

称号及び氏名 博士（応用生命科学） 村田 雄司

学位授与の日付 平成18年9月30日

論文名 「羅漢果の甘味特性および機能性に関する研究」

論文審査委員 主査 中野 長久
副査 林 英雄
副査 乾 博

論文要旨

中国桂林周辺の特産品の一つである羅漢果(*Siraitia grosvenori* Swingle)は、古くから「神果」として珍重されてきたウリ科の薬用植物であり、古代中国において、咳止めや喉荒れ緩和などに対する民間薬として広く供されてきた。羅漢果の特長は、その甘味成分(mogroside 類)にあり、ショ糖の数百倍もの甘味強度を有し、その化学構造はトリテルペン配糖体であることが明らかにされている。しかし、羅漢果に含まれる甘味成分の甘味質特性、高純度羅漢果配糖体の製造技術および羅漢果の機能性(生理作用)に関する報告例はない。

申請者は、このような背景のもとで、羅漢果を植物由来の新規な高甘味度甘味料としての実用化を目的として、羅漢果の甘味特性や機能性に関する詳細な研究を行った。本論文は、羅漢果に含まれる甘味成分(mogroside 類)を単離・精製し、甘味質の基本性能について数量的な解析を行い、ショ糖や他の高甘味度甘味料と比較検討した。また、高純度羅漢果配糖体を工業レベルで生産することを目的として、その精製方法に関する検討を行った。さらに、量産した羅漢果甘味配糖体濃縮物とエリスリトールを処方した新規な植物系低カロリー甘味料(実質的に0カロリー)の製造法を確立した。

一方で、羅漢果は、鎮咳、去痰薬として喘息の諸症状に対する民間薬として用いられてきたことから、羅漢果抽出物にはアレルギー症状に有効ではないかと考え、花粉症およびアトピー性皮膚炎の動物モデルに対する効果について検討を加えた。さらに、羅漢果粗抽出物にマルターゼ阻害活性を見だし、食後の血糖値の急激な上昇を抑制することで、糖尿病患者に対して病態の進行抑制に機能を発揮する可能性を示した。最後に、

これらの羅漢果の生理機能の解明の基礎的な知見のひとつとして、羅漢果に含まれる甘味主成分である mogroside V をラットに経口摂取させ、ラット消化管での動態について検討した成果について述べる。

羅漢果の主要甘味成分である各種トリテルペン配糖体の甘味強度を Pauli の全系列法を用いて、ショ糖に対する甘味倍率を求めた。Siamenoside I (テトラグルコース体) の甘味強度がショ糖の 465 倍で最も強く、以下 mogroside V (ペンタグルコース体) (378 倍)、mogroside IV (テトラグルコース体) (300 倍)、11-oxo-mogroside V (ペンタグルコース体) (68 倍) の順であった。また、mogroside V の酵素分解物である mogroside III (トリグルコース体) は甘味を呈したが (ショ糖の 195 倍)、mogroside II a (ジグルコース体の 1 つ) と mogroside

I a (モノグルコース体の 1 つ) は甘味を示さなかった。

さらに、これらの配糖体の甘味質について数量的な解析を行うために、甘味質を構成する 8 要素 (①苦み②後引き③しつこさ④くせ⑤渋味⑥刺激⑦すっきり感⑧まろやかさ) について評価した結果、羅漢果トリテルペン配糖体 (mogroside V, 11-oxo-mogroside V, mogroside IV, siamenoside I, mogroside III) は、味覚の 8 要素のいずれについても、ショ糖の甘味質に近く、ステビア抽出物や甘草抽出物の植物系甘味料よりも、総合的に良質な甘味特性を有することがわかった。

羅漢果配糖体の高純度品の実用生産を前提として、羅漢果甘味配糖体濃縮物の工業レベルにおける製法について検討し、羅漢果配糖体の甘味質は果実の収穫時期 (完熟度) に大きな影響を与えることを見出した。完熟した果実を原料として、簡便なクロマト操作 (配糖体の純度 35%) だけで、実用上十分な甘味質の優れた羅漢果甘味配糖体濃縮物を工業レベルで製造することに成功した。

