

抗う蝕効果相乗機構解明を目的とした ホップ成分-シクロデキストラン相互作用の検討

米倉 タケル*¹ 高橋 圭子*²

Study of the Interaction between the extract from *Humulus Lupulus Linnaeus* and cyclodextrins for elucidation mechanism of anticarcinogenic agent

Takeru Yonekura*¹ Keiko Takahashi*²

The chemistry of large ring molecules has been very much part and parcel of the development of supramolecular chemistry. Cyclodextrins (CIs) are naturally occurring α -(1,6)-linked cyclic isomaltooligosaccharides, consisting of seven to seventeen glucopyranosyl residues. CIs have high water solubility and flexible ring structure and anti-carcinogenic effect. The mixture consisting of many size of CIs, CI_{plus} is used as anticarcinogenic liquid dentifrice, “HACHURA©”. We examined the extract using MALDI TOF mass and nuclear magnetic resonance spectroscopy, and set up a hypothesis.

諸言

1. シクロデキストラン, シクロイソマルトース

環状オリゴ糖の代表的分子はD-グルコースが α -1,4結合で環状に連なったシクロデキストリン (cyclodextrin; CyD) である^{1),2)}. CyDは水溶液中で疎水性相互作用を駆動力として、中央の疎水性空洞に空洞の大きさに応じた分子をゲスト分子として包接するユニークな特性を有しており、包接に伴う分子の安定化や水溶化は、食品、医薬品において応用され、最近では機能性材料として注目されている^{1),2)}. 当研究室では研究室開設時より、CyDに関する合成・分析・機能開発等多くの研究を卒業研究テーマとして展開してきた³⁾⁻¹⁶⁾.

環状オリゴ糖はグルコースを単位構造としたものだけでも、 α -1,6¹⁷⁾, β -1,2¹⁸⁾, β -1,3-環状オリゴグリコシド¹⁹⁾が報告されている。

なかでも1993年に発見された α -1,6結合した環状オリゴグリコシドはシクロイソマルトース(cycloisomaltoligosaccharide)あるいはシクロデキストラン(cyclodextran)と呼ばれCIと略記する²⁰⁾. 環を構成しているグルコース数nの場合はCI_nと表記されている。

CIは2級水酸基のみを有し、浅く広いフレキシブル空洞を有している (Figure 1). ショ糖からデキストランを合成するデキストラン生産菌とデキストランを原料として環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ [EC2.4.4.248]による分子内転移反応によって生産されており、現在の生産法ではCI7~CI12 (グルコース残基が7~12個)を15%程度含有する混合物として生産されている。黒糖から作られることから、沖縄を中心に盛んに研究が行われてきた。現在のところグルコース数が7個から17個までのCI7~CI17までの11種類が分取、構造決定されているがCyDのように特定グルコース環状CIを工業規模で得るには至っていない^{21), 22)}. CIはCyD同様、非還元性糖質で、加熱、酸・アルカリにもかなり安定である。CyDと異なり、等量以下の水に溶解する高い水溶性を有する。 α -1,6グリコシド結合は α -1,4結合を切断するアミラーゼや消化酵素では切断されないで、体内でブドウ糖となることはない。 α -、 β -CyDは消化酵素アミラーゼでは切断されないが、 γ -CyDは切断され、グルコースとなり、エネルギー源となる。カロリー制限等生活習慣病に敏感な近年では、 γ -CyDが対象とする比較的大きなゲスト分子に対する包接材料として期待されてきた。 α -グルコースを構成単位とし、天然由来化合物であり、CI特有のCyDにはない新しい機能発現の可能性があり、CI化学の展開が期待されている。当研究室では、CI化学の基礎として、NMRスペクト

