

2015 年度

博士学位論文

植物ポリフェノールの利用に関する食品化学的
および食品機能学的研究

Food chemical and food functional studies on the
application of plant phenolics

植野 壽夫

中部大学

目次

略語一覧	3
序論	4
第 1 章 柑橘系飲料の風味劣化に対する植物ポリフェノールの添加効果	9
第 1 節 遮光下におけるシトラールの劣化とオフフレーバー生成機構	9
1.1.1 緒言	9
1.1.2 実験方法	10
1.1.3 結果および考察	12
1.1.4 要約	16
第 2 節 シトラール由来のオフフレーバーに対する紅茶テアフラビンの抑制効果	35
1.2.1 緒言	35
1.2.2 実験方法	35
1.2.3 結果および考察	38
1.2.4 要約	42
第 3 節 光照射によるシトラールの劣化と植物ポリフェノールによる劣化抑制効果	56
1.3.1 緒言	56
1.3.2 実験方法	56
1.3.3 結果および考察	58
1.3.4 要約	59
第 4 節 ビタミン B ₁ 由来のオフフレーバーに対する茶抽出物の抑制効果	68
1.4.1 緒言	68
1.4.2 実験方法	68
1.4.3 結果および考察	69

1.4.4 要約.....	69
第 2 章 ストレス関連症状に対するラベンダーおよびペパーミント由来ポリフェ ノールの摂取効果	72
第 1 節 ラベンダー抽出物の抗ストレス作用	72
2.1.1 緒言.....	72
2.1.2 実験方法	72
2.1.3 結果.....	75
2.1.4 考察.....	77
2.1.5 要約.....	78
第 2 節 ラベンダー由来の抗うつ様活性成分	86
2.2.1 緒言.....	86
2.2.2 実験方法	86
2.2.3 結果および考察.....	90
2.2.4 要約.....	93
第 3 節 ペパーミント抽出物の胃保護作用	102
2.3.1 緒言.....	102
2.3.2 実験方法	103
2.3.3 結果.....	107
2.3.4 考察.....	108
2.3.5 要約.....	109
総括	114
謝辞	117
参考文献	118
研究業績	131

略語一覽

AEDA	aroma extract dilution analysis
ANOVA	analysis of variance
CAA	caffeic acid
calcd.	calculated
DLA	3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid
EI	electron ionization
ESI	electrospray ionization
FD-factor	flavor dilution factor
Fr.	fraction
GC	gas chromatography
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectrometry
i.d.	inner diameter
IMP	imipramine
LE	lavender extract
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
OAV	odor activity value
prep	preparative
PE	peppermint extract
PTFE	polytetrafluoroethylene
RA	rosmarinic acid
RI	retention index
SU	sucralfate
TMS	tetramethylsilane
TOF	time of flight

序論

ポリフェノールとは

ポリフェノールとは、分子内に複数のフェノール性水酸基を有する化合物の総称であり、植物中にはフラボノイド類やフェノールカルボン酸類、タンニンなどが存在する。代表的なポリフェノールの化学構造を **Fig. 1** に示した。これらは元来、植物が紫外線や病害虫、細菌などから自らを防御するために作り出す二次代謝産物と考えられている¹⁾。いずれも基本的には優れた抗酸化剤であり、食品の加工、保存時における脂質の酸化防止に利用されてきた²⁾。また、近年、ポリフェノールの生理機能に関する研究が盛んに進められ、メタボリックシンドロームの予防や発癌抑制、骨密度の低下抑制、抗アレルギー作用、脳機能障害の改善など様々な生理機能が明らかにされている³⁾。本章では植物ポリフェノールの食品への利用について、「食品の風味劣化防止」と「ストレス関連症状の緩和」の二つの観点からこれまでの知見を述べ、最後に本研究の目的について述べる。

植物ポリフェノールによる食品の風味劣化防止

食品の成分は加工・保存時に熱や光、酵素、微生物などの影響を受けて変化を起こす。これらの変化が起こると本来の食品とは異なる風味（オフフレーバー）を引き起こす場合が多いが、一方ではその変化を楽しんだり、変化を利用して品質の改良を図ったりすることもある。食品の加工や保存時に起こる成分変化の中で、オフフレーバーの原因として最も重要なものは酸化である^{4), 5), 6), 7)}。特にリノール酸などの多価不飽和脂肪酸は酸化されやすく、自動酸化あるいは光増感酸化により脂質ヒドロペルオキシドを生成する (**Fig. 2**)。さらに、生成した脂質ヒドロペルオキシドは、熱や光、遷移金属イオンなどの影響により分解し、アルデヒド類やケトン類、アルコール類など様々な二次酸化生成物を生成する。これら二次酸化生成物が、例えば油脂製品では「酸敗臭」と表現されるようなオフフレーバーの原因になる。これに対し内因性あるいは外因性の植物ポリフェノールは、ラジカル消去作用や遷移金属イオンに対するキレート作用、紫外線吸収作用により脂質の酸化を防止し、その結果としてオフフレーバーが抑制される²⁾。これまで、植物ポリフェノールのオフフレーバー抑制効果は油脂や食肉、魚油、ナッツ

類，乳製品など主に脂質の酸化がオフフレーバーの原因になる場合について検討されてきた⁸⁾．一方，香気成分やビタミン類，アミノ酸など脂質以外の成分変化がオフフレーバーの原因になる場合も数多く報告されている．例えば，レモンの香気成分であるシトラールは，酸性溶液中では不安定であり，酸触媒による環化反応や酸化反応を経てオフフレーバーを生成することが知られている^{9), 10), 11), 12), 13)}．また，オレンジやグレープフルーツなど柑橘果汁の加工および保存時に生じるオフフレーバーの一部はビタミン B₁ に由来することが報告されている^{14), 15), 16)}．しかし，このような脂質以外の成分変化がオフフレーバーの原因になる場合について，植物ポリフェノールの添加効果が検討された例は比較的少ない¹⁷⁾．

ストレス関連症状に対する植物ポリフェノールの摂取効果

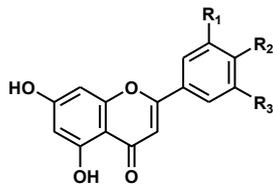
近年，ストレスが健康へ与える影響が深刻な問題になっている．ストレスとは元来，「物体に圧力を加えることで生じる歪み」を意味する物理学の用語であったが，ストレス学説を提唱した Selye は，外的刺激（ストレッサー）に対して生体が示す非特異的反応の総称としてストレスを定義した^{18), 19)}．本来，生体が示すストレス反応は，ストレッサーに対する生体の防御機構として必要不可欠なものである．しかし，高度な文明社会を営むヒトの場合，人間関係や仕事，家庭問題などの心理社会的要因が慢性的なストレス反応を引き起こし，これが不安障害やうつ病などの精神疾患の他，胃・十二指腸潰瘍，本態性高血圧，過敏性腸症候群，アトピー性皮膚炎，糖尿病など様々な疾患の原因になっている²⁰⁾．現代はストレス社会といわれストレス対策の重要性が認識されるようになって久しいが，国内のうつ病患者は依然として増加し続けており²¹⁾，ストレス性疾患の予防・軽減に役立つ食品の開発は重要な課題と考えられる．

ストレスに起因する様々な症状に対して，ラベンダーやペパーミントなどの西洋ハーブが伝統的に利用されてきた．ラベンダーは香りにリラックス効果があるとされ，乾燥した花から水蒸気蒸留によって得られる精油はアロマセラピーに広く利用されている²²⁾．また，ペパーミントは生薬として古くから消化器症状の改善に利用されてきた²³⁾．これらのハーブには精油以外にも有用な成分としてポリフェノールが豊富に含まれ，煎汁やチンキ剤として摂取した場合はその効果が期待できる．しかし，ストレス関連症状に対するラベンダーあるいはペパーミント由来ポリフェノールの有効性について，十分な科学的根拠は得られていない．

本研究の目的

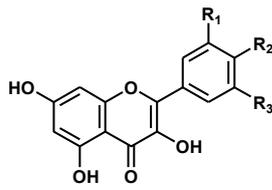
本研究の第一の目的は、柑橘系飲料の風味劣化に対する植物ポリフェノールの添加効果を明らかにすることにある。柑橘果実飲料や柑橘風味の清涼飲料水は、熱や光の影響を受けて風味が容易に変化する。その原因の一部は、前述のシトラールやビタミン B₁ など脂質以外の成分変化によるオフフレーバー生成である。そこで第 1 章では、シトラールおよびビタミン B₁ に由来するオフフレーバーの抑制とその作用機序の解明に取り組んだ。

本研究の第二の目的は、ストレス関連症状に対するラベンダーおよびペパーミント由来ポリフェノールの摂取効果を明らかにすることである。これらの植物は、i) ポリフェノールを豊富に含み、抗酸化性が高い、ii) 精油が多量に生産されており、その残渣をポリフェノールの供給源として利用可能、iii) 精油のリラックス効果²²⁾ や抗潰瘍効果²⁴⁾ が報告されており、精油とポリフェノールを一緒に摂取した場合の併用効果が期待できる、といった特徴があり、抗ストレス食品素材として興味深い。そこで第 2 章では、うつ病や急性胃粘膜障害を含むストレス関連症状に対するラベンダーおよびペパーミント由来ポリフェノールの摂取効果を検討した。



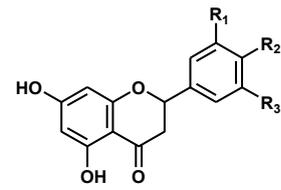
Flavones

$R_1 = R_3 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$: **apigenin**
 $R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: **luteolin**



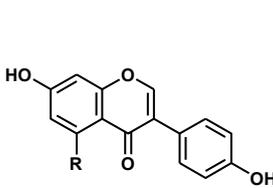
Flavonols

$R_1 = R_3 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$: **kaempferol**
 $R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: **quercetin**
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: **myricetin**



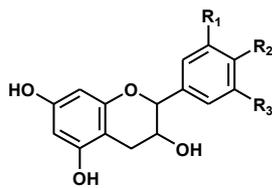
Flavanones

$R_1 = R_3 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$: **naringenin**
 $R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: **eriodictyol**
 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{H}$: **hesperetin**



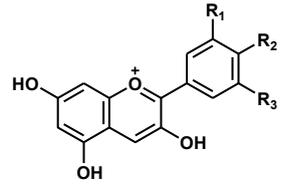
Isoflavones

$R = \text{H}$: **daidzein**
 $R = \text{OH}$: **genistein**



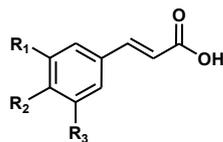
Flavanols

$R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: **catechin**
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: **gallocatechin**



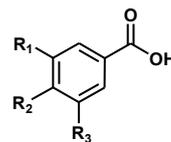
Anthocyanidins

$R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: **cyanidin**
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: **delphinidin**



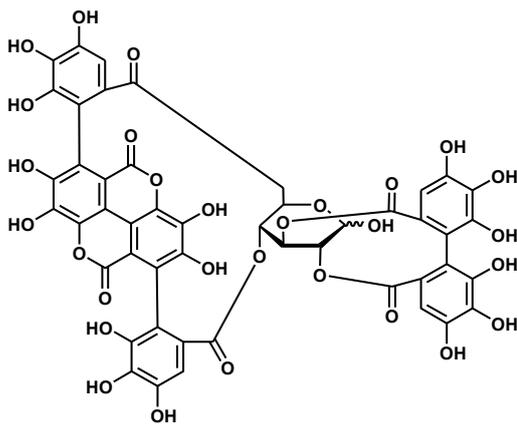
Hydroxycinnamic acids

$R_1 = R_3 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$: ***p*-coumaric acid**
 $R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: **caffeic acid**
 $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: **ferulic acid**
 $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OH}$: **sinapinic acid**

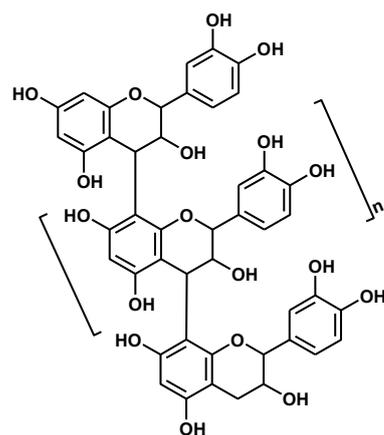


Hydroxybenzoic acids

$R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: **protocatechuic acid**
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: **gallic acid**



Punicalagin
 (a hydrolysable tannin)



Procyanidins
 (a type of condensed tannins)

Fig. 1 代表的なポリフェノールの化学構造

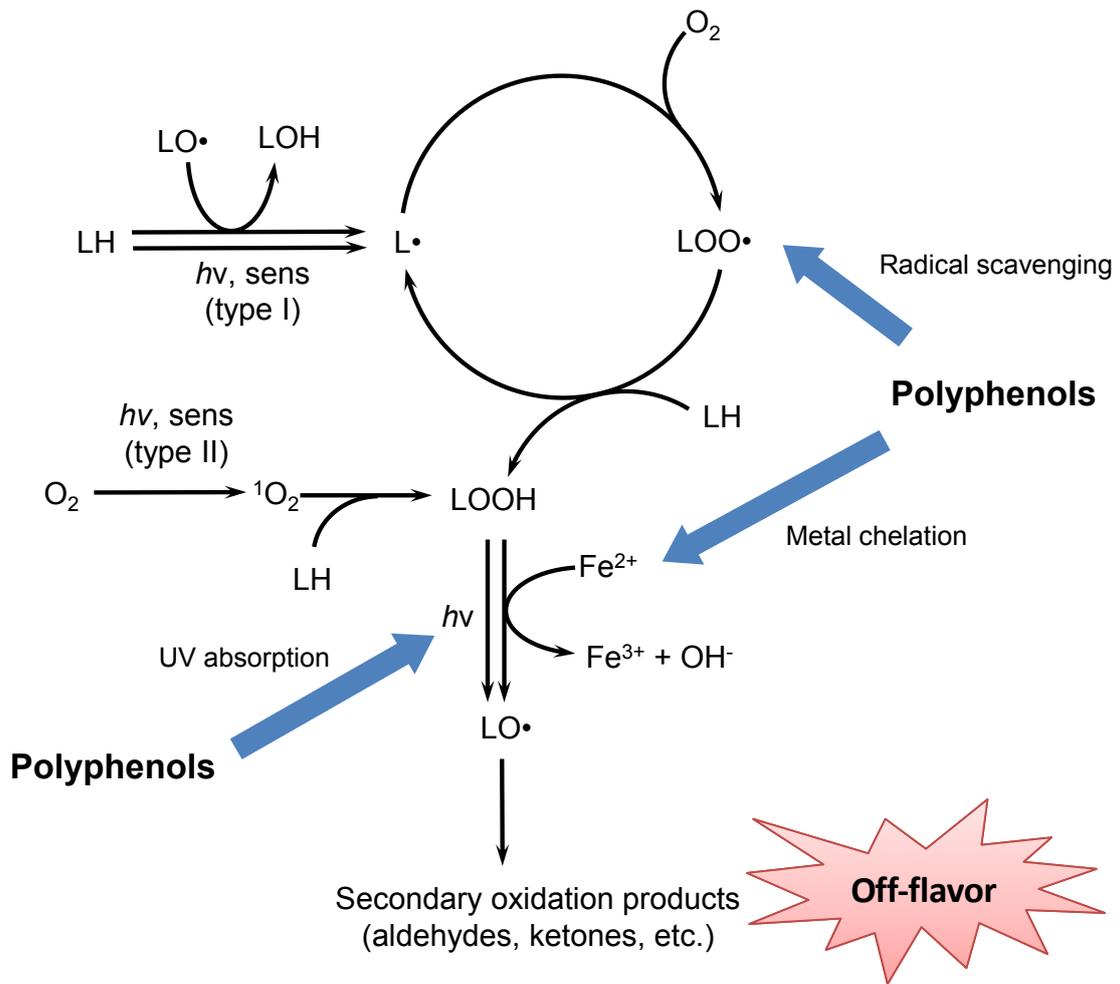


Fig. 2 脂質酸化によるオフフレーバーの生成と植物ポリフェノールによる酸化防止^{7),8)}

第1章 柑橘系飲料の風味劣化に対する植物ポリフェノールの添加効果

第1節 遮光下におけるシトラールの劣化とオフフレーバー生成機構

1.1.1 緒言

シトラールは、二つの立体異性体 geranial と neral (Fig. 3) からなる精油成分であり、新鮮なレモン様香気を有し、天然ではレモン果皮やレモングラスなどに存在する²⁵⁾。シトラールは食品にレモン風味を付与する目的で広く利用されているが、pH が低い食品中では不安定であり、酸触媒による環化反応や酸化反応を経て様々な化合物へと変化する。酸触媒によるシトラールの環化反応については、これまでに詳細な研究がなされ、その成果は Clark らの総説にまとめられている⁹⁾。反応の概略を Fig. 4 に示した。酸性水溶液中でシトラールは geranial と neral の互変異性体として存在するが、これらのうちシス体である neral は容易に酸触媒による環化を引き起こし、異性化や水和反応を伴って *p*-menthadien-8-ol 類や *p*-menth-2-ene-1,8-diol 類を生成する。さらに、これらの化合物は脱水反応を経て最終的には *p*-cymene へと変化する。

上述の酸触媒によるシトラールの環化反応は、飲料の殺菌や保存の過程で新鮮なレモン様香気が失われる主要な原因である。一方、劣化がさらに進行したときに起こるオフフレーバー（異臭）の発生には、酸化反応が重要な役割を果たしている。シトラールに由来するオフフレーバーの原因成分として、これまでに提案された化合物を Fig. 5 に示した。これらの中で *p*-cymene 以外の化合物の生成には、酸触媒反応だけでなく酸化反応が関与すると考えられる。木村ら¹⁰⁾ および Peacock と Kuneman¹¹⁾ は、*p*-cymene, α ,*p*-dimethylstyrene および *p*-cymen-8-ol が酸性条件下でシトラールから発生するオフフレーバーの原因であると推定した。一方、Schieberle らは、匂いの閾値を考慮した香気分析手法である aroma extract dilution analysis²⁶⁾ (AEDA) を用いて、シトラール¹²⁾ およびレモンオイル¹³⁾ の酸性エマルジョンの劣化によって発生するオフフレーバーを解析した。その結果、*p*-cresol と *p*-methylacetophenone がシトラールに由来するオフフレーバーの原因成分であると推定された。これら二つの化合物は、それ以前にオフフレーバーの原因成分として提案された *p*-cymene や α ,*p*-dimethylstyrene に比べて匂いの閾値が極めて低く、それぞれの匂いは “phenolic” および “bitter-almond-like” と表現されて

いる。シトラールから *p*-cresol と *p*-methylacetophenone が生成する経路については、シトラールが酸触媒反応によって環化した後、酸化を経て生成する経路が推定されたが、具体的な酸化のメカニズムは明らかにされていない。

本節では、酸性水溶液中、シトラールから発生するオフフレーバーの原因成分を AEDA により特定するとともに、オフフレーバー成分の生成メカニズムを検討した。

1.1.2 実験方法

1.1.2.1 実験材料

シトラールは Polarome International (Jersey City, NJ) より購入した。 *p*-Cymene および quercitrin は和光純薬工業株式会社より購入した。 *p*-Cymen-8-ol および α ,*p*-dimethylstyrene はシグマ アルドリッチ ジャパンより購入した。 *p*-Cresol, *p*-methylacetophenone および ascorbic acid はナカライテスク株式会社より購入した。 (+)-Catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate および (-)-epigallocatechin gallate は フナコシ社より購入した。 4-(2-Hydroxy-2-propyl)benzaldehyde は *p*-bromobenzaldehyde dimethylacetal (シグマ アルドリッチ ジャパン) を出発物質として *n*-ブチルリチウム存在下、アセトンと反応させる方法²⁷⁾により合成した。収量 13 mg (収率 31%); ¹H MMR (CDCl₃), δ 10.00 (s, 1H), 7.76 (AA'BB' aromatic quartet, 4H), 2.16 (brs, 1H), 1.61 (s, 6H) [agreed with the literature²⁷⁾]; MS (EI), m/z (relative intensity), 164 (2), 150 (10), 149 (100), 145 (5), 133 (3), 121 (4), 115 (5), 107 (6), 105 (5), 91 (7), 77 (14), 74 (4), 65 (3), 59 (6), 51 (10), 43 (94)。 8-Hydroperoxy-*p*-cymene は次に示す方法で合成した。 30% 過酸化水素 150 mL と 2.5% (w/v) 硫酸 15 mL の混合物に *p*-cymen-8-ol 150 mg を含むエタノール溶液 5 mL を攪拌下滴下し、室温で 1 時間攪拌した。反応混合物をジクロロメタン 250 mL で抽出、次いで水洗 (250 mL × 2) し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、ロータリーエバポレーターで約 1 mL まで濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲル薄層クロマトグラフィー [酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 5 (v/v)] で精製し、8-hydroperoxy-*p*-cymene 38 mg (収率 23%) を得た。MS (EI) および ¹H NMR スペクトルは文献値と一致した^{28), 29)}。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

1.1.2.2 熱安定性試験

シトラール 10 mg/L を含む酸性緩衝溶液 (0.1 M クエン酸-0.2 M リン酸水素二ナトリウム, pH 3.0) 100 mL を 110-mL 容のねじ口瓶に入れ, テフロンライナー付きキャップで蓋をして密閉し, 遮光された 40°C の恒温槽内で 2 週間保存した. Fe²⁺ 存在下における 8-hydroperoxy-*p*-cymene の安定性試験では, 2 mg/L の 8-hydroperoxy-*p*-cymene を含む酸性緩衝溶液 (0.1 M クエン酸-0.2 M リン酸水素二ナトリウム, pH 3.0) 100 mL に, 5 x 10⁻² M の硫酸鉄 (II) 水溶液 1 mL を加えた. 反応溶液は直ちに黄色く変色した. サンプル瓶に蓋をして振り混ぜた後, 室温で 30 分間放置した.

1.1.2.3 香気成分の抽出

反応終了後, シトラールあるいは 8-hydroperoxy-*p*-cymene の分解物をジクロロメタン (30 mL × 2) で抽出し, 内部標準として 0.1% (w/v) *n*-ペンタデカン/ジクロロメタン溶液 1 mL を添加した. 抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥した後, ロータリーエバポレーターで約 5 mL まで濃縮し, さらに窒素気流下で約 200 μL まで濃縮した.

1.1.2.4 ガスクロマトグラフィー (GC)

DB-1 カラム (60 m × 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, J&W Scientific) および水素炎イオン化型検出器 (FID) を搭載したアジレント社製 6890 N ガスクロマトグラフを使用し, 以下に示す条件で行った. 注入口温度, 100 °C ; 試料注入量, 1 μL ; スプリット比, 1 : 50 ; キャリヤーガス, 窒素 1 mL/min ; オープン温度, 80 °C — 210 °C (3 °C/min) , 210 °C (15 min) ; 検出器温度, 250 °C. シトラールおよびシトラール分解物の濃度は内部標準法 (内部標準物質: *n*-ペンタデカン) により定量した. FID に対するレスポンスファクターは全ての化合物について等しいと近似した.

1.1.2.5 ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS)

DB-1 カラム (60 m × 0.25 mm i.d.; 膜厚 0.25 μm; J&W Scientific) および Hewlett-Packard 社製 HP-5972 質量選択検出器を搭載した 5890 SERIES II ガスク

ロマトグラフを使用し，以下に示す条件で行った：注入口温度，250 °C；試料注入量，1 μ L；スプリット比，1:50；キャリアガスおよび流量，ヘリウム，1 mL/min；オープン温度，60 °C—210 °C（3 °C/min），210 °C（40 min）；イオン化電圧，70 eV；イオン源温度，140 °C.

1.1.2.6 核磁気共鳴分光分析法（NMR）

¹H NMR スペクトル（400 MHz）はブルカーバイオスピン社製 Advance 400 を使用し，重クロロホルム（CDCl₃）中，TMS（=0 ppm）を内部標準として測定した.

1.1.3 結果および考察

1.1.3.1 シトラールに由来するオフフレーバー成分の解析

シトラールの酸性水溶液を 40°C で 2 週間保存すると，新鮮なレモン様の香りは失われ，フェノール様あるいはアーモンド様のオフフレーバーが生成した．保存前後のシトラール溶液を GC 分析した結果，保存後の溶液ではシトラール（neral と geranial）が完全に消失し，環化生成物 **1-17** に変化していることが判明した（**Fig. 6, Table 1**）．これらシトラール由来の生成物のうち，いずれの化合物がオフフレーバーの原因であるかを特定するため，aroma extract dilution analysis²⁶⁾（AEDA）による香気寄与成分の解析を行った．AEDA は，匂い嗅ぎ GC を用いて分析試料中の香気成分の匂い強度を数値化する手法である．この手法では，分析試料から抽出した香気濃縮物を 2 倍ないし 4 倍程度の一定の倍率で段階的に希釈し，希釈倍率の低い方から高い方へ（濃度が高い方から低い方へ）順次匂い嗅ぎ GC を行う．このとき，希釈倍率が高くなる（濃度が低くなる）に連れて匂い嗅ぎ GC で検知される成分は減少するが，一つの成分がどの希釈倍率まで検知可能であるかは，その成分の希釈前の匂い強度に依存する．そこで，ある成分について，匂い嗅ぎ GC で検知可能な最大の希釈倍率をその成分の flavor dilution factor（FD ファクター）と定義し，相対的な匂い強度の指標とする．FD ファクターは，匂い嗅ぎ GC におけるその成分の閾値濃度と香気濃縮物中の濃度との比率を表している．また，横軸に GC の保持指標（retention index, RI），縦軸に FD ファクターをプロットした FD クロマトグラムは，ガスクロマトグラムと対比して匂いピークを視

覚化する目的で利用される。

保存後のシトラール溶液の香気を AEDA により解析した結果, **Fig. 7** に示す FD クロマトグラムが得られた. FD ファクターの高い上位 5 成分は RI の順に *p*-cresol (**3**, RI=1047), linalool (RI=1084), *p*-methylacetophenone (**6**, RI=1150), 8-hydroperoxy-*p*-cymene (**14**, RI=1314) および未知成分 (RI=1359) であった. これらの成分はそれぞれ「フェノール様」, 「新鮮な柑橘様」, 「アーモンド様」, 「フローラル」および「テルペン様」と表現される香気を有していた. FD ファクターの高さと香りの特徴から, *p*-cresol (**3**) と *p*-methylacetophenone (**6**) が保存後のシトラール溶液のオフフレーバーに寄与することが示唆された. 化合物 **3** と化合物 **6** は, シトラール¹²⁾ およびレモンオイル¹³⁾ の酸性エマルジョンの劣化によって発生するオフフレーバーの原因として, Schieberle らにより指摘された化合物である. 本研究においてもこれら 2 つの化合物が, シトラール由来のオフフレーバーの原因として示唆された.

1.1.3.2 シトラール由来の酸化生成物に対する抗酸化剤添加の影響

1.1.3.1 でシトラール由来のオフフレーバーの原因として示唆された *p*-cresol と *p*-methylacetophenone について, Schieberle らは酸化反応を含む生成経路を提案している¹²⁾. これらの化合物を含め, シトラールの劣化生成物 (**Table 1**) の中で酸化を経て生成すると考えられる化合物を **Fig. 8** に示した. 前述のとおり, *p*-cresol (**3**) の生成には酸化が関与すると推定されているが詳細な機構は不明である³⁷⁾. α ,*p*-Dimethylstyrene (**4**) と *p*-cymen-8-ol (**7**) は, *p*-menthadien-8-ol 類の自己酸化還元によって α -terpineol と共に生成すると考えられている¹⁰⁾. *p*-Methylacetophenone (**6**) は α ,*p*-dimethylstyrene (**4**) の酸化により生成する機構が提案されている³⁷⁾. 化合物 **10** および **11** は, シトラールの 6,7-位のエポキシ化を経由して生成する機構が提案されている³⁰⁾. 8-Hydroperoxy-*p*-cymene (**14**) と 4-(2-hydroxy-2-propyl)benzaldehyde (**17**) は, シトラールの劣化生成物として本研究により初めて見出された化合物であるが, これらの生成に酸化反応が関与することは化学構造から明らかである. 本研究では, これらシトラール由来の酸化生成物の生成経路を検討するため, 種々の抗酸化剤の添加による影響を検討した.

実験結果を **Table 2** に示す. 抗酸化剤を添加したときの酸化生成物の挙動は, 酸化生成物の種類および抗酸化剤の種類によって異なっていた. 例えば *p*-cresol (**3**) と 8-hydroperoxy-*p*-cymene (**14**) の濃度は, (+)-catechin の添加により減少し,

(-)-epicatechin gallate あるいは (-)-epigallocatechin gallate を添加した場合は著しく増加した。それとは対照的に α ,*p*-dimethylstyrene (4) と *p*-cymen-8-ol (7) の濃度は, (+)-catechin の添加により著しく増加し, (-)-epicatechin gallate あるいは (-)-epigallocatechin gallate を添加した場合はそれほど増加しなかった。また, *p*-methylacetophenone (6) と 4-(2-hydroxy-2-propyl)benzaldehyde (17) は, いずれの抗酸化剤を添加した場合も濃度が減少した。このような抗酸化剤を添加したときの酸化生成物への影響を解析した結果, 化合物 3 と 14, 化合物 4 と 7 および化合物 6 と 17 との間には, 抗酸化剤を添加したときの濃度にそれぞれ高い相関があることが判明した (Fig. 9)。化合物 4 と 7 の相関 ($R=0.993$) については, 化合物 4 が化合物 7 の脱水生成物であることから説明できる。興味深いことに, 1.1.3.1 においてシトラール由来のオフフレーバーの原因として示唆された化合物 3 および 6 の濃度は, 今回新たに見出された化合物 14 および 17 の濃度とそれぞれ高い相関を示した ($R=0.975$ および 0.995)。これらの結果から, 化合物 14 と化合物 17 はシトラール由来のオフフレーバー生成機構を解明する上で重要な成分であることが示唆された。

1.1.3.3 酸性水溶液中における 8-hydroperoxy-*p*-cymene (14) の安定性

次に, 1.1.3.2 で明らかになった化合物同士の相関の原因について検討した。まず, 8-hydroperoxy-*p*-cymene (14) とオフフレーバー成分である *p*-cresol (3) との関係については, 化合物 14 が化合物 3 の直接の前駆体であると推定した (Fig. 10)。化合物 14 の類縁体であるクメンヒドロペルオキシドは, 酸触媒による O-O 結合のヘテロティック開裂によりフェノールを生成することが知られている (Hock rearrangement³¹⁾)。これと同様の反応が化合物 14 に対して起これば化合物 3 が生成する。これを確認するため, 酸性条件下における化合物 14 の安定性を検討した。その結果, 化合物 14 は酸性水溶液中で保存することにより徐々に分解し, 化合物 3 へと変化することが明らかになった (Fig. 11)。また, 化合物 3 に加え, *p*-cymen-8-ol (7) および少量の α ,*p*-dimethylstyrene (4) も同時に生成した。これらの反応は, Fig. 12 に示すように全て酸触媒の反応機構によって説明することができる。

1.1.3.4 Fe²⁺存在下における 8-hydroperoxy-*p*-cymene (14) の分解

もう一つのオフフレーバー成分である *p*-methylacetophenone (6) と

4-(2-hydroxy-2-propyl)benzaldehyde (17) との関係については、これらの化合物が同じラジカル中間体 (18) を経由して生成するという仮説を立てた (Fig. 13) . ここでアルコキシラジカル 18 は、ヒドロペルオキシド 14 を鉄 (II) イオン (Fe^{2+}) 存在下で分解することにより生成可能である³²⁾ . この仮説を検証するため、 Fe^{2+} 存在下における 14 の分解を検討した. Fig. 14 に示すように、ヒドロペルオキシド 14 は酸性水溶液中、硫酸鉄 (II) (FeSO_4) の添加によって直ちに分解し、化合物 6, 7 および 17 を生成した. このときの化合物の定量結果を Table 3 に示した.

ヒドロペルオキシド 14 から化合物 6, 7 および 17 が生成する機構については、 Fe^{2+} の還元作用により 14 の O-O 結合がホモリティック開裂を起こし、生じたアルコキシラジカル 18 を共通の中間体として化合物 6, 7 および 17 が生成すると考えられる (Fig. 15) . ここで化合物 7 は、アルコキシラジカル 18 が Fe^{2+} により還元されることで生成可能である³²⁾ . 化合物 17 の生成については、アルコキシラジカル 18 からベンジルラジカル 19 への変換が関与すると考えられる^{33), 34), 35)} .

1.1.3.5 シトラール酸性水溶液中での *p*-methylacetophenone (6) および化合物 17 の生成機構

Fe^{2+} 存在下でのヒドロペルオキシド 14 の分解 (1.1.3.4) とは異なり、 Fe^{2+} 非存在下で化合物 14 を分解させた場合 (1.1.3.3) , 化合物 6 と 17 は殆ど生成しなかった. 一方、シトラール酸性水溶液中では Fe^{2+} 非存在下でも化合物 6 と 17 が生成した (1.1.3.1) . このことは、シトラール酸性水溶液中では Fe^{2+} による 14 の分解とは異なる経路で化合物 6 と 17 が生成することを示唆している. その可能性として、ヒドロペルオキシド 14 の前駆体であるペルオキシラジカル 20 から 14 を経由せずにアルコキシラジカル 18 を生成する経路が考えられる (Fig. 16, path A and B) . この経路には二つの可能性があり、1 つはペルオキシラジカル 20 の自己カップリング反応により生じたテトラオキサイドの分解であり^{36), 37), 38)} (path A) , もう 1 つは *p*-menthadien-8-ol 類のようなオレフィン類へのペルオキシラジカル 20 の付加とそれに続くアルコキシラジカル 18 の脱離である^{39), 40), 41)} (path B) .

シトラールからペルオキシラジカル 20 が生成する機構については、シトラールの酸触媒環化生成物である化合物 5 の脱水反応によって *p*-mentha-1,4(8),5-triene

(21) が生成し, 21 の自動酸化を経てペルオキシラジカル 20 が生成すると推定した (Fig. 17). 化合物 21 は, 酸性条件下でシトラールから *p*-cymene (2) が生成する際の間体としてその存在が推定されている⁴²⁾. しかし, 非常に不安定なため, シトラール酸性水溶液から化合物 21 を検出するのは困難と考えられる. Andemichael ら⁴³⁾ は, 化合物 21 は非常に酸化され易く, 短時間空気に暴露することで化合物 14 に変化すると報告している.

1.1.4 要約

本節では, 酸性水溶液中, シトラールの劣化によって発生するオフフレーバーの原因成分とその生成機構を検討した. AEDA による香気寄与成分探索の結果, *p*-cresol と *p*-methylacetophenone がシトラール由来のオフフレーバー成分であることが示唆された. また, シトラール由来の酸化生成物として 8-hydroperoxy-*p*-cymene (14) と 4-(2-hydroxy-2-propyl)benzaldehyde (17) を新たに同定した. さらに化合物 14 と 17 の生成は, オフフレーバー成分である *p*-cresol および *p*-methylacetophenone の生成とそれぞれ密接に関係することが, 抗酸化剤の添加実験ならびにモデル反応実験により示唆された. すなわち, 化合物 14 は *p*-cresol の直接の前駆体であり, 化合物 17 は *p*-methylacetophenone と共通のラジカル中間体を經由して生成すると考えられた.

これらの知見は, シトラールに由来するオフフレーバーの抑制方法を検討する上で基礎となる重要な知見と考えられる.

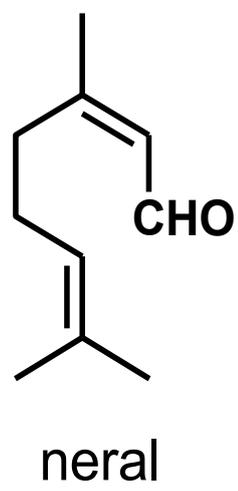
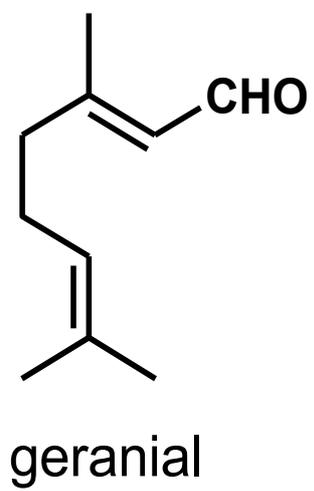


Fig. 3 Chemical structure of citral.