一方で、クロマト処理を繰り返して配糖体の純度をさらに向上させ、配糖体の純度と甘味質の関係についても調べた。その結果、配糖体の純度を 35% 以上に精製しても、甘味質の大幅な改善は見られなかった。ステビア抽出物のような植物系甘味料は、その主要甘味成分をできる限り高純度化し、良質な甘味料に調製する必要があるが、羅漢果の場合は主甘味成分である mogroside V だけでなく、その類縁化合物 (副成分として 11-oxo-mogroside V, mogroside IV, siamenoside I) も良好な甘味特性を有することから、mogroside V を選択的に高純度に精製する必要がないことを見出した。

このようにして完熟果実から工業レベルで調製した羅漢果甘味配糖体濃縮物は、強い甘味強度と良好な甘味特性を有することから、エリスリトールとの併用により、低カロリーの羅漢果-エリスリトール甘味料の工業生産を行い、ショ糖にきわめて近い甘味質を呈する糖尿病患者用の植物系甘味料を初めて上市させた。

羅漢果の抗アレルギー作用として、マウスの鼻炎モデルおよびアトピー性皮膚炎モデルに対する有効性について検討した。ヒスタミンによって誘発されるマウス鼻搔き行動に対する羅漢果粗抽出物および配糖体甘味配糖体濃縮物の影響を調べた結果、連続投与を続けた1週間後、2週間後の鼻搔き回数には有意差は認められなかった。しかし、連続投与を4週間続けると、羅漢果甘味配糖体濃縮物のみならず羅漢果粗抽出物にも鼻搔き回数の有意な減少が見られ、花粉症(アレルギー性鼻炎)モデルであるマウスでのヒスタミン誘発の鼻搔き行動を抑制することが明らかになった。

つぎに、マウスの吻側背部皮内にヒスタミン遊離惹起物質(コンパウンド48/80)を投与したアトピー性皮膚炎モデルを調製し、誘発される引搔き回数に対する羅漢果の効果を調べた。アレルギー性鼻炎モデルの結果と同様に、投与1週間では有意な抑制作用を示さなかったが、4週間の連続投与では有意な抑制作用が認められた。

羅漢果の背部引搔き行動の抑制に対する作用機序を検討する目的で、ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する羅漢果の効果を調べたところ、羅漢果はラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離を濃度依存的に抑制したことから、アトピー性皮膚炎モデルに対する羅漢果の有効性はヒスタミン遊離の抑制に起因するものと考えられた。

ウィスター系ラットに羅漢果粗抽出物を投与させた後、マルトース負荷試験を行った結果、負荷後30分、60分および90分後の血糖値の上昇が有意に抑制されることがわかった。一方、スクロースもしくはグルコース負荷では、血糖値上昇がコントロール群と有意差を認めなかった。このことから、羅漢果の血糖値上昇抑制作用は、マルターゼに対する特異的な阻害作用によるものと示唆された。羅漢果に含まれる甘味配糖体が血糖上昇抑制効果の有効成分であることを検証するためにmogroside類の精製標品を使ってマルターゼ阻害活性をインビトロ系で評価した。その結果、甘味成分であるトリテルペン配糖体にマルターゼ阻害活性が見いだされ、特に消化管内でmogroside V等の分解によって生じると考えられるmogroside IIIに高い阻害効果が確認された。なお、本阻害の様式は非競争阻害であった。

申請者は、羅漢果には様々な機能性(生理作用)を示すことを見出したが、それらの作用機序の解明の基礎的な知見として、羅漢果甘味配糖体(mogroside V)の消化・吸収さらに生体内での動態について検討した。

まずmogroside類の簡便で高感度な分析法の確立について検討した結果、生体試料中の微量のmogroside類を一斉に分析・定量を可能とする高速液体クロマトグラフ質量分析法(LC-MS法)を確立することができた。さらに本分析法を用いて、ラット消化管内でのmogroside Vの消化過程について調べた。

ラットにmogroside Vを経口投与し、一定時間後の小腸内容物の分解物について分析した結果、大半(60~70%)は未分解のままmogroside Vとして見いだされたが、テトラ