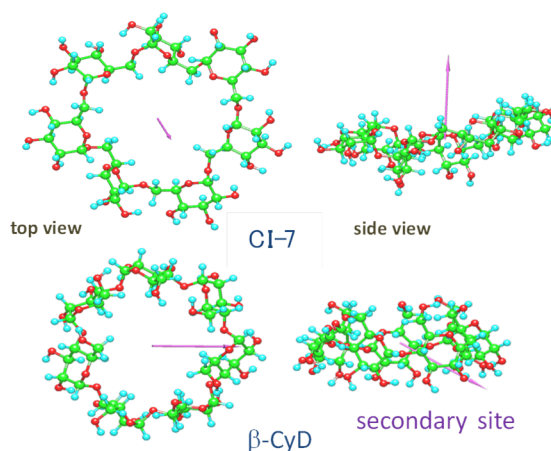
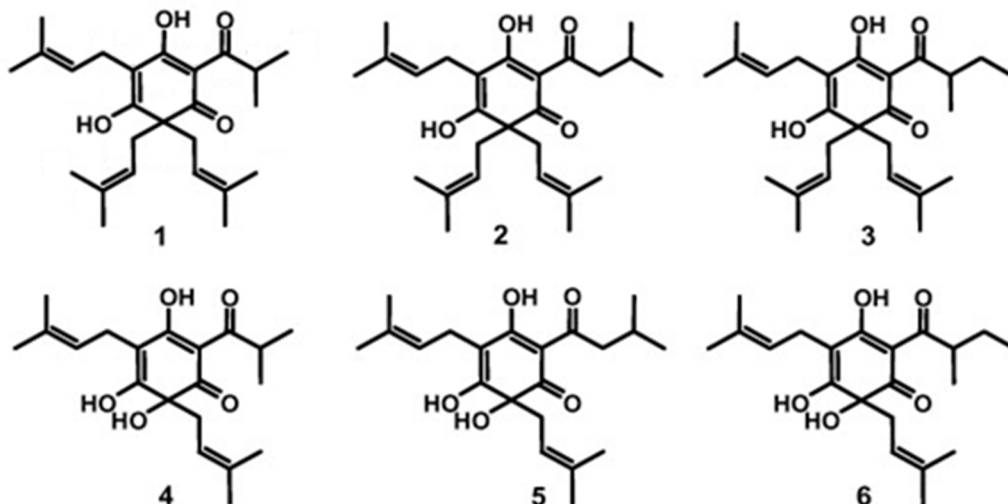


Figure. 1. Structure of β -CyD (bottom) and CI7 (upper)

*¹ 東京工芸大学生命環境化学科卒業研究生 *² 生命環境化学科教授
2017年8月2日 受理



lupulone(1), adlupulone (2), colupulone (3), humulone(4), adhumulone(5), cohumulone(6).

Figure 2. Structure of typical resins in extraction from chemical extracts of *Humulus Lupulus Linnaeus*²⁷⁾.

ルおよびその緩和時間の解析から, CI の特性についてすでに報告している^{23), 24)}.

2. ホップ

セイヨウカラハナソウ (*Humulus Lupulus Linnaeus*) の乾燥雌花を原料とする成分, ホップは, ビールの苦味, 泡の安定化, 殺菌の役割を担っている. 生薬としても古くから用いられ, 鎮静, 健胃, 制癌作用も含め現在でも新たな効用が報告されている^{25), 26)}. 有効成分以外にも構成成分の化学分析が研究されてきたが, 化学的に不安定であり, 完全分析はされていない. 既知樹脂成分(レジン)はハードとソフトに分類され, さらにソフトレジン α 酸と β 酸に分類されている. ソフトレジンの α 酸(Figure 2, 1, 2, 3)と β 酸(4, 5, 6)の一部が同定されている²⁷⁾.