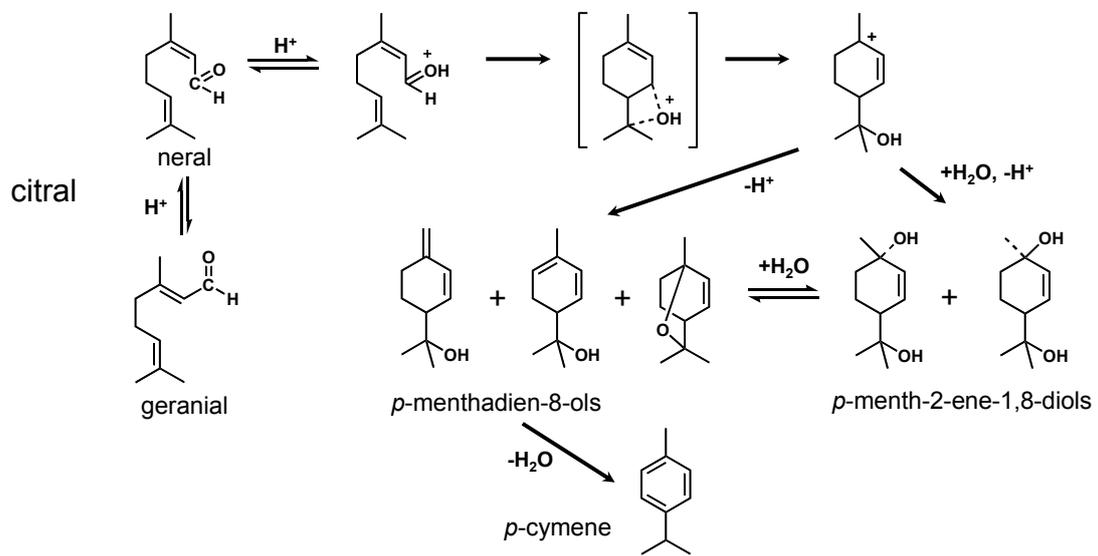


Fig. 4 Acid-catalyzed cyclization of citral⁹⁾.

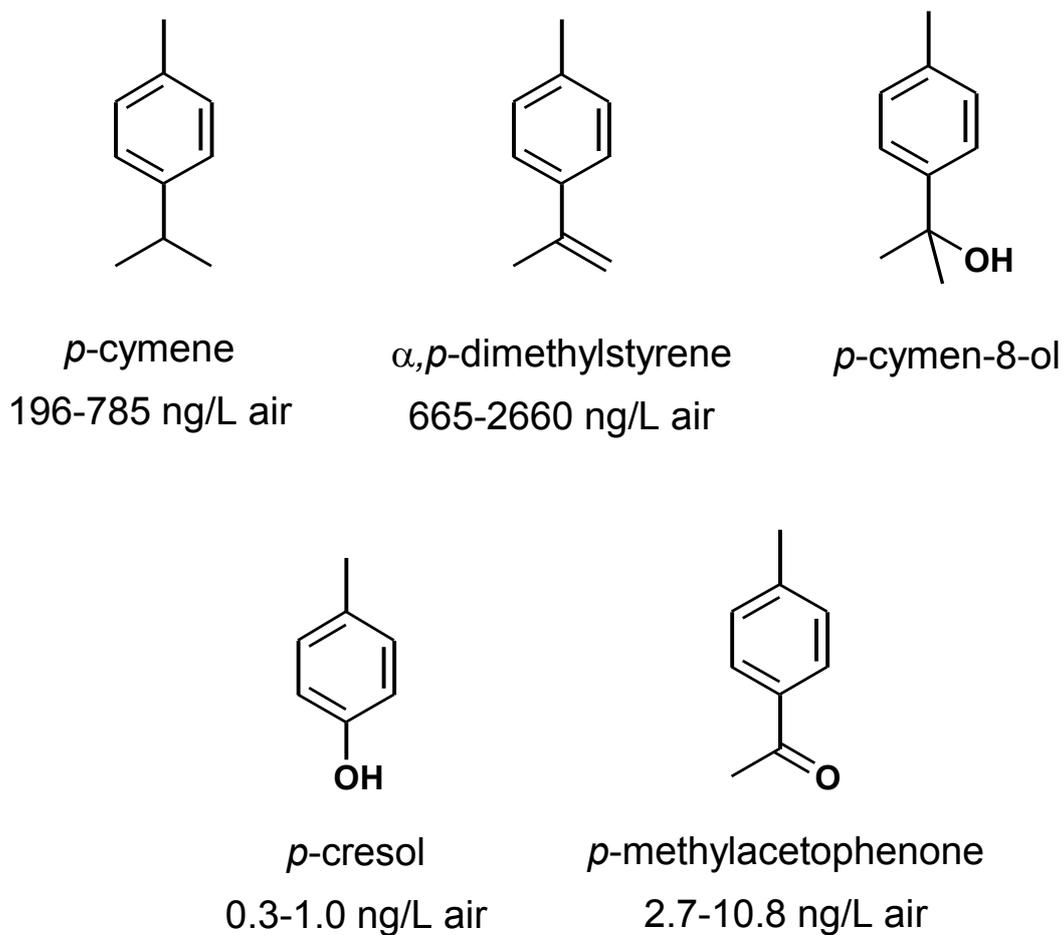


Fig. 5 Previously proposed off-odor compounds from citral^{10), 11), 12)} and their odor thresholds¹²⁾.

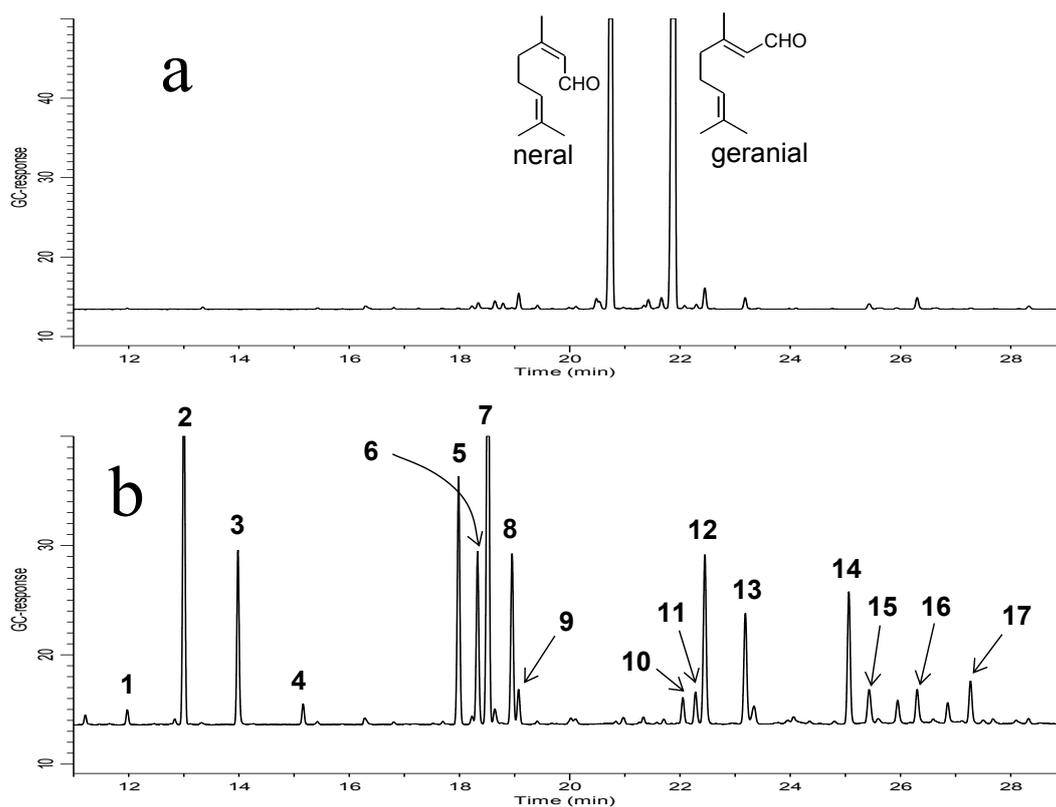


Fig. 6 Gas chromatographic analysis of the acidic buffer solution (pH 3.0) of citral (10 mg/L) (a) before and (b) after storage at 40 °C for 2 weeks. Numbers correspond to those in Table 1.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5677-5684 (2004). Copyright 2004 American Chemical Society.

Table 1 Degradation products detected in the acidic buffer solution (pH 3.0) of citral (10 mg/L) stored at 40 °C for 2 weeks.

no. ^a	compound	RI ^b	ID ^c method
1	2,3-dehydro-1,8-cineole	985	B
2	<i>p</i> -cymene	1017	A
3	<i>p</i> -cresol	1044	A
4	α , <i>p</i> -dimethylstyrene	1077	A
5	<i>p</i> -mentha-1,5-dien-8-ol	1150	B
6	<i>p</i> -methylacetophenone	1158	A
7	<i>p</i> -cymen-8-ol	1163	A
8	<i>p</i> -mentha-1(7), 2-dien-8-ol	1174	B
9	α -terpineol	1177	A
10	(2 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-2-formylmethyl-2-methyl-5-(1-hydroxy-1-methylethyl)-tetrahydrofuran	1249	C
11	(2 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *)-2-formylmethyl-2-methyl-5-(1-hydroxy-1-methylethyl)-tetrahydrofuran	1254	C
12	<i>trans-p</i> -menth-2-ene-1,8-diol	1259	B
13	<i>cis-p</i> -menth-2-ene-1,8-diol	1276	B
14	8-hydroperoxy- <i>p</i> -cymene	1321	A
15	<i>trans-p</i> -menth-1-ene-3,8-diol	1330	B
16	<i>cis-p</i> -menth-1-ene-3,8-diol	1351	B
17	4-(2-hydroxy-2-propyl)benzaldehyde	1365	A

^a Numbers correspond to those in **Fig. 6**. ^b Retention index on DB-1 (60 m). ^c Identification method: A, mass spectrum and retention index agree with those of authentic compounds; B and C, compounds were tentatively identified on the basis of the following criteria: (B) mass spectrum agrees with that of the Wiley mass spectral database (Agilent Technologies, 2000) and RI agrees with literature value¹¹⁾, or (C) mass spectrum agrees with literature spectrum³⁰⁾.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5677-5684 (2004). Copyright 2004 American Chemical Society.

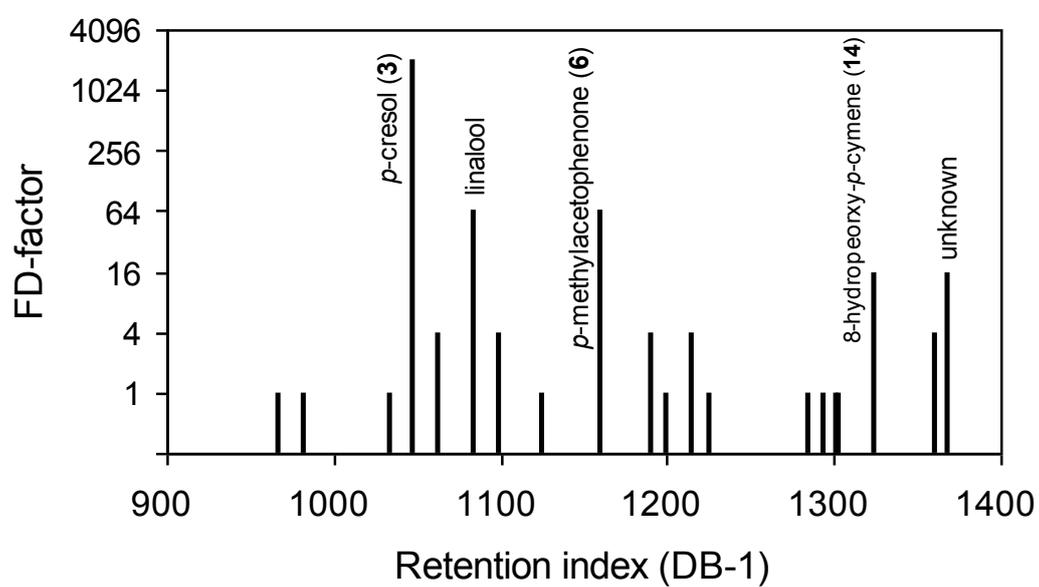


Fig. 7 Flavor dilution chromatogram of the acidic buffer solution (pH 3.0) of citral (10 mg/L) after storage at 40 °C for 2 weeks. Numbers correspond to those in Table 1.

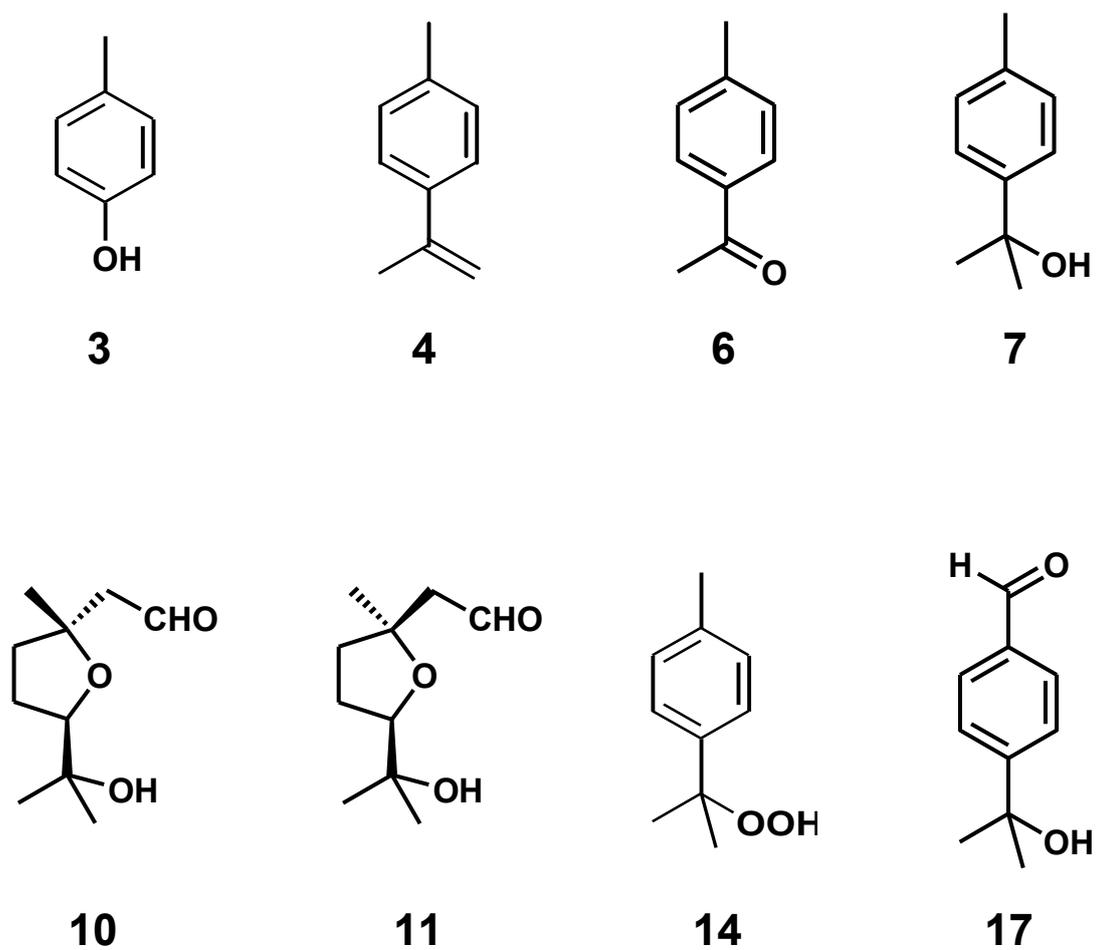


Fig. 8 Chemical structures of oxidation products from citral. For chiral compounds, only one enantiomer is given. Numbers correspond to those in Table 1

Table 2 Effects of antioxidant addition on the formation of the oxidation products (3, 4, 6, 7, 14, and 17) from citral under acidic aqueous conditions.

antioxidant ^a	concentration of compound ^b (µg/L)					
	3	4	6	7	14	17
control	197	24	209	677	171	29
(+)-catechin	170 ^c	68	23 ^c	1589	134	trace
(-)-epicatechin (EC)	344	42	45	1018	278	3.2
(-)-epigallocatechin (EGC)	299	65	29	1402	263	trace
(-)-epicatechin gallate (ECg)	592	28	21	805	618	trace
(-)-epigallocatechin gallate (EGCg)	556	30	28 ^c	835	565	trace
quercitrin	514	22	106	624	625	11
ascorbic acid	132	23	137	654	152	19

^a Sixty mg/L of an antioxidant was added to an acidic buffer solution (0.1 M citric acid-0.2 M sodium hydrogen phosphate, pH 3.0) containing 10 mg/L of citral. ^bConcentration was determined after the storage of the citral solution at 40 °C for 2 weeks. Each value is the mean of five experiments. Coefficient of variation for each value was less than 10% unless otherwise specified. ^c Coefficients of variation ranged from 10 to 20%.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5677-5684 (2004). Copyright 2004 American Chemical Society.

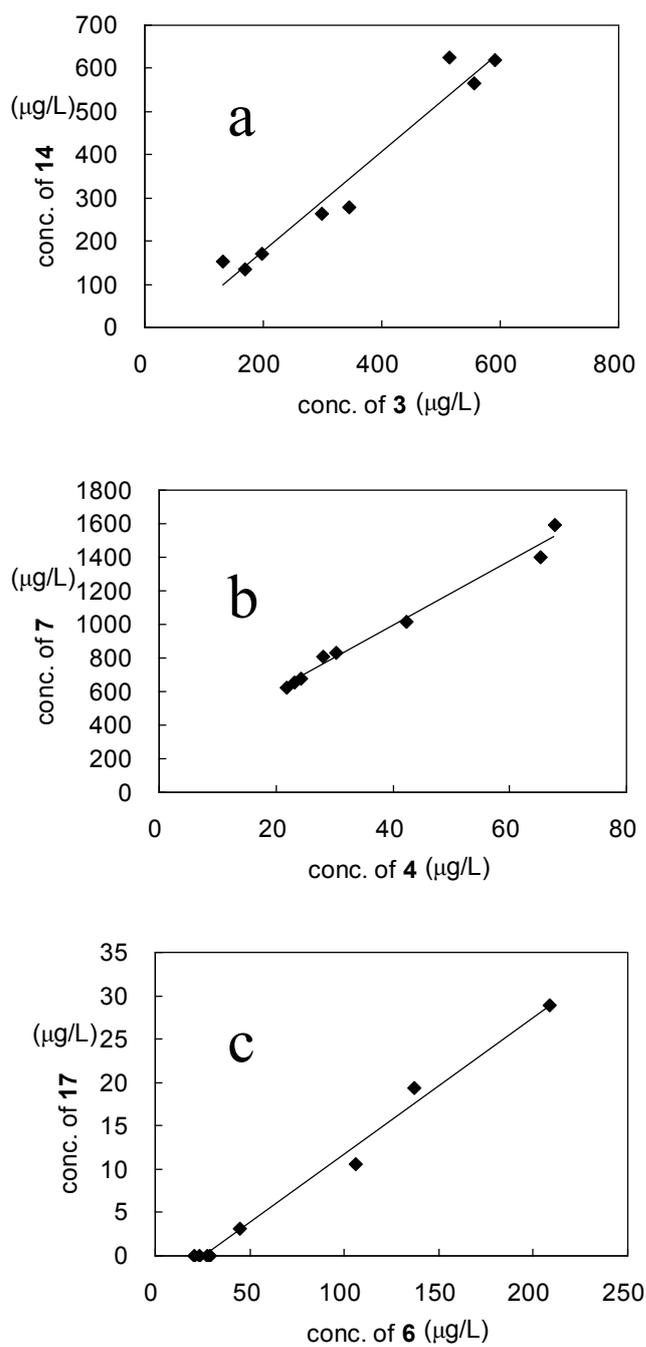


Fig. 9 Linear relationships between the concentration of (a) compounds 3 and 14, (b) 4 and 7, and (c) 6 and 17 in the citral solution stored with antioxidants (data from Table 2).

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5677-5684 (2004). Copyright 2004 American Chemical Society.

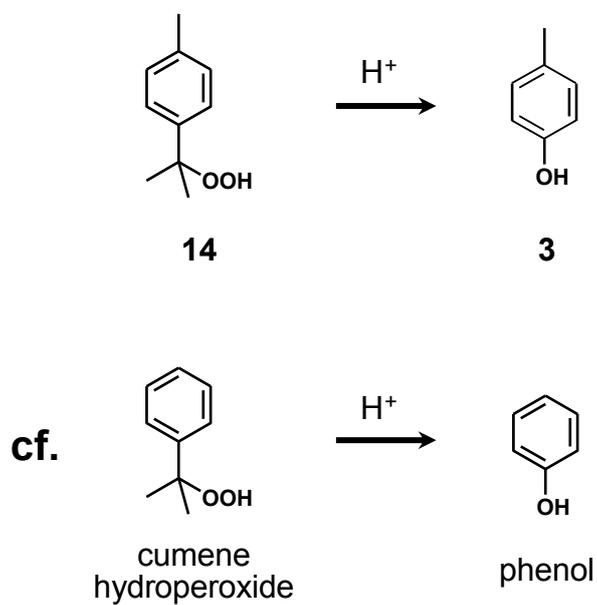


Fig. 10 Hypothetical formation of *p*-cresol (**3**) from 8-hydroperoxy-*p*-cymene (**14**) by Hock rearrangement.

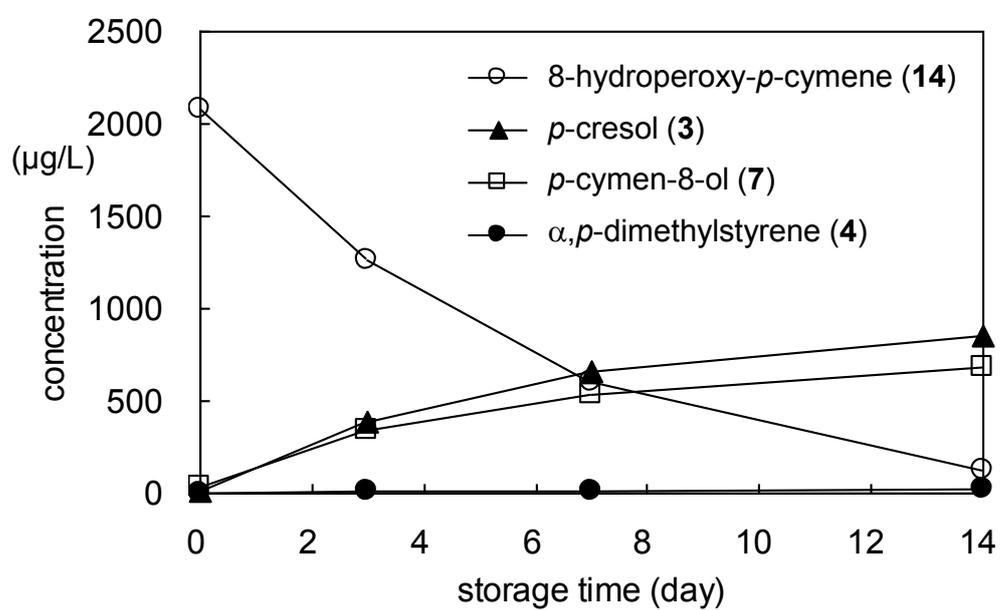


Fig. 11 Degradation of 8-hydroperoxy-*p*-cymene (14) under acidic aqueous conditions at 40 °C.

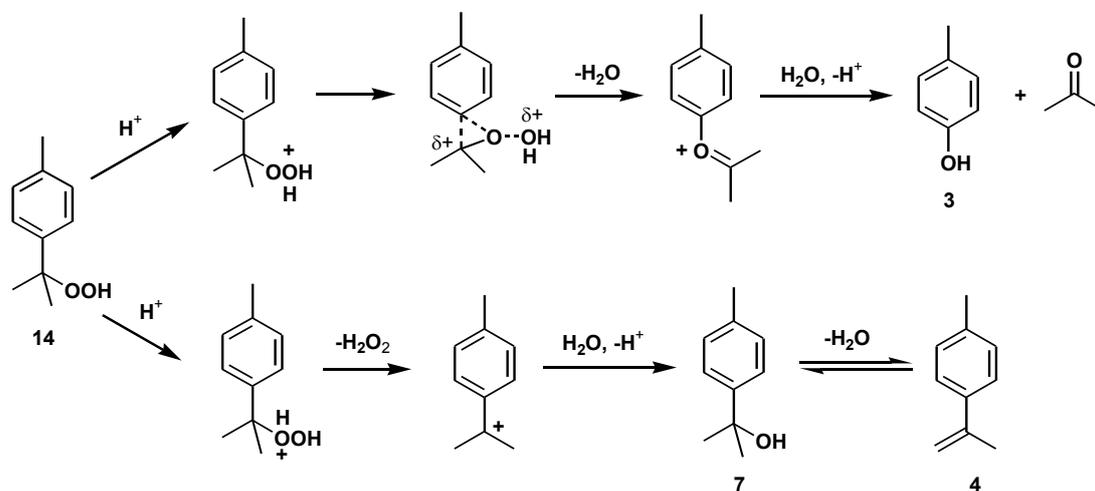


Fig. 12 Possible formation mechanisms of *p*-cresol (3), *p*-cymen-8-ol (7), and α,p -dimethylstyrene (4) from 8-hydroperoxy-*p*-cymene (14).

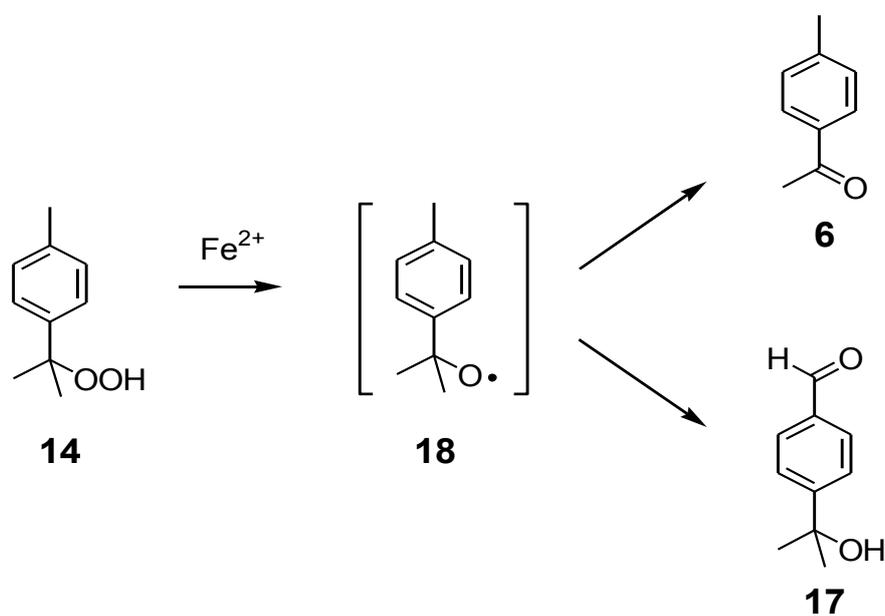


Fig. 13 Hypothetical formation of *p*-methylacetophenone (6) and 4-(2-hydroxy-2-propyl)benzaldehyde (17) from 8-hydroperoxy-*p*-cymene (14) via the *tert*-alkoxyl radical 18 in the presence of Fe^{2+} .

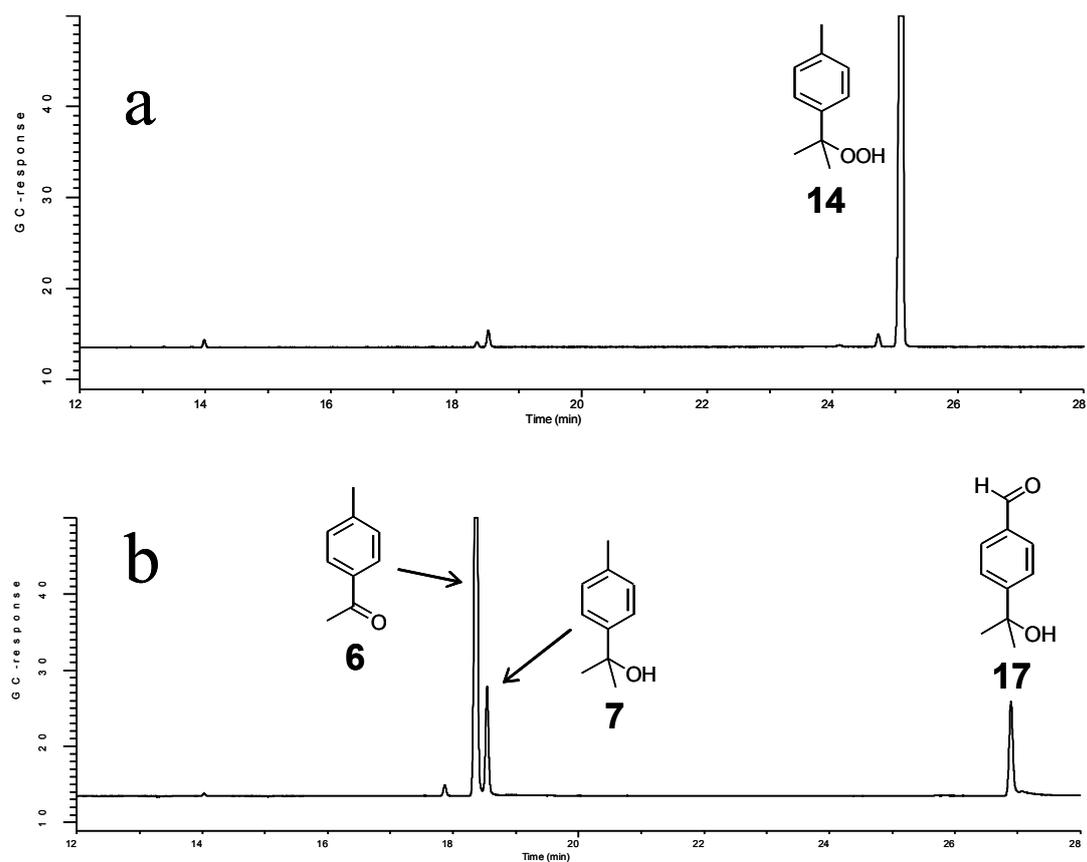


Fig. 14 Gas chromatographic analysis of the acidic buffer solution (pH 3.0) of hydroperoxide 14 (2 mg/L) (a) before and (b) after the addition of Fe²⁺ (5 x 10⁻⁴ M).

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5677-5684 (2004). Copyright 2004 American Chemical Society.

Table 3 Quantitative data for the Fe²⁺-induced decomposition of 8-hydroperoxy-*p*-cymene (**14**) under acidic aqueous conditions.

sample ^a	concentration of compound (μg/L)			
	6	7	14	17
before addition of Fe ²⁺	9	32	2085	nd ^b
after addition of Fe ²⁺	1378	273	nd ^b	278

^a FeSO₄ (5 × 10⁻⁴ M) was added to the acidic buffer solution (pH 3.0) of **14** (2 mg/L).

^b Not detected.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5677-5684 (2004). Copyright 2004 American Chemical Society.

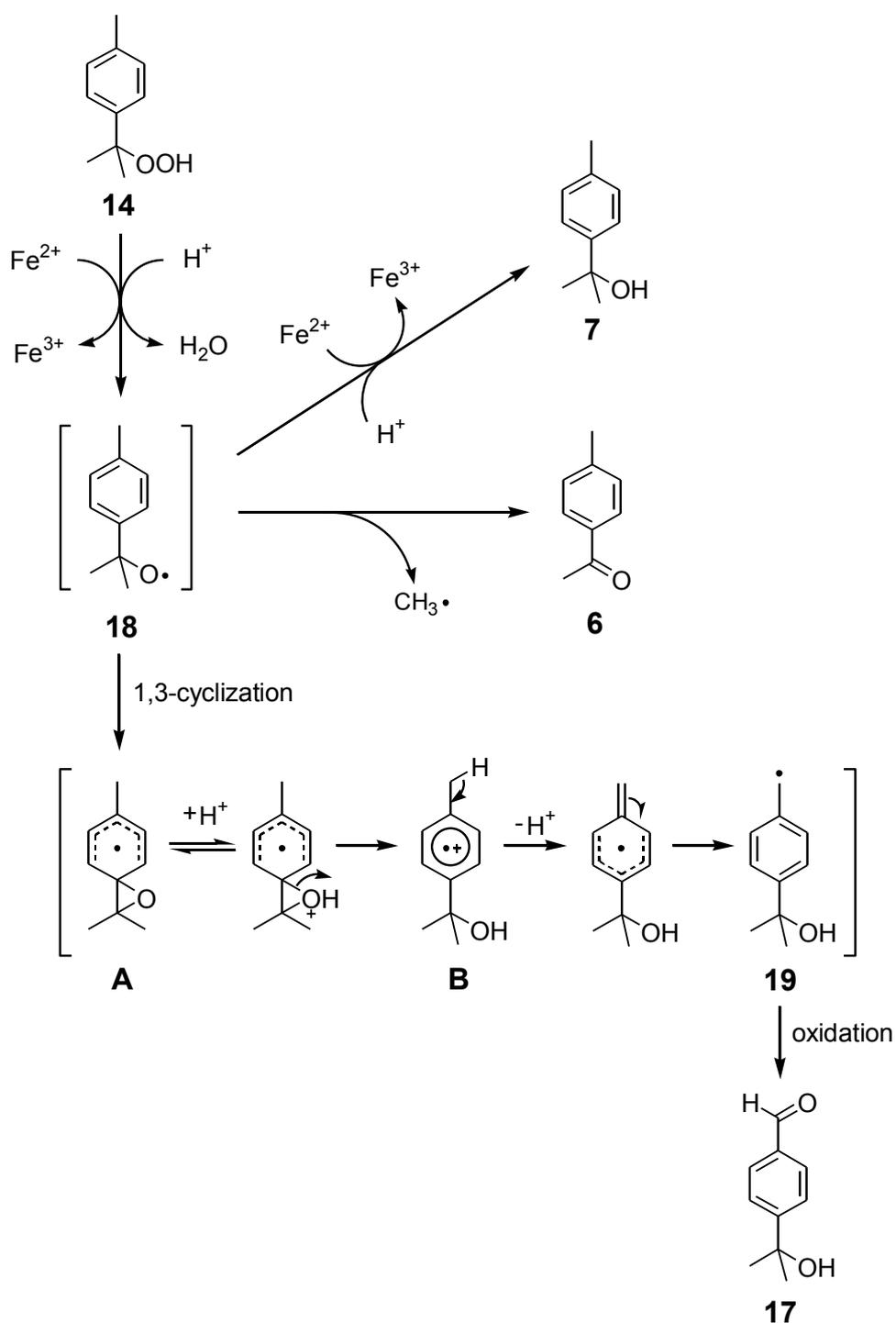


Fig. 15 Possible mechanism for the Fe^{2+} -induced decomposition of hydroperoxide **14** under acidic aqueous conditions.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5677-5684 (2004). Copyright 2004 American Chemical Society.

