやユーレカ、そしてピアフランカであり、広島県では特にリスボンが主流となっている。Table 1-1に主なレモンの品種と特徴を示した。リスボンは主にカリフォルニアの内陸地帯で生産されている品種（原産国はポルトガル）で果汁が多く酸味が強いのが大きな特徴で、さわやかな香りを持っている。複数あるレモンの品種の中でも、リスボンは比較的樹勢が強く実りが多く、また耐寒性にもすぐれることから国内でよく栽培が行われている。ピアフランカは外観、味ともリスボンとよく似ており、香りがよく酸味もしっかりあるレモンであり、また種がやや少なく樹木にトゲがないのが大きな特徴で、トゲなしレモンとして苗が市販されている品種である。一方で、近年では輸入の自由化もあり交配種もよく見られるようになった。例えば、マイヤー（メイヤー）レモンはオレンジとレモンの自然交雑で生まれた品種だと言われており、栽培環境によって果実の形状が丸みを帯び、完熟すると果皮がオレンジ色に近づく。酸味が弱く、やや甘味もあり香りはオレンジに近い品種である<sup>10)</sup>。その他、日本国内でも新規な品種が登録されており、例えば宝韶寿は広島県内でユーレカやリスボンを植栽する中で発見された変異株であり、果皮が厚く酸味が強いのが特徴である。平成15年に品種登録された新しい品種である。また同じく広島県内でイエローベルと呼ばれる新たな品種も近年開発され、少しずつではあるが一般に知られるようになってきた。

Table 1-1 レモンの代表的な品種とその特徴

品種	特徴
リスボン	日本において主力品種のひとつ。樹勢が強く、豊産性の品種。トゲがやや多い。
ユーレカ	主力品種のひとつでトゲは比較的少ない。リスボンより耐寒性がやや弱い。
ピアフランカ	トゲなしレモンとして苗が売られている。果実の品種特性はユーレカに近く、日本国内でもよく見られる。
ジェノバ	チリで主に栽培されている品種。1996 年に輸入が開始され近年知られるようになった。種が少なく果汁が豊富である。
マイヤーレモン （メイヤー）	オレンジとレモンの自然交雑から生まれた品種で、やや丸みを帯び完熟すると果皮の色はオレンジがcaってくる。酸味が少なく甘味がある。似たものにスイートレモネードという品種も存在する。
サイパンレモン	マイヤーレモンの系統で「菊地レモン」「島レモン」とも呼ばれる。北マリアナ諸島のテニアン島から小笠原諸島に導入された品種である。
ポンテローザ	普通サイズ(100 g 前後)の3 倍の大きさのレモン。ごくわずかであるが、日本国内でも流通している。
宝韶寿	日本で発見された品種。果皮が分厚く酸味が強い。
イエローベル	果皮が薄く種子が少ない特徴を持つ、近年作出された新品種である。

### 1-3 カンキツ類とポリフェノール

レモンをはじめとしてオレンジ、グレープフルーツ、ライムなどのカンキツ類は、昔からヒトの食生活に欠かせないものであった。カンキツ類の利用例として有名なのは、15～17世紀の大航海時代に壊血病の予防として用いられたことであろう。壊血病が知られていなかった当時は原因不明の出血性疾患が船員たちの間で流行し、これにより死亡することが非常に多く職業病とも言われ恐れられた。1747年にイギリスの軍医 James Lind によってカンキツ類の摂取によってその症状（壊血病）が回復することが示されると<sup>11)</sup>、カンキツ類の酸（酸っぱさ）に予防効果があると船員の間で信じられ航海に持ち出されるようになったが、実際に効果を有していたのはアスコルビン酸（ビタミン C）であることが後に明らかになり<sup>12,13)</sup>、近年のビタミン C の研究に繋がっている。

一方で、カンキツ類は古くから風邪の薬としても珍重されてきた。例えば、ミカンの皮を細かく刻みこれに熱湯を注いだものを1日に3回ほど飲むと、風邪の症状が緩和されることから民間療法として用いられてきた。正月に行われる左義長の行事ではミカンを焼いて食べ一年の健康を願う風習が現在でも残っており、また和歌山県北部ではミカンをジャバラ（邪を払う）と呼び、健康に良く長寿になれると信じられ食べられてきた<sup>14)</sup>。ウンシュウミカンの皮を日に干してよく乾燥させたものを陳皮と呼び、これは生薬として健胃、去痰、鎮咳などに対して現在も使われており、家庭でも容易に作ることが出来る。その他よく似た生薬に、ダイダイやナツミカンの未熟な果実を半分に横断し乾燥させた枳実や成熟果皮を乾燥させた橙皮などがあり、古くから胃もたれなどに用いられてきた (Fig. 1-5)。



Fig. 1-5 カンキツ由来の生薬

(三橋博ほか, 生薬学改訂第4版, 南江堂 (1993) より抜粋)

これまでにカンキツ類の例を挙げたが、「薬食同源」と表現されるようにヒトは植物の中から経験的に生薬を発見し、科学の進歩とともに生薬成分を参考にして医薬を開発する方法を考えるようになった。その中で、多数の薬理作用を持つ成分が単離構造決定されてきた。カンキツ由来の生薬の陳皮や枳実には、ヘスペリジン (Fig. 1-6) と呼ばれるフラボノイドが主成分として含まれており、その機能性が注目を浴びている。このヘスペリジンはミカンやナツミカン、ダイダイなどのカンキツ類全般に比較的多く含まれていることが明

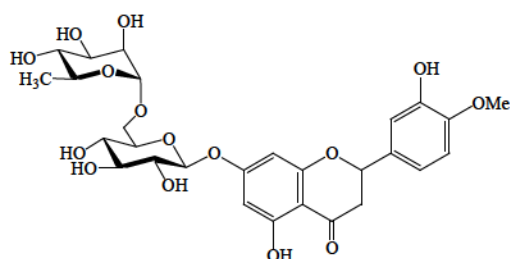


Fig. 1-6 ヘスペリジンの化学構造

らかにされている<sup>15)</sup>。

また赤ブドウ、ブルーベリーや赤キャベツなどの色素成分、グレープフルーツなどカンキツ類の苦み成分、お茶の渋味成分や紅茶の色素成分、そして渋柿に含まれるタンニンなど、これらの化合物はみな分子内にフェノール性水酸基を複数個有することが特徴であり、これらの様に分子内に

複数のフェノール性水酸基（主にベンゼン環に水酸基が結合したもの）を有する化合物を総称してポリフェノールと呼ぶ。1990年代初期に、赤ワインをよく飲むフランスでは高脂肪食品の摂取量が多いにもかかわらず、冠動脈疾患が少ないという「フレンチパラドックス」が疫学調査から明らかとなり<sup>16)</sup>、この有効成分がポリフェノールであることが報告されたことから一般的に良く知られるようになった<sup>17,18)</sup>。一方で、ポリフェノールは植物成分の中でセルロース、ヘミセルロース、リグニンに次いで多い成分で、植物中では太陽光からの紫外線防御や、昆虫など外敵からの攻撃や防御物質として、さらには生体反応の調節因子としての機能など、植物の生命を維持する上で必須の二次代謝産物でもある<sup>19)</sup>。

ポリフェノールは主にモノマータイプとポリマータイプに大別される。モノマータイプには、コーヒーに含まれるクロロゲン酸などのフェノール酸や、植物の常成分であるフラボノイドが挙げられる (Fig. 1-7)。一方で、ポリマータイプにはタンニンなどが挙げられる。タンニンの中では、フラボノイドの1種であるカテキン、エピカテキン、エピガロカテキンやロイコアントシアニンなどが重合した縮合型タンニンが良く知られている。

ここでフラボノイドとは、2個のベンゼン環（A環、B環）が炭素（C3 ユニット）で結合した、C6-C3-C6の炭素骨格を持つ化合物である。植物内では酢酸 - マロン酸経路由来のC6（A環）とシキミ酸経路由来のC6-C3（B環、C環）とが縮合して生合成される化合物群である。

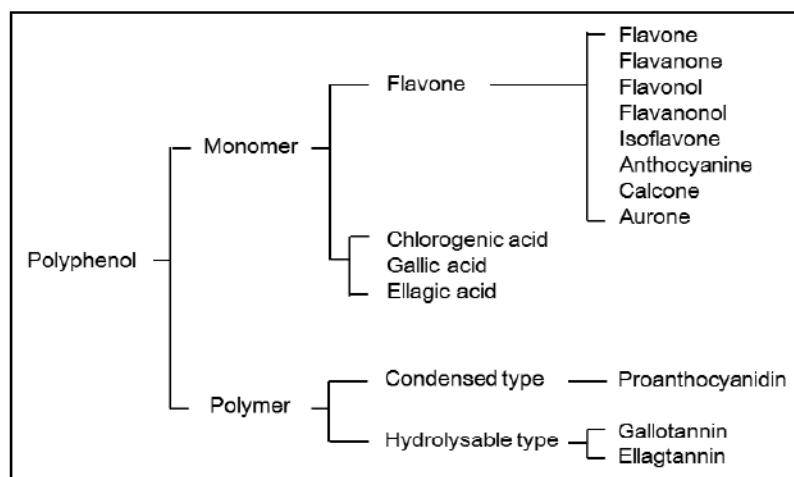


Fig. 1-7 ポリフェノール化合物の分類

(FFIジャーナル, 日本食品化学研究振興財団, Vol.209, No.5 (2000) より抜粋)

フラボノイドは5000種類以上の化合物がこれまでに知られているが<sup>20)</sup>、その大部分はグルコースなどが結合した配糖体として存在しており、茶などに含まれるカテキン類を除くと遊離の状態で存在することは少ない。フラボノイドの基本構造は2つのベンゼン環A、Bと、そのA環と炭素3個と酸素原子でできたC環から成る。フラボノイドの分類はB環とC環の結合位置やC環中の二重結合の有無によりフラボン類、フラバノン類、フラバノール類、フラボノール類、イソフラボン類、カルコン類、そしてカテキン類やシアニジン類などと複数の種類に分類される (Fig. 1-8)。このようにポリフェノールの一種であるフラボノイドは特に多種多様であり、ポリフェノールを構成する成分の多くを占めている。

例を挙げると、ルチンやクエルセチンなど野菜や果実などに広く分布しているフラボノイドや、ヘスペリジンやナリンジンなどの様にカンキツに特有のフラバノン類、同じくカンキツ類に含まれるジオオスミン等のフラボン類、およびノビレチンなどのポリメトキシフラボン、そして、ブルーベリーやナスなどの紫色を作るアントシアニンはシアニジン類に属する。

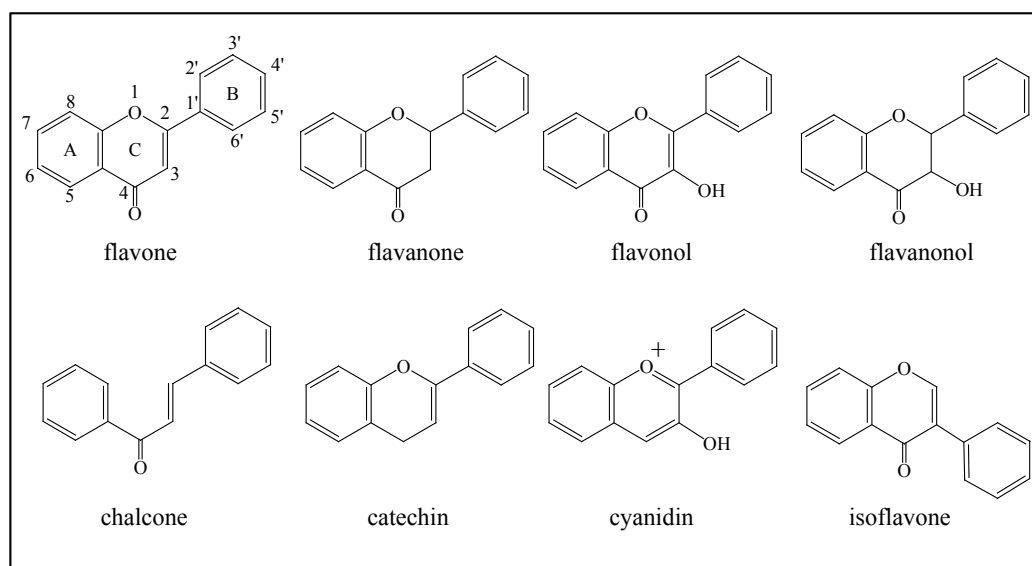


Fig. 1-8 フラボノイドの種類と化学構造

フラボノイドの機能性に関する研究はこれまでに多数報告されてきた。その代表例を挙げると、フラバノン類配糖体の1つであるヘスペリジンは上述したように陳皮の主成分であり、1936年にアスコルビン酸と共同して毛細血管の膜の透過性を調整し、その抵抗性を増強する物質として発見された<sup>21,22)</sup>。また透過性 (Permeability) に関わる物質としてビタミンPとも呼ばれることもあり特に研究が盛んな物質であるが、近年ではソバに含まれるルチンや、タマネギなどに含まれるクエルセチンなど、フラボノイド誘導体一般が毛細血管増強作用や他の生理作用を示すことが少しずつ明らかになってきている<sup>23)</sup>。しかしながら、その欠乏症が明らかにされていないことから、ビタミンPとして明確に定義されていないのが実

際である<sup>24)</sup>。

ヘスペリジンが陳皮の主成分として発見されたことから、ミカン類に注目した機能性の報告が多く見られる。例えば、血圧上昇の抑制作用<sup>25)</sup>や、アゾキシメタンで誘導したラットの大腸ガンに対する抗腫瘍効果<sup>26)</sup>、脂質代謝改善作用<sup>27,28)</sup>、抗炎症作用<sup>29)</sup>やWistar系ラットに対する抗アレルギー作用<sup>30,31)</sup>など、様々な生理活性作用が報告されており、特に日本では温州ミカンでの研究例が多い。また一方では、ヘスペリジンのアグリコンであるヘスペレチンに抗ウイルス効果<sup>32)</sup>が、またナリンジンのアグリコンであるナリンゲニンについて、ヒト癌細胞株（Caco-2細胞など）および癌腫移植マウスにおける腫瘍増殖を抑制したという抗腫瘍作用<sup>33)</sup>などが、近年になって報告され始めている。これらのことから、フラボノイドのアグリコンに対する研究も積極的に行われている。

## 1-4 カンキツ類とリモノイド

天然には少ないながら変形トリテルペンと呼ばれる化合物群が存在する。これは、トリテルペンが酸化された物質群であり、その代表例として、リモノイドと呼ばれるカンキツ類に特有の成分がある。このリモノイドは、ミカン科とセンダン科の植物に存在するトリテルペン誘導体の総称で、これまでに300種類を超えるリモノイドが報告されているが、その多くはセンダン科植物由来のものが多い。その中でカンキツ類を中心とするミカン科の植物からは、36種類のアグリコンと17種類の配糖体が見つかっており、これらは特にカンキツリモノイドとも呼ばれる<sup>34)</sup>。リモノイドは、カンキツ類における苦みの原因物質の一つであり、その中でもリモニンやノミリンなどが苦味を持っている (Fig. 1-9) (もう一方はナリンジンに代表されるフラボノイドであり、これは第5章で述べる)。一般的なりモノイドの苦味閾値は7~12 ppm とされているが、リモニンの苦味閾値は6 ppm と非常に強い苦味を持つ<sup>35)</sup>。

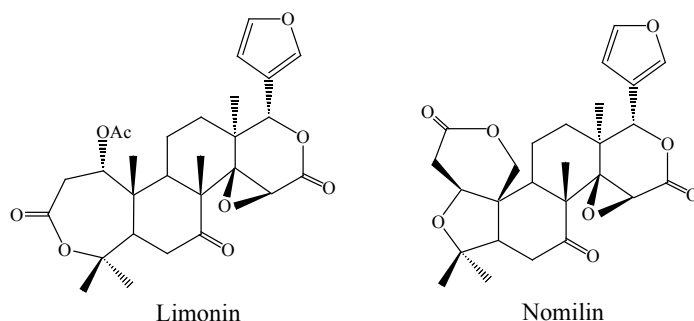


Fig. 1-9 代表的なカンキツリモノイドの化学構造

このように、リモノイドは食品加工分野において製品価値を下げる成分としてみなされ好まれない傾向にあった。しかし、近年では、研究例はまだ少ないものの、リモノイドのアグリコンにマウスやハムスターに対する発ガン抑制効果<sup>36)</sup>や、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) の誘導作用<sup>37)</sup>等が報告され、少しずつ注目されるようになってきた。

さらには、最近の研究でカンキツの成熟後期にラクトンの水酸基にグルコースが結合したリモノイド配糖体 (リモノイドグルコシド) に変化し苦味を呈さない物質になることが分かってきた<sup>38,39)</sup>。このリモニンの配糖体にもヒト神経芽細胞腫に対するアポトーシス誘導作用<sup>40)</sup>や発ガン抑制効果<sup>41)</sup>が示され、配糖体にもリモノイドと同様の機能性が期待できることから、リモノイド、リモノイド配糖体の双方について、食品への利用研究が進められている。一方で、リモノイドには昆虫に対する摂食阻害作用<sup>39)</sup>があることもわかり、食品以外の新たな分野への応用も期待されている。



## 1-5 レモンの成分と概要

レモンをはじめとするカンキツ類はビタミンC欠乏による壊血病の予防手段として使用され、これまで人々の生活に欠かせない食品として用いられてきた。一般的にレモンと言えばビタミンCという概念が定着しており、清涼飲料水などには「レモン〇個分のビタミンC」と表記されているのをよく見かける。レモン1個分のビタミンC量は20 mgを基準とするよう農林水産省により定められていたことから、現在でもこの表記がよくされるわけであるが、実際にレモンはビタミンCを多く含んでおり（100 mg/個）、その量は温州ミカンの1.4倍である<sup>42)</sup>。また、レモンの果汁にはビタミンCに加えてクエン酸が非常に多く含まれており（6 g/個）、この量は温州ミカンに対しては約6倍、ウメでは約2倍と顕著に高い値である<sup>43)</sup>。運動後や疲労時には甘味や酸味の欲求が高まることは経験的に知られているが、その中でレモンは視覚・嗅覚および味覚などの観点から爽やかさが感じられることから、運動後や疲労時によく摂取されてきた。近年の研究の中で、ビタミンCやクエン酸が疲労回復に対して有効な成分であると考えられるようになり<sup>44)</sup>、実際にヒトに対する研究例として、レモン果汁やクエン酸を摂取することで、運動中に上昇する乳酸の血中濃度を減少させる効果が確認された例も報告されている<sup>45)</sup>。

カンキツ類に含有されるその他の成分としては、上述したもの以外にフラボノイド、カロチノイド、クマリン類、テルペノイド、そしてリモノイドなどの成分が知られるようになってきた。レモンと言えば一般的に酸っぱい、または黄色といったイメージが強いが、この酸味はクエン酸によるものであり、レモンの黄色を作る色素はカロテンやエリオシトリンと呼ばれるフラボノイドの一種である。このエリオシトリンはフラバノン配糖体に属し、強い抗酸化力を有し、他のカンキツ類と比較して30~100倍近く多く含まれているレモンやライムに特有のフラボノイドである<sup>46)</sup>。また、レモン果皮由来のフラボノイド配糖体投与による動物での血圧降下作用は古くから知られており、その有効成分はフラボノイドC配糖体の6,8-ジ-C-グルコシルアビゲニンなどであることが示されている<sup>47)</sup>。一方で、レモンのフラボノイドに関する機能性についてのヒトを対象とした研究では、脂質代謝改善効果などが報告されており、エリオシトリン等の配糖体がその有効成分であることが認められている。特に近年ではエリオシトリンを中心とするレモンフラボノイド摂取が、生体内で抗酸化活性を示すこと<sup>48)</sup>、そして高脂肪食後の血中脂肪や血糖の上昇を抑える効果<sup>49)</sup>や、血圧の上昇を抑制する効果などが明らかにされている<sup>50)</sup>。

またカンキツ類の果皮には芳香のもととなる精油も豊富であり、芳香剤など香料として一般的に用いられている<sup>51)</sup>。レモンの精油の中には60~80%ほどのリモネンが含まれ、レモンの芳香の主成分となっており<sup>51, 52)</sup>、生体反応への影響も研究されている<sup>53)</sup>。また、先述したようにカンキツ類の果皮には苦み物質のリモノイドが含まれているが、レモン果皮には500 ppm程度、また果汁には数10~100 ppmのリモノイドが含有されており<sup>38, 54)</sup>、その含有量はカンキツ類の中でも比較的多く、機能性物質としての機能が期待されている。



## 1-6 本研究について

近年、食の欧米化やファーストフード食への片寄りなど日本人の食生活は大きく変様している。それに伴ってガンや心臓病、脳血管障害に加え糖尿病など生活習慣が大きく関わる疾病が増加しており、結核や肺炎などの感染症が死因の上位を占めていた過去と比べて疾病の形態も大きく変化してきている<sup>55)</sup>。このような変化は、増加傾向にある生活習慣病に対して特に食生活の面で関心が持たれ、一次予防の観点から食生活の重要性に対する意識の変化を生んでいる。「薬食同源」とも表現されるように、生活習慣病の予防や改善には日々の運動と食生活の両面での対策が必要だという考えが広まってきた。しかしながら、近年の健康ブームにより様々な健康食品が氾濫していること、また食育の重要性が見直されていることなどから、特に食生活の面から科学的な検証や正しい知識や情報の啓発の必要性が増してきている。市場に出回っている健康食品を例にとってもその機能性が不明瞭であるものも少なくない。実際に健康被害が報告された例も見られ（厚生労働省医薬食品局食品安全部、健康被害事例）、このような点で食品の効能を科学的根拠に基づいて示す必要性がより増しており、食科学の観点からも疾病の予防や改善に対する本格的な研究が行われつつある。

果物の中でもカンキツ類の摂取がもたらす健康への効果はこれまでも多数知られてきたが<sup>56)</sup>、前述したように、近年の食の安全志向にともなってカンキツ類の有する機能性が改めて注目を浴びている。例えば、杉浦らはミカンの摂取と生活習慣病についての疫学的調査において、ミカンの日常的な摂取が糖尿病や高脂血症などの有病率を低下させることを明らかにした<sup>57)</sup>。その作用本体の一つがフラボノイドのヘスペリジンであることが示されたことで、カンキツの果皮からポリフェノールをはじめとする様々な生理活性物質が新たに発見された。そして、その抗酸化活性や代謝調節作用などの機能性が注目されるようになった。ヘスペリジンに加えて、同様にカンキツの果皮に含まれるフラボノイドで苦みを呈するナリンジンは、血管の透過性を改善するビタミン P 様物質として、また抗アレルギー作用を有する物質として報告されている<sup>58)</sup>。さらに、これまで好まれてこなかった苦み成分のリモノイドについても徐々に機能性に関する研究が進み、苦みを生かすべくその利用法が見直され始めている。

このように、現在ではカンキツ類の果皮の有用性が改めて注目されており、それに伴い消費量が増加傾向にある。しかしながら、レモンをはじめとするカンキツ類の輸入品の多くは、安価である一方で防カビ剤などが用いられていることから消費者のポストハーベスト農薬への懸念が未だに根強く残っている。食の安全志向に加えて、食生活を通して健康を保ちたいという傾向は強まりその安全性が求められる中で、農薬使用の心配がなく「皮まで食べられる」という国内産のレモンが見直されつつある。広島県は国内有数のレモン産地であり、特に近年では宝詔寿やイエローベルと言った新たなレモンの品種開発も盛んに行われている。このような特徴を生かし、広島県では県内の特産品でもあるレモンを広

める働きが盛んに行われており、その多面的な有効利用が期待されている。しかしながら、レモンについては果汁の利用が主であり、その健康効果の科学的な検証はいまだ十分には行われていないのが現状である。このような背景から、本研究ではレモンのさらなる利用価値を高めるため、部位別や成熟に伴うレモンの成分分析や機能性および安全性の評価を網羅的かつ総合的に行うことによって、その有用性についての科学的検証を行った。また、その中でレモン関連物質について新規な生成法を開発し、その研究成果を広島レモンの利活用の拡大につなげることを目的とした。

## 第2章 レモンの成分分析におけるHPLCプロファイリング法の確立 およびエリオシトリンの分離精製

### 2-1 はじめに

近年、カンキツの中でも特にミカンやオレンジについては機能性の研究が精力的に進められており、ナリンジンやヘスペリジンに抗腫瘍作用や、抗アレルギー作用などの機能性が報告されていることは第1章で述べた。カンキツ類のフラボノイドとしては、この他にも類似の構造を持つフラバノン配糖体や、フラボン配糖体が多様に含まれていることが明らかにされている。その例を挙げると、ナリンジンやヘスペリジンに加えて、ナリルチン、エリオシトリンなどのフラバノン配糖体、また、ジオスメチンなどのフラボン配糖体、また、ノビレチンなどのポリメトキシフラボンなどが報告されている<sup>59)</sup>。レモンに限ってみると、フラバノン配糖体のエリオシトリン、ヘスペリジン、また、フラボン類のC配糖体であるC-グルコシルジオスミンなどがこれまでに見出されている<sup>46,60)</sup> (Fig. 2-1)。

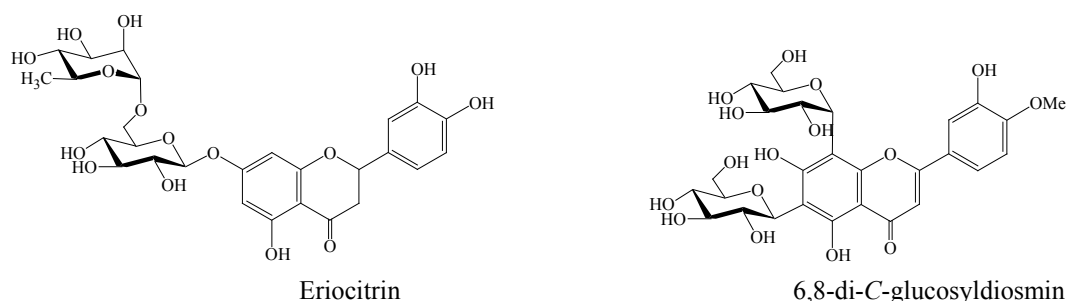


Fig. 2-1 レモンに含まれる主なフラボノイド配糖体とその化学構造

しかし、国内のレモンの生産はミカンなど他のカンキツ類と比較しても非常に少なく、消費量も少ないのが現状である。従ってレモンの機能性、また健康効果についての科学的検証はいまだ不十分であり、比較するとその情報は極めて少ない。このような状況に加えて、苦味の主成分であるリモノイド<sup>61)</sup>や、ビタミンC<sup>62,63)</sup>、またクエン酸<sup>64)</sup>など、それぞれの分析法に関する文献は多数みられるが、これらの成分を網羅的に解析した総合的な評価および報告例はない。さらに、エリオシトリンは1997年にレモンから三宅らによって単離精製されたが<sup>65)</sup>、その後の新たな精製法に関する文献はなく、またペパーミント (*Mentha piperita* L.) からのエリオシトリンの精製について井上らによって報告されているが<sup>66)</sup>、その方法は煩雑である。

## 2-2 本章における研究の目的

カンキツフラボノイドは果皮により多く含まれていることが分かり、抗酸化活性をはじめ、その機能性が注目されている<sup>67)</sup>。そして、果皮を含めた全果実部位の食品としての利用、そして摂取が生活習慣病をはじめとする疾患の改善や予防に有効であると考えられるようになってきた。食品の有する機能性を評価するに当たって、有用な機能を有する成分の特定が最も重要となるが、これらは主に食用部位の選別や加工、さらに調理などの工程で影響を受けることが多い。つまり、機能性成分の分布状態による摂取量の変化、加工処理による損失または変性が起きることが予想される。例えば、カンキツ果実では、生食の場合はじょうのう膜と果肉、あるいは果肉のみを食するのが一般的である。また果汁の製造においては、果肉の利用が中心であるが、一部ではじょうのう膜や果皮も含まれている製品も見られ、果皮成分の果汁への移行が考えられる。このような中で、レモンの含有成分を部位別に、またそれらを総合して分析、評価した文献はみられない。これらの点を考慮して、本章ではビタミン C やクエン酸、そしてフラボノイドなどレモンの機能性成分について部位別に分析した。また、食品加工で問題となるカンキツ類の苦みという観点から、苦み成分のフラボノイド（ナリンジンやネオヘスペリジンなど）および、リモノイドについても詳細に分析を行い、レモンの部位別利用の有用性を考察した。また、後半ではレモンの機能性の評価を行う上で、まずレモンの主たるフラボノイドのエリオシトリンに着目し、新たな単離精製法の確立を試みた。

## 2-3 実験方法

### 2-3-1 試料

**供試材料：**広島県産レモンおよびチリ産レモンはそれぞれ市内のスーパーで購入し、使用した。

**共試薬：**フラボノイドのHPLC分析用のスタンダードとして用いたエリオシトリン(ERI)，ナリルチン(NRT)はフナコシから購入した。また，ナリンジン(NRG)，ネオヘスペリジン(NHP)はシグマアルドリッチから購入した。ヘスペリジン(HSP)は温州ミカンから単離した物を使用した。その他のHPLC分析用スタンダードとしてリモニンはLKT Laboratories, Inc. から，アスコルビン酸(ビタミンC)は関東化学から，クエン酸水和物およびクエン酸ナトリウム(クエン酸三ナトリウム二水和物)は和光純薬からそれぞれ購入した。その他メタリン酸は和光純薬から購入し，1.06%に純水で調整したものを使用した。使用したスタンダード物質の構造はFig. 2-2に示した。全てのフラボノイドおよびリモニンは1 mg/mlとなるようにメタノールで溶解し，遮光保存した。またクエン酸水和物は10 mM およびアスコルビン酸は1 mM となるように1.06%メタリン酸で溶解し，冷蔵保存した。検量線などの作成にはこれらのサンプルを同様の溶媒で希釈し，使用した。

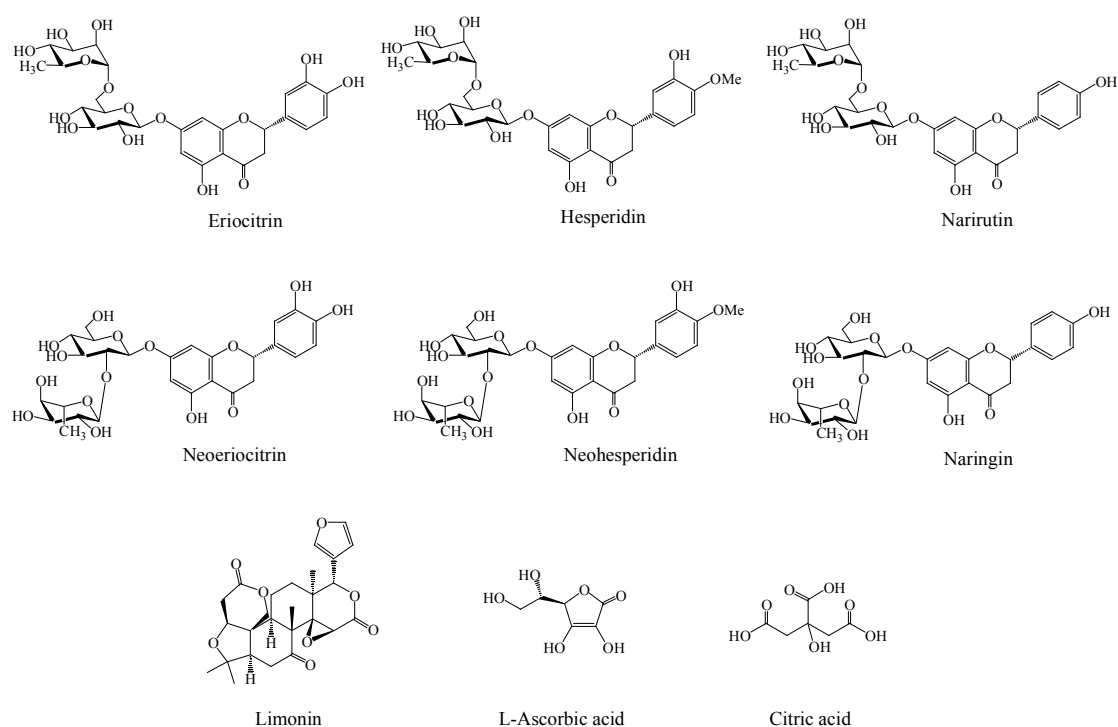


Fig. 2-2 供試した化合物の化学構造

その他、メタノール（特級）およびエタノール（1 級）は関東化学から、また酢酸（特級）はナカライテスクから購入した。なお、アセトニトリルは HPLC グレードのものをサーモフィッシャーサイエンティフィックから購入し、HPLC 分析溶媒として使用した。

## 2-3-2 試料調製

### (A) フラボノイドおよびリモニンの分析

レモンは1個当たりの重量を秤り果汁搾り器で果汁を搾った後、外果皮（フラベド）、中果皮（アルベド）、内果皮（じょうのう膜）、さのう膜の各組織にそれぞれ切り分けた。これら果汁以外の部位は、それぞれ重量を測定した後、1 g を取り分け、約 5 mm 角に細断し 50 ml チューブに移し、20 ml のメタノールで1日静置抽出した（50℃）。抽出後、ろ紙（No.2, 185 mm, ADVANTEC）でろ過し、残渣を再度 20 ml のメタノールで1日再抽出した。これらを合わせた抽出液を 50 ml となるようにメタノールで調整し、各組織の抽出液とした。このメタノール抽出液から 1 ml を 1.5 ml チューブに取り分け、6,500×g で5分遠心した後、その上清を HPLC 分析用サンプルとし分析に供した。また、果汁は 1 ml を 1.5 ml チューブに取り分け、各組織と同様の方法で遠心後、その上清を HPLC 分析サンプルとした。なお、フラボノイドおよびリモニンのスタンダードはそれぞれメタノールに溶解し、分析に供した。

### (B) クエン酸およびアスコルビン酸の分析

(A) で切り分けた各組織から同様に 1 g を秤り取り細かく刻んだ後、9 ml の 1.06% メタリン酸に浸し、乳鉢を用いてより細かくすりつぶした。この抽出液を 15 ml チューブに移し、3,000×g で5分遠心後、その上清 1 ml を 1.5 ml チューブに取り分けた。これをさらに 6,500×g で5分遠心し、その上清を HPLC 分析用サンプルとした。また、果汁は 1 ml を 15 ml チューブに取り分け、そこに 9 ml の 1.06% メタリン酸を加え転倒混和した後に 3,000×g で5分遠心した。さらにその上清 1 ml を 1.5 ml チューブに取り分け 6,500×g で5分遠心した上清を HPLC 分析サンプルとした。なお、クエン酸およびアスコルビン酸のスタンダード物質はそれぞれ 1.06% メタリン酸に溶解し、分析に供した。

## 2-3-3 HPLC 分析条件の設定

HPLCはポンプ2台（LC-10ADvp）、検出器（SPD-M10ADvp）、カラムオーブン（CTO-10Avp）、デガッサー（DGU-12A）、システムコントローラー（ALC-10Avp）から構成される島津製のシステムを使用した。また分取HPLCにはポンプ（PU-980）、検出器（UV-975）、グラジエントシステム（LG-950-02）から構成される日本分光製のシステムを用いた。分析カラム

はCosmosil 5C<sub>18</sub>-AR II 250-4.6 (ナカライテスク) およびそのガードカラム, またはMightysil RP-18 GP 150-6.0 (関東化学) とそのガードカラムを使用し, カラムオーブンの温度は35°C とした. また, サンプル注入量は2.5  $\mu$ l~5.0  $\mu$ lとした. 検出器は200-500 nmの吸収スペクトルをフォトダイオードアレイにより記録した. スタンダード分析は3回繰り返して行い, それぞれの保持時間 (Retention time: *Rt*) の平均値と標準偏差 (SD) を求めた. 各サンプル分析における溶出成分は, 保持時間と200-500nmにおけるUV吸収波長をスタンダード物質と比較することにより同定した. また, それぞれの成分の定量はスタンダードのピーク面積を用い検量線を作成し, 絶対検量線法により計算した. それぞれの分析条件は三宅らの方法<sup>65)</sup>およびAbbasiらの方法<sup>68)</sup>を参考にして設定した. 分析条件およびスタンダード分析の詳細は以下に示した.

#### (A) フラボノイド分析

カラム: Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR II, 溶媒: アセトニトリル: 0.5%酢酸 = 25: 75 (v/v)

流速: 0.7 ml/min, カラム温度: 35°C, 検出波長: 285 nm, サンプル注入量: 5.0  $\mu$ l

(サンプルはNRGが1 mg/ml, ERI, NRT, HSP, NHPは0.1 mg/mlとなるようにメタノールで調整したものを分析した.)

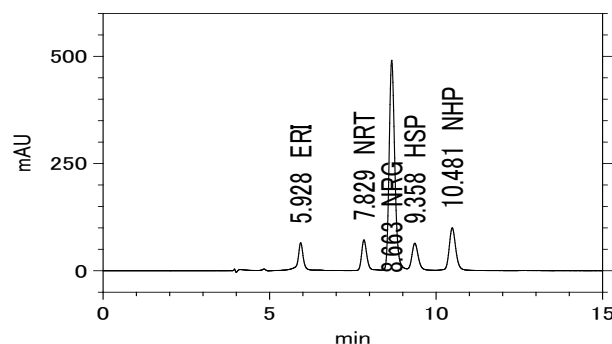


Fig. 2-3 HPLC profile of flavonoid standards

Table 2-1 Retention times (*Rt*) and UV absorption maxima ( $\lambda_{\max}$ ) of flavonoid standards in HPLC profiles

Compound		<i>Rt</i>	$\pm$ SD <sup>a)</sup>	UV <sub>max</sub>
ERI	Eriocitrin (Eriodictyol 7- <i>O</i> -rutinoside)	5.93	0.013	284 nm, 328 nm
NRT	Narirutin (Naringenin 7- <i>O</i> -rutinoside)	7.83	0.019	212 nm, 282 nm, 328 nm
NRG	Naringin (Naringenin 7- <i>O</i> -neohesperidoside)	8.67	0.023	212 nm, 282 nm, 328 nm
HSP	Hesperidin (Hesperetin 7- <i>O</i> -rutinoside)	9.36	0.026	284 nm, 324 nm
NHP	Neohesperidin (Hesperetin 7- <i>O</i> -neohesperidoside)	10.49	0.034	284 nm, 324 nm

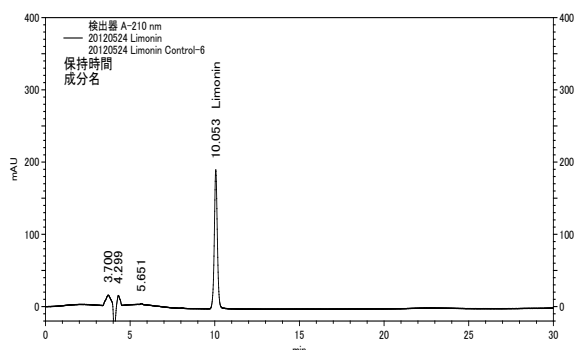
<sup>a)</sup> n=3

## (B) リモニン分析

カラム：Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR II，溶媒：アセトニトリル：0.5%酢酸 = 50：50 (v/v)

流速：0.7 ml/min，カラム温度：35°C，検出波長：210 nm，サンプル注入量：2.5 µl

(サンプルは 1 mg/ml となるようにメタノールで溶解したものを分析した.)



**Table 2-2 Retention time ( $R_t$ ) and UV absorption maxima ( $\lambda_{\max}$ ) of limonin**

Compound	$R_t$	$\pm SD^a)$	UV <sub>max</sub>
Limonin	10.06	0.021	192

<sup>a)</sup> n=3.

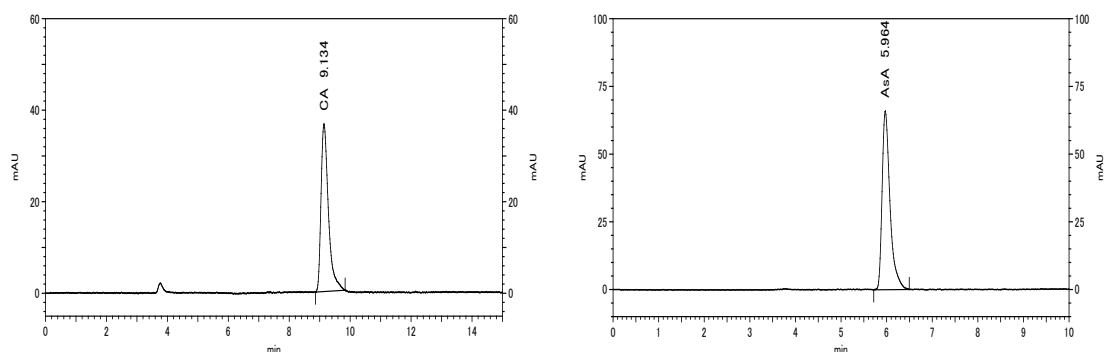
**Fig. 2-4 HPLC profile of limonin standard**

## (C) クエン酸およびアスコルビン酸分析

カラム：Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR II，溶媒：0.1 M リン酸緩衝液 (pH 2.1)，流速：0.7 ml/min

カラム温度：35°C，検出波長：245 nm (ビタミン C)，210 nm (クエン酸)

サンプル注入量：5.0 µl (アスコルビン酸は 1 mM，クエン酸は 10 mM となるように 1.06% メタリン酸で溶解したものをサンプルとして分析した.)



**Fig. 2-5 HPLC profiles of citric acid (CA) and ascorbic acid (AsA) standards**

**Table 2-3 Retention times ( $R_t$ ) and UV absorption maxima ( $\lambda_{\max}$ ) of citric acid and ascorbic acid standards**

	Compound	$R_t$	$\pm SD^a)$	UV <sub>max</sub>
CA	Citric acid	9.16	0.021	205 nm
AsA	Ascorbic acid (Vitamin C)	5.96	0.006	243 nm

<sup>a)</sup> n=3.



## 2-3-4 エリオシトリンの単離と物性の確認

### (A) エリオシトリンの抽出条件の検討と単離

エリオシトリンの単離に際し、予備試験として抽出溶媒の検討を行った。レモン（広島県産）を果皮と果汁に分けた後、そこから果皮を 1g 量り取り、10 ml のメタノール、エタノール、純水でそれぞれ抽出を行い（overnight）、抽出されるエリオシトリンの量を HPLC で確認した。

実際の単離はレモン 1.0 kg（10 個分）を搾り、果皮と果汁に分けそれぞれから抽出を行った。まず果汁をガーゼろ過し、遠心分離（3,000×g, 10 分）により上清液（250 ml）を得た。この上清液（半量）を純水で平衡化したダイヤイオン HP-20 カラム（φ37×250 mm）に充填し、純水 600 ml で溶出し、次いで 20%メタノール、40%メタノール、100%メタノール（それぞれ 500 ml）で溶出した。この分画操作を 2 回繰り返し、ロータリーエバポレーターで各フラクションを 5.0 ml に減圧下濃縮した。TLC（展開溶媒 MeOH : CH<sub>3</sub>Cl : H<sub>2</sub>O = 10 : 20 : 1）で R<sub>f</sub> 値を比較後、メタノール 100%分画にエリオシトリンのスポットを確認した。さらに HPLC でピークを確認後、メタノール 100%分画をさらに濃縮し HPLC で分取を行った（Mightysil C-18 GP（250-10）, 280 nm, CH<sub>3</sub>CN : 25%, 2.0 ml/min）。得られた分画を凍結乾燥し（真空凍結乾燥機；宮川化学産業製 MBM3 型）、薄い黄色粉末を得た。さらにこの粉末および市販のエリオシトリンをそれぞれ純水に溶解したもの（1.0 mg/ml）を 6,500×g で 5 分遠心した後、HPLC で分析し（Mightysil RP-18 GP）、R<sub>t</sub> が一致することを確認した。また、果皮は熱水抽出（50℃）で行った。つまり、レモン果皮（520 g）を約 5 mm 角に細かく切り、1200 ml の熱水で 2 時間静置抽出した。これをガーゼろ過し、減圧下濃縮により 300 ml にした後、ダイヤイオン HP-20 カラムに 100 ml ずつ充填し、純水 600 ml、20%、40%メタノール、さらに 60%、80%、100%メタノール（それぞれ 500 ml）で溶出した。これを TLC および HPLC で確認した後、メタノール 60%分画を果汁と同様の方法で HPLC 分取しエリオシトリンを単離した。

### (B) 精製したエリオシトリンの物性確認

単離したエリオシトリンは次の方法で水溶液中での安定性を評価した。エリオシトリン 1.0 mg を蒸留水 2.0 ml に溶解し 0.05%水溶液を作り、pH 試験紙を用いておおよその pH を確認した。また、100 mM クエン酸溶液と 200 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液をそれぞれ混合させ、pH 2.6, 4.4, 7.2 の緩衝液を調製した（McIlvaine buffer）。これらを用いてエリオシトリンの 0.05%水溶液を調製し、そこから 200 μl ずつをガラス管に量り取り、50℃ および 80℃ で 30 分また 60 分間湯煎し HPLC 分析で得られた面積値の変化から pH と熱に対する安定性を調べた。また、0.1 M クエン酸水溶液と 0.1 M クエン酸ナトリウム水溶液をそれぞれ混合して調製した 0.1 M クエン酸緩衝液（pH 2.4 および 6.8）を用いて、1 mg/ml のエリオシトリン溶液を調製した。常温下におけるこの溶液中のエリオシトリンの変化を 1 週

間 HPLC で分析した.

### (C) エリオシトリンの水に対する溶解度の測定

エリオシトリンの水への溶解度を, 比較物質としてナリンジンとヘスペリジンを用いて測定した. 溶解度は経済開発協力機構 (OECD : Organization for Economic Co-operation and Development) および米国環境保護庁 (EPA : Environmental Protection Agency) が定めるテストガイドラインに記されているフラスコ法<sup>69, 70)</sup>を参考に評価した. すなわち, 5 ml のサンプル管にそれぞれ 30 mg の試料と 3 ml の蒸留水を加え 50°C に加温しスターラーで攪拌した. 1 日, 2 日, 3 日目にこれらの試料を遠心分離し (6,500×g, 10 分×2 回), 上清に含まれる被検物質量を HPLC で分析した. さらに, エリオシトリンは水溶性が高いことから (10 mg/ml の濃度では容易に溶解する), 100 µl の蒸留水に 10 mg ずつ溶解を繰り返しその溶解度を検討した.

## 2-3-5 統計処理

データは平均値±標準偏差 (SD) で表した. データの統計処理はダネット試験を用い, 有意差水準 1%未満 ( $p<0.01$ ) を統計学的に有意差ありとした.