グルコース体(mogrosideⅣ、siamenosideⅠ)、トリグルコース体(mogrosideⅢ)、さらにはジグルコース体(mogrosideⅡa)も検出された。しかし、モノグルコース体やアグリコンは検出されなかった。

一方、糞便について分析した結果、排泄された mogroside 類の 62%はアグリコンである mogrol として、それ以外に mogrosideⅡb が 33%を占めていた。

なお、門脈血、尿中の mogroside 類を分析したが、いずれも検出限界以下であったことから、mogrosideⅤあるいはその部分加水分解物(テトラグルコース体、トリグルコース体、ジグルコース体)は小腸からはほとんど吸収されないことが示唆された。

審査結果の要旨

中国桂林周辺の特産品の一つである羅漢果[*Siraitia grosvenorii* C. Jeffrey ex A. M. Lu & Zhi Y. Zhang (*Momordica grosvenori* Swingle)]は、古くから「神果」として珍重されてきたウリ科の薬用植物であり、古代中国において、咳止めや喉荒れ緩和などに対する民間薬として広く供されてきた。その特長は、甘味成分(mogroside類)にあり、ショ糖の数百倍もの甘味強度を有し、その化学構造はトリテルペン配糖体であることが明らかにされている。しかし、羅漢果に含まれる甘味成分の甘味質特性、高純度羅漢果配糖体の製造技術および羅漢果の機能性(生理作用)に関する報告例はない。

申請者は、このような背景のもとで、羅漢果を高甘味度甘味料として実用化することを目的として、甘味特性や機能性に関する研究を行った。本論文は、羅漢果に含まれる甘味成分を単離・精製し、甘味質の基本性能について数量的な解析を行い、他の甘味料と比較検討した。また、高純度羅漢果配糖体を工業レベルで生産することを目的として、その精製方法を確立し、量産した羅漢果甘味配糖体濃縮物とエリスリトールを処方した新規な植物系低カロリー甘味料(実質的に0カロリー)の製造法を確立した。

一方、羅漢果は喘息の諸症状に対する民間薬として用いられてきたことから、アレルギー症状に有効性を検討した。さらに、羅漢果粗抽出物にマルターゼ阻害活性を見だし、食後の血糖値上昇抑制により、糖尿病患者の病態の進行抑制に機能を発揮する可能性を示した。また、羅漢果の甘味主成分である mogrosideⅤをラットに経口摂取させ、消化管での動態について検討した。本論文はこれらの成果をまとめたものであり、以下に概略を報告する。

羅漢果の主要甘味成分である各種トリテルペン配糖体の甘味強度を Pauli の全系列法を用いて、ショ糖に対する甘味倍率を求めた。SiamenosideⅠ(テトラグルコース体)の甘味強度がショ糖の 465 倍で最も強く、以下 mogrosideⅤ(ペンタグルコース体)(378 倍)、mogrosideⅣ(テトラグルコース体)(300 倍)、11-oxo-mogrosideⅤ(ペンタグルコース体)(68 倍)の順であった。また、mogrosideⅤの酵素分解物である mogrosideⅢ(トリグルコース体)は甘味を呈したが(ショ糖の 195 倍)、mogrosideⅡa(ジグルコース体の

1つ)と mogroside Ia(モノグルコース体の1つ)は甘味を示さなかった。

さらに、これらの配糖体の甘味質について数量的な解析を行うために、甘味質を構成する8要素(①苦み②後引き③しつこさ④くせ⑤渋味⑥刺激⑦すっきり感⑧まろやかさ)について評価した結果、羅漢果トリテルペン配糖体(mogroside V, 11-oxo-mogroside V, mogroside IV, siamenoside I, mogroside III)は、味覚の8要素のいずれについても、ショ糖の甘味質に近く、ステビア抽出物や甘草抽出物の植物系甘味料よりも、総合的に良質な甘味特性を有することがわかった。