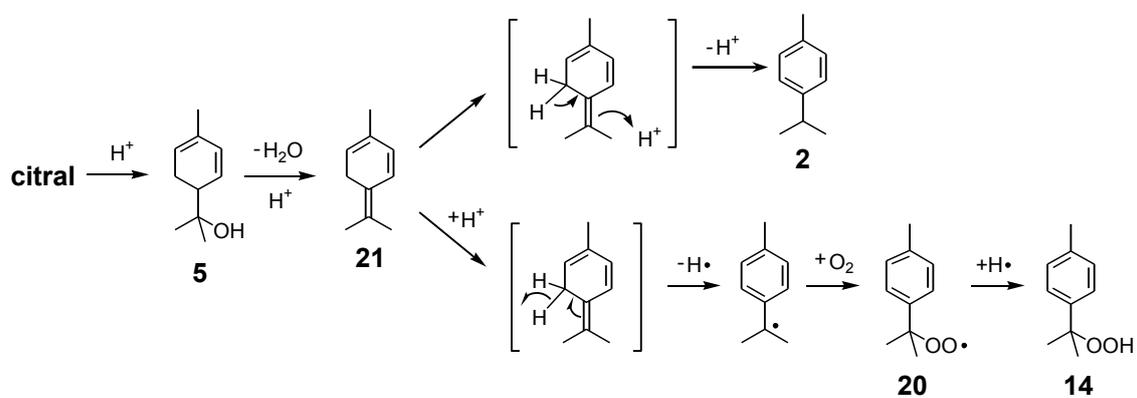


Fig. 17 Proposed mechanism for the formation of hydroperoxide 14 from citral under acidic aqueous conditions.

第2節 シトラール由来のオフフレーバーに対する紅茶テアフラビンの抑制効果

1.2.1 緒言

シトラールの酸化を抑制する目的で種々の抗酸化剤の添加効果が検討されてきた。木村ら¹⁰⁾は、シトラールの酸性溶液中で生成する *p*-cymene, α ,*p*-dimethylstyrene および *p*-cymen-8-ol に対して, BHT や BHA, α -tocopherol などの添加は抑制効果が示さなかったと報告している。一方, Peacock と Kuneman¹¹⁾は、シトラールを含有する炭酸飲料において, アスコルビン酸およびイソアスコルビン酸の添加が α ,*p*-dimethylstyrene と *p*-cymen-8-ol の生成抑制に効果があったと報告している。また, 本章第1節でシトラール由来のオフフレーバーの原因であることが示唆された *p*-cresol と *p*-methylacetophenone に対して, 緑茶あるいは紅茶の抽出物が生成抑制に有効であったと報告されている^{44), 45)}。しかし, 第1節の実験 (Table 2) では, 緑茶由来の主要なポリフェノールであるカテキン類は *p*-methylacetophenone の生成に対して抑制効果を示したが, もう一つのオフフレーバー成分である *p*-cresol の生成抑制には効果がないか逆にその生成を促進した。一方, 紅茶に特徴的なポリフェノールとしてテアフラビン類が知られている。しかし, シトラール由来のオフフレーバーに対するテアフラビン類の添加効果はこれまでに報告されていない。

そこで本節では, シトラール由来のオフフレーバー成分である *p*-cresol および *p*-methylacetophenone に対するテアフラビン類の添加効果ならびにその作用機序について検討した。

1.2.2 実験方法

1.2.2.1 実験材料

紅茶由来テアフラビン混合物 [総テアフラビン類 92.2 area % (HPLC)] , 緑茶由来カテキン混合物 (総カテキン類 88.2 wt %) および (-)-epigallocatechin gallate はフナコシ社より購入した。Theaflavin, theaflavin 3-gallate, theaflavin 3'-gallate および theaflavin 3,3'-digallate は和光純薬工業より購入した。Purpurogallin は東京化成より購入した。シトラール, *p*-cymene, *p*-cymen-8-ol, α ,*p*-dimethylstyrene, *p*-cresol,

p-methylacetophenone および 8-hydroperoxy-*p*-cymene は 1.1.2.1 と同じものを使用した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

1.2.2.2 熱安定性試験

シトラール 10 mg/L を含む酸性緩衝溶液 (0.1 M クエン酸-0.2 M リン酸水素二ナトリウム, pH 3.0) を調製し, ポリフェノール成分として緑茶由来カテキン混合物, 紅茶由来テアフラビン混合物, (-)-epigallocatechin gallate, purpurogallin, theaflavin, theaflavin 3-gallate, theaflavin 3'-gallate または theaflavin 3,3'-digallate のいずれかを 0–5 mg/L の濃度範囲内で添加した。調製した溶液の一部 (3×18 mL) を 20-mL 溶のヘッドスペースバイアル (PTFE / シリコン製セプタム付きクリンプトップキャップ) に封入し, 別の一部 (3×100 mL) を 110-mL 容のねじ口瓶 (テフロンライナー付きキャップ) に封入して 40 °C で 2 週間保存した。ヘッドスペースバイアルに保存したサンプルは HPLC 分析に供した。ねじ口瓶に保存したサンプルは GC 分析および官能評価に使用した。GC 分析では 1.1.2.3 と同じ方法で香氣成分を抽出し, 分析用サンプルを調整した。

1.2.2.3 HPLC

フォトダイオードアレイ検出器を搭載したアジレント社製 1100 シリーズ HPLC システムを使用した。分析条件: カラム, Capcell Pak C18 MG (250 mm × 4.6 mm i.d.; 粒径, 5 μm; 資生堂); カラムオープン温度, 40 °C; 移動相, 溶離液 A (pH 2.5 リン酸水溶液: アセトニトリル=90:10) / 溶離液 B (アセトニトリル) =100/0 (0 min), 0/100 (25 min), 0/100 (27 min); 流速, 1 mL/min; 注入量, 20 μL。サンプル溶液は注入前に 0.45-μm PTFE メンブランフィルタ (DISMIC-13HP; 東洋濾紙) で濾過した。*p*-Cresol および *p*-methylacetophenone の相対濃度を, それぞれ波長 222 および 254 nm のクロマトグラムのピーク面積に基づき決定した (Fig. 18)。また, *p*-Cresol および *p*-methylacetophenone のピークの帰属は, それぞれ UV スペクトル (波長 200-400 nm) と保持時間を標品と比較することで行った。

1.2.2.4 GC および GC-MS

GC および GC-MS 分析は, それぞれ 1.1.2.4 および 1.1.2.5 に記載の条件で行っ

た.

1.2.2.5 官能評価

テアフラビン混合物 (0–5 mg/L) を含むシトラール酸性水溶液を 40°C で 2 週間保存し, 保存後のオフフレーバーの強さを官能検査で評価した. 試験デザインとサンプルの提示方法は文献に従った⁴⁶⁾. 100-mL 容のプラスチックカップに各サンプル 30mL を入れランダム化し, 各評価者には評価する全てのサンプルを一度に提示した. 評価者 (n=17) はサンプルの匂いを嗅いでオフフレーバーの強さを 7 段階スケール (1=オフフレーバーなし, 7=非常に強い) で評価した. テアフラビン混合物を含まないシトラール溶液をオフフレーバー強度の基準 (=5 ポイント) として提示すると同時に, 評価サンプルの 1 つとしてブラインドでも提示した. オフフレーバー強度の平均値と標準偏差 (SD) を算出し, サンプル間の有意差を一元配置分散分析 (ANOVA) および Bonferroni 法を用いた多重比較により検定した. 統計解析ソフトは SPSS 13.0J for Windows (SPSS Japan) を使用した. いずれの場合も $P < 0.05$ の場合を有意と判定した.

1.2.2.6 IC₅₀ 値の算出

ポリフェノール成分の濃度に対する *p*-cresol および *p*-methylacetophenone の阻害率のデータを 4 パラメータロジステック式 $Y = (A - B) / [1 + (X / C)^D] + B$ (X, ポリフェノール成分の濃度, mg/L ; Y, *p*-cresol または *p*-methylacetophenone の相対量, % ; A, Y の最大値 = 100% ; B, Y の最小値 = 0% ; C, *p*-cresol または *p*-methylacetophenone の生成を 50% 阻害するポリフェノール成分の濃度, IC₅₀, mg/L ; D, 変曲点における傾斜) に当てはめ, 非線形最小二乗法によるパラメータの最適化を行うことで C (IC₅₀) および D を決定した. 解析ソフトは SPSS 13.0J for Windows (SPSS Japan) を用いた.

1.2.2.7 *p*-Cymen-8-ol の閾値測定

p-Cymen-8-ol の市販試薬 (Bedoukian Research, Danbury, CT) をシリカゲルクロマトグラフィー (溶媒: ジクロロメタン) により繰り返し精製し, 不純物である *p*-methylacetophenone を完全に除いた. 水溶媒における臭気の検知閾値は, ASTM

規格 E679-04（上昇濃度系列の強制選択極限法）に従って決定した⁴⁷⁾。*p*-Cymen-8-ol の 50%エタノール溶液を水に添加することで閾値測定用のサンプルを調製した（*p*-cymen-8-ol の最終濃度：1.1, 3.3, 10, 30, 90, 270 mg/L）。コントロールには 50%エタノールを水に添加した。各サンプル 30mL を 100-mL 容のプラスチックカップに入れて評価した。三つのサンプル（1 つは *p*-cymen-8-ol を含むサンプル, 2 つはコントロール）を 1 セットとして評価者（n=21）に提示し、評価者はヘッドスペースの匂いを嗅ぎ、匂いの異なるサンプルを 1 つ選択した。*p*-Cymen-8-ol の濃度が低い方から高い方へ順番にサンプルセットを提示し、最も高い不正解濃度とその次の正解濃度の幾何平均を各評価者における閾値の最良推定値とした。グループ閾値は各評価者の最良推定値の幾何平均とした。

1.2.3 結果および考察

1.2.3.1 シトラール由来のオフフレーバー成分に対する緑茶カテキンおよび紅茶テアフラビンの添加効果

シトラール酸性水溶液中で生成する *p*-cresol と *p*-methylacetophenone のそれぞれに対して、テアフラビン混合物およびカテキン混合物の添加効果を検討した（**Fig. 19** および **Fig. 20**）。テアフラビン混合物とカテキン混合物はいずれも *p*-methylacetophenone の生成を濃度依存的に抑制したが、カテキン混合物よりもテアフラビン混合物の方がはるかに強い効果を示した（**Fig. 19**）。また、テアフラビン混合物は *p*-cresol に対しても優れた抑制効果を示したが、カテキン混合物は *p*-cresol の生成をかえって促進した（**Fig. 20**）。これら添加効果の濃度依存曲線から、各オフフレーバー成分の生成を 50% 抑制するのに必要なテアフラビン混合物およびカテキン混合物の濃度（IC₅₀ 値）を算出した（**Table 4**）。*p*-Methylacetophenone の生成に対するテアフラビン混合物の IC₅₀ 値（= 0.10 mg/L）は、カテキン混合物の IC₅₀ 値（= 1.29 mg/L）と比べて 10 分の 1 以下であった。すなわち、*p*-methylacetophenone の生成抑制において、テアフラビン混合物はカテキン混合物の 10 倍以上の活性を持つことが示唆された。また、カテキン混合物は *p*-cresol に対する抑制効果を示さなかったが、テアフラビン混合物は *p*-cresol の生成に対しても低い IC₅₀ 値（= 0.18 mg/L）を示した。

1.2.3.2 シトラール由来のオフフレーバー成分に対する個々のフェノール性化合物の添加効果

次に、**Fig. 21** に示した個々のフェノール性化合物のオフフレーバー抑制効果を調べた。ここで、**theaflavin (22)** とその没食子酸エステル類 (**23-25**) は紅茶に含まれる主要なテアフラビン類であり、また、**purpurogallin (26)** はその配糖体がイングリッシュオークなどの木の虫こぶに存在する成分である⁶⁰⁾。これらの化合物は共通の部分構造としてベンゾトロポロン環を有している。一方、(-)-epigallocatechin gallate (**EGCg, 27**) は緑茶ポリフェノールの主要成分であるが、テアフラビン類や **purpurogallin** とは異なりベンゾトロポロン環を持たない。

各フェノール性化合物のオフフレーバー抑制活性 (IC_{50} 値) を **Table 5** に示した。全てのテアフラビン類と **purpurogallin** は *p*-methylacetophenone に対して優れた抑制効果を示し、 IC_{50} 値は 0.06 から 0.23 mg/L の範囲であった。それに比べて **EGCg** の *p*-methylacetophenone に対する IC_{50} 値は 1.28 mg/L と比較的高い値であった。また、テアフラビン類と **purpurogallin** は *p*-cresol に対しても強い抑制効果を示し、 IC_{50} 値は 0.17 から 0.51 mg/L の範囲であった。一方、**EGCg** は *p*-cresol に対する抑制効果を示さなかった。これらの結果から、テアフラビン類と **purpurogallin** に共通するベンゾトロポロン環がオフフレーバー抑制効果を示す上で重要な役割を果たしていることが示唆された。また、*p*-methylacetophenone と *p*-cresol のどちらに対しても **theaflavin 3,3'-digallate** がテアフラビン類の中で最も低い IC_{50} 値を示し、次いで **theaflavin 3-gallate**, **theaflavin**, **theaflavin 3'-gallate** の順で IC_{50} 値が高くなった。この結果から、テアフラビン類のオフフレーバー抑制効果を高める上では 3'位のガロイル基よりも 3位のガロイル基の方が重要であることが示唆された。

1.2.3.3 主要なシトラール劣化生成物に対する紅茶テアフラビンの添加効果

本節のこれまでの結果から、テアフラビン類は酸性水溶液中、シトラールに由来する *p*-cresol と *p*-methylacetophenone の生成を強力に阻害することが明らかになった。他のシトラール劣化生成物に対するテアフラビン類の効果を見るため、保存後のシトラール溶液から香气成分を抽出し、GC および GC/MS により分析した (**Fig. 22**)。ガスクロ分析で検出されたシトラール由来の主要な生成物は、生成経路の違いから二つのグループに分類することができた。第1のグループは *p*-cymene (peak A), *p*-menthadien-8-ols (peaks D および G) および *p*-menth-2-ene-1,8-diols (peaks H および I) から構成される酸触媒反応生成物のグ

ループである。これら化合物の生成経路はシトラールの酸触媒環化反応とその後
に起こる異性化や水和，脱水反応など全て酸触媒反応によって説明することがで
きる^{9), 10), 11)}。第2のグループは *p*-cresol (peak B) , α ,*p*-dimethylstyrene (peak C) ,
p-methylacetophenone (peak E) , *p*-cymen-8-ol (peak F) および 8-hydroperoxy-*p*-cymene
(peak J) から構成される酸化生成物のグループである。1.1.3.2 で述べたように，
これらの化合物の生成には酸触媒反応だけでなく酸化反応が関与すると考えられ
る。それぞれのグループの生成物に対するテアフラビン混合物 (5 mg/L) の添加
効果を Fig. 23 および Fig. 24 に示す。興味深いことに，酸触媒反応生成物の一つ
である *p*-cymene の生成がテアフラビン類の添加により著しく阻害された。他の酸
触媒反応生成物である *p*-menthadien-8-ols と *p*-menth-2-ene-1,8-diols の生成は，テ
アフラビン類の添加により僅かに増加した。酸化生成物については，テアフラビ
ン類は *p*-cresol , *p*-methylacetophenone および 8-hydroperoxy-*p*-cymene の生成を阻
害する一方で， α ,*p*-dimethylstyrene および *p*-cymen-8-ol の生成を著しく促進した。

1.2.3.4 紅茶テアフラビンを添加したシトラール溶液の官能評価

シトラール由来のオフフレーバーに対するテアフラビン類の添加効果を官能評
価により検討した (Fig. 25) 。テアフラビン混合物を 0.1 mg/L の濃度で添加した
場合，保存後のシトラール溶液のオフフレーバー強度は無添加と比べて差が無か
った。一方，テアフラビン類を 0.5 mg/L あるいは 2.5 mg/L の濃度で添加した場合，
オフフレーバー強度は無添加および 0.1 mg/L 添加した場合に比べて有意に低かつ
た。また，テアフラビン類を 2.5 mg/L の濃度で添加した場合，オフフレーバー強
度は 0.5 mg/L 添加した場合に比べて有意に低かった。これらの結果は，シトラール
由来のオフフレーバーに対するテアフラビン類の抑制効果は濃度依存的であり，
その効果は 0.5 mg/L 以上で検知可能であることを示している。

1.2.3.5 紅茶テアフラビンの添加がシトラール劣化生成物の odor activity value (OAV) に与える影響

1.2.3.4 で観測されたテアフラビン類による感覚的なオフフレーバー強度の減少
を分子レベルで解明するため，主要なシトラール劣化生成物の odor activity value
(OAV)²⁶⁾ を計算した (Table 6) 。OAV とは，検出された香气成分がサンプル
の香りにとって重用であるかを推定するための数値であり，次式により計算され
る。

$$\text{OAV} = \frac{\text{ある香気成分のサンプル中の濃度}}{\text{その香気成分がサンプルと同じ媒体中で示す匂い閾値}}$$

OAV が 1 以上の場合、その成分は匂い閾値以上の濃度でサンプル中に存在することになり、サンプルの香りに寄与する可能性がある。ここでは 1.2.3.3 で定量した主要なシトラール劣化生成物のうち、テアフラビンの添加によって濃度が顕著に変化した 6 成分について OAV を計算した (Table 6)。各成分の水溶液の匂い閾値は *p*-cymen-8-ol を除いて文献から引用した (48), (49), (50), (51), (52), (53), (54), (55), (56)。*p*-Cymen-8-ol の水溶液の匂い閾値は本研究により初めて明らかになったが、他のシトラール由来の生成物に比べて著しく高い値 (22500 µg/L) を示した。テアフラビン類を添加しない場合、*p*-cymene, *p*-cresol および *p*-methylacetophenone の OAV はそれぞれ 2.4-55, 3.3-67 および 6.7-8.5 の範囲と推定された。いずれの成分も OAV が 1 を大きく上回ることから、これらの化合物は保存後のシトラール溶液のオフフレーバーに寄与することが示唆された。テアフラビン類を添加した場合、*p*-cymene, *p*-cresol および *p*-methylacetophenone の OAV は大幅に低下し、それぞれ推定範囲の上限であっても 1.1, 1.7 および 0.8 に留まった。これらの結果は、*p*-cymene, *p*-cresol および *p*-methylacetophenone の濃度がテアフラビン類の添加によって閾値付近あるいはそれ以下まで低下したことを示唆している。一方、 α -*p*-dimethylstyrene と *p*-cymen-8-ol の濃度はテアフラビン類の添加により著しく増加したが、その場合でも α -*p*-dimethylstyrene の濃度は閾値付近に留まっており (OAV=1.2)、*p*-cymen-8-ol の濃度は閾値より遥かに小さい (OAV=0.08)。これらのデータから、1.2.3.4 で観測されたテアフラビン類添加によるオフフレーバー強度の減少は、主として *p*-cymene, *p*-cresol および *p*-methylacetophenone の減少によるものであり、テアフラビン類の添加により増加した α -*p*-dimethylstyrene と *p*-cymen-8-ol は匂い閾値との関係から殆どオフフレーバー強度に影響しないことが示唆された。

1.2.3.6 テアフラビン類のオフフレーバー抑制メカニズム

最後に、上述のようなテアフラビン類添加によるシトラール劣化生成物の増減がなぜ起こるかという問題について考察した。これには次のようなメカニズムが考えられる。本章第 1 節の結果から推定されたシトラール由来のオフフレーバー生成経路を Fig. 26 に示す。シトラールは、まず酸触媒反応によって

p-menthadien-8-ol 類などの環化生成物に変化し¹⁾、次に *p*-mentha-1,4(8),5-triene を共通の中間体として三つの経路 (path A, B および C) に分かれて変化する。1.1.3.5 で述べたように、*p*-cymene は *p*-mentha-1,4(8),5-triene の酸触媒異性化によって生成すると考えられる (path A)。一方、*p*-mentha-1,4(8),5-triene の自動酸化により *p*-methylacetophenone, *p*-cresol および 8-hydroperoxy-*p*-cymene を含む酸化生成物が生成する (path B)。さらに、*p*-mentha-1,4(8),5-triene の脱水素とそれに続く水和反応は、別の酸化生成物である α ,*p*-dimethylstyrene と *p*-cymen-8-ol を生成する⁴²⁾ (path C)。Fig. 23 および Fig. 24 の結果を見ると、テアフラビン類の添加により path B の酸化生成物だけでなく酸化が関与しない path A の *p*-cymene の生成が顕著に抑制された。一方、path C の生成物である α ,*p*-dimethylstyrene と *p*-cymen-8-ol の生成量はテアフラビン類の添加により大幅に増加した。これらの結果はテアフラビン類の酸化によりキノン類が生成し、*p*-mentha-1,4(8),5-triene の脱水素反応 (path C) を促進すると仮定すれば解釈できる。テアフラビン類は酵素的あるいは化学的な酸化によりキノン類を生成することが報告されている^{57), 58)}。一般的にキノン類は優れた脱水素剤として働くので、*p*-mentha-1,4(8),5-triene の脱水素反応 (path C) を促進する可能性がある。実際にキノン類の一種である chloranil を使った場合、シトラールから α ,*p*-dimethylstyrene が高収率で得られることが報告されている⁴²⁾。今後、本研究の条件下においてテアフラビン類から誘導されるキノン類を同定するとともに、それらキノン類のオフフレーバー抑制効果について検討する必要がある。

1.2.4 要約

本節では、酸性水溶液中、シトラール由来のオフフレーバーに対する紅茶テアフラビン類の添加効果ならびにその作用機序について検討した。シトラールの酸性水溶液を遮光、加温条件下で保存することにより、オフフレーバーの原因物質である *p*-cresol と *p*-methylacetophenone が生成した。これに対しテアフラビン類を保存前に添加した場合は、*p*-cresol と *p*-methylacetophenone の生成が濃度依存的に抑制されるとともに官能評価におけるオフフレーバー強度が有意に低下した。興味深いことに、緑茶由来のポリフェノールであるカテキン類は *p*-methylacetophenone に対する抑制効果がテアフラビン類より弱く、*p*-cresol に対しては逆に生成を促進した。また、他のシトラール劣化生成物の中では、 α ,*p*-dimethylstyrene と *p*-cymen-8-ol の生成量がテアフラビン類の添加により著しく増加することが判明した。しかし、odor activity value (OAV) を計算した結果、

これら二つの化合物の増加は全体的なオフフレーバー強度には殆ど影響しないことが示唆された。 *α,p*-Dimethylstyrene , *p*-cymen-8-ol , *p*-cresol および *p*-methylacetophenone は共通の中間体を経由して生成すると考えられ, テアフラビン類は *α,p*-dimethylstyrene と *p*-cymen-8-ol の生成を促進することにより, オフフレーバー成分である *p*-cresol と *p*-methylacetophenone の生成を抑制すると考えられた。

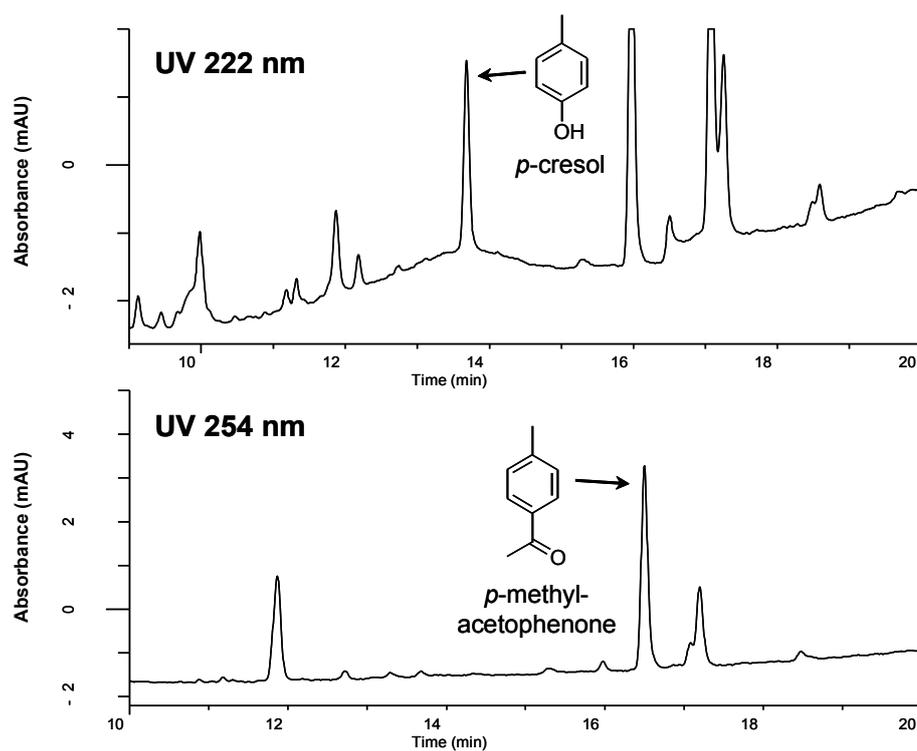


Fig. 18 HPLC analysis of *p*-cresol and *p*-methylacetophenone formed in the acidic aqueous solution (pH 3.0) of citral (10 mg/L) stored at 40 °C for 2 weeks.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

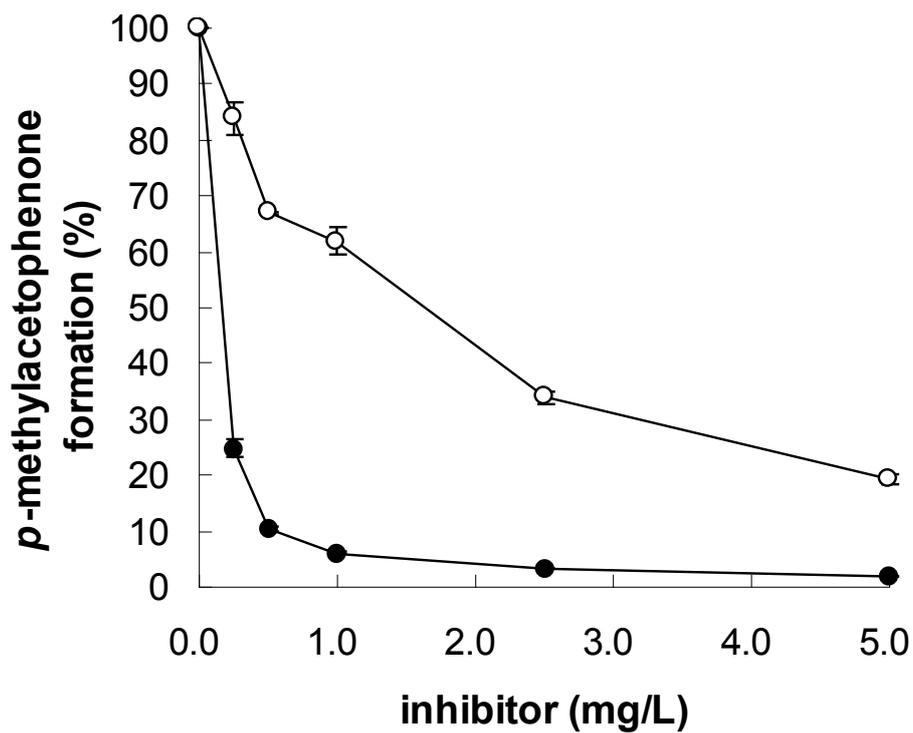


Fig. 19 Dose-dependent effects of mixtures of tea polyphenols on the formation of *p*-methylacetophenone from citral (10 mg/L) stored under acidic aqueous conditions (pH 3) at 40 °C for 2 weeks: theaflavin mixture (●), catechin mixture (○). Each value is expressed as the mean ± standard deviation of triplicate samples.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

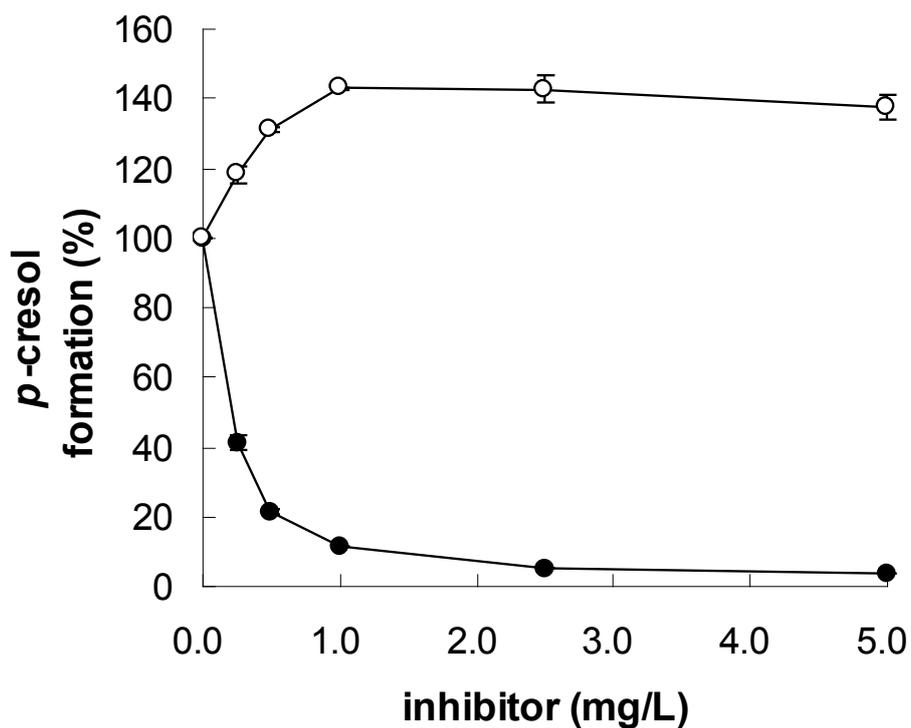


Fig. 20 Dose-dependent effects of mixtures of tea polyphenols on the formation of *p*-cresol from citral (10 mg/L) stored under acidic aqueous conditions (pH 3) at 40 °C for 2 weeks: theaflavin mixture (●), catechin mixture (○). Each value is expressed as the mean \pm standard deviation of triplicate samples.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

Table 4 Estimated IC₅₀ values of mixtures of tea polyphenols.

off-odorant	IC ₅₀ ^a (mg/L)	
	theaflavin mixture	catechin mixture
<i>p</i> -methylacetophenone	0.10 (0.01)	1.29 (0.11)
<i>p</i> -cresol	0.18 (0.01)	nd ^b

^a IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression of the dose-dependent inhibition data. Asymptotic standard errors were shown in brackets. ^b Not determined.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

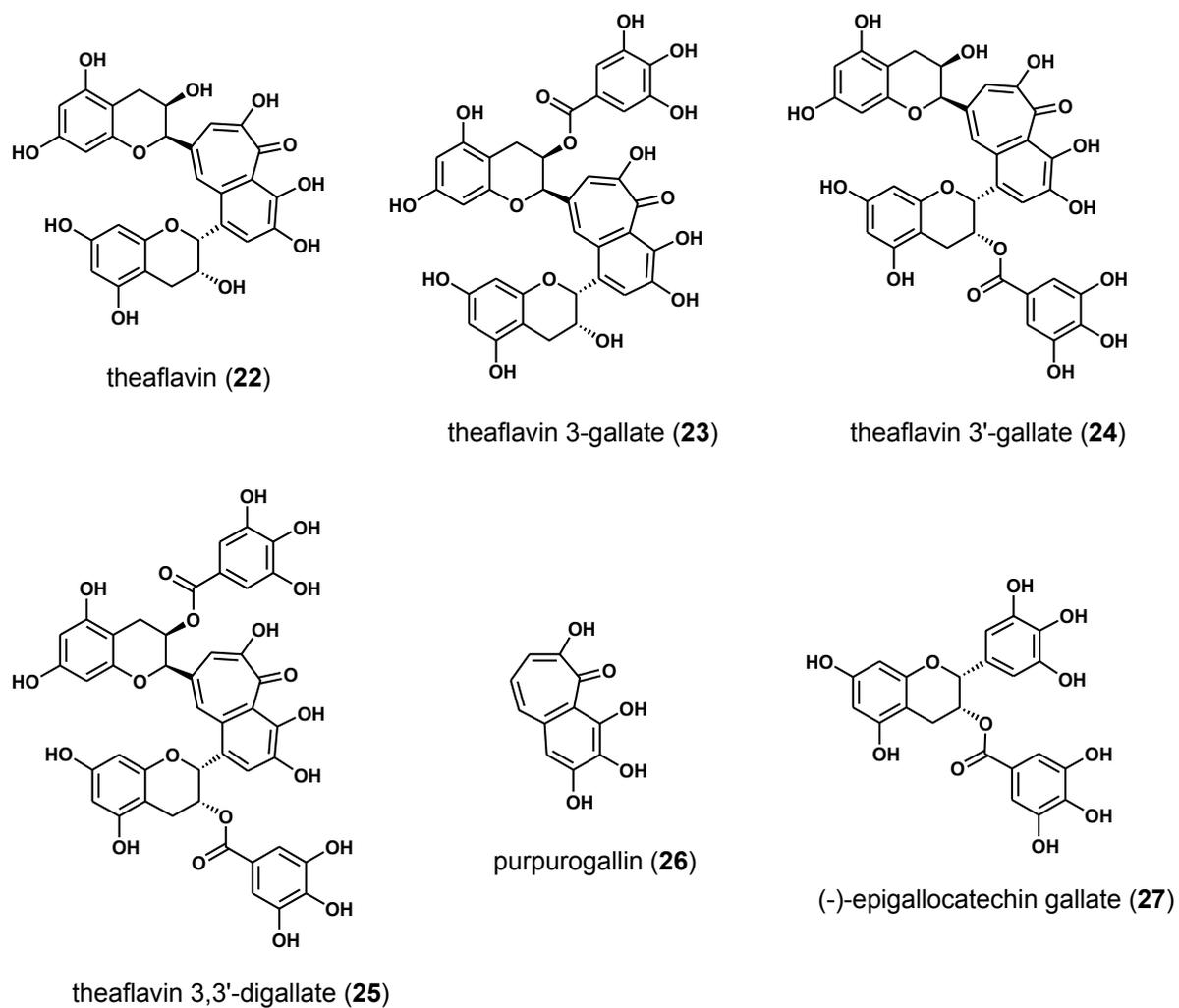


Fig. 21 Chemical structures of individual phenolic compounds.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

Table 5 Estimated IC₅₀ values of individual phenolic compounds 22-27 ^a.

off-odorant	IC ₅₀ ^b (mg/L)					
	1	2	3	4	5	6
<i>p</i> -methylacetophenone	0.20 (0.01)	0.15 (0.02)	0.23 (0.01)	0.06 (0.01)	0.17 (0.01)	1.28 (0.12)
<i>p</i> -cresol	0.33 (0.02)	0.20 (0.00)	0.42 (0.01)	0.17 (0.02)	0.51 (0.03)	nd ^c

^a Numbers represent the following compounds: **22**, theaflavin; **23**, theaflavin 3-gallate; **24**, theaflavin 3'-gallate; **25**, theaflavin 3,3'-digallate; **26**, purpurogallin; **27**, (-)-epigallocatechin gallate. ^b IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression of the dose-dependent inhibition data. Asymptotic standard errors were shown in brackets. ^c Not determined.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

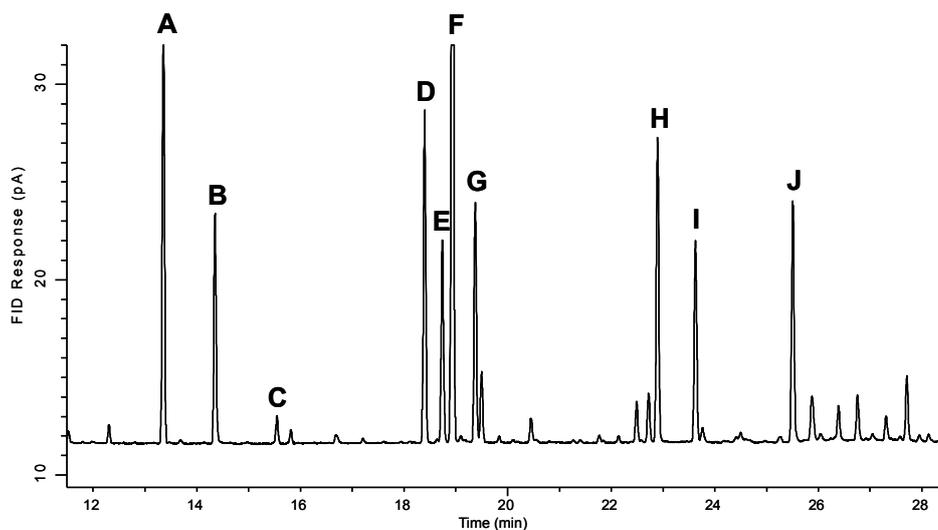


Fig. 22 Gas chromatographic analysis of the volatile compounds extracted from the acidic aqueous solution (pH 3.0) of citral (10 mg/L) stored at 40 °C for 2 weeks. Peaks: A, *p*-cymene; B, *p*-cresol; C, α ,*p*-dimethylstyrene; D, *p*-mentha-1,5-dien-8-ol; E, *p*-methylacetophenone; F, *p*-cymen-8-ol; G, *p*-mentha-1(7),2-dien-8-ol; H, *trans-p*-menth-2-ene-1,8-diol; I, *cis-p*-menth-2-ene-1,8-diol; J, 8-hydroperoxy-*p*-cymene.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