## 2-4 結果

### 2-4-1 フラボノイドの成分分析

市販の広島県産レモンを用いて部位別の成分分析を詳細に行い，果実の各部位および果汁中の新鮮重量（100 g）当たりの含有量およびそれぞれのフラボノイドが占める割合を示した．レモンの断面とそれぞれの組織についての模式図をFig. 2-6に示した．一般にカンキツ類は色素のある外果皮（フラベド），白い綿状の中果皮（アルベド），可食部に当たる果肉部分を包む内果皮（じょうのう膜），そして果肉の砂じょう（果汁はこの膜につつまれている）に分類される．本章ではこれらの分類に基づいて各部位の部位別含有量を求めた．

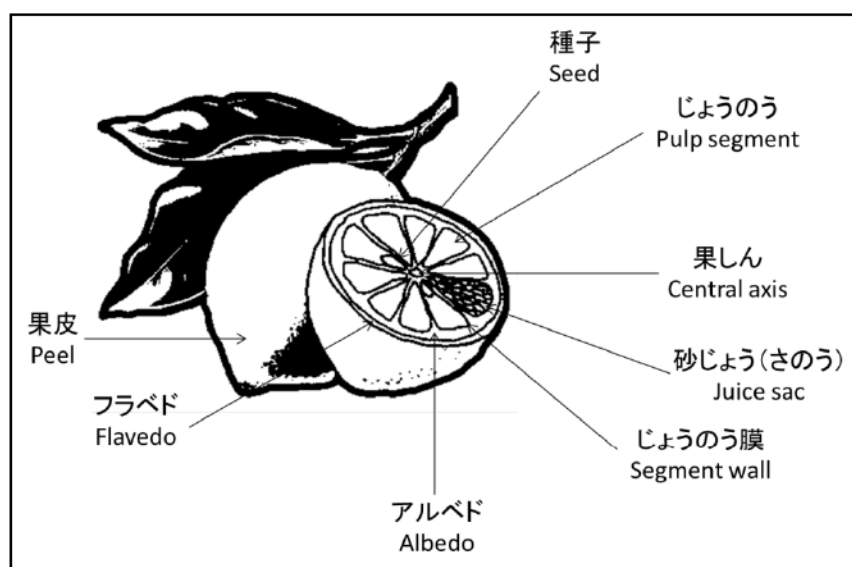


Fig. 2-6 レモンの断面図と組織名

原島広至，改訂第2版生薬単，NTS (2012) より抜粋（一部改変）

それぞれの物質は保持時間とUV 吸収スペクトルのパターンで同定した．また定量はスタンダードの検量線を作成し，面積法で定量した．UV 吸収スペクトルが測定できず分別できないほど小さなピークは，スタンダードと保持時間が一致しても定量しなかった．レモンに関して，これまでに三宅らは9種類のフラボノイドグルコシドの存在を分析している<sup>40)</sup>．その報告によると，レモンの主要なフラボノイドはエリオシトリンとヘスペリジンであることが示されているが，本分析においても同様の結果が得られた．つまり，本試験に供した広島県産レモン（新鮮重100 g）において，エリオシトリンの総含有量（240.9 mg）が一番多く，次いでヘスペリジンの含有量（95.3 mg）が多かった．その他，カンキツフラボノイドのナリンジンやナリルチン，またネオヘスペリジンなどの含有量は非常に低い（最大で1.9 mg），または検出限界以下であった（Table 2-4）．

部位別にみると、主要なフラボノイドであるエリオシトリンとヘスペリジンは中果皮（アルベド）に圧倒的に多く含まれており、それぞれ全体の半分以上（おおよそ60%）が存在していた。外果皮（アルベド）と合わせた果皮には70～80%が存在した。これらに合わせてじょうのう膜の分も含めると90%以上を占めることになり、ジュースとしての利用分にはその10%以下しか含まれていないことになる。一方で、苦味のフラボノイドのナリンジンやネオヘスペリジンの含有量は非常に低く、レモン果皮の苦みは別のリモノイドに起因するものであることが明確となった（フラボノイドの苦みについては5章で詳細に取り上げる）。

**Table 2-4 Flavanone contents in each tissue of lemon fruit**

Tissue	Flavanone content (mg/100 g fresh weight)				
	ERI	NRT	NAR	HES	NHS
Flavedo	46.01 (19.1)	ND	0.77	8.68 (9.1)	1.38
Albedo	141.66 (58.8)	ND	0.26	57.32 (60.2)	0.34
Segment membrane	34.46 (14.3)	ND	0.04	21.62 (22.7)	0.14
Juice vesicle	4.94 (2.1)	ND	0.02	4.29 (4.5)	ND
Juice	13.83 (5.7)	ND	0.82	3.38 (3.5)	0.04
Total	240.90 (100)	—	1.90	95.28 (100)	1.90

Relative percentages of each compound are shown in the parentheses.

ND, not detected

## 2-4-2 リモノイドの成分分析

フラボノイド分析の結果、苦味の主フラボノイドであるナリンジンの含有量は非常に少なかったことから、レモン果皮に感じられる強い苦みはリモノイドに起因するものと考えられた。そこで、苦み成分の主リモノイドであるリモニンについて部位別の含有量および、総量について分析した。その結果、外果皮（フラベド）と内果皮（じょうのう膜）にリモニンが検出された。アルベドにも含まれるものと考えられるが、今回の分析においては検出限界以下であり測定できなかった(Table 2-5)。なおリモニンの苦み閾値は6 ppmとされていることから<sup>35)</sup>、外果皮（フラベド）の含有濃度3.22 mg/100 g (=32 ppm)は十分に苦みを引き起こす濃度であることが確認された。

**Table 2-5 Limonin contents in each tissue of lemon fruit**

Compound	Content (mg/100 g fresh weight)					Total
	Flavedo	Albedo	Segment membrane	Juice vesicle	Juice	
Limonin	3.22	ND	4.14	ND	-	7.36
	(43.7)	ND	(56.2)	ND	-	(100)

Relative percentages of limonin are shown in the parentheses.

ND, not detected; -, not analyzed

### 2-4-3 ビタミンCおよびクエン酸の分析

ビタミンCやクエン酸のレモン全果100 g当たりの含有量は、ビタミンCで100 mg、クエン酸で約6 gであることを前述した。本実験での結果も、全果100 gにおける各組織の合計量はビタミンCで90 mg、クエン酸で約5.9 gとおおよそ近い値を示し、クエン酸の含有量は顕著に高かった。また、各組織の含有量の内訳を見ると、ビタミンCはフラベドで33.76 mg、アルベドで22.46 mgとややフラベド側に多く分布していたが、これら果皮の合計含有量は56.22 mgと果肉部の33.76 mgよりも多かった。これにより、レモン中のビタミンCは果肉部よりも果皮に多く含まれていることが新たに明らかとなった。

一方で、クエン酸の組織別の含有量はビタミンCとは逆の傾向がみられた。つまり、フラベドに68.65 mg、アルベドに369.26 mgと果皮に限ってはアルベドの含有量が高かったが、これらの合計量は約0.44 g/100 gとなり、果肉部の5.5 g/100 gと比較して著しく低い値であった（全量の7%程度）。これらのことから、レモンの酸味をもたらすクエン酸はそのほとんどが果肉部分（果汁）に含まれていることが示唆された。果皮の酸味が弱いのはこのためであると言える。

**Table 2-6 Vitamin C and citric acid contents in each tissue of lemon fruit**

Compound	Content (mg/100 g fresh weight)			
	Flavedo	Albedo	Pulp	Total
Vitamin C	33.76	22.46	33.76	89.98
	(37.5)	(25.0)	(37.5)	(100)
Citric acid	68.65	369.32	5455.45	5893.43
	(1.2)	(6.3)	(92.6)	(100)

Relative percentages of each compound are shown in the parentheses.

#### 2-4-4 エリオシトリンの抽出条件と単離精製

エリオシトリンの抽出に際し、予備試験としてレモン果皮からのエリオシトリンの抽出効率について水、メタノール、エタノールを用いて比較検討した。その結果を Table 2-7 に示した。低温かつ 1 時間程度の短時間の処理であればメタノールでの抽出効率が非常に高かったが（水：0.034 mg/ml, メタノール：0.081 mg/ml）、50℃のような比較的高い温度であれば、水抽出でもメタノールと大差なくエリオシトリンは溶出可能であった（水：0.083 mg/ml, メタノール：0.084 mg/ml）。これらのことから、エリオシトリンは抽出温度をやや高めに設定する（50℃ 以上）ことで、水抽出でもメタノールと同等の抽出が行えることが明らかとなった。また、全体的にエタノールでの抽出効率は低かった。なお、水抽出（80℃, 120 分）での濃度 0.158 mg/ml は果皮 1 g 中から 1.58 mg, すなわちレモン果皮 100 g 中から、158 mg のエリオシトリンを抽出できることとなる。先述した通り、レモン果皮 100 g 当たり約 280 mg のエリオシトリンが含まれていることから、1 回の抽出で 60% 程度のエリオシトリンが抽出可能であることを確認した。

一方で、ヘスペリジンはいずれの温度や時間においてもメタノール抽出で顕著にその溶出が多く、水抽出での効率はエタノールよりも低かった。また、24 時間後では、抽出効率が低下しているように見えるが、これは難溶性のヘスペリジンとエリオシトリンとの共沈が原因であると考えられる。これらの結果を総合して、レモンからのエリオシトリンの抽出には水抽出（50℃）で 2 回行うこととした。

**Table 2-7 Effects of solvents on the extraction efficiency of flavonoids from lemon fruit**

(A) Eriocitrin							
Time	20℃			50℃			80℃
	H <sub>2</sub> O	MeOH	EtOH	H <sub>2</sub> O	MeOH	EtOH	H <sub>2</sub> O
60 min	0.034	0.081	0.032	0.083	0.084	0.067	0.133
120 min	0.037	0.127	0.040	0.086	0.130	0.065	0.158
1day	0.069	0.087	0.053	0.106	0.106	0.072	0.118
(B) Hesperidin							
Time	20℃			50℃			80℃
	H <sub>2</sub> O	MeOH	EtOH	H <sub>2</sub> O	MeOH	EtOH	H <sub>2</sub> O
60 min	0.030	0.092	0.043	0.057	0.096	0.073	0.093
120 min	0.027	0.128	0.057	0.059	0.133	0.071	0.106
1day	0.040	0.083	0.042	0.071	0.105	0.072	0.065

(mg/ml)

Table 2-7 の結果をもとにレモン果皮を水抽出 (50°C) した。レモン果皮 (520 g) のメタノール抽出物をダイヤイオン HP-20 オープンカラムを用いて、20%, 40%, 60%, 80%のメタノールで分離した結果, TLC において 60%抽出分画にエリオシトリンが確認された (Fig. 2-7)。この分画をさらに HPLC を用いて分取することにより純度を高め, 最終的にエリオシトリンを果汁から 25.6 mg, 果皮から 223.4 mg の合計 249.0 mg を単離精製した。本試験で用いた広島県産レモン全果 100 g 当たりにはエリオシトリンが約 240 mg 含まれていたことから (Table 2-4), 抽出に用いた 1 kg のレモン (実際に分離に用いたのはその半量) から収率 20%で単離精製できていることが確認された。

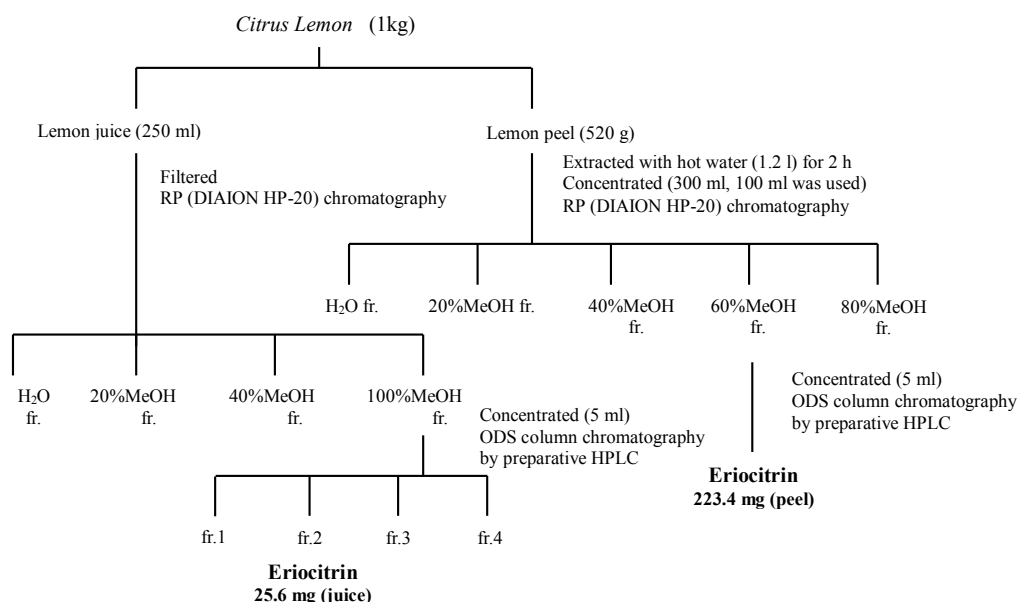


Fig. 2-7 Scheme for isolation of eriocitrin from lemon fruits

精製したエリオシトリンは Mightysil RP-18 GP250-10 逆相カラムを用いて HPLC 分析した結果 (移動相  $\text{CH}_3\text{CN} : 0.5\% \text{CH}_3\text{COOH} = 25 : 75$ ), 標準品のピークと一致した。Fig. 2-8 に精製前の HPLC クロマトグラム (A) と精製後のクロマトグラム (B) を示した。

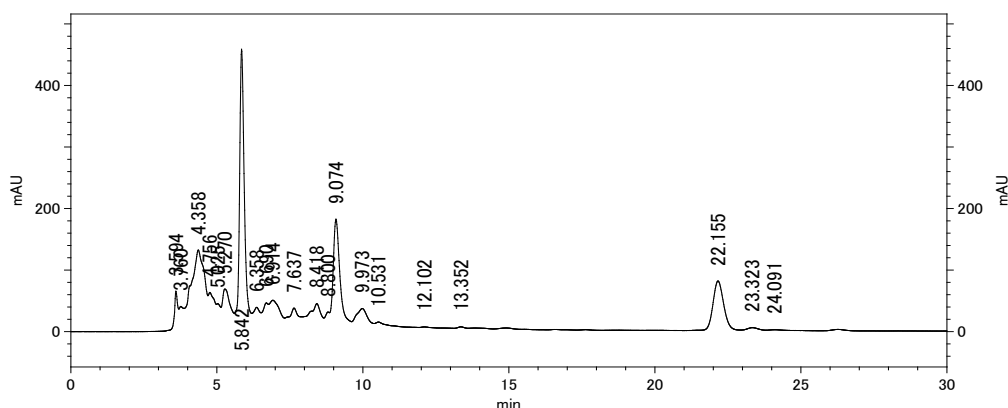


Fig. 2-8 (A) HPLC profile of lemon peel extract

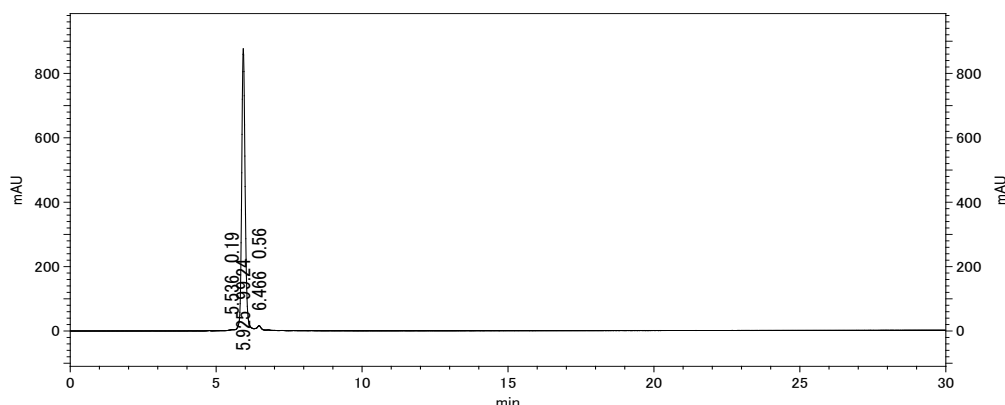


Fig. 2-8 (B) HPLC profile of eriocitrin purified from lemon peel

標準品とピーク ( $R_t$ ) が一致したことに加えて、標準品と吸収スペクトルが一致することを確認した。最終的に単離精製したエリオシトリンの純度は 99% (HPLC で計算) 以上であり、標準品と変わらない高い純度で精製できていることが示された。

#### 2-4-5 エリオシトリンの基本的な物性評価

精製したエリオシトリンは薄い黄色粉末 (凍結乾燥品) として得られ、純水をはじめメタノールやエタノールなどの有機溶媒に可溶であった。その水溶液は薄い黄色を呈し、284 nm に特徴的な吸収極大を示した。さらに、0.05%のエリオシトリンを溶解させた水溶液の pH は 4.4 前後とやや酸性であった (Table 2-8)。また、pH 2.6 および pH 4.4 の条件において、50°C または 85°C での熱処理 (1 時間未満) に対して非常に安定であった。一方で pH 7.2 の中性付近ではその安定性はやや低下し、特に高温では残存率が低下した (Table 2-9)。これは、フラバノン骨格の C 環が開環し、カルコン型に変換されたこと、また構造そのものが壊れたことなどが考えられるが HPLC 分析では詳細が確認できなかった。本試験で認められたこれらの性質は、三宅らの報告<sup>65)</sup>と極めてよく類似したことから、単離した物質がエリオシトリンであることが改めて確かめられた。

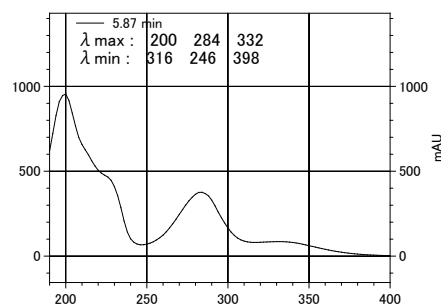
さらに、エリオシトリンの水溶液中での安定性をより詳しく調べるため、pH 2.4 および pH 6.8 に調整したクエン酸緩衝液を用いて常温下における 1 週間の物質変化を HPLC で分析した。コントロール (純水に溶解、pH 4.4 前後、Table 2-9 参照) において、エリオシトリンは 7 日間常温で保存しても全く変化は見られなかった。同様に、pH 6.8 の中性付近においても、7 日目で 94.8% とほとんど変化は見られなかった。一方で、pH 2.4 の酸性条件では 4 日目で 96.1% とほとんど変化は見られなかったが、7 日目で 75.8% とやや残存量が減少したことから、わずかながら酸加水分解が進んだものと考えられる。



**Table 2-8 UV absorption spectrum of purified eriocitrin solution (H<sub>2</sub>O)**

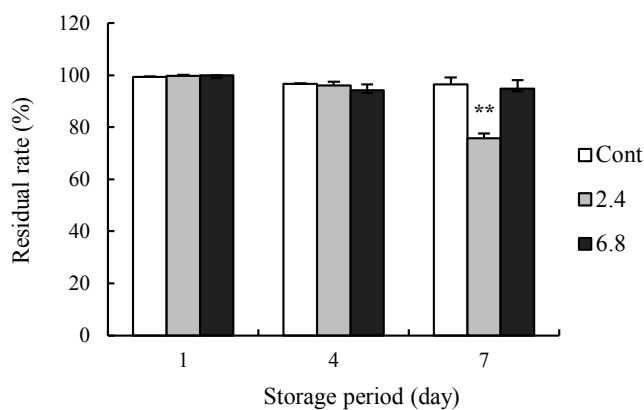
Form	yellow powder
pH	about 4.4
Solubility	H <sub>2</sub> O, MeOH, EtOH
UV <sub>max</sub>	200 nm, 284 nm, 332 nm

Eriocitrin was dissolved in water (0.05%) and its absorption spectrum was measured.

**Table 2-9 Stability of eriocitrin solution to heat and pH treatment**

pH	Temp.(°C )	Time (min)	Residual ratio (%)
2.6	50	30	100
		60	100
	85	30	100
		60	86
4.4	50	30	100
		60	100
	85	30	100
		60	99
7.2	50	30	82
		60	82
	85	30	70
		60	51

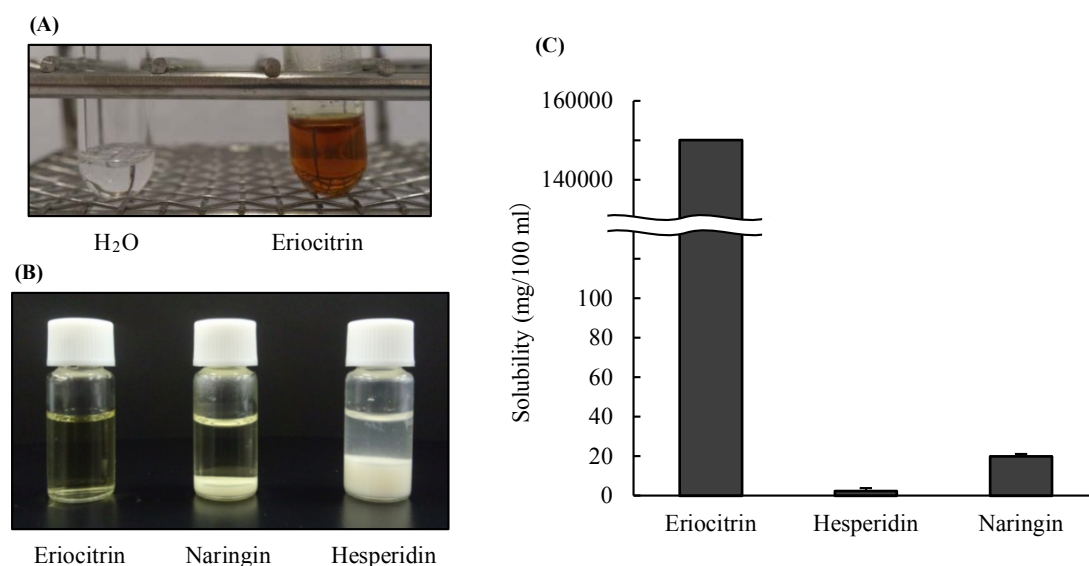
The stability of eriocitrin to heat and pH treatment was determined by HPLC on the basis of the residual content of eriocitrin.

**Fig. 2-9 Long-term stability of eriocitrin at room temperature**

One mg of eriocitrin was dissolved in 1ml of water (Control) and citrate buffer (pH 2.4 or 6.8). The solution was stored at room temperature for 7 days. The residual ratio of eriocitrin was determined by HPLC. Significant difference from the control group (\*\* $p < 0.01$ )

これらの基本的な物性に加えて、精製したエリオシトリンの水への溶解性について調べた。テストガイドラインにおける水溶性試験において、類似のフラバノン配糖体であるナリンジンの水への溶解度は  $0.204 \pm 0.013$  mg/ml、ヘスペリジンは  $0.025 \pm 0.002$  mg/ml といずれも配糖体でありながら非常に低く (Fig. 2-10 C), 容易に沈殿が生じた (Fig. 2-10 B)。なおヘスペリジンはメタノールを用いても水の 10 倍程度しか溶解しなかった。

これらの結果に対して、エリオシトリンは 1.5 g/ml の濃度で完全に溶解し、その溶解度は 1.5 g/ml 以上と推定された (Fig. 2-10 A)。これはナリンジンに対しては 7,500 倍、ヘスペリジンと比較すると 60,000 倍以上であり、非常に高い水溶性を有した。これはカテコール (0.43 g/ml) や、グルコース (0.9 g/ml) の溶解性よりも高い値である。なお、これらの溶解試験後に各溶液を HPLC 分析したところ、エリオシトリンに特に変化は見られなかった。



**Fig. 2-10 Water solubility of flavanone derivatives from citrus fruit**

Eriocitrin (150 mg) was dissolved in 100  $\mu$ l of water at room temperature (A). Thirty mg of each flavanones (eriocitrin, naringin and hesperidin) were dissolved in 3 ml of hot water at 50°C and stirred for 1day (B). The solubility of each flavanone was determined by HPLC (C). Data are mean values and standard deviations of solubility of flavanones (n=3).

## 2-5 小括

レモン中のフラボノイドについて部位別にその含有量を分析したところ、総含量ではエリオシトリの含有量が多く (240.90 mg/100 g fresh weight) , 次いでヘスペリジンの含有量が多かった (95.28 mg/100 g fresh weight) . これらのフラボノイドは果汁中には少なく (総含有量の 10%以下) , その多くは果皮に, 中でもアルベド (中果皮) に多いことが確認された. また, ナリンジンやナリルチン, またネオヘスペリジンなどの類似のフラバノン配糖体の含有量は非常に微量であるか, また検出限界以下であった. フラボノイドの部位別分布や分子種の特異性は既報<sup>46,65)</sup>に類似するデータであったが, 第 5 章で後述する品種間差異や成熟過程での含量変化を新たに解析するための HPLC プロファイリング法を確立した. エリオシトリンの抽出および単離に関して, 水抽出でもエリオシトリンの溶出がみられ, 熱水抽出では短時間でも十分に抽出できることを明らかにした. さらに, エリオシトリンは熱に非常に安定であり, また比較的長期間, 水溶液中で安定であった (Table 2-9, Fig. 2-9) . このような点において, 近年レモンを加熱調理した使用例がよく紹介されているが, 一般的な家庭での調理においてもエリオシトリンが十分にレモンから抽出され, またある程度の調理や加工を受けても十分に残存していると考えられる. したがって, その強い酸味から生食が難しいレモンであっても, 果汁等の利用のみならず, 加工や調理を加えることで十分なエリオシトリンの摂取が可能であると言える.

カンキツ類の苦みを呈す原因物質の1つであるナリンジンやネオヘスペリジンの含有量が非常に少量であったことから, レモン果皮の苦みは別のリモノイドに大きく起因することが考えられた. そこで, リモニンについて部位別の分析を試みたところ, フラベドと内果皮にリモニンの存在が認められ, その含有量は32 ppm と十分に苦みを引き起こす濃度 (6 ppm 以上) であることが確認された (Table 2-5) . この結果から, レモン果皮の苦みが, 主にリモニンに由来していることが示唆された. 一方で, 多くのリモノイドはアグリコンの状態では苦みを呈するが, 配糖体の状態では苦みを呈さないことが知られており<sup>71)</sup>, その代表例がリモニンでありレモン果皮の利用に大きな課題となっている. 本章ではこのリモニンに限って分析を行ったが, 現在ではカンキツ類から36種類のリモノイドが単離されており, また加えて17種類のリモノイド配糖体がレモンやグレープフルーツ, オレンジなどに存在することが明らかとなっている<sup>72,73)</sup>. リモノイド配糖体は加工などにより組織の破壊が起こることでアグリコンへと変換されるため, レモンの苦みに関しては主にリモニンの制御などを含めて, 食品加工などにおける苦味の評価にはさらなる分析が必要である.

本実験で用いたダイヤイオン HP-20 カラムは粒子が大きく比較的早い流速かつ大量のサンプルを分離するのに適しており, レモンからのエリオシトリンの第一段精製には効率のよい分離が可能であった. 今回確立した方法で得たエリオシトリンの純度は 99% (HPLC で計算) 以上であり, 標準品と同等の高い純度であった. 入手価格 (22,000 円/ 5 mg) から本法の簡易な精製法の確立は, レモンフラボノイドの研究や食品開発にも多大の貢献をもた

らすと期待される．このエリオシトリンは薄い黄色粉末として得られ，純水をはじめメタノールやエタノールなどの有機溶媒にそれぞれ可溶であった．また，酸性条件では非常に安定であり，熱処理にも非常に強い性質が見られた．

エリオシトリンを中心とするフラボノイドやビタミンCは果皮により多く含まれている．レモン中全果 100 g 当たりのビタミン C 含有量は 100 mg であるが，その割合は外果皮（フラベド）で 37.5%，中果皮（アルベド）で 25.0%，そして果肉部分で 37.5%（Table 2-6）と，果皮側（62.5%）に多く含まれていることが新たに明らかとなった．一般的にはビタミン C に着目したレモンの利用は果汁が中心であるが，これらの結果は，フラボノイドが果皮に多いと言う事実に加えて，果皮を含めた全部位の利用の有用性をより一層強めるものである．

以上の様に，本章ではレモン中に含まれるフラボノイド配糖体，ビタミン C およびリモノイドの部位別の組成を明確にし，その主たるフラボノイドであるエリオシトリンを効率的に分離する方法を新たに確立した．さらにエリオシトリンが非常に高い水溶性を有するという有望な物性を明確にしたことにより，これらの結果はエリオシトリンのさらなる利用可能性の拡大を示唆するものである．

## 第3章 エリオシトリンからの効率的モノグルコシドの生成

### 3-1 はじめに

ヘスペリジンやナリンジンは、血管の透過性を改善するビタミン P 様物質として注目され、また近年では抗腫瘍作用<sup>26)</sup>や抗アレルギー作用<sup>31)</sup>などが新たに報告されている。しかし、これらに代表されるカンキツフラボノイドの多くは水に溶けにくく、その応用が難しいという側面がある。その中でも、特にヘスペリジンは水への溶解度が極度に低く (0.025 mg/ml, 第2章)、ミカンなどの缶詰や飲料水などの食品中で時間経過とともに沈殿を生じることがあり、加工の際の大きな問題となる<sup>74)</sup>。このように、一般的な食品への利用という観点からもフラボノイドの溶解性の低さが懸念されており、溶解性の改善が強く求められている。このような状況下において、近年、糖転移または糖水解によるフラボノイド成分の特性改善や機能性向上を目指した研究が盛んに行われている<sup>75,76)</sup>。

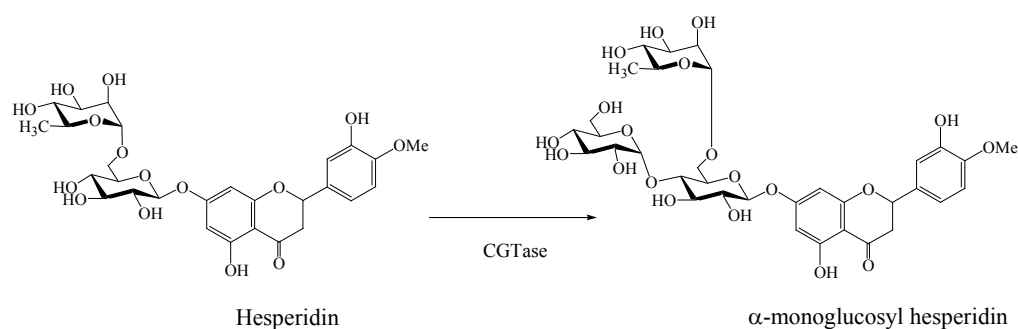
シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase) は、デンプンからシクロデキストリンを生成する反応や、グリコシル基を転移する反応、さらには加水分解反応を触媒する酵素であり、1942年に Tilden らによって *Bacillus macerans* から単離された<sup>77)</sup>。また、ナリンギナーゼやヘスペリジナーゼは、それぞれヘスペリジンやナリンジンを有する糖鎖 (ルチノース) の L-ラムノース結合や D-グルコースの結合を加水分解し、モノグルコシドやアグリコンを生成する酵素である。これらは食品添加物としても認可されており、ナリンギナーゼはナツミカンの苦み除去に、ヘスペリジナーゼは温州ミカンの白濁防止剤として缶詰などによく用いられる (Table 3-1)。

Table 3-1 工業的に用いられている糖質関連酵素の例

酵素名	反応と基質	起源	用途
$\alpha$ -アミラーゼ (EC 3.2.1.1)	デンプンなどに作用し、1,4- $\alpha$ -D-グルコシド結合を加水分解する。	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus oryzae</i> ブタ膵臓、大麦麦芽など	デンプンからオリゴ糖などの製造、アルコール発酵などの発光原料、消化剤 (ジアスターゼ)
$\beta$ -アミラーゼ (EC 3.2.1.2)	デンプンなどに作用し、非還元性末端より $\beta$ -マルトースを生成する。	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus megaterium</i> など	デンプンから水あめの製造
シクロマルトデキストリン トランスフェラーゼ (EC 2.4.1.19)	1,4- $\alpha$ -D-グルカンに作用し、環状デキストリンを生成する。またグリコシル基を $\alpha$ -1,4 結合で転移する。	<i>Bacillus macerans</i> <i>Bacillus megaterium</i>	シクロデキストリンやアスコルビン酸グルコシドの製造
$\beta$ -グルコシダーゼ (EC 3.3.1.21)	セロビオースの 1,4- $\beta$ -D-グルコシド結合を加水分解し、グルコースを生成する。	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus aculeatus</i> など	セルロースからグルコースの生成 (セルラーゼ併用)
ナリンギナーゼ (EC 3.2.1.40)	ナリンジンの 1,2- $\alpha$ -D-ラムノシド結合を分解する。	<i>Aspergillus niger</i>	ナツミカンの苦みナリンジンの除去
ヘスペリジナーゼ	ヘスペリジンの 1,6- $\alpha$ -D-ラムノシド結合を分解しラムノースを遊離。	<i>Aspergillus niger</i>	温州ミカンの白濁物質ヘスペリジンの除去
リゾチーム (EC 3.2.1.17)	細胞壁中のアセチルグルコサミンとアセチルラミン酸の 1,4- $\beta$ 結合を加水分解	ニワトリ卵白 動物組織	消炎剤、食品防腐
グルコースオキシダーゼ (EC 1.1.3.4)	グルコースを酸化し、クルコノ-1,5-ラクトンと過酸化水素を生成する。	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium amagasakiensis</i>	グルコースの分析、卵白の脱糖など

(科学便覧第5版 (応用編), 丸善, 日本化学会より抜粋)

このように様々な生物由来の酵素を工業的に利用して物質変換に応用し、新たな物質を作り出す方法が盛んに研究されている。ヘスペリジンにさらにグルコースを  $\alpha$ -結合させた糖転移ヘスペリジンが新たに作り出されており (Fig. 3-1), 高血圧ラットに対する血圧上昇抑制効果など, その機能性が報告されている<sup>78)</sup>。この糖転移ヘスペリジンは未変換のヘスペリジンと比較すると, その水溶性が1000倍以上にもなることが示されており<sup>79)</sup>, 現在では難溶性の問題を改善した水溶性ヘスペリジンとして清涼飲料水などに使用されるようになってきている。またこのような CGTase を用いた糖転移反応はアスコルビン酸<sup>80)</sup>やナリンジン<sup>81)</sup>などでも行われており, 水溶性や安定性を高めた多種類の配糖体が生成されていると共に, その応用が期待されている。



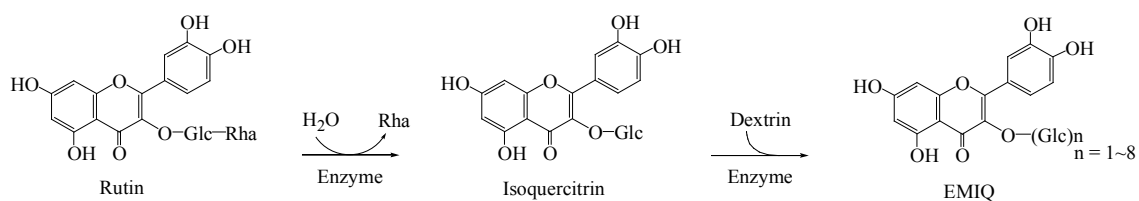
**Fig. 3-1 Enzymatically modified hesperidin**

(Yamamoto *et al.*, 2007)

また, ルチンはソバ, アズキ, 穀物, 果物や野菜などに広く含まれている代表的なフラボノール配糖体である。ヘスペリジンと同様にビタミン P 様物質としても知られ, こちらも食品添加物としての使用が認められている化合物の1つである。しかしながら, このルチンもその機能性が注目されているものの, 水への溶解性が低く食品等への応用にはその溶解性の改善が求められていた。そこで, ルチンの糖鎖構造を変換させたものが酵素処理イソクエルシトリン (EMIQ: 糖転移イソクエルシトリン) と呼ばれる物質である<sup>82)</sup>。EMIQ は, ルチンに結合するルチノースをヘスペリジナーゼで部分的に加水分解し, ラムノシル基を外してルチン酵素分解物 (イソクエルシトリン) とし, 次いでデキストリンとの混合物に CGTase を作用させてグルコース残基を  $\alpha$ -結合で新たに付加させたものである (Fig. 3-2)。

酵素処理イソクエルシトリンはアグリコンであるクエルセチンの3位にマルトース, マルトトリオース, マルトテトラオース, マルトペンタオース等のオリゴ糖が付加した配糖体混合物で構成される。ルチンの溶解度は冷水に0.01%以下であるが, 配糖化することにより溶解性を大幅に向上させることができ, 実用上は任意の添加量で使うことができるように改善されたものである。一方でクエルセチンやルチンはその抗酸化活性から機能性食品素材として注目され利用されてきたが, 機能性物質としての面では消化管からの吸収率

が低いことが知られていた。これに対して酵素処理イソクエルシトリンは、ラットに対する経口投与実験でルチンなどの他のクエルセチン配糖体よりも体内に吸収されやすいことが近年報告された<sup>83)</sup>。そしてこの酵素処理イソクエルシトリンについては、高血圧を抑制する効果<sup>82)</sup>や花粉症に対する抑制効果<sup>84)</sup>などが示され、さらには高い安全性が明らかにされている。また、サルナシ (*Actinidia arguta*) の抽出物が2型糖尿病ラットに対して抗糖尿病効果を示すことが近年示され、その中心成分が EMIQ 生成の中間体でもあるイソクエルシトリンであることが明らかにされている<sup>85)</sup>。



**Fig. 3-2 Manufacturing process of EMIQ**

(Emura *et al.*, 2006)

このような背景から近年では、特に水溶性の増大や機能性の増大を目的として、酵素処理によるフラボノイドの加水分解や配糖化反応が盛んに研究されており、食品添加物など食品への応用や開発が期待されている。

### 3-2 本章における研究の目的

レモンの主要なフラボノイド成分であるエリオシトリンは、強い抗酸化活性<sup>44)</sup>、抗動脈硬化作用<sup>60)</sup>、脂質代謝改善作用<sup>86)</sup>などを持つことが報告されている。2章において、このエリオシトリンはヘスペリジンやナリンジンなどの類似のフラボノイド配糖体とは異なり、非常に高い水溶性が認められ、食品加工への応用が強く期待される。エリオシトリンはレモンの加工処理や果実中の酵素により、エリオジクチオール7-*O*-グルコシド、そしてアグリコンのエリオジクチオールへと加水分解することが知られている (Fig. 3-3)。

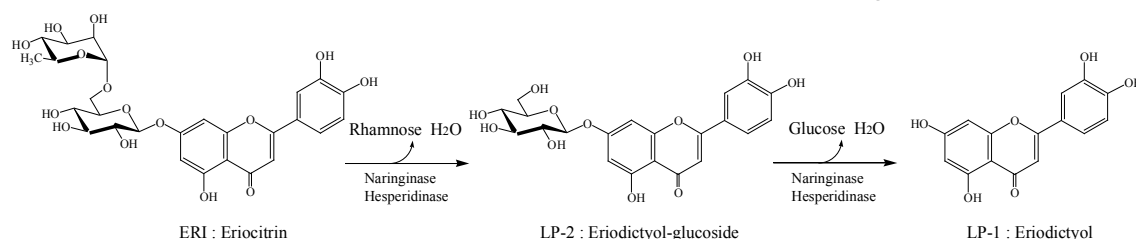


Fig. 3-3 Enzymatic reaction of eriocitrin by hesperidinase and naringinase

レモンの加工製品の1つに果皮の圧搾液であるレモンピール水がある。このレモンピール水中のエリオシトリン残存量を分析してみると時間経過とともにエリオシトリンの割合は減少し、新たな成分への変化が起こっている。これは、レモンの加工段階で廃棄物とされるレモンの搾りかすを有効利用したものであるが、そこから血糖値の上昇を抑える成分 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を有する成分) が発見され、のちにその成分がエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドであることが明らかにされた (広島県立総合技術研究所食品工業技術センターおよび県立広島大学の共同保有する特許)。  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性は、ブドウやマンゴーなどの果物や、イタリアンパセリや桑の葉などの抽出物にもその活性が認められており、糖尿病の予防にその効果が期待されている。しかし、これらの活性は現在の糖尿病治療薬でもあるアカルボースと比較すると非常に弱い<sup>75,88)</sup>。このような点で、レモン果皮由来のエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの効果が期待されるが、レモンピール水中でエリオシトリンが加水分解されて徐々に生成される。レモン中には見られない成分であり、加工製品特有のものである。しかしながら、レモンピール水のような加工製品においては自然に水解反応が進むため、その生成を制御しエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドを効率良く得ることは非常に困難である。さらには、エリオシトリンを出発物質とする効率的な生成方法に関する研究もみられない。

このような背景からエリオシトリンの新規用途や新物質の開発を目的として、酸による加水分解および、既存の酵素によるフラボノイドの物質変換をもとに反応条件などを詳細に検討し、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの効率的な生成方法の確立を試みた。さらにエリオシトリン、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシド、エリオジクチオールについて、  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を比較しその有用性を検討した。



### 3-3 実験方法

#### 3-3-1 試料

##### (A) 試薬

エリオシトリンはレモン果皮から精製したものを使用した(純度 99%以上, 第 2 章参照). また, エリオジクチオール, エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの標準試薬はフナコシより購入した. 酵素変換に用いたヘスペリジナーゼ (*Aspergillus niger*, 3 U/g) および, ナリンギナーゼ (*Penicillium decumbens*, 537 U/g) はそれぞれシグマアルドリッチから購入した.  $\beta$ -グルコシダーゼ (almond, 36.8 U/mg) および  $\alpha$ -グルコシダーゼ (yeast, 63.4 U/mg) は関東化学から購入した. その他, セロビオースは関東化学, グルコース CII テストワコーは和光純薬から購入した. また McIlvaine 緩衝液は 100 mM クエン酸溶液と 200 mM リン酸水素二ナトリウム溶液を混合し pH 5.0 となるように調整した. 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) は酢酸ナトリウム三水和物 (関東化学) を純水で 0.1 M になるよう調整した. またクエン酸緩衝液は 2 章に準じて調製した. その他, 4%マルトース溶液はマルトース水和物 (関東化学) を 4%になるよう純水で調整したものを使用した.

##### (B) 機器

分析に用いたHPLCは第2章に記述した島津製のシステムを使用した. また, 分取に用いたHPLCは日本分光製のポンプ (PU-980), 検出器 (UV-975), グラジエントユニット (LG-980-02) および島津製のレコーダー (CR-6A) で構成されるシステム, またはトーソー製のポンプ (CCPS), 検出器 (UV-8020) で構成されるシステムを使用した. 分取には, 関東化学製のMightysil RP-18 GP (10 mm×250 mm) 分取用カラムと, そのガードカラムを使用した.

#### 3-3-2 HPLC 分析条件の設定

HPLC 分析条件および物質の同定は第 2 章に準じて行った. また, 新たに本章で用いたエリオジクチオールおよびエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドについても, 標準試薬を用いて 3 回分析を繰り返して行った. この時, 用いたカラムにより保持時間が異なったため, それぞれについて保持時間の平均値と標準偏差を求めた. それぞれの分析についての詳細を以下に示した.

