

氏名	宮城 一菜
学位の種類	博士 (栄養科学)
学位記番号	博栄甲第 0007 号
学位授与の日付	平成 21 年 3 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (課程博士)
研究科専攻	栄養科学研究科 栄養科学専攻
学位論文題目	Synephrine in Shiikuwasha(<i>Citrus depressa</i> Hayata) :Analysis method,and its distribution in citrus varieties. (シークワシャー果実中のシネフリン : 分析法とカンキツ 品種における分布)
主論文公表雑誌	Food Science and Technology Research (第 15 巻,第 4 号,389 頁~394 頁,2009 年)
論文審査委員	(主査) 藤田 守 (副査) 太田 英明 (副査) 古賀 信幸

論文内容の要旨

【緒言】 沖縄県本島北部で生産されているシークワシャー(*Citrus depressa* Hayata)には、ノビレチン、タンゲレチンなどのポリメトキシフラボン類(PMF)が、我が国のカンキツ類の中で最も多量に含まれていることが確認されている。この PMF には、発ガン抑制、ガン転移抑制作用が報告され、注目を集めてきた。一方、シネフリンは、アドレナリン作用性(交感神経作動性)アミンの一種であり、陳皮(ミカンの皮)に含まれるフェンチルアミン誘導体である。本学の肥満クリニックボランティアの協力によるシークワシャーペーストを用いた食事試験において、血糖抑制作用に加え、新たに脂肪量低減作用が認められた。この脂肪量低減作用に対しては、シネフリンの関与が示唆され、交感神経を作動させることによって貯蔵脂肪分解が促進させられたと予想された。しかしながら、本成分は心拍数上昇、血圧上昇作用も有する可能性があるため、その正確な分析法の開発とともに、シークワシャーに含有される発ガン抑制成分、ノビレチン等の有用成分との分離技術の開発も強く望まれていた。本論文は、上記の状況を鑑み、シネフリンの迅速・正確な分析方法、カンキツ品種における分布、さらにノビレチン等の PMF とシネフリン分離技術の開発について検討を行った。

【実験材料および方法】 シネフリン用抽出溶媒試料：沖縄県農業試験場から 2005 年 12 月上旬に入手した果実を果皮と果肉に分離した凍結乾燥果皮を用いた。生育過程中的の調査対

象試料:2005年8月~翌年1月まで1か月ごとに大宜味および勝山地区の特定果樹から採取した果実の凍結乾燥品(果皮・果肉)を使用した。市販カンキツ果汁試料:オレンジジュース(4種類)、グレープフルーツジュース(4種類)、オレンジ・温州みかん混合ジュース(3種類)の計11種類および2005年12月上旬に入手した対照のシークワシャー果汁(勝山クガニ)の合計12種類を利用した。カンキツ45品種のシネフリン分布試料:2003年に農林水産省果樹試験場カンキツ部より入手したカンキツ44品種および沖縄県農業試験場より入手したシークワシャー(大宜見ガニ)1品種の計45品種から、アルベド部とフラベド部に分離した凍結乾燥果皮を用いた。高ノビレチン含有物調製試料:JAおきなわより2006年12月に収穫したシークワシャー果実の搾汁粕を入手し、その搾汁粕から果皮のみを取り分けた生果皮および凍結乾燥果皮を利用した。

シネフリン HPLC 分析条件の検討①カラム;LiChrospher 100:RP-18(ϕ 4.0×250mm, 5 μ m)、移動相;0.02Mクエン酸-0.02Mリン酸二水素ナトリウム(7:3)、波長;220nm、②カラム;Develosil ODS-5(ϕ 4.6×250mm, 5 μ m)、移動相;アセトニトリル-H₂O(2:98)-10mMリン酸、波長;223nm、③カラム;①と同じ、移動相;50%アセトニトリル-0.01Mギ酸、波長;210nm、④カラム;①と同じ、移動相;アセトニトリル-H₂O-SDS-リン酸(35:65:0.5:0.1, pH2.6)、波長;220nmを用いる4手法を比較検討した。

最適抽出溶媒の検討:生果皮 2.5g および乾燥果皮 0.5g にアルコール溶媒または有機溶媒 10ml を添加後、抽出操作を行い、その抽出溶液を HPLC 分析に供した。

シネフリン分離技術(高ノビレチン含有物調製技術)の開発:1)生果皮試料 10.0g と乾燥果皮試料 2.5g を用い、エタノール添加後、超音波抽出などの抽出操作を行い濾過した溶液を HPLC 分析用試料溶液とした。2)酵素(セルロシン HC100)処理後の生果皮試料にエタノールを添加後、振盪抽出などの操作を行い HPLC 分析に供した。3)酵素処理後の果皮固形物を恒温槽にて乾燥後粉末化し、抽出操作を行った後の溶液を試料溶液とした。

【結果および考察】シネフリンの標準品を使用して HPLC 分析条件を検討した結果、カラムに LiChrospher 100:RP-18 を利用する①③④の方法は、分離の悪いピークとなり保持時間も 10 分前後と長くなった。一方、②の方法では、分離が良い極めてシャープなピークが検出された。従って、以後の試験では条件②の方法を用いて実施した。次いで、シークワシャーの主要産地である大宜味地区と勝山地区の 2 系統間の生育中のシネフリン含量を調査した結果、系統別では、乾燥果皮 1.0g 当たりのシネフリン含量は、主に勝山地区の方が果皮・果肉ともに多かった。さらに、果皮・果肉別に見ると、大宜見・勝山両地区とも果皮部に大部分のシネフリンが存在することが明らかになった。また、田中らの分類に従ってカンキツ 45 品種におけるシネフリンの分布を調査した結果、ダイダイ区とミカン区に高濃度存在していた。その中でも最もシネフリン含量が多かったカンキツは夏ダイダイであり、次いでケラジ、オウトウ、ハッサクの順となり、シークワシャーは中程度の含有量であった。最終的に、45 品種中 30 品種のカンキツにシネフリンが存在することが認められた。