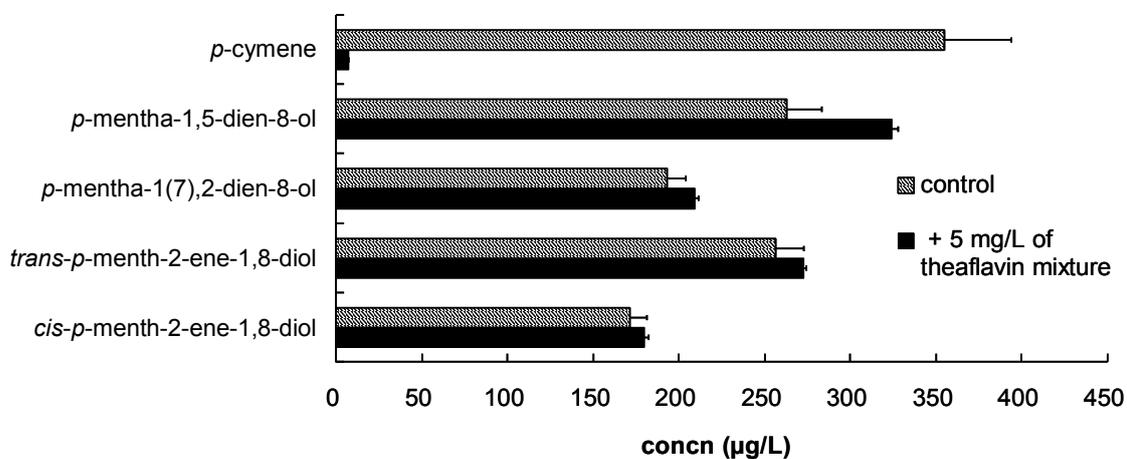


Fig. 23 Effect of theaflavin mixture on the formation of acid-catalyzed reaction products from citral (10 mg/L) stored under acidic aqueous conditions (pH 3) at 40 °C for 2 weeks. Each value is expressed as the mean \pm standard deviation of triplicate samples.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

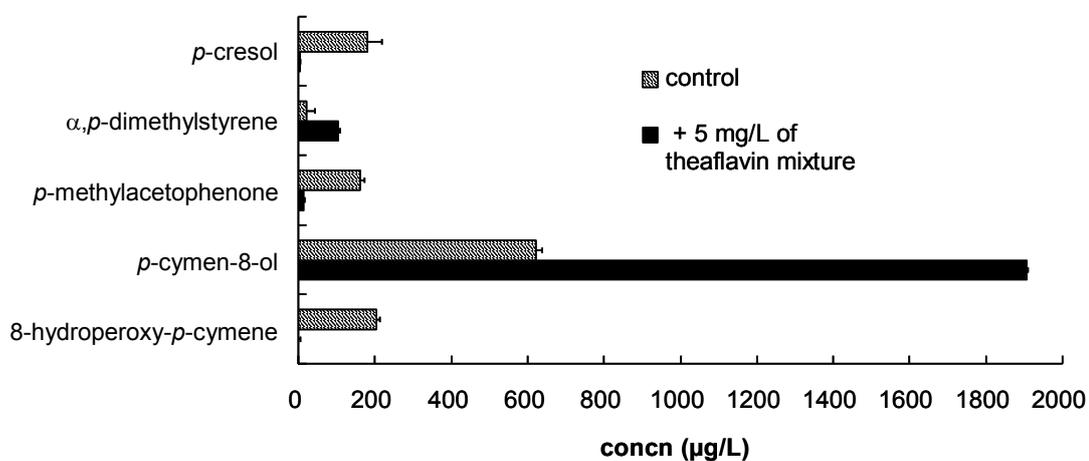


Fig. 24 Effect of theaflavin mixture on the formation of oxidation products from citral (10 mg/L) stored under acidic aqueous conditions (pH 3) at 40 °C for 2 weeks. Each value is expressed as the mean \pm standard deviation of triplicate samples.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

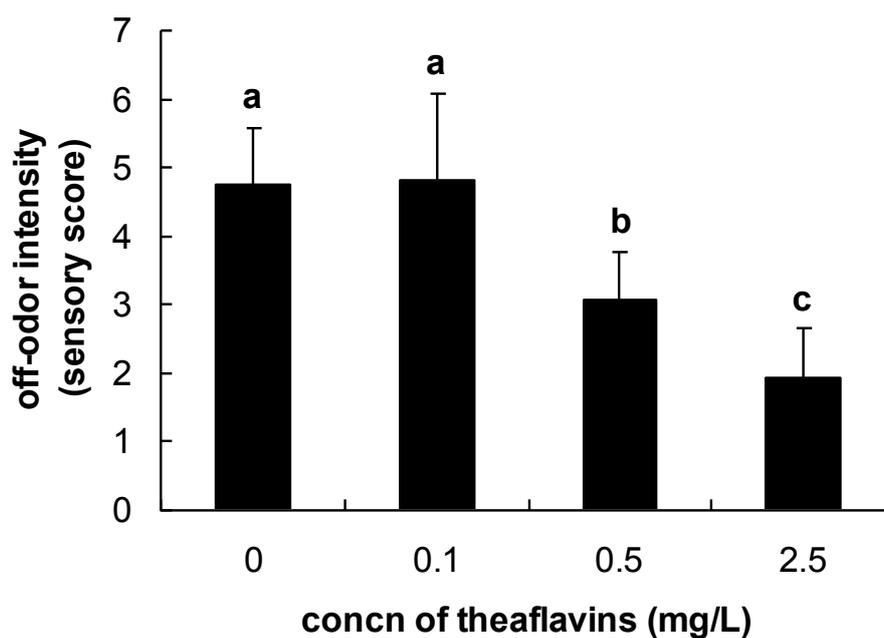


Fig. 25 Off-odor intensity of stored citral solutions containing theaflavin mixture at different concentrations. Acidic aqueous solutions (pH 3) containing citral (10 mg/L) were stored at 40 °C for 2 weeks. Each value is expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 17$). Values with same letters are *not* significantly different ($p \geq 0.05$).

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

Table 6 Odor thresholds of possible off-odorants and their odor activity values (OAVs) in the stored citral solutions.

off-odorant	odor threshold in water ^a (µg/L)	OAVs in citral solutions ^b	
		control	+ theaflavins
<i>p</i> -cymene	6.2-150 ^{c-f}	2.4-55	0.05-1.1
<i>p</i> -cresol	2.7-55 ^{g,h}	3.3-67	0.1-1.7
<i>p</i> -methylacetophenone	19-24 ^{f,i,j}	6.7-8.5	0.6-0.8
8-hydroperoxy- <i>p</i> -cymene	nd ^k	nd ^k	nd ^k
α, <i>p</i> -dimethylstyrene	85 ^j	0.3	1.2
<i>p</i> -cymen-8-ol	22500 ^l	0.03	0.08

^a Orthonasal detection. ^b OAVs were calculated by dividing the concentration of each off-odorant in the citral solutions (**Fig. 23** and **Fig. 24**) by its odor threshold. ^c Buttery *et al.* ⁴⁸). ^d Ahmed *et al.* ⁴⁹). ^e Pino *et al.* ⁵⁰). ^f Boonbumrung *et al.* ⁵¹). ^g Buttery *et al.* ⁵²). ^h Karagül-Yüceer *et al.* ⁵³). ⁱ Buttery *et al.* ⁵⁴). ^j Masanetz and Grosch ⁵⁵, ⁵⁶). ^k Not determined. ^l Original data.

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

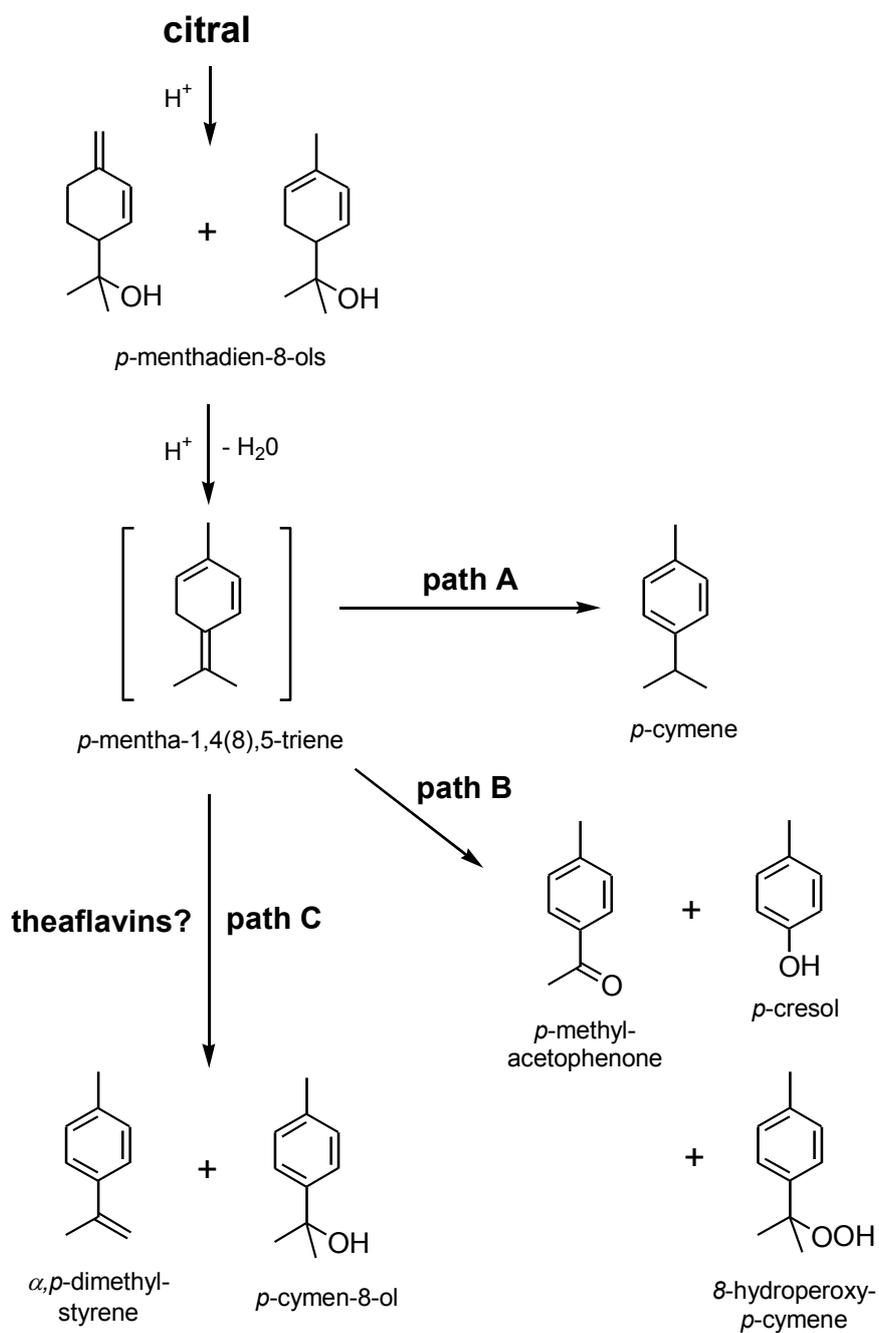


Fig. 26 Summarized formation pathways of off-odorants from citral and possible action of theaflavins (path A, acid-catalyzed isomerization; path B, autoxidation; path C, dehydrogenation and subsequent hydration).

Reproduced with permission from *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

第3節 光照射によるシトラールの劣化と植物ポリフェノールによる劣化抑制効果

1.3.1 緒言

柑橘系飲料は光の影響を受けやすく、流通の過程で日光や照明に曝され風味が劣化する。レモンの香気成分であるシトラールは特に光の影響を受けやすく、分子内環化反応を起こして種々の化合物へと変化することが報告されている^{59), 60), 61)}。本節では、酸性水溶液中におけるシトラールの光劣化機構の解明と植物ポリフェノールの添加効果を検討した。

1.3.2 実験方法

1.3.2.1 実験材料

シトラールは Polarome International (Jersey City, NJ) より購入した。Caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid, *p*-coumaric acid, quercitrin, *p*-hydroxybenzoic acid, L(+)-ascorbic acid, gallic acid, protocatechuic acid および vanillic acid はナカライテスク社より購入した。(-)-Epicatechin はシグマアルドリッチ ジャパン社より購入した。Rosmarinic acid, (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epigallocatechin はフナコシ社より購入した。Chlorogenic acid は和光純薬工業株式会社より購入した。α-Glucosylrutin は東洋精糖株式会社より購入した。3,5-Dicaffeoylquinic acid はコーヒー生豆を 50%エタノールで抽出し、得られた抽出物をシリカゲルクロマトグラフィ（溶媒：クロロホルム-メタノール）で処理することにより調製した。Citral 6,7-epoxide は文献^{62), 63)}に従い合成した。

1.3.2.2 光安定性試験

シトラール (10 mg/L) および抗酸化成分 (10 mg/L) を含む酸性緩衝溶液 (0.1 M クエン酸-0.2 M リン酸水素二ナトリウム, pH 3.5) を調製し、各溶液 100 mL を 110-mL 容ねじ口透明ガラス瓶に入れ、テフロンライナー付きキャップで蓋をして密閉した。サンプルを光安定性試験器（東京理化学器械株式会社）に入れ、10°C、

15000 ルクス（蛍光灯）で 14 日間光照射した。

1.3.2.3 香気成分の抽出

1.1.2.3 と同じ方法で香気成分を抽出し、GC および GC/MS 分析用サンプルを調整した。

1.3.2.4 GC

DB-WAX カラム（60 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, J&W Scientific）および水素炎イオン化型検出器（FID）を搭載した Hewlett-Packard 社製 5890 SERIES II ガスクロマトグラフを使用し、以下に示す条件で行った。注入口温度, 250 °C ; 試料注入量, 1 μL ; スプリット比, 1 : 32 ; キャリヤーガス, ヘリウム 1 mL/min ; オープン温度, 60 °C—210 °C (4 °C/min) , 210 °C (42.5 min) . シトラールおよびシトラール分解物の濃度は内部標準法（内部標準物質：*n*-ペンタデカン）により定量した。FID に対するレスポンスファクターは全ての化合物について等しいと近似した。

1.3.2.5 GC-MS

DB-WAX カラム（60 m x 0.25 mm i.d.; 膜厚 0.25 μm; J&W Scientific）および Hewlett-Packard 社製 HP-5972 質量選択検出器を搭載した 5890 SERIES II ガスクロマトグラフを使用し、以下に示す条件で行った。注入口温度, 250 °C ; 試料注入量, 1 μL ; スプリット比, 1 : 50 ; キャリヤーガスおよび流量, ヘリウム, 1 mL/min ; オープン温度, 60 °C—210 °C (4 °C/min) , 210 °C (42.5 min) ; イオン化電圧, 70 eV ; イオン源温度, 140 °C.

1.3.2.6 ラジカル消去活性

ラジカル消去活性は既報^{64), 65)}に従い測定した。0.1 M クエン酸—0.2 M リン酸水素二ナトリウム緩衝液 (pH 3.5) 2 mL, 0.04 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, 99% エタノール溶液) 2 mL および抗酸化成分溶液 (5 mg/L, 50% エタノール溶液) 1 mL を混合し、室温で 30 分間静置した後、517 nm における吸光度

を測定した。コントロールに対する吸光度の減少率を各抗酸化成分のラジカル消去活性と定義した。測定は3回行い平均値と標準偏差を計算した。

1.3.2.7 UV/可視分光法

抗酸化成分のUVスペクトルおよびDPPHラジカルの吸光度(517 nm)は、UV-可視分光光度計(UV-2100 PC, 株式会社島津製作所)および石英セル(光路長1 cm)を用いて測定した。

1.3.3 結果および考察

1.3.3.1 光によるシトラールの劣化反応

シトラールの酸性水溶液を遮光および光照射下で保存したときのガスクロマトグラムを **Fig. 27** に示す。光照射下 (**Fig. 27b**) で保存した場合、11個のピークが主な生成物として観測されたが、これらのうち peak 6, 7, 10 および 11 は遮光下 (**Fig. 27a**) でも同様に生成した。従って、残りの peak 1-5, 8 および 9 が光の影響で生成した化合物であり、GC-MS 分析の結果、**Fig. 28** に示す化学構造であることが明らかになった。これらのうち peak 1-5 の化合物は、光励起したシトラールの分子内環化によって生成することが報告されている^{59), 60)}。一方、テトラヒドロフラン誘導体 (peak 8 および 9) がシトラールの光劣化によって生成することはこれまでに報告がなかった。これらの化合物の生成にはシトラールの光酸化が関与すると考えられる。すなわち、シトラールの6位の二重結合が光酸化によってエポキシ化し、次に酸触媒反応によってテトラヒドロフラン環を形成すると考えられる (**Fig. 29**)。この生成機構は、中性条件下でシトラールを光劣化させるとテトラヒドロフラン誘導体 (peak 8 および 9) の代わりにシトラールのエポキシド (peak 12 および 13) が生成することからも支持された (**Fig. 30**)。

1.3.3.2 シトラールの光劣化抑制剤

稲波ら⁶⁶⁾は紫外線吸収剤、特に rutin や chlorogenic acid など UV-A 領域(320-400 nm)に吸収を持つ物質がシトラールの光劣化抑制に効果的であると報告している。

一方、立場ら⁵⁹⁾は、アスコルビン酸のようなラジカル消去剤がシトラールの光劣化抑制に有効であると報告している。本研究では **Table 7** に挙げた 17 種類の抗酸化剤について、これらの添加が酸性溶液中におけるシトラールの光劣化にどのように影響するかを調べた。今回テストした抗酸化剤はいずれも光照射後のシトラールの保持に有効であったが、**caffeic acid** を始めとする α, β -不飽和カルボニル化合物の効果が特に高かった (**Fig. 31**)。シトラール由来の生成物への影響を見ると、いずれの抗酸化剤もシトラールの光酸化により生じるテトラヒドロフラン誘導体 (**peak 8** および **9**) に対して高い抑制効果を示した (**Fig. 32**)。一方、シトラールの光環化生成物 (**peak 1-5**) に対しては、 α, β -不飽和カルボニル基を有する抗酸化剤は抑制効果を示したが、それ以外の抗酸化剤では生成を促進する傾向が見られた (**Fig. 33**)。これについては次のようなメカニズムが考えられる。いずれの抗酸化剤もシトラールの光酸化を抑制するので、これによりシトラールは保持されるが、一方で競合するシトラールの光環化はシトラールの濃度が高くなることでかえって促進される。このため、 α, β -不飽和カルボニル基を持たない抗酸化剤では光環化生成物の量が増加する。一方、 α, β -不飽和カルボニル基を有する抗酸化剤の場合はシトラールと同様の波長領域に UV 吸収を持ち、この領域の UV をカットすることでシトラールの光環化を抑制すると考えられる。

1.3.4 要約

本節では、酸性水溶液中におけるシトラールの光劣化機構の解明と植物ポリフェノールの添加効果について検討した。酸性水溶液中でシトラールを光照射したときの生成物を分析した結果、シトラールの光劣化には二つの異なる経路が存在し、一つはシトラールの光酸化であり、もう一つはシトラールが紫外線を吸収することによって起こる分子内環化（光環化）であることが判明した。植物ポリフェノールを含む 17 種類の抗酸化剤について、シトラールの光劣化に対する抑制効果を調べたところ、**caffeic acid** を始めとする α, β -不飽和カルボニル化合物の効果が特に高かった。 α, β -不飽和カルボニル基を有する抗酸化剤はシトラールの光酸化と光環化の両方を抑制したが、それ以外の抗酸化剤ではシトラールの光酸化は抑制されたが、光環化はむしろ促進された。これらの結果から、シトラールの光劣化抑制剤としては抗酸化能力と UV 吸収能力の両方の要素が重要であることが示唆された。

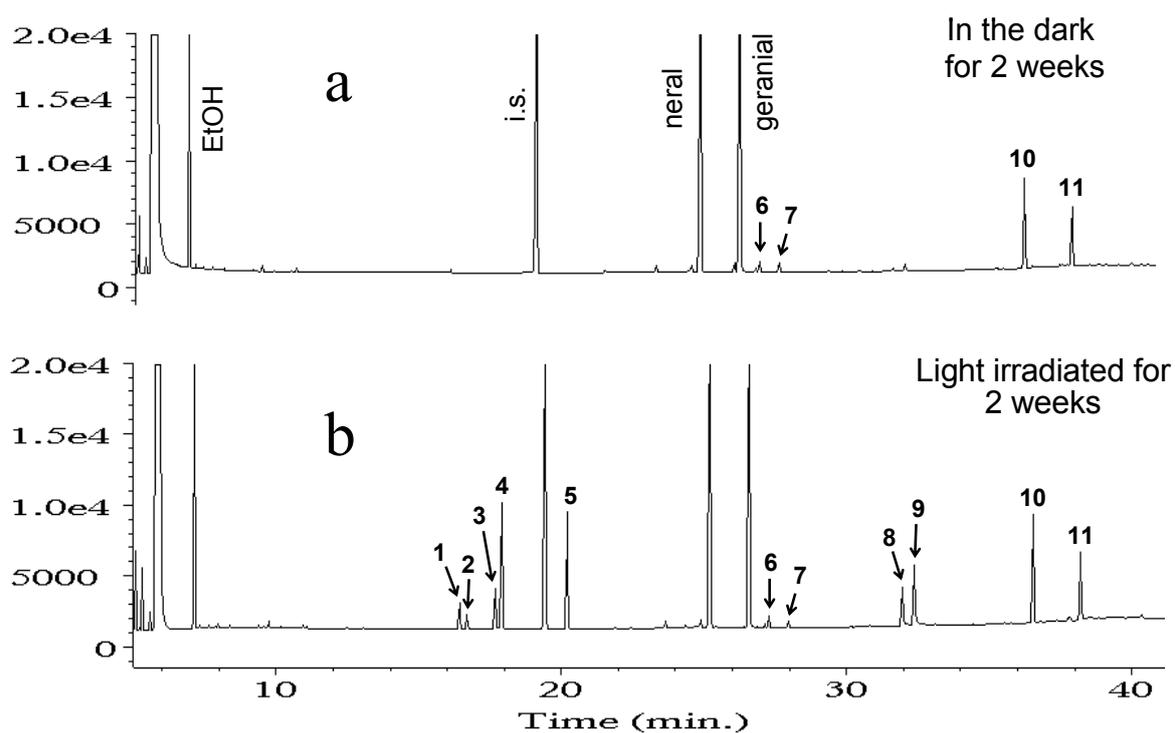


Fig. 27 Gas chromatographic analysis of the degradation products from citral (10 mg/L) stored in the acidic aqueous solutions (pH 3.5) at 10 °C (a) in the dark and (b) under fluorescent-light irradiation (15000 lux) for 2 weeks.

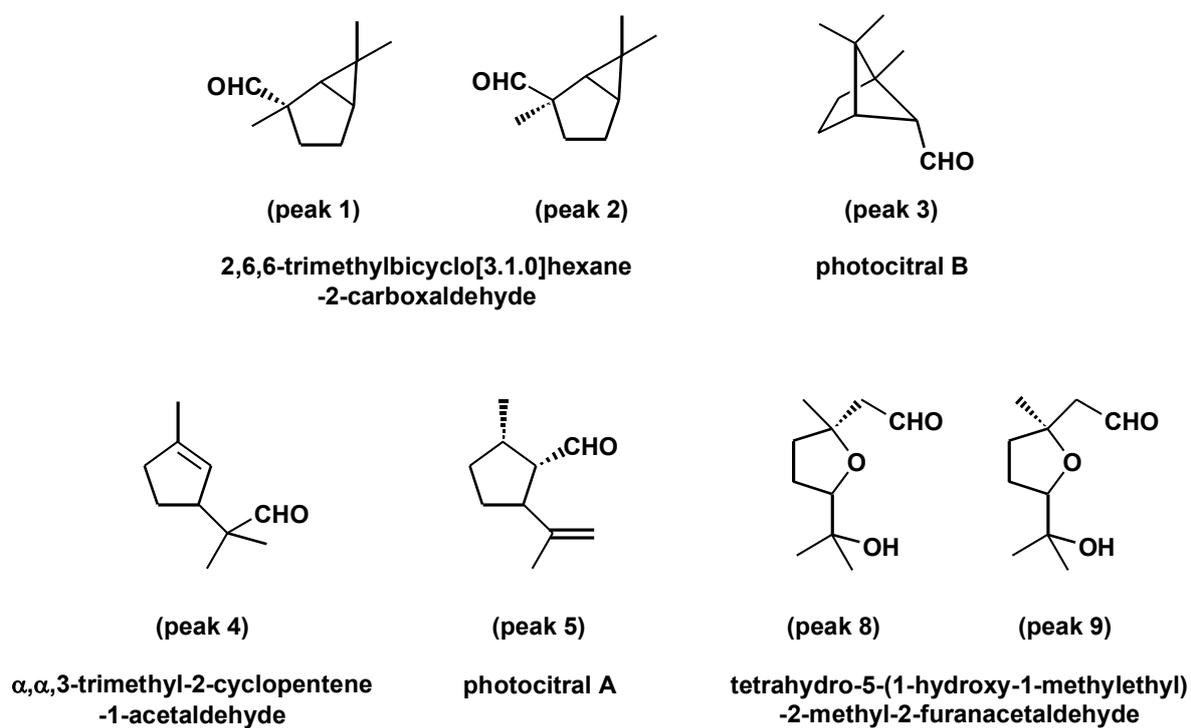


Fig. 28 Light-induced degradation products from citral. For chiral compounds, only one enantiomer is given. Peak numbers in Fig. 27 are given in parentheses.

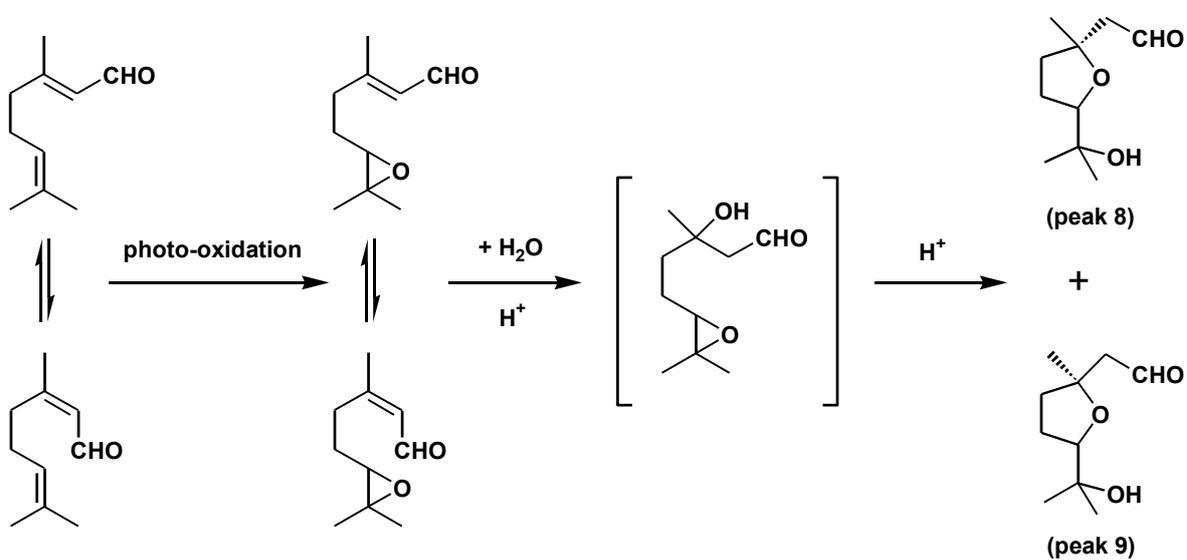


Fig. 29 Proposed mechanism for the formation of photo-oxidation products from citral. For chiral compounds, only one enantiomer is given. Peak numbers in Fig. 27 are given in parentheses.

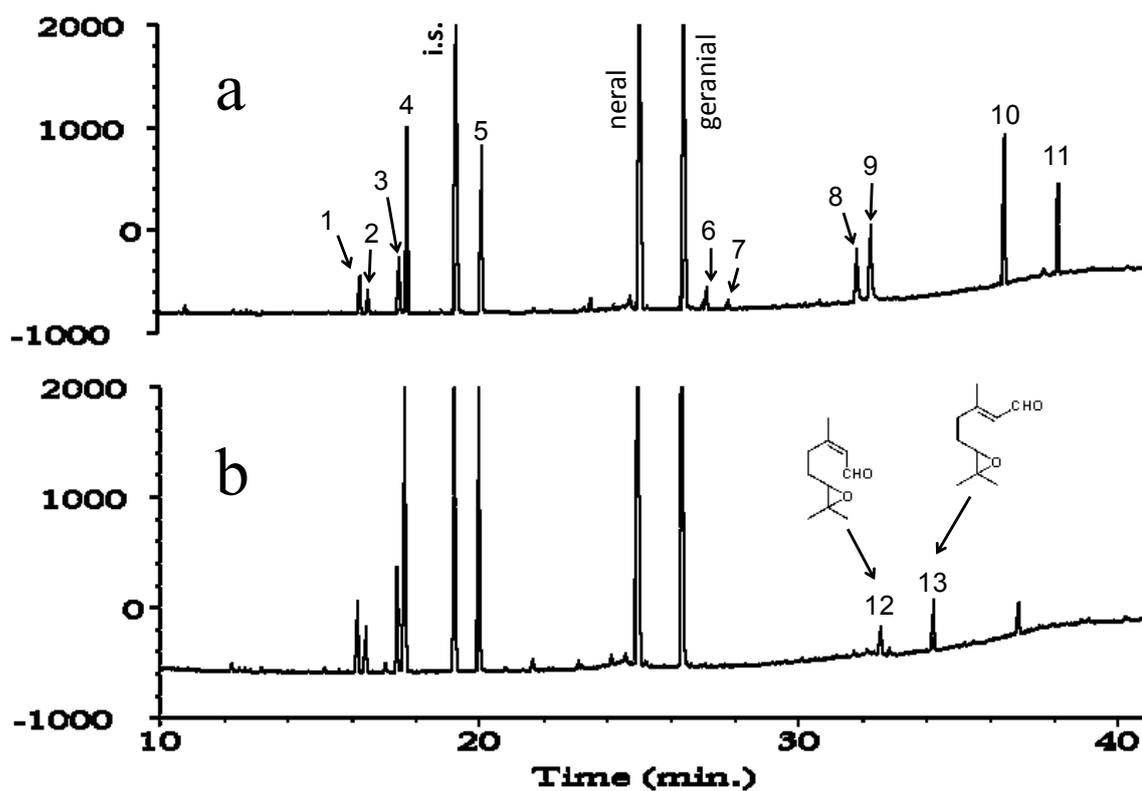


Fig. 30 Gas chromatographic analysis of the degradation products from citral (10 mg/L) stored in (a) pH 3.5 and (b) pH 7.0 buffers at 10 °C under fluorescent-light irradiation (15000 lux) for 7 days.

Table 7 Tested antioxidants

Hydroxybenzoic acids	Hydroxycinnamic acids
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	<i>p</i> -coumaric acid
protocatechuic acid	caffeic acid
vanillic acid	ferulic acid
gallic acid	sinapic acid
	rosmarinic acid
	chlorogenic acid
Flavonoids	Other
(-)-epicatechin	L(+)-ascorbic acid
(-)-epigallocatechin	
(-)-epigallocatechin gallate	
α -glucosylrutin	
quercitrin	

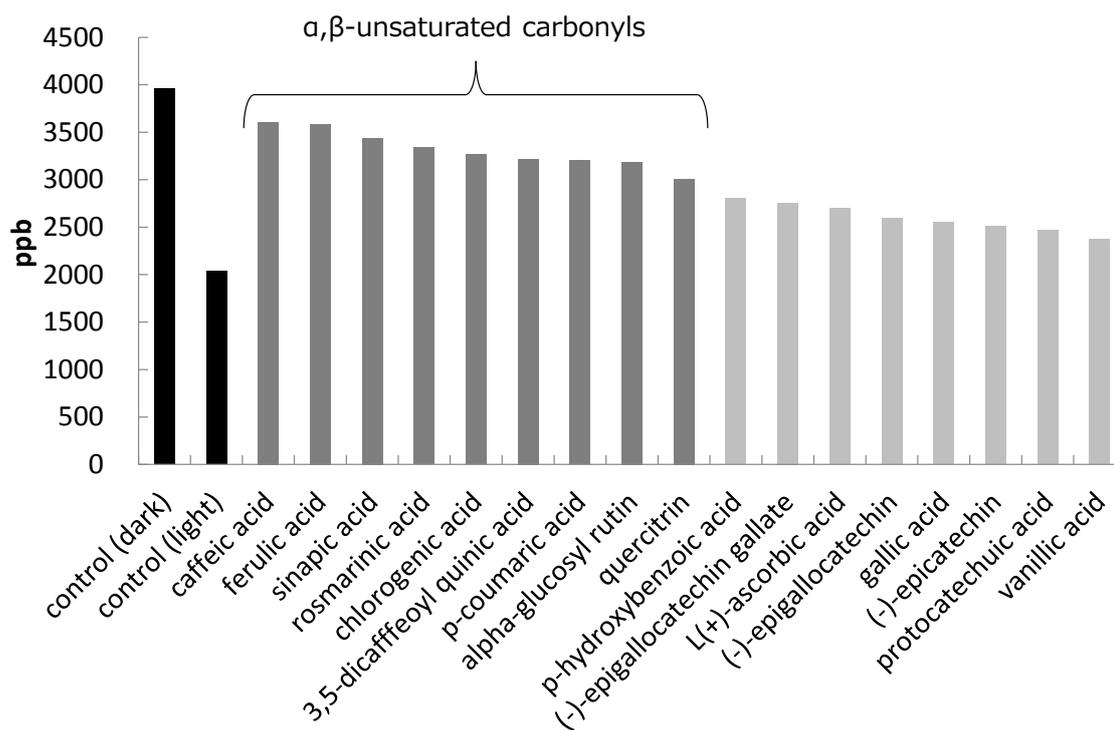


Fig. 31 Effects of antioxidants on the retention of citral. Citral (10 mg/L) was stored with or without antioxidants (10 mg/L) in the acidic aqueous solutions (pH 3.5) at 10 °C under fluorescent-light irradiation (15000 lux) for 2 weeks.