カラム : Mightysil RP-18 GP (6.0×150 mm) (A) または Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR II (4.6×250 mm)(B)  
溶媒 : アセトニトリル : 0.5%酢酸 = 25 : 75, 流速 : 0.7 ml/min, カラム温度 : 35°C  
検出波長 : 285 nm, サンプル注入量 : 1  $\mu$ l または 5  $\mu$ l

### 3-3-3 エリオシトリンの酸加水分解

0.01 N, 0.1 N, 1 N 塩酸液（各 1 ml）を入れた試験管を 3 本ずつ用意し（n=3），沸騰水中であらかじめ加熱して，水温を 90℃ とした．エリオシトリン 1 mg をそれぞれに加えて，これを 30 分間沸騰水中にて処理した．処理後 30 分間常温で冷まし，同濃度の水酸化ナトリウムで中和した．pH を確認後，HPLC を用いて分析し生成物を確認した．さらに，0.1 N, 1 N に調整した硫酸，リン酸，酢酸についても同様の方法で酸加水分解の有無について評価した．

### 3-3-4 酵素活性の測定

ナリンギナーゼやヘスペリジナーゼなど  $\beta$ -グルコシダーゼ活性を持つ酵素について，セロビオースを同一基質として用いてそれぞれのセロビオースに対する酵素活性を求めた．ヘスペリジナーゼは 10 mg/ml， $\beta$ -グルコシダーゼは 0.1 mg/ml，またナリンギナーゼは 1 mg/ml となるように McIlvaine 緩衝液（pH 5.0）で溶解し酵素溶液とした．この酵素溶液 1 ml を，1.5 ml チューブに量り取った 1.0 mg のセロビオースと混合した（最適酵素量およびセロビオース濃度はあらかじめ予備実験にて決定した）．この混合溶液を 37℃ で 150 分間反応させた．10 分置きに熱湯で 3 分間インキュベートし酵素反応を止めた．グルコース CII テストワコーを用いて，酵素反応後の溶液を 10 分ごとに分光光度計（吸収波長 505 nm）で測定することによって，遊離したグルコース量を定量した．定量結果から，それぞれの酵素の反応曲線を作成し，1 分間の吸光度変化（初速度）を算出し，以下に示す式からセロビオースに対する酵素活性を求めた．

$$\text{酵素活性}(\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{1 \text{ 分間の吸光度変化(初速度)}}{\text{モル吸光係数}(1 \mu\text{mol}/\text{ml})} \times \text{反応溶液}(\text{ml}) \times \text{酵素の希釈倍率}$$

### 3-3-5 エリオシトリンの酵素処理と変換物の単離精製

レモン果皮より精製したエリオシトリン 1 mg とヘスペリジナーゼ 0.5 mg または 5 mg を 1.5 ml チューブに量り取り，1 ml の McIlvaine 緩衝液で溶解し 37℃ で 24 時間インキュベートした（暗条件下）．この反応液を 1 時間おきに HPLC で分析し，そのエリオシトリンの経時間的变化を分析した．ナリンギナーゼについては，エリオシトリン 1 mg とナリンギナーゼ 0.03 mg または 0.3 mg を反応させ，同様に 1 時間おきに分析した．HPLC の分析条件は 3-3-2 に準じた．さらにエリオジクチオール 7-O-グルコシドの生成を目的として，経時変化

の分析から得られた条件を利用して、レモン果皮から精製したエリオシトリン 30 mg とヘスペリジナーゼ 15 mg を 50 ml チューブに秤り取り、30 ml の超純水に溶解し 37°C で 24 時間インキュベートした（暗条件下）。反応後、同量のメタノールに溶解し反応を止めた後、減圧濃縮し 10 ml のメタノールに再溶解した。これを 6,500×g で 5 分遠心し、その上清液を純水で置換した Sephadex LH-20 (27×250 mm) にアプライし、純水 100 ml で洗浄し、次いで 20%, 40%, 60%, と 20% ずつメタノールの濃度を変え、最終的に 100% メタノール（それぞれ 100 ml）で溶出した。また、HPLC による分取も試みた。なお、エリオジクチオール生成を目的とする場合は、エリオシトリン 30 mg にナリンギナーゼ 9 mg を反応させ、30 ml の超純水に溶解し 37°C で 24 時間インキュベートした（暗条件下）。同量のメタノールを加え酵素反応を止めた後、HPLC で分取した。分取の HPLC 条件を以下に示した。

#### 【分取 HPLC 条件】

カラム：Mightysil RP-18 GP250-10

溶媒：アセトニトリル：0.5%酢酸 = 19：81（エリオシトリンの単離）

アセトニトリル：0.5%酢酸 = 34：66（エリオジクチオールの単離）

流速：2.0 ml/min, カラム温度：室温

検出波長：285 nm, サンプル注入量：100～300  $\mu$ l

### 3-3-6 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性試験

$\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性試験はグルコース測定キットのグルコース C-II テストワコーを用いた。

#### (A) ブタ小腸ホモジネートの調製

冷凍保存したブタ小腸を生理食塩水で洗浄した後、小腸に付着している余分な脂肪を除去し粘膜層をそぎ取った。次に重量を秤りさらにハサミでミンチ状に刻んだ。これに 4 倍量の PPS(-)を加え、氷上で高速ホモゲナイザーを用いて破碎した。3,200×g, 10 分, 4°C で遠心し、その上清をガーゼろ過し、ブタ小腸ホモジネートとして調整した。これをさらに 9,500×g, 60 分, 4°C で遠心し、沈殿物と上清に分け、上清をブタ小腸由来ホモジネート（ $\alpha$ -グルコシダーゼ）として凍結保存した。

#### (B) 阻害活性の測定

1.5 ml 微量遠心チューブに 0.1 M 酢酸緩衝液（pH 6.0）120  $\mu$ l, 4%マルトース溶液 50  $\mu$ l, サンプル 10  $\mu$ l, ブタ小腸ホモジネート 20  $\mu$ l を加え、37°C, 20 分間インキュベートした。反応後、沸騰水中で 3 分間加熱し酵素反応を停止させ、さらに 2,400×g で 5 分間遠心分離し

た. 遠心上清 20  $\mu$ l を 1.5 ml チューブにとり, グルコース測定キットの発色試薬を 0.9 ml 加えて, 37°C, 20 分間インキュベートした. 反応後 505 nm における吸光度を測定した. なお試料ブランクには純水を用い, 以下の計算式によりそれぞれの物質の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を求めた.

$$\text{阻害率(\%)} = \left[ 1 - \frac{(\text{吸光度}_{+ \text{阻害剤}/- \text{酵素}}) - (\text{吸光度}_{+ \text{阻害剤}/- \text{酵素}})}{(\text{吸光度}_{- \text{阻害剤}/+ \text{酵素}}) - (\text{吸光度}_{- \text{阻害剤}/- \text{酵素}})} \right] \times 100$$

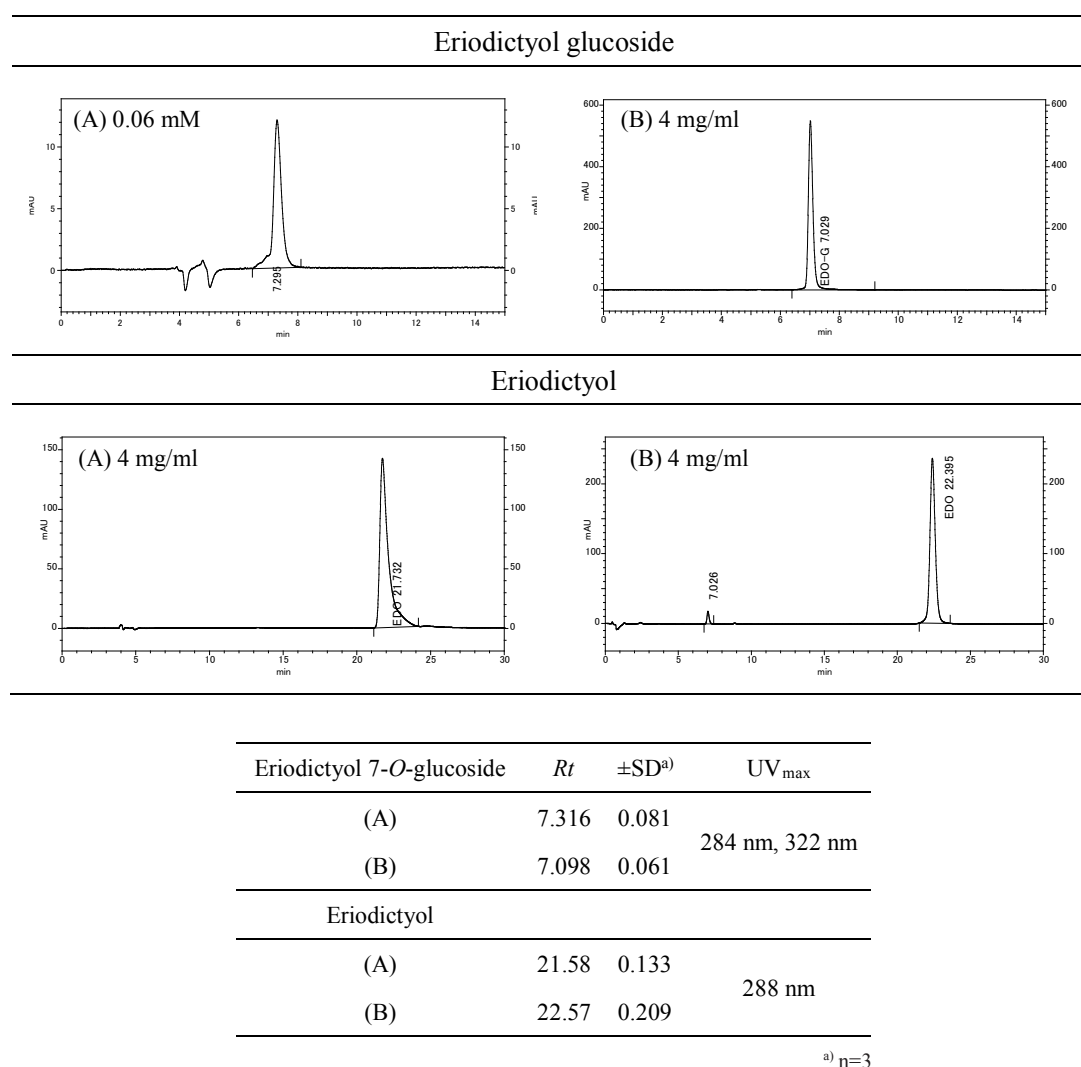
### 3-3-7 統計処理

それぞれの実験において 3 回ずつ繰り返し分析を行い, その平均 $\pm$ 標準偏差 (SD) を求めた.

### 3-4 結果

#### 3-4-1 標準物質の HPLC プロファイル

まず最初にエリオジクチオールとエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの標準品について HPLC 分析を行い条件検討を行った。2 種類のカラム Mightysil RP-18 GP (6.0×150 mm) (A) または Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR II (4.6×250 mm)(B)を使用した。いずれの物質ともほぼ類似した保持時間で溶出した。それぞれについて 3 回繰り返し分析を行い保持時間の平均値および標準偏差を計算した (Fig. 3-4)。



**Fig. 3-4 HPLC profiles of eriodictyol 7-*O*-glucoside and eriodictyol standards**

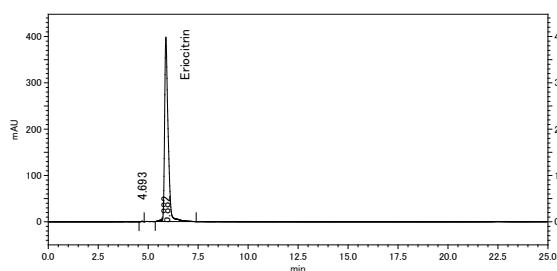
The columns used for analysis are Mightysil RP-18 GR (A) and Cosmosil 5C<sub>18</sub> AR-II (B).

### 3-4-2 エリオシトリンの酸加水分解

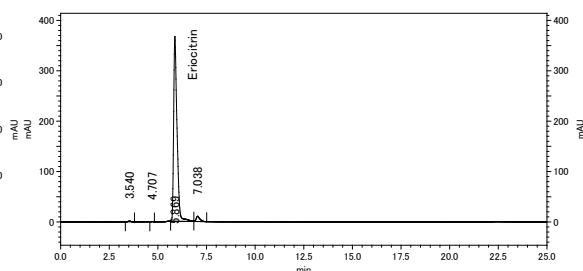
エリオシトリンはクエン酸緩衝液中で7日間常温保存した場合、pH 2.4の酸性条件でわずかに減少したものの安定であり（第2章 Fig. 2-9），糖鎖部分の酸加水分解は自然には起こりにくいと考えられた．エリオシトリンはヘスペリジン等と同様にルチノースを有するグルコース配糖体であるが，このような配糖体は，塩酸などの強酸を用いて酸加水分解することで，単糖が得られることが知られており，実際にフラボノイドの有する糖鎖の加水分解に応用されている<sup>89)</sup>．したがって，まずエリオシトリンを酸加水分解することで，エリオジクチオール7-*O*-グルコシドを生成できないか検討した．

1 mg のエリオシトリンを 0.01 N, 0.1 N, 1 N 塩酸 1 ml にそれぞれ溶解し，30 分煮沸処理した．30 分間常温で冷却し中和した後，HPLC でその変化を分析した．その結果，0.1 N および 1 N 塩酸中での処理によりエリオジクチオール 7-*O*-グルコシド（保持時間 7 分付近）およびエリオジクチオール（保持時間 22 分付近）が生成された（Fig. 3-5）．したがって，強酸中では短時間の加熱で加水分解が起こることが確認された．なお，純水中では変換物は見られず，煮沸に対しても安定であった．

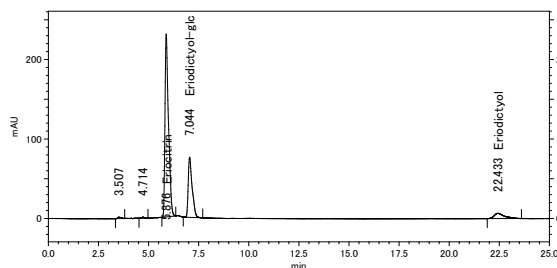
Control (H<sub>2</sub>O)



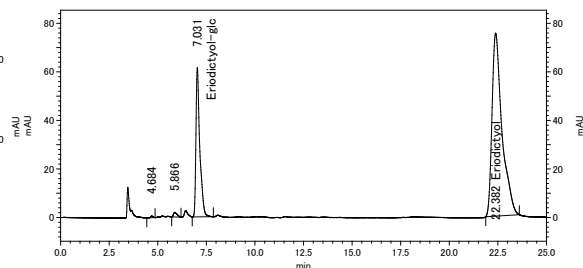
0.01 N HCl



0.1 N HCl



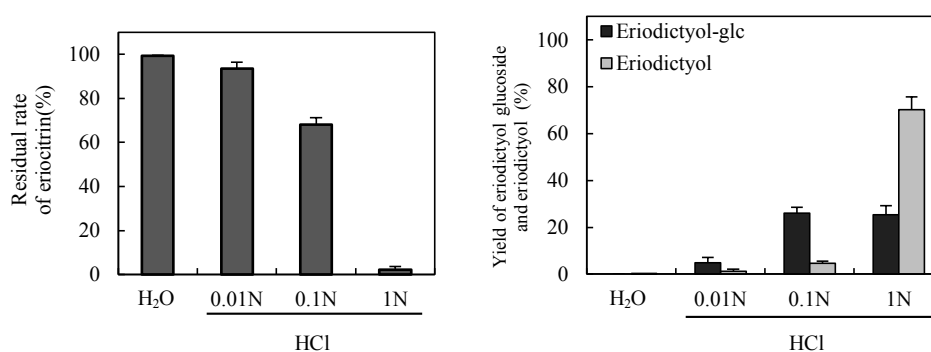
1 N HCl



**Fig. 3-5 HPLC chromatograms of eriocitrin after acidic hydrolysis**

One mg/ml of eriocitrin was treated with various concentrations of hydrochloric acid at 100 °C for 30 min. After neutralization, the solution was analyzed by HPLC using Cosmosil C<sub>18</sub> ODS column.

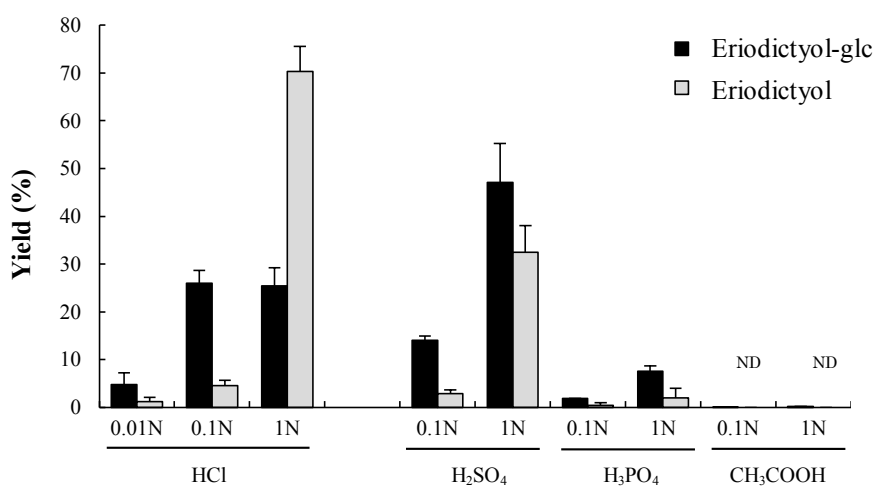
エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの生成量に着目してみると、0.01 塩酸処理で 4.8%, 0.1 N 処理で 26.0%, 1 N 処理で 25.4%といずれの処理濃度においてもその生成量は低かった (Fig. 3-6). また 1 N 処理ではエリオジクチオールの生成量が 70%と高く、これらの結果から、酸処理によってエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドを選択的に生成することは難しいと判断した. 次いで他の酸性溶液についても同様の方法で加水分解の有無を検討した (Fig. 3-7). その結果、0.1 N 硫酸では 14.1%と低い変化率しか見られなかったが、1 N 硫酸においてエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドは 47.1%と比較的多く、またエリオジクチオールが 32.5%と塩酸処理よりも生成効率が良いことが明らかとなった. しかしながら、リン酸では 1 N 処理で 7.6%とその加水分解効率は低く、さらに酢酸に関しては 99%以上エリオシトリンが残存しており、加水分解物は見られなかった.



**Fig. 3-6 Conversion of eriocitrin by acidic hydrolysis**

(A) Residual yield (%) of eriocitrin; (B) Conversion yield (%) of hydrolyzed products

All data show the mean  $\pm$ SD (n=3).



**Fig. 3-7 Comparison of conversion yield (%) of hydrolyzed products by various acid treatments**

ND, Not detected; All data are presented as the mean  $\pm$ SD (n=3).

3-4-3 エリオシトリンの酵素水解

(A) セロビオースに対する酵素活性

セロビオースはグルコース 2 分子が  $\beta$  結合によって結合した二糖である。エリオシトリンの持つルチノースに類似の構造を持つセロビオースを用いて、同一基質に対する酵素活性を調べることで、それぞれの使用濃度の判断材料とした。ヘスペリジナーゼおよびナリンギナーゼによって遊離したグルコースを指標にそれぞれの酵素における反応曲線を作成した (Fig. 3-8)。次いで 1 分間の吸光度変化から初速度を求め酵素活性を算出した (Fig. 3-9)。このセロビオースに対するナリンギナーゼおよびヘスペリジナーゼの酵素活性はそれぞれ、53 units/g および 0.75 units/g であり、70 倍ほどナリンギナーゼの方が強かった。また、almond  $\beta$ -グルコシダーゼのセロビオース水解活性は 453 units/g と非常に強い活性を示した。

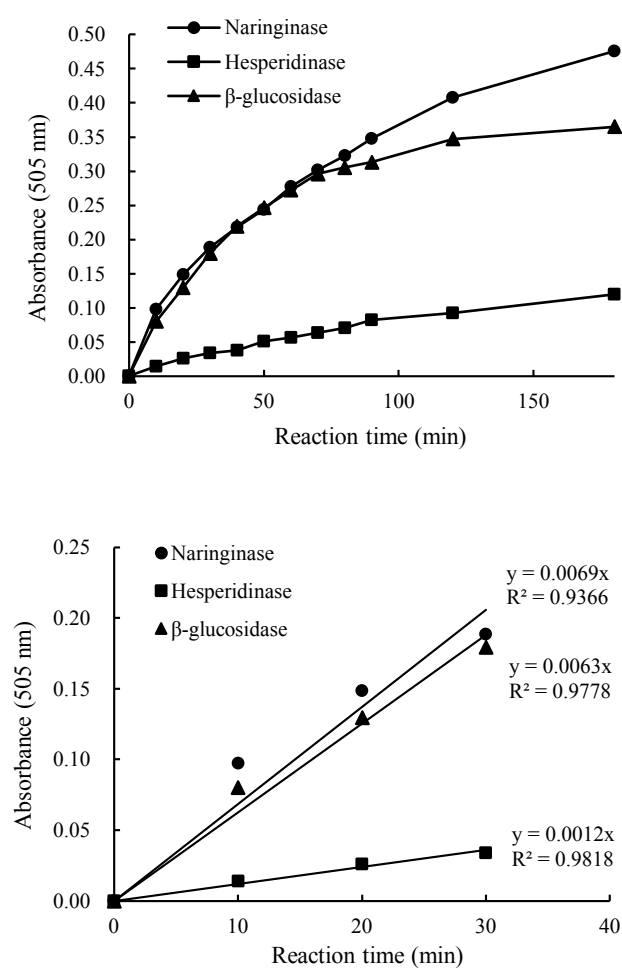


Fig. 3-8 Time course of enzymatic hydrolysis of glycosidases toward cellobiose

One mg of cellobiose was incubated with 0.03 mg of naringinase and 0.5 mg of hesperidinase in a 1 ml of mcllvaine buffer (pH 5.0) at 37°C for 3 h. Glucose liberated in the solution was determined using Glucose C II test.

Fig. 3-9 Determination of enzymatic activities of glycosidases used in this study

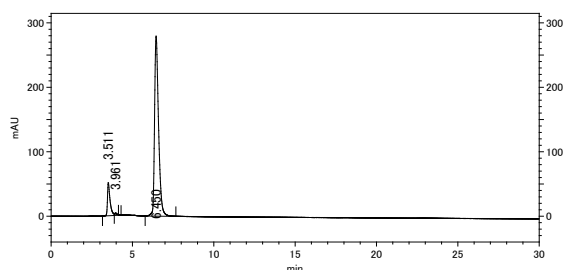
Enzymes activities were calculated based on their initial velocities of hydrolytic potentials.



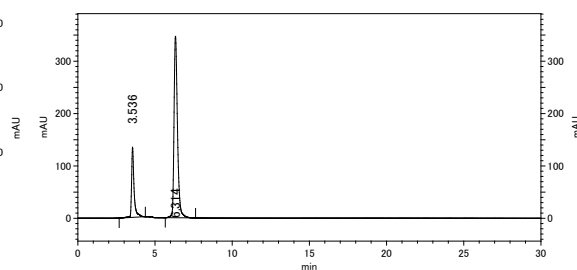
## (B) 用いる酵素の選択

ヘスペリジナーゼ (*Asp. niger*), ナリンギナーゼ (*P. decumbens*),  $\beta$ -グルコシダーゼ (almond), および  $\alpha$ -グルコシダーゼ (yeast) の 4 つの酵素を用いて, エリオシトリンの加水分解を試みた. それぞれ二糖水解活性を基に酵素量を決め, エリオシトリンに対する加水分解能を検討した結果, ヘスペリジナーゼおよびナリンギナーゼの 2 酵素でエリオシトリンの加水分解が確認でき, ヘスペリジナーゼではエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドおよびエリオジクチオールが生成され, ナリンギナーゼではエリオジクチオールのみが生成された (Fig. 3-10 C, D). しかし,  $\beta$ -グルコシダーゼや結合様式の異なる  $\alpha$  結合を加水分解する  $\alpha$ -グルコシダーゼについては長時間の反応においても生成物は見られず (Fig. 3-10 A, B), 酵素反応は起こらなかった. これらのことから, エリオシトリンの酵素処理は, ヘスペリジナーゼとナリンギナーゼを用いて詳細に検討することとした.

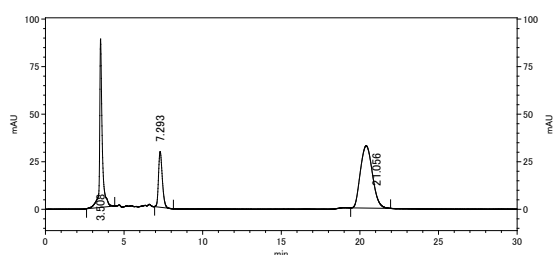
### (A) $\alpha$ -glucosidase (from yeast)



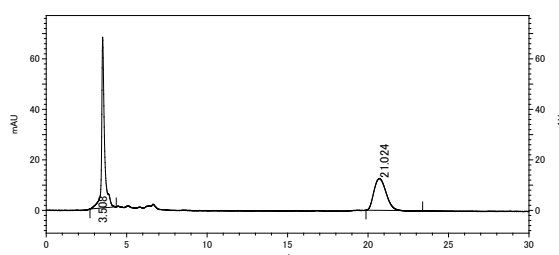
### (B) $\beta$ -glucosidase (from almond)



### (C) Hesperidinase



### (D) Naringinase



**Fig. 3-10 HPLC chromatograms of eriocitrin treated with yeast  $\alpha$ -glucosidase (A), almond  $\beta$ -glucosidase (B), hesperidinase (C) and naringinase (D)**

One mg of eriocitrin was dissolved in 1 ml of McIlvaine buffer (pH 5.0) and treated with  $\alpha$ -glucosidase (10  $\mu$ l),  $\beta$ -glucosidase (1 mg), hesperidinase (5 mg) and naringinase (1 mg) for 24 h at 37°C. The enzymatic products of eriocitrin were analyzed by HPLC using a Mightysil C<sub>18</sub> ODS column.

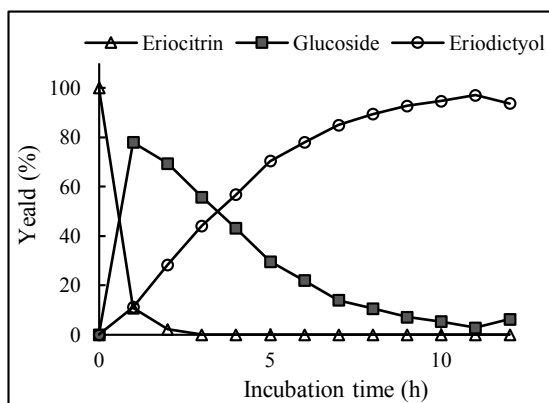
### (C) 酵素処理によるエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの生成（最適条件の検討）

ナリンギナーゼおよびヘスペリジナーゼを用いることで、エリオシトリンの糖部位での加水分解が起こることを確認した (Fig. 3-10). 次にエリオシトリンの酵素反応溶液における 1 時間ごとの経時変化を HPLC で分析し、本目的であるエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの生成状態を経時的に分析し、それぞれの時間に見られたエリオシトリン、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシド、エリオジクチオールの存在比をピーク面積比を基に示した. いずれの酵素の場合とも、酵素量が多い場合には加水分解速度は速く、最終的にアグリコンのエリオジクチオールが多く生成された. ヘスペリジナーゼ（エリオシトリン 1 mg に対してヘスペリジナーゼ 5 mg）を用いた酵素反応においてエリオシトリンは 3 時間で約 50%, 5 時間で 70%, 12 時間で 100%と経時的にエリオジクチオールに変換された. しかし反応後数時間はエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドが生成されており、時間とともにさらに加水分解を受けてエリオジクチオールに変換されていることが確認された (Fig. 3-11 A). 同様にナリンギナーゼ（エリオシトリン 1 mg に対してナリンギナーゼ 0.3 mg）を用いた酵素処理においては、反応後 2 時間でエリオシトリンはほぼ全量エリオジクチオールに変化しており、反応後 30 分に少量のエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの生成が確認されたのみであった (Fig. 3-11 C).

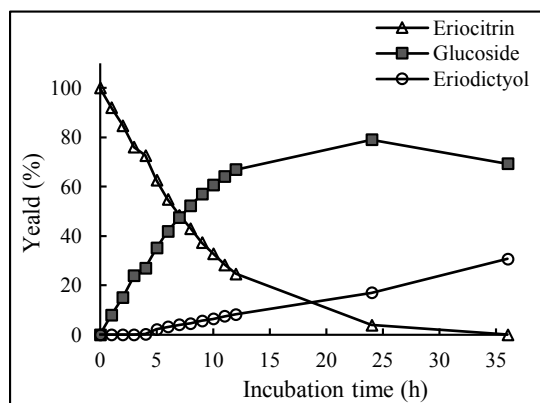
以上の条件では反応が早く、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの生成量が少ないことから、次にその割合を増やすことを目的として、酵素活性を 1/10 倍に希釈し活性を弱めて同様に実験を行った. ヘスペリジナーゼ（エリオシトリン 1 mg に対してヘスペリジナーゼ 0.5 mg）を用いた結果、反応後 24 時間でグルコシドの生成量が最大となり、エリオジクチオールへの加水分解は非常にゆるやかであった (Fig. 3-11 B). この時点でグルコシドへの変換はほぼ 80%に達し、エリオジクチオールは 20%以下であった. 同様にナリンギナーゼ（エリオシトリン 1 mg に対してヘスペリジナーゼ 0.03 mg）についても検討したところ、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドが 12 時間で最大 70%程度確認され、こちらもエリオジクチオールへの加水分解はゆるやかであったが、24 時間では 50%とやや反応が進んだ (Fig. 3-11 D). なおヘスペリジナーゼおよびナリンギナーゼのどちらの酵素においても、HPLC 分析の結果、その他の変換物と思われるピークは見られなかった.

これらのことから、酵素活性を調整することでエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドからエリオジクチオールへの加水分解を抑え、選択的にエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドを生成させることが可能であることが示された. また、ヘスペリジナーゼやナリンギナーゼによる脱配糖化は、エリオシトリンのルチノース部におけるラムノースの遊離が起こり、次いでグルコースの遊離によってアグリコン化することが確認された. このことから、特にヘスペリジナーゼの活性によって効率的にエリオシトリンからエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの生成が可能であることを明らかにした.

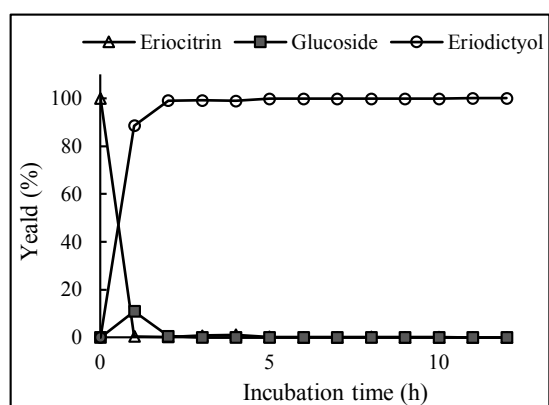
(A) Hesperidinase 5 mg



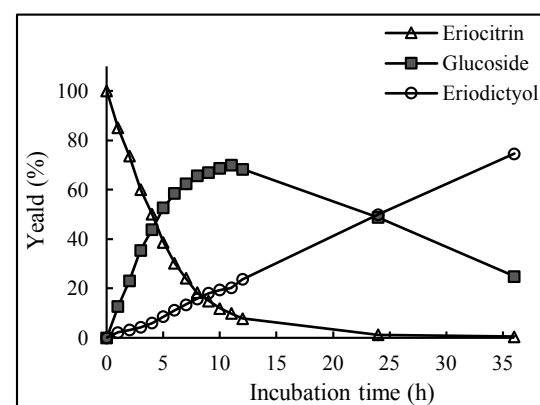
(B) Hesperidinase 0.5 mg



(C) Naringinase 0.3 mg



(D) Naringinase 0.03 mg



**Fig. 3-11 Conversion of eriocitrin to its hydrolytic products by hesperidinase and naringinase**

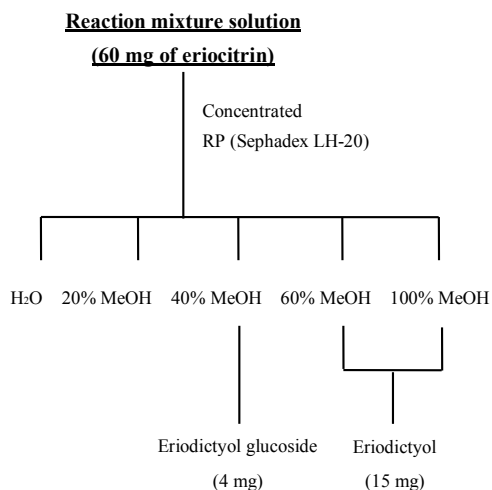
One mg of eriocitrin was dissolved in 1 ml of McIlvaine buffer (pH 5.0) and treated with hesperidinase (0.5mg or 5 mg) or naringinase (0.03 mg or 0.3 mg) at 37°C. The enzymatic products of eriocitrin were analyzed by HPLC using a Cosmosil C<sub>18</sub> ODS column.

### 3-4-4 エリオジクチオールとエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの精製

これまでの処理条件の検討をもとに、ナリンギナーゼ（エリオシトリン 1 mg に対してナリンギナーゼ 0.3 mg）を用い反応時間を 3 時間で処理し、エリオジクチオールを生成した。この酵素反応溶液に 2 倍量のメタノールを加え反応を停止させた後、Sephadex LH-20 カラムを用いて分離精製した。またエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの生成にはヘスペリジナーゼ（エリオシトリン 1 mg に対してヘスペリジナーゼ 0.5 mg）を用い、反応時間を 24 時間で処理した。この酵素反応溶液を 2 倍量のメタノールを加え反応を停止させた後、同様に Sephadex LH-20 カラムに、純水で洗浄後、20, 40, 60, 100%メタノールで抽出した (Fig. 3-12)。エリオジクチオールは 60%および 100%メタノール分画に、またエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドは 40%分画にそれぞれ溶出された。

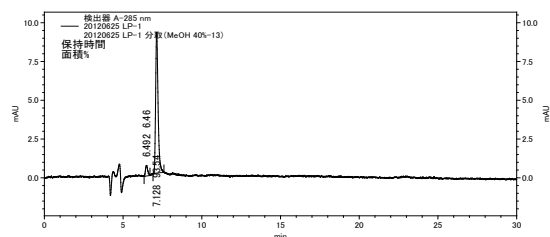
なおそれぞれの酵素反応には 30 mg のエリオシトリンを用い、エリオジクチオールを 15 mg（純度>98%）、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドを 4 mg（純度>93%）を得た。後者の純度はやや低かったものの、反応混合溶液中のこれらの反応物はオープンカラムを用いてそれぞれ分離が可能であり、一度に多量の処理が可能であった。その結果、黄色粉末として純度 99%（HPLC）のエリオジクチオールを得た。

(A)

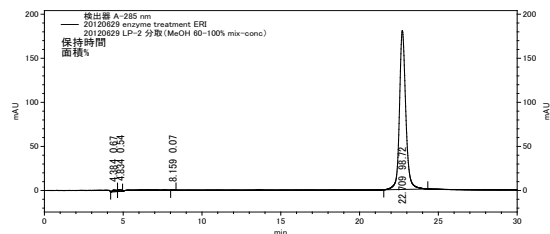


(B)

**Pulified eriodictyol glucoside**



**Pulified eriodictyol**

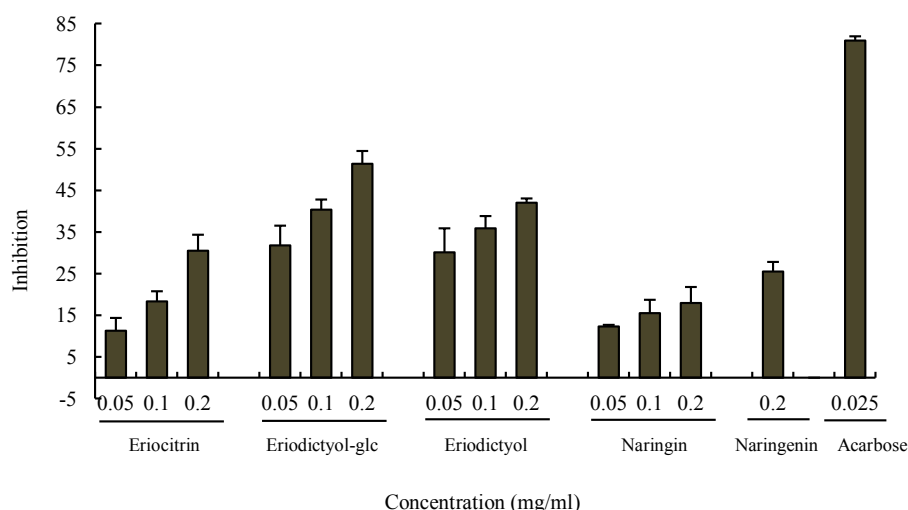


**Fig. 3-12 Scheme for isolation of eriodictyol glucoside and eriodictyol (A), and their chromatograms (B)**

HPLC conditions : Mithysil C18 ODS column, detection, 285 nm, temperature, 35°C, Eluent, 25% acetonitrile, flow rate, 0.7ml/min.

### 3-4-5 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の評価

食後高血糖や肥満の予防の一つは、食事中的糖や脂質の吸収を抑制することで可能なことが指摘されている<sup>90)</sup>。先述した通り、エリオジクチオール7-*O*-グルコシドはレモンピール水中から  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性物質として発見された物質である。そこで本試験ではレモンフラボノイドの阻害活性を総合的に評価するため、精製したエリオシトリン、エリオジクチオール、そしてエリオジクチオール7-*O*-グルコシドについて、それぞれ  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を評価し比較した。その結果、終濃度0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml においてエリオシトリンの阻害活性 (30.4 $\pm$ 3.9%, 18.3 $\pm$ 2.4%, 11.4 $\pm$ 3.0%) に対して、エリオジクチオールは42.1 $\pm$ 0.9%, 35.9 $\pm$ 2.9%, 30.1 $\pm$ 5.7%となり、またエリオジクチオール7-*O*-グルコシドは51.3 $\pm$ 3.1%, 40.4 $\pm$ 2.4%, 31.8 $\pm$ 4.8%と、いずれの濃度ともにエリオシトリンよりも強い活性を示した。特にエリオジクチオール7-*O*-グルコシドはいずれの濃度においてもエリオシトリンより顕著に強かった。また、アグリコンのエリオジクチオールに対してナリンゲニンの活性は25.5 $\pm$ 2.3% (終濃度0.2 mg/ml) と弱く、さらにその配糖体であるナリンジンの阻害活性は12.3 $\pm$ 0.3% (終濃度0.2 mg/ml) と極めて弱かった。また Fig. 3-13の結果をもとに、それぞれの阻害活性から近似線を作成し IC<sub>50</sub> 値を求めたところ、エリオジクチオール7-*O*-グルコシド (0.18 mg/ml) < エリオジクチオール (0.29 mg/ml) < エリオシトリン (0.35 mg/ml) の順となり、エリオシトリンからラムノースが脱離すると特に活性が強くなることが示された (Table 3-1)。



**Fig. 3-13  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activities of lemon flavonoids**

Reaction mixtures containing 120  $\mu$ l of 0.1 M acetate buffer, 50  $\mu$ l of 4% maltose, 20  $\mu$ l of porcine intestinal homogenate, and 10  $\mu$ l of sample were incubated for 20 min at 37°C. Glucose liberated was measured at 505 nm by Glucose C-2 test. All data represent the mean  $\pm$ SD (n=3).

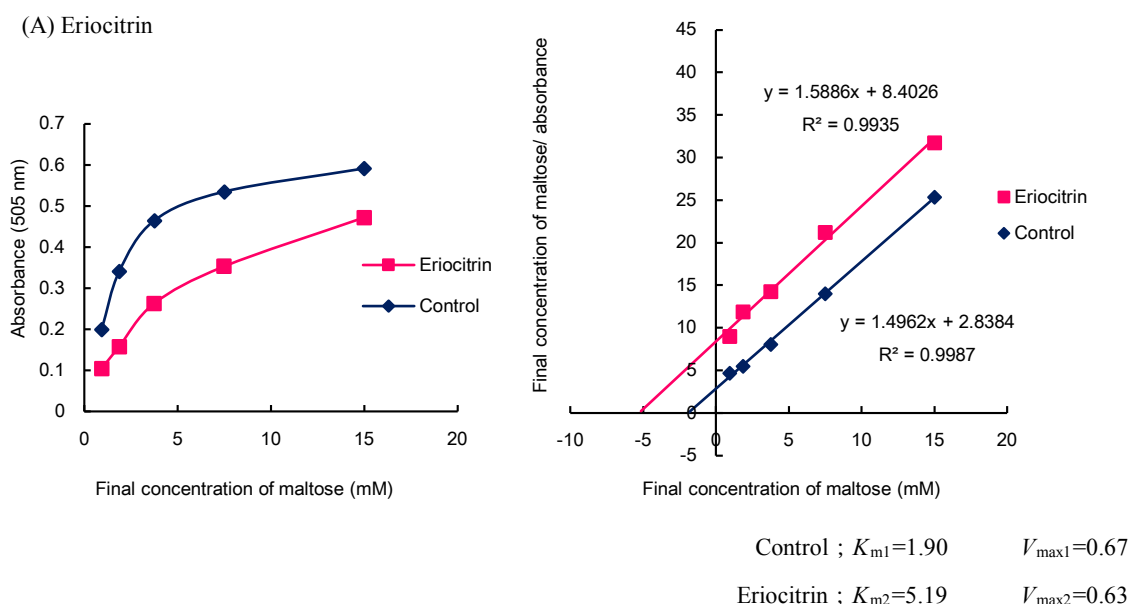
Table 3-1 IC<sub>50</sub> of flavonoids for  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity

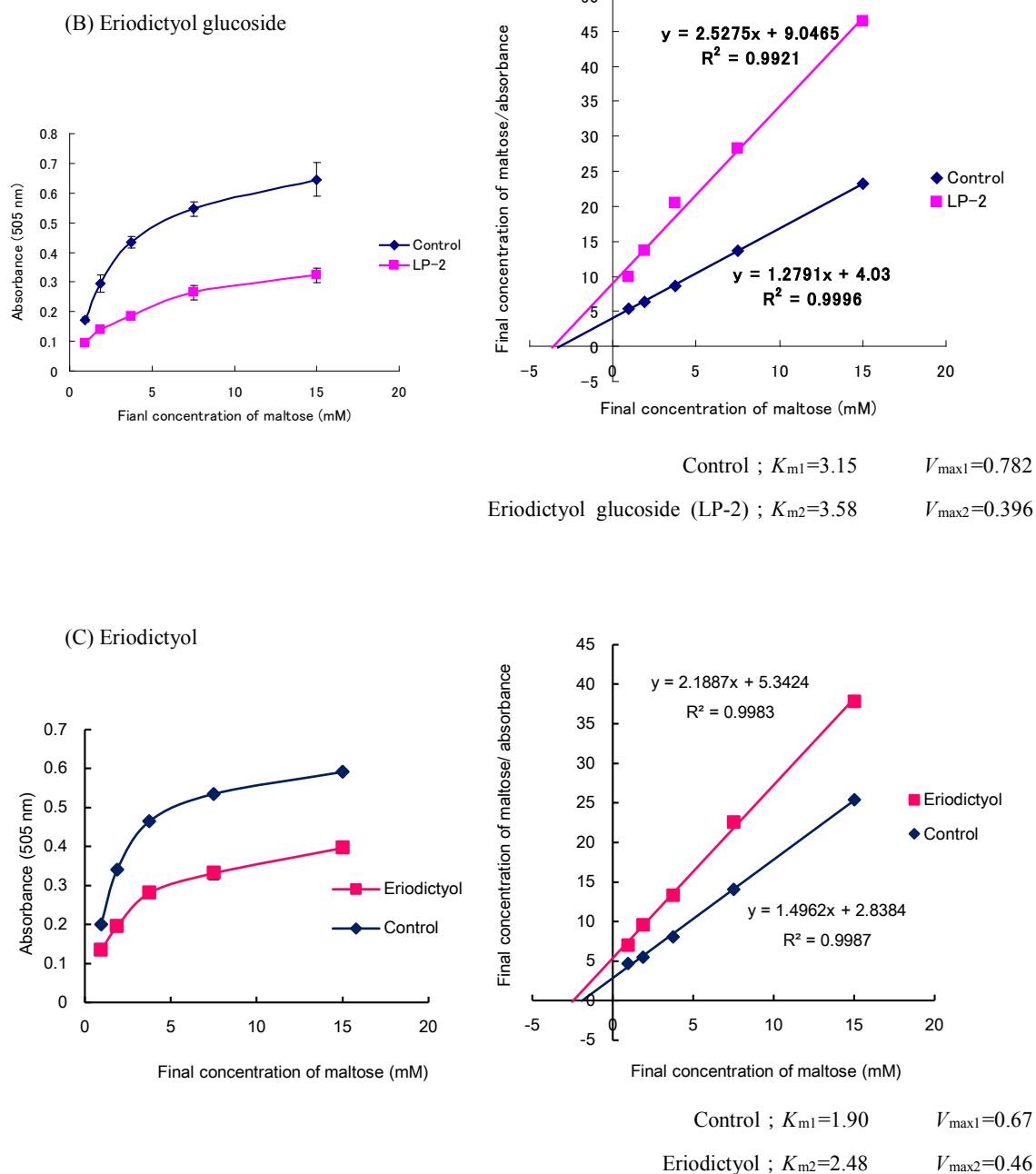
Sample	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Eriocitrin	0.35
Eriodictyol-glc	0.18
Eriodictyol	0.29
Naringin	1.09

### 3-4-6 レモンフラボノイドの $\alpha$ -グルコシダーゼに対する阻害様式

レモンフラボノイドの  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性について、その阻害様式の解析を行うため、基質濃度を 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2% と変化させた時の反応速度と、それらを直線型に変形させた Hanes Woolf plot を用いて  $V_{\max}$  と  $K_m$  値を求め評価した。その結果、エリオシトリンは  $V_{\max}$  が 0.67 (Control) から 0.63 (Eriocitrin) と変化なかったが、 $K_m$  値は 1.90 (Control) から 5.19 (Eriocitrin) と大きく上昇した (Fig. 3-13 A)。次にエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドは  $V_{\max}$  が 0.78 (Control) から 0.39 (LP-2) と顕著に低下したが、 $K_m$  値は 3.15 (Control) から 3.58 (LP-2) と変化はなかった (Fig. 3-13 B)。また、エリオジクチオールについても  $V_{\max}$  が 0.67 (Control) から 0.46 (Eriodictyol) と顕著に低下し、 $K_m$  値は 1.90 (Control) から 2.48 (Eriodictyol) と大きな変化はなかった (Fig. 3-13 C)。

したがって、エリオジクチオールとエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドは  $V_{\max}$  が変化し  $K_m$  値の変化がなかったことから、これらの阻害様式は非競合阻害であることが明らかとなった。これに対して、エリオシトリンは  $V_{\max}$  が変化せず  $K_m$  値に大きな変化が見られたことから阻害様式は競合阻害であることが明らかとなった (Table 3-2)。





**Fig. 3-14 inhibition pattern of eriocitrin (A), eriodictyol glucoside (B), and eriodictyol (C)**

Reaction mixtures containing 120  $\mu$ l of 0.1 M acetate buffer, 50  $\mu$ l of each concentration of maltose (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2%), 20  $\mu$ l of porcine intestinal homogenate, and 10  $\mu$ l of sample were incubated for 20 min at 37°C. Glucose liberated was measured at 505 nm by Glucose C- II test. All data represent the mean  $\pm$ SD (n=3).