羅漢果甘味配糖体濃縮物の工業レベルにおける製法について検討し、羅漢果配糖体の甘味質は果実の収穫時期(完熟度)に大きく影響されることを見出した。完熟した果実を原料として、簡便なクロマト操作(配糖体の純度35%)だけで、実用上十分な甘味質の優れた羅漢果甘味配糖体濃縮物を工業レベルで製造することに成功した。配糖体の純度を35%以上に精製しても、甘味質の大幅な改善は見られなかった。高純度化が必要なステビアとは異なる性質を示し、羅漢果は主甘味成分であるmogroside Vだけでなく、その類縁化合物も良好な甘味特性を有することから、mogroside Vを選択的に高純度に精製する必要がないことを見出した。

このようにして完熟果実から工業レベルで調製した羅漢果甘味配糖体濃縮物は、強い甘味強度と良好な甘味特性を有することから、エリスリトールとの併用により、低カロリーの羅漢果・エリスリトール甘味料の工業生産を行い、ショ糖にきわめて近い甘味質を呈する糖尿病患者用の植物系甘味料を初めて上市させた。

羅漢果の抗アレルギー作用として、マウスの鼻炎モデルおよびアトピー性皮膚炎モデルに対する有効性について検討した。ヒスタミンによって誘発されるマウス鼻搔き行動に対する羅漢果粗抽出物および配糖体甘味配糖体濃縮物の影響を調べた結果、連続投与を4週間続けると、羅漢果甘味配糖体濃縮物と羅漢果粗抽出物の両者に鼻搔き回数の有意な減少が見られ、マウスでのヒスタミン誘発の鼻搔き行動を抑制することが明らかになった。

つぎに、マウスの吻側背部皮内にヒスタミン遊離惹起物質(コンパウンド48/80)を投与したアトピー性皮膚炎モデルを調製し、誘発される引っ搔き回数に対する羅漢果の効果を調べた。アレルギー性鼻炎モデルの結果と同様に、4週間の連続投与で有意な抑制作用が認められた。

羅漢果の背部引っ搔き行動の抑制に対する作用機序を検討する目的で、ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する羅漢果の効果を調べたところ、羅漢果はラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離を濃度依存的に抑制したことから、アトピー性皮膚炎モデルに対する羅漢果の有効性はヒスタミン遊離の抑制に起因するものと考えられた。

ウィスター系ラットに羅漢果粗抽出物を投与させた後、マルトース負荷試験を行った結果、負荷後血糖値の上昇が有意に抑制された。一方、スクロースとグルコース負荷では、血糖値上昇抑制を示さなかった。このことから、羅漢果の血糖値上昇抑制作用は、

マルターゼに対する特異的な阻害作用によるものと示唆された。羅漢果に含まれる甘味配糖体が血糖上昇抑制効果の有効成分であることを検証するために mogroside 類の精製標品を使ってマルターゼ阻害活性をみるとトリテルペン配糖体にマルターゼ阻害活性が見いだされ、特に消化管内で mogroside V 等の分解によって生じる mogroside III に高い非競争的阻害が確認された。

次に、羅漢果甘味配糖体 (mogroside V) の消化・吸収さらに生体内での動態について検討した。ラットに mogroside V を経口投与し、一定時間後の小腸内容物の分解物について分析した結果、大半 (60~70%) は未分解のまま mogroside V として見いだされたが、テトラグルコース体 (mogroside IV、siamenoside I)、トリグルコース体 (mogroside III)、さらにはジグルコース体 (mogroside II a) も検出された。しかし、モノグルコース体やアグリコンは検出されなかった。一方、糞便について分析した結果、排泄された mogroside 類の 62% はアグリコンである mogrol として、それ以外に mogroside II b が 33% を占めていた。なお、門脈血、尿中の mogroside 類を分析したが、いずれも検出限界以下であったことから、mogroside V あるいはその部分加水分解物 (テトラグルコース体、トリグルコース体、ジグルコース体) は小腸からはほとんど吸収されないことが示唆された。

以上の成果は、食品機能学、栄養生理、生化学および酵素化学の分野に多大の貢献をするものであり、本論文の審査並びに最終試験の結果と併せて、博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。