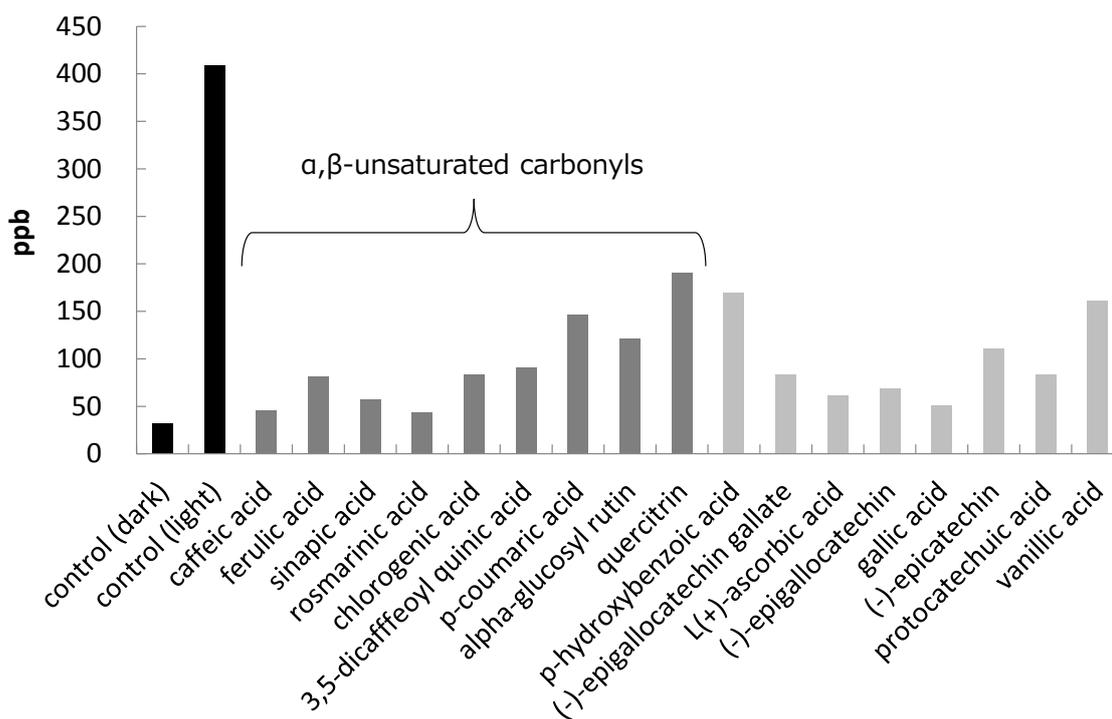


Fig. 32 Effect of antioxidants on the formation of photo-oxidation products from citral. Citral (10 mg/L) was stored with or without antioxidants (10 mg/L) in the acidic aqueous solutions (pH 3.5) at 10 °C under fluorescent-light irradiation (15000 lux) for 2 weeks.

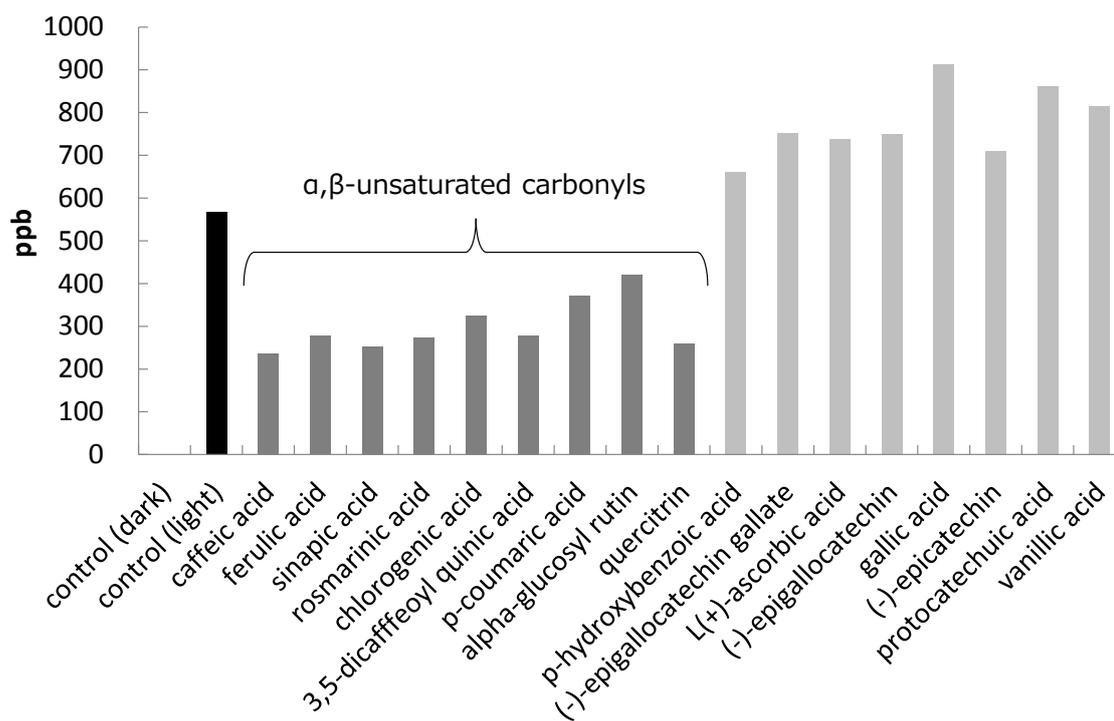


Fig. 33 Effect of antioxidants on the formation of photochemical-cyclization products from citral. Citral (10 mg/L) was stored with or without antioxidants (10 mg/L) in the acidic aqueous solutions (pH 3.5) at 10 °C under fluorescent-light irradiation (15000 lux) for 2 weeks.

第4節 ビタミン B₁ 由来のオフフレーバーに対する茶抽出物の抑制効果

1.4.1 緒言

オレンジやグレープフルーツなどの柑橘果汁の製造には、濃縮や殺菌などの加熱工程を伴う場合が多い。このため、市場に流通している柑橘果汁の香りは、絞りたてのフレッシュな香りとは異なることが知られている。柑橘果汁の殺菌、保存に伴う劣化臭の原因として、ビタミン B₁ の分解によって生成する 2-methyl-3-furanthiol (MFT) が指摘されている^{14), 15), 16)}。本節では、ビタミン B₁ 酸性水溶液の殺菌、保存によって生成する MFT に対して、緑茶抽出物および個々のカテキン類の添加効果を検討した。

1.4.2 実験方法

1.4.2.1 実験材料

緑茶抽出物は既報⁶⁷⁾に従い調製した。チアミン塩酸塩はナカライテスク社より購入した。(+) -Catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate および (-)-epigallocatechin gallate はフナコシ社より購入した。

1.4.2.2 サンプル調製

ビタミン B₁ 塩酸塩 (10 mg/L) を 0.1 M クエン酸—0.2 M リン酸水素二ナトリウム緩衝溶液 (pH 3.0) に溶解した。この溶液に緑茶抽出物, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate および (-)-epigallocatechin gallate のうち、いずれか一つを 30 mg/L の濃度で添加し、ガラス瓶に充填した。各溶液を 70°C にて 10 分間殺菌した後、40°C の恒温槽内で 1, 3, 7 および 14 日間保存した。保存前および保存後の各溶液をジクロロメタンで抽出した後、ガスクロマトグラフィ—質量分析法により 2-methyl-3-furanthiol の生成量を測定した。対照には無添加のビタミン B₁ 酸性水溶液を使用した。

1.4.3 結果および考察

ビタミン B₁ 酸性水溶液の殺菌，保存による 2-methyl-3-furanthiol (MFT) の濃度変化とそれに対する緑茶抽出物の添加効果を **Fig. 34** に示す．殺菌後および 1 日間保存後では緑茶抽出物の添加効果は見られなかったが，3，7 および 14 日間保存後では緑茶抽出物の添加により MFT の生成が顕著に抑制された．次に，7 日間保存した時点での MFT の生成に対する個々のカテキン類の添加効果を検討した (**Fig. 35**) ．その結果，(-)-epigallocatechin (EGC) と (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) は MFT の生成に対して抑制効果を示したが，(+)-catechin, (-)-epicatechin (EC) および (-)-epicatechin gallate (ECg) は抑制効果を示さなかった．これらの結果から，MFT の生成抑制にはカテキン分子内 B 環のピロガロール構造が重要であることが示唆された．緑茶由来のカテキン類は酸化によりキノンを形成し，メチルメルカプタンと反応することが報告されている⁶⁸⁾．本章で確認された MFT に対する抑制効果も同様の反応機構によるものと推察される．

1.4.4 要約

オレンジやグレープフルーツなど柑橘果汁の殺菌，保存に伴う劣化臭の原因として，ビタミン B₁ の分解によって生成する 2-methyl-3-furanthiol (MFT) が報告されている．本節では，ビタミン B₁ 酸性水溶液の保存によって生成する MFT の抑制に，緑茶抽出物の添加が有効であることが明らかになった．さらに，個々のカテキン類の添加効果を検討した結果，(-)-epigallocatechin と (-)-epigallocatechin gallate は MFT の生成に対して抑制効果を示したが，(+)-catechin, (-)-epicatechin および (-)-epicatechin gallate は抑制効果を示さなかった．これらの結果から，MFT の生成抑制にはカテキン分子内 B 環のピロガロール構造が重要であることが示唆された．

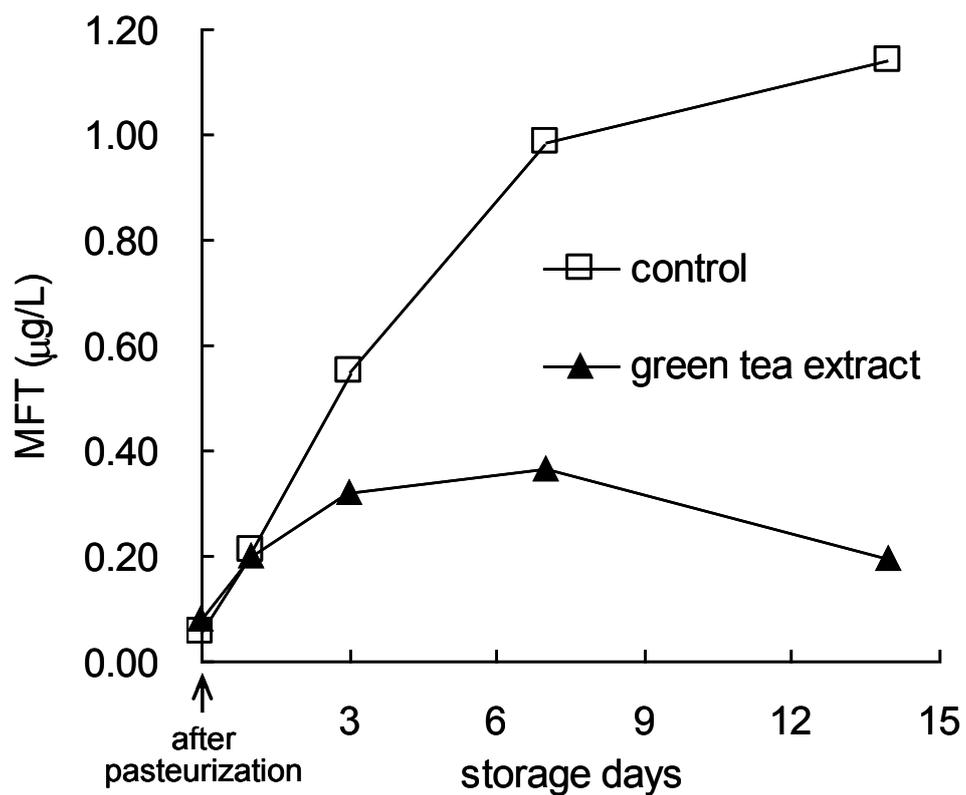


Fig. 34 Effects of the green tea extract (30 mg/L) on the formation of 2-methyl-3-furanthiol (MFT) from thiamin (10 mg/L) in an acidic buffer (pH 3.0) during storage at 40 °C.

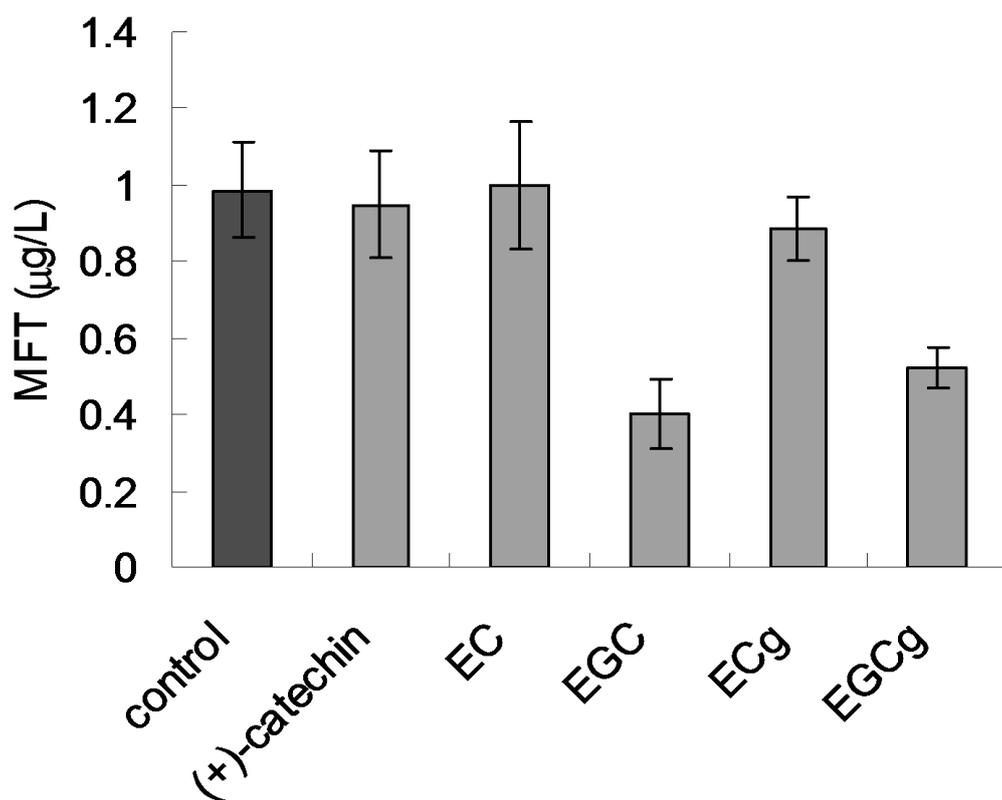


Fig. 35 Effects of the individual catechins (30 mg/L) on the formation of 2-methyl-3-furanthiol (MFT) from thiamin (10 mg/L) in an acidic buffer (pH 3.0) stored at 40 °C for 7 days. EC: (-)-epicatechin; EGC: (-)-epigallocatechin; ECg: (-)-epicatechin gallate; EGCg: (-)-epigallocatechin gallate.

第2章 ストレス関連症状に対するラベンダーおよびペパーミント由来ポリフェノールの摂取効果

第1節 ラベンダー抽出物の抗ストレス作用

2.1.1 緒言

ラベンダー (*Lavandula angustifolia*) は地中海沿岸を原産とするシソ科の多年草であり、香りにリラックス効果があるとされ、乾燥した花から水蒸気蒸留によって得られる精油はアロマセラピーやフレグランスに広く利用されている²²⁾。ラベンダー精油とその主要香気成分である linalool は、蒸気吸入により鎮静もしくはリラックス作用を示すことが、ヒトおよび動物を対照とした研究で確かめられている^{69), 70), 71), 72)}。また、その他にもラベンダー精油の効能については、ストレス緩和⁷³⁾、抗不安^{74), 75)}、抗うつ⁷⁶⁾、睡眠改善作用^{77), 78), 79)}など、ストレスに関連した研究が数多く報告されている。一方、ラベンダーは熱水で抽出することによりハーブティーとしても利用されているが⁸⁰⁾、ラベンダーの熱水抽出物の効能に関する研究は少なく、*in vitro* における抗酸化作用⁸¹⁾や神経細胞保護作用⁸²⁾、アルツハイマー病モデルラットにおける空間認知改善作用⁸³⁾などが報告されているが、ストレス性疾患の予防もしくは改善作用については報告されていない。

本研究では、ラベンダーの熱水抽出物にはフェノール性の抗酸化成分⁸⁴⁾など香気以外にも有用な成分が含まれることに着目し、香気を除去したラベンダー熱水抽出物 (lavender extract, 以下 LE と略す) の摂取がストレス性疾患として代表的なうつ病と胃潰瘍の動物モデルに及ぼす影響について検討した。

2.1.2 実験方法

2.1.2.1 実験動物および飼育条件

動物は4または5週齢の雄性 ICR マウスを日本エスエルシー株式会社より購入し、室温 22-25°C、湿度 40-70%、明期 12 時間 (7:00-19:00) の環境で飼育した。

飼育ケージにはポリカーボネート樹脂ケージ (210 × 315 × 130 mm, 日本クレア株式会社), 床敷には木材チップを使用し, ケージ当たり 4-8 匹のマウスを収容して飼育した. 飼料は CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を与え, 飼育中は飼料と水を自由摂取させた. 群分けは, 群分け当日の体重に基づいて層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように行った. 動物実験は株式会社ケー・エー・シーへ委託し, 同社生物科学センター動物委員会の承認を受け, 「実験動物の飼育および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号) を遵守した上で行った.

2.1.2.2 試料および試薬

ラベンダー熱水抽出物 (LE) は以下の方法により調製した. ラベンダー (*Lavandula angustifolia*) の乾燥花 125 g を 2.5 L の蒸留水を用いて攪拌下, 90°C で 1 時間抽出した. 抽出残渣を濾別し, 濾液を減圧下濃縮および凍結乾燥することにより LE 36.4 g を得た. イミプラミン塩酸塩は和光純薬株式会社より購入した. その他の試薬は市販の特級品を使用した. linalool はシグマアルドリッチ ジャパン社より購入した.

2.1.2.3 HPLC

フォトダイオードアレイ検出器を搭載したアジレント社製 1200 シリーズ HPLC システムを使用した. 分析条件: カラム, Capcell Pak C18 MG (250 mm × 4.6 mm i.d.; 粒径, 5 μm; 資生堂); カラムオープン温度, 40 °C; 移動相, 溶離液 A (pH 2.5 リン酸水溶液: アセトニトリル=90:10) / 溶離液 B (アセトニトリル) =100/0 (0 min), 0/100 (30 min), 0/100 (35 min); 流速, 1 mL/min; 注入量, 1 μL. サンプル溶液は注入前に 0.45-μm PTFE メンブランフィルタ (DISMIC-13HP; 東洋濾紙) で濾過した. linalool の定量は波長 210nm のクロマトグラムを用いて外部標準法により行った. ピークの帰属は UV スペクトル (波長 200-400 nm) と保持時間を標品と比較することで行った.

2.1.2.4 強制水泳試験 (FST)

入荷時 4 週齢の雄性 ICR マウスを使用し, 1 週間の馴化飼育の最終日にコント

ロール群ならびに LE 500, 1000 および 2500 mg/kg 投与群, 陽性対照として抗うつ薬であるイミプラミン 30 mg/kg 投与群の 5 群 (各 n=8) に群分けした. 順化飼育終了後, 胃ゾンデを用いて被験物質溶液 (10 mL/kg 体重) を反復経口投与した. なお, コントロール群には各投与液の媒体である蒸留水を投与した. この投与は 1 日 1 回の頻度で実施し, 15 日目の投与 1 時間後に FST を実施した. FST は 13:00 ~17:00 の時間帯に実施し, Porsolt らの方法⁸⁵⁾に従って行った. 高さ 40 cm, 内径 7 cm のガラス製円柱容器に水深が 20 cm になるように水 (水温は 25°C に管理) を入れて FST 用プールとした. マウスを FST 用プールに入れて 6 分間放置し, 最初の 2 分間は馴化時間として残りの 4 分間における無動時間を計測した. 無動時間は, マウスが前肢および後肢を動かさず, 首から上を水面に出して浮かんでいる状態 (無動状態) の時間の合計とした.

2.1.2.5 自発運動量測定試験

上記 FST を実施した後, 引き続き被験物質の投与を継続して 17 日目の投与の 1 時間後に自発運動量測定試験を実施した. まず, 床敷きを入れていない空のケージにマウスを入れて 10 分間馴化させた後, 防音条件下で自発運動量測定装置 (マルチチャンネル型自発運動量測定システム, スーパーメックス: SM-04/W, 室町機械株式会社) を用いて 10 分間の自発運動量を測定した.

2.1.2.6 ストレス潰瘍試験

入荷時 5 週齢の雄性 ICR マウスを使用し, 1 週間の馴化飼育の最終日にストレスなし群 (n=4) ならびに水泳ストレス負荷コントロール群 (n=9), LE 500, 1000 および 2000 mg/kg 投与群 (各 n=9), 陽性対照として抗ストレス潰瘍効果が報告されているイミプラミン⁸⁶⁾ 10 mg/kg 投与群 (n=8) の 6 群に群分けした. 順化飼育終了後, 水泳ストレスを負荷する約 24 時間前からマウスを絶食させた. 絶食中, 飲料水は自由摂取とし, 床敷きや糞を食べないようにケージには絶食用の金属性網を敷いた. 水泳ストレス負荷の 1 時間前に胃ゾンデを用いて被験物質溶液 (10 mL/kg 体重) を強制経口投与し, コントロール群には各投与液の媒体である蒸留水を投与した. また, ストレスなし群には胃摘出の 2 時間前に蒸留水を投与した. 投与から 1 時間後, 松元ら⁸⁷⁾が開発した運動量測定流水槽 (有限会社アニテック) を用いてマウスを流水中 (水温 25°C, 流量 5 L/min), 1 時間強制水泳させることによりストレスを負荷した. 水泳終了後, イソフルラン麻酔下でマウスを脱

血, 安楽死させ胃を摘出し, 10%中性緩衝ホルマリン液で 30 分間以上固定した後, 大彎に沿って胃を切り開き, 生理食塩液で洗浄した. 切り開いた胃をゴム板に張り付け, 実体顕微鏡 (倍率 20 倍: 面積測定用レンズ装着) を用いて出血性の病変の面積 (潰瘍面積) を計測した.

2.1.2.7 統計処理

各群のデータについて平均値と標準誤差 (SEM) を算出し, Shapiro-Wilk 検定により正規性を検定した. 正規性が棄却されなかった場合, 2 群間の比較においては F 検定により, 3 群間以上の場合には Bartlett 検定により等分散性を検定した. 等分散性が棄却されなかった場合, 2 群間の差は Student の t 検定により, 3 群間以上の場合にはコントロール群とその他の群との差を Williams 検定により解析した. 等分散性が棄却された場合, 2 群間の差は Welch の t 検定により, 3 群間以上の場合にはコントロール群とその他の群との差を Shirley-Williams 検定により解析した. 正規性が棄却された場合, 2 群間の差は Mann-Whitney の U 検定により, 3 群間以上の場合にはコントロール群とその他の群との差を Shirley-Williams 検定により解析した. 統計ソフトは Shapiro-Wilk 検定には SPSS 13.0J for Windows (SPSS Japan) を使用し, その他の検定には Statcel 3 (オーエムエス出版) を使用した. いずれの検定においても $P < 0.05$ の場合を有意と判定した.

2.1.3 結果

2.1.3.1 反復投与中のマウスの体重変化

投与開始前に対する投与 7 日目および 14 日目の各試験群におけるマウスの体重増加率 (%) を **Table 8** に示す. 統計学的有意差の解析は, コントロール群とイミプラミン投与群との差については Student の t 検定 (両側), コントロール群と LE 投与群との差については Shirley-Williams 検定 (両側) を用いて行った. いずれの測定日においても, イミプラミンもしくは LE 投与による体重増加率への有意な影響は見られなかった. また, 投与期間中, いずれの試験群においても死亡例はなく, 一般状態観察においても異常所見は認められなかった.

2.1.3.2 FST の無動時間に対する LE 反復投与の効果

イミプラミンおよびLEを15日間反復投与した場合のマウスの無動時間への影響を **Fig. 36** に示す。コントロール群およびイミプラミン投与群の無動時間（平均値±標準誤差）はそれぞれ 220 ± 5 および 150 ± 17 秒であった。統計学的解析の結果、イミプラミン投与群ではコントロール群に比べてマウスの無動時間が有意に減少していることが判明した（ $P = 7.7 \times 10^{-4}$ ，両側，Mann-Whitney の U 検定）。この結果から、本試験系において抗うつ薬であるイミプラミンの効果が正しく評価できたと考えられた。一方、LE 500, 1000 および 2500 mg/kg 投与群の無動時間はそれぞれ 196 ± 8 , 168 ± 28 および 137 ± 22 秒であり、用量依存的に無動時間が減少する傾向が見られた。統計学的解析の結果、いずれの LE 投与群においてもコントロール群に比べて無動時間が有意に減少していることが明らかとなった（LE 2500 mg/kg 投与群では $P < 0.01$ ，LE 500 および 1000 mg/kg 投与群では $P < 0.05$ ，すべて両側，Shirley-Williams 検定）。

2.1.3.3 マウスの自発運動量に対する LE 反復投与の効果

イミプラミンもしくはLEを17日間反復投与した場合のマウスの自発運動量への影響を **Table 9** に示す。統計学的有意差の解析は、コントロール群とイミプラミン投与群との差については Student の t 検定（両側），コントロール群とLE投与群との差については Williams 検定（両側）を用いて行った。イミプラミンもしくはLEの投与による自発運動量への有意な影響は見られなかった。

2.1.3.4 ストレス潰瘍に対する LE 単回投与の効果

ストレス潰瘍試験におけるマウス胃内部の写真の一例を **Fig. 37** に示す。ストレスなし群（Non-stressed control）のマウスの胃粘膜に損傷は見られなかったが、水泳ストレス負荷コントロール群（Swim-stressed control）のマウスの胃粘膜には出血性の病変が認められた。これら病変の面積（潰瘍面積）を測定した結果を **Fig. 38** に示す。ストレスなし群、水泳ストレス負荷コントロール群、イミプラミン投与群の潰瘍面積（平均値±標準誤差）はそれぞれ 0.2 ± 0.1 , 29.0 ± 3.9 , $6.6 \pm 2.0 \text{ mm}^2$ であった。統計学的解析の結果、水泳ストレス負荷コントロール群ではストレスなし群に比べて潰瘍面積が有意に増加し（ $P = 7.6 \times 10^{-5}$ ，両側，Welch の t 検定），イミプラミン投与群では水泳ストレス負荷コントロール群に比べて潰瘍面積が有

意に減少していることが判明した ($P = 1.8 \times 10^{-4}$, 両側, Student の t 検定) . これらの結果から, 本試験においてストレス潰瘍モデルが問題なく作製できたと考えられた. 一方, LE 500, 1000 および 2000 mg/kg 投与群の潰瘍面積はそれぞれ 11.7 ± 2.1 , 13.7 ± 3.3 および $8.8 \pm 1.8 \text{ mm}^2$ であった. 統計学的解析の結果, いずれの LE 投与群においても潰瘍面積が水泳ストレス負荷コントロール群に比べて有意に減少していることが判明した (すべて $P < 0.01$, 両側, Shirley-Williams 検定) .

2.1.3.5 濃縮前および凍結乾燥後における LE 中の linalool 含量

濃縮前の LE 中の linalool 含量は 乾燥重量基準で 24.2 mg/g であったのに対し, 凍結乾燥後の LE には linalool は検出されなかった (Fig. 38) .

2.1.4 考察

2.1.4.1 ラベンダー熱水抽出物 (LE) の抗うつ様作用

FST は 1977 年に Porsolt ら⁸⁸⁾ により開発され, 現在, 抗うつ薬のスクリーニング方法として最も繁用されているうつ病の動物モデルである. マウスあるいはラットを逃避不可能な水槽内に入れると, 最初は逃げようと激しく水面を泳ぐが, 次第に泳ぐのを諦めて水に浮いているだけの状態 (無動状態) になる. この状態は, 動物が水からの逃避を放棄した一種の絶望状態と考えられており, 臨床的に効果のある多くの抗うつ薬によって無動時間が短縮することが知られている⁸⁸⁾,⁸⁹⁾,⁹⁰⁾ . 一方, 抗うつ薬以外に, アンフェタミンやカフェインのような中枢神経興奮作用のある薬物も無動時間を短縮することが知られている⁸⁸⁾,⁹⁰⁾ . しかし, これらの薬物は, 抗うつ薬と異なりマウスやラットの自発運動を著しく増加させるので, 自発運動への影響を測定することにより抗うつ薬と区別することができる⁹⁰⁾ .

本研究では 1 日当たり 500-2500 mg/kg の LE を 15 日間マウスへ反復投与することにより, 自発運動に影響することなく FST における無動時間が有意に短縮した (Fig. 36, Table 9) . また, 抗うつ薬であるイミプラミン 30 mg/kg を 15 日間反復投与した場合も同様の挙動を示した. これらの結果から, LE はマウスへの反復投与において抗うつ様作用を有することが示唆された. ラベンダーの抗うつ様作

用については、ラベンダーの精油をラットの腹腔内に投与することにより FST における無動時間を短縮することが報告されている⁷⁶⁾。また、ラベンダーチンキ（含水アルコール抽出物）の経口投与はうつ病患者におけるイミプラミンの治療効果を高めることが報告されている⁹¹⁾。ラベンダー熱水抽出物がマウスへの反復投与において抗うつ様作用を示すことは、今回始めて明らかになった。

2.1.4.2 ラベンダー熱水抽出物 (LE) の抗ストレス潰瘍作用

身体的または精神的ストレスによって発症する急性の胃粘膜病変をストレス潰瘍⁹²⁾と称しているが、本研究では、マウスに強制水泳を負荷することにより発生させた実験的ストレス潰瘍に対して、LE が優れた予防効果を示すことが明らかとなった (Fig. 38)。これまでラベンダー精油ならびその主要香気成分である linalool および linalyl acetate には、エタノール誘発性潰瘍に対して抑制効果があることが報告されている²⁴⁾。しかし、ラベンダーの熱水抽出物の抗潰瘍効果を実験的に証明した報告はこれまでになかった。

2.1.4.3 LE 中の有効成分

本研究で用いた LE からは、濃縮と凍結乾燥によってラベンダーの主要な精油成分である linalool が完全に除去されている (Fig. 39)。したがって、LE の抗うつ様および抗潰瘍作用はラベンダー中の不揮発性成分に起因すると考えられる。ラベンダーにはヒドロキシ桂皮酸類やフラボン配糖体など不揮発性のフェノール性化合物が存在する⁸⁴⁾。これらの中で rosmarinic acid^{93), 94)} は FST において抗うつ様作用を示すことが報告されている。一方、ラベンダーと同じくシソ科の植物であるローズマリーの抗潰瘍成分として rosmarinic acid の可能性が指摘されている⁹⁵⁾。したがって rosmarinic acid は、LE の抗うつ様作用と抗ストレス潰瘍作用の両方に関与している可能性がある。しかし、他の有効成分が存在する可能性も残されており、今後詳細に検討する必要がある。

2.1.5 要約

本研究では、ストレス性疾患として代表的なうつ病と胃潰瘍に対するラベンダー熱水抽出物 (lavender extract, LE) の効果を、それぞれの疾患モデルマウスを用

いて検討した。抗うつ試験では、うつ病の動物モデルとして汎用されている強制水泳試験 (FST) を用いて LE の反復投与による効果を検証した。1 日当たり 500-2500 mg/kg の LE を 15 日間マウスへ反復経口投与することにより、自発運動量に影響することなく FST における無動時間が有意に短縮した。さらに、抗うつ薬であるイミプラミン 30 mg/kg を 15 日間反復投与した場合も同様の挙動を示した。これらの結果から、LE はマウスへの反復投与において抗うつ様作用を有することが示唆された。抗ストレス潰瘍試験では、マウスに強制水泳を負荷することにより発生させた実験的ストレス潰瘍に対して、予め 500-2000 mg/kg の LE を単回経口投与することにより、マウスの潰瘍面積が対照群と比べて有意に減少した。以上の結果から、LE の摂取がストレスに起因するうつ病や胃潰瘍の予防・軽減に有効である可能性が示唆された。

Table 8 Changes in body weight of mice during repeated treatment with imipramine and lavender extract (LE).

Treatment	Body weight (%)	
	Day 7	Day 14
Control	114 ± 1.2	129 ± 2.2
Imipramine 30 mg/kg	115 ± 2.0	123 ± 2.5
LE 500 mg/kg	117 ± 1.7	127 ± 2.0
LE 1000 mg/kg	117 ± 1.9	123 ± 2.1
LE 2500 mg/kg	117 ± 4.9	126 ± 4.9

Data are expressed as a percentage of the pretreatment value (mean ± SEM, n=8). Samples were orally administrated once daily for 14 days.

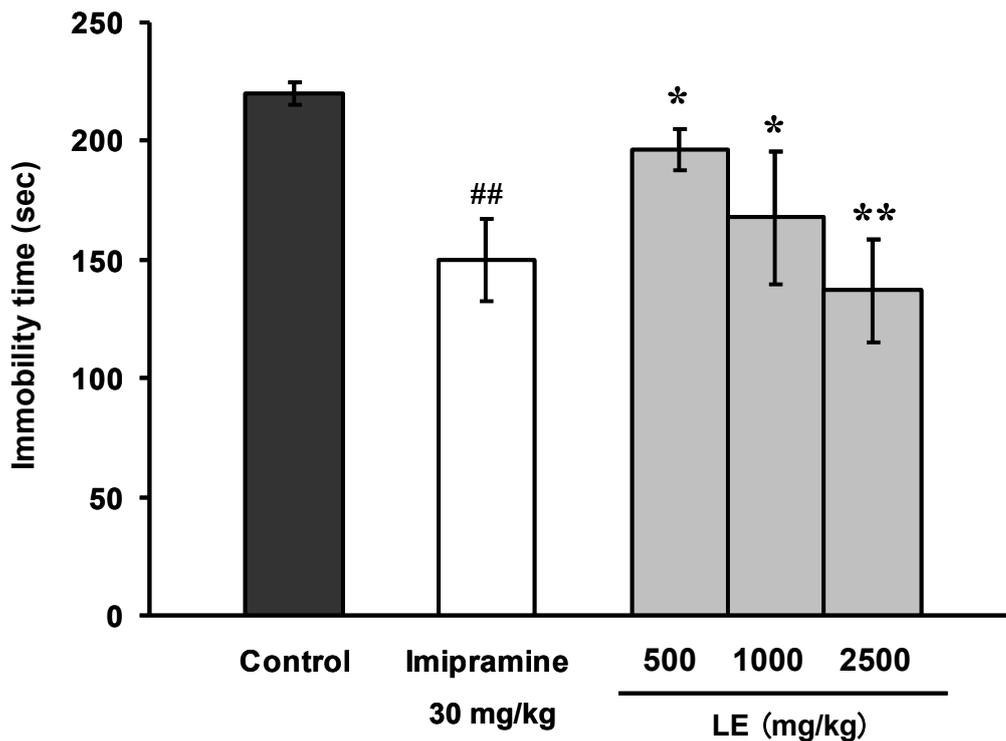
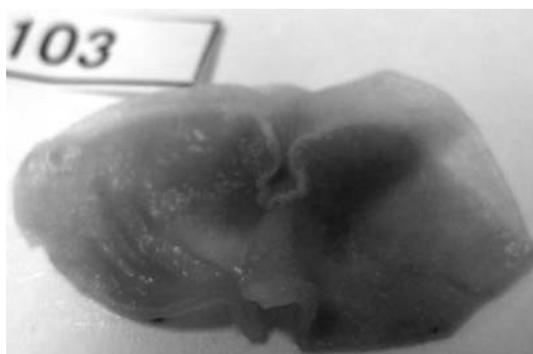


Fig. 36 Effects of repeated administration of lavender extract (LE) on the immobility time in the FST in mice. Samples were orally administered once daily for 15 days. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8). ## $P < 0.01$ vs. control (two-tailed Mann-Whitney's U -test); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (two-tailed Shirley-Williams' test).

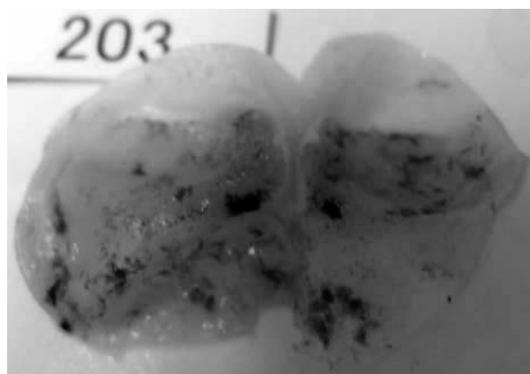
Table 9 Effects of repeated administration of lavender extract (LE) on locomotor activity in mice.