### 3-5 小括

本章では、エリオシトリンをナリンギナーゼやヘスペリジナーゼを用いて酵素処理することでエリオシトリン分子中のラムノース 1 個を脱離したモノグルコシド、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの効率的生成法を新たに確立した。まず初めに植物由来の  $\beta$ -グルコシダーゼ（アーモンド由来）を用いてエリオシトリンの処理を行ったが、糖の加水分解は見られなかった。また結合様式の異なる  $\alpha$ -グルコシダーゼ（酵母菌由来）においても加水分解はみられなかった。したがって、次に微生物由来の  $\beta$ -グルコシダーゼであるナリンギナーゼおよびヘスペリジナーゼを用いることとした。その結果、エリオシトリンの結合糖であるルチノースはラムノースから順に脱離され、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシド、次いでエリオジクチオールへと順に加水分解されることを確認した。これらの反応は酵素量比を調整することで、効率的にそれぞれを生成させることができ、ヘスペリジナーゼ（エリオシトリン 1 mg に対してヘスペリジナーゼ 0.5 mg）で 24 時間処理することで、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの生成割合を 80%程度に高めることができ、モノグルコシドの生成を制御することが可能であった。一方でナリンギナーゼを用いた酵素処理においても、同様にモノグルコシドの生成が見られたが、ヘスペリジナーゼ処理に比べ、エリオジクチオールの生成速度が若干早いことが認められた。これらのことから、モノグルコシドはヘスペリジナーゼ、アグリコンはナリンギナーゼとそれぞれの酵素を使い分けることにより、それぞれをより効率的に生成することが可能であった。また酵素反応溶液中のアグリコンとモノグルコシドは、Sephadex LH-20 オープンカラムクロマトグラフィーまたは分取 HPLC を用いて、それぞれを一段階の操作で高い純度で得ることができることを示した。

これまでに酵素を用いたエリオシトリンのエリオジクチオールへの物質変換は三宅らによって報告されており、エリオシトリンに加えてアグリコンのエリオジクチオールにも LDL の酸化を抑制する作用が認められた<sup>91)</sup>。しかしながら酵素条件に関する検討はされておらず、エリオジクチオールの生成についてのみであり、モノグルコシドについては触れていない。一方で、ヘスペリジンやナリンジンを酵素変換し、それぞれモノグルコシドを生成する方法が増川らによって報告されているが<sup>74)</sup>、精製効率に関しては記されておらず、さらにヘスペリジンを酸加水分解によりヘスペリジンモノグルコシド（ヘスペレチン 7-*O*-グルコシド）を生成した文献も見られるが、その生成率は最大でおよそ 30%程度と低い<sup>92)</sup>。このような先行研究に対して、本章で示した酵素処理法はモノグルコシドの生成率が 80%程度と非常に高いものであり、酵素の処理時間を詳細に検討することでエリオシトリンから効率良くそのモノグルコシドおよびアグリコンを生成させることを可能とした。またこれらは比較的簡易な方法により高純度で分離精製が可能であった。これらの新規なエリオシトリンの分子変換方法はレモンフラボノイドのさらなる応用研究に有用である。

またレモンフラボノイドについて  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を評価したところ、エリオシトリンよりも高い阻害効果がエリオジクチオールとエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドに



見られた。そしてこれらの阻害様式は非競合阻害であったのに対して、エリオシトリンは競合阻害という異なる様式であった。エリオジクチオールとレモンフラボノイドはいずれも B 環にカテコール構造を有するが、B 環に水酸基が1つであるナリンジンやナリンゲニンの阻害活性は低かった。したがって、活性部位は B 環のカテコール構造、あるいは活性を高める条件として A 環7位の結合糖が二糖ではなく単糖であることなどが考えられる。エリオジクチオール7-*O*-グルコシドの阻害効果は他のフラボノイドと比較しても非常に強く<sup>93)</sup>、これらの結果は、レモンピール水をはじめレモンおよびその加工製品が血糖値上昇の抑制に対して有用であることを示唆するものである。

以上をまとめると、本章では新規なエリオシトリンの酵素変換法により、強い  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を有するエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドを効率良く精製する方法を確立した。

## 第4章 レモンフラボノイドの生物活性の評価

### 4-1 はじめに

#### (1) 抗酸化物質と過酸化脂質

油脂を含む食品は、空気にさらしておくと、色合いが変化し味やにおいが悪くなる。この現象を酸敗と呼ぶが、これは油脂の成分の中でも特に二重結合を多く含む高度不飽和脂肪酸（リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸など）が、光や熱の刺激でラジカルを生じ、これが新たな脂肪酸に伝播し、連鎖的に脂質過酸化反応を起こすことに起因する。生成した過酸化脂質は自動酸化の過程の中でアルデヒド、アルコール、ケトン、炭化水素、低級脂肪酸などに分解される。低級脂肪酸により食品の pH が低下するとともに、アルデヒドや炭化水素により臭いや味の劣化が起こるのである。このように食品における脂質の過酸化反応は、酸敗臭の発生や栄養価の低下など、品質の劣化を引き起こす。脂質の連鎖的過酸化は脂質（LH）からヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）等により水素引き抜き反応を受けて脂質ラジカル（アルキルラジカル:  $\text{R}\cdot$ ）が生成することから始まる。このラジカルは酸素分子と反応して脂質ペルオキシドラジカル（アルキルペルオキシドラジカル:  $\text{LOO}\cdot$ ）となり、さらに脂質ペルオキシドラジカルが新たな脂質と反応して水素を引き抜き、再び脂質ラジカルが発生することでラジカル連鎖反応が生じる。過酸化脂質（ヒドロペルオキシド:  $\text{LOOH}$ ）は第 1 鉄イオンで還元されてアルコキシラジカル（ $\text{RO}\cdot$ ）を生成し、このアルコキシラジカルが脂質から脱水素して脂質ラジカルを生成するとさらに連鎖反応が加速される。このような脂質過酸化の連鎖反応は生体内脂質酸化でも同様のメカニズムで進行しているものと考えられている（Fig. 4-1）。

その中で近年、生体内において酸化反応により生じた過酸化脂質などの活性酸素種（ROS: Reactive oxygen species）は、細胞障害のみならず、生活習慣病である動脈硬化や糖尿病、またがんなどの様々な疾病の発症と進展の原因と考えられる。ROS は体内では日常的に生成するが、様々な要因により強い酸化ストレスが加わると、生体内の過酸化に対する修復機構のバランスが崩れ、様々な悪影響をきたす<sup>94)</sup>。例えば、大荒田らは劣化油の長期摂取が生体の免疫機能の低下を引き起こすことを報告しており<sup>95,96)</sup>、また低密度リポタンパク（LDL）粒子の膜脂質過酸化は、アテローム性動脈硬化症の原因であると考えられている<sup>97)</sup>。このような観点から、食品中から抗酸化物質を摂取することが、生活習慣病をはじめとする疾病の予防や、さらには健康維持に有効であると考えられている。脂質の自動酸化による連鎖反応を阻止するには、ラジカルの消去や、またラジカルの発生を抑えるために遮光するなどして、紫外線による光励起を抑える必要がある<sup>98,99)</sup>。

代表的な抗酸化物質（ラジカル消去剤）としてジブチルヒドロキシトルエン（BHT: Dibutyl hydroxytoluene）やブチルヒドロキシアニソール（BHA: Butylated hydroxyanisole）などの油脂に用いられる脂溶性の抗酸化剤や、また水溶性のエリスルビン酸などが挙げられるが、これらはいずれも化学合成品であり、また使用基準も厚生労働省により定められている（例えば BHA は油脂やバターに対して 0.2 g/kg）。これに対して、現在では酸化防止剤としてのみに制限されているが、低毒性で使用量に制限のないトコフェロール（ビタミン E）が BHT や BHA の代わりに使用されるようになっている。さらに、現在は使用制限のないアスコルビン酸（ビタミン C）をはじめとして天然抗酸化剤である、カテキンやクエルセチン、およびルチンなどのフラボノイド類およびカロテノイドなどが新たに食品添加物として注目されている<sup>100)</sup>。

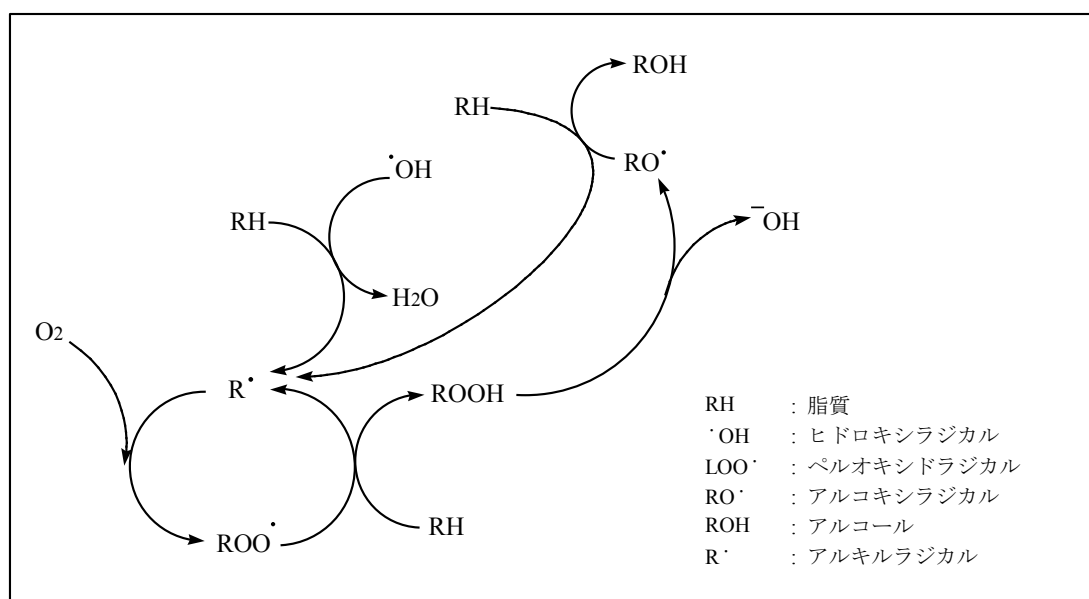


Fig. 4-1 Reaction mechanism of lipid autooxidation

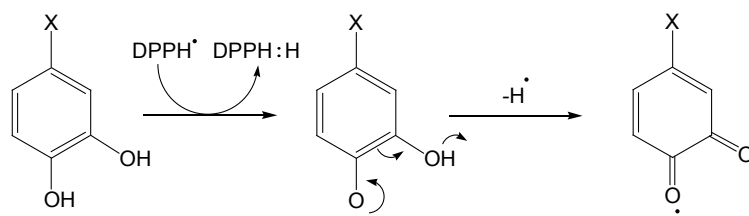
FFI reports, 食品添加物研究誌 (2004)

## (2) ラジカル消去反応と構造活性相関

前述したように、フラボノイドはこれまでに 5000 種以上もの種類が植物中から発見されており、果物、野菜、豆類、香辛料などその存在は多岐にわたる。フラボノイドは代表的な天然由来の抗酸化成分として、人体に対して有害な過酸化反応の防止に効果があることが考えられており、さらに近年では抗炎症、抗アレルギー作用などの生理活性が明らかにされてきた<sup>101)</sup>。ところで、ポリフェノールは分子内にフェノール性水酸基を有することで抗酸化活性を示すが、現在では DPPH (2,2-Diphenyl-picryl-hydrazyl) 法, ORAC

(Oxygen radical absorption capacity) 法, TRAP (Total peroxy radical-trapping parameter) 法,  $\beta$ -カロテン褪色法, ESR 法など様々な抗酸化能に関する測定系が確立されており, 抗酸化活性の指標とされている. その例として Fig. 4-2 に DPPH ラジカルに対するフェノール性水酸基の反応機構について示した. フラボノイドなどの抗酸化物質は分子内にフェノール性水酸基を有し, ヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) や脂質ペルオキシラジカル ( $\text{LOO}\cdot$ ) などの活性酸素やフリーラジカルに対して水素移動反応を起こすことで強力な抗酸化作用を示すといわれている<sup>102)</sup>.

一般的に水酸基の多いフラボノイドは抗酸化活性が高いと言われているが, 例えばタマネギの主フラボノイドであるケルセチンは水酸基を5つ持つフラボノイドであり, 抗酸化活性が非常に高いことがよく知られている. ケルセチンとそのメトキシ体や配糖体についての  $\beta$ -カロテン褪色法により, それらの抗酸化活性を調べたところ, ケルセチンが B 環のカテコール構造や C 環の水酸基を有することで強い活性を示すことが示された<sup>103)</sup>. このように, 現在ではフラボノイドが示す抗酸化活性について, その活性部位や構造活性相関に関心がもたれている.



**Fig. 4-2 Reaction mechanism of flavonoid to scavenge DPPH radical**

Xican Li, Jing Lin et al.: *Chemistry Central Journal* (2012)

### (3) フラボノイドの安全性

これまでにカンキツフラボノイドは抗酸化作用や抗アレルギー, また  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性, さらに抗腫瘍効果を有することを示してきた. このようにフラボノイドの健康効果に関する情報はよく知られてきたが, その反面, 安全性や毒性に関する情報は一般的にはあまり知られていないのが現状である. フラボノイドの豊富な食品は健康に良いという証拠は十分にあるが, その摂取量によっては健康障害を起こす可能性も考えられ得る.

特に近年の健康志向に基づいて, 様々な食品の健康効果がメディアで取り上げられるようになってきているが, その中で健康に良いと過剰に謳われる食品や, また健康食品の使用量そのものが著増していることもあり, 「少量で良いものは大量ではもっと良い」という誤解までも生まれている. さらに, フラボノイド (ポリフェノール) が天然の抗がん剤であ

ると取り上げられ、フラボノイド含有量の多い食品を「毒性のない薬」と誇張した宣伝さえも見られるようになった。しかし、実際には臨床試験ではまだ明確に確認されておらず、その効果、安全性が不明瞭なものも少なくない。普通の食事を通して、比較的多くの野菜や穀類を摂取する日本人は、フラボノイドの摂取量は一般的に多いと言われている。Christine らの報告<sup>104)</sup>によると、日本人の1日の平均フラボノイド摂取量はフラボノール(クエルセチンなど)が68 mg, イソフラボン(ゲニステインなど)が20~240 mg と言われている。これらの摂取量はアメリカやヨーロッパ人と比較してもいずれも高いレベルである。しかしながらこれらの摂取量は健康障害を起こす量とは考えにくく、むしろ健康効果が得られるものと考えられる。その一方で、フラボノイドを配合したサプリメントやダイエット食品の乱用はその摂取量が10~20倍量のグラム規模となることもあり、過剰摂取による健康障害を考慮する必要がある。例えば上述のクエルセチンはタマネギなどに多量に含まれており、日本人の摂取量は平均で21 mg 程度だと言われている<sup>105)</sup>。(このことからフラボノールの摂取量の内クエルセチンが大部分を占めていることが分かる)クエルセチンの生物作用は、*in vitro* 実験において、抗ウイルス、抗炎症、抗細胞増殖、抗菌作用などが報告されているが、その一方でこれらのフラボノイドは変異原性や薬物との相互作用、またイソフラボンに限っては強いエストロゲン作用などが問題にされている<sup>106,107)</sup>。これらはミトコンドリア呼吸の調節を乱して過酸化物の生成を起こし、DNA 傷害や突然変異の誘発に至る。しかしながらこのミトコンドリア酵素の阻害が一方では抗腫瘍作用の機序と考えられており、フラボノイドの抗腫瘍作用は様々ながん由来細胞株においても多数報告されている<sup>108)</sup>。このように、フラボノイドの生理作用については様々な報告があり、またその構造の違いによっても効果が相反することもあり<sup>107)</sup>、フラボノイドの生理作用が健康に良いか悪いかは表裏一体と言える。

#### (4) 細胞毒性の評価

フラボノイドをはじめとする多様な天然由来成分の毒性の評価には、培養細胞に対する障害性が指標としてよく用いられている。本研究では以下の細胞を用いた。

(A) IEC-6細胞(ラット小腸上皮由来細胞株)：IEC-6細胞は大日本製薬株式会社(当時)より入手した。腸上皮は、腸から物質を吸収し、かつそれらを最終的に血流に輸送する機能を有しており、形態学的には極性をもつ細胞の単層から構成される。その中で小腸の腸管モデルとして、いくつかの*in vitro* 細胞培養系が確立されてきた。その細胞系として、Caco-2, HT-29, SW 1116, T84, IEC-18, および IEC-6細胞などが挙げられる。IEC-6細胞はラット新生児の小腸上皮由来の未分化細胞株であり、1979年に Quaroni らによって株化された<sup>109)</sup>。近年の研究により IEC-6は通常培養中にコンフルエントに達すると分化すること、またいくつかの輸送単体(Glucose transporter: GLUT3や GLUT5など)の遺伝子が発現していることが

確認されている<sup>110)</sup>。このような点から、ヒト結腸がん由来細胞株 Caco-2細胞同様に、小腸上皮における消化吸收モデルとして一般的に用いられている。本研究でもレモンフラボノイドやテルペノイドの安全性評価を目的とし、IEC-6細胞を *in vitro* 腸管モデルとして、細胞毒性や腸管吸収の評価に用いた。

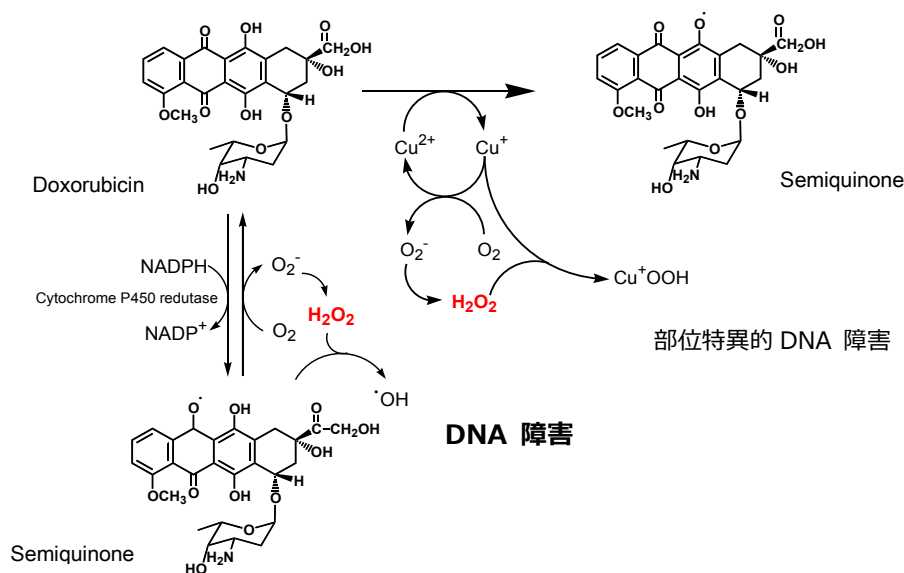
(B) HL-60細胞（ヒト骨髓性白血病細胞株）：HL-60細胞は理化学研究所から入手した。白血病細胞は増殖と分化の調節を失った細胞であり、由来した血液細胞の分化の時期を反映していることから、様々な分化過程を示す細胞株が分離されている。これらの細胞株の中には、細胞外からの刺激や情報伝達物質によって終末分化する細胞がある。その中の一つが、HL-60細胞である。これは急性骨髓性白血病患者から樹立された骨髓性白血病細胞株で、1979年に Gallagher らによって株化された<sup>111)</sup>。この細胞株の特徴として、分化誘導によって顆粒球やマクロファージ、好酸球、好塩基球に分化することが知られている。さらに近年、HL-60細胞に細胞増殖に関連するがん遺伝子が次々に発見され、その分化誘導レセプターも明らかにされている<sup>112)</sup>。これらのことから、近年では増殖抑制や、また分化の分子機構についての研究に多用される細胞である。本研究では、がん細胞モデルとして、レモンフラボノイドの細胞障害性の評価に用いた。

#### (5) 過酸化水素とドキソルビシンの細胞障害とフラボノイドの細胞保護作用

多くの抗がん剤は、がん細胞にアポトーシスを起こすことによってその作用を発現することはこれまでに知られている<sup>113-115)</sup>。これらの抗がん剤の多くは、DNA を標的としてアポトーシス誘導において DNA の損傷が重要な役割を果たしている。その中で、近年抗がん剤によるアポトーシスの誘導過程で、細胞内において過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などの活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) を生成し、これが抗がん剤の作用に関与しているという報告がされている<sup>116)</sup>。それによると過酸化水素は生体内でフェントン反応や  $O_2^{\cdot-}$  との Harber-Weiss 反応などからヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) を産生し、シグナルに作用するより近傍の生体分子の酸化的障害を引き起こす。ROS の生成および DNA 損傷を介したアポトーシス誘導機構は次の2つが考えられる。①抗がん剤自身から生成された ROS による DNA の損傷からアポトーシスに至る場合、②抗がん剤による DNA 損傷を介して二次的に ROS が生成することでアポトーシスに至る場合である。

ドキソルビシン (DOX, 慣用名アドリアマイシン) は、テトラサイクリン系の抗がん性抗生物質で、現在がんの治療に最もよく使われている第一選択薬である。このドキソルビシンはそのアポトーシス誘導機構が明らかにされつつあり、トポイソメラーゼ II 阻害や ROS 生成による DNA 損傷に関与することが示されている<sup>117,118)</sup>。つまり、DOX のアポトーシス誘導機構として、細胞内で DOX 自身から過酸化水素を発生し、DNA が酸化的に損傷され、PAPR と NADPH オキシダーゼの活性化やミトコンドリアの障害を経て、カスパーゼ

が活性化される. また, DOXは酸化型セミキノンラジカルをとることも可能であり, Cu(II)の存在下で ROS を生成し, 結果的に DNA を酸化的に損傷するという2通りの反応機構が明らかになっている (Fig. 4-3).



**Fig. 4-3 Proposed mechanisms of doxorubicin on DNA damage**

水谷秀樹, 薬学雑誌 (2007)

このような過酸化水素による細胞障害に対して, 近年フラボノイドがその細胞障害を軽減するという報告が多数見られるようになった. Kanno らは, フラボノイド配糖体のナリンジンがマウス白血病由来細胞 (P388細胞) に対して過酸化水素で誘導した酸化障害 (アポトーシス) を顕著に抑制することを示した<sup>119)</sup>. 同様にクエルセチンがヒト正常角化細胞 (HaCaT 細胞) に対して過酸化水素で誘導したアポトーシスおよびミトコンドリアの障害を軽減するという報告もみられる<sup>120)</sup>. また, フラボノイドではないが, 白金ナノコロイドがヒト口腔上皮細胞に対して過酸化水素で誘導した炎症反応 (過酸化水素により IL-8生産が増加し炎症反応が慢性化する) を抑制することが示されている<sup>121)</sup>. その他, 関連の研究として, 紫外線照射により誘導した酸化障害に対するルテイン (カロテノイドの一種) の細胞保護効果なども報告されている<sup>122)</sup>.

これら例に示したように, 近年では過酸化水素を用いて細胞内 ROS を発生させる実験系が広く用いられている. 過酸化水素によって引き起こされる細胞障害に対する抗酸化物質の保護効果について研究が進んでおり<sup>123)</sup>, 酸化ストレスの予防という点で食品成分の持つ抗酸化活性が注目されている.

## (6) フラボノイドの吸収と代謝

フラボノイドの多くは配糖体として植物体に存在しており，そのため我々はフラボノイドを配糖体として摂取している．このフラボノイドの3 位，4'位，7 位などにグルコースなどが結合した単糖配糖体は，腸管吸収の過程で小腸上皮細胞に存在する  $\beta$ -グルコシダーゼや乳糖分解酵素（LPH: Lactase phlorizin hydrolase）により加水分解されることが知られている<sup>124)</sup>．しかし，エリオシトリンやヘスペリジンなど，ラムノースとグルコースが二つ結合しているようなルチノース配糖体はそのままでは分解吸収されず，腸内細菌が有する  $\beta$ -グルコシダーゼにより加水分解されてから吸収されることが多い．すなわち，植物性食品中の配糖体の多くはそのままでは吸収されにくく，腸管内で腸内細菌によりアグリコンに変換され細胞内への取り込みが促進される<sup>125)</sup>．この点について，Scalbert らは，無菌ラットにクエルセチン配糖体であるルチン（クエルセチン 3-ルチノシド）を投与しても吸収されずにそのまま排泄されることを報告しており<sup>126)</sup>，腸内細菌がフラボノイドの代謝に関与していることを示している．

近年では，ヒト小腸モデルである Caco-2細胞（ヒト結腸がん由来細胞株）を用いた腸管吸収モデルが確立されており，ポリフェノールの吸収動態に関する解析が進んでいる<sup>127)</sup>．先述したように，大部分のフラボノイド配糖体は腸内細菌の有する  $\beta$ -グルコシダーゼにより加水分解され，アグリコンにされた後に吸収されと考えられるが，小腸粘膜にはフラボノイド配糖体を消化する2種類の  $\beta$ -グルコシダーゼ活性が存在する．すなわち刷子縁に局在する LPH や細胞質に局在するグルコシダーゼ（CBG: Cytosolic  $\beta$ -glucosidase）が存在することが示されており<sup>128,129)</sup>，カテキン類やシアニジン配糖体など，一部の配糖体は小腸に存在するナトリウム依存性グルコーストランスポーター（SGLT1: Sodium-dependent glucose transporter）により輸送され，この CBG により細胞内でアグリコンに変換されることが Caco-2 細胞を用いた腸管モデルによって明らかにされている<sup>130)</sup>(Fig. 4-4)．

生体内で加水分解を受けアグリコンとなったフラボノイドは，その多くが生体内で抱合体として存在していると考えられる．下井らはラットを用いてルテオリン7-グルコシドの吸収動態について検討したところ，アグリコンとそのグルクロン酸抱合体が検出されたことを示しており<sup>131)</sup>，腸管吸収において糖の加水分解とアグリコンの抱合化が起こっていることを示唆している．さらに，Caco-2細胞を用いたクエルセチンおよびその配糖体の吸収実験においては，グルクロン酸抱合が起こっていることが確認されており，グルクロン酸転移酵素（UGT: UDP-Glucuronosyltransferase）の存在が示唆されている<sup>132)</sup>．したがってヒトの腸管においても同様に糖の加水分解やアグリコンに対する抱合反応が起こっていることが予想される．

このように，フラボノイドの代謝は一般的な薬物代謝反応を受け，フェノール性水酸基へのグルクロン酸や硫酸，またメチル基抱合を受ける．さらに，腸管細胞や肝臓で抱合化されたフラボノイドは，門脈やリンパ液中に移行していることが明らかにされている<sup>133)</sup>．



しかしながら、これらの吸収メカニズムはフラボノイドの構造によっても異なり、また肝臓内でチトクローム P-450などの酵素による水酸化反応や<sup>134)</sup>、腸内細菌によってフラボン骨格の加水分解を受け、開裂が起こるなど分解産物の存在も指摘されており<sup>135)</sup>、非常に複雑である。

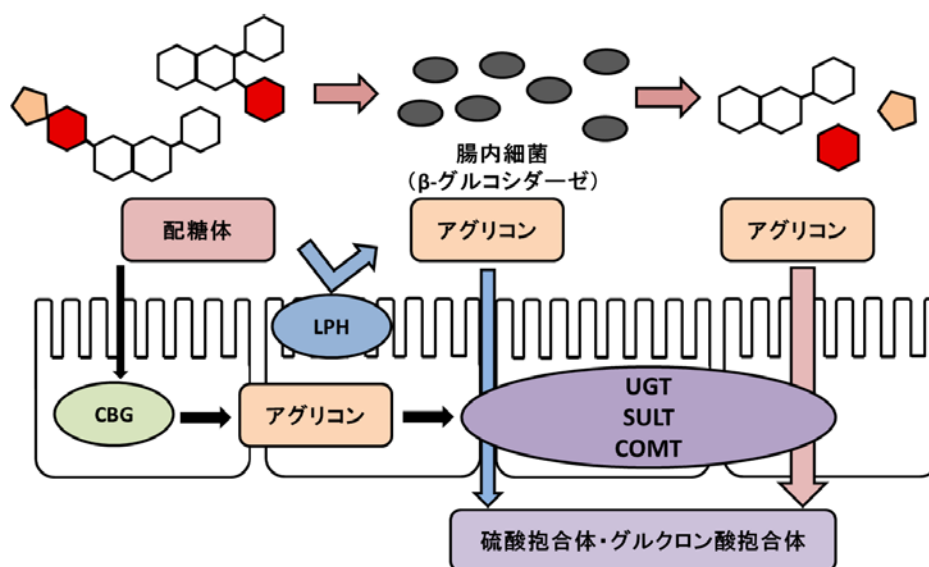


Fig. 4-4 小腸におけるフラボノイドの吸収および代謝メカニズム

MRP2: 多剤耐性ポンプ2, LPH: ラクターゼフロリジンハイドロラーゼ

SGLT-1: ナトリウム依存性グルコーストランスポーター, SULT: 硫酸抱合酵素

UGT: UDP-グルクロン酸抱合酵素

## 4-2 本章における研究の目的

3章ではレモンの主たるフラボノイドであるエリオシトリンやエリオジクチオール7-*O*-グルコシド、またアグリコンのエリオジクチオールを単離精製した（以下これらをレモンフラボノイドと示す）。これらの食品機能成分としての有用性を検討する過程において、その基本的な抗酸化活性やその安全性を確認することは非常に重要である。エリオシトリンが強い抗酸化力を示すことはこれまでも報告されている。三宅ら<sup>65)</sup>によると DPPH ラジカル阻害活性試験の結果において、エリオシトリンの抗酸化活性はおよそ2.3 mol ( $\alpha$ -トコフェロール等量) 程度と、同じポリフェノール類のシナピン酸と同等の強い活性を有することを示している。しかしながら、エリオジクチオール7-*O*-グルコシドなど酵素変換体についての抗酸化活性については報告がなく、レモンフラボノイドの総合的な抗酸化活性の比較評価はできない。そこで本章では、はじめにレモンフラボノイドの抗酸化活性について総合的な評価を行うため、DPPH ラジカル阻害活性試験や ABTS ラジカル消去試験、および  $\beta$ -カロテン褪色法を用いてそれぞれの抗酸化力を測定した。そこで、これらのレモンフラボノイドに加え、構造の類似したカンキツフラボノイド（ナリンジン、ナリルチン、ヘスペリジンとそれらアグリコン）を比較対照としてそれぞれの抗酸化活性を測定し、その構造活性相関を検討した。また、エリオシトリン、エリオジクチオール7-*O*-グルコシド、さらにエリオジクチオールと、A 環7位の側鎖に着目し、結合糖が抗酸化活性に与える影響についても検討した。

天然由来の成分についてその安全性を評価する際に、動物細胞に対する毒性の検討や Caco-2細胞や IEC-6細胞などの腸管モデルを用いた吸収動態の解析、さらにはラットなどの実験動物を用いた代謝吸収評価などが一般的に行われている<sup>136-138)</sup>。本章では IEC-6細胞を腸管モデルとして使用し、レモンフラボノイドや上記した類似のカンキツフラボノイドなどについて、その細胞毒性を評価し抗酸化活性との関連性について考察した。さらに、*in vivo* 実験として、Wistar 系ラットを用いてレモンフラボノイド経口投与後の血中移行量および臓器への残存量を分析した。加えて、尿中や糞中への移行量についても検討し、総合的にレモンフラボノイドの吸収動態を評価することで、その安全性について検討した。

過酸化水素、また DOX（ドキソルビシン：抗がん剤）はこれまでに示した様に、培養細胞を用いた *in vitro* 実験によってアポトーシスを誘導することが知られている。したがって、これらを用いて細胞に酸化障害を与える系に対して目的の評価物質を作用させることで、評価物質の抗酸化力を細胞保護効果として示すことができる。そこで本章では IEC-6 細胞を正常腸管モデルとして用い、過酸化水素やドキソルビシンによって誘導される酸化障害に対するレモンフラボノイドの保護作用について評価した。そしてレモンフラボノイドの抗酸化物質としての有用性について検討した。

## 4-3 実験方法

### 4-3-1 試薬および機器

**標準試薬：**エリオシトリンはレモンより単離精製した（純度>99%）。エリオジクチオールおよびエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドは3章で精製したものおよびレモンピール水から精製されたものを使用した。比較物質として用いたナリンジン，ナリルチン，ナリングニン，ヘスペリジン，ネオヘスペリジンおよびリモニンは2章に記述したものを使用した。またトロロックス，ブチルヒドロキシアニソール（BHA），エトポシド，クエルセチン，ケンフェロール，ナリングニン，ヘスペレチン，クロロゲン酸，(+)カテキンおよび(-)エピカテキンはそれぞれシグマアルドリッチから購入した。また，エピガロカテキンガレート（EGCG），ナリルチン，アピゲニン，ルテオリンはフナコシから購入した。その他，カフェ酸および *d*-リモネンはナカライテスクから購入した。なお，本章での活性評価に用いたこれらの標準物質の化学構造式は Fig. 4-5 に示した。

**測定用試薬：**DPPH，ABTS， $\beta$ -カロテンおよびリノール酸はシグマアルドリッチより購入した。またツイーン 40 はナカライテスク，WST-1 は和光純薬から，西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（POD）はそれぞれ Boehringer Mannheim GmbH 社から購入した。

**緩衝液：**それぞれの緩衝液は以下の様に適宜調製して使用した。

20 mM HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid)溶液：0.48 g の HEPES（ナカライテスク）を滅菌水に溶解し 100 ml とし冷蔵保存した。

20 mM PMS (1-Methoxy-5-methyl phenazinium methyl sulfate)溶液：6.7 mg の PMS（和光純薬）を 1 ml の 20 mM HEPES に溶解したものを適宜調整し使用した。

0.1 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.4):0.1 M トリスアミノメタン(ナカライテスク)0.605 g を 50 ml の蒸留水に溶解し，これに 0.1 M 塩酸を 41.4 ml 加え，さらに蒸留水で全量を 100 ml にメスアップした。

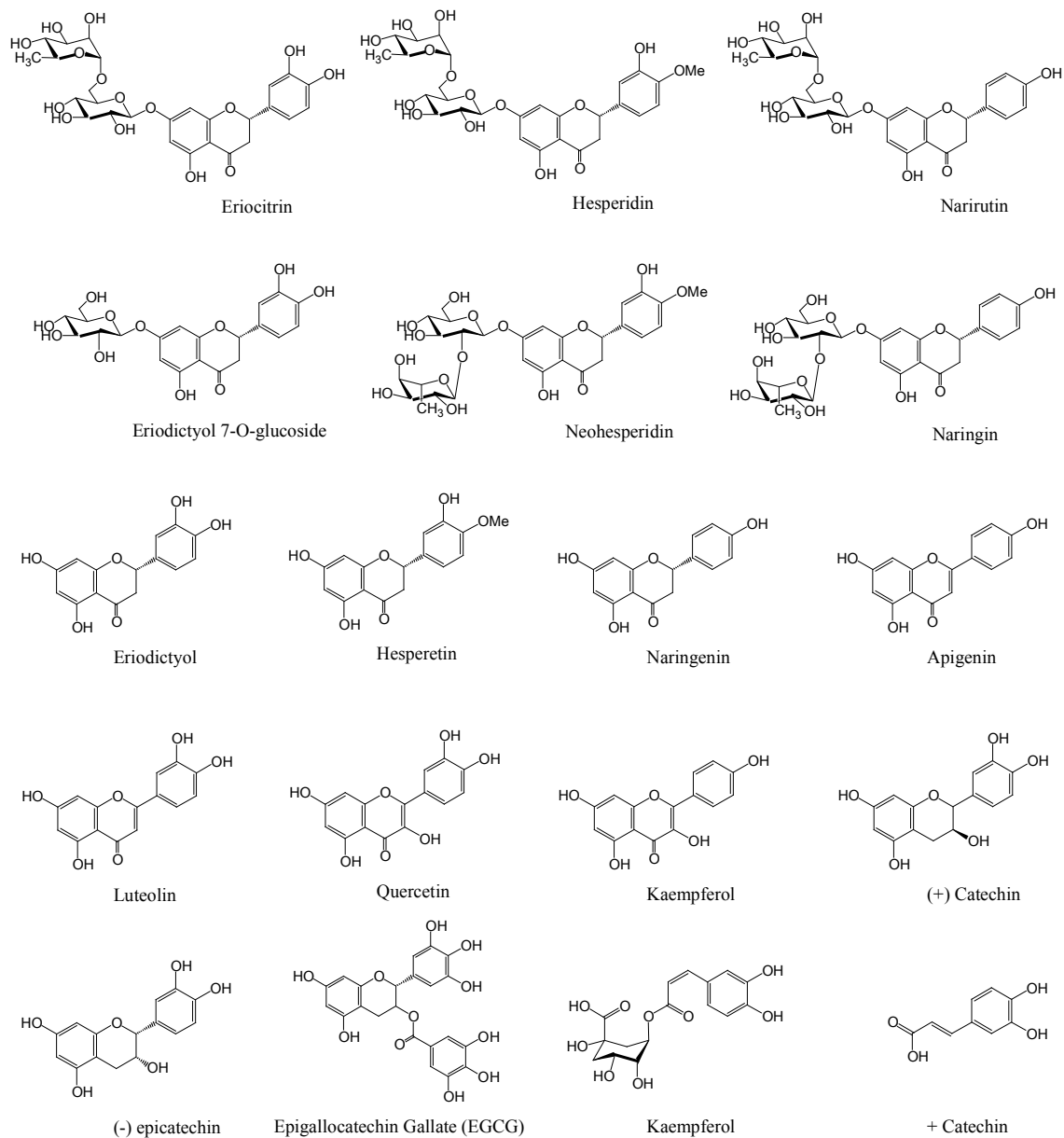
0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.0)：リン酸二水素ナトリウム 2 水和物とリン酸水素二ナトリウム 12 水和物（ナカライテスク）を 0.2 M になるように調製し，それぞれを 87.7 ml，12.3 ml ずつ混合し蒸留水で 200 ml にメスアップした。

0.1 M リン酸緩衝液(pH 2.1)：リン酸二水素ナトリウム 2 水和物 7.8 g とリン酸 3.4 ml を超純水で溶解し 1000 ml になるように調整し，脱気したものを HPLC 溶液として使用した。

**その他：**過酸化水素（30%）は関東化学から購入したものを，また DMSO (Dimethyl sulfoxide) は米山薬品工業の物を使用した。

**機器：**HPLC は2章および3章に記述した島津製のシステムを使用した。また，分光光度計は日本分光製（V-530）および島津製（UV-1600）の機器を使用した。その他，マイクロプレートリーダーは BIO-RAD 製(model-550)および Thermo Fisher Scientific 製(varioskan flash)の機器をそれぞれ使用した。

## ポリフェノール類



## その他

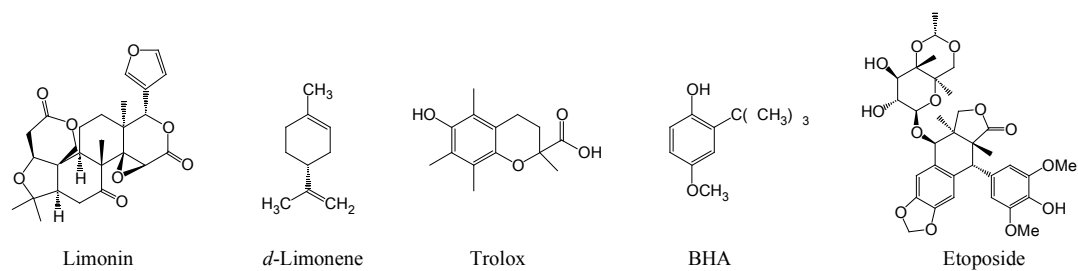


Fig. 4-5 試験に供した物質とその化学構造

#### 4-3-2 DPPH ラジカル消去活性試験

DPPH ラジカル消去活性は Clark らの方法<sup>139)</sup>に準じて行った。DPPH 溶液は1.3 mg/10 ml となるようにエタノールに溶解した。測定用のサンプルはメタノールに溶解し、0.5 mM および0.2 mM に調整した。96穴マイクロプレートに DPPH 溶液100  $\mu$ l, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 90  $\mu$ l, 測定サンプル10  $\mu$ l を入れ、常温で30分および60分反応させ、プレートリーダーで517 nm の吸光度を測定した。なお、ブランクには試料の代わりにメタノールを用いた。また試料自体の吸収を考慮し、DPPH 試薬の代わりにエタノール100  $\mu$ l を加えた際の吸光度を実際の測定値から差し引いた。なお同様の手順でトロロックスをメタノールで溶解し、0.125 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM に調整したものを基準物質として測定し消去率を求めた後、検量線を作成した。測定した各物質の抗酸化活性は検量線を用いてトロロックス当量で示した。

それぞれのラジカル消去率は以下の計算式により求めた。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{(\text{吸光度}_{\text{コントロール}} - \text{吸光度}_{100\% \text{反応}}) - (\text{吸光度}_{\text{サンプル}} - \text{吸光度}_{100\% \text{反応}})}{(\text{吸光度}_{\text{コントロール}} - \text{吸光度}_{100\% \text{反応}})} \times 100$$

※ コントロール：メタノール 10  $\mu$ l, 100%反応：10 mM トロロックス 10  $\mu$ l

#### 4-3-3 $\beta$ -カロテン褪色抑制活性試験

$\beta$ -カロテン褪色法は津志田らの方法<sup>140)</sup>に準じて行った。この方法はリノール酸の自動酸化に伴い生じるリノール酸過酸化物が、 $\beta$ -カロテンの二重結合と反応することによって、 $\beta$ -カロテンの色が消失することを利用したものである。

反応試薬は以下のように調整した。リノール酸溶液は1 g のリノール酸をクロロホルムに溶解して 10 ml とした。10 mg の  $\beta$ -カロテンをクロロホルムに溶解して 10 ml とし  $\beta$ -カロテン溶液とした。また、2 g のツイーン 40 をクロロホルムに溶解して 10 ml としツイーン 40 溶液とした。これら調整したそれぞれの溶液について、100 ml の三角フラスコにリノール酸溶液を 0.1 ml,  $\beta$ -カロテン溶液 0.25 ml, ツイーン 40 溶液 0.5 ml をとり、窒素ガスでクロロホルムを完全に飛ばした後、45 ml の蒸留水を加えて溶解した。さらにこの溶液に 5 ml の 0.2 M リン酸緩衝液を加えリノール酸- $\beta$ -カロテンエマルジョン液を作成した。

試験管にコントロールとしてのメタノールと各濃度の BHA 標準液、および試料液をそれぞれ 100  $\mu$ l 添加した。次いで、4.9 ml のリノール酸- $\beta$ -カロテン溶液を微量分注ピペットで勢い良く加えた。この試験管を 50°C で湯せんし、以後 10 分毎に 470 nm における吸光度の減少を測定した。抗酸化活性を以下のように計算し、BHA と比較した。なお、BHA 標準溶

液は 80% のメタノール溶液に BHA を 1 mg, 3 mg, 5 mg それぞれ溶かして 100 ml とした.  
(BHA : ブチルヒドロキシアニソール) また, 測定サンプルは 80% メタノールに溶解し,  
それぞれ 100  $\mu$ M 溶液とした. 各フラボノイドの抗酸化能は次の 3 項目について評価した.

### (1) $\beta$ -カロテンの褪色

$\beta$ -カロテンのエマルジョンは, 50°C の水溶液中で酸化反応が進むと生成したリノール酸の酸化物が $\beta$ -カロテンを酸化して (自動酸化) 褪色する. この現象を用い, 酸化反応を 470 nm における吸光度の減少を測定し, 以下の式から各溶液の褪色速度を求めた.

$$\text{褪色速度} = (\ln(A_0/A_{50})) / 50$$

$A_0$  は 0 分の吸光度,  $A_{50}$  は 50 分後の吸光度

### (2) 酸化速度比

$\beta$ -カロテンの褪色速度は酸化に伴い増加するため, 抗酸化作用を有する物質をエマルジョンに添加するとその褪色は抑制される. 抗酸化作用が強いものほど褪色速度は小さくなり, 各試験溶液の酸化速度を比較することが可能である. そこで, 次の式を用いてコントロールに対する各試験溶液の酸化速度比を求めた.

$$\text{酸化速度比} = R_{\text{sample}}/R_{\text{control}}$$

$R_{\text{sample}}$  : サンプルの褪色速度,  $R_{\text{control}}$  : コントロールの褪色速度

### (3) 抗酸化活性

各フラボノイドの抗酸化活性は 60 分におけるコントロールの酸化速度に対する抑制率を指標として以下の式から求めた.

$$\text{抗酸化活性} = [(As_{(60)} - Ac_{(60)}) / (Ac_{(0)} - Ac_{(60)})] \times 100$$

$As_{(60)}$  : 60 分後における試料溶液の吸光度

$Ac_{(0)}$ ,  $Ac_{(60)}$  : 開始時または 60 分後におけるコントロールの吸光度

## 4-3-4 ABTS ラジカル消去活性試験

ABTS ラジカル消去活性試験は, 過酸化水素の定量法を応用して行った<sup>141-143)</sup>. つまり, ABTS を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に 5 mg/10 ml となるように溶解し, さらに 50  $\mu$ l の過酸化水素 (30% 過酸化水素, 関東化学) を加えた. さらに 0.5 mg/ml となるように溶解した POD (西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ) を 10  $\mu$ l 加え ABTS ラジカル溶液を調製した. 試

験は、96 穴マイクロプレートに緩衝液 140  $\mu$ l とラジカル溶液を 50  $\mu$ l, さらに試験物質 (0.5 mM) を 10  $\mu$ l 加え常温で遮光条件下にて 5 分間反応させた後, 734 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した. 消去率は以下の計算式より算出した.

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{(\text{吸光度}_{\text{コントロール}} - \text{吸光度}_{100\% \text{反応}}) - (\text{吸光度}_{\text{サンプル}} - \text{吸光度}_{100\% \text{反応}})}{(\text{吸光度}_{\text{コントロール}} - \text{吸光度}_{100\% \text{反応}})} \times 100$$

※ コントロール: メタノール 10  $\mu$ l, 100%反応: 10 mM トロロックス 10  $\mu$ l

#### 4-3-5 WST-1 法を用いた細胞障害性の評価

細胞毒性の評価は WST-1 法により行った. WST-1 は 1-Methoxy PMS を電子キャリアーとして用いることで, 生細胞内のミトコンドリアの持つ脱水素酵素により還元され橙色のフォルマザンを生じる. 細胞内脱水素酵素活性に応じて産生される NADH や NADPH は, 1-Methoxy PMS を介して WST-1 をフォルマザンに還元する (Fig. 4-6). このフォルマザンの色素量は生細胞数に比例することから, この吸光 (415 nm) を測定することで細胞の生存を評価することが出来る.

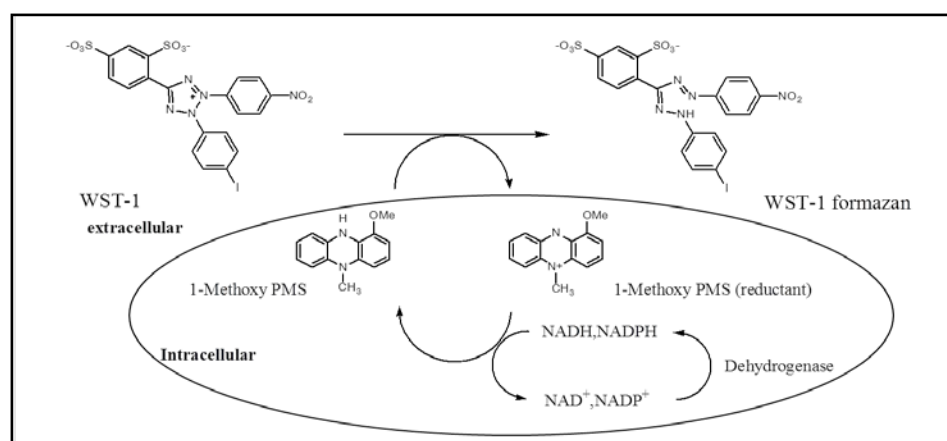


Fig. 4-6 WST-1 法発色メカニズム

#### (1)細胞培養

IEC-6 は 10% FBS を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に懸濁し必要数を 90 mm または 60 mm のプラスチックディッシュに播種し, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の条件で培養した. 細胞の増殖曲線は培養 1 日, 2 日, 3 日, 4 日後にそれぞれ 0.25% トリプシン, 0.02% EDTA を含む生理的リン酸緩衝液 (PBS) により細胞を浮遊させ, Thoma のヘマトメーターにより細胞数を計測して求めた.