各種溶媒を用いて、PMF およびシネフリンを効率良く抽出するための最適抽出溶媒を検討

した結果、PMF では、生果皮では 90%エタノール、80%エタノール、アセトン - ヘキサン - THF (60:30:30)の順でその含量は多かった。乾燥果皮は 75%アセトン、50%アセトン、25%アセトンの順となった。一方、シネフリンは生果皮および乾燥果皮とも水 100%で最高値を示した。今回検討した溶媒の中では、75%アセトンで抽出した溶液中の PMF 含量が最も高かった。

シークワシャー果皮からシネフリンを分離して高ノビレチン含有物を調製するために、シークワシャー搾汁粕からの果皮を用いて調製法を検討した。その結果、酵素処理後に乾燥した果皮固形物を使用した調製法が、最もシネフリン量を低減し、高濃度のノビレチンを抽出することができた。さらに、この酵素処理後の乾燥果皮を用いて、前述したノビレチン最適抽出溶媒(アセトン - 水の混合溶媒)と組み合わせて抽出すると、アセトン 50%および 75%において、乾燥果皮試料 100g 当たりノビレチン含量が 1000mg 以上と、ノビレチンの高濃度化が可能となった。

以上から、本研究では、正確・迅速なシネフリン分析法を確立し、シネフリンの生育中の変化および品種間差を明らかにするとともに、シネフリンをシークワシャー果皮から分離した高ノビレチン含有物の開発の可能性を示すことができた。

論文審査結果の要旨

沖縄県本島北部で生産されている小型カンキツの一種であるシークワシャー(*Citrus depressa* Hayata)には、発ガン抑制、ガン転移抑制作用が報告されたノビレチン、タンゲレチンなどのポリメトキシフラボン類がカンキツ類の中で最も多量に含まれていることから、注目を集めてきた。一方、シネフリンは、アドレナリン作用性(交感神経作動性)アミンの一種であり、陳皮(ミカンの皮)に含まれるフェンチルアミン誘導体である。本学の肥満クリニックボランティアの協力によるシークワシャーペーストを用いた食事試験において、脂肪量低減作用が認められた。この脂肪量低減作用に対しては、シネフリンの関与が示唆され、交感神経を作動させることによって貯蔵脂肪分解が促進させられたと予想された。しかしながら、本成分は心拍数上昇、血圧上昇作用を有する可能性が大きいため、その正確な分析法の開発とともに、シークワシャーに含有される発ガン抑制成分、ノビレチン等の有用成分との分離技術の開発が強く望まれていた。

本研究は、シネフリンの迅速・正確な分析方法を設定し、それを応用してシークワシャー生育過程のシネフリンの動向、カンキツ品種における分布、さらに有用なノビレチンとのシネフリンを分離する技術を開発したものである。

本論文では、まず従来法に比べてシャープな分離ピークが得る条件を求め、シネフリンの優れた HPLC 分析法を構築している。それを用いたシークワシャーの分析調査から果皮部に大部分のシネフリンが存在すること、生育初期にシネフリン含量が比較的多いことを明らかにしている。また、田中らのカンキツ分類に基づくシネフリンの分布から、ダイダイ区と

ミカン区に高濃度存在し、シークワシャーは中程度の含有量であること示している。

また、シネフリンの抽出を抑えながら有用成分のノビレチンを効率良く抽出するための最適抽出溶媒を選択するとともに、工業的規模を前提にシークワシャー果皮から酵素処理と溶媒抽出とを組み合わせることによって、低濃度のシネフリンでノビレチンを高濃度化することに成功している。

以上、本論文は正確・迅速なシネフリン分析法を確立し、生育中の変化、品種間差を明らかにするとともに、シネフリンのシークワシャー果皮からの抽出を抑えた高ノビレチン含有物の調製を示しており、本学の学位論文として適格であると判断した。

最終試験結果の要旨

申請者に対して以下の質問を行った。

1. シネフリンは必ず取り除かないといけないのか
2. グレープフルーツにシネフリンが含まれていない理由
3. 実際に販売されているシークワシャーは何月のものが多いのか
4. この調製法を利用した製品化は可能なのか
5. シネフリン、オクトパミンをカテコールアミン類に分類しているが、カテコールアミン類ではないのではないのか
6. シネフリンの植物での生合成
7. アルベド部とフラベド部の分離方法
8. 遠心分離の加速度(g)について
9. シネフリン HPLC 分析条件で、条件 2 を採用した理由
10. 果実生育過程において、勝山地区の乾燥果皮試料が乾燥果肉試料よりも少ないのは、発表内容と矛盾してないか
11. 市販カンキツ果汁のシネフリン含量は多いはずだが、なぜシークワシャー果実中のシネフリンを除去するのか
12. 単位を 1g あたりと、100g あたりにしている理由
13. ミカン区でも全てのカンキツでシネフリンが多いわけではなく、特定の種で多い理由
14. エタノール系溶媒とメタノール系溶媒におけるシネフリン抽出含量が異なる理由
15. シネフリンの構造式からみて、その抽出効率を上げるためにはどうすればいいのか
16. 抽出時の pH における検討は行ったのか
17. シネフリン含量の効果がみられる摂取量、負の作用がみられた時の含量および制限量
18. シークワシャーの学名に Hayata とついているが、学名の後に命名された年数をいれなくてはならないのではないのか

審査結果

専門的な見地から、研究内容に対して、また関連分野に対して質疑を行った結果、的確な回答が得られたので、最終試験に合格したものと判定した。