Treatment	Locomotor activity (counts)
Control	723 ± 158
Imipramine 30 mg/kg	842 ± 168
LE 500 mg/kg	666 ± 146
LE 1000 mg/kg	733 ± 197
LE 2500 mg/kg	717 ± 96

Data are expressed as the mean ± SEM (n=8). Samples were orally administrated once daily for 17 days.



Non-stressed control
Ulcer area = 0 mm²



Swim-stressed control
Ulcer area = 42.8 mm²

Fig. 37 Gastric insides of swim-stressed and non-stressed mice.

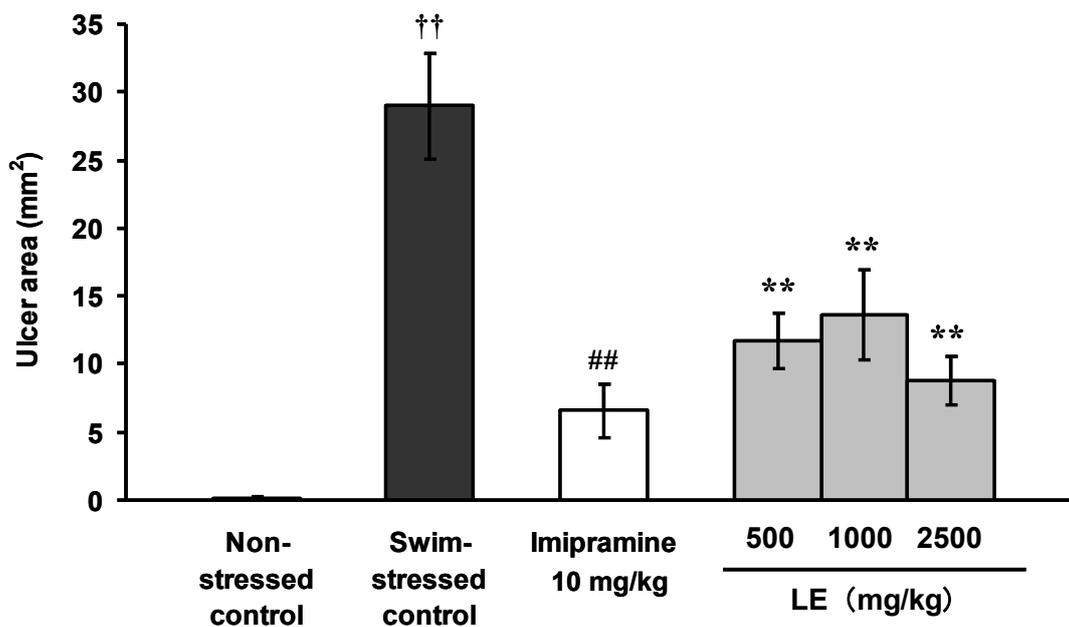


Fig. 38 Effects of single oral administration of lavender extract (LE) on gastric lesions in mice. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=4-9). †† P < 0.01 vs. non-stressed control (two-tailed Welch's t -test); ## P < 0.01 vs. swim-stressed control (two-tailed Student's t -test); ** P < 0.01 vs. swim-stressed control (two-tailed Shirley-Williams' test).

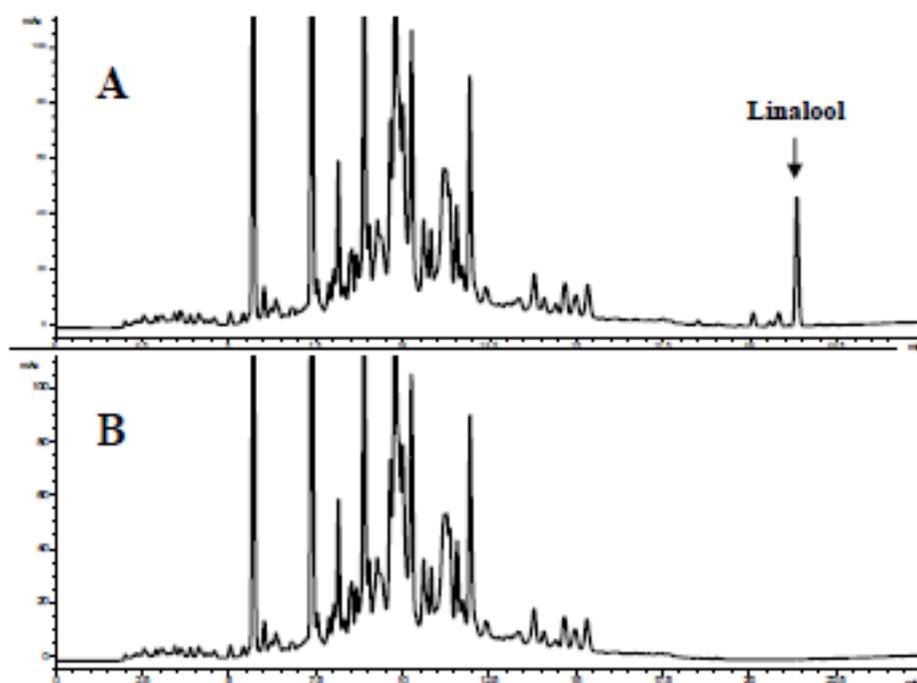


Fig. 39 HPLC chromatograms of LE before (A) and after (B) the evaporation-lyophilization process. A wavelength of 210 nm was used for recording the chromatograms

第2節 ラベンダー由来の抗うつ様活性成分

2.2.1 緒言

第1節の結果では、ラベンダー抽出物 (LE) はマウスへの経口投与において、抗うつ様および抗ストレス潰瘍作用を示した。また、LEの有効成分については、*rosmarinic acid* が抗うつ様および抗ストレス潰瘍作用の両方に関与する可能性が示唆された。しかし、未知の有効成分が存在する可能性も残されている。本節ではLEの抗うつ様活性成分について検討した。

2.2.2 実験方法

2.2.2.1 実験動物および飼育条件

動物は6週齢の雄性ICRマウス (29–31 g) を日本エスエルシー株式会社より購入し、室温22–24°C、湿度38–51%、明期12時間 (7:00–19:00) の環境で飼育した。飼育ケージにはポリカーボネート樹脂ケージ (210×315×130 mm, 日本クレア株式会社)、床敷には木材チップを使用し、ケージ当たり4匹のマウスを収容して飼育した。飼料はCRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を与え、飼育中は飼料と水を自由摂取させた。1週間の馴化飼育の最終日に層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行った。行動試験は群分けの翌日、13:00–17:00の時間帯に実施した。動物の再利用はせず、行動試験のたびに新しい動物を使用した。動物実験は株式会社ケー・エー・シーへ委託し、同社生物学センター動物委員会の承認を受け、「実験動物の飼育および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」 (平成18年4月28日環境省告示第88号) を遵守した上で行った。

2.2.2.2 試料および試薬

ラベンダー抽出物 (LE) は第1節と同じ方法で調製した。*Rosmarinic acid* (RA) および *caffeic acid* (CAA) はシグマアルドリッチ ジャパン社より購入した。イミプラミン塩酸塩は和光純薬工業株式会社より購入した。*(+)-Catechin hydrate* はナ

カライテスク社より購入し、水分量をカールフィッシャー法により測定した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

2.2.2.3 分取 HPLC

LE の分画は、分取 HPLC システム（島津製作所）を用いて行った。システム構成：SIL-10AP オートサンプラ，LC-6AD 送液ユニット×2，DGU-12A 脱気ユニット，SCL-10A VP システムコントローラ，SPD-M20A フォトダイオードアレイ検出器および FRC-10A フラクションコレクタ。5g の LE を蒸留水 100 mL に溶解し，0.45- μ m PTFE メンブランフィルタ（DISMIC-25HP；東洋濾紙）で濾過した後，次に示す条件で分画した。分画条件：カラム，Chromatorex ODS SMB 100-10（250 mm × 20 mm i.d.；粒子径，10 μ m；細孔径，10 nm；富士シリシア）；移動層，アセトニトリル/0.1% ギ酸（v/v）= 13/87（0 min），30/70（35 min），100/0（35 min），100/0（45 min）；流速，12 mL/min；注入量，5 mL；分画時間，0.3–10.8 min（Fr. 1），10.8–33.3 min（Fr. 2），33.3–36.5 min（Fr. 3），36.5–45.0 min（Fr. 4）。上記条件による分画を 25 回繰り返した後，各フラクションをロータリーエバポレーターで減圧下濃縮，次いで凍結乾燥することにより LE の乾燥分画物を得た。各分画物の収量を **Table 10** に示す。

2.2.2.4 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)lactic acid (DLA) の単離

125 g のラベンダー乾燥花から 2.1.2.2 に示した方法により LE 35g を調製した。この LE を 1.75 L の 1%ギ酸水溶液に懸濁し，多孔性樹脂カラム（セパビーズ SP-70，三菱化学）に吸着させた後，最初に 1%ギ酸水溶液（1.75 L×2），次に 1%ギ酸含有 10%エタノール（1.75 L×3）で展開した。1%ギ酸含有 10%エタノールで溶出した画分（1.75 L×3）のうち，二つ目の画分をロータリーエバポレーターで減圧下濃縮，次いで凍結乾燥することにより 961 mg の組成物を得た。得られた組成物を 2.2.2.3 と同様の条件で分取 HPLC により精製し，297 mg の 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid (DLA) を得た。¹H MMR (CD₃OD, 400 MHz) : δ 6.71 (1H, *d*, *J* = 2 Hz, C₂-H), 6.67 (1H, *d*, *J* = 8 Hz, C₅-H), 6.57 (1H, *dd*, *J* = 2, 8 Hz, C₆-H), 4.26 (1H, *dd*, *J* = 4, 8 Hz, C₂-H), 2.94 (1H, *dd*, *J* = 4, 14 Hz, C₃-H), 2.75 (1H, *dd*, *J* = 8, 14 Hz, C₃-H) [文献値⁹⁶⁾と一致] ; ¹³C MMR (CD₃OD, 100 MHz) : δ 177.3 (C₁), 145.9 (C_{3'}), 144.9 (C_{4'}), 130.3 (C_{1'}), 121.9 (C_{6'}), 117.7 (C_{2'}), 116.1 (C_{5'}), 73.1 (C₂), 41.0 (C₃) ; HRMS

(ESI-TOF, negative) : m/z 197.0470 [M-H]⁻ (calcd. for C₉H₉O₅, 197.0450) .

2.2.2.5 強制水泳試験 (FST)

FSTは2.1.2.4と同様の方法で行った.ただし,被験物質の投与は単回投与とし,順化飼育最終日の翌日, FST の 1 時間前に胃ゾンデを用いて被験物質溶液 (10 mL/kg 体重) を投与した. LE の分画物である Fr. 1-3 は, LE に換算して 2500 および 5000 mg/kg に相当する 2 種類の用量 (低および高用量) で投与し, Fr. 4 は高用量のみで投与した.

2.2.2.6 自発運動量測定

自発運動量の測定にはマルチチャンネル型自発運動量測定システム (スーパーメックス SM-04/W, 室町機械) を用いた. 床敷きを入れていない空のケージ (210 × 315 × 高さ 130 mm) にマウスを入れ, 10 分間ごとの自発運動量を合計 60 分間測定した. 被験物質溶液 (10 mL/kg 体重) を試験の 1 時間前に胃ゾンデを用いて投与した.

2.2.2.7 HPLC

フォトダイオードアレイ検出器を搭載したアジレント社製 1200 シリーズ HPLC システムを使用した. 分析条件: カラム, Capcell Pak C18 MG (250 mm × 4.6 mm i.d.; 粒径, 5 μm; 資生堂); カラムオープン温度, 40 °C; 移動相, 溶離液 A (pH 2.5 リン酸水溶液: アセトニトリル=90:10) / 溶離液 B (アセトニトリル) =100/0 (0 min), 0/100 (30 min), 0/100 (35 min); 流速, 1 mL/min; 注入量, 1 μL. サンプル溶液は注入前に 0.45-μm PTFE メンブランフィルタ (DISMIC-13HP; 東洋濾紙) で濾過した. DLA および RA の定量はそれぞれ波長 280 および 210 nm のクロマトグラムにより行った. また, DLA および RA のピークの帰属は UV スペクトル (波長 200-400 nm) および保持時間を標品と比較することにより行った.

2.2.2.8 Rosmarinic acid (RA) の添加実験

RA (22, 44 および 88 mg) を蒸留水 100mL に添加し, ラベンダーの乾燥花 5g

を加えて攪拌下, 90 °C で 1 時間抽出した. RA を添加しない場合も同様に抽出した. 抽出後, 液相中の DLA および RA の濃度を HPLC 分析により測定した.

2.2.2.9 総フェノール量の測定

総フェノール量は Folin-Denis 法⁹⁷⁾ により測定し, (+)-catechin 当量として表した.

2.2.2.10 核磁気共鳴分光分析法 (NMR)

NMR スペクトル (¹H, 400 MHz; ¹³C, 100 MHz) の測定にはブルカーバイオスピン社製 Advance 400 を使用した. 溶媒は重メタノール (CD₃OD) を使用し, 化学シフトは溶媒の残留プロトン ($\delta = 3.30$) および溶媒のカーボンシグナル ($\delta = 49.0$) を基準として δ 値 (ppm) で表した. 結合定数 (J 値) は Hz で表し, 多重度 (d , 二重線; dd , 二重の二重線) を記載した. シグナルの帰属は二次元 NMR (COSY, HMQC, HMBC) により確認した.

2.2.2.11 高分解能質量分析 (HRMS)

高分解能質量スペクトルは日本ウォーターズ社製 LCT Premier 飛行時間型質量分析計を用いて, エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) によりコーン電圧 40 V で測定した.

2.2.2.12 統計解析

各群のデータについて平均値と標準誤差 (SEM) を算出し, Microsoft Excel 2010 (マイクロソフト社) およびアドインソフトウェア Statcel 3 (OMS 出版) を用いて解析した. コントロール群と被験物質投与群との比較を用量が 1 種類の場合は Student's t -test により, 用量が 2 種類以上の場合は Williams 検定により解析した. いずれの場合も $P < 0.05$ の場合を有意と判定した.

2.2.3 結果および考察

2.2.3.1 LE 分画物の総フェノール量と rosmarinic acid (RA) 含量

ラベンダーに存在する rosmarinic acid (RA) 以外の抗うつ様活性成分を探索するため、ラベンダー熱水抽出物 (LE) を分取 HPLC によって分画した。Fig. 40 に示すように、ODS カラムの保持時間に基づき LE を分画し、RA を主成分とする画分 (Fr. 3) とそれ以外の三つの画分 (Fr. 1, 2 および 4) を得た。これら分画物の収量、総フェノール量および RA 含量を Table 10 に示した。総フェノール量は全ての画分に分散し、その中でも Fr. 2 の総フェノール量が最も高かった。一方、RA は Fr. 3 に高い濃度で存在し、それ以外の画分では殆ど検出されなかった。これらの結果から、Fr. 3 を除く三つの画分 (Fr. 1, 2 および 4) には RA 以外のフェノール性成分が存在することが示唆された。

2.2.3.2 LE とその分画物の抗うつ様活性

LE とその分画物の抗うつ様活性を強制水泳試験 (FST) により評価した。本章第 1 節では LE の抗うつ様活性を反復投与による FST で検証したが、本節では成分探索が目的であることから比較的簡便な単回投与による FST を採用した。LE (500, 1000 および 2500 mg/kg) をマウスへ単回経口投与することにより、FST における無動時間はコントロールと比べて有意に短縮した (Fig. 41a)。さらに、Fr. 1 (1610 および 3221 mg/kg)、Fr. 3 (127 mg/kg) および Fr. 4 (314 mg/kg) の経口投与によってもマウスの無動時間が有意に短縮した (Fig. 41a, b)。Fr. 3 は既知の抗うつ様活性成分である RA^{93), 94)} を高濃度に含有するので、Fr. 3 の抗うつ様活性は RA に起因することが推察された。一方、RA を殆ど含まない Fr. 1 と Fr. 4 にも抗うつ様活性が検出されたことから、Fr. 1 と Fr. 4 には RA 以外の抗うつ様活性成分が存在することが示唆された。

2.2.3.3 Fr. 1 における 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid (DLA) の同定

RA 以外の抗うつ様活性成分の存在が示唆された Fr. 1 および Fr. 4 のうち、Fr. 1 の HPLC チャートには高い吸光度を示す単独のピーク (peak A) が存在する (Fig. 40)。そこで、Fr. 1 における peak A の単離同定を検討した。SP-70 多孔性樹脂カ

ラムにより LE を分画し、得られた組成物を分取 HPLC で精製することにより、peak A に相当する純化合物を得た。¹H および ¹³C NMR スペクトルならびに MS スペクトル分析により、この化合物を 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid (DLA, Fig. 42) と同定した。DLA は RA の構成成分であり、もう 1 つの構成成分である caffeic acid (CAA) とのエステル結合により RA を形成する (Fig. 42)。これまでの研究では、DLA は *Salvia miltiorrhiza*⁹⁸⁾ や *Origanum vulgare*⁹⁹⁾, *Mentha haplocalyx*¹⁰⁰⁾ など様々なシソ科植物に見出されている。しかし、*Lavandula* 属に存在することは調べた限りこれまでに報告がない。

2.2.3.4 DLA, RA および CAA の抗うつ様活性

DLA および RA の抗うつ様活性をマウスによる FST で評価した (Fig. 43a)。RA (37.5 mg/kg) の経口投与により FST におけるマウスの無動時間は有意に短縮した。さらに、DLA のマウスへの経口投与は用量依存的な無動時間の短縮傾向を示し、用量が 150 および 300 mg/kg のときに有意な結果が得られた。RA は経口および腹腔内投与により FST におけるマウスの無動時間を短縮することが報告されている^{93), 94)}。一方、DLA による無動時間の短縮については、調べた限りこれまでに報告がない。最近、Kwon ら¹⁰¹⁾ は、DLA がマウスへの経口投与 (1–10 mg/kg) において抗うつ様活性を示さなかったと報告している。本研究においても、用量が 37.5 および 75 mg/kg のときには DLA による有意な無動時間の短縮はなく、Kwon らの結果と一致する。

RA の抗うつ様活性発現に必要な部分構造を明らかにするため、CAA の経口投与による抗うつ様活性を評価した。これまでの研究では、CAA は腹腔内投与により FST におけるマウスの無動時間を短縮することが報告されている⁹⁴⁾。しかし、CAA の経口投与による抗うつ様作用については、調べた限り報告がない。Fig. 43b に示すように、CAA (75 および 150 mg/kg) の経口投与により FST におけるマウスの無動時間が有意に短縮した。DLA と CAA はいずれも FST において抗うつ様活性を示したので、これらはともに RA の抗うつ様活性の発現に必要な構成要素と考えられる。今後の課題としては、例えば尾懸垂試験¹⁰²⁾ など他のうつ病の動物モデルを用いた検証が必要と考えられる。

2.2.3.5 DLA, RA および CAA の経口投与がマウスの自発運動量におよぼす影響

本章第1節で述べたように、FSTで検出された抗うつ様活性には自発運動量の増加による偽陽性の可能性がある。2.2.3.4で観測されたDLA, RA および CAAの抗うつ様活性の真偽を判定するため、これら化合物の自発運動量への影響を測定した。DLA (300 mg/kg) あるいは RA (37.5 mg/kg) をマウスへ経口投与した場合、いずれの場合もコントロールの自発運動量に対して有意な差はなかった (Fig. 44a)。一方、CAA (150 mg/kg) を経口投与した場合、投与後10分から20分間でコントロールの自発運動量に対する有意な増加が観測された (Fig. 44b)。これらの結果から、FSTで観測されたCAAの抗うつ様活性が少なくとも部分的には運動刺激によることが示唆された。Ohnishiらの研究¹⁰³⁾においても、CAAの経口投与による穏やかな中枢神経刺激作用が確認されている。

2.2.3.6 LE中のDLAおよびRA濃度

HPLCによりLE中のDLAとRAを定量した結果、Table 11に示す通りになった。このデータに基づき、FST (Fig. 41)におけるLEの最大投与量 (2500 mg/kg) をRAに換算すると34.3 mg/kgに相当する。これはRAが単独で抗うつ様作用を示した投与量37.5 mg/kg (Fig. 43)に匹敵する。すなわち、LEの投与量2500 mg/kgにおける抗うつ様作用は、RA単独の作用によって説明可能である。しかし、LEの他の投与量 (500 mg/kg および 1000 mg/kg) における抗うつ様作用は、RA単独の作用によって説明することはできない。LEの抗うつ様作用には、RAに加えてDLAおよびFr. 4の未知成分が関与すると考えられる。

2.2.3.7 RAの添加がLE中のDLA濃度に及ぼす影響

最後にLE中でDLAが生成する原因について検討した。DLAはRA生合成の中間体¹⁰⁴⁾としてラベンダーの植物体内に蓄積されている可能性がある。また、ラベンダー乾燥花を熱水抽出する間にRAが加水分解し、DLAが生成する可能性も考えられる。これらのうち後者の可能性を検証するため、ラベンダー乾燥花を抽出する直前に種々の濃度でRAを添加し、LE中のDLA含量がどのように変化するかを観察した (Fig. 45)。グラフから明らかのように、RAの添加は抽出後のDLA濃度に全く影響せず、単にRA濃度が増加する結果となった。この結果は、ラベンダー乾燥花を熱水抽出する間にRAの加水分解は殆ど起こらないことを示

唆している。藤江ら⁹⁹⁾は、オレガノ葉を 2% 食塩水中で 15 分間煮沸する場合、予め RA を添加しても煮沸後の DLA 濃度には影響しないことを示した。本研究では、これと同様の現象がラベンダーを熱水抽出する場合においても観察された。

2.2.4 要約

本節では、ラベンダー熱水抽出物 (LE) の抗うつ様活性成分について検討した。LE を HPLC によって分画し、既知の抗うつ様活性成分である rosmarinic acid (RA) を主成分とする画分 (Fr. 3) とそれ以外の三つの画分 (Fr. 1, 2, 4) を得た。これら分画物の抗うつ様活性を強制水泳試験 (FST) により評価した結果、RA を高濃度に含む Fr. 3 だけでなく、RA を殆ど含まない Fr. 1 および Fr. 4 の経口投与によってもマウスの無動時間が有意に短縮した。さらに、RA を含まない Fr. 1 の主要成分として 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid (DLA) を単離同定した。ラベンダーから DLA が単離されたのは今回が初めてである。DLA および RA の経口投与はどちらも FST におけるマウスの無動時間を有意に短縮した。これらの結果から、DLA と RA が LE の抗うつ様活性に寄与していることが示唆された。

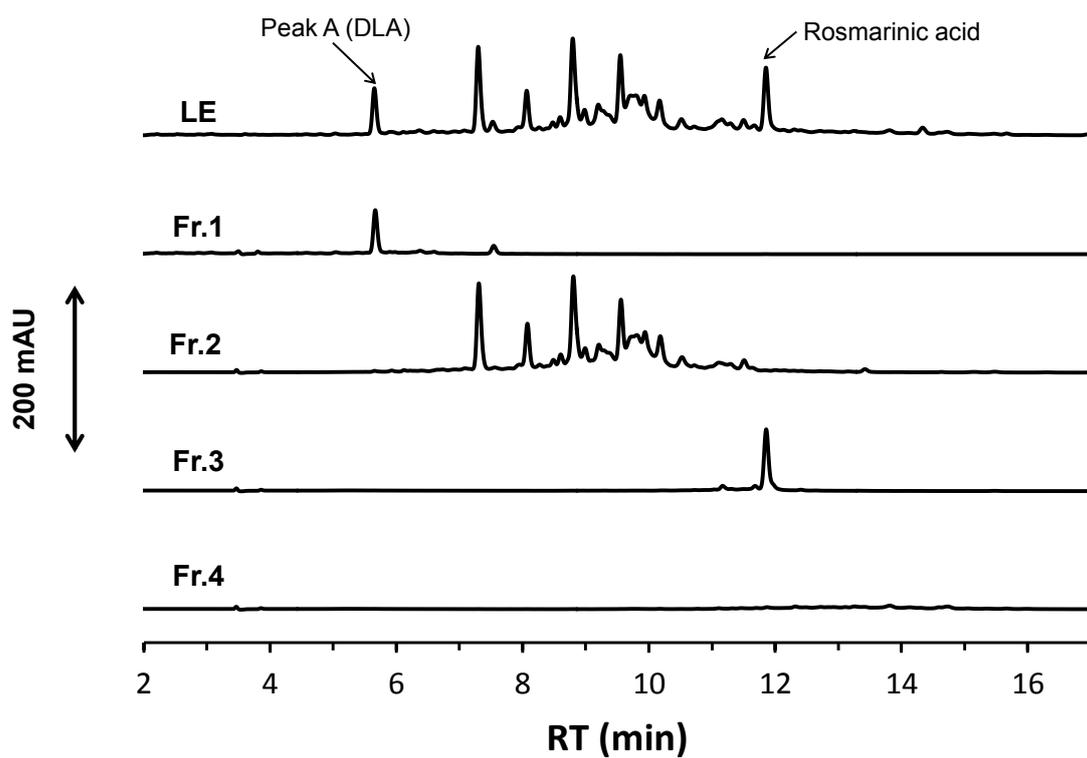


Fig. 40 HPLC chromatograms of the lavender extract (LE) and its fractions obtained by prep-HPLC. A wavelength of 210 nm was used for recording the chromatograms.

Table 10 Total phenolic and rosmarinic acid (RA) contents in the fractions obtained from the lavender extract.

Fr. no.	Yield (mg)	Total phenols ^a (mg)	RA (mg)
1	3479	133	n.d. ^b
2	1446	328	n.d. ^b
3	137	82	66
4	339	71	tr. ^c

^a Values determined by the Folin-Denis method and expressed as (+)-catechin equivalents.

^b Not detected. ^c Trace.

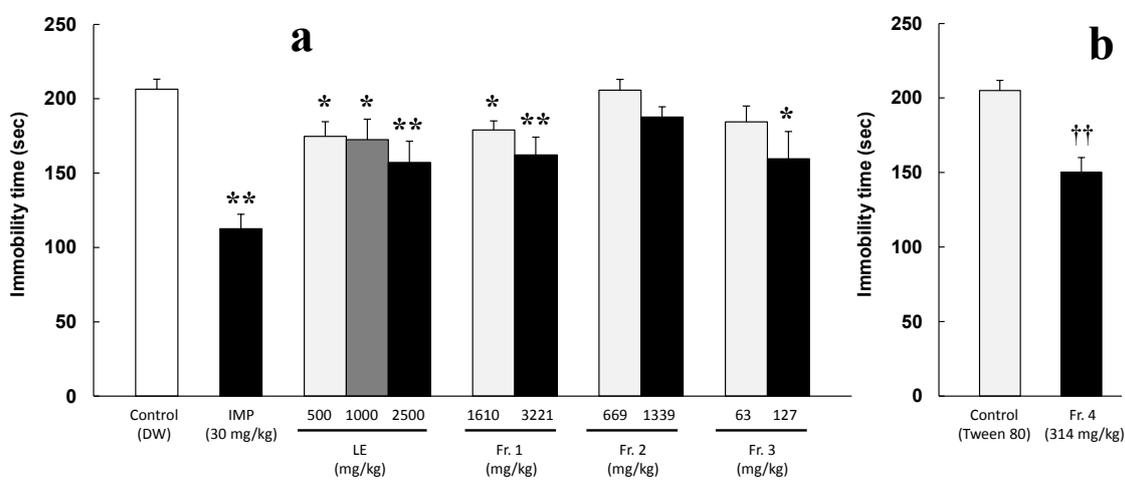
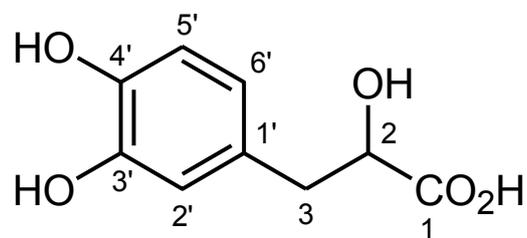
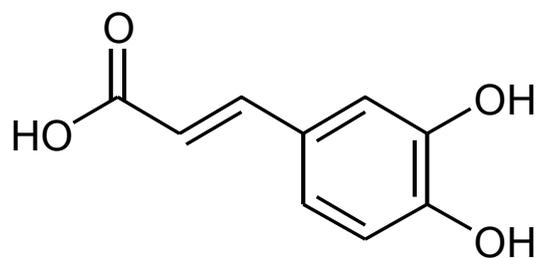


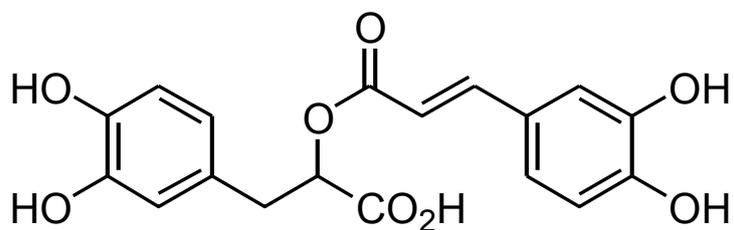
Fig. 41 Effects of the lavender extract (LE) and its fractions on immobility time in mice. (a) Distilled water or (b) 1% Tween 80 was used as the vehicle. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=8). DW, distilled water; IMP, imipramine (positive control); ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. control (DW); †† $P < 0.01$ vs. control (Tween 80).



DLA



CAA



RA

Fig. 42 Chemical structures of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid (DLA), caffeic acid (CAA), and rosmarinic acid (RA).

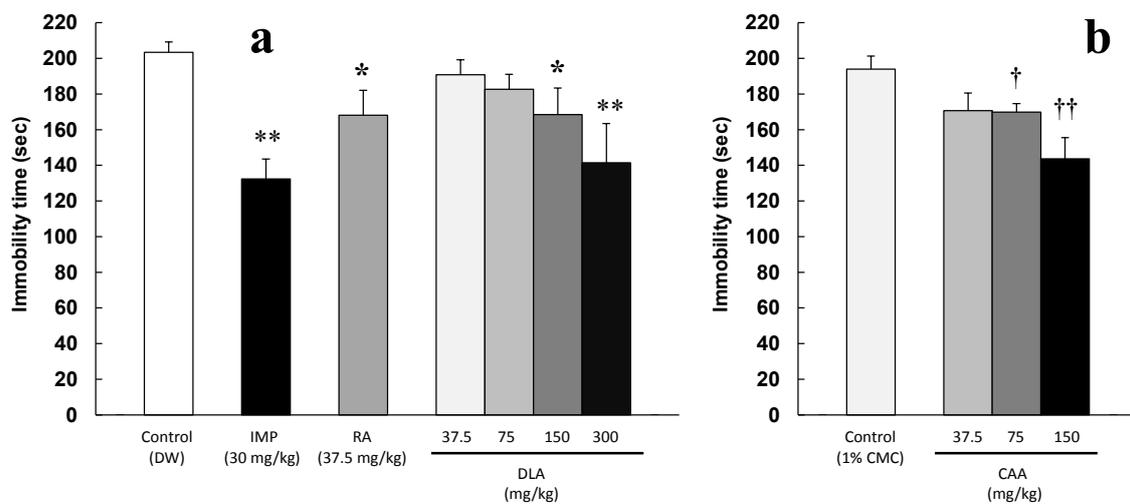


Fig. 43 Effects of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid (DLA), rosmarinic acid (RA), and caffeic acid (CAA) on immobility time in mice. (a) Distilled water or (b) 1% carboxymethyl cellulose was used as the vehicle. The data are expressed as the mean \pm SEM (n=8). DW, distilled water; IMP, imipramine (positive control); CMC, carboxymethyl cellulose; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. control (DW); † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs. control (1% CMC).

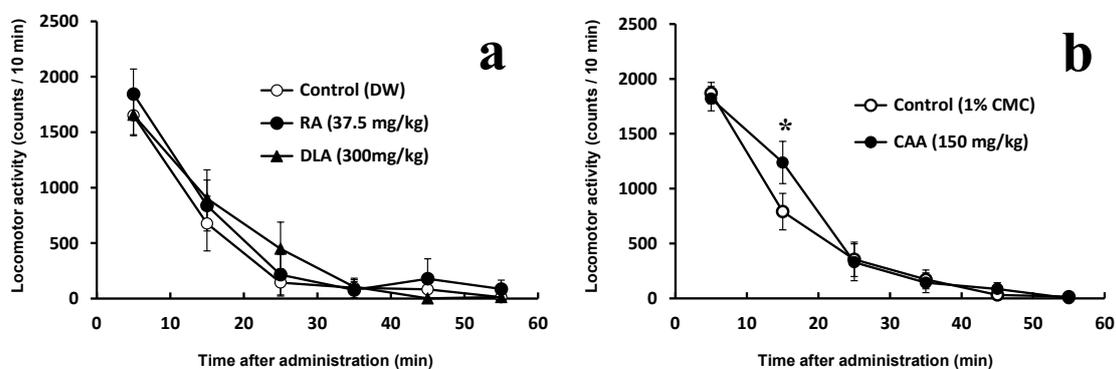


Fig. 44 Effects of (a) DLA, RA, and (b) CAA on the locomotor activity in mice. (a) Distilled water or (b) 1% carboxymethyl cellulose was used as the vehicle. The data are expressed as the mean \pm SEM (n=8). DW, distilled water; CMC, carboxymethyl cellulose; * $P < 0.05$ vs. control (1% CMC).

Table 11 Concentration of DLA, RA, and CAA in the LE.

Compound	Concentration (% by dry weight)
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)lactic acid (DLA)	1.90
Rosmarinic acid (RA)	1.37
Caffeic acid (CAA)	ND ^a

^a Not determined due to peak overlapping.

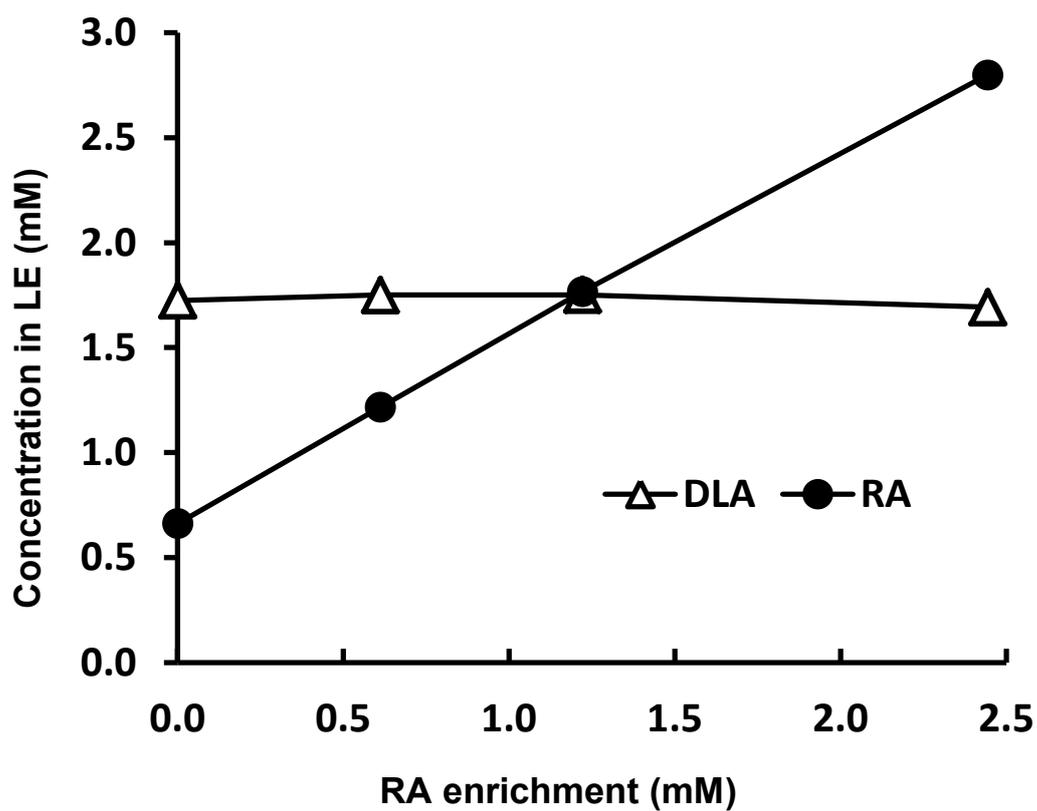


Fig. 45 Effects of RA enrichment on the concentration of DLA and RA in the LE after hot-water extraction at 90°C for 1 h.