## (2)WST-1 法による細胞障害性試験

96 ウェルマイクロプレートに 4,000 cells/well (培地 200  $\mu$ l) となるように細胞を播種し、24 時間前培養を行った。その後、終濃度が 400  $\mu$ l $\sim$ 3.12  $\mu$ l となるよう調整したサンプルを 10  $\mu$ l 投与し、さらに 24 時間培養した。培養終了後、培地を抜き取り、さらに PBS(-)で 1 回洗浄した後、新たに 200  $\mu$ l の培地を入れ、培地の交換を行った。WST-1 試薬を 20  $\mu$ l 投与しさらに 2 時間培養した。2 時間後、吸光プレートリーダーで 415 nm の吸光度を測定した。サンプル溶解に用いた DMSO の終濃度は 0.5% $\sim$ 1.0% の範囲で物質の溶解度に合わせて調節した。

### 4-3-6 過酸化水素とドキソルビシンによる細胞障害に対するフラボノイドの細胞保護作用

#### (1)過酸化水素による酸化障害に対するレモンフラボノイドの保護効果の評価

96 ウェルマイクロプレートに細胞を 6,000 cells/well となるよう播種し 24 時間培養した。次いで終濃度 50  $\mu$ M となるように PBS(-)に溶解したエリオシトリン、エリオジクチオール 7-O-グルコシドおよびエリオジクチオールを 10  $\mu$ l 投与し、6 時間インキュベートした。その後培地を抜き取り、PBS(-)で洗浄後、新しい培地を添加し、さらに過酸化水素を終濃度 250  $\mu$ M となるよう添加して 20 時間培養した。培養終了後、WST-1 試薬を添加し、2 時間後に 415 nm の吸光度を測定した。過酸化水素を添加しない代わりに PBS(-)を同量添加し、Control 群とした。なお、フラボノイドの溶解に用いた DMSO は終濃度 0.1% になるように調整した。

#### (2)ドキソルビシンに対するレモンフラボノイドの細胞保護効果の評価

96 ウェルマイクロプレートに細胞を 6,000 cells/well となるよう播種し 24 時間培養した。次いで終濃度 50  $\mu$ M となるように PBS(-)に溶解したエリオシトリン、エリオジクチオール 7-O-グルコシドおよびエリオジクチオールを 10  $\mu$ l 投与し、6 時間インキュベートした。その後培地を抜き取り、PBS(-)で洗浄後、新しい培地を添加し、さらにドキソルビシンを終濃度 0.8  $\mu$ M となるよう添加して 20 時間培養した。培養終了後、WST-1 試薬を添加し、2 時間後に 415 nm の吸光度を測定した。過酸化水素を添加しない代わりに PBS(-)を同量添加し、Control 群とした。なお、フラボノイドの溶解に用いた DMSO は終濃度 0.5% になるように調整した。



#### 4-3-7 細胞内吸収量の測定とラットにおける吸収代謝評価

##### (1)レモンフラボノイドの細胞内吸収量の測定

細胞内への取り込み量は 60 mm ディッシュで細胞をコンフルエントまで培養した後、サンプルを終濃度が 100  $\mu$ M となるよう添加して 6 時間培養した。6 時間の培養後、15 ml チューブに培地を移し、さらに細胞をスクレイパーで回収し 2,000 $\times$ g で遠心した。上清を取り除き、新たに 1 ml のメタノールを加え超音波で細胞を破砕した。その遠心上清を回収し 6,500 $\times$ g で遠心した上清を細胞抽出サンプルとし HPLC で分析した。

##### (2)レモンフラボノイドの DMEM 培地に対する安定性

細胞内取り込み量の評価と同様に、6 mm ディッシュに 4 ml の培地を入れ 24 時間インキュベートした。(10% FBS および FBS フリーの 2 種類を用意。) 24 時間のプレインキュベート後、それぞれのフラボノイドを終濃度 100  $\mu$ M となるよう調整したものを 40  $\mu$ l 添加した。添加後、0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 (12), 24 時間後の培地をそれぞれ HPLC で分析し、各フラボノイドの残存量を分析した。それぞれの培地を微量チューブに入れ密閉状態でも同様にインキュベートしたものを分析した。残存量の評価はそれぞれ HPLC におけるピークの高さで評価した。

(フラボノイド添加後、0 時間を最大量としてそれぞれの残存量を示した。)

HPLC の分析条件は以下に示す通り 2 章および 3 章に準ずる。

カラム：Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR II (ナカライテスク)

溶媒：アセトニトリル：0.5%酢酸 = 25：75

流速：0.7 ml/min, カラム温度：35°C

検出波長：285 nm, サンプル注入量：5.0  $\mu$ l

##### (3)ラットにおける吸収代謝評価

ラットは Wistar 系雄ラットを使用した (週齢 5~12)。16 時間の絶食後、エリオシトリン (50 mg/kg B.W)，エリオジクチオール (25 mg/kg B.W) を経口投与し 30, 60, 120, 240 分後にエーテル麻酔下で尾静脈血を採血した。2,000 rpm (20 分, 4°C) で遠心し血漿を回収し 9 倍量のメタリン酸で処理したものを再度遠心 (10,800 rpm) した上清をサンプルとし HPLC で分析した。また、同様にエリオシトリンを経口投与 (50 mg/kg B.W) し、30 分後に屠殺し腎臓と肝臓を摘出した。摘出した臓器は生理食塩水で洗い、1 g を量り取り 9 倍量のメタリン酸を加え、ガラス-テフロンホモジナイザー攪拌機 (Asahi Techno glass, Chiba, Japan) を用いて 800 rpm でホモジナイズした。そのホモジナイズ液を 6,500 $\times$ g で 10 分遠心し、その上清を HPLC に供した。

尿中または糞便中の残存量の測定には、代謝ケージを使用した。つまり、エリオシトリン (50 mg/kg B.W) を経口投与し、代謝ケージにて 2, 4, 6, 12, 24 時間後の尿および 24 時間後の糞を回収した。この際、水および餌は自由摂取させた。回収した尿は、9 倍量のメタリン酸で処理し、遠心した後その上清を分析した。また、糞は凍結乾燥処理し乾燥重量を量った後、乾燥重量に対して 9 倍量のメタリン酸で抽出し、遠心後その上清を分析した。

また、抱合体などの分析は、血清サンプルをグルクロニダーゼで処理することで、HPLC 分析におけるピークの変化を評価した。なおラットを用いた吸収代謝評価における HPLC の分析条件は以下の通りである。分離には 2 液からなるグラジエント法を用いた。

#### HPLC 分析条件

カラム：Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR II (ナカライテスク)

溶媒：アセトニトリル：0.1 M リン酸緩衝液 (pH 2.1) = 15 : 80 (0-15 min), 40 : 60 (15-40 min)

流速：0.7 ml/min, カラム温度：35°C

検出波長：285 nm, サンプル注入量：10 µl

なお動物実験は、県立広島大学倫理委員会の承認を受け、動物実験倫理規定に基づいて実施した。

#### 4-3-8 統計処理

データは平均値±標準偏差 (SD) で表した。データの統計処理はスチューデントの t 検定および、ダネット試験を用い、有意差水準 1%未満 ( $p<0.01$ ) および、5%未満 ( $p<0.05$ ) を統計学的に有意差ありとした。

## 4-4 結果

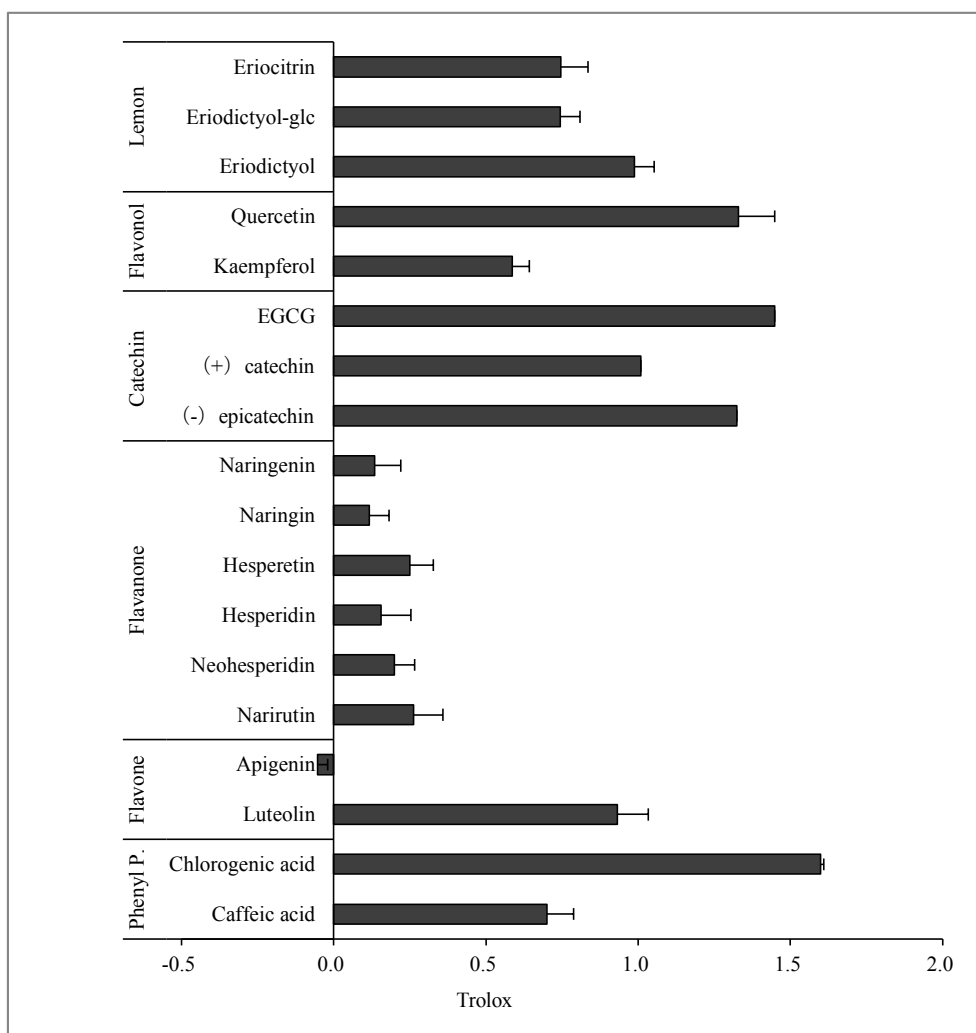
### 4-4-1 DPPH ラジカル消去活性試験

レモンフラボノイドと構造類似のフラボノイド 18 種類について DPPH ラジカル消去活性を DPPH ラジカル消去率 (%) として求め評価した。その結果、レモンフラボノイドはいずれも強い抗酸化力を有することが確認された (Fig. 4-7)。このうちエリオシトリンやエリオジクチオールについては、三宅らによって報告されているが<sup>56)</sup>、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドについても同様に強い抗酸化力を持つことが新たに示された。それぞれの活性の強さは、終濃度 25  $\mu\text{M}$  で比べると、エリオジクチオール ( $58.67 \pm 3.88\%$ ) > エリオシトリン ( $44.28 \pm 5.35\%$ ) = エリオジクチオール 7-*O*-グルコシド ( $44.17 \pm 3.90\%$ ) となり、アグリコンのエリオジクチオールで 10% ほど活性は強かったが、A 環 C7 位に結合する糖の有無による活性の低下はさほど大きくはなかった。また、エリオシトリンとエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドとを比較すると、A 環 C7 位に結合するルチノシドとグルコシドとの間において活性の違いはみられなかった。

次に水酸基に着目すると、エリオジクチオールやエリオシトリンに対して B 環 C3' 位に水酸基を持たないナリンジン ( $6.92 \pm 3.91\%$ ) や、そのアグリコンのナリンゲニン ( $7.96 \pm 5.12\%$ )、また 4' 位にメトキシ基を有するヘスペリジン ( $9.30 \pm 5.81\%$ )、そしてそのアグリコンのヘスペレチン ( $14.87 \pm 4.62\%$ ) などの活性は非常に弱かった。この中で比較しても、わずかに配糖体よりもアグリコンの活性が強く見られたが、大きな差はなかった。また、ヘスペリジンとナリンジンを比較してみると、B 環にメチル基を有することで、わずかに活性の増加が見られた。

また、C 環 C3 位に水酸基を有するフラボノール類に分類されるクエルセチンやケンフェロールにおいては、B 環にカテコールを有するクエルセチン ( $78.90 \pm 7.17\%$ ) はカテコールを有さないケンフェロール ( $34.81 \pm 3.34\%$ ) と比べて 2 倍近く高い活性を示した。同じように、またフラボン類に分類されるアピゲニンとルテオリンとを比較すると、B 環にカテコールを有するルテオリン ( $55.28 \pm 6.04\%$ ) はカテコールを有さないアピゲニン ( $-0.05 \pm 0.93\%$ ) と比較して顕著にその活性が高かった。なお、アピゲニンは抗酸化活性を全く示さなかった。これについて、フラボンのアピゲニンとルテオリンに対して、フラバノンのナリンゲニンとエリオジクチオール (水酸基を有する位置や数は同じ) の抗酸化活性はわずかに高く、フラボン > フラバノンの関係が見られた。

さらにフェニルプロパノイドのクロロゲン酸 ( $94.97 \pm 0.58\%$ ) やカフェ酸 ( $41.60 \pm 5.25\%$ ) は、それぞれベンゼン環に水酸基を 2 つ持っており、同じようにカテコール構造を持つ化合物であり、いずれのフラボノイドについてもその活性は高かった。カテコール構造を持つフラボノイド全般は抗酸化活性が高いことが示された。構造活性相関に関する詳細な考察は小括でまとめることとする。



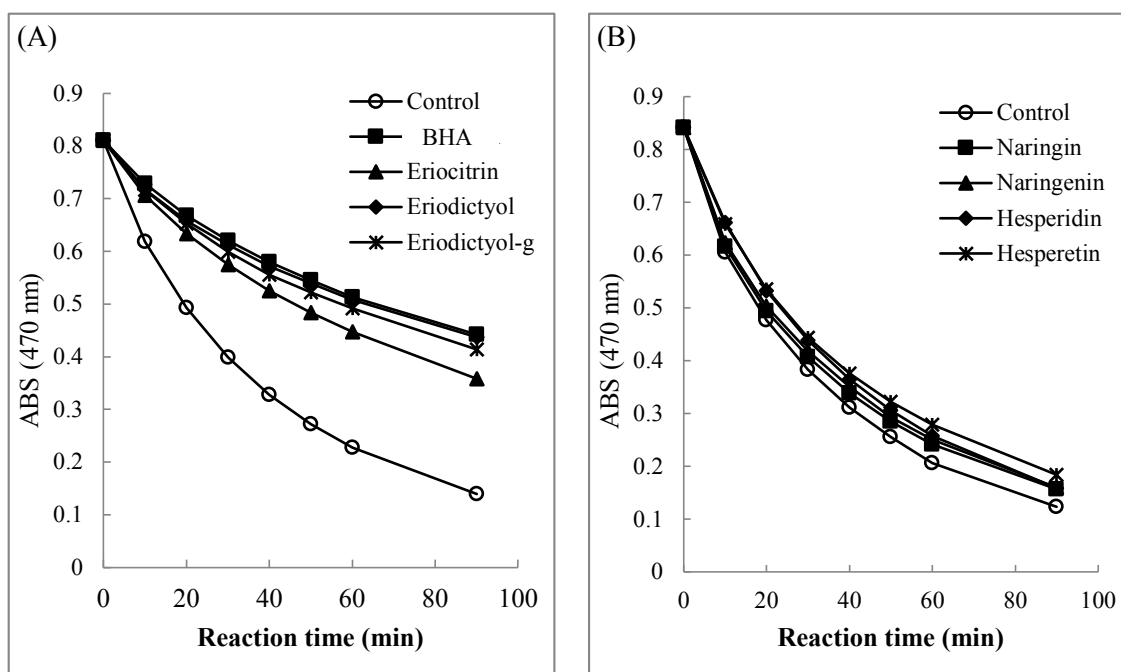
**Fig. 4-7 DPPH radical scavenging activities of flavonoids**

The reaction mixture containing 100  $\mu$ l of DPPH solution (0.13 mg/ml), 90  $\mu$ l of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4), and 10  $\mu$ l of 0.5 mM sample (Catechin group is 0.25 mM) was mixed and stood for 30 min. Each result is expressed as the trolox equivalent. All data are presented as the mean  $\pm$ SD (n=3). EGCG: Epigallocatechin gallate, Phenyl P.: Phenylpropanoid.

#### 4-4-2 $\beta$ -カロテン褪色抑制活性試験

レモンフラボノイド3種と類似のカンキツフラボノイド4種について、各試験溶液 (100  $\mu$ M) の $\beta$ -カロテンを用いて $\beta$ -カロテンの吸光度の変化をモニターした (Fig. 4-8) . コントロールにおける $\beta$ -カロテンの褪色による吸光度減少に対して、本試験で用いたフラボノイドのうちレモンフラボノイド3種には $\beta$ -カロテンの褪色を有意に抑える作用が確認された ( $p<0.01$ ) (A) . この効果は食品添加物として使用されているBHA 1 mg/ml (5.5 mM) に相当した.

しかしながら、同じカンキツのフラボノイド配糖体であるナリンジンやナリンゲニンおよび、ヘスペレチンやヘスペリジンはアグリコンと配糖体の差に関係なくその効果は著しく弱く、脂質の自動酸化に対する抑制効果は見られなかった (B)。



**Fig. 4-8 Inhibition of  $\beta$ -caroten decoloration by flavonoids**

One hundred  $\mu$ l of each sample (100  $\mu$ M) was put into a test tube and 4.9 ml of linoleic acid- $\beta$ -carotene solution was added. This mixture was incubated at 50°C and measured at 470 nm. (A) eriocitrin, eriodictyol eriodictyol glucoside, and control of BHA. (B) naringin, naringenin and hesperidin and hesperetin.

次に、60分後の $\beta$ -カロテンの吸光度変化を用いてそれぞれの褪色速度 (R) を求め、それぞれのコントロールに対する酸化速度比を求めた (Table 4-1). 酸化速度比 (Oxidation rate ratio: ORR) はその数値が低いほどコントロールにおける酸化速度を抑制したことを意味する。本試験で用いたフラボノイドのうち、レモンフラボノイド3種は $\beta$ -カロテンの酸化速度を有意に抑制した ( $p < 0.01$ )。しかしながら、ナリンジンやナリンゲニンおよび、ヘスペレチンやヘスペリジンには抑制作用は見られなかった。それぞれの酸化速度比は、B環にカテコール構造を持つレモンフラボノイド3種では0.281から0.391であるのに対して、水酸基が1つのナリンジンやナリンゲニンで0.859から0.888、水酸基とメトキシ基を持つヘスペリジンやヘスペレチンで0.782~0.835とわずかにその抑制作用は弱かった。これにより、水酸基にメチル基が付加することはその活性を大きく低下させることが示唆された。一方で、7位の糖の有無は大きな影響を及ぼさなかった。

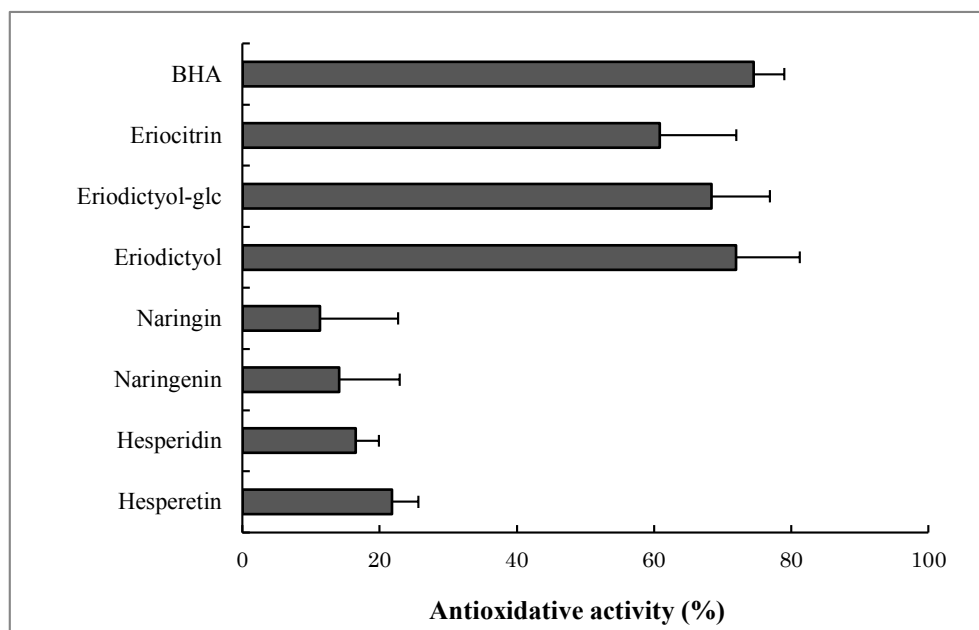
**Table 4-1 Parameters of antioxidative activities of lemon flavonoids measured by  $\beta$ -caroten decoloration method**

	Rapidly			Oxidation rate ratio		
	R $\pm$ S.D.( $\times 100$ )			ORR $\pm$ S.D.		
Control	2.276	$\pm$	0.867			
BHA	0.580	$\pm$	0.209	0.254	$\pm$	0.045
Eriocitrin	0.830	$\pm$	0.190	0.391	$\pm$	0.111
Eriodictyol-glucoside	0.669	$\pm$	0.147	0.316	$\pm$	0.086
Eriodictyol	0.596	$\pm$	0.141	0.281	$\pm$	0.093
Naringin	2.093	$\pm$	0.232	0.888	$\pm$	0.114
Naringenin	2.025	$\pm$	0.172	0.859	$\pm$	0.088
Hesperidin	1.970	$\pm$	0.056	0.835	$\pm$	0.035
Hesperetin	1.844	$\pm$	0.070	0.782	$\pm$	0.038

また、Table 4-1で求めた褪色速度から、コントロールに対する $\beta$ -カロテンの褪色抑制率(%)を求め抗酸化活性とした。フラボノイドの抗酸化活性はFig. 4-9に示した。この測定において、レモンフラボノイド(100  $\mu$ M)はいずれにおいても60%以上の強い抗酸化活性を示し、それは抗酸化物質のBHA 1 mg/ml (5.5 mM) (74.52 $\pm$ 4.50)と同程度の活性であった。そしてその関係はエリオジクチオール(71.93 $\pm$ 9.30%) > エリオジクチオール7-O-グルコシド(68.35 $\pm$ 8.55%) > エリオシトリン(60.85 $\pm$ 11.12%)となったが、7位の糖による抗酸化力の変化はエリオジクチオールとエリオシトリンとの間でも10%程度と有意な差ではなくほぼ同等であった( $p < 0.01$ )。

しかしながら、これらに対してナリンジン(11.32 $\pm$ 11.40%)、ナリンゲニン(14.10 $\pm$ 8.84%)、ヘスペリジン(16.48 $\pm$ 3.45%)、ヘスペレチン(21.83 $\pm$ 3.80%)はいずれも配糖体とアグリコンに差はなく、その抗酸化活性はヘスペレチンを除き20%以下と非常に弱かった。これらのことから、DPPHラジカルに対する消去活性と同様に、脂質の自動酸化抑制にはB環の水酸基、とりわけカテコール構造が大きく関与していることと、A環の糖の付加における活性の影響は弱く、A環の水酸基は活性にはほとんど関与していないことが示唆された。

これらの結果、レモンフラボノイドはその分子構造にカテコール構造を有することで、他のカンキツフラボノイドと比較して極めて強い脂質酸化抑制作用を有することが明らかとなった。中でもエリオジクチオールは、抗酸化物質のBHAよりも50倍低い濃度で同等の活性を示すなどその活性は顕著に強かった。



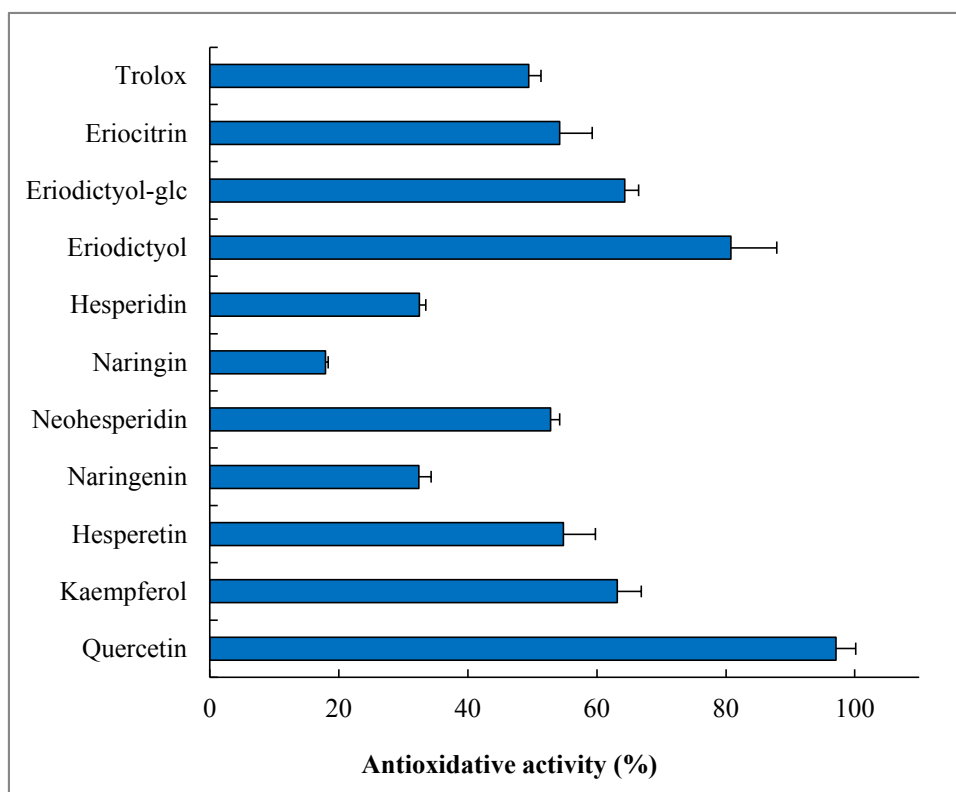
**Fig. 4-9 Antioxidative activities of flavonoids measured by  $\beta$ -caroten decoloration method**

One hundred  $\mu$ l of each sample (100  $\mu$ M) was put into a test tube and 4.9 ml of linoleic acid- $\beta$ -carotene solution was added. This mixture was incubated at 50°C and measured at 470 nm. All data are presented as the mean  $\pm$ SD. (n=3)

#### 4-4-3 ABTS ラジカル消去活性試験

これまでの DPPH ラジカル阻害活性や  $\beta$ -カロテン法による脂質酸化抑制活性などの試験と同様に, ABTS ラジカルに対してもレモンフラボノイド 3 種は強い消去活性を示した (Fig. 4-10) . その活性はエリオジクチオール (80.75 $\pm$ 7.17%) > エリオジクチオール 7-*O*-グルコシド (64.30 $\pm$ 2.18 %) > エリオシトリン (54.26 $\pm$ 4.98%) の順であり, 配糖体よりもアグリコンの方が活性が高いという関係も同様であった. 特にエリオジクチオールの消去活性は非常に高く, クエルセチン (97.11 $\pm$ 3.05 %) に近い活性を示した. これらレモンフラボノイドの活性は基準物質として使用したトロロックス 0.5 mM $\sim$ 1 mM に相当する強さであり, DPPH ラジカル消去活性におけるトロロックス当量とおよそ一致した.

また他のフラボノイドについて, ヘスペレチン (54.82 $\pm$ 4.95%) やネオヘスペリジン (52.82 $\pm$ 1.43%) , ケンフェロール (63.19 $\pm$ 3.72%) およびヘスペリジン (32.49 $\pm$ 0.98%) などにも全体的にやや高い活性が見られたものの, レモンフラボノイドの活性には及ばなかった. 以上から ABTS ラジカル法においても, DPPH ラジカル法および  $\beta$ -カロテン法と同じようにレモンフラボノイドの高い抗酸化活性が示され, B 環のカテコール構造を持たないフラボノイドではその抗酸化活性が低下するという傾向が見られた.



**Fig. 4-10 ABTS radical scavenging activities of flavonoids**

Fifty  $\mu$ l of ABTS radical solution, 140  $\mu$ l of 0.1M phosphate buffer (pH 6.0), and 10  $\mu$ l of 0.5 mM sample were mixed and stood for 5 min. All data are presented as the mean  $\pm$ SD. (n=3)



#### 4-4-4 レモンフラボノイドおよびその誘導体の細胞障害性の評価

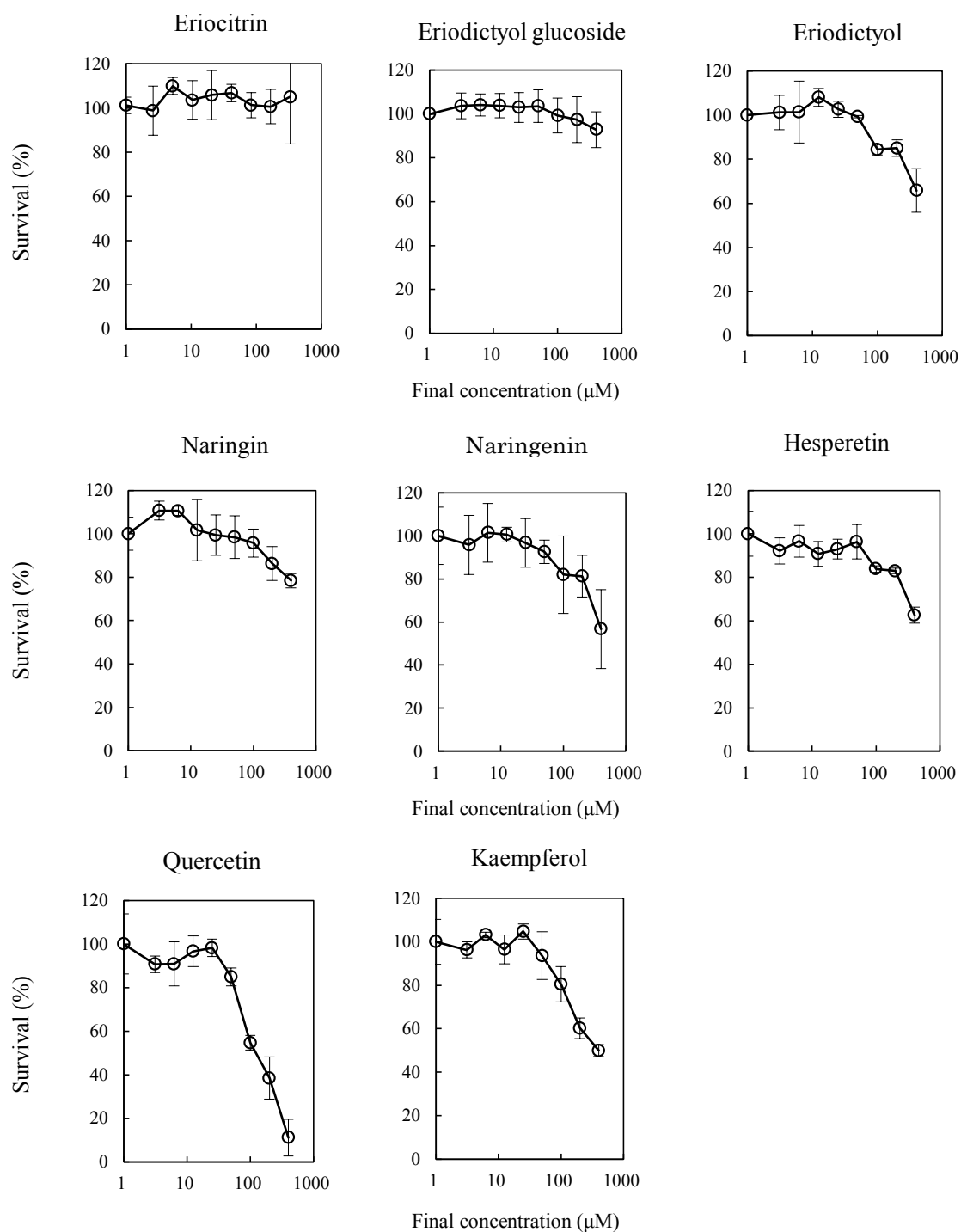
##### (1)細胞の増殖曲線

IEC-6細胞を10%FBSを含むDMEM培地(60 mm dish)で培養し、1日ごとに細胞数を計測し増殖曲線を作成した。4日でフルコンフルエントとなった。IEC-6は2日で約4~5倍、3日で10倍近くまで増殖することが明らかになり、これは9 mm dishで培養した場合においても同様であった(Doubling time: 約27時間)。これはIEC-6細胞を株化したAndreaらの報告<sup>109)</sup>よりも早い増殖ペースであるが、培地中のFBS量で調整可能だと思われる(Andreaらは5%FBSを含むDMEM培地で行っており、増殖ペースは4分の1程度である)。

##### (2)WST-1法による細胞障害性試験

レモンフラボノイドとその類似のフラボノイド誘導体について細胞障害性をWST-1法により評価した(Fig. 4-11)。それぞれの試薬は終濃度0~400  $\mu\text{M}$ となるように調整した。

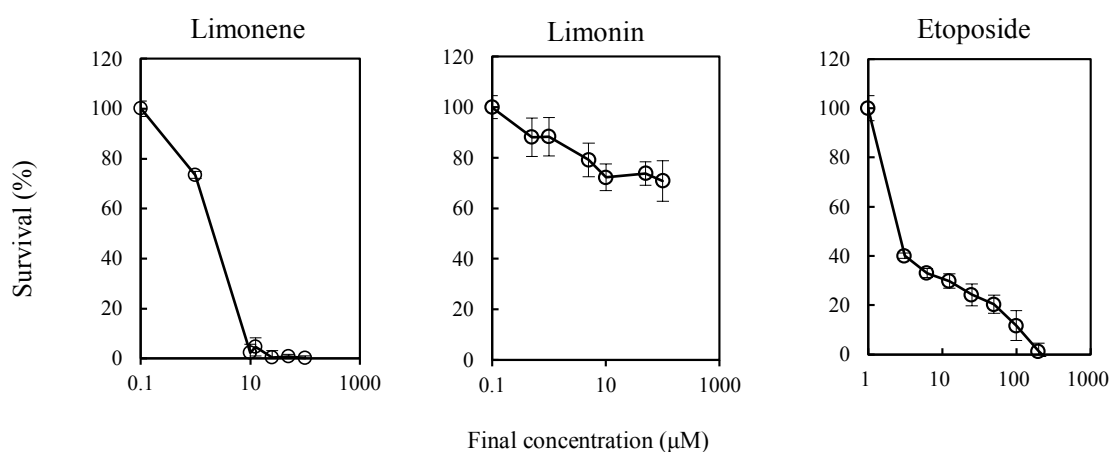
その結果エリオシトリンやエリオジクチオールモノグルコシドは400  $\mu\text{M}$ の非常に高い濃度においても細胞障害性は確認されなかった。一方で、エリオジクチオールは400  $\mu\text{M}$ における細胞生存率が約60%であり、かなり高い濃度ではあるものの弱い障害性が見られた。次に、クエルセチンは非常に高い障害性を示し、その $\text{LC}_{50}$  (50% Lethal concentration)値は128  $\mu\text{M}$ であった。これに対しケンフェロールは $\text{LC}_{50}$ 値が400  $\mu\text{M}$ とその障害性は低かった。ナリンジンやナリンゲニンはエリオジクチオールやエリオシトリンの類似物質である(3'位に水酸基を持たない)。構造に大きな違いはないことから、細胞に対する障害性も同じような傾向が見られると予想されたがナリンゲニンはナリンジンとほぼ同等の障害性を示したが、ナリンジンについてはエリオシトリンと同様に配糖体であるにも関わらず200  $\mu\text{M}$ から弱いながら障害性を示し生存率の低下を示した。また、ヘスペリジンのアグリコンであるヘスペレチンも同じアグリコンのエリオジクチオールやナリンゲニンとよく似た障害性を示した。なお、本研究では試薬の調製にDMSOを使用し、終濃度が1%以下になるように調整した。DMSOの影響については0%~3%まで評価したが、2%までは特に細胞に対する毒性などの影響は見られなかった。



**Fig. 4-11 Viability of IEC-6 cells treated with flavonoids**

IEC-6 cells were incubated with flavonoids in 10% FBS-supplemented DMEM for 24 h at 37°C, and the viability of cells was measured at 415 nm by the WST-1 assay. The flavonoids were solubilized in DMSO and DMEM at appropriate concentrations.

さらにレモン果皮の含有成分のリモネンおよびリモニンの細胞障害性について、同様に評価した。エトポシドは抗がん剤の 1 種で強い細胞障害性があるためポジティブコントロールとして使用した (Fig. 4-12)。リモネンについては 2.5  $\mu\text{M}$  から強い障害性が見られ、これはエトポシドの強さとよく似ていた (リモネン  $\text{LC}_{50}=4 \mu\text{M}$ )。またリモニンも低濃度でも生存率が 80%~70%を推移し、比較的に弱い障害性を示したが 250  $\mu\text{M}$  までの測定濃度において生存率が大きく低下することはなかった。なお、それぞれの  $\text{LC}_{50}$  値は Table 4-2 に示した。なお  $\text{LC}_{50}$  値の求められなかった物質については、400  $\mu\text{M}$  において生存率の低下が見られた場合を Slightly toxic, 生存率に変化がなかった場合を Nontoxic と表記した。



**Fig. 4-12 Viability of IEC-6 cells treated with *d*-limonene, limonin and etoposide**

IEC-6 cells were incubated with limonene, limonin and etoposide in at the indicated concentrations for 24h at 37°C, and the viability of cells was measured at 415 nm by the WST-1 assay. All data are shown as the mean  $\pm$ SD. (n=3)

**Table 4-2  $\text{LC}_{50}$  values of flavonoids and other compound toward the viabilities of IEC-6 and HL-60 cells**

	$\text{LC}_{50}$			$\text{LC}_{50}$	
	IEC-6	HL-60		IEC-6	HL-60
Eriocitrin	Nontoxic	Slightly toxic	Naringenin	Slightly toxic	150 $\mu\text{M}$
Eriodictyol glucoside	Nontoxic	140 $\mu\text{M}$	Naringin	Slightly toxic	Nontoxic
Eriodityol	Slightly toxic	150 $\mu\text{M}$	Limonin	Slightly toxic	Nontoxic
Quercetin	128 $\mu\text{M}$	40 $\mu\text{M}$	Limonene	4 $\mu\text{M}$	8.7 $\mu\text{M}$
Kaempferol	400 $\mu\text{M}$	47 $\mu\text{M}$	Etoposide	2.6 $\mu\text{M}$	-
Hesperetin	Slightly toxic	Slightly toxic			

#### 4-4-5 過酸化水素およびドキシソルビシン誘導性酸化障害に対する レモンフラボノイドの細胞保護効果の評価

##### (1) 過酸化水素の IEC-6 細胞に対する障害毒性

細胞保護効果の評価を行うため、まず過酸化水素の IEC-6 細胞に対する細胞障害について WST-1 法を用いて検討した。その結果、125  $\mu\text{M}$  処理での生存率が  $81.12 \pm 1.56\%$ 、また 250  $\mu\text{M}$  処理での生存率は  $31.62 \pm 6.73\%$  となった (Fig. 4-13)。この結果から  $\text{LC}_{50}$  は 204.6  $\mu\text{M}$  と求められた。そこで過酸化水素処理濃度を 100  $\mu\text{M}$  と 250  $\mu\text{M}$  とし、それぞれ弱い細胞障害と強い細胞障害が起こる条件下でのレモンフラボノイドの細胞保護作用について評価することとした。

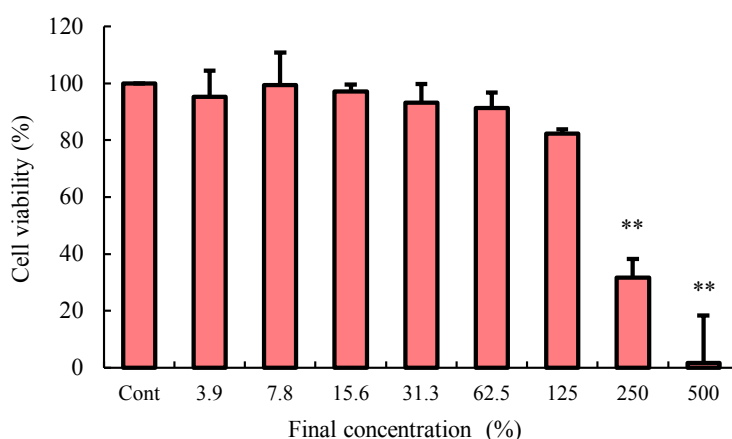


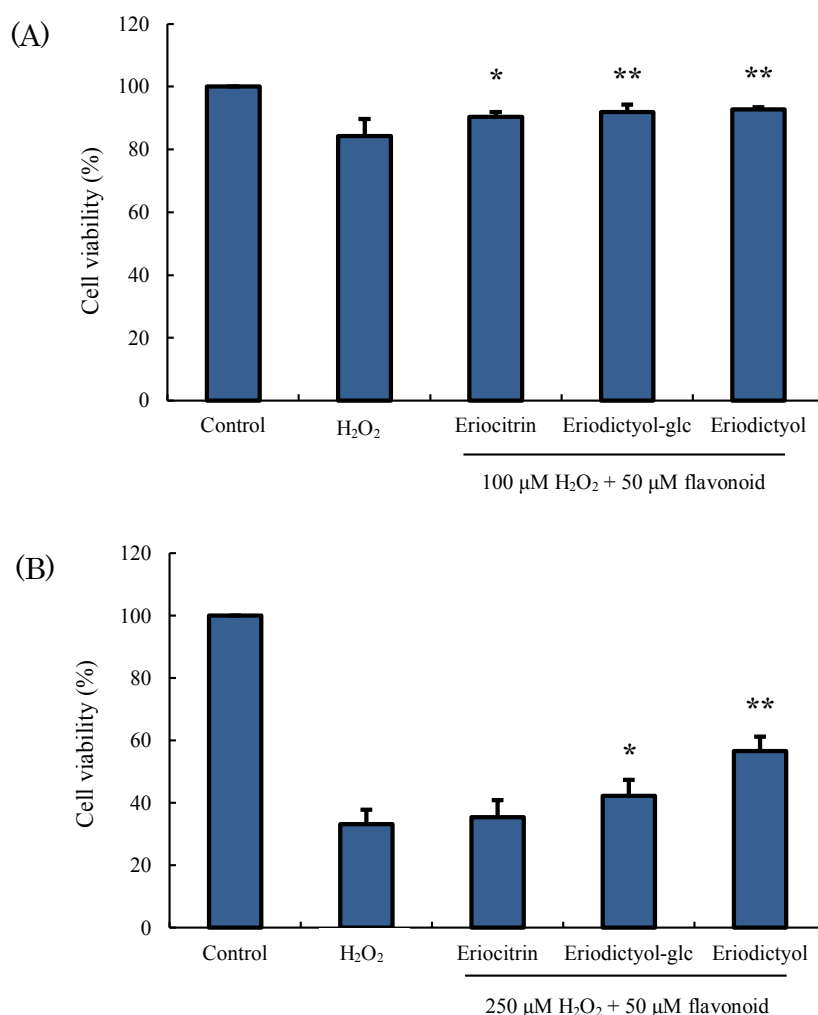
Fig. 4-13 Cell viability of IEC-6 cell treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$

IEC-6 cells were incubated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  at various concentrations for 24 h at  $37^\circ\text{C}$ , and the viability of cells was measured at 415 nm by the WST-1 assay. All data are shown as the mean  $\pm$ SD ( $n=3$ ). Significant difference from control group (\*\* $p<0.01$ )

##### (2) 過酸化水素の酸化障害に対する保護効果の評価

過酸化水素の処理濃度 100  $\mu\text{M}$  において、その生存率が  $84.22 \pm 5.48\%$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$  群) であったのに対して、それぞれ 50  $\mu\text{M}$  のレモンフラボノイドを前処理し細胞内に取り込ませた群では、エリオシトリン ( $90.33 \pm 1.50\%$ ,  $p<0.05$ ), エリオジクチオール ( $92.76 \pm 0.66\%$ ,  $p<0.01$ ), エリオジクチオール 7-*O*-グルコシド ( $91.89 \pm 2.42\%$ ,  $p<0.01$ ) といずれにおいても有意な生存率の改善が認められた (Fig. 4-14 A)。しかし、この処理濃度においては有意差を認めたもののその細胞生存率の変化は小さく、またレモンフラボノイド中での構造の違い (配糖体とアグリコン、またグルコシドとラムノシド) による保護作用に大きな差は認められなかった。

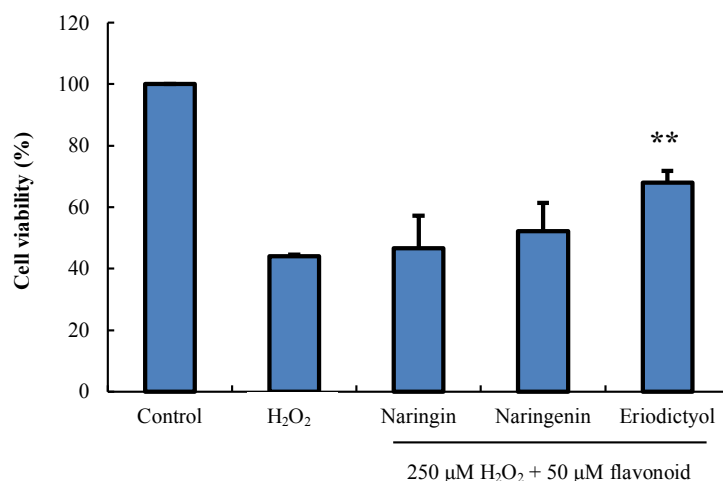
そこで、レモンフラボノイドの構造の違いや、その保護効果をさらに明確にするために、次に過酸化水素を終濃度 250  $\mu\text{M}$  になるように調整して処理したところ、その細胞生存率は  $33.28 \pm 4.60\%$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$  群) に低下した。これに対し、フラボノイドの前処理を行った群では、エリオジクチオールでは  $56.72 \pm 4.51\%$  と細胞生存率の顕著な改善が認められ有意な保護作用を示した ( $p < 0.01$ )。またエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドは  $42.37 \pm 5.07\%$  と、エリオジクチオールほどではないが有意な保護効果を示した ( $p < 0.05$ )。しかし、エリオシトリンに有意な保護効果は見られなかった (Fig. 4-14 B)。



**Fig. 4-14 Effects of lemon flavonoids on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced cytotoxicity in IEC-6 cells**

IEC-6 cells were pre-incubated with 50  $\mu\text{M}$  of lemon flavonoids for 6 h at  $37^\circ\text{C}$ . After, cells were washed with culture medium to remove flavonoids, they were treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (A: 100  $\mu\text{M}$ , B: 250  $\mu\text{M}$ ) for 20 hr. The viability of cells was measured at 415 nm by the WST-1 assay. Values are shown as the mean  $\pm$  SD ( $n=4$ ,  $n=5$ ). Significant difference from the  $\text{H}_2\text{O}_2$  group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

これらの結果をもとに、エリオシトリンと構造類似のフラバノン配糖体であるナリンジンおよびそのアグリコンであるナリンゲニンについて同様に 50  $\mu\text{M}$  の前処理を行い、その保護効果について比較評価した。この際に有意な保護効果が見られたエリオジクチオールをポジティブコントロールとして使用した。過酸化水素 250  $\mu\text{M}$  処理における細胞生存率 ( $43.98 \pm 0.75\%$ ) に対して、エリオジクチオールの前処理は  $67.96 \pm 3.74\%$  と有意な保護効果が見られたのに対して、ナリンジン ( $46.68 \pm 10.47\%$ )、ナリンゲニン ( $52.25 \pm 9.16\%$ ) と、いずれも生存率のわずかな上昇が見られたが、有意な保護効果は認められなかった (Fig. 4-15)。レモンフラボノイドには過酸化水素誘導性の酸化障害に対する細胞保護効果が示され、この保護効果は過酸化水素が高濃度の条件で顕著にエリオジクチオールに認められた。一方、ナリンジンやナリンゲニンには有意な効果は見られなかったことから、過酸化水素による酸化障害に対する細胞保護効果は、エリオジクチオールの高い抗酸化活性に起因するものと予想される。本試験で認められた過酸化水素による酸化障害に対する細胞保護効果は、DPPH 法や  $\beta$ -カロテン褪色法および ABTS 法で確認した抗酸化活性の強さに関連していた (エリオジクチオール > エリオジクチオール 7-*O*-グルコシド > エリオシトリン > ナリンジン > ナリンゲニン)。



**Fig. 4-15 Effects of naringin and naringenin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in IEC-6 cells**

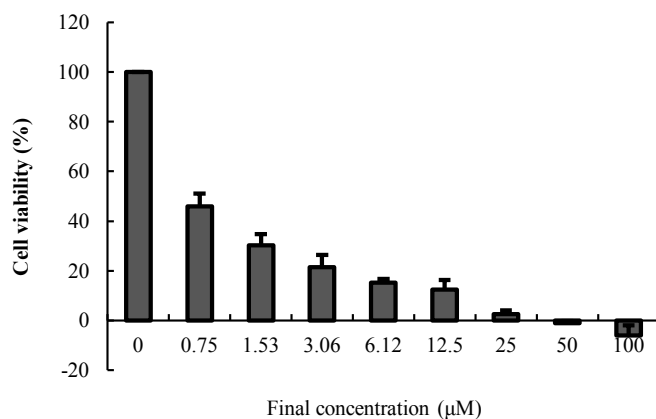
IEC-6 cells were pre-incubated with 50  $\mu\text{M}$  of naringin, naringenin and eriodictyol (positive control) for 6 h at 37°C. After, cells were washed with culture medium to remove flavonoids, they were treated with 250  $\mu\text{M}$  of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 hr. The viability of cells was measured at 415 nm by the WST-1 assay. Values are shown as the mean  $\pm$  SD (n=3). Significant difference from the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group (\*\* $p < 0.01$ )

### (3)ドキシソルビシン誘導性の細胞障害に対するレモンフラボノイドの保護効果

ドキシソルビシンが細胞毒性を示す（アポトーシスを誘導する）メカニズムの1つに過酸化水素を介した経路が報告されている<sup>116)</sup>。前項で示した様に、過酸化水素による細胞障害に対して、レモンフラボノイドにその細胞障害を軽減する細胞保護効果を認めた。したがって、ドキシソルビシンの細胞障害に対してもレモンフラボノイドの前処理が保護効果を示すか否かを評価した。

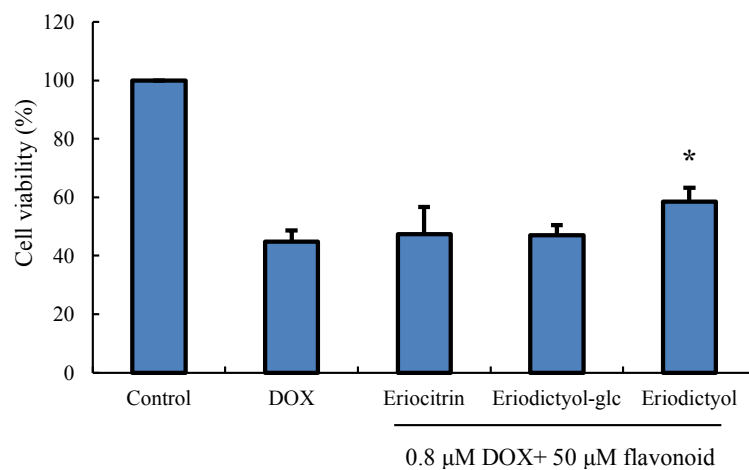
ドキシソルビシンの細胞毒性について検討したところ 0.75  $\mu\text{M}$  の処理濃度で細胞生存率は  $45.85 \pm 5.29\%$  であった ( $\text{LC}_{50}$  値は 0.692  $\mu\text{M}$  と推定)。過酸化水素 250  $\mu\text{M}$  処理時の結果に合わせるため、細胞生存率が 40% 前後となるようドキシソルビシンの処理濃度を 0.8  $\mu\text{M}$  と設定した (Fig. 4-16)。0.8  $\mu\text{M}$  ドキシソルビシン処理において細胞生存率は  $44.84 \pm 3.79$  であった (DOX 群)。これに対し、フラボノイドの前処理を行った群では、エリオジクチオールで  $58.55 \pm 4.71\%$  と 10% 以上の細胞生存率の改善が認められ有意な保護作用を示した ( $p < 0.05$ )。一方でエリオシトリンは  $47.47 \pm 9.19\%$ 、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドは  $47.08 \pm 3.41\%$  といずれも細胞生存率に大きな変化はなく有意な保護効果は見られなかった (Fig. 4-17)。

このように、ドキシソルビシンの細胞障害に対するレモンフラボノイドの保護効果は過酸化水素の酸化障害に対する保護効果ほど顕著には認められなかったが、抗酸化活性の強さに相関してエリオジクチオールで有意な保護効果が認められた。



**Fig. 4-16 Cell viability of IEC-6 cell treated with DOX**

IEC-6 cells were incubated with DOX at various concentrations for 24 h at 37°C, and the viability of cells was measured at 415 nm by the WST-1 assay. All data are shown as the mean  $\pm$ SD (n=3).



**Fig. 4-17 Effects of lemon flavonoids on DOX-induced cytotoxicity in IEC-6 cells**

IEC-6 cells were pre-incubated with 50  $\mu$ M of lemon flavonoids for 6 h at 37°C. After, cells were washed with culture medium to remove flavonoids, they were treated with 0.8  $\mu$ M of DOX at 20 hr. The viability of cells was measured at 415 nm by the WST-1 assay. Values are the shown as mean  $\pm$  SD (n=6). Significant difference from the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group (\* $p$ <0.05)



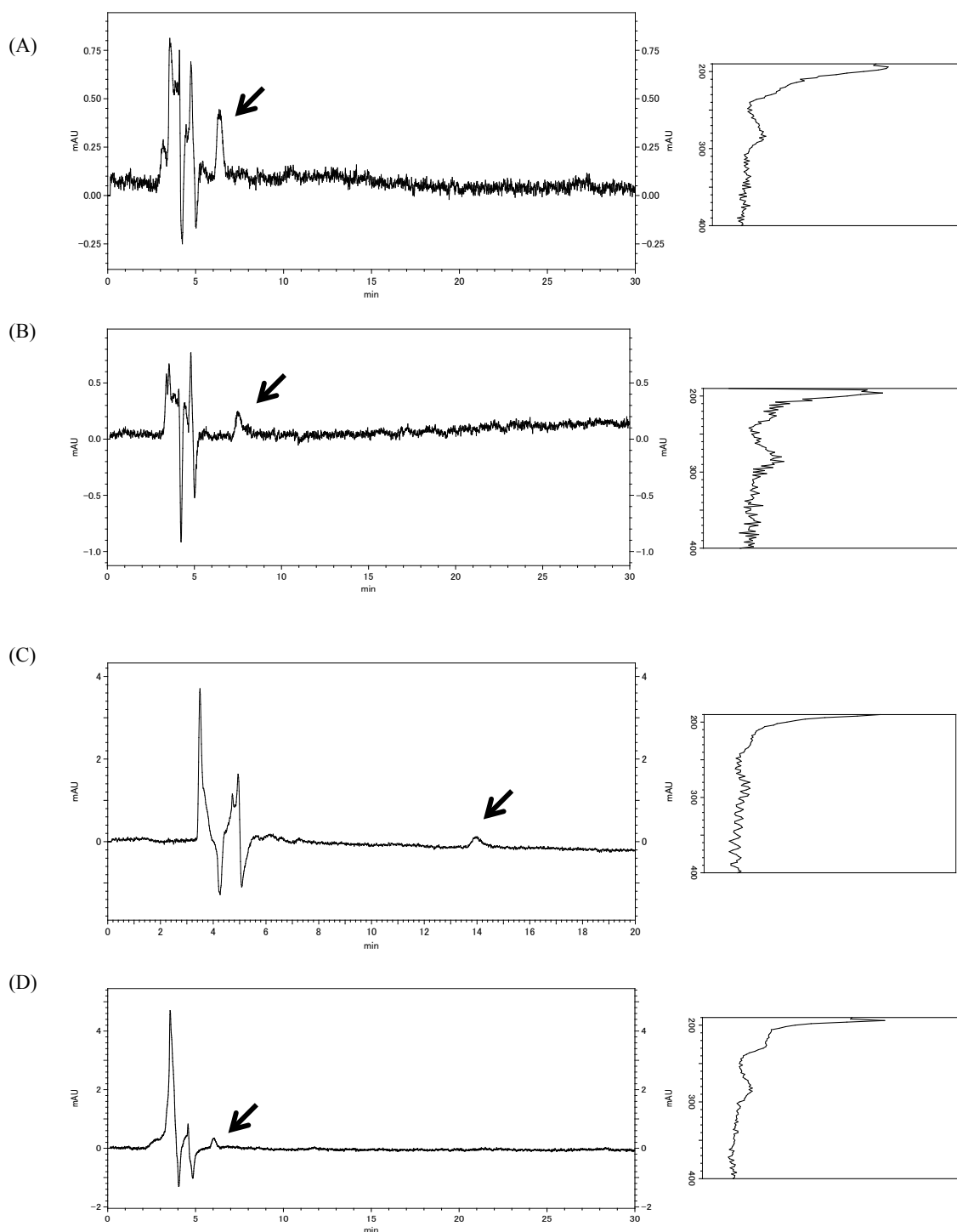
#### 4-4-6 レモンフラボノイドの細胞内取り込み量の評価

##### (1) 細胞内取り込み量の測定

IEC-6 細胞に対するレモンフラボノイドの細胞障害性は非常に低く、さらにレモンフラボノイドの 6 時間の前処理により過酸化水素やドキソルビシンの酸化障害に対する細胞保護作用が認められた。そこで本項では、フラボノイドの前処理後 (6 時間) の IEC-6 細胞について、細胞内へのフラボノイドの取り込みを HPLC で解析し、細胞保護効果との関連性を検討した。

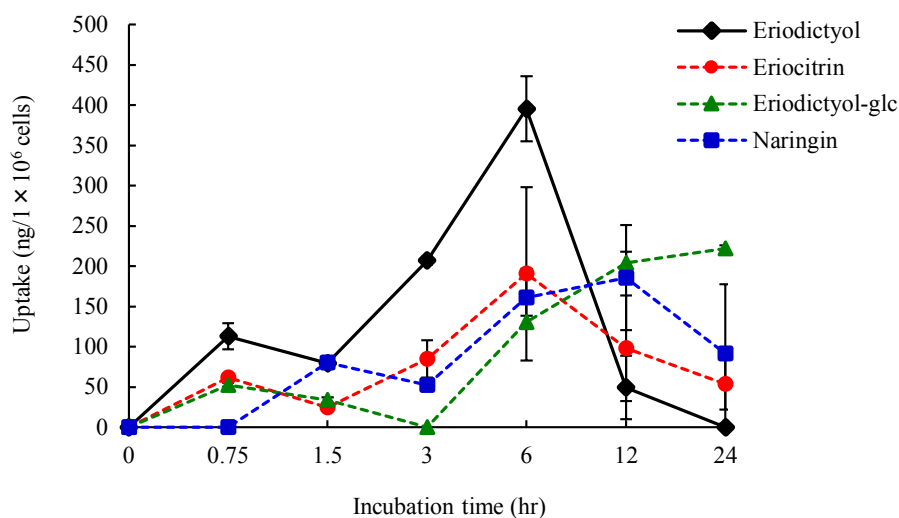
6 時間のフラボノイド (エリオシトリン, エリオジクチオール, エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドおよびナリンジン) 処理後の細胞のメタノール抽出液を HPLC で分析した結果、いずれのフラボノイドも未変化体のピークがそれぞれ検出された (Fig. 4-18)。また、そのピークについて吸収スペクトルを確認したところ標準物質のスペクトルとよく一致した。したがって、それぞれのフラボノイドが細胞内に取り込まれていると判断された。また、いずれの物質についても細胞内に代謝物と見られるピークは確認できなかったことから、処理したフラボノイドの一部が未変化体のまま細胞内に取り込まれていると考えられる。

細胞内へのフラボノイドの取り込みが認められたことから、次にフラボノイド処理後の取り込み量について経時的变化を分析した。各フラボノイド投与後の 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 24 時間における吸収量の推移をそれぞれ HPLC で分析した。その結果、処理後 45 分で小さな吸収量の上昇が見られた。しかし一方で、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドを除く他のフラボノイドは全て 6 時間付近で吸収量が最大になり、その吸収量はエリオシトリンで  $190.54 \pm 107.37 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ , エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドで  $130.39 \pm 8.33 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ , またナリンジンで  $161.19 \pm 35.34 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ cells}$  であったのに対して、エリオジクチオールは  $395.34 \pm 40.35 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ cells}$  とその吸収量は 2 倍近く多かった。なお、エリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの吸収量は 24 時間後に最大となった ( $222.16 \pm 3.86 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ ) (Fig. 4-19)。これらのことから、モノグルコシドを含む配糖体よりもアグリコンの細胞内取り込みがより顕著であることが示された。また、細胞による代謝物の存在についても考慮して培地中のフラボノイドも HPLC 分析したが、処理前と同様のクロマトグラムを示し代謝物と考えられるピークは検出されなかった。したがって、代謝物に関しては存在していたとしても検出限界以下の極めて微量であったと推測される。



**Fig. 4-18 HPLC profiles of cell extracts after treatment of flavonoids in IEC-6 cells and absorption spectra of the corresponding peaks**

IEC-6 cells were incubated with 100  $\mu$ M of eriocitrin (A), eriodictyol 7-*O*-glucoside (B), eriodictyol (C) and naringin (D) for 6 hr. After washing, the cells were extracted with methanol and the extract was analyzed by HPLC. Eluent: CH<sub>3</sub>CN:25% (A), (B), (D) and 40% (C). Arrows indicate the peaks of individual non-metabolized flavonoids.



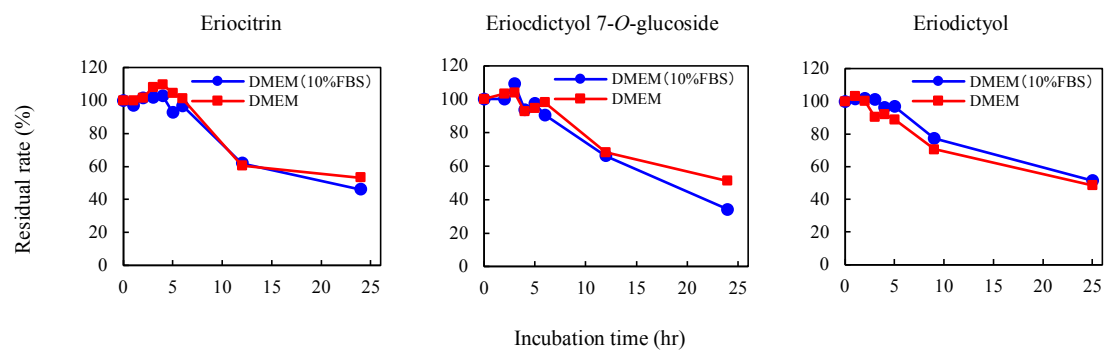
**Fig. 4-19 Uptake of lemon flavonoid by IEC-6 cells**

Accumulation of flavonoids in IEC-6 cells was determined at various times after addition of 100  $\mu$ M flavonoids. Each data represents as the mean  $\pm$ SD. (n=3)

## (2) レモンフラボノイドの DMEM 培地に対する安定性

培地中には pH 調整のために炭酸水素ナトリウムが含まれていることおよびが多く、そのためカテキンやクエルセチンなど抗酸化活性が高い物質（酸化されやすい物質）は、培地中で容易に酸化され壊れてしまうことがある<sup>144)</sup>。実際に、クエルセチンを培地中に溶解し、HPLC で分析すると時間経過とともに減少する。こうした点において、レモンフラボノイドに対してもそのような減少が起こるかどうかを検討し、細胞保護効果や吸収量に影響が出るかどうかを検討した。

レモンフラボノイドそれぞれについて、DMEM 培地または10%FBS を含有する培地（炭酸水素ナトリウムを含む）にフラボノイドを添加し、細胞培養と同条件でインキュベートした。その結果、添加後6時間ではレモンフラボノイドの残存量にいずれも大きな減少は見られず90%以上残存していたが、24時間後には残存量が50%ほどになり大きく減少していた。また、培地中の FBS の有無による減少量に違いは見られなかった (Fig. 4-20)。これらの結果から、10時間を超える長時間のフラボノイド処理においては培地成分による分解や、分解物による細胞への影響が懸念されるが、本章でフラボノイドの取り込みに適用した6時間の処理時間においては、培地成分によるフラボノイドの分解が影響する可能性は低いと言える。



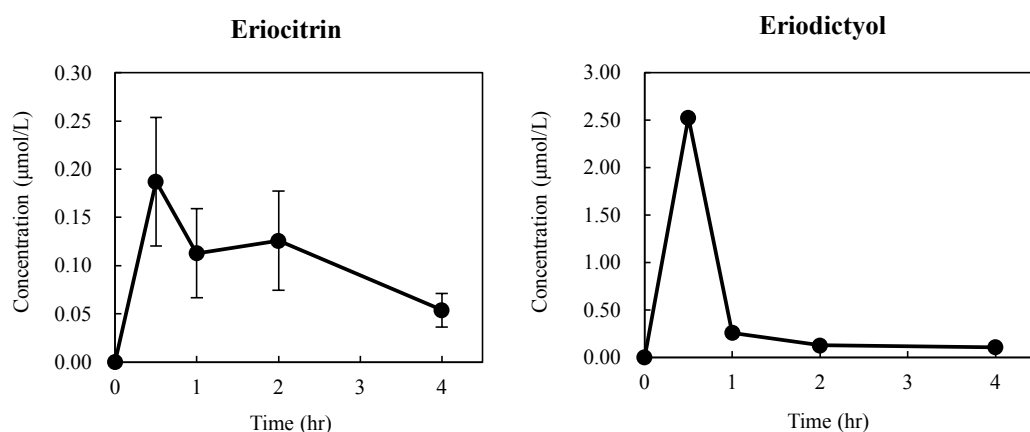
**Fig. 4-20 Degradation of flavanons treated in DMEM with and without FBS at 37°C**

#### 4-4-7 ラットにおけるエリオシトリンの吸収動態の解析

##### (1) 未変化体の血中移行量と経時的推移

培養細胞を用いた *in vitro* の系での試験で、レモンフラボノイドの細胞毒性が非常に低いことを示し、また細胞内への吸収とそれに基づく酸化ストレスに対する細胞保護効果について示した。本項では、Wistar 系ラットを用いてレモンフラボノイドの吸収動態、また代謝について評価することとした。麻酔下で、ラットにそれぞれのフラボノイドを胃内投与し（エリオシトリン；50 mg/kg body weight, エリオジクチオール；25 mg/kg body weight）、一定時間後に尾静脈より血液を採取し、血しょう中のフラボノイド量を HPLC で分析することで移行量を分析した。いずれの血清サンプルにおいても未変化体のピークがそれぞれ検出されたが、エリオシトリンのピークは非常に小さく定量限界に近い値であった。

エリオシトリンの未変化体としての最大血中濃度は経口投与後 30 分で  $0.187 \pm 0.067 \mu\text{M}$  であり、1 時間後では  $0.113 \pm 0.046 \mu\text{M}$ 、そして 4 時間後にはほとんど検出されないレベル ( $0.054 \pm 0.018 \mu\text{M}$ ) まで減少した。一方でアグリコンのエリオジクチオールは経口投与後 30 分で最大血中濃度  $2.53 \mu\text{M}$  を示し、1 時間後では  $0.106 \mu\text{M}$  と急激に減少し、さらに 4 時間後では  $0.106 \pm 0.015 \mu\text{M}$  とほとんど検出されなかった (Fig. 4-21)。最大血中濃度で比較しても、エリオシトリンの吸収量はエリオジクチオールの 1/10 以下であり、配糖体であるエリオシトリンは未変化体としては吸収されにくいことが明らかとなった。

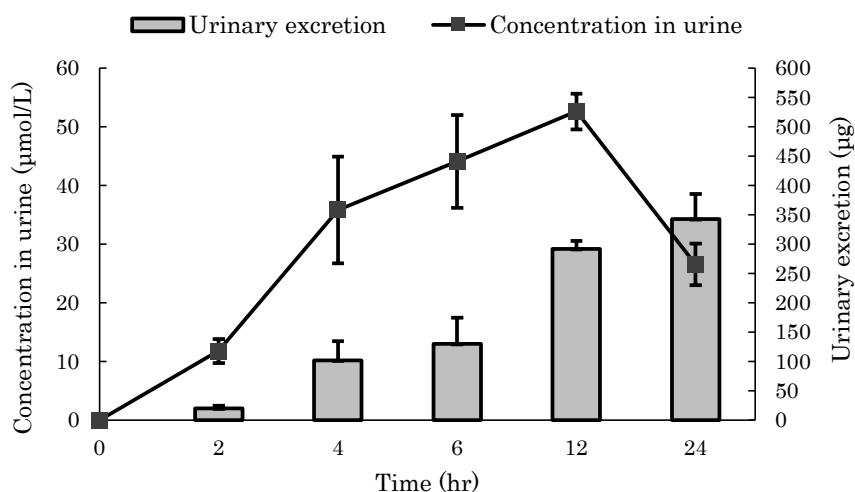


**Fig. 4-21 Concentrations of eriocitrin and eriodictyol in serum after its administration to rats**

Concentrations of lemon flavonoids in rat serum were determined by HPLC after administration of eriocitrin (50 mg/kg body weight) and eriodictyol (25 mg/kg body weight). Each value represents the mean  $\pm$ SD ( $n=3$ , eriocitrin).

## (2) 尿および糞中への排泄量および各臓器の残存量

次にエリオシトリンの経口投与後の未変化体の尿中および糞中への排泄量について、同様に分析しその経時的変化を分析した。また、肝臓および腎臓内での残存量についても分析し、その分布を評価した。血中への移行量とは異なり尿中のエリオシトリン濃度（蓄積量）は時間経過とともに経口投与後 12 時間にかけて経時的に増加し、2 時間後で  $11.83 \pm 2.06 \mu\text{M}$  であったのに対して 12 時間で  $52.64 \pm 3.03 \mu\text{M}$  と最大となった (Fig. 4-22)。一方、尿中のエリオシトリン蓄積量については 2 時間で  $20.50 \pm 4.53 \mu\text{g}$ 、6 時間で  $130.60 \pm 44.44 \mu\text{g}$ 、12 時間で  $292.60 \pm 13.51 \mu\text{g}$  と経時的に増加し、24 時間後で  $342.19 \pm 42.61 \mu\text{g}$  となった (Fig. 4-23 右軸)。したがって、実際のエリオシトリンの排泄は経口投与後 12 時間程度でピークになり、次第に減少していくことが確認された。しかしながら経口投与後 30 分における肝臓および腎臓内の残存量について同様に分析を行ったが、いずれにおいてもわずかなピークは確認できたものの定量は不可能であった。さらに経口投与後 24 時間における全糞中の未変化体の含有量は  $1.19 \pm 0.12 \text{ mg/total feces}$  であり、24 時間後の尿中蓄積量 ( $342.19 \pm 42.61 \mu\text{g}$ ) よりも 3 倍ほど多かった。これは  $23.5 \text{ mg}$  の投与量（ラットの平均体重  $470 \text{ g}$  から換算）に対してわずか 5%である。また、尿中量と合わせた総排出量 ( $1.53 \text{ mg}$ ) で見積もっても 6.5% 程度である。したがって経口投与したエリオシトリンのほとんどが、何らかの代謝を受けて吸収または排泄されていることが示唆された (Table 4-3)。



**Fig. 4-22 Concentration of eriocitrin in urine after administration**

Amounts of eriocitrin in urea were determined after administration of eriocitrin ( $50 \text{ mg/kg}$  body weight) by HPLC.

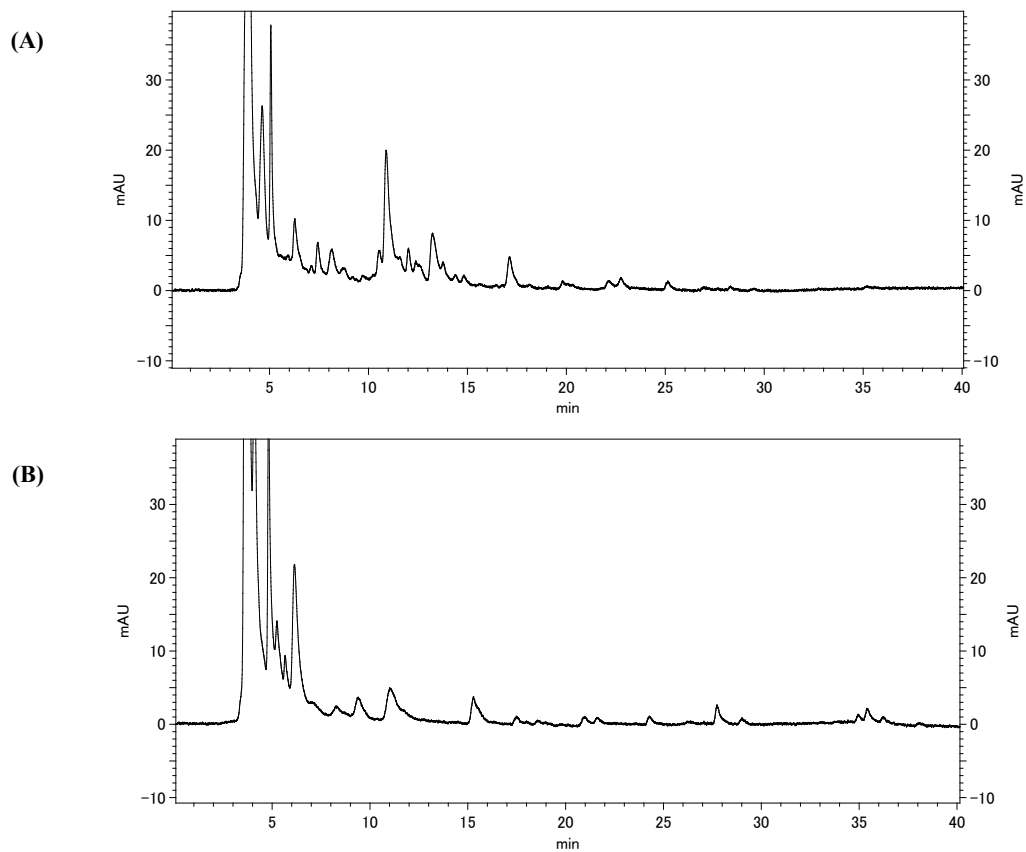
Each value represents the mean  $\pm$ SD (n=3)

**Table 4-3 Concentration of eriocitrin in liver, kidney and feces after administration to rats**

Liver	Kidney	Feces	Urine	Total(after 24h)	Recovery
ND	ND	1.19±0.12	342.19±42.61	1.53±0.16	6.49
		(mg/total feces)	(µg/total urine)	(mg)	(%)
		0.39			
		(mg/g feces)			

フラボノイド配糖体の多くは腸内細菌により加水分解を受けアグリコンに変換された後、吸収されグルクロン酸抱合などの抱合を受けることが知られている。そこで、尿サンプルを用いて変換体について  $\beta$ -グルクロニダーゼ（スルファターゼ活性を含む）処理を行い、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体などの有無を分析し、エリオシトリンの代謝についても検討した。尿サンプルに  $\beta$ -グルクロニダーゼ／スルファターゼを2時間作用させ、再度HPLC分析を行った。その結果、未処理のクロマトグラムに見られる保持時間 10 分から 15 分にかけて溶出したピークは酵素処理後には消失しており（Fig. 4-23 A）、それに伴って保持時間 25 分以降に複数のピークが確認された（Fig. 4-23 B）。これについて、スタンダード物質の保持時間と比較すると 28 分付近のピークがアグリコンのエリオジクチオール、36 分付近のピークはヘスペレチンと推定された。したがって、保持時間 10 分から 15 分にかけてのピークは抱合体であることが考えられ、これらの結果はエリオシトリンがグルクロン酸抱合および硫酸抱合を受け代謝される一方で、メチル化などの代謝を受けヘスペリジンもしくはアグリコンのヘスペレチンへと変換されていることを示唆する。

しかしながら酵素処理後のエリオジクチオールの全尿中濃度は  $39.82 \pm 3.87 \mu\text{M}$  であり、これは 24 時間後の全尿中（22 ml）に  $248.78 \pm 25.30 \mu\text{g}$  と非常に少量である。一方、ヘスペレチンについてもその濃度は  $16.81 \pm 12.39 \mu\text{M}$ 、つまり 24 時間後の全尿中に  $109.84 \pm 80.12 \mu\text{g}$  と非常に少量であった。



**Fig. 4-23 HPLC chromatograms of urine extracts from eriocitrin-administered rats before (A) and after  $\beta$ -glucuronidase/sulfatase treatment (B)**

The mobile phase contained the following: solvent A,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; solvent B, 0.1 M Phosphate buffer (pH 2.1). Gradient conditions : A/B=15/85, 0-15 min ; 40/60, 15-40 min.

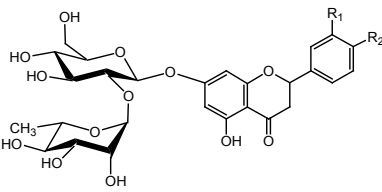
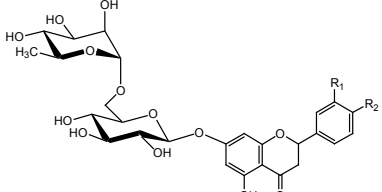


## 4-5 小括

### レモンフラボノイドの抗酸化活性と構造活性相関

DPPH ラジカル消去活性試験および  $\beta$ -カロテン褪色試験法のいずれの試験法においても、レモンフラボノイドに強い抗酸化活性が認められた。エリオシトリンやエリオジクチオールグルコシドは 7 位にラムノースおよびグルコースをそれぞれ持つ配糖体であるが、アグリコンのエリオジクチオールと比べてわずかにアグリコンで高くなる傾向が見られたが、有意な差はなくほとんど同等の活性であった。同様に、ナリンジンとナリンゲニン、またヘスペレチンとヘスペリジンと 7 位のラムノースの有無で比較しても、活性の差はいずれの試験においてもわずかにアグリコンが高くなる傾向にあるのみである。これらのことから、フラボノイドの 7 位の水酸基は抗酸化活性にほとんど影響していないと考えられる。さらに、ナリルチンやヘスペリジン、そしてナリンジンやネオヘスペリジンを比較すると、わずかにナリルチンやヘスペリジンの活性が高かった (DPPH ラジカル消去活性試験)。両者はそれぞれ、7 位にルチノースやネオヘスペリドースが結合する配糖体であり、グルコースとラムノースの結合様式が  $\alpha$ -1-6 結合と  $\alpha$ -1-2 結合の違いがある (Table 4-4)。このことから、7 位に結合する糖鎖の種類もわずかに抗酸化活性に影響し、ルチノースと比較してネオヘスペリドースは立体障害など何らかの影響で活性を下げるものが推測されるが、まだ詳細は明らかではない。

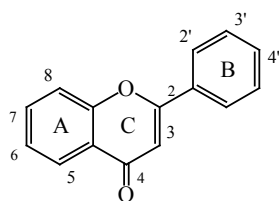
**Table 4-4** Clasification of citrus flavonoids conjugated with neohesperidose and rutinose

Structure	7-Glucoside	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Name
	Neohesperidose (Rhamnose and Glucose) $\alpha$ -1-2 bond	OH	OH	Neeriocitrin
		OH	OMe	Neohesperidin
	bitter taste	OH	H	Naringin
	Rutinose (Rhamnose and Glucose) $\alpha$ -1-6 bond	OH	OH	Eriocitrin
		OH	OMe	Hesperidin
	no taste	OH	H	Narirutin

次に、B 環の水酸基に着目してみると、3', 4'位に水酸基を持つカテコール構造のエリオシトリン、エリオジクチオールグルコシド、エリオジクチオールの活性が有意に高く、次いで 4'位がメトキシ基に置換されているヘスペリジンやヘスペレチンの順で、3'のみに水酸基を持つナリンジンやナリンゲニン、ナリルチンの活性は低かった。

このように、エリオジクチオールやエリオシトリンに対して炭素 3'位に水酸基を持たないナリンジンやナリンゲニン、また類似物質のヘスペレチンでは活性は非常に小さい。これは B 環のカテコール構造が抗酸化活性の発現に非常に重要であることを示す。

クエルセチンやケンフェロールなどの物質はこれまでによく調べられており、その結果から C 環3位の水酸基はフラボノイドの抗酸化力を強めることが明らかになっている<sup>145)</sup>。たとえば、クエルセチンは非常に抗酸化力の高い物質としてよく知られているが、このクエルセチンから4'位の水酸基を除いた、つまり B 環にカテコール構造を持たない物質がケンフェロールであり、この活性はエリオジクチオールよりも低かった。このことから、C 環の水酸基よりも、B 環のカテコール構造がより抗酸化活性を高めるものと推測される。



Compound	A ring	B ring	C ring
Myricetin	5, 7-OH	3', 4', 5'-OH	3-OH
Luteorin	5, 7-OH	3', 4'-OH	-
Quercetin	5, 7-OH	3', 4'-OH	3-OH

Fig. 4-24 Chemical structures of quercetin and its derivatives

さらに $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{+}$ イオン等はフェントン反応を通じて酸化反応を促進するため、キレート作用による金属イオンのトラップが脂質の自動酸化を抑制することにつながる<sup>99)</sup>。ここで、隣接したフェノール性水酸基（カテコール）を持つ化合物は金属イオンとキレート形成が可能である。クエルセチンは3', 4'位の水酸基、3位の水酸基と4位のカルボニル基、5位の水酸基と4位のカルボニル基間でキレート化することが報告されている<sup>90)</sup>。これらの結果から、①A環の7位の水酸基は抗酸化作用に寄与しないが、配糖体ではその結合糖の違いが影響する。②フラバノン類においてもB環カテコール構造が大きく活性を高めることが示唆された。これらの特徴から、レモン果皮中に多く含まれるヘスペレチンやジオスミンと比較してもレモンフラボノイドの抗酸化活性は極めて高い<sup>146)</sup>。またレモンフラボノイドは金属キレート作用も期待できることから、本章での結果は抗酸化物質さらには酸化抑制剤としてレモンフラボノイドが非常に有効であることを示唆する。

#### レモンフラボノイドの細胞障害性と細胞保護効果

IEC-6細胞に対するフラボノイドの細胞障害性について検討したところ、エリオシトリンの障害性は他のフラボノイドよりも非常に低かった。これはフラボノイドの構造よりもむしろ、水への溶解性や自身の還元力などによるものと考えられる。また、エリオジクチオールに高濃度でやや障害性が見られたが ( $\text{EC}_{50} > 400 \mu\text{M}$ ) 非常に弱いものであった (Table 4-2)。これについて松尾らはヒト胎児肺線維芽細胞 (TIG-1 cells) およびヒト臍帯血管内皮

細胞 (HUVE cells) の正常細胞2種類でフラボノイド9種類の細胞毒性を評価しているが、いずれの細胞に対してもエリオジクチオールは細胞障害性は極めて低いことが示されており<sup>147)</sup>、エリオジクチオールの正常細胞に対する安全性が示唆される。また、HL-60細胞などのがん細胞に対してもエリオシトリンは障害性を示さなかったが、エリオジクチオールには障害性が見られた ( $EC_{50}=150\text{ }\mu\text{M}$ ) (Table 4-2)。このエリオジクチオールにはヒトT細胞白血病細胞 (CCRF-HSB-2 cells)、ヒト肺がん細胞 (A549 cells) や胃がん細胞 (TGBC11TKB cells) などの多種のがん細胞についての細胞増殖抑制効果が報告されているが<sup>148)</sup>、いずれの細胞に対しても強い細胞増殖抑制作用を示している ( $EC_{50}$ 値は数  $\mu\text{M}$ ~数十  $\mu\text{M}$ )。したがって正常細胞に対して毒性がなく、がん細胞に対して強い増殖抑制効果を示す点はフラボノイドの中でもエリオジクチオールに特徴的な点であると言える。

このようにレモンフラボノイドは強い抗酸化力を持つ一方で、その細胞障害性は非常に弱いという特徴から、細胞の酸化ストレス障害に対する保護作用について評価した。細胞障害への影響のない50  $\mu\text{M}$  のレモンフラボノイドの前処理は、過酸化水素やドキソルビシンによる酸化障害に対して細胞保護効果を示した。レモンフラボノイドの中でもエリオシトリンの保護効果は弱かったが、エリオジクチオールは特に有意に保護効果を示し、過酸化水素250  $\mu\text{M}$  処理による障害に対して前処理によって生存率が20%以上改善された (Fig. 4-14 B)。横溝らはフラボノイドの取り込みと過酸化水素による酸化ストレスを Caco-2細胞を用いて解析し、細胞内に取り込まれたフラボノイドの量およびラジカル捕捉活性に比例して  $\text{H}_2\text{O}_2$ によって発生した活性酸素種(ROS)を減少させ、さらにフラボノイドの持つ抗酸化活性が ROS の消去活性に大きく関与することを示している<sup>149)</sup>。また、培地中の炭酸水素ナトリウムによりフラボノイドが分解されるという報告について<sup>144)</sup>、横溝らも、ミリセチンなどの不安定なフラボノイドは培地中で容易に分解されることを示し、ROS の消去よりもむしろ  $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生に関与することを推測している。しかし、エリオジクチオールについては、長時間の培養ではこのような変化が見られたものの、6時間処理では大きな変化は見られなかった。

これらの結果から、エリオジクチオールに見られた細胞保護効果は、直接的な  $\text{H}_2\text{O}_2$ 消去によるものではなくむしろ  $\text{H}_2\text{O}_2$ から発生した ROS の消去によるものと考えられる。一方で、ドキソルビシン0.8  $\mu\text{M}$  処理に対しては10%程度の生存率の改善が見られたが (Fig. 4-17)、ドキソルビシンによる細胞障害メカニズムは未だ不明瞭な部分も多く<sup>116)</sup>、本章で示したドキソルビシンの細胞障害性は過酸化水素を介する経路のみに起因するものではないと考えられる。過酸化水素処理の場合ほど大きな生存率の改善が見られなかったものと考えられる。

#### レモンフラボノイドの細胞内取り込みとラットにおける体内動態

レモンフラボノイドが過酸化水素やドキソルビシンで誘導される酸化障害に対して細胞保護効果を有することから、前処理したフラボノイドが細胞内に取り込まれて何らかの抗酸

化作用を示したものと考えられた。したがって細胞内へのフラボノイドの取り込みは、細胞保護作用を裏付ける1つの根拠となり得る。レモンフラボノイド6時間処理後の細胞内容物を分析したところ、細胞内に未変換体のフラボノイドが確認されたことから細胞内への取り込みが確認された (Fig. 4-18)。特にエリオジクチオールはエリオシトリンよりも2倍以上吸収されており、配糖体よりもアグリコンの方が吸収されやすいことが実証された (Fig. 4-19)。Caco-2細胞を用いた腸管膜モデルにおいて、フラボノイドは細胞膜を受動拡散により移動することが知られており、配糖体のヘスペリジンよりもアグリコンのヘスペレチンの方が細胞内により吸収されることが示されている<sup>150)</sup>。したがって疎水性の高いエリオジクチオールの取り込み量がエリオシトリンの取り込みよりも多いという結果は一致する。このことからレモンフラボノイドの細胞の保護効果は、その抗酸化力と細胞内の取り込み量に相関することが明らかになった。

レモンの摂取により含有量の最も高いエリオシトリンがどのように挙動するかを明らかにするため、Wistar系ラットを用いて体内動態について解析した。エリオシトリンの未変換体としての最大血中濃度はエリオシトリンの経口投与後30分で $0.187 \pm 0.067 \mu\text{M}$ であったが、アグリコンのエリオジクチオールではその経口投与後30分で最大血中濃度 $2.53 \mu\text{M}$ を示した。またエリオシトリンの経口投与後の腎臓および肝臓への分布や、また尿中排泄量について同様に分析した。血中への移行量とは異なり尿中のエリオシトリン濃度（蓄積量）はゆるやかに増加し、12時間で $52.64 \pm 3.03 \mu\text{M}$ と最大となった (Fig. 4-22)。さらに経口投与後24時間において、糞中からは $1.19 \pm 0.12 \text{ mg/total feces}$ と未変換体のエリオシトリンは極めて少量しか検出されなかった。この濃度から実際のエリオシトリン量に換算すると、 $23.5 \text{ mg}$ の経口投与に対して5%とごく少量であった。また、経口投与後30分における肝臓および腎臓について同様に分析を行ったが、いずれにおいてもわずかなピークは確認できたものの定量は不可能であった。これらの結果から、経口投与されたエリオシトリンのほとんどが、何らかの代謝を受けて吸収および排泄されていることが示唆された (Table 4-3)。

フラボノイド配糖体の多くは腸内細菌により加水分解を受けアグリコンに変換された後、吸収されグルクロン酸抱合などの抱合を受けることが知られている<sup>131-133)</sup>。尿サンプルに $\beta$ -グルクロニダーゼ/スルファターゼを作用させた結果、アグリコンのエリオジクチオールとヘスペレチンが検出された。したがって、酵素処理によって消失した保持時間10分から15分にかけてのピークは抱合体であると考えられ、これらの結果はエリオシトリンがグルクロン酸抱合および硫酸抱合を受け代謝される一方で、メチル化などの代謝を受けヘスペリジンもしくはアグリコンのヘスペレチンへと変換されていることを示唆する。三宅らはヒトにおけるヘスペリジンやエリオシトリンを含む複数のフラボノイド代謝実験において、血中に未変換体のエリオシトリンやヘスペリジンが検出されなかったことを示しており、また $\beta$ -グルクロニダーゼ/スルファターゼ処理後の血漿中から、エリオジクチオールやヘスペレチンなどのアグリコンが検出された（いずれも数 $\mu\text{M}$ ~数十 $\mu\text{M}$ ）ことを示している<sup>151)</sup>。種差の違いはあるが、ラットにおいても同様の代謝物が認められその主要な代謝物は一致

した. しかしながら酵素処理後のエリオジクチオール全尿中濃度は $39.82 \pm 3.87 \mu\text{M}$ であり, これは24時間後の全尿中に $248.78 \pm 25.30 \mu\text{g}$ と非常に少量である. 一方, ヘスペレチンについてもその濃度は $16.81 \pm 12.39 \mu\text{M}$ , つまり24時間後の全尿中に $109.84 \pm 80.12 \mu\text{g}$ と非常に少量であった (Fig. 4-23). したがって, 経口投与したエリオシトリン量に対して確認された代謝物および未変化体の量は少ないことになり, これはフラボノイドの代謝が非常に複雑に行われていることを示唆する. 今後さらなる詳細な分析が必要である.

## 第5章 レモン品種間差異の分析とその応用

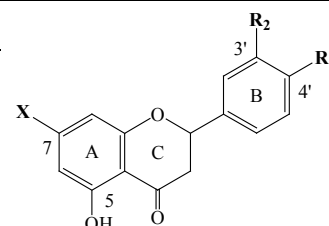
### 5-1 はじめに

#### (1) カンキツフラボノイドの生合成と苦みのフラボノイド

オレンジ，レモン，グレープフルーツなど多くのカンキツ類の果皮は，強い苦みを伴いそのまま食することは難しい．この苦味を呈する化合物はリモニンやノミリンなどを代表とするリモノイドと，またナリンジンやネオヘスペリジンなどフラバノン類の配糖体である．レモンの果皮の苦みは主にリモニンであり，レモンの主たるフラボノイドのエリオシトリンには苦みはなく無味である．これと同様に，ミカンなどによく含まれているナリルチンにも苦みがない．このような同じフラバノン配糖体における苦みの有無について，Horowitz らの構造研究によって，その苦みと化学構造との間にある関係が見出されている<sup>152)</sup>．Table 5-1に示すように，同じフラバノン配糖体でも苦みの有無を生じるのは結合糖（糖の結合様式）の違いであることが明らかにされている．つまり，フラバノン A 環7位に結合する糖がネオヘスペリドースの場合は苦みを有し，ルチノースの場合は苦みを有さない．

**Table 5-1 カンキツ類のフラボノイドの構造と苦味**

X: ルチノシド (苦みなし)	X: ネオヘスペリドシド (苦味閾値 mol)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
ヘスペリジン	ネオヘスペリジン ( $5 \times 10^{-4}$ )	OCH <sub>3</sub>	OH
ナリルチン	ナリンジン ( $5 \times 10^{-5}$ )	OH	H
エリオシトリン	ボンシリン ( $5 \times 10^{-5}$ )	OH	OH
イソサクラネチンルチノシド	ネオエリオシトリン ( $> 5 \times 10^{-4}$ )	OCH <sub>3</sub>	H



(味とにおいの化学 日本化学会 より抜粋)

これら8種類のフラボノイド配糖体のうち結合糖がルチノシドである場合は無味であるのに対し，ネオヘスペリドシドは全て苦みを呈する．この顕著な呈味性の違いは，糖部分のラムノースがグルコースのC6 に結合するか，C2に結合するかのわずかな違いである．現在のところ，松本らはB環のカルボニル基が苦みに必須の構造であること，ラムノースがグルコースのC2に結合すると苦味，甘味に関わらず呈味性を発揮すること（C6に結合すると消失する）などが明らかにしているが<sup>153)</sup>，詳細はまだ明らかにされていない．

これらの違いを生み出す要因について，植物の合成経路の観点からいくつかの報告がみられる．フラバノン配糖体のルチノシドおよびネオヘスペリドシドの生成に関与する遺伝子は，2対の優性同義遺伝子によることを示しており，ネオヘスペリドシドは優性に，ルチ

ノシドは劣性ホモの発現であることを示している<sup>152,153</sup>). Fig. 5-1にこれまでに報告されている文献<sup>154-156</sup>)からカンキツ類のフラボノイド生合成経路をまとめた. 一般的にフラボノイドは, フェニルアラニンが脱アミノ化されてケイ皮酸が生成されることから始まる. シキミ酸経路などを経てまず初めにナリンゲニンカルコンが生成され, 種々のフラバノン配糖体が形成され細胞組織内に蓄積される. 初めのステップとしてカルコンが閉環してアグリコンが生成されるが, 次いでグルコースが結合し, その後ラムノースが結合する. このラムノースの結合の違い( $\alpha$ -1-6結合と $\alpha$ -1-2結合)がルチノシドとネオヘスペリドシドである. 現在, まだこれらの完全な遺伝子解析および生合成経路に関しては明らかにはなっていないが, 配糖化酵素に関する遺伝子の優劣が, カンキツフラボノイドの生合成に大きく関与していることが明らかである.