第3節 ペパーミント抽出物の胃保護作用

2.3.1 緒言

胃はストレスの影響を最も受けやすい臓器の一つであり，仕事や人間関係からくるストレスで胃がキリキリと痛んだり，精神的に落ち込んだときに食欲不振に陥ったりするなど日常生活において胃とストレスの関連性を認識することは多い．ストレスにより交感神経が興奮すると，胃粘膜下層の細動脈が収縮し，血流が低下する．胃粘膜血流の低下は防御因子である粘液産生能や HCO_3^- 分泌の低下を引き起こし，さらに，虚血-再灌流によって活性酸素が発生し，胃粘膜が障害される¹⁰⁵⁾．このようにストレスが原因で発症する急性の胃粘膜障害は，特にストレス潰瘍⁹²⁾と呼ばれており，重度の熱傷によって起こる Curling 潰瘍¹⁰⁶⁾ や頭部外傷によって起こる Cushing 潰瘍¹⁰⁷⁾ が古くから知られている．一方，胃痛，胸やけ，胃もたれなど胃の不快症状を抱えながら胃粘膜に障害のない場合も多数存在し，機能性胃腸症と呼ばれている¹⁰⁸⁾．ストレスの多い現代社会では胃粘膜障害や胃の不快症状に悩まされる人は多く，これらの予防や症状緩和に役立つ食品の開発は重要な課題と考えられる．

ペパーミント (*Mentha x piperita*) はシソ科ハッカ属に属する多年性草本植物であり，ウォーターミント (*M. aquatica*) とスペアミント (*M. spicata*) の自然交雑によってできたと考えられている¹⁰⁹⁾．ペパーミントの地上部を水蒸気蒸留することによって得られる精油は，爽やかな香りと清涼感を有し，チューイングガム，口腔清涼剤，歯磨き，シャンプーなど幅広い製品に香料として使用されている．また，ペパーミントは生薬として古くから，食べすぎ，飲み過ぎ，食欲不振，胃痛など消化器症状の改善に利用されてきた²³⁾．近年行われた臨床試験においても，ペパーミントの精油あるいはチンキ（含水エタノール抽出物）を配合した混合薬は，機能性胃腸症の改善に有効であることが報告されている^{110), 111)}．しかし，ペパーミントの精油やチンキは *l*-menthol などの香気成分含有量が高く香りが強い．このため，カプセル形態ではなく，飲料や菓子などに配合して機能性食品を開発する場合，嗜好性の問題から配合量が限られる．一方，ペパーミントの熱水抽出物にはフラボノイド配糖体やフェニルプロパノイドなど香気以外にも有用な成分が含まれ，抗アレルギー作用を有することがこれまでに報告されている^{112), 113)}．乾燥させた熱水抽出物であれば，精油やチンキに比べて香りが弱く，食品素材として幅広く利用できる可能性がある．しかし，ストレス潰瘍や胃の不快症

状に対するペパーミント熱水抽出物の効果はこれまでに報告されていない。

そこで本研究では、ストレス潰瘍および胃の不快症状に対するペパーミント熱水抽出物（以下 PE と称す）の効果を動物試験およびヒトを対象としたアンケート調査により検討した。

2.3.2 実験方法

2.3.2.1 ストレス潰瘍試験

i) 実験動物および飼育条件

動物は 5 週齢の雄性 ICR マウスを日本エスエルシー株式会社より購入し、室温 22-25°C、湿度 41-53%、明期 12 時間（7:00-19:00）の環境で飼育した。飼育ケージにはポリカーボネート樹脂ケージ（210 × 315 × 130 mm, 日本クレア株式会社）、床敷には木材チップを使用し、ケージ当たり 8-10 匹のマウスを収容して飼育した。飼料は CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社）を与え、飼育中は飼料と水を自由摂取させた。群分けは、群分け当日の体重に基づいて層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように行った。動物実験は株式会社ケー・エー・シーへ委託し、同社生物科学センター動物委員会の承認を受け、「実験動物の飼育および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号）を遵守した上で行った。

ii) 試料および試薬

ペパーミント (*Mentha x piperita*) 葉部およびカモミール (*Matricaria recutita*) 花部の熱水抽出物は、小川香料株式会社製の食品用エキス（商品名：「ミントポリフェノール 30」および「カモミールエキス OG10」）を凍結乾燥して使用した。レモンバーム (*Melissa officinalis*) 葉部、ラベンダー (*Lavandula angustifolia*) 花部、オレガノ (*Origanum vulgare*) 葉部の熱水抽出物は、市販の植物乾燥体を熱水で抽出し、減圧下濃縮、次いで凍結乾燥することにより調製した。スクラルファートは、アルサミン細粒 90% (1g 中に日局スクラルファート水和物 900 mg 含有、中外製薬株式会社) を使用した。

iii) 水泳ストレス負荷

入荷時 5 週齢の雄性 ICR マウスを使用し、1 週間の馴化飼育の最終日に水泳なし対照群 (n=4) ならびに水泳あり対照群 (n=12) , ペパーミント, カモミール, レモンバーム, ラベンダーおよびオレガノの各熱水抽出物 300 mg/kg 投与群 (各 n=8) , 陽性対照として胃粘膜保護薬であるスクラルファート 300 mg/kg 投与群 (n=8) の 8 群に群分けした。馴化飼育終了後、水泳ストレスを負荷する約 24 時間前からマウスを絶食させた。絶食中、飲料水は自由摂取とし、床敷きや糞を食べないようにケージには絶食用の金属性網を敷いた。水泳ストレス負荷の 1 時間前に胃ゾンデを用いて被験物質溶液 (10 mL/kg 体重) を強制経口投与し、対照群には各投与液の媒体である蒸留水を投与した。また、水泳なし対照群には胃摘出の 2 時間前に蒸留水を投与した。各ハーブ熱水抽出物の投与量については、一般的にハーブ抽出物の抗潰瘍効果を動物試験で検証する際の用量として 100-300 mg/kg の範囲が推奨されていることから¹¹⁴⁾、その範囲の上限である 300 mg/kg に設定した。また、スクラルファートの投与量は文献¹¹⁵⁾に従い 300 mg/kg に設定した。投与から 1 時間後、松元ら⁸⁷⁾が開発した運動量測定流水槽 (有限会社アニテック) を用いてマウスを流水中 (水温 25°C, 流量 5 L/min) , 1 時間強制水泳させることによりストレスを負荷した。

iv) 潰瘍面積の測定

水泳終了後、イソフルラン麻酔下でマウスを脱血、安楽死させ胃を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液で 30 分間以上固定した後、大彎に沿って胃を切り開き、生理食塩液で洗浄した。切り開いた胃をゴム板に張り付け、実体顕微鏡 (倍率 20 倍: 面積測定用レンズ装着) を用いて出血性の病変の面積 (潰瘍面積) を計測した。

v) 統計処理

各群のデータについて平均値と標準誤差 (SEM) を算出し、以下に示す解析を実施した: ①水泳なし対照群と水泳あり対照群の比較 (Mann-Whitney の *U* 検定) ; ②水泳あり対照群とスクラルファート投与群の比較 (Mann-Whitney の *U* 検定) ; ③水泳あり対照群とハーブ抽出物投与群の比較 (Steel 検定)。上記解析項目のうち、項目①, ②は試験の妥当性の検証であり、両方の検定において有意差が検出された場合にのみ、項目③の比較が成立する。このように、複数命題の論理積から結論を導く場合は、検定の繰り返しによる多重性の問題は発生しない^{116), 117)}。したがって、項目①-③の検定において有意水準の調整は行わず、それぞれ $P < 0.05$

の場合を有意と判定した。

2.3.2.2 胃の不快症状に関するアンケート調査

i) 被験者

被験者は、株式会社 TES ホールディングスの有償ボランティア登録者のうち、35 歳以上 65 歳以下の日本人男女を対象とし、過去 3 ヶ月以内に胃痛、胸焼け、胃もたれ、食欲不振のいずれか 1 つ以上の自覚症状を断続的に有し、かつ以下の除外基準に該当しない者を募集した：①現在、何らかの慢性疾患や胃の不快な症状などで薬物治療を受けている者；②過去 3 ヶ月以内に市販の胃薬を週に 4 日以上服用している者；③過去 1 年以内にピロリ菌の除去、胃潰瘍手術、胃がん手術の経験のある者；④食品や医薬品にアレルギー症状を示す恐れのある者；⑤肝炎などの疾患の既往歴・現病歴のある者；⑥高度の貧血のある者；⑦アルコールを過度に摂取している者（純アルコール平均 60 g/日）；⑧夜勤など勤務時間が不規則な者；⑨他のヒト臨床試験に参加している者、またはヒト試験終了後 3 ヶ月が経過していない者；⑩妊娠中または妊娠の可能性のある者、授乳中の者、または調査期間中に妊娠を予定している者。次に、応募者を対象にスクリーニング検査として胃の不快症状に関するアンケート（**Table 12**）を実施し、全質問中、スコア 3 以上の項目が 4 つ以上ある者 220 名（男性：94 名，女性：126 名）を選抜し被験者とした。

被験者には試験の趣旨および内容を十分に説明し、自由意志に基づく同意を文書で得た。また、調査実施に関わる原資料類、同意文書等の取り扱いに関しては、被験者のプライバシー保護を十分に配慮し、データ作成にあたって被験者の特定は被験者番号で行った。調査は株式会社 TES ホールディングスへ委託し、「ヘルシンキ宣言」（2008 年ソウル改訂）および「疫学研究に関する倫理指針」（平成 20 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）の趣旨を尊重して行った。

ii) 試験デザイン

試験デザインはプラセボ対照一重盲検並行群間比較試験を採用し、年齢・性別およびスクリーニング検査時の胃の不快症状に関する質問票（**Table 12**）の合計値が各群で出来るだけ均等になるように割り付けた。

iii) 試験食品および摂取方法

試験食品は盲検性を維持するためカプセル形態とし、カプセルの製造は三生医薬株式会社に委託した。ペパーミント熱水抽出物 (PE) は小川香料株式会社製の食品用エキス粉末 (商品名: 「ミントポリフェノール 50」, PE 50%含有) を使用した。PE 含有カプセルには 1 粒当たり PE 50mg を配合した。PE の安全性については、動物試験 (遺伝毒性, 急性毒性, 反復経口投与毒性) および臨床試験 (成人男女 24 名, PE 300mg を含む飲料を 4 週間摂取) によって問題がないことが確認されている¹¹⁸⁾。プラセボカプセルには PE の代わりにとうもろこし澱粉とデキストリンを配合し、概観, 性状において PE 含有カプセルと区別がつかないように調製した。被験者は PE 含有カプセルを 1 日 6 粒 (PE 300 mg/day) または同数のプラセボカプセルを 2 週間連続して摂取した。

iv) 評価方法

胃の不快症状に関するアンケートは、消化器症状に関する質問票「出雲スケール」¹¹⁹⁾ から、胸やけ, 胃痛, 胃もたれ症状に関する質問を抜粋して使用した (Table 12)。質問は、胸やけ, 胃痛, 胃もたれの各症状に対して、それぞれ 3 問 (計 9 問) で構成され、各質問では直近 1 週間のそれぞれの症状に起因する QOL の低下について、「全く困らなかった (0 点)」から「がまんできないぐらい困った (5 点)」までの 6 段階の中から 1 つを選択する方法で評価した。アンケートはスクリーニング検査時, 試験食摂取前, 2 週間摂取後の計 3 回行った。

v) 統計処理

データは平均値±標準誤差 (SEM) で示した。各質問項目のスコア変化量およびスコアの絶対値について、以下の解析を行った: ①スコア変化量の群間比較 (PE 群とプラセボ群のスコア変化量を Mann-Whitney の *U* 検定により比較) ; ②スコアの絶対値の群間比較 (摂取前後の各時点における PE 群とプラセボ群のスコアを Mann-Whitney の *U* 検定により比較) ; ③スコアの絶対値の群内比較 (各試験食群における摂取前と 2 週間摂取後のスコアを Wilcoxon の符号付順位検定により比較)。ここで、項目①により有意差が検出された場合は、PE の摂取がスコア変化に影響したと判断し、その場合に限り項目②, ③を実施した。いずれも $P < 0.05$ の場合を有意と判定した。また、 $0.05 \leq P < 0.1$ の場合は傾向ありとして示した。統計ソフトは Statcel 3 (有限会社オーエムエス出版) を使用した。

2.3.3 結果

2.3.3.1 ストレス潰瘍に対するハーブ熱水抽出物の効果

マウスの潰瘍面積の測定結果を **Fig. 46** に示す。水泳なし対照群，水泳あり対照群，スクラルファート (SU) 投与群の潰瘍面積 (平均値±SEM) はそれぞれ 0.9 ± 0.3 , 28.8 ± 4.1 , $15.4 \pm 3.2 \text{ mm}^2$ であった。統計解析の結果，水泳あり対照群では水泳なし対照群に比べて潰瘍面積が有意に増加し，SU 投与群では水泳あり対照群に比べて潰瘍面積が有意に減少していることが判明した (水泳なし対照群 vs. 水泳あり対照群, $P < 0.01$; 水泳あり対照群 vs. SU 投与群, $P < 0.05$)。これらの結果から，本試験においてストレス潰瘍モデルが問題なく作製できたと考えられた。ペパーミント (A)，レモンバーム (B)，ラベンダー (C)，オレガノ (D)，カモミール (E) の各熱水抽出物投与群の潰瘍面積 (平均値±SEM) はそれぞれ 9.8 ± 1.3 , 11.4 ± 1.8 , 12.7 ± 3.1 , 14.7 ± 4.6 および $18.9 \pm 4.9 \text{ mm}^2$ であった。統計解析の結果，ペパーミントおよびレモンバーム投与群において，潰瘍面積が水泳あり対照群に比べて有意に減少していることが判明した (水泳あり対照群 vs. ペパーミント投与群, $P < 0.01$; 水泳あり対照群 vs. レモンバーム投与群, $P < 0.05$)。

2.3.3.2 胃の不快症状に対する PE 摂取の効果

試験食を 2 週間摂取後，205 名 (PE 摂取群 105 名，プラセボ摂取群 100 名) からアンケートの回答が得られた。各質問における回答スコアの絶対値ならびにスコア変化量 (平均値±SEM) を **Table 13** に示す。

i) スコア変化量の群間比較 (**Table 13**)

PE 群とプラセボ群のスコア変化量の差を Mann-Whitney の *U* 検定により解析した結果，問 9「胃の膨満感」において有意差が検出された ($P < 0.01$)。

ii) スコアの絶対値の群間比較 (**Fig. 47**)

「胃の膨満感」(問 9) について，各時点 (摂取前，2 週間摂取後) における PE 群とプラセボ群のスコアを Mann-Whitney の *U* 検定により比較した。その結果，摂取前には有意な群間差は見られないが，2 週間摂取後において，PE 群のスコアがプラセボ群に比べて有意に低下していることが判明した ($P < 0.05$)。

iii) スコアの絶対値の群内比較 (Fig. 47)

「胃の膨満感」(問 9) について、各試験食群 (PE, プラセボ) における摂取前と 2 週間摂取後のスコアを Wilcoxon の符号付順位検定により比較した。その結果、プラセボ群では 2 週間摂取後のスコアが摂取前に比べて有意に上昇していることが判明した ($P < 0.05$)。一方、PE 群では、試験食摂取によるスコアの減少傾向が見られた ($P < 0.1$)。

2.3.4 考察

西洋ハーブは心身の諸症状を改善する目的で古来より利用されてきた。しかし、西洋ハーブを機能性食品素材として幅広く利用する場合、香りの嗜好性が問題になることが多い。そこで本章第 1 節および第 2 節では、西洋ハーブの不揮発性画分の有効性に着目し、香りを除去したラベンダーの熱水抽出物の抗うつ、および抗ストレス潰瘍作用について検討した。本節では食用ハーブとして広く普及しているペパーミントについて、乾燥させた熱水抽出物の胃保護作用を検討した。まず、国内で食品として流通している 5 種類の西洋ハーブについて、マウスのストレス潰瘍に対する抑制効果を検討した。その結果、ペパーミントが最も高い抑制効果を示した (Fig. 46)。次に、ヒトがペパーミント熱水抽出物 (PE) 含有カプセルを継続摂取した場合の体感効果をアンケート調査により検証した結果、2 週間摂取後において、胃もたれ症状の 1 つである膨満感のスコアがプラセボカプセルを摂取した場合に比べて有意に低下した (Fig. 47)。これまで、ペパーミントの胃保護作用については、*l*-menthol や *l*-menthone などの香気成分を含むチンキ剤が、ラットのインドメタシン誘発性潰瘍を抑制することが報告されている^{120), 121)}。また、ペパーミントの精油あるいはチンキを配合した混合薬は、胃の不快症状を緩和させることが報告されている^{110), 111)}。しかし、乾燥させたペパーミント熱水抽出物に抗ストレス潰瘍効果があることや胃の不快症状を緩和する効果があることは、調べた限り報告されていない。

本研究に用いた PE は、濃縮、乾燥工程を経て香気成分が除去されているので、PE の抗潰瘍および膨満感の低下作用には、*l*-menthol などの香気成分ではなく、不揮発成分が関与すると考えられる。ペパーミントの不揮発性画分には rosmarinic acid や luteolin-7-*O*-rutinoside などのポリフェノールが存在するが¹¹³⁾、rosmarinic acid と luteolin のアグリコンには抗潰瘍効果があることが既に報告されている^{95), 122)}。また、緑茶のポリフェノールは機能性胃腸症の改善に有効であることが報

告されている¹²³⁾。緑茶ポリフェノールと同じように、ペパーミント由来のポリフェノールが機能性胃腸症の症状の一つである膨満感の低下に関与する可能性も考えられ、今後さらに研究をする必要がある。

2.3.5 要約

本研究では、ストレス潰瘍および胃の不快症状に対するペパーミント熱水抽出物 (peppermint extract, PE) の効果を動物試験および健常者を対象としたアンケート調査により検討した。マウスに強制水泳を負荷させることにより発生させた実験的ストレス潰瘍に対して、予め PE (300 mg/kg) を単回経口投与することにより、マウスの潰瘍面積は対照群と比べて有意に減少した。アンケート調査では、被験者 (胃の不快症状を有する 35 歳以上 65 歳以下の健康な男女) は PE 含有カプセル (PE 300 mg/day) あるいはプラセボカプセルを 2 週間連続摂取し、胃の不快症状 (胃痛, 胸やけ, 胃もたれ症状) に関するアンケートに回答した。摂取期間終了後、PE 摂取群 (n=105) では胃もたれ症状の一つである膨満感のスコアがプラセボ群 (n=100) に比べて有意に低下した。以上の結果から、PE の摂取がストレス潰瘍の予防や膨満感の緩和に有効である可能性が示唆された。

Table 12 胃の不快症状に関するアンケート*

症状区分	番号	質問（過去1週間の状況について）
胸やけ	問1	胃酸の逆流のために困ったことがありましたか？ （胃酸の逆流とは、少量の苦い水が胃からのどにあがってくる感じをさします）
	問2	前胸部に熱く焼けるような感じがして困ったことがありましたか？
	問3	のどの違和感で困ったことがありましたか？ （のどの違和感とは人によって異なりますが、何かが詰まっている感じや、ひりひりした感じ、何かに摘まれている感じをさします）
胃痛	問4	胃が痛くて困ったことがありましたか？ （空腹時の痛みは除く）
	問5	空腹時に胃が痛くて困ったことがありましたか？
	問6	みぞおちの辺り（おへそと胸の間）が焼けるような熱い感じで困ったことがありましたか？
胃もたれ	問7	食事をすると <u>すぐ</u> におなかがいっぱいになって困ったことがありましたか？
	問8	食後に胃の中にいつまでも食べ物がとどまっているような重苦しく、ムカムカした感じがあって困ったことがありましたか？
	問9	胃の膨満感のために困ったことがありましたか？ （胃の膨満感とは、胃にガスがたまっておなかが張っている感じをさします）

判定基準：「全く困らなかった（0点）」，「あまり困らなかった（1点）」，「少し困った（2点）」，「困った（3点）」，「かなり困った（4点）」，「がまんできないくらい困った（5点）」

* 出雲スケール¹¹⁹⁾より、胸やけ、胃痛、胃もたれ症状に関する質問を抜粋。

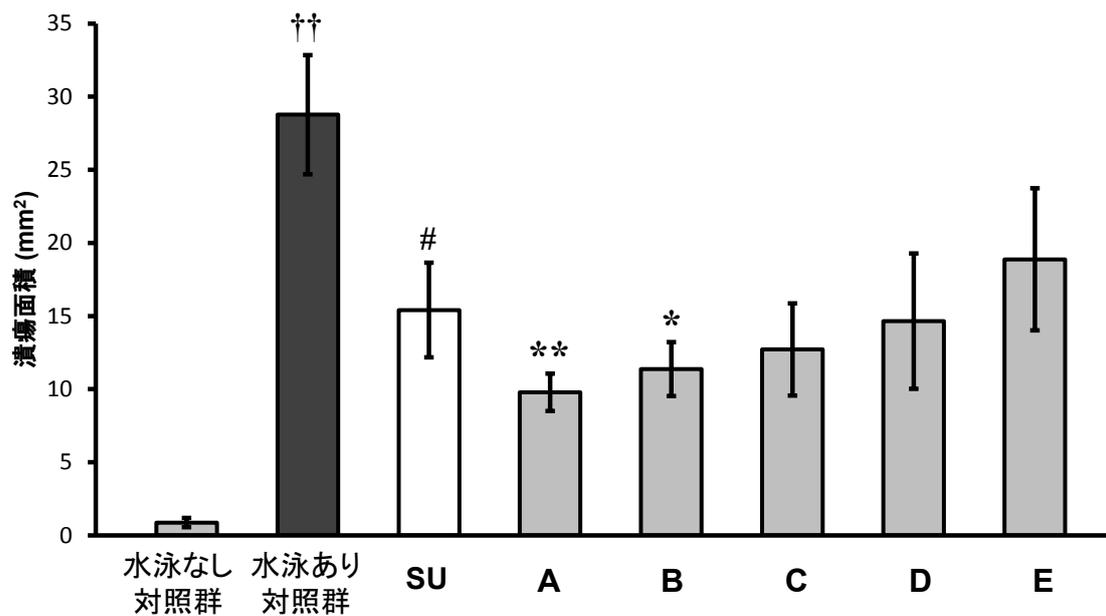


Fig. 46 マウスのストレス潰瘍に対するハーブ熱水抽出物の効果

SU, スクラルフアート (陽性対照) ; A, ペパーミント ; B, レモンバーム ; C, ラベンダー ; D, オレガノ ; E, カモミール. 平均値±SEM (n = 4-12) . †† $P < 0.01$ vs. 水泳なし対照群 (Mann-Whitney の U 検定) ; # $P < 0.05$ vs. 水泳あり対照群 (Mann-Whitney の U 検定) ; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. 水泳あり対照群 (Steel 検定) .

Table 13 胃の不快感アンケートにおけるスコア変化量の群間比較

質問	試験食	平均スコア±SEM		スコア変化量	
		摂取前	2週間摂取後	平均値±SEM	P値
問1	PE	2.16 ± 0.11	1.12 ± 0.09	-1.04 ± 0.10	NS
	プラセボ	2.22 ± 0.12	1.00 ± 0.09	-1.22 ± 0.12	
問2	PE	1.93 ± 0.11	1.00 ± 0.09	-0.93 ± 0.10	NS
	プラセボ	1.89 ± 0.13	0.85 ± 0.09	-1.04 ± 0.12	
問3	PE	1.94 ± 0.11	0.95 ± 0.08	-0.99 ± 0.12	NS
	プラセボ	2.08 ± 0.13	1.16 ± 0.12	-0.92 ± 0.12	
問4	PE	2.64 ± 0.10	1.12 ± 0.10	-1.51 ± 0.11	NS
	プラセボ	2.77 ± 0.11	1.38 ± 0.12	-1.39 ± 0.12	
問5	PE	2.25 ± 0.10	1.08 ± 0.10	-1.17 ± 0.11	NS
	プラセボ	2.57 ± 0.10	1.33 ± 0.12	-1.24 ± 0.14	
問6	PE	1.79 ± 0.11	1.08 ± 0.10	-0.71 ± 0.13	NS
	プラセボ	1.76 ± 0.13	0.91 ± 0.10	-0.85 ± 0.13	
問7	PE	1.82 ± 0.11	2.48 ± 0.11	0.66 ± 0.14	NS
	プラセボ	1.76 ± 0.12	2.36 ± 0.12	0.60 ± 0.15	
問8	PE	2.39 ± 0.10	2.63 ± 0.12	0.24 ± 0.14	NS
	プラセボ	2.46 ± 0.11	2.68 ± 0.13	0.22 ± 0.18	
問9	PE	2.62 ± 0.12	2.26 ± 0.12	-0.36 ± 0.17	**
	プラセボ	2.35 ± 0.13	2.69 ± 0.13	0.34 ± 0.18	

NS : 有意差なし, ** $P < 0.01$ (PE vs. プラセボ, Mann-Whitney の U 検定)

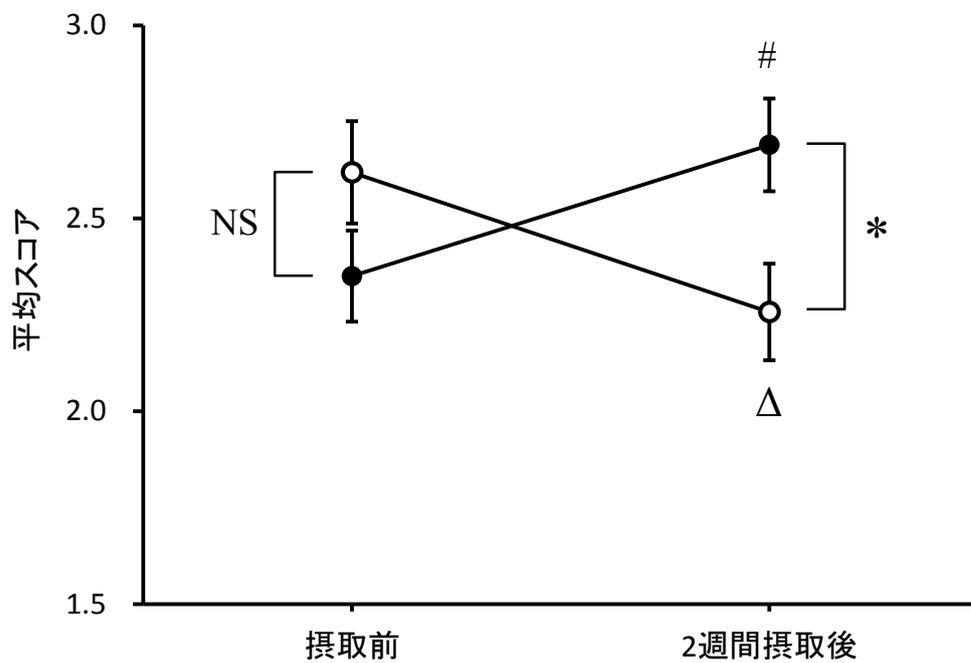


Fig. 47 胃の膨満感 (問 9) におけるスコア (絶対値) の群間および群内比較
 ○ : PE 摂取群, ● : プラセボ群 ; NS : 有意差なし, * $P < 0.05$ (PE 群とプラセボ群の比較, Mann-Whitney の U 検定) ; $\Delta P < 0.1$, # $P < 0.05$ (摂取前との比較, Wilcoxon の符号付順位検定) .

総括

本論文は、植物ポリフェノールの食品への利用について、食品化学的および食品機能学的な見地から検討し、結果をまとめたものである。従来、植物ポリフェノールは、食品の加工および保存時における脂質の酸化を防止する目的で利用されてきた。しかし、香気成分やビタミン類など脂質以外の成分変化に対する植物ポリフェノールの添加効果を研究した例は比較的少ない。一方、ストレス関連症状を緩和する目的でラベンダーやペパーミントなどの西洋ハーブが従来から利用されてきた。しかし、ラベンダーおよびペパーミントに存在するポリフェノール画分の抗ストレス効果については、これまでに十分な研究が行われていない。本研究では、脂質以外の成分変化が風味に影響する例として柑橘系飲料を取り上げ、その風味劣化に対する植物ポリフェノールの添加効果を検討した（第1章）。さらに、うつ病やストレス潰瘍などストレス関連症状に対するラベンダーおよびペパーミント由来ポリフェノールの摂取効果（第2章）について検討した。

第1章第1節から第3節では、遮光および光照射下におけるシトラールの劣化機構解明と植物ポリフェノールによる劣化抑制について検討した。シトラールはレモン香気の特徴成分であるが、柑橘系飲料のような酸性水溶液中では不安定であり、熱や光の影響を受けて容易に変化する。例えば、遮光、加温下でシトラールの酸性水溶液を保存した場合、酸触媒反応や酸化反応を経て *p*-cresol や *p*-methylacetophenone などオフフレーバー（異臭）の原因物質が生成することが報告されている。本章では、これらオフフレーバー原因物質の生成機構を分子レベルで解明するとともに、紅茶由来のポリフェノールであるテアフラビン類がシトラール由来のオフフレーバー抑制に有効であることを始めて明らかにした。興味深いことに、同じ茶由来のポリフェノールでも緑茶由来のカテキン類は、オフフレーバー原因物質のうち *p*-methylacetophenone に対する抑制効果がテアフラビン類より弱く、*p*-cresol に対しては生成を促進した。これらの結果から、テアフラビン類のオフフレーバー抑制メカニズムは、ポリフェノールの酸化防止メカニズムとして一般的に知られているラジカル消去とは異なることが推察された。

一方、光照射下でのシトラールの劣化には二つの異なる経路が存在し、一つはシトラールが紫外線を吸収することによって起こる分子内環化反応（光環化）であり、もう一つはシトラールの光酸化であった。それぞれの反応抑制に有効な植

物ポリフェノールを探索したところ、 α, β -不飽和カルボニル基を有するポリフェノールはシトラールの光酸化と光環化の両方を抑制したが、それ以外のポリフェノールではシトラールの光酸化は抑制されたが光環化はむしろ促進された。これらの結果からシトラールの光劣化抑制にはポリフェノールの抗酸化能力と紫外線吸収能力の両方が重要であることが推察された。

第1章第4節では、ビタミンB₁由来のオフフレーバーに対する茶抽出物の抑制効果について検討した。オレンジやグレープフルーツなど柑橘果汁の殺菌、保存に伴うオフフレーバーの原因として、ビタミンB₁の分解によって生成する2-methyl-3-furanthiol (MFT) が報告されている。本章では、ビタミンB₁酸性水溶液の殺菌、保存によって生成するMFTの抑制に、緑茶抽出物の添加が有効であることを見出した。さらに、個々の緑茶カテキン類の添加効果を検討した結果、(-)-epigallocatechin と(-)-epigallocatechin gallate はMFTの生成に対して抑制効果を示したが、(+)-catechin, (-)-epicatechin および (-)-epicatechin gallate は抑制効果を示さなかった。これらの結果から、MFTの生成抑制にはカテキン分子内B環のピロガロール構造が重要であることが示唆された。

第2章第1節および第2節では、ラベンダー (*Lavandula angustifolia*) に含まれるポリフェノールの有用性に着目し、ストレス性疾患として代表的なうつ病と胃粘膜障害に対するラベンダー抽出物 (lavender extract, 以下LEと略す) の効果を、それぞれの疾患モデルマウスを用いて検討した。抗うつ様活性の評価は、うつ病の動物モデルとして汎用されている強制水泳試験 (FST) により行った。500-2500 mg/kg のLEをマウスへ単回あるいは15日間反復経口投与することにより、自発運動量に影響することなくFSTにおける無動時間が有意に短縮した。また、抗うつ薬であるイミプラミン 30 mg/kg を15日間反復投与した場合も同様の挙動を示した。これらの結果からLEは抗うつ様活性を有することが示唆された。抗ストレス潰瘍試験では、マウスに強制水泳を負荷することにより発生させた実験的ストレス潰瘍に対して、予め500-2000 mg/kgのLEを単回経口投与することにより、マウスの潰瘍面積が対照群と比べて有意に減少した。以上の結果から、LEの摂取がストレスに起因するうつ病や胃潰瘍の予防・軽減に有効である可能性が示唆された。さらに、LEの抗うつ様活性成分をHPLC分画とFSTにより探索した結果、シソの抗うつ様活性成分として既に報告されている rosmarinic acid 以外に、新規抗うつ様活性成分として 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid を見出した。

第2章第3節では、ストレス潰瘍および胃の不快症状に対するペパーミント抽出物 (peppermint extract, 以下PEと略す) の効果を動物試験および健常者を対象

としたアンケート調査により検討した。マウスに強制水泳を負荷させることにより発生させた実験的ストレス潰瘍に対して、予め PE (300 mg/kg) を単回経口投与することにより、マウスの潰瘍面積は対照群と比べて有意に減少した。アンケート調査では、被験者（胃の不快症状を有する 35 歳以上 65 歳以下の健康な男女）は PE 含有カプセル (PE 300 mg/day) あるいはプラセボカプセルを 2 週間連続摂取し、胃の不快症状（胃痛，胸やけ，胃もたれ症状）に関するアンケートに回答した。摂取期間終了後，PE 摂取群 (n=105) では胃もたれ症状の一つである膨満感のスコアがプラセボ群 (n=100) に比べて有意に低下した。以上の結果から，PE の摂取がストレス潰瘍の予防や膨満感の緩和に有効である可能性が示唆された。

以上，柑橘系飲料の風味劣化抑制に有効なポリフェノールを探索するとともに作用機序の解明に取り組み，新たな知見を得た。また，伝統的にストレス関連症状の緩和に利用されてきたラベンダーおよびペパーミント由来のポリフェノールについて，有効性の科学的根拠を得るとともに新規活性成分を見出した。これらの成果は，より嗜好性の高い柑橘系飲料の提供，ならびに抗ストレス食品開発のための基礎的な知見として有用と考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，懇切なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました中部大学 応用生物学部 食品栄養科学科 横越 英彦 教授に心より感謝致します。

本論文執筆にあたり，適切なお助言を賜りました中部大学 応用生物学部 食品栄養科学科 横山 信治 教授，中部大学 応用生物学部 食品栄養科学科 津田 孝範 教授に厚く御礼申し上げます。

また，本研究を遂行するにあたり，有益なお助言を賜りましたニュージャージー州立ラトガース大学 食品科学部 Chi-Tang Ho 特別教授，小川香料株式会社 増田 秀樹 博士，小川香料株式会社 西村 修 博士，早稲田大学 先進理工学研究科 武藤 亜矢 博士に深く感謝致します。

なお，本論文は小川香料株式会社で行った研究をまとめたものであり，終始ご理解を賜りました小川 裕 代表取締役社長，作田 圭亮 取締役，機能研究所 所長 佐久間 克也 博士をはじめ，本研究にご協力を頂きました社員の皆様ならびに機能研究所の皆様にご心から御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) 金沢和樹, 植物性食品の非栄養性機能成分ポリフェノール, オレオサイエンス, **7**, 317-325 (2007).
- 2) Decker, E.A., Chen, B., Panya, A. and Elias, R.J., 10 - Understanding antioxidant mechanisms in preventing oxidation in foods. In “Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications”, ed. Decker, E.A., Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 225-248 (2010).
- 3) 小西豊, フェノール酸の吸収機構とその生理的意義, 化学と生物, **44**, 532-538 (2006).
- 4) 久保田紀久枝, 森光康次郎編, 第12章 酸化と劣化, 「食品学: 食品成分と機能性 第2版 (スタンダード栄養・食物シリーズ 5)」, 東京化学同人, 東京, pp. 119-128 (2008).
- 5) 高村仁知, 食品の脂質劣化および風味変化に関する研究, 日本食品科学工学会誌, **53**, 401-407 (2006).
- 6) 塩田誠, アイスクリームの光酸化防止技術の開発, 日本食品保蔵科学会誌, **32**, 159-168 (2006).
- 7) Jacobsen, C., 6 - Understanding and reducing oxidative flavour deterioration in foods. In “Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications”, ed. Decker, E.A., Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 122-142 (2010).
- 8) Berdahl, D.R., Nahas, R.I. and Barren, J.P., 12 - Synthetic and natural antioxidant additives in food stabilization: current applications and future research. In “Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications”, ed. Decker, E.A., Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 272-320 (2010).
- 9) Clark, B.C., Jr. and Chamblee, T.S., Acid-catalyzed reactions of citrus oils and other terpene-containing flavors. *Dev. Food Sci.*, **28**, 229-85 (1992).
- 10) Kimura, K., Nishimura, H., Iwata, I. and Mizutani, J., Deterioration mechanism of

- lemon flavor. 2. Formation mechanism of off-odor substances arising from citral. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 801-4 (1983).
- 11) Peacock, V.E. and Kuneman, D.W., Inhibition of the formation of α -*p*-dimethylstyrene and *p*-cymen-8-ol in a carbonated citral-containing beverage system. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 330-5 (1985).
 - 12) Schieberle, P., Ehrmeier, H. and Grosch, W., Aroma compounds resulting from the acid-catalyzed breakdown of citral. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, **187**, 35-9 (1988).
 - 13) Schieberle, P. and Grosch, W., Identification of potent flavor compounds formed in an aqueous lemon oil/citric acid emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 797-800 (1988).
 - 14) Bezman, Y., Rouseff, R.L. and Naim, M., 2-Methyl-3-furanthiol and methional are possible off-flavors in stored orange juice: aroma-similarity, NIF/SNIF GC-O, and GC Analyses. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5425-5432 (2001).
 - 15) Dreher, J.G., Rouseff, R.L. and Naim, M., GC-olfactometric characterization of aroma volatiles from the thermal degradation of thiamin in model orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3097-3102 (2003).
 - 16) 熊沢賢二, 和田善行, 増田秀樹, カンキツ果汁の香気成分と加熱による香気変化, 日本食品科学工学会誌, **54**, 266-273 (2007).
 - 17) Reineccius, G., 4 - Flavor deterioration during food storage. In “Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages”, eds. Skibsted, L.H., Risbo, J. and Andersen, M.L., Woodhead Publishing, pp. 95-112 (2010).
 - 18) Selye, H., A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, **138**, 32 (1936).
 - 19) Selye, H., Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can. Med. Assoc. J.*, **115**, 53-6 (1976).
 - 20) 石川俊男, 疾患とストレス総論, 「ストレスの事典」, 河野友信, 石川俊男編, 朝倉書店, 東京, pp. 107-110 (1995).