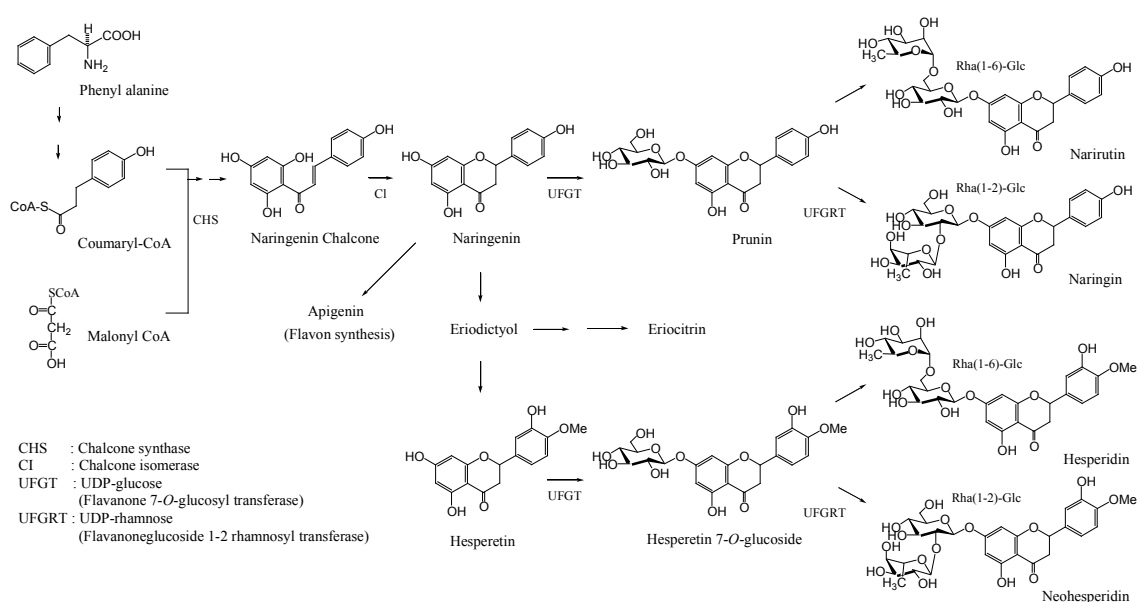


Fig. 5-1 Pathways of flavanone glucosides in *Citrus* sp.

Three molecules of malonyl-CoA and one of *p*-coumaryl-CoA are condensed to naringenin chalcone by chalcone synthase (Lewinsohn *et al.*, 1989). Naringenin chalcone is converted to naringenin by chalcone isomerase. After that, naringenin is converted by methylations or hydroxylations to other flavanone aglycones such as hesperetin, eriodictyol (Maria L. *et al.*, 2012). In citrus, flavanones are glucosylated at C7 position to create flavanone-7-*O*-glucosides. Furthermore, flavanone-7-*O*-glucosides are glycosylated by either a 1-6 rhamnosyltransferase to tasteless 7-*O*-rutinosides or a 1-2 rhamnosyltransferase to bitter 7-*O*-neohesperidosides (Ahuva Frydman *et al.*, 2004).

フラボノイドの生合成に関わる酵素は近年の研究で多数明らかにされているが, 微生物や他の植物での研究例で, カンキツ類に限ってみると未確認の酵素も少なくない. 実際にフラバノン配糖体に対して, これまで述べてきたラムノースをグルコースのC2に結合させる酵素は明らかにされており, この酵素がカンキツ類の苦みを左右させる鍵となっていることが示されているが<sup>157</sup>), C6に結合させる酵素はいまだ精製されてはいない. また, 一般

的にナリングニンカルコンがシキミ酸経路から合成され、種々の酵素により水酸化やメトキシ化、また異性化などを経て、非常に多くの種類のフラボノイドが生合成される。しかしながら、カンキツ類の中でエリオシトリンやヘスペリジン、また、ナリンジンなどがどのように作り分けられているか、その詳細はまだ明らかになっていない。このように、現在まだこれらの完全な遺伝子解析や生合成経路の解明はなされていないが、少なくとも発現している水酸化酵素の種類や配糖化酵素に関する遺伝子の優劣がフラボノイドの生合成に大きく関与しており、カンキツフラボノイドの多様な種類に繋がっている。

## (2) 品種間の含有フラボノイドの差異

一般にカンキツ類は、ミカン科・ミカン亜科のカンキツ属 (*Citrus*) を含め、キンカン属 (*Fortunella*) やカラタチ属 (*Poncirus*) に含まれる種を指す。また、これら以外に複数の属を含めてミカン亜科植物は 33 属から成り立つ。このうち、実際に食用に用いられているのはカンキツ属とキンカン属の一部である。カンキツ属には香酸カンキツ類 (レモンや柚子など)、オレンジ類、グレープフルーツ類、マンダリン類、ミカン類などに加えて、さらにこれらの相互交雑種が含まれて多様な品種群を構成している (Fig. 5-2)。

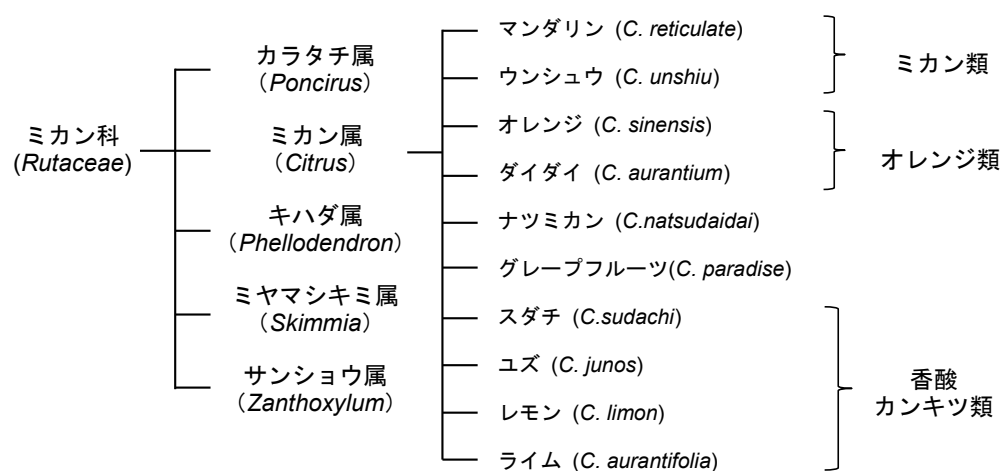


Fig. 5-2 カンキツ類の分類

近年、DNA マーカー技術の進展によって、RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法<sup>158)</sup>や ISSR (inter-simple sequence repeat) 法<sup>159)</sup>, また RFLP (restriction fragment polymorphism) 法<sup>160)</sup>などがカンキツの分類や系譜解析に利用されてきた。最近では、ISSR や CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 法により品種を判別する手法も報告されている。しかしながら、カンキツ類は品種改良を重ね非常に多くの品種が新たに開発されており、実際には



品種が想定できない場合も多く、判別がに困難を要することが問題とされている<sup>161)</sup>。そこで、近年ではカンキツ類を中心にその含有成分の多様性に注目して、その含有成分の特徴から品種判別を行おうとする研究が行われている<sup>162)</sup>。

カンキツ類の特徴として、ネオヘスペリジンやナリンジンなどのフラバノンネオヘスペリドース配糖体やそれらのルチノース配糖体、またジオスミンなどのフラボン類やその配糖体などと、非常に多種多様なフラボノイド成分を含有することが挙げられる。これに着目しカンキツ類に含まれるフラボノイド組成と品種との関係が検討されてきた。特に近年では、HPLC や MS 等の分析機器の発達により、多数のフラボノイドを精度良く定量することが可能になった。こうした点から、種や系統におけるフラボノイド組成のデータベースを構築することで、品種判別や、さらには特定成分の有効利用や育種への応用にも役立てられると考えられる。

## 5-2 本章における研究の目的

近年ではレモンに限っても新規な品種が登録され市場に出回るようになっており、例えば宝韶寿（2006年登録）は、広島県大崎下島で発見された自然交配によって生まれた品種であるが、果皮が厚いことや果汁の量などによる特徴が示されているのみで、詳細は明らかではない。また、レモンの果皮にはエリオシトリンが特徴的に含まれておりその機能性が注目されていることを示したが、品種間や摘果時期による組成の違いについては明確でない。また、広島県立農業技術センターでは新たな品種イエローベルが生み出されている。

カンキツ類に含まれるフラバノン配糖体には糖の結合様式によりラムノシドとネオヘスペリドシドの2種類が存在し、そしてそれがカンキツ類の苦みなど呈味性の有無を生じていることを先述した。第2章ではレモンに含まれるフラボノイドの特徴をHPLC分析したが、そこでは苦みを有さないエリオシトリンやヘスペリジンの含有量が多く、苦みを呈するナリンジンやネオヘスペリジンなどの含有量は極めて低いことが確かめられた。一般的な例として、グレープフルーツ（*C. paradise*）やナツミカン（*C. natsudaikai*）などの果皮は非常に苦みが強く一般的には食されない。一方でオレンジ（*C. sinensis*）などの果皮は比較的苦みが弱くジャムなどの加工に利用されている。

本章ではこのような苦みを左右するフラバノン配糖体6種類（エリオシトリン、ネオエリオシトリン、ヘスペリジン、ネオヘスペリジン、ナリンジン、ナリルチン）に注目して、レモンの収穫時期の違いによるフラボノイドの成分分析を行い、その組成の違いを評価した。またフラボノイド組成をもとに、主成分分析に基づく品種判別の可能性について考察した。さらに、クエン酸やアスコルビン酸などの成分に関してHPLCを用いたの同時分析を試み、これらを総合的にカンキツ類の特徴付けを行った。さらに、カンキツ類の種や系統における各組成のデータベースを構築することで、新たに開発されたレモンの新品種であるイエローベルや宝韶寿についてそれらの特徴を明確にし、利用拡大につなげることを目的とした。

## 5-3 実験方法

### 5-3-1 試料

フラボノイドの HPLC 分析用のスタンダードとして用いたエリオシトリン (ERI), ナリルチン (NRT), ナリンジン (NRG), ヘスペリジン (HSP), ネオヘスペリジン (NHP) および, リモニン, アスコルビン酸, クエン酸水和物については 2 章に記述した. また, 分析サンプルとして使用したカンキツ類は以下の通りである.

広島県産青レモン, 高知県産青レモン, メイヤーレモン (オーストラリア産), 黄色レモン (チリ産), ライム (メキシコ産), オレンジ (オーストラリア産), グレープフルーツ (オーストラリア産) はそれぞれ市内のスーパーで購入したものを使用した. また, スダチは徳島県産のものを使用した.

### 5-3-2 サンプルの調製

それぞれのカンキツは 1 個当たりの重量を量り, 果汁を搾った後, 外果皮 (フラベド), 中果皮 (アルベド), 内果皮 (じょうのう膜), さのう膜, にそれぞれ切り分けた後, 2 章の方法に準じて分析用サンプルを調整した. オレンジやグレープフルーツなど 1 個当たりの重量が大きいものに関しては全重量の 4 分の 1, または 2 分の 1 を切り分け重量を測定した. なお, HPLC の分析条件や各スタンダード物質の検量線, また保持時間などについても 2 章に準ずるが, 分析カラムは Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR II (ナカライテスク) およびそのガードカラムで統一した. 以下に各サンプルの詳細を示した (Table 5-2).

Table 5-2 分析に供したカンキツ類サンプル一覧

No.		学名	産地	重量 (g)	分析日
1	国産レモン (緑)	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	広島県	118	2012,10
2	国産レモン (黄緑)	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	高知県	102	2012,10
3	国産レモン (黄)	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	高知県	87	2012,11
4	国産レモン (黄緑)	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	広島県	98	2012,12
5	外国産レモン (黄)	<i>C. limon</i>	チリ	145	2012,10
6	メイヤー (レモン)	<i>C. meyerii</i> Y. Tanaka	ニュージーランド	115	2012,10
7	メイヤー (レモン)	<i>C. meyerii</i> Y. Tanaka	ニュージーランド	120	2013,10
8	国産レモン (緑)	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	広島県	114	2013,10
9	国産レモン (黄)	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	広島県	89	2013,10
10	ライム	<i>C. aurantifolia</i>	メキシコ	125	2013,10
11	オレンジ	<i>C. sinensis</i>	オーストラリア	271	2013,10
12	グレープフルーツ	<i>C. paradise</i>	オーストラリア	458	2013,10
13	スダチ	<i>C. sudachi</i>	徳島県	68	2013,11
14	宝韶寿 (レモン)	<i>C. limon</i>	広島県	157	2012,05
15	温州ミカン	<i>C. unshiu</i>	大分県	60	2012,08

レモンの成熟過程による成分分析は、入手時期の異なる広島県産レモン（2012 年 10 月および 2013 年 10 月）および、高知県産レモン（2012 年 10 月）を用い、あらかじめ青レモン（緑色）の状態のものを入手した。1 か月～2 か月程度黄色く変化するまで冷蔵保存し、その後分析に供しその含有フラボノイドの違いを分析した。また種子などについての成分分析はしなかった。なお、本章で分析に供した広島県産レモンは 2 章の物とは入手時期などが異なる。

レモンの新品種イエローベルは、果皮 1 mg を 1 ml のメタノールで溶解したサンプルとして提供を受けたものを分析に供した。

### 5-3-3 統計処理

主成分分析には多変量解析ソフトウェア（i Stat 社）を用い、相関行列に基づいて主成分スコアを求め解析を行った。また、総含有量について主成分スコアを平面プロットしそれぞれの分布状態について調べた。

## 5-4 結果

### 5-4-1 レモンのフラボノイドに関する系統または品種間の差異

レモンの品種間プロファイルを作成する為に、フラボノイドの分析を様々なカンキツ類や複数の品種のレモンを用いて行った。また、同時にクエン酸およびアスコルビン酸についてそれぞれの品種について HPLC を用いて分析を行った。またレモン以外のカンキツ類についても同様に分析を行い、成分分析および品種間の特徴を評価する上での参考とした。

#### (A) カンキツ類フラボノイド分析とそれぞれの特徴と新品種イエローベルの特徴

第 2 章では広島県産の成熟レモンについての詳細な部位別のフラボノイド分析の結果を示し、その主たるフラボノイドがエリオシトリンとヘスペリジンであることを示した。本章ではそれに加え入手時期の異なる青レモンや、またそれを成熟させたもの、そして他のカンキツ類などについても分析を行いその違いやレモンの特徴について分析した。

Table 5-3～10 に各組織別の含有量 (mg/100 g fresh weight) および、果皮 (アルベドとフラベド) と可食部 (じょうのう膜、砂嚢膜および果汁) との比較、そして全果 100 g 当たりの総含有量を示した。その結果、青レモンは緑色であればあるほどフラボノイド含有量が非常に多いことが明らかとなった。つまり、緑色の広島レモン (No. 1) はヘスペリジンの含有量が突出して多くレモン全果 100 g あたりに 997.26 mg と 1 g 近くを含むのに対し、2 か月後の分析 (No. 4) では 536.58 mg と顕著な違いが見られた。これについての詳細は後述するが、レモンが緑色から黄色く熟す過程においてヘスペリジンの含有量が減少することが認められ、それはアルベドやフラベドなど果皮の部分で顕著であった。

次にメイヤーレモンはオレンジと掛け合わされた品種であって、全果 100 g の新鮮重当たりのエリオシトリンの含有量が 8.22 mg (No. 6) および 8.44 mg (No. 7) と、同じレモンの中でも極めて少ないのが特徴であった。さらに掛け合わされたオレンジの含有成分の特徴であるナリルチンやナリンジンの含有量もきわめて少なく、そのほとんどはヘスペリジン (No. 6 で 588.26 mg, No. 7 で 607.55 mg) であった。

また、近年新しく品種登録された宝韶寿 (No. 14) については全体的なフラボノイド含有量が少なかった。この宝韶寿はリスボンなどの変異種であり、他のレモンと比較して含有成分の特徴は見られなかったが、全果 100 g の新鮮重当たりのエリオシトリンの含有量が 166.20 mg, ヘスペリジンの含有量が 127.39 mg とややエリオシトリンの方が多い点は、熟したレモンと特徴とよく似ていた。

このように、レモンの果皮の色の違い (成熟度合) や品種によって、含有される成分量に顕著な違いが確認された。また、レモンの含有フラボノイドに関してはエリオシトリンやヘスペリジンなどのルチノース配糖体に極端に偏っていた。

**Table 5-3 カンキツ類アルベド 100 g 中のフラボノイド配糖体含有量**

サンプル No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Name	広島青レ (緑)	高知青レ (黄緑)	高知青レ (黄)	広島青レ (黄緑)	チリ産 黄レモン	メイヤー 12	メイヤー 13	広島青レ (緑)	広島青レ (黄)	メキシコ 産ライム	オレンジ	グレープ フルーツ	スダチ	宝韶寿	温州ミカン (大分)
ERI	447.55	355.41	395.74	317.92	337.36	15.57	32.65	282.89	117.95	131.22	0.00	76.58	94.30	124.37	0.00
NRT	2.49	0.00	7.54	8.18	2.63	0.00	0.00	0.00	0.00	47.88	13.38	55.80	71.99	0.00	35.26
NRG	0.00	22.00	0.00	24.01	15.07	10.76	0.00	18.90	6.99	0.00	0.00	441.79	66.68	9.31	0.00
HSP	935.42	558.30	458.01	659.45	297.37	450.04	307.24	466.39	70.40	268.89	387.07	0.00	102.95	65.13	401.33
NHP	77.26	136.41	59.00	44.89	12.85	0.00	0.00	56.57	49.38	30.72	0.00	37.50	123.62	19.56	0.00

(mg/100 g fresh weight)

**Table 5-4 カンキツ類フラベド 100 g 中のフラボノイド配糖体含有量**

サンプル No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Name	広島青レ (緑)	高知青レ (黄緑)	高知青レ (黄)	広島青レ (黄緑)	チリ産 黄レモン	メイヤー 12	メイヤー 13	広島青レ (緑)	広島青レ (黄)	メキシコ 産ライム	オレンジ	グレープ フルーツ	スダチ	宝韶寿	温州ミカン (大分)
ERI	368.65	431.78	474.71	948.41	859.20	6.55	0.00	329.13	482.87	401.82	0.00	0.00	91.75	179.12	0.00
NRT	38.59	8.67	13.81	27.62	28.25	3.86	0.00	0.00	0.00	78.53	120.39	646.10	128.59	0.00	523.03
NRG	2.73	0.00	2.93	5.86	6.93	0.00	0.00	13.18	6.53	0.00	0.00	7072.45	105.99	0.70	0.00
HSP	1713.60	1102.81	669.76	1339.52	987.06	588.26	607.55	868.05	393.27	400.19	960.14	0.00	222.80	178.39	1070.50
NHP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	96.87	187.03	0.75	0.00

(mg/100 g fresh weight)

**Table 5-5 カンキツ類じょうのう膜 100 g 中のフラボノイド配糖体含有量**

サンプル No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Name	広島青レ (緑)	高知青レ (黄緑)	高知青レ (黄)	広島青レ (黄緑)	チリ産 黄レモン	メイヤー 12	メイヤー 13	広島青レ (緑)	広島青レ (黄)	メキシコ 産ライム	オレンジ	グレープ フルーツ	スダチ	宝韶寿	温州ミカン (大分)
ERI	404.30	943.70	602.08	394.35	851.74	17.60	0.00	375.08	394.50	401.82	0.00	0.00	85.53	238.47	—
NER															
NRT	9.57	2.92	10.82	39.85	9.57	10.38	0.00	0.00	0.00	78.46	136.33	467.25	154.10	0.00	—
NRG	3.14	0.76	9.27	30.36	0.00	0.00	0.00	10.00	6.19	0.00	0.00	2246.62	87.62	0.40	—
HSP	890.08	624.70	325.40	787.65	437.86	1581.11	519.11	371.07	155.63	399.93	463.66	0.00	80.06	150.83	—
NHP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	127.82	75.84	1.09	—

—：温州ミカンは果汁中（可食部）の含有量として分析 (mg/100 g fresh weight)

**Table 5-6 カンキツ類砂嚢膜 100 g 中のフラボノイド配糖体含有量**

サンプル No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Name	広島青レ (緑)	高知青レ (黄緑)	高知青レ (黄)	広島青レ (黄緑)	チリ産 黄レモン	メイヤー 12	メイヤー 13	広島青レ (緑)	広島青レ (黄)	メキシコ 産ライム	オレンジ	グレープ フルーツ	スダチ	宝韶寿	温州ミカン (大分)
ERI	179.33	250.82	140.72	113.93	362.21	14.86	0.00	99.50	129.49	93.88	0.00	0.00	40.13	83.27	—
NER															
NRT	0.05	0.00	0.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	49.83	53.48	38.48	0.00	—
NRG	7.77	6.48	4.96	17.47	11.04	0.00	0.00	15.93	9.03	11.65	0.00	193.57	29.96	16.13	—
HSP	300.01	349.32	90.33	256.50	182.02	562.29	402.10	105.04	51.27	128.82	289.77	0.00	24.93	62.90	—
NHP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	25.62	0.00	—

—：温州ミカンは果汁中（可食部）の含有量として分析, (mg/100 g fresh weight)

**Table 5-7 カンキツ類果汁 100 g 中のフラボノイド配糖体含有量**

サンプル No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Name	広島青レ (緑)	高知青レ (黄緑)	高知青レ (黄)	広島青レ (黄緑)	チリ産 黄レモン	メイヤー 12	メイヤー 13	広島青レ (緑)	広島青レ (黄)	メキシコ 産ライム	オレンジ	グレープ フルーツ	スタチ	宝韶寿	温州ミカン (大分)
ERI	18.46	18.70	27.14	18.42	14.88	1.68	1.83	18.17	26.39	12.18	1.76	0.00	5.04	21.18	0.00
NER															
NRT	0.01	0.01	0.11	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.63	6.87	18.23	5.09	0.00	0.09
NRG	0.40	0.33	0.64	0.40	0.75	0.00	0.19	0.14	0.25	0.00	0.00	52.22	4.50	2.04	0.00
HSP	5.21	4.72	8.86	5.76	3.12	2.82	1.89	6.02	6.32	4.90	7.22	0.00	4.36	7.95	16.62
NHP	0.12	0.17	0.41	0.15	0.08	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	3.71	2.96	0.10	0.00

(mg/100 g fresh weight)

**Table 5-8 カンキツ類果皮（アルベド+フラベド） 100 g 中のフラボノイド配糖体含有量**

サンプル No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Name	広島青レ (緑)	高知青レ (黄緑)	高知青レ (黄)	広島青レ (黄緑)	チリ産 黄レモン	メイヤー 12	メイヤー 13	広島青レ (緑)	広島青レ (黄)	メキシコ 産ライム	オレンジ	グレープ フルーツ	スタチ	宝韶寿	温州ミカン (大分)
ERI	399.89	404.12	426.08	636.76	592.57	10.04	17.40	305.56	311.88	230.93	0.00	45.52	93.36	157.11	0.00
NER															
NRT	24.30	5.53	9.95	18.01	15.16	2.37	0.00	0.00	0.00	59.17	71.49	295.19	92.93	0.00	146.35
NRG	1.65	7.97	1.13	14.83	11.09	4.17	0.00	16.10	6.74	0.00	0.00	3130.76	81.22	4.16	0.00
HSP	1405.48	905.57	539.35	1003.37	634.67	534.76	447.51	663.30	241.98	317.27	698.26	0.00	147.30	132.87	553.74
NHP	30.59	49.41	36.33	22.19	6.56	0.00	0.00	28.84	23.14	19.40	0.00	61.58	147.08	8.31	0.00

(mg/100 g fresh weight)



**Table 5-9 カンキツ可食部（じょうのう膜+砂囊膜+果汁）100 g 中のフラボノイド配糖体含有量**

サンプル No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Name	広島青レ (緑)	高知青レ (黄緑)	高知青レ (黄)	広島青レ (黄緑)	チリ産 黄レモン	メイヤー 12	メイヤー 13	広島青レ (緑)	広島青レ (黄)	メキシコ 産ライム	オレンジ	グレープ フルーツ	スダチ	宝韶寿	温州ミカン (大分)
ERI	127.36	104.31	122.35	116.09	162.16	6.50	1.11	95.24	96.86	67.92	1.24	0.00	44.40	87.74	0.00
NER															
NRT	2.25	0.18	1.67	9.00	1.49	2.48	0.00	0.00	0.00	9.41	32.22	79.66	71.70	0.00	0.09
NRG	1.89	1.20	2.47	9.56	1.14	0.00	0.11	4.57	2.13	1.62	0.00	348.64	43.01	2.71	0.00
HSP	246.35	88.30	64.18	216.46	79.56	423.19	188.42	87.54	35.22	67.12	116.63	0.00	38.92	52.85	16.62
NHP	0.08	0.14	0.29	0.09	0.06	0.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	19.04	36.79	0.37	0.00

(mg/100 g fresh weight)

**Table 5-10 カンキツ 100 g 中のフラボノイド配糖体総含有量**

サンプル No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Name	広島青レ (緑)	高知青レ (黄緑)	高知青レ (黄)	広島青レ (黄緑)	チリ産 黄レモン	メイヤー 12	メイヤー 13	広島青レ (緑)	広島青レ (黄)	メキシコ 産ライム	オレンジ	グレープ フルーツ	スダチ	宝韶寿	温州ミカン (大分)
ERI	278.77	262.40	259.81	373.63	343.22	8.31	9.31	191.95	181.13	118.20	0.79	11.27	63.47	124.95	0.00
NER															
NRT	14.50	3.00	5.42	13.46	7.24	2.42	0.00	0.00	0.00	24.76	46.53	133.00	79.97	0.00	32.17
NRG	1.76	4.77	1.86	12.17	5.33	2.13	0.06	9.87	3.93	1.12	0.00	1037.18	57.89	3.49	0.00
HSP	890.33	519.25	279.22	605.69	313.07	480.26	318.81	352.29	116.25	144.28	328.56	0.00	81.12	95.77	134.44
NHP	17.03	26.12	16.60	11.02	2.80	0.42	0.00	13.26	9.07	5.98	0.04	29.57	79.74	4.63	0.00

(mg/100 g fresh weight)

**Table 5-11 イエローベル 100 g 中のフラボノイド配糖体総含有量**

	Flavanons					
	ERI	NER	NRU	NRG	HSP	NHP
イエローベル	26.13	15.37	11.31	97.20	36.10	462.02

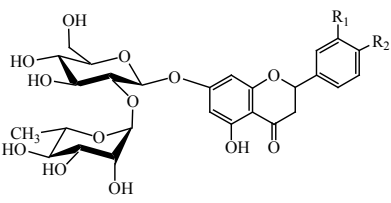
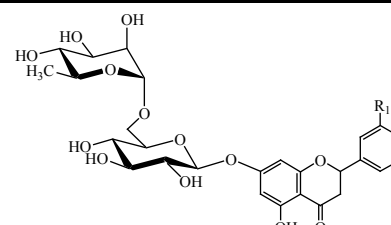
(mg/100 g fresh weight)

レモンの特徴と比較して他のカンキツ類のフラボノイド組成の特徴を見てみると、温州ミカンでは全果 100 g の新鮮重当たりのナリルチン量が 41.21 mg/100 g、ヘスペリジン 172.22 mg/100 g とルチノースを結合糖に持つフラバノン配糖体を主成分として多く含有していた。これは、オレンジの成分の特徴 (ナリルチン 40.07 mg/100 g、ヘスペリジン 282.96 mg/100 g) とよく似ていた。一方で、グレープフルーツはナリンジンの含有量が極めて多く (1135.72 mg/100 g)、またネオヘスペリジン (32.38 mg/100 g) の分布も見られ、ネオヘスペリドースを結合糖に持つフラバノンが多く見られた。

このように、カンキツ類に含有されるフラバノン配糖体は、その結合糖がルチノースかネオヘスペリドースであるかの、多くはその種類がどちらかに偏っており、これらのことから大よそのカンキツ類の品種特性を分類することが可能であると考えられた。カンキツ類に多く含まれるフラバノン配糖体はエリオシトリン、ネオエリオシトリン、ナリルチン、ナリンジン、ヘスペリジン、ネオヘスペリジンの主に 6 種類であり、これらは結合糖の違いで 2 種類のグループに分けることが出来る。すなわち、グルコースとラムノースが  $\alpha$ -1-2 結合で結合したネオヘスペリドースと  $\alpha$ -1-6 結合したルチノースである。一般的に苦みを有すると言われるネオヘスペリドースを結合糖に持つ、ナリンジンやネオヘスペリジンなどはグレープフルーツなどに多く、一方でルチノースを結合糖に持つ、ナリルチンやヘスペリジンはミカン類に多いことが明らかとなった。また、レモンは圧倒的にエリオシトリンの含有量が多く、こちらルチノース群に分類される。一方で、スダチには上述の 6 種類のフラバノン配糖体を平均的に含有していた。例えばエリオシトリン 63.47 mg/100 g ネオエリオシトリン 35.66 mg/100 g (データは示していない) とどちらの結合糖も有しており、一部のカンキツには例外が見られることも明らかとなった。

ここで新品種のイエローベルの成分に注目してみると全果 100 g の新鮮重当たりのネオエリオシトリン (430.5 mg/100 g) が顕著に多いと言うこれまでのカンキツに見られなかった特徴を示し、さらにネオヘスペリジン (114.0 mg/100 g) やナリンジン (84.5 mg/100 g) が顕著に多く含まれていた。一方で、エリオシトリンやヘスペリジンの含有量は国内産レモンと比較すると極端に少なかった (Table 5-11)。この特徴は、同じレモンであっても国内産レモン (リスボン) やメイヤーレモン、また宝韶寿などとは大きく異なり、ネオヘスペリドースを結合糖に持つフラバノン配糖体が多かったことから、グレープフルーツやオレンジ類の一部などに近い群に分けられた (Table 5-12)。

Table 5-12 フラバノン配糖体の違いによるカンキツ類の簡易な分類

Structure	7-Glucoside	R1	R2	Name	簡易分類例
	Neo-hesperidose (Rhamnose and Glucose) α-1-2 bond	OH	OH	Neo Eriocitrin	グレープフルーツ
		OH	OMe	Neo Hesperidin	イエローベル
		OH	-	Naringin	
	Rutinose (Rhamnose and Glucose) α-1-6 bond	OH	-	Narirutin	オレンジ ウンシュウミカン
		OH	OMe	Hesperidin	ライム レモン 宝詔寿
		OH	OH	Eriocitrin	

## (B) カンキツ類のクエン酸およびアスコルビン酸分析とレモンの特徴

レモン全果 100 g 当たりのアスコルビン酸含有量は一般的に 100 mg と言われているが、青レモン（緑色）ではそれに近い値（89.99 mg/100 g fresh weight）が示されたが、黄色レモンのアスコルビン酸含有量(51.84 mg/100 g fresh weight)はやや少なかった。他のカンキツ類と比較すると、レモンのアスコルビン酸含有量は果汁中には多いが、果皮を含めた全果当たりの含有量で評価すると、オレンジやグレープフルーツなどの含有量が非常に高いことが示された。またアスコルビン酸の組織別の分布については、特に果皮に多く含まれており、オレンジやグレープフルーツではその傾向が特に顕著であった。一方でライムの総含有量は非常に低かった（30.27 mg/100 g fresh weight）が、果肉部分のアスコルビン酸量が果皮部分を上回るという顕著な特徴が見られた（果皮 10.98 mg < 果肉 19.29 mg/100 g fresh weight）。

Table 5-13 品種別レモンおよびカンキツの 100 g 当たりのアスコルビン酸の含有量

	レモン (緑)	レモン (黄)	メイヤー レモン	すだち	オレンジ	グレープ フルーツ	ライム
外果皮	33.76	14.23	23.29	60.43	59.28	48.49	6.53
中果皮	22.46	16.71	31.30	32.22	52.38	89.60	4.45
果肉	33.76	20.91	24.50	33.20	19.31	17.40	19.29
合計	89.99	51.84	79.09	125.84	130.97	155.49	30.27

カンキツ類 100 g 当たりの含有総量換算 (mg)

**Table 5-14 品種別レモンおよびカンキツの 100 g 当たりのクエン酸の含有量**

	レモン (緑)	レモン (黄)	メイヤー レモン	すだち	オレンジ	グレープ フルーツ	ライム
外果皮	68.6	155.6	10.6	44.2	—	—	50.8
中果皮	369.3	592.3	185.1	634.8	75.9	33.6	594.2
果肉	5455.4	5697.1	2702.1	3324.5	87.8	725.7	5023.1
合計	5893.4	6445.1	2897.9	4003.6	163.8	759.3	5668.2

カンキツ類 100 g 当たりの含有総量換算 (mg)

一方で、レモン全果当たりのクエン酸量は一般に 5～6%と言われているが、こちらに関しては大よそ近い値が示された。その含有量はレモン（青レモン 5.9 g, 黄レモン 6.4 g/100 g fresh weight）、ライム（5.7 g/100 g fresh weight）、すだち（4.0 g/100 g fresh weight）などの香酸カンキツ類で特に多く、一方でオレンジの含有量が少なかった（0.16 g/100 g fresh weight）。また、クエン酸のほとんどは果肉の部分に含まれており、果肉の含有量は果皮の含有量の 10 倍程度であった（香酸カンキツ類に限ると）。また、果皮の中でも外果皮＜中果皮となる傾向が見られた。オレンジやグレープフルーツなど酸味の少ないカンキツ類に関してはクエン酸量は少なく、またオレンジとの交配種であるメイヤーレモンも原種の半量以下の含有量であり、実際に酸味が弱かった。

#### 5-4-2 含有フラボノイドの主成分分析と新品種イエローベルの特徴付け

これまでに分析した各カンキツ類のフラボノイド分析の結果から、新鮮重 100 g 当たりの含有量をもとに、主成分分析による分類を試みた。なお主成分分析は相関行列に基づいて行った（Table 5-15A）。それぞれのカンキツ類に含まれるフラバノン配糖体の特徴からその相関関係を見ると、エリオシトリンとヘスペリジンは正の相関を示し、逆にエリオシトリンとナリンジンやネオヘスペリジンなどは逆相関していた。これらのことは、カンキツ類に含まれるルチノシドとネオヘスペリドシドの 2 種類のフラバノン配糖体に関して、これらに対比的な関係にあることを示している。つまり、すだちなどの例外は一部見られたものの、大きく分けるとカンキツ類が含むフラボノイドはルチノシド型かネオヘスペリドシド型のどちらかに偏って分布していることが改めて示された。

また、エリオシトリンとヘスペリジンの 2 種類に対して、他のフラバノン配糖体は逆相関の関係にあることが新たに示された。このことから、エリオシトリンとヘスペリジンを主に含むレモンは他のカンキツ類とは異なる特徴を持っていることが考えられた。

次に、それぞれの主成分の固有値および、寄与率などを Table 5-15 に、また個々の主成分スコアを Table 5-16 に示した。主成分 1 と主成分 2 の累積寄与率は 68.4%である。さらに主成分 3 までの累積寄与率は 81.8%となり、およそその全体図を説明することが出来ると考えられた。主成分 1 のスコアに着目すると、ナリンジンやネオヘスペリジンなどレモンには少ないネオヘスペリドシド配糖体の含有量の多い種類が高値を示した。逆にレモン類は全て負の値を示しており大きな特徴であったが、レモン類の中での違いは見出せなかった。

**Table 5-15 相関行列表と固有値表**

項目	ERI	NER	NRT	NRG	HSP	NHP
ERI	1.000	-0.243	-0.406	-0.286	0.552	-0.231
NER	-0.243	1.000	0.355	-0.011	-0.339	0.482
NRT	-0.406	0.355	1.000	0.821	-0.399	0.007
NRG	-0.286	-0.011	0.821	1.000	-0.364	0.064
HSP	0.552	-0.339	-0.399	-0.364	1.000	-0.313
NHP	-0.231	0.482	0.007	0.064	-0.313	1.000

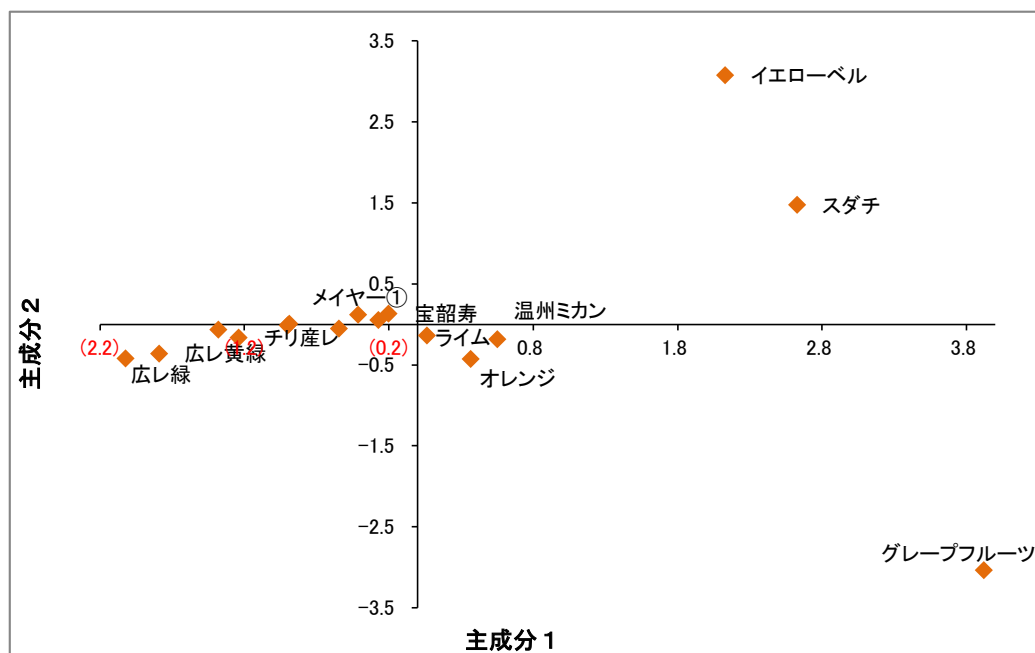
主成分 No.	固有値	寄与率 (%)	累積 (%)
1	2.7	44.6	44.6
2	1.4	23.8	68.4
3	0.8	13.3	81.8
4	0.6	10.0	91.8
5	0.4	7.3	99.1
6	0.1	0.9	100.0

**Table 5-16 主成分スコア**

No.	表記名	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5	主成分 6
1	広レ緑	-2.0247	-0.4179	1.3675	0.0789	1.2120	-0.0351
2	高レ黄緑	-1.3805	-0.0651	0.5430	0.2355	0.0874	0.0780
3	高レ黄	-0.8994	-0.0128	0.1141	0.1943	-0.6787	-0.0169
4	広レ黄緑	-1.7921	-0.3592	1.3146	0.2570	-0.1435	-0.1342
5	チリ産レ	-1.2386	-0.1645	0.5755	0.2309	-0.9717	-0.0735
6	メイヤー①	-0.5461	-0.0537	-0.7980	-0.3058	1.0747	0.3304
7	メイヤー②	-0.2729	0.0534	-1.1027	-0.2710	0.5470	0.3265
8	広レ緑②	-0.8878	0.0043	-0.1339	0.1010	-0.1553	0.1829
9	広レ黄②	-0.4132	0.1168	-0.6131	0.0870	-0.8680	0.1226
10	ライム	0.0622	-0.1356	-0.6398	-0.1766	-0.4300	-0.2744
11	オレンジ	0.3675	-0.4287	-0.6857	-0.5467	0.7428	-0.5200
12	グレープフルーツ	3.9180	-3.0330	0.5768	0.8574	0.0236	0.1163
13	スダチ	2.6263	1.4725	1.4399	-2.0562	-0.2343	0.1110
14	宝韶寿	-0.2008	0.1301	-0.9272	-0.0239	-0.6850	0.1706
15	温州ミカン	0.5524	-0.1832	-1.1671	-0.4370	0.0875	-0.3078
16	イエローベル	2.1296	3.0765	0.1360	1.7752	0.3915	-0.0762

そこで、第3主成分までの主成分スコアについて検討することとした。Fig. 5-3 は主成分1と主成分2のスコアをプロットした図である。メイヤーレモン (No. 6, No. 7) や宝韶寿 (No. 14) , またチリ産レモン (No. 5) など多くのレモン類はそれぞれが近隣に分布したが、広島県産レモン (No. 1, No. 2) などヘスペリジンの含有量が多い物はややその集団から遠い位置に分布する傾向が見られた。しかしながら、同じレモンであってもイエローベルにおいてはこれらの分布からかなり離れた反対の位置に分布した。

(A)



(B)

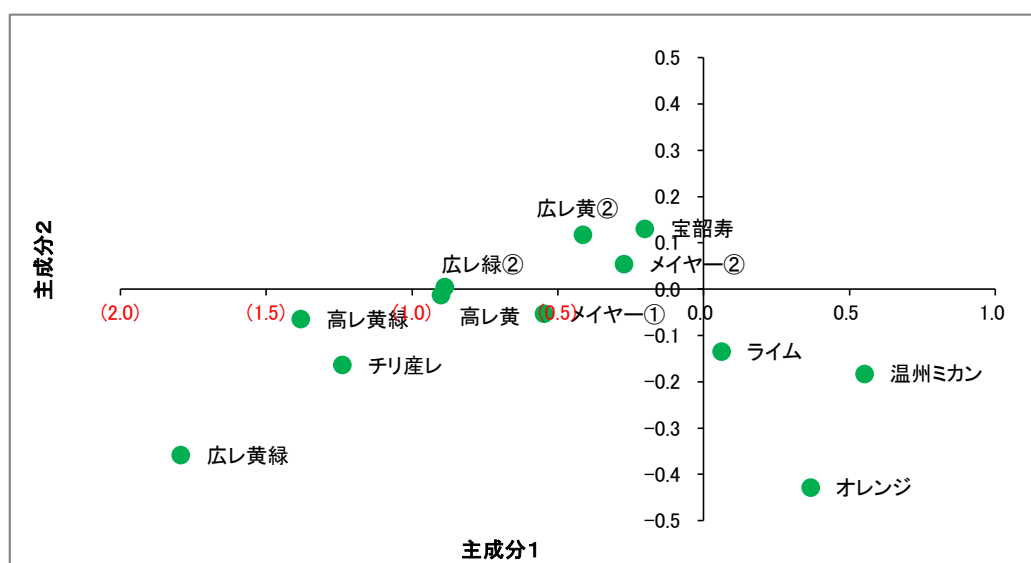


Fig. 5-3 主成分スコア（主成分1および2）に対する散布図 A とその拡大図 B

またグレープフルーツは右下と遠い位置に分布した．これらが含有成分の特徴から，主成分 2 の負の側はエリオシトリンの含有率（またはヘスペリジンを含ませた合計含有量）の高い群が分布する傾向にあった．また，ナリンジンやナリルチンを含む個体が右下，ネオヘスペリジンを含む個体が右上に分布する傾向がみられ，これらの関係がそれぞれの主成分に関与しているものと考えられる．しかしながら，ここではレモンの中での分布に大きな違いを見出すことはできなかった．

次に，Fig. 5-4 の散布図について検討すると，ここでもやはりグレープフルーツやイエローベルが集団から大きく離れる形で分布した．また，同じレモンでもやや分布にばらつきがみられ，フラバノン配糖体の総含有量とナリンジンやネオヘスペリジンなど，レモンにはあまり含まれていない種類の含有量が大きく影響しているものと考えられる．つまり，同じレモンであってもフラバノン配糖体の含有量の高い緑色のレモン（No. 1 や No. 4）などは集団から遠く（上側）に分布する傾向にあり，また，ナリンジンやネオヘスペリジンなどのネオヘスペリドース型の配糖体を含む個体は，レモンの分布集団から右側に離れていく傾向がうかがえる．これについては，さらに Fig. 5-5 で説明することができる．レモンの多くは主成分 3 のスコアが小さく軸付近に分布するが，ナリンジン，ネオヘスペリジン，またネオエリオシトリンなどのネオヘスペリドース型の配糖体の含有量が多いグレープフルーツ，スタチ，イエローベルは左右に離れて分布した．

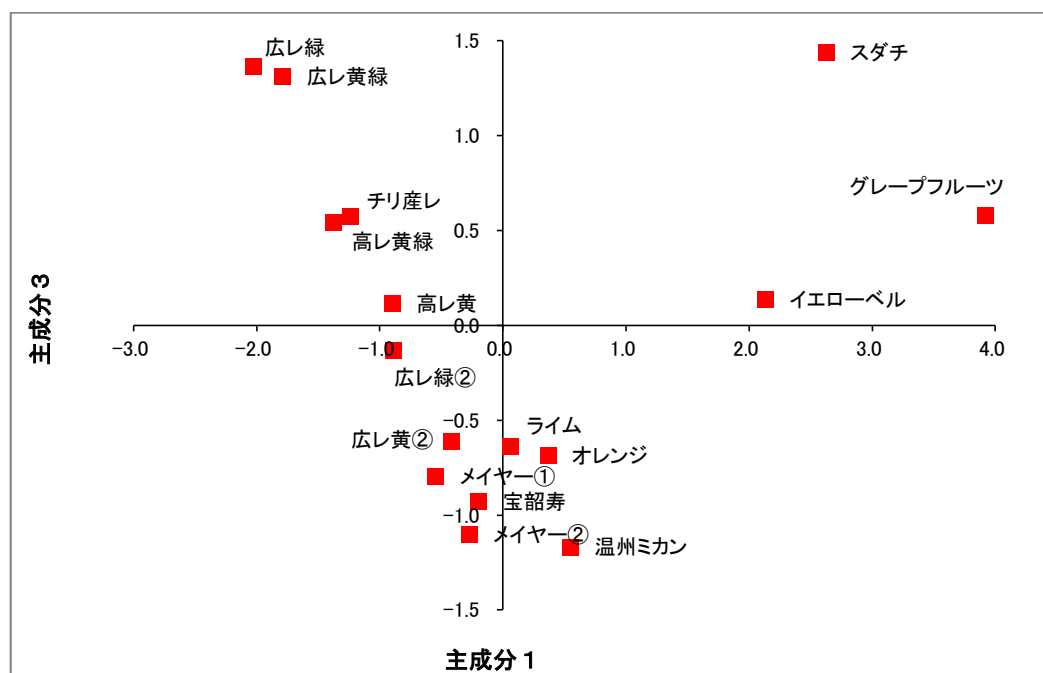


Fig. 5-4 主成分スコア（主成分 1 および 3）に対する散布図

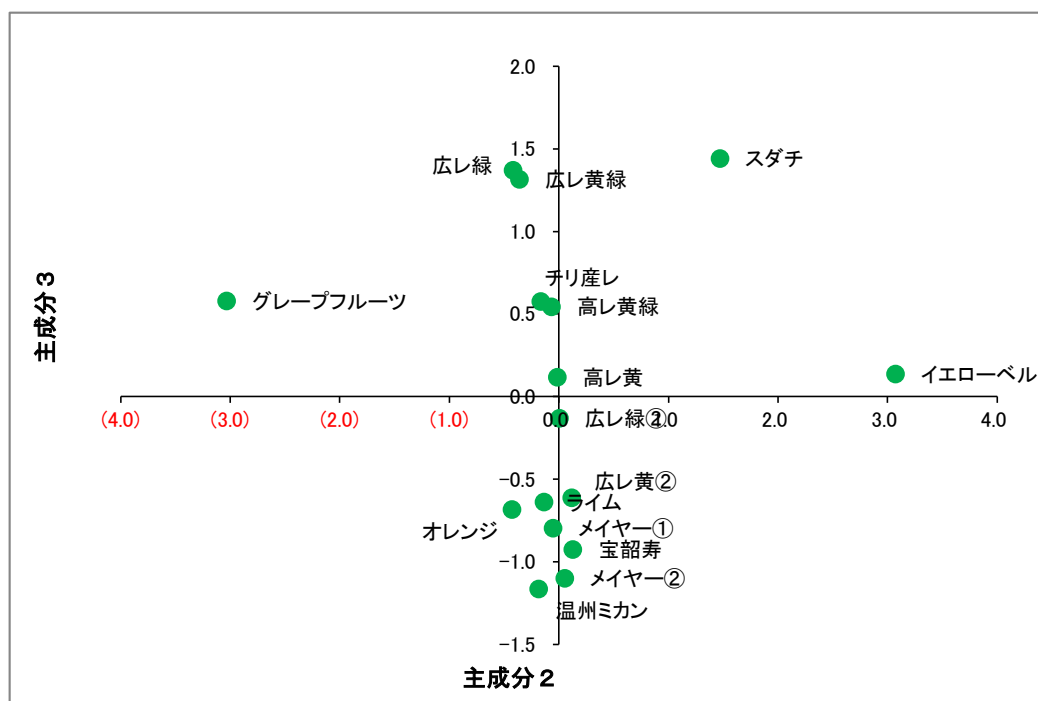


Fig. 5-5 主成分スコア（主成分2および3）に対する散布図 A とその拡大図 B

Fig. 5-3～5 において、ほとんどのレモンはその種類に関わらず近い部分に分布したが、その中で、フラボノイド配糖体、特にヘスペリジンの含有量の高いものがその分布から離れていく傾向が見られた。メイヤーレモンや宝韶寿などの交配種、そして黄色い成熟したレモンなどでは、全体的なフラバノン配糖体の含有量が少なく、それに伴い散布図の中心に固まって分布した。レモンはルチノース配糖体のエリオシトリンやヘスペリジンが含有成分のほとんどを占めるが、これらのレモンの分布特徴に対して、ネオヘスペリドース配糖体のナリンジンやネオヘスペリジンなどを顕著に含有するグレープフルーツやスダチなどは大きく離れた場所に分布し、その種類の違いを顕著に示した。このような分布背景をもとに、イエローベルに含まれる含有フラバノン配糖体からその特徴を考察すると、レモンの特徴がほとんどなく、むしろスダチやグレープフルーツなどに近く、香酸カンキツ類としての側面は見られるものの、レモンとは大きく離れた特徴を持つ個体であることが示唆された。



### 5-4-3 レモン中のフラボノイドの成熟時期による分布の変化

レモンが緑色から黄色く熟す過程でヘスペリジンの含有量が減少することを認め、さらにレモンに含まれるフラバノン配糖体のほとんどをエリオシトリンとヘスペリジンが占めることを示した。そこで、レモン 6 種類のエリオシトリンとヘスペリジンの全果 100 中の含有量について、その推移を調べた。

青レモンと黄色（黄緑）レモンを比較すると、黄色く熟していく過程でエリオシトリンとヘスペリジンの全体的な含有量は減少することが示された。つまり、広島産レモン（2012 年）では濃緑色 1169.1 mg/100 g > 黄色 974.32 mg/100 g，高知県産レモンでは黄緑色 781.65 mg/100 g > 黄色 539.03 mg/100 g，さらに入手時期の異なる広島レモン（2013 年）では黄緑色 544.24 mg/100 g > 黄色 297.38 mg/100 g と、いずれのロットにおいてもその差は顕著であった。

一方で、ヘスペリジンの含有量に着目してみると、広島産レモン（2012 年）では濃緑色 890.3 mg/100 g > 黄色 605.69 mg/100 g，高知県産レモンでは黄緑色 519.25 mg/100 g > 黄色 279.22 mg/100 g，さらに広島レモン（2013 年）では黄緑色 352.29 mg/100 g > 黄色 116.25 mg/100 g と顕著に減少していることが認められた。しかしながら、エリオシトリンに着目すると、広島産レモン（2012 年）では濃緑色 278.77 mg/100 g < 黄色 373.63 mg/100 g と若干の増加が見られたものの、高知県産レモンでは黄緑色 262.40 mg/100 g  $\div$  黄色 279.22 mg/100 g，さらに広島レモン（2013 年）では黄緑色 191.95 mg/100 g  $\div$  黄色 181.13 mg/100 g と、その含有量に大きな変化はみられなかった。

これらのことから、レモンが成熟し緑色から黄色への変化していく過程で顕著にフラバノン配糖体の含有量が減少し、その原因として主成分の 1 つであるヘスペリジンの含有量の減少が大きく寄与していることが明確になった。

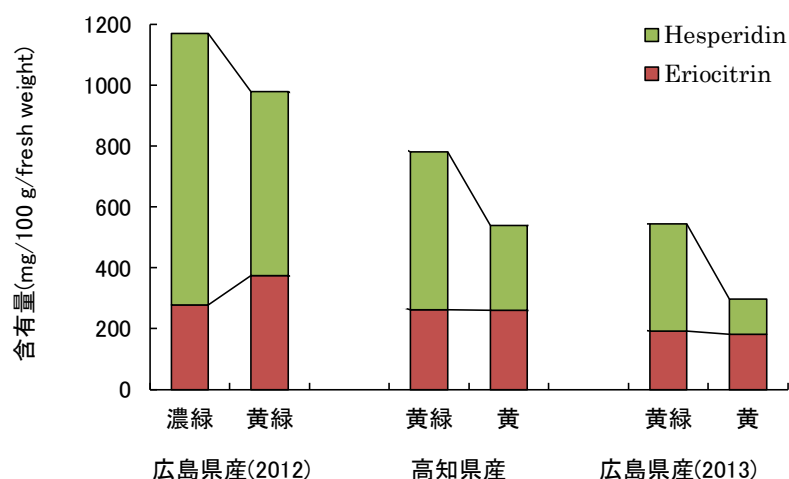


Fig. 5-6 成熟過程におけるエリオシトリンとヘスペリジンの含有量変化

## 5-5 小括

本章では、レモンをはじめとする16種類のカンキツ類について、フラバノン配糖体に着目した分析を行い、その特徴から新品種イエローベルや宝韶寿の特徴付けを行った。多くのレモンは、その品種や入手時期に関わらず、エリオシトリンとヘスペリジンの主成分として含有していた。また、スダチ、グレープフルーツやオレンジ、温州ミカンなどその他のカンキツ類では、ナリンジンやネオヘスペリジンなどを中心に含んでおり、その組成はレモンと大きく異なった(Table 5-3~5-10)。これらは、ルチノシドとネオヘスペリドシドという2種類のフラバノン配糖体として分類することができ、多くのカンキツ類はこの分布がどちらかの種類に偏っていた。この関係を用いるとレモンやライムなどの香酸カンキツ類はルチノシド型、その他グレープフルーツやスダチなどはネオヘスペリドシド型の配糖体の含有量が多いという特徴が確かめられた。この関係はさらにフラボノイド成分に注目した主成分分析においてより明確に認められた。一方で、レモンに限って比較してみると、いずれの主成分プロットにおいても同一分類区では重なりが大きかった(Fig. 5-3~5-5)。これについて、河合らは可食部位（果肉およびじょうのう膜）のフラボノイド組成に基づく主成分分析を検討し、同様に各分類区が重なることを報告している<sup>163)</sup>。本分析ではメイヤーレモンとの差や成熟度合において、それぞれに分布の違いが見られたが、明確な分類を行うためには各部位別の含有量などにも注目したより詳細な分析が求められる<sup>161)</sup>。

ここで、イエローベルはハッサク (*Citrus hassaku*) とナツミカン (*Citrus natsudaidai*) との交雑種が掛け合わさって出来たと言われており（広島県立総合技術研究所農業技術センター）報道でも取り上げられた。そこでイエローベルのフラボノイド組成に注目すると、ナリンジン (97.20 mg/100 g) とネオヘスペリジン (462.02 mg/100 g) の含有量が多いという特徴が見られた(Table 5-11)。そこで、ナツミカンおよびハッサクのフラバノン配糖体の特徴についてTable 5-17 に示した。ナツミカンはナリンジン (444 mg/100 g) , ネオヘスペリジン (114 mg/100 g) , ハッサクはナリンジン (303 mg/100 g) , ネオヘスペリジン (166 mg/100 g) と、その量の割合こそ異なるものの、同じ成分を主成分としていた。このことから、新品種イエローベルはレモンの成分的特徴よりもむしろ、ナツミカンの成分的特徴を有していた。つまり、ルチノシド型ではなくネオヘスペリドス型の配糖体の含有量が偏っていることを示している。従って、フラバノン配糖体のルチノシドおよびネオヘスペリドシドの生成に関与する2対の遺伝子のうちネオヘスペリドシド合成遺伝子は優性に発現するという報告<sup>153)</sup>と一致する。

**Table 5-17 ナツミカン 100 g 中のフラボノイド配糖体総含有量 (mg)**

	ERI	NER	NRU	NRG	HSP	NHP
ナツミカン ( <i>Citrus natsudaikai</i> )	0.0	7.9	26.2	444	11.7	114
ハッサク ( <i>Citrus hassaku</i> )	7.7	4.4	85.2	303	31.4	166

(野方洋一：近中四農研報(2005)より抜粋)

これらの分析の中で新たに、レモンの成熟過程において成熟前の青レモンには非常にヘスペリジンが多いことが認められ、さらに成熟するにつれ減少して行くことが明らかとなった。その一方でエリオシトリンに関してはほとんど変動しないか、ヘスペリジンの減少にともなってエリオシトリンがわずかに増加することが確認された。このヘスペリジンやエリオシトリンは、いずれの品種においても中果皮（アルベド）に多く分布していることが明らかであって、成熟の過程において顕著にヘスペリジンが減少する部位であった。現在のところレモン中のエリオシトリン合成は、ナリンジンからヘスペリジンに生合成された後にエリオシトリンに生合成されている可能性が考えられるが（Fig. 5-1），そのメカニズムについては明らかではない。

これまでもカンキツ中のフラバノン配糖体の含有量が季節推移することが示されている。土佐らはミカン類を中心に17種類のカンキツ類について、ナリルチンやヘスペリジン、ネオヘスペリジンが季節推移に伴って減少することを示している<sup>164)</sup>。また久保らはカンキツ類の季節推移に伴って抗アレルギー活性が低下することを示し、その活性主成分がヘスペリジンであることから、フラバノン配糖体が減少することを示唆している<sup>165)</sup>。また、このようなフラボノイド配糖体の季節推移に伴う現象は他の属の植物でも示されている<sup>166)</sup>。しかしながらこれらはいずれも摘果前のものであり、レモンについて、さらには摘果後の含有成分の変動について調べたものは本試験が初めてである。

以上をまとめると、本章ではカンキツ類の含有フラバノン配糖体に注目した品種間プロファイルを作成することによって、新たな開発品種であるイエローベルの特徴付けが可能であることを示した。そして、イエローベルが原種のレモンとは大きく異なり、掛け合わされたナツミカンの特徴を強く有していることが明らかとなった。さらにレモンの成熟状態の違いで、フラバノン配糖体やアスコルビン酸、またクエン酸の含有量が変化することを見出した。これらの成果は特定成分の有効利用や新品種の育種への応用に役立てられると考えられる。

## 第6章 総括

本研究の目的は、レモンの有するフラボノイドの包括的な解析および機能性や安全性の科学的な評価によって、レモンおよびそのフラボノイドの利用の可能性を明らかにすることである。そして、以下に総括するこれらの研究成果を広島県産レモンの利活用の拡大につなげようとするものである。

(1) レモン中に含まれるフラボノイド、ビタミン C、クエン酸およびリモノイドの部位別の含有量を詳細に分析し、特徴的なフラボノイド成分であるエリオシトリンの化学的特性を明らかにするとともに精製法を新たに確立した。レモンに含まれるフラボノイドはエリオシトリンとヘスペリジンの 2 つが主成分であり、これは他のカンキツ類には見られない特徴であった。これらのフラボノイドは果皮、特にアルベド中に圧倒的に多く、果汁に豊富に含まれるといわれるビタミン C も果皮部に多いことから、レモン果皮の有用性を示唆した。さらにレモンの主たるフラボノイド成分であるエリオシトリンを従来法より効率的に、かつ高純度で分離する方法を新たに確立し、非常に高い水溶性などの化学的特性を明らかにすることでエリオシトリンの新たな利用可能性を示した。

(2) レモンの機能性成分として本学が知財化したエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドを効率よくエリオシトリンから生成する方法を確立した。酸加水分解では中間生成物の制御が困難であり、さらに生成効率が非常に低かった。そこで、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性を有する酵素を用いてエリオシトリンの加水分解を試み、ヘスペリジナーゼやナリンギナーゼを用いて非常に高い効率でエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドを選択的に生成させることができた。さらに精製したエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドはエリオシトリンやエリオジクチオールよりも高い哺乳類由来の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を示した。新たに確立した酵素法によるエリオジクチオール 7-*O*-グルコシドの生成法は、ヒト  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性に着目したレモンの機能性食品開発に向けて、コスト面からも工業的に非常に有用なものと考えられる。

(3) レモンフラボノイドの機能性や安全性を細胞および動物レベルで解析し、その生物学的有用性を明らかにした。DPPH ラジカル消去活性試験および  $\beta$ -カロテン褪色法のいずれの試験法においても、レモンフラボノイドは強い抗酸化活性を示し、特にエリオジクチオールは過酸化水素やドキソルビシンによる細胞障害に対して細胞保護効果を示した。さらに、IEC-6 細胞に対してレモンフラボノイドの細胞障害性は他のフラボノイドに比べて著しく弱いことを明らかにした。レモンフラボノイドは強い抗酸化力とそれによる細胞保護効果を持つとともにその細胞障害性は非常に弱く、これらの結果はレモンフラボノイドが抗酸化物質さらには酸化抑制剤として非常に有効であることを示唆するものである。また、エリオシトリンについて、Wistar 系ラットを用いて体内動態について評価した結果、投与量

に対して確認された代謝物および未変換体の量は少なく、生体内では速やかに代謝分解されることが示唆された。

(4) カンキツ類の有するフラバノン配糖体に注目した品種プロファイリングを行うことで、レモンおよびその新たな開発品種の特徴付けが可能であることを示した。カンキツ類に含まれるフラボノイド配糖体は、ルチノシドとネオヘスペリドシドという2種類のフラバノン配糖体として分類することができ、これに基づいて新品種イエローベルはナツミカンの成分的特徴を有していることを明確にした。さらにレモンの成熟過程においてフラバノン配糖体やビタミンC、またクエン酸の含有量が著しく変化することを見出し、青レモンの活用の有用性を示唆した。このプロファイリング法は特定成分の有効利用や新品種の育種への応用に役立てることができると考えられる。

以上より、本研究では、レモンの成分分析、特にフラボノイドの詳細な分析からレモン特有のエリオシトリンを従来法より簡便に精製する方法を確立し、そのエリオシトリンから機能性成分となるエリオジクチオール7-*O*-グルコシドを効率的に生成する酵素処理法を新たに確立し、レモンの工業的利用への道を拓いた。さらに、これらレモンフラボノイドが他のカンキツ由来フラボノイドと比べて強い抗酸化活性を有し、酸化ストレスに対して保護的に機能すること、生体内動態については吸収、分布、代謝、排泄の面から分析して安全性が高いと推察された。本研究はレモン特有のフラボノイドの有用性を科学的に証明し、レモン果皮を含めた全部位の食品としての利活用に向けた可能性を示すものとして、得られた成果の応用が期待される。

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり，終始ご指導ご鞭撻頂きました公立大学法人県立広島大学大学院総合学術研究科生命システム科学専攻 武藤徳男教授に厚くお礼申し上げます．

また，副指導教員として多くのご助言，ご指導を頂きました公立大学法人県立広島大学大学院総合学術研究科生命システム科学専攻 野下俊朗准教授に深くお礼申し上げます．

また，大変お忙しい中，副査として本学位論文のご審査を賜りました公立大学法人県立広島大学大学院総合学術研究科生命システム科学専攻 田井章博教授，野下俊朗准教授，斉藤靖和准教授に深く感謝の意を表します．

そして，本研究に対して数々のご協力を頂き，充実した研究環境を与えて下さった公立大学法人県立広島大学生大学院総合学術研究科生命システム科学専攻および生命環境学部 武藤研究室の皆様に深く感謝致します．

最後に，どのような時も温かく見守り続けてくれた家族に心から感謝します．

## 引用文献

1. 明地柑尚：レモンー良質多収の国産栽培．農山漁村分化教会 (1989).
2. 堀田満，緒方健，新田あや，星川清親，柳宗民，山崎耕宇：世界有用植物辞典．平凡社 (1989).
3. 渡邊智子：果物と栄養教育（第7回食品成分表）．日本青果物輸入安全推進協会 (2014).
4. ワンダー・セラー著，高山林太郎訳：アロマテラピーのための84の精油．フレグランスジャーナル社 (1995).
5. ダニエル・ライマン著，林陽訳：香りの療法アロマテラピー．中央アート出版 (1993).
6. 守誠：ドキュメント日米レモン戦争．家の光協会 (1983).
7. 小縣昭雄，安藤弘，久保喜一，平賀興吾：チアベンダゾール(TBZ)のマウスを用いた催奇形性試験．東京衛研年報，29, 112 (1978).
8. 田山邦昭，井口重孝，平賀興吾：オルトフェノールのラットにおける急性経口毒性試験．東京衛研年報，31-2, 1-7 (1980).
9. 橋爪 清松，戸田 千登世，安井照代，永納秀男：マウスにおけるチアベンダゾール(TBZ)の体内挙動－TBZ 経口投与による雌マウスの腎への影響－：衛生化学 36(5), 413-418 (1990).
10. Miyake Y., Ito C., Itoigawa M.: Characteristics of flavonoids and coumarins in Meyer Lemon (*Citrus meyerii*). *J. Jpn. Soc. Food Sci.*, **58**, 178-181 (2011).
11. Duncan P. Thomas: Sailors, scurvy and science. *J. R. Soc. Med.*, **90**, 50-54 (1997).
12. Kjartan S.: Vitamin C in fish nutrition a review. *Fisk.Dir. Skr., Ser. Ernering*, **4**, 3-32 (1991).
13. Sato Y. and Ishigami A.: Scurvy is not a past disease. *The vitamin society of japan*, **11**, 609-611 (2008).
14. 村上光太郎：食べる薬草辞典．農文協 (2010).
15. 岡村俊彦，村上孝雄：天然物化学．廣川書店，224-225 (1967).
16. Renaud S. and de Lorgeril M.: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, **339**(8808), 1523-6 (1992).
17. Jürgen F. L., Tomas R. R., Paulus W. Véronique C., Angelika M. V. and Verena M. D.: Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*, **106**, 1614-1617 (2002).
18. Giuseppe L., Massimo F. and Gian C. G.: Red wine and cardiovascular health: the “French Paradox” revisited. *Int. J. Wine Res.*, **2**, 1-7 (2010).
19. 林七雄，内尾康人，岡野正義，貫名学，平田敏文，深宮齊彦，本田計一，松尾昭彦：天然物化学への招待－資源天然物の有効利用を目指して－．三共出版，20-25, (2003).
20. Dejan N. and Richard B. van Breemen: New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes. *ASPET Lett.*, **32**, 387-397 (2004).
21. Bentsath A., Rusznyak S. T., Szent-Gyorgyi A.: Vitamin nature of flavones. *Nature*, **138**, 798 (1936).
22. 神谷真太郎：ビタミンP．新ビタミン学（日本ビタミン学会），439-441 (1969).

23. Boris S., Walter H. E. and James B. R.: The biological activity of a flavonoid (vitamin P) compound. *J. Clin. Invest.*, **30**, 395–400 (1951).
24. 矢野俊博：ビタミン P はいま．発酵化学会誌，**70**, 410 (1992)．
25. Francisco O., Ezequiel Á., Hélène B. and Claire L.: Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase-inhibitory effects of hesperetin and hesperidin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **270**, 452-463 (2004).
26. Tanaka T., Makita H., Kawabata K., Mori H., Kakumoto M., Satoh K., Hara K., Sumida T., Tanaka T. and Ogawa H.: Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*, **18**, 957–965 (1997).
27. Kawaguchi K., Mizuno T., Aida K. and Uchino K.: Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 102-104 (1997).
28. Borradaile N. M., Carroll K. K. and Kurowska E. M.: Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids*, **34**, 591-598 (1999).
29. Galati E. M., Monforte M. T., Kirjavainen S., Forestieri A. M., Trovato A. and Tripodo M. M.: Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco.*, **40**, 709-712 (1994).
30. 久保道德，矢野眞紀，松田秀秋：（第 1 報）ウンシュウミカン果実の抗アレルギー作用 その 1．薬学雑誌，**109**, 835-842 (1989).
31. 松田秀秋，矢野眞紀，久保道德，飯沼宗和，大山雅義，水野瑞夫：柑橘類果実の薬理学的研究（第 2 報）ウンシュウミカン果実の抗アレルギー作用 その 2．フラボノイド成分について．薬学雑誌，**111**, 193-198, (1991).
32. Adriana P., Mariaelena A., Jeannette M. and Morella R. O.: Anti-sindbis activity of flavanones hesperetin and naringenin. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 108-109 (2003).
33. Kawano S., Tomizawa A., Hiura T., Osanai Y., Shouji A., Ujibe M., Ohtake T., Kimura K. and Ishikawa M.: Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma, S-180-implanted mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 527-530 (2005).
34. 食品機能性の科学編集委員会：食品機能性の科学，産業技術サービスセンター，1009-1020 (2008).
35. Dante G. G., Vincent P. M. and Jean G. T.: Effect of some citrus juice constituents on taste thresholds for limonin and naringin bitterness. *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 1277-1288 (1973).
36. Miller E. G., Fanous R., Rivera-Hidalgo F., Binnie W. H., Hasegawa S. and Lam L. K.: The effects of citrus limonoids on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **10**, 1535–1537 (1989).
37. Luke K. T. L., Ying L. and Hasegawa S.: Effects of citrus limonoids on glutathione S-transferase activity in mice. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 878-880 (1989).



38. Chi H. F., Hasegawa S. Zareb H. and Peter O.: Biosynthesis of limonoid glucosides in lemon (*Citrus limon*). *J. Sci. Food Agric.*, **54**, 393-398 (1991).
39. 松本亮司, 池田太亮, 吉岡照高, 山本雅史: 抗リモニン抗血清を用いた酵素免疫測定法によるカンキツの機能性成分リモニン配糖体の定量, 園学研, **7**, 481-489 (2008).
40. Shibu M. P, Edward D. H., and Bhimanagouda S. P.: Citrus Limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. *J. Nutr.*, **135**, 870-877 (2005).
41. Robert J., Hasegawa S., and Gary M.: The potential of citrus limonoids as anticancer agents. *Perishables Handling Quarterly Issue*, No. 102 (2000).
42. 食品成分研究調査編「日本食品成分表」, 東京, 医歯薬出版, 290-291, (2006).
43. 日本果汁教会「最新果汁・果実飲料辞典」, 東京, 朝倉書店, 467, (1997).
44. 堂本時夫: レモンの健康効果に関する研究の動向, 人間と科学, 県立広島大学保健福祉学部誌, 1-13 (2003).
45. 三宅義明, 山本兼史, 長崎大, 中井直也, 村上太郎, 下村吉治: ヒトにおけるレモン果汁およびクエン酸摂取が運動後の血中乳酸濃度に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌, **54**, 29-33 (2001).
46. Miyake Y., Yamamoto K., Morimitsu Y. and Osawa T.: Characteristics of antioxidative flavonoid glucosides in lemon fruit. *Food Sci. technol. Int. Tokyo*, **4**, 48-53 (1998).
47. Miyake Y., Suzuki E., Ohya S., Fukumoto S., Hiramitsu M., Sakaida K., Osawa T. and Furuichi Y.: Lipid-lowering effect of eriocitrin, the main flavonoid in lemon fruit in rats on a high-fat and high-cholesterol diet. *J. Food Sci.*, **71**, 633-637 (2006).
48. Miyake Y., Yamamoto K., Tsujihara N. and Osawa T.: Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids*, **33**(7), 689-695 (1998).
49. 堂本時夫ほか: 日常的なレモン摂取によるメタボリックシンドローム関連指標への影響, *Health Sciences*, **26**, 210-218 (2010).
50. Kumamoto H. Matsubara Y., Iizuka Y., Okamoto K. and Yokoi K.: Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in lemon peelings (Part 2). *Nippon Nougai Kagaku kaishi*, **59**, 677-682 (1985).
51. Gurdip S. and Om P. S.: Chemistry of essential oils of citrus species. *Natural Product Radiance*, 8-21 (2002).
52. Gracia P. B. and Graeme J. N.: Determination of the enantiomeric composition of limonene and limonene-1,2-epoxide in lemon peel by multidimensional gas chromatography with flame-ionization detection and selected ion monitoring mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, **36**, 37-43 (1998).
53. Yokogoshi H.: Japan Nutrition Review Brain and Nutrition: Is it possible to promote anti-stressful effect by food components? , Nestlé Nutrition Council (2007).
54. 大野一仁: 食品中の健康機能成分の分析法マニュアル. 愛媛県産業技術研究所 (2010).
55. 後藤昌義, 瀧下修一: 新しい臨床栄養学, 南江堂 (2006).

56. 杉浦実：果物と生活習慣病予防，治療， 84, 142-144 (2002).
57. Sugiura, M., Matsumoto, H. and Yano M.: Cross-sectional analysis of Satsuma mandarin consumption and health status according to data from self-administered questionnaire. *J. Health Sci.*, **48**, 366-369 (2002).
58. Itoh K., Masuda M., Naruto S., Murata K. and Matsuda H.: Antiallergic activity of unripe Citrus hassaku fruits extract and its flavanone glycosides on chemical substance-induced dermatitis in mice. *J. Nat. Med.*, **63**, 443-450 (2009).
59. Sawabe A., Kumamoto H. and Matsubara Y.: Bioactive glycoside in citrus fruit peels. *Bull. Inst. Compr. Agr. Sci. Kinki Univ.*, **6**, 57-67 (1998).
60. Miyake Y., Mochizuki M., Okada M., Hiramitsu M., Morimitsu Y. and Osawa T.: Isolation of antioxidative phenolic glucosides from lemon juice and their suppressive effect on the expression of blood adhesion molecules. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1911-1919 (2007).
61. Morishita T.: Effect on the taste and flavor of marmalade by combining citrus fruits. *J. Home Econ. Jpn.* **45**, 709-712 (1994).
62. Maeda G., Iha S. and Tsushida T.: Estimation of carotenoids, vitamin C, and polyphenols in traditional okinawan vegetables. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. **58**, 103-112 (2011).
63. Oba K., Watanabe A., Kaimoto H., Tomoto A. and Moriyama M.: Comparative study on the vitamin C content of fresh and cooked vegetables at mealtime. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. **58**(10), 499-504 (2011).
64. Kishi H. and Kawana K.: Determination method of isocitric acid in food additive citric acid. *Shokuhin Eiseigakushi*, **42**, 45-47 (2000).
65. Miyake Y., Yamamoto K. and Osawa T.: Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7-rutinoside) from lemon fruit (*Citrus Limon* BURM. f.) and its antioxidative activity. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **3**, 84-89 (1997).
66. Inoue T., Sugimoto Y., Masuda H. and Kamei C.: Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 256-259 (2002).
67. Matsubara Y. and Sawabe A.: Biologically active compounds in citrus fruit peels. *J. Syn. Org. Chem. Jpn.*, **52**, 78-87 (1994).
68. Soleiman A., Parvin Z. and Esmaeil M.: Quantitation of limonin in Iranian orange juice concentrates using high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Eur. Food Res. Technol.*, **221**, 202-207 (2005).
69. United states environmental protection agency: EPA chemical fate testing guideline “Water Solubility”. CG-1500, 1-16 (1982).
70. The organisation for economic co-operation and development: OECD guideline for the testing of chemicals section 1 “Water Solubility”. 105, 1-7 (1995).

71. Maeda H., Ozaki Y., Miyake M., Ifuku Y. and Hasegawa S.: Limonoid glucosides in Hassaku (*Citrus hassaku* Hort. ex Tanaka). *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **64**, 1231-1234 (1990).
72. Amit R. and Shailendra S.: Limonoids: Overview of significant bioactive distributed in plants kingdom. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 191-201 (2006).
73. Ishii T., Ohata H., Nogata Y., Yano M. and Hasegawa S.: Limonoids in seeds of Iyo Tangor (*Citrus iyo* hort. Ex Tanaka). *Food Sci. Technol. Res.*, **9**, 162-164 (2003).
74. Masukawa K., Komatsu H., Fujimura N., Fukuyama T., Fukushima M. and Ishikawa T.: Determination of hesperidin and its enzymatic hydrolysis products in Satsuma Mandarin by high performance liquid chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **32**, 864-869 (1985).
75. Suzuki Y. and Suzuki K.: Enzymatic formation of 4G- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-rutin. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 181-187 (1991).
76. Kometani T., Terada Y., Nishimura T., Takii H. and Okada S.: Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and transglycosylation at alkaline pHs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 517-520 (1994).
77. Evelyn B. Tilden and C. S. Hudson: Preparation and properties of the amylases produced by *bacillus macerans*. *National institute of health, Bethesda, Maryland*, 527-544 (1942).
78. Yamamoto M., Suzuki A. and Hase T.: Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **54**, 95-98 (2008).
79. Kometani T. Terada Y., Nishimura T., Takii H. and Okada S.: Transglucosylation to hesperidin by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1990-1994 (1994).
80. Aga H., Yoneyama M., Sakai S. and Yamamoto I.: Synthesis of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1751-1756 (1991).
81. Akiyama T., Yamada M., Yamada T. and Maitani T.: Naringin glycosides  $\alpha$ -glucosylated on ring B found in the natural food additive, enzymatically modified naringin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**(10), 2246-2249 (2000).
82. Emura K., Yokomizo A., Toyoshi T. and Moriwaki M.: Effect of enzymatically modified isoquercitrin in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **53**, 68-74 (2007).
83. Makino T., Shimizu R., Kanemaru M., Suzuki Y., Moriwaki M. and Mizukami H.: Enzymatically modified isoquercitrin,  $\alpha$ -oligoglucosyl quercetin 3-O-glucoside, is absorbed more easily than other quercetin glycosides or aglycone after oral administration in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 2034-2040 (2009).

84. Hirano T., Kawai M., Arimitsu J., Ogawa M., Kuwahara Y., Hagihara K., Shima Y., Narazaki M., Ogata A., Koyanagi M., Kai T., Shimizu R., Moriwaki M., Suzuki Y., Ogino S., Kawase I. and Tanaka T.: Preventative effect of a flavonoid, enzymatically modified isoquercitrin on ocular symptoms of hapanese cedar pollinosis. *Allergol. Int.*, **58**, 373-382 (2009).
85. Kurakane S., Yamada N., Sato H. and Igarashi K.: Anti-diabetic effects of *Actinidia arguta* polyphenols on rats and KK-A<sup>y</sup> mice. *Food Sci. Technol. Res.*, **17**, 93-102, (2011).
86. Hiramitsu M., Shimada Y., Kuroyanagi J., Inoue T., Katagiri T., Liqing Z., Nishimura Y. Nishimura N. and Tanaka T.: Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis. *Sci. Rep.*, **4**, 1-11 (2014).
87. Nakanishi H., Onose S., Kitahara E., Chumchuen S., Takasaki M., Konishi H. and Kanekatsu R.: Effect of environmental conditions on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity on mulberry leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 2293-2296 (2011).
88. Nasu R., Miura M. and Gomyo T.: Hffects of fruit, spices and herbs on  $\alpha$ -glucosidase activity and glycemic index. *Food Sci. Technol. Res.*, **11**, 77-81, (2011).
89. Jun W., Lu-Lu Z., Guo-Xia S., Fu-An W., Zhong-li C. and Shi-ming C.: A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin. *Afr. J. Biotechnol.*, **10**, 1460-1466 (2011).
90. Ieyama T., Maria D. P. T. Gunawan-Puteri and Kawabata J.:  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from the bulb of eleutherine americana. *Food Chem.*, **128**, 308-331 (2011).
91. Miyake Y., Sakurai C., Usuda M., Hiramitsu M. and Kondo K.: Preparation of a lemon flavonoid aglycone and suppressive effect on the susceptibility of LDL to oxidation following human ingestion. *Food Sci. Technol. Res.*, **15**, 83-88, (2009).
92. Inaba N., Ayano S., Ozaki Y., Maruyama K. and Miyake M.: Effective hydrolysis of hesperidin to prepare hesperetin 7-glucoside. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **43**, 1212-1218 (1996).
93. Ishikawa A., Yamashita H., Hiemori M., Inagaki E., Kimoto M., Okamoto M., Tsuji H., Alla N. M., Alli M. and Natori Y.: Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of *Nerium indicum*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **53**, 166-173 (2007).
94. 宮澤陽夫：過酸化脂質と生活習慣病. *Nestle Nutrition Council, Japan* (2007).
95. Oarada M., Miyazawa T., Fujimoto K. and Kaneda T.: Decrease in Spleen Weight and Blood Leucocytes Number with Long-Term Feeding of Oxidized Oil in Mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **34**, 163-166 (1988).
96. Oarada M., Miyazawa T. and Kaneda T.: Distribution of <sup>14</sup>C after oral administration of (U-<sup>14</sup>C) labeled methyl linoleate hydroperoxides and their secondary oxidation products in rats. *Lipids*, **21**, 150-154 (1986).
97. Scott M. G.: Oxidized LDL and atherogenesis: Relation to risk factors for coronary heart disease. *Clin. Cardiol.*, **16**, 3-5 (1993).

98. Violi F., Micheletta F. and Iuliano L.: Antioxidants and atherosclerosis. *Eur. Heart. J. Suppl.*, **4**, 17-21 (2002).
99. FFI ジャーナル編集委員会: FFI レポート(Technical Reports) 酸化防止剤としてのフラボノイド(1). 食品・食品添加物研究誌, **209**, 441-446 (2004).
100. FFI ジャーナル編集委員会: FFI レポート(Technical Reports) 酸化防止剤としてのフラボノイド(2). 食品・食品添加物研究誌, **209**, 622-628 (2004).
101. 大澤俊彦: 「フリーラジカル・活性酸素」障害評価への免疫化学的アプローチ. 日本栄養・食糧学会誌, **56**, 365-371 (1998).
102. Xican L., Jing L., Yaoxiang G., Weijuan H. and Dongfeng C.: Antioxidant activity and mechanism of rhizoma *Cimicifugae*. *Chem. Centr. J.*, **6**, 1-10 (2012).
103. Mikamo E., Okada Y., Semma M., Ito Y., Morimoto T. and Nakamura M.: Studies on structural-correlation with antioxidant activity of Flavonoids (1). *Jpn. J. Food Chem.*, **7**, 93-96 (2000).
104. Christine F. S. and Martyn T. S.: Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 375-383 (2000).
105. メリッサ・メルビー, 卓興鋼, 渡邊昌: 日本人のフィトケミカルの摂取量と健康影響. 大豆たん白質研究, Vol. 9 (2006).
106. Flavia A. R., Wagner V., Lourdes C. dos Santos and Eliana A. V.: Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (ames) test. *Molecules*, **17**, 5255-5268 (2012).
107. Kinae N. and Masuda S.: Studies on antimutagens (A review), *Environ. Mutagen Res.*, **24**, 129-144 (2002).
108. Giuseppe G. and Peter J. O'B.: Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 287-303 (2004).
109. Andrea Q., Jack W., Robert L. T and Kurt J. I.: Epithelioid cell cultures from rat small intestine, characterization by morphologic and immunologic criteria. *J. Cell Biol.*, **80**, 248-265 (1979).
110. 川端博秋, 小宇田智子, 斉藤桃実: ラット小腸由来株細胞 (IEC-6) における糖輸送単体の遺伝子発現に及ぼすグルコシルコイドの影響. 明治大学農学部研究報告, 第 124 号, 1-12 (2000).
111. Gallagher R., Collins S., Trujillo J., McCredie K., Ahearn M., Tsai S., Metzgar R., Aulakh G., Ting R., Ruscetti F. and Gallo R.: Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, **54**, 713-733 (1979).
112. 山田道之, 橋中一也: 骨髄性白血病細胞 HL-60 の細胞分化と遺伝子発現の調節. タンパク質核酸酵素, **36**, 41-53 (1991).

113. Suwei W., Eugene A K., Srigiridhar K., Joy J., Shasi K. and Kalyanaraman B.: Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms, intermediacy of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-and p53-dependent pathways. *J. Biol. Chem.*, **279**, 25535-25543 (2003).
114. Eun Y. C., Boonlert V., Hyun S. K., Yoon K. K., Sang I. K., Keun H. L. and Tae C. P.: Regulation of paclitaxel-induced programmed cell death by autophagic induction: A model for cervical cancer. *Obstet. Gynecol. Sci.*, **56**, 84-92 (2013).
115. Yamanaka S., Tatsumi T., Shiraishi J., Mano A., Keira N., Matoba S., Asayama J., Fushiki S., Henry F. and Nakagawa M.: Amlodipine Inhibits Doxorubicin-Induced Apoptosis in Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **41**, 870-878 (2003).
116. 水谷秀樹 : 抗がん剤による活性酸素種を介した DNA 損傷及びアポトーシス誘導機構. 薬学雑誌, **127**, 1837-1842 (2007).
117. Brett A. W., Crystaal B. E., Krzysztof J. R., Garry R. B. and C. Patrik Burns: Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in PC3 prostate cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **440**, 181-190 (2005).
118. Paolo S., Silvano G., Paola A., Patrizia F., Valeria M., Sabina N., Pierfranco R., Giorgio G., Alberto B., Franco P., Antonio B. and Claudio B.: Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **37**, 837-846 (2004).
119. Kanno S., Shouji A., Asou K. and Ishikawa M.: Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *J. Pharmacol. Sci.*, **92**, 166-170 (2003).
120. Xiao-yan Y., Pei-ying H., Juan D. and Jian-zhong Z.: Quercetin in combating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced early cell apoptosis and mitochondrial damage to normal human keratinocytes. *Chin. Med. J.*, **123**(5), 532-536 (2010).
121. 長尾清香, 佐藤拓也, 加藤伸一, チェン リ, 宮本有正 : 白金ナノコロイドによる過酸化水素由来細胞障害の抑制. 日口粘膜誌, **51**, 29-36 (2009).
122. Sutatip P., Prattep W., Ongart L., Nanteetip L. and Manote S.: Protective effect of silk lutein on ultraviolet B-irradiated human keratinocytes. *Biol. Res.*, **46**, 39-45 (2013).
123. Gunji S., Santoso J., Yoshie-Stark Y. and Suzuki T.: Effects of extracts from tropical seaweeds on DPPH radicals and Caco-2 cells treated with hydrogen peroxide. *Food Sci. Technol. Res.*, **13**, 275-279 (2007).
124. Shimoi K.: Circulating conjugated flavonoids and the sites of their metabolic activation. *Environ. Mutagen Res.*, **26**, 241-246 (2004).
125. Murota K., Shimizu S., Miyamoto S., Izumi T., Obata A., Kikuchi M. and Terao J.: Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: Comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J. Nutr.*, **132**, 1956-1961 (2002).
126. Augustin S. and Gary W.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols<sup>1</sup>. *J. Nutr.*, **130**, 2073-2085 (2000).

127. 竹山恵美子, 福島正子: ヒト消化管由来の Caco-2 細胞によるポリフェノールの腸管吸収モデル実験. 学苑・生活科学紀要, **806**, 37-39 (2007).
128. Murota K., Kawaii Y. and Terao J.: Transport mechanism of dietary flavonoids and their metabolites. *Vitamin (Japan)*, **84**, 589-598 (2010).
129. Murota K.: Integrated study of the intestinal absorption and bioavailability of dietary lipids and lipophilic food components. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **62**, 107-113 (2009).
130. Jaya B. V. and Thomas W.: Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)-epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *Pharm. Exp. Therap.*, **307**, 745-752 (2003).
131. Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Y., Yamamoto H. and Kinane N.: Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- $\beta$ -glucoside in rats and humans. *FEBS Lett.*, **438**, 220-224 (1998).
132. Murota K., Shimizu S., Chujo H., Jase-Hak M. and Terao J.: Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2. *Arch. Biochem. Biophys.*, **384**, 391-397 (2000).
133. Murota K. and Terao J.: Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. *FEBS Lett.*, **579**, 5343-5346 (2005).
134. Dejan N. and Richard B. B.: New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes. *ASPET Lett*, **32**, 387-397 (2003).
135. Chuan L., Mao-Jung L., Shuqun S., Xiaofeng M., Saileta P., Bozena W., Baoming H., Jee Y. C., Shunqi Y., Chi-Tang H. and Chung S. Y.: Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 177-184 (2000).
136. Helieh S. O. and Jeffrey L. E.: Green tea polyphenols mediated apoptosis in intestinal epithelial cells by a fadd-dependent pathway. *J. Cancer Ther.*, **1**, 105-113 (2010).
137. Zeng-hui T., Si-yuan Z., Yu-hua R., Xin-you L., Xi Y., Cheng-jun Y. and Qi-bing M.: Cellular absorption of anthraquinones emodin and chrysophanol in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1636-1643 (2007).
138. Oda M., Fujimoto K., Kobayashi M. and Saito H.: Bacampicillin uptake is shared with thiamine in Caco-2 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1344-1349 (2007).
139. Garry C., Kang N. T., Christophe W. nad Jeffery F.: High correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the malaysian rainforest. *Antioxidants*, **2**, 1-10 (2013).
140. 津志田藤二郎, 三上一保: 農林水産省補助事業食品機能性評価マニュアル集第II集. 日本食品化学工学会, 87-92 (2009).

141. Iwaida M., Ito Y., Tonogai Y., Suzuki H., Ogawa S., Hasegawa Y., Tanaka K., Kondo M. and Fujii M.: Microanalysis of residual hydrogen peroxide in foods-comparison of ultraviolet spectrophotometry, fluorometry and 4-aminoantipyrine colourimetry-. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **56**(6), 483-489 (1981).
142. Hasegawa N., Sugawara E. and Kashiwagi T.: A spectrophotometric determination of small amounts of hydrogen peroxide with peroxidase and 2,2'-azinodi[3-ethylbenzthiazoline sulfonate(6)]. *Bunseki Kagaku*, **30**, 470-474 (1981).
143. Shimamura T., Matsuura R., Tokuda T., Sugimoto N., Yamazaki T., Matsufuji H., Matsui T., Matsumoto K. and Ukeda H.: Comparison of conventional antioxidants assays for evaluating potencies of natural antioxidants as food additives by collaborative study. *Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi*. **54**, 482-487 (2007).
144. Nae-Cherng Y., Cheng-Hao L. and Tuzz-Ying S.: Evaluation of resveratrol oxidation in vitro and the crucial role of bicarbonate ions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 63-68 (2000).
145. Mikamo E., Okada Y., Semma M., Ito Y., Morimoto T. and Nakamura M.: Studies on structural-correlation with antioxidant activity of Flavonoids (2). *Jpn. J. Food Chem.*, **7**, 97-101 (2000).
146. Miyake Y., Yamamoto K., Morimitsu Y. and Osawa T.: Isolation of C-glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4619-4623 (1997).
147. Matuo M., Saaki N., Saga K. and Kaneko T.: Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 253-259 (2005).
148. Kawaii S., Tomono Y., Katase E., Ogawa K. and Yano M.: Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 896-899 (1999).
149. Yokomizo A. and Moriwaki M.: Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1317-1324 (2006).
150. Kobayashi S., Tanabe S., Sugiyama M. and Konishi Y.: Transepithelial transport of hesperetin and hesperidin in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 33-41 (2008).
151. Miyake Y., Sakurai C., Usuda M., Fukumoto S., Hiramitsu M., Sakaida K., Osawa T. and Kondo K.: Difference in plasma metabolite concentration after ingestion of lemon flavonoids and their aglycones in humans. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **52**, 54-60 (2006).
152. Horowitz R. M. and Bruno G.: Taste and structure in phenolic glycosides. *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 696-700 (1969).
153. Matsumoto R. and Okudai N.: Inheritance of flavanone neohesperidoside in citrus. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **60**, 201-207 (1991).



154. Efraim L., Lothar B., Yehuda M. and Jonathan G.: Flavanone glycoside biosynthesis in citrus, chalcone synthase, UDP-Glucose: Flavanone-7-*O*-glucosyl-transferase and -rhamnosyl-transferase activities in cell-free extracts. *Plant Physiol.*, **91**, 1323-1328 (1989).
155. Maria L. F. F., Sebastian P. R. and Paula C.: Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front. Plant Sci.*, **3**, 1-15 (2012).
156. Ahuva F., Oori W., Maor B. P., David V. H., Lloyd W. S., Francisco R. M., Efraim L., Robert f., Jonathan G. and Yoram E.: Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene Cm1, 2RhaT encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *Plant J.*, **40**, 88-100 (2004).
157. Maor B. P., Efraim L., Robert F. and Gonathan G.: UDP-rhamnose: Flavanone-7-*O*-glucoside-2''-*O*-rhamnosyltransferase, Purification and characterization of an enzyme catalyzing the production of bitter compounds in citrus. *J. Biol. Chem.*, **266**, 20953-20959 (1991).
158. Chletta Filho H. D., Machado M. A., Targon M. L. P. N., Moreira M. C. P. Q. D. G. and J. Pompeu Jr.: Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus spp.*) using RAPD markers. *Euphytica*, **102**, 133-139 (1998).
159. Gulsen O. and Roose M.L.: Chloroplast and nuclear genome analysis of the parentage of lemons. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **126**, 210-215 (2001).
160. Federici C. T., Fang D. Q., Scora R. W., Roose M. L.: Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (*Rutaceae*) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.*, **96**, 812-822 (1998).
161. 野方洋一: カンキツ果実の機能性成分の検索とその有効利用に関する研究. 近中四農研報, **5**, 19-84 (2005).
162. Nogata Y., Sakamoto K., Shiratsuchi H., Ishii T., Yano M. and Ohta H.: Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 178-192, (2006).
163. Kawaii S., Tomono Y., Katase E., Ogawa K. and Yano M.: HL-60 differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from *Citrus* juices. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 128-135 (1999).
164. Tosa S., Ishihara S., Toyota M., Yoshida S., Nakazawa H. and Tomimatsu T.: Studies of flavonoid in *Citrus*, Analysis of flavanone glycosides in the peel of *Citrus* by high performance liquid chromatography. *Shoyakugaku Zasshi*, **42**, 41-47 (1988).
165. Kubo M., Fujita T., Nishimura S., Tokunaga M., Matsuda H., Gato T., Tomohiro N., Sasaki K. and Utsunomiya N.: Seasonal variation in anti-allergic activity of *Citrus* fruits and flavanone glycoside content. *Natural medicines*, **58**, 284-294 (2004).
166. Mizuno M., Iinuma M., Tanaka T., Iwashima S., Sakakibara N.: Seasonal fluctuation of flavonol glycosides in epimedium species. *Yakugaku Zasshi*, **109**, 271-273 (1989).