- 21) 厚生労働省 平成 20 年患者調査 (傷病分類編), 傷病別年次推移表, うつ病, <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/10syoubyo/suihyo18.html#05>
- 22) Lis-Balchin, M., Lavender oil. In “Aromatherapy science: a guide for healthcare professionals”, Pharmaceutical Press, London, pp. 219-226 (2006).
- 23) 林真一郎編, ペパーミント, 「メディカルハーブの事典: 主要 100 種の基本データ」, 東京堂出版, 東京, pp. 146-147 (2007).
- 24) Barocelli, E., Calcina, F., Chiavarini, M., Impicciatore, M., Bruni, R., Bianchi, A. and Ballabeni, V., Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil. *Life Sci.*, **76**, 213-23 (2004).
- 25) In “Fenaroli's handbook of flavor ingredients (2nd Ed.)”, eds. Furia, T.E. and Bellanca, N., CRC Press, Boca Raton, Vol. 2, p 99 (1975).
- 26) Schieberle, P., Chapter 17 - New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. In “Characterization of Food”, ed. Gaonkar, A.G., Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 403-431 (1995).
- 27) Creary, X. and Wang, Y.X., Solvolytic kinetic studies by fluorine-19 NMR. *J. Org. Chem.*, **57**, 4761-4765 (1992).
- 28) Buchanan, M.S., Connolly, J.D. and Rycroft, D.S., Two new monoterpenoid hydroperoxides from the liverwort *Jungermannia obovata*. *J. Indian Chem. Soc.*, **75**, 613-615 (1998).
- 29) Kropf, H. and Wischer, D., *p*-Isopropylbenzyl hydroperoxide. Autoxidation of *p*-cymene. *Tetrahedron Lett.*, 1751-4 (1969).
- 30) Grein, B., Schmidt, G., Full, G., Winterhalter, P. and Schreier, P., 2-formylmethyl-2-methyl-5-(1-hydroxy-1-methylethyl)-tetrahydrofuran: major volatile product of the water-mediated oxidative decomposition of citral. *Flavour and Fragrance Journal*, **9**, 93-98 (1994).
- 31) Hiatt, R., In “Organic Peroxides”, ed. Swern, D., Wiley Interscience, London, Vol. II, pp. 65-70 (1971).

- 32) Sosnovsky, G. and Rawlinson, D.J., In "Organic Peroxides", ed. Swern, D., Wiley-Interscience, New York, Vol. 2, pp. 186-191 (1971).
- 33) Fossey, J., Lefort, D. and J., S., In "Free Radicals in Organic chemistry", J. Wiley & Sons, New York, p Chapter 13 (1995).
- 34) Goosen, A., McClelland, C.W. and Rinaldi, F.C., Cyclization of 3-(*p*-methylphenyl)propan-1-ol via its alkoxyl radical and aryl radical cation intermediates. A comparison of regioselectivities. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 279-81 (1993).
- 35) Citterio, A., Electron-transfer processes by peroxydisulfate: homolytic benzylation of quinones by alkylarenes and reactions of aromatic radical cations with aromatics. *Gazz. Chim. Ital.*, **110**, 253-8 (1980).
- 36) Blanchard, H.S., Mechanism of cumene autoxidation. Mechanism of the interaction of *t*-peroxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4548-52 (1959).
- 37) Bartlett, P.D. and Traylor, T.G., Oxygen-18 tracer studies of alkylperoxy radicals. I. The cumylperoxy radical and chain termination in the autoxidation of cumene. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2407-10 (1963).
- 38) Bartlett, P.D. and Guaraldi, G., Di-*tert*-butyl trioxide and di-*tert*-butyl tertoxide. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4799-801 (1967).
- 39) Mayo, F.R., Free radical autoxidations of hydrocarbons. *Accounts Chem. Res.*, **1**, 193-201 (1968).
- 40) Ingold, K.U., Peroxy radicals. *Accounts Chem. Res.*, **2**, 1-9 (1969).
- 41) Howard, J.A., Reactions of organic peroxy radicals in organic solvents. In "Peroxy Radicals", ed. Alfassi, Z.B., Wiley-Interscience, New York, pp. 283-334 (1997).
- 42) Barton, D.H.R. and Parekh, S.I., A short and efficient method for the preparation of α , *p*-dimethylstyrene from Citral (1). *Synthetic Communications*, **19**, 3353-3361 (1989).
- 43) Andemichael, Y.W. and Wang, K.K., A facile synthesis of

- 5-methylene-1,3-cyclohexadienes (*o*-isotoluenes) and 1,2,4,6-heptatetraenes. *J. Org. Chem.*, **57**, 796-798 (1992).
- 44) 長谷川博, 飲料フレーバー技術の進歩について : フルーツ香料, ソフト・ドリンク技術資料 (213), 213-225 (2002).
- 45) Liang, C.P., Wang, M., Simon, J.E. and Ho, C.T., Antioxidant activity of plant extracts on the inhibition of citral off-odor formation. *Molecular nutrition & food research*, **48**, 308-17 (2004).
- 46) Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T., "Sensory evaluation techniques", 2nd ed, CRC Press, Boca Raton, FL (1991).
- 47) ASTM E679-04 (2004), Standard practice for determination of odor and taste thresholds by a forced-choice ascending concentration series method of limits, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2004.
- 48) Buttery, R.G., Black, D.R., Guadagni, D.G., Ling, L.C., Connolly, G. and Teranishi, R., California bay oil. I. Constituents, odor properties. *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 773-7 (1974).
- 49) Ahmed, E.M., Dennison, R.A., Dougherty, R.H. and Shaw, P.E., Flavor and odor thresholds in water of selected orange juice components. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 187-91 (1978).
- 50) Pino, J., Torricella, R. and Orsi, F., Correlation between sensory and gas-chromatographic measurements on grapefruit juice volatiles. *Nahrung*, **30**, 783-90 (1986).
- 51) Boonbumrung, S., Tamura, H., Mookdasanit, J., Nakamoto, H., Ishihara, M., Yoshizawa, T. and Varanyanond, W., Characteristic aroma components of the volatile oil of yellow keaw mango fruits determined by limited odor unit method. *Food Sci. Technol. Res.*, **7**, 200-206 (2001).
- 52) Buttery, R.G., Turnbaugh, J.G. and Ling, L.C., Contribution of volatiles to rice aroma. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1006-9 (1988).
- 53) Karagül-Yüceer, Y., Vlahovich, K.N., Drake, M. and Cadwallader, K.R.,

- Characteristic aroma components of rennet casein. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6797-801 (2003).
- 54) Buttery, R.G., Guadagni, D.G., Ling, L.C., Seifert, R.M. and Lipton, W., Additional volatile components of cabbage, broccoli, and cauliflower. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 829-32 (1976).
- 55) Masanetz, C. and Grosch, W., Key odorants of parsley leaves (*Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ssp. *crispum*) by odor-activity values. *Flavour Fragrance J.*, **13**, 115-124 (1998).
- 56) Masanetz, C. and Grosch, W., Hay-like off-flavor of dry parsley. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch. A*, **206**, 114-120 (1998).
- 57) Tanaka, T., Betsumiya, Y., Mine, C. and Kouno, I., Theanaphthoquinone, a novel pigment oxidatively derived from theaflavin during tea-fermentation. *Chemical Communications*, 1365-1366 (2000).
- 58) Jhoo, J.W., Lo, C.Y., Li, S., Sang, S., Ang, C.Y., Heinze, T.M. and Ho, C.T., Stability of black tea polyphenol, theaflavin, and identification of theanaphthoquinone as its major radical reaction product. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6146-50 (2005).
- 59) Tateba, H., Iwanami, Y., Kodama, N. and Kishino, K., Changes in lemon flavoring components during UV-irradiation. *Spec. Publ. - R. Soc. Chem.*, **197**, 82-85 (1996).
- 60) Iwanami, Y., Tateba, H., Kodama, N. and Kishino, K., Changes of lemon flavor components in an aqueous solution during UV irradiation. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 463-466 (1997).
- 61) 沢田正徳, 寺西克倫, 山田哲也, 搾油方法の異なるレモン油を用いた飲料の光安定性, *日本食品科学工学会誌*, **46**, 181-186 (1999).
- 62) Nali, M., Rindone, B., Tollari, S. and Valletta, L., Biomimetic epoxidation of biologically significant nonconjugated diolefins. *Gazz. Chim. Ital.*, **117**, 207-12 (1987).

- 63) Pfander, H., Kamber, M. and Battegay-Nussbaumer, Y., 1,2-Epoxy-carotenoids. Part 1. Synthesis of 1,2-epoxylycopene and 1,2,1',2'-diepoxylycopene. *Helv. Chim. Acta*, **63**, 1367-76 (1980).
- 64) Chen, J.H. and Ho, C.-T., Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2374-2378 (1997).
- 65) 内山充, 鈴木康男, 福沢健治, Tocopheronolactone の生理活性について(第1報), *薬学雑誌*, **88**, 678-683 (1968).
- 66) 稲波治, フレーバーの光による変質防止, *月刊フードケミカル*, **13**, 23-27 (1997).
- 67) 松崎妙子, 原征彦, 茶葉カテキン類の抗酸化作用について, *日本農芸化学会誌*, **59**, 129-134 (1985).
- 68) Yasuda, H. and Arakawa, T., Deodorizing mechanism of (-)-epigallocatechin gallate against methyl mercaptan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1232-1236 (1995).
- 69) Buchbauer, G., Jirovetz, L., Jäger, W., Dietrich, H. and Plank, C., Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z. Naturforsch. C*, **46**, 1067-72 (1991).
- 70) Buchbauer, G., Jirovetz, L., Jäger, W., Plank, C. and Dietrich, H., Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. *J. Pharm. Sci.*, **82**, 660-4 (1993).
- 71) Diego, M.A., Jones, N.A., Field, T., Hernandez-Reif, M., Schanberg, S., Kuhn, C., McAdam, V., Galamaga, R. and Galamaga, M., Aromatherapy positively affects mood, EEG patterns of alertness and math computations. *Int. J. Neurosci.*, **96**, 217-24 (1998).
- 72) Kuroda, K., Inoue, N., Ito, Y., Kubota, K., Sugimoto, A., Kakuda, T. and Fushiki, T., Sedative effects of the jasmine tea odor and (*R*)-(-)-linalool, one of its major odor components, on autonomic nerve activity and mood states. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **95**, 107-14 (2005).

- 73) Toda, M. and Morimoto, K., Effect of lavender aroma on salivary endocrinological stress markers. *Arch. Oral Biol.*, **53**, 964-8 (2008).
- 74) Bradley, B.F., Starkey, N.J., Brown, S.L. and Lea, R.W., Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. *J. Ethnopharmacol.*, **111**, 517-25 (2007).
- 75) Umezu, T., Nagano, K., Ito, H., Kosakai, K., Sakaniwa, M. and Morita, M., Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **85**, 713-21 (2006).
- 76) Seol, G.H., Shim, H.S., Kim, P.J., Moon, H.K., Lee, K.H., Shim, I., Suh, S.H. and Min, S.S., Antidepressant-like effect of *Salvia sclarea* is explained by modulation of dopamine activities in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **130**, 187-90 (2010).
- 77) Hardy, M., Kirk-Smith, M.D. and Stretch, D.D., Replacement of drug treatment for insomnia by ambient odour. *Lancet*, **346**, 701 (1995).
- 78) Lewith, G.T., Godfrey, A.D. and Prescott, P., A single-blinded, randomized pilot study evaluating the aroma of *Lavandula angustifolia* as a treatment for mild insomnia. *J. Altern. Complement. Med.*, **11**, 631-7 (2005).
- 79) Goel, N., Kim, H. and Lao, R.P., An olfactory stimulus modifies nighttime sleep in young men and women. *Chronobiol. Int.*, **22**, 889-904 (2005).
- 80) Blumenthal, M., Busse, W.R., Goldberg, A., Gruenwald, J., Hall, T., Riggins, C.W. and Rister, R.S. (eds.) Lavender flower. In "The complete German Commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines", American Botanical Council, Austin, pp. 159-160 (1998).
- 81) Zheng, W. and Wang, S.Y., Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5165-70 (2001).
- 82) Büyükkuroğlu, M.E., Gepdiremen, A., Hacimüftüoğlu, A. and Oktay, M., The effects of aqueous extract of *Lavandula angustifolia* flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. *J. Ethnopharmacol.*, **84**, 91-4 (2003).

- 83) Kashani, M.S., Tavirani, M.R., Talaei, S.A. and Salami, M., Aqueous extract of lavender (*Lavandula angustifolia*) improves the spatial performance of a rat model of Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.*, **27**, 99-106 (2011).
- 84) Harborne, J.B. and Williams, C.A., Phytochemistry of the genus *Lavandula*. In "Lavender: the genus *Lavandula*", ed. Lis-Balchin, M., Taylor & Francis, London, pp. 86–99 (2002).
- 85) Porsolt, R.D., Bertin, A. and Jalfre, M., Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **229**, 327-36 (1977).
- 86) Hernandez, D.E. and Xue, B.G., Imipramine prevents stress gastric glandular lesions in rats. *Neurosci. Lett.*, **103**, 209-12 (1989).
- 87) Matsumoto, K., Ishihara, K., Tanaka, K., Inoue, K. and Fushiki, T., An adjustable-current swimming pool for the evaluation of endurance capacity of mice. *J. Appl. Physiol.*, **81**, 1843-9 (1996).
- 88) Porsolt, R.D., Le Pichon, M. and Jalfre, M., Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, **266**, 730-2 (1977).
- 89) Borsini, F. and Meli, A., Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl.)*, **94**, 147-60 (1988).
- 90) Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N. and Jalfre, M., Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.*, **47**, 379-91 (1978).
- 91) Akhondzadeh, S., Kashani, L., Fotouhi, A., Jarvandi, S., Mobaseri, M., Moin, M., Khani, M., Jamshidi, A.H., Baghalian, K. and Taghizadeh, M., Comparison of *Lavandula angustifolia* Mill. tincture and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized trial. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **27**, 123-7 (2003).
- 92) 並木正義, ストレス潰瘍, 日本消化器内視鏡学会雑誌, **32**, 1218-1219 (1990).

- 93) Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T. and Kubo, M., Identification of rosmarinic acid as a novel antidepressive substance in the leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (Perillae Herba). *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, **22**, 15-22 (2002).
- 94) Takeda, H., Tsuji, M., Inazu, M., Egashira, T. and Matsumiya, T., Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **449**, 261-7 (2002).
- 95) 宮崎寿次, 伊藤久富, 小坂邦男, 消化器潰瘍を抑制するための食品および医薬組成物, 特開 2000-72685 (2000.3.7).
- 96) Yahara, S., Satoshiro, M., Nishioka, I., Nagasawa, T. and Oura, H., Isolation and characterization of phenolic compounds from coptidis rhizome. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 527-31 (1985).
- 97) Folin, O. and Denis, W., A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.*, **22**, 305-308 (1915).
- 98) Zhao, G.R., Zhang, H.M., Ye, T.X., Xiang, Z.J., Yuan, Y.J., Guo, Z.X. and Zhao, L.B., Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 73-81 (2008).
- 99) 藤江歩巳, 吉田久美, 大羽和子, オレガノ葉のポリフェノール化合物, 日本食品科学工学会誌, **50**, 404-410 (2003).
- 100) She, G.M., Xu, C., Liu, B. and Shi, R.B., Polyphenolic acids from mint (the aerial of *Mentha haplocalyx* Briq.) with DPPH radical scavenging activity. *J. Food Sci.*, **75**, C359-C362 (2010).
- 101) Kwon, G., Kim, H.J., Park, S.J., Lee, H.E., Woo, H., Ahn, Y.J., Gao, Q., Cheong, J.H., Jang, D.S. and Ryu, J.H., Anxiolytic-like effect of danshensu [(3-(3,4-dihydroxyphenyl)-lactic acid)] in mice. *Life Sci.*, **101**, 73-8 (2014).
- 102) Cryan, J.F., Mombereau, C. and Vassout, A., The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **29**, 571-625 (2005).

- 103) Ohnishi, R., Ito, H., Iguchi, A., Shinomiya, K., Kamei, C., Hatano, T. and Yoshida, T., Effects of chlorogenic acid and Its metabolites on spontaneous locomotor activity in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2560-2563 (2006).
- 104) Di, P., Zhang, L., Chen, J., Tan, H., Xiao, Y., Dong, X., Zhou, X. and Chen, W., ¹³C tracer reveals phenolic acids biosynthesis in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *ACS Chem. Biol.*, **8**, 1537-48 (2013).
- 105) 小林広幸, ストレスと胃潰瘍・急性胃粘膜病変, 「からだの中からストレスをみる」, 日本比較内分泌学会編, 学会出版センター, 東京, pp. 123-136 (2000).
- 106) Czaja, A.J., McAlhany, J.C. and Pruitt, B.A., Jr., Acute gastroduodenal disease after thermal injury. An endoscopic evaluation of incidence and natural history. *N. Engl. J. Med.*, **291**, 925-9 (1974).
- 107) Alain, B.B. and Wang, Y.J., Cushing's ulcer in traumatic brain injury. *Chin. J. Traumatol.*, **11**, 114-9 (2008).
- 108) 味村俊樹, 福島亮治, 安達実樹, 沖永功太, ストレスと胃腸障害, 臨床栄養, **107**, 720 - 724 (2005).
- 109) Arthur, O.T. and Robert, F.C.N., *Mentha*: an overview of its classification and relationships. In "Mint: the genus *Mentha*", ed. Lawrence, B.M., CRC Press, Boca Raton, pp. 1-39 (2006).
- 110) May, B., Köhler, S. and Schneider, B., Efficacy and tolerability of a fixed combination of peppermint oil and caraway oil in patients suffering from functional dyspepsia. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **14**, 1671-1677 (2000).
- 111) von Arnim, U., Peitz, U., Vinson, B., Gundermann, K.J. and Malfertheiner, P., STW 5, a phytopharmakon for patients with functional dyspepsia: results of a multicenter, placebo-controlled double-blind study. *Am. J. Gastroenterol.*, **102**, 1268-75 (2007).
- 112) Inoue, T., Sugimoto, Y., Masuda, H. and Kamei, C., Effects of peppermint (*Mentha piperita* L.) extracts on experimental allergic rhinitis in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 92-95 (2001).

- 113) 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).
- 114) Schmeda-Hirschmann, G. and Yesilada, E., Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *J. Ethnopharmacol.*, **100**, 61-66 (2005).
- 115) Danesh, J.Z., Duncan, A., Russell, R.I. and Mitchell, G., Effect of intragastric pH on mucosal protective action of sucralfate. *Gut*, **29**, 1379-85 (1988).
- 116) 永田靖, 吉田道弘, 第3章 多重比較法の考え方—基本的な概念と用語, 「統計的多重比較法の基礎」, サイエンティスト社, 東京, pp. 19-32 (1997).
- 117) 小宮山靖, 平田篤由, 半田淳, 薬効薬理試験の信頼性向上に役立つ統計学的考え方, 日本薬理学雑誌, **116**, 12-17 (2000).
- 118) 亀井千晃, 井上俊夫, 増田秀樹, ペパーミント抽出物によるアレルギー性鼻炎の緩和, バイオインダストリー, **22**, 20-28 (2005).
- 119) 古田賢司, 石原俊治, 佐藤秀一, 三宅達也, 石村典久, 越野健司, 飛田博史, 森山一郎, 天野祐二, 足立経一, 太田明, 木下芳一, 消化器症状を有する患者の QOL 評価のための問診票「出雲スケール」の作成とその検証, 日本消化器病学会雑誌, **106**, 1478-1487 (2009).
- 120) Khayyal, M.T., EL-Ghazaly, M.A., Kenawy, S.A., Seif-EL-Nasr, M., Mahran, L.G., Kafafi, Y.A. and Okpanyi, S.N., Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. *Arzneimittelforschung*, **51**, 545-53 (2001).
- 121) Khayyal, M.T., Seif-El-Nasr, M., El-Ghazaly, M.A., Okpanyi, S.N., Kelber, O. and Weiser, D., Mechanisms involved in the gastro-protective effect of STW 5 (Iberogast) and its components against ulcers and rebound acidity. *Phytomedicine*, **13**, SV 56-66 (2006).
- 122) Mota, K.S., Dias, G.E., Pinto, M.E., Luiz-Ferreira, A., Souza-Brito, A.R., Hiruma-Lima, C.A., Barbosa-Filho, J.M. and Batista, L.M., Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **14**, 979-1012 (2009).

- 123) 中澤三郎, 小林隆, 菅野健太郎, 関根忠, 高橋信一, 徳永健吾, 多田知子, 丹藤雄介, 辻川知之, 中村光男, 長谷川範幸, 原澤茂, 馬場忠雄, 藤山佳秀, 前谷容, 松井輝明, 森山光彦, 芳野純治, 鈴木裕子, 伊東史弘, 野澤歩, 提坂裕子, 角田隆巳, 茶カテキンの functional dyspepsia に対する有用性の検討. *Prog. Med.*, **30**, 211 -218 (2010).

研究業績

①査読付学術論文

[Journal articles]

1. **Ueno, T.**, Masuda, H. and Ho, C.-T., Formation mechanism of *p*-methylacetophenone from citral via a *tert*-alkoxy radical intermediate. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5677-5684 (2004).
2. **Ueno, T.**, Kiyohara, S., Ho, C.-T. and Masuda, H., Potent inhibitory effects of black tea theaflavins on off-odor formation from citral. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3055-3061 (2006).
3. **植野壽夫**, 増田秀樹, 武藤亜矢, 横越英彦, ラベンダー熱水抽出物のマウスにおける抗うつ, 抗ストレス潰瘍作用, 日本食品科学工学会誌, **59**, 435-441 (2012).
4. **植野壽夫**, 西村修, 戸川真, 佐久間克也, ペパーミント熱水抽出物の胃保護作用, 日本食品科学工学会誌, **61**, 308-313 (2014).
5. **Ueno, T.**, Matsui, Y., Masuda, H., Nishimura, O., Togawa, M., Sakuma, K. and Yokogoshi, H., Antidepressant-like effects of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid isolated from lavender (*Lavandula angustifolia*) flowers in mice. *Food Sci. Technol. Res.*, **20**, 1213-1219 (2014).
6. Kageyama, A., **Ueno, T.**, Oshio, M., Masuda, H., Horiuchi, H. and Yokogoshi, H., Antidepressant-like effects of an aqueous extract of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) in rats. *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 473-479 (2012).

[Conference proceedings]

7. Masuda, H., **Ueno, T.**, Muranishi, S., Irisawa, S. and Ho, C.-T., Inhibition of citral deterioration. In "Free Radicals in Food", eds. Morello, M.J., Shahidi, F. and Ho, C.-T. (American Chemical Society, Washington, D.C.), pp. 176-187 (2002).
8. **Ueno, T.**, Masuda, H. and Ho, C.-T., Combined inhibitory effects of catechins with Fe³⁺ on the formation of potent off-odorants from citral. In "Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products", eds. Shahidi, F. and Ho, C.-T. (American Chemical Society, Washington, D.C.), pp. 129-142 (2005).
9. **Ueno, T.**, Kumazawa, K., Kiyohara, S. and Masuda, H., Off-flavour formation in citrus juices and its inhibition by green tea extract. In "State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology", eds. Hofmann, T., Rothe, M. and Schieberle, P. (Deutsche Forschungsanstalt fuer Lebensmittelchemie, Garching, Germany), pp. 446-450 (2004).

10. **Ueno, T.**, Masuda, H., Muranishi, S., Kiyohara, S., Sekiguchi, Y. and Ho, C.-T., Inhibition of the formation of off-odour compounds from citral in an acidic aqueous solution. In “Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century”, eds. Le Quéré, J.-L. and Etiévant, P. (Editions Tec & Doc, Intercept, Paris, France), pp. 128-131 (2003).

②参考論文 (査読付)

[Journal articles]

1. Toru, T., Yamada, Y., **Ueno, T.**, Maekawa, E. and Ueno, Y., A new route to the prostaglandin skeleton via radical alkylation. Synthesis of 6-oxoprostaglandin E1. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4815-17 (1988).

[Conference proceedings]

2. Muranishi, S., Masuda, H., Kiyohara, S., **Ueno, T.** and Ho, C.-T., Effect of antioxidants on photosensitized degradation of methionine by riboflavin. In “Food Factors in Health Promotion and Disease Prevention”, eds. Shahidi, F., Ho, C.-T., Watanabe, S. and Osawa, T. (American Chemical Society, Washington, D.C.), pp. 400-409 (2003).
3. **Ueno, T.**, Suzuki, Y., Ho, C.-T. and Masuda, H., Formation of off-odorants during light exposure of milk and its inhibition by antioxidants. In “Antioxidant Measurement and Applications”, eds. Shahidi, F. and Ho, C.-T. (American Chemical Society, Washington, D.C.), pp. 390-400 (2007).

③査読無学術論文

1. **植野壽夫**, 酸性飲料中でのシトラールの劣化とその抑制方法, 香料 (233), 107-115 (2007).
2. **植野壽夫**, ラベンダー, 「抗ストレス食品の開発と展望 II」, 横越英彦 監修 (シーエムシー出版, 東京), pp. 163-167 (2012).
3. **植野壽夫**, ジャーマンカモミール, 「抗ストレス食品の開発と展望 II」, 横越英彦 監修, (シーエムシー出版, 東京), pp. 179-183 (2012).

④その他 (学会発表等)

[国際会議発表]

1. **Ueno, T.**, Masuda, H., Muranishi, S., Irisawa, S., Nishimura, O., Adachi, K. and Ho, C.-T., Inhibition of deterioration of citral by antioxidant, 219th ACS National Meeting, San Francisco, CA, United States, Mar. 26-30, 2000.

2. **Ueno, T.**, Masuda, H., Muranishi, S., Kiyohara, S. and Ho, C.-T., Effect of antioxidants on citral degradation in acidic solution, 2000環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM 2000), Honolulu, Hawaii, United States, Dec. 14-19, 2000.
3. Muranishi, S., Masuda, H., Kiyohara, S., Kaneko, S., **Ueno, T.** and Ho, C.-T., Effects of antioxidants on photosensitized degradation of methionine by riboflavin, 221st ACS National Meeting, San Diego, CA, United States, Apr. 1-5, 2001.
4. **Ueno, T.**, Masuda, H., Muranishi, S., Kiyohara, S., Sekiguchi, Y. and Ho, C.-T., Inhibition of the formation of off-odour compounds from citral in an acidic aqueous solution, 10th Weurman flavour research symposium, Beaune, France, Jun. 25-28, 2002.
5. **Ueno, T.**, Masuda, H., Muranishi, S., Kiyohara, S. and Sekiguchi, Y., Formation of off-odor compounds from citral under acidic conditions, 第46回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 国際精油シンポジウム (ISEO) 合同大会, 徳島, 2002年10月18-21日.
6. **Ueno, T.**, Masuda, H. and Ho, C.-T., Effects of phenolic compounds on the formation of off-odorants from citral under acidic conditions, 226th ACS National Meeting, New York, NY, United States, Sept. 7-11, 2003.
7. **Ueno, T.**, Kumazawa, K., Kiyohara, S. and Masuda, H., Off-flavour formation in citrus juices and its inhibition by green tea extract, 7th Wartburg Symposium on Flavour Chemistry and Biology, Eisenach, Germany, Apr. 21-23, 2004.
8. Suzuki, Y., **Ueno, T.**, Masuda, H. and Ho, C.-T., Effects of antioxidants on the formation of off-odorants during light-irradiation of dairy products, 228th ACS National Meeting, Philadelphia, PA, United States, Aug. 22-26, 2004.
9. **Ueno, T.**, Kiyohara, S., Ho, C.-T. and Masuda, H., Potent inhibitors of off-odorant formation from citral under acidic aqueous conditions, 230th ACS National Meeting, Washington, DC, United States, Aug. 28-Sept. 1, 2005.
10. Suzuki, Y., **Ueno, T.**, Masuda, H. and Ho, C.-T., Antioxidant effect of tryptophan and related compounds on riboflavin-sensitized formation of potent off-flavor from methionine, 230th ACS National Meeting, Washington, DC, United States, Aug. 28-Sept. 1, 2005.

[国内学会発表]

11. **植野寿夫**, 田中雅人, 丸山進平, 林詢, 加熱発香性香料材料の検索, 第34回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 香川, 1990年10月23-25日.
12. 村西修一, **植野寿夫**, 清原進, 増田秀樹, シトラール酸性水溶液の光劣化について, 第44回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 北海道, 2000年9月15-17日.
13. 清原進, 村西修一, **植野寿夫**, 増田秀樹, シトラールの光劣化に関する研究 (2), 第45回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 富山, 2001年10月

13-15日.

14. 村西修一, **植野壽夫**, 清原進, 増田秀樹, 加熱によるシトラールの変化, 第45回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 富山, 2001年10月13-15日.
15. **植野壽夫**, 増田秀樹, シトラール由来のオフフレーバー生成抑制とそのメカニズム, 第47回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 東京, 2003年11月8-10日.
16. **植野壽夫**, 清原進, 増田秀樹, シトラール由来のオフフレーバー抑制, 第49回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 福井, 2005年11月5-7日.
17. 小林啓子, **植野壽夫**, 清原進, 西村修, 濱口隆, 酸性飲料中でのレモンフレーバーの安定性に関する研究, 第50回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 横浜, 2006年11月10-12日.
18. 陰山亜矢, 小塩睦美, 堀内広子, **植野壽夫**, 増田秀樹, ラベンダー投与における抗うつ様活性評価とアミノ酸の変化, 第65回日本栄養・食糧学会大会, 東京, 2011年5月13-15日.
19. **植野壽夫**, 増田秀樹, 陰山亜矢, 横越英彦, ストレス性疾患モデルマウスにおけるラベンダー抽出物の抗ストレス作用, 日本食品科学工学会 第58回大会, 仙台, 2011年9月9-11日.
20. **植野壽夫**, 松井謡子, 増田秀樹, 西村修, 横越英彦, ラベンダー抽出物の分画とマウスにおける抗ストレス作用, 日本食品科学工学会 第59回大会, 札幌, 2012年8月29-31日.
21. **植野壽夫**, 戸川真, 佐久間克也, 作田圭亮, ソフトイオン化質量分析計によるハーブ抽出物の消臭効果測定, 第58回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 和歌山, 2014年9月20-22日.
22. **植野壽夫**, 小松千紘, 戸川真, 佐久間克也, 作田圭亮, ソフトイオン化質量分析計による消臭効果のリアルタイム測定, 日本薬学会 第135年会, 神戸, 2015年3月25-28日.
23. 小松千紘, **植野壽夫**, 戸川真, 佐久間克也, 作田圭亮, 唾液存在下におけるペパーミントポリフェノールの消臭効果, 日本食品科学工学会 第62回大会, 京都, 2015年8月27-29日.

[特許]

24. 真鍋博哉, **植野壽夫**, 村西修一, 増田秀樹, 亀田弥, ω -ハロゲノー1-アルケンの製造法, 特開平7-206731 (特許3290281).
25. **植野壽夫**, 井上俊夫, 増田秀樹, 抗酸化剤, 特開2000-336355.
26. **植野壽夫**, 村西修一, 清原進, 増田秀樹, シトラールの劣化臭生成抑制剤およ

- び劣化臭生成抑制方法, 特開2002-180081 (特許5314822).
27. 村西修一, 植野壽夫, 清原進, 増田秀樹, 光によるシトラールの減少抑制剤及び減少抑制方法, 特開2002-255778 (特許4933700).
 28. 植野壽夫, 村西修一, 清原進, 増田秀樹, シトラール又はシトラール含有製品の劣化臭生成抑制剤, 特開2002-338990 (特許5021869).
 29. 植野壽夫, 村西修一, 清原進, 増田秀樹, 食品の香味劣化抑制剤並びに抑制方法, 特開2003-79335 (特許4632598).
 30. 植野壽夫, 村西修一, 清原進, 増田秀樹, 香気劣化抑制剤及び香気劣化抑制方法, 特開2003-82384.
 31. 植野壽夫, 村西修一, 清原進, 増田秀樹, シトラール又はシトラール含有製品の劣化臭生成抑制方法, 特開2004-123788 (特許4291988).
 32. 清原進, 植野壽夫, 足立謙次, 鈴木佑人, 増田秀樹, 香味又は香気劣化抑制剤, 特開2005-171116.
 33. 植野壽夫, 清原進, 熊沢賢二, 増田秀樹, ビタミンB 1 またはその誘導体含有酸性飲用組成物の異臭成分の発生を防止する方法, 特開2005-304323 (特許4418702).
 34. 清原進, 植野壽夫, 足立謙次, 熊沢賢二, 増田秀樹, グレープフルーツ果汁含有飲食品の保存中に生じる異臭の発生を防止する方法, 特開2005-304324.
 35. 本間祥郎, 清原進, 増田秀樹, 植野壽夫, 足立謙次, 香味劣化抑制剤, 特開2006-340639.
 36. 植野壽夫, 廣岡沙織, 増田秀樹, 抗ストレス剤, 特開2012-31073.
 37. 植野壽夫, 増田秀樹, 横越英彦, 抗うつ剤, 特開2012-102059.