3. シクロデキストランとホップの抗う蝕作用

CIは抗う蝕作用(anticarigenic effect)を有する. 環状グルコシド CyD では, 特定のグルコース数で構成されている CyD が特異的機能発現することが多い. 抗う蝕作用の作用機序は未解明であるが CI 構成グルコース数に依存しない. 構成グルコース数 7~17 (CI7~CI17) に非環状 α -1,6

オリゴイソマルトースを 50%程度含む CI 混合物である CI_{plus}でも有用な抗う蝕作用が認められ, 商品名「はちゅら」として商品化されている. その機構はう蝕作用の多糖形成(プラーク形成)を触媒するグルコシルトランスフェラーゼ阻害作用にあるとされている(Figure 3)²⁰⁾. さらに近年, ホップ抽出成分が CI の抗う蝕作用を促進すると報告されているがその機構は未解明である²⁸⁾. CI の作用とは異なる機構ではないかとされている. 口内の酸性度低下は抗う蝕作用の一助であるが, ホップ抽出成分には酸性度低下作用はないにもかかわらず, CI と混合すると酸性度低下作用が出現する. また, 黒ビール成分に抗う蝕作用があるという報告もあり, ビール愛好者には興味深い研究結果である²⁹⁾.

4. 本研究の目的

ホップも抗う蝕作用を有する. CI との抗う蝕作用促進相乗効果の機構はいかなるものであろうか. ホップ含有成分が (1) グルコシルトランスフェラーゼ関連酵素阻害効果を有する, (2) 多糖類やショ糖切断阻害機能も有する, (3) CI と複合体を形成しグルコシルトランスフェラーゼ阻害効果を促進する, の 3 つの仮説があげられる. ホップでは発現しない口内酸性度低下作用も CI 存在下で発現すること

も CI-ホップ成分複合体形成の証拠ではあるまいか. 本研究では(3)の仮説の検証を試みた. すなわち, ホップ成分が CI と相互作用して複合体を形成し, CI のグリコシド結合にゆがみを誘導し, α -1,6 グリコシド結合であるにもかかわらず α -1,4 グリコシド結合を形成するグルコシルトランスフェラーゼ活性部位阻害剤として機能し, 相乗的に抗う蝕作用を示すと仮説をたてた (Scheme 1). これはいわば "induced-fit" 現

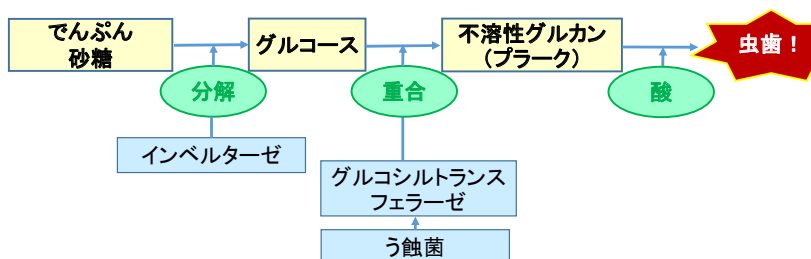
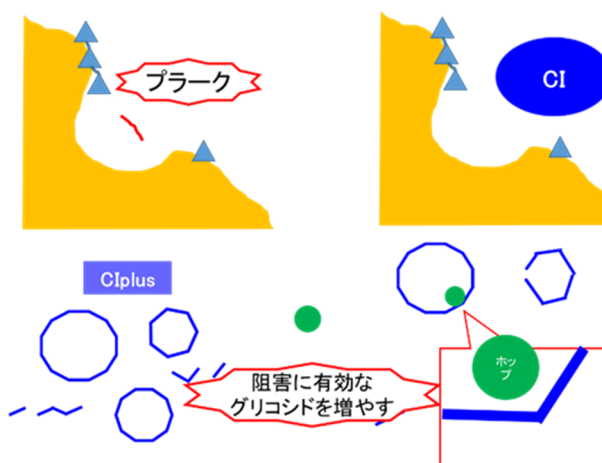


Figure 3. Suggested mechanism for anticarigenic effect for CI_{plus}.²⁰⁾



Scheme 1. Hypothesis for a synergistic anticarcinogenic mechanism of extract from hop and CI.

象であり、CI サイズ非依存性も、約半量混入している非環状イソマルトースでも効果がある事実と矛盾しない。ホップ成分が有効 CI 濃度（有効阻害剤濃度）上昇を誘導したことになる。本研究室では CyD 環状構造を構成しているグルコース間の α -1,4 グリコシド結合角の差異を ^{13}C NMR のグリコシド結合 C1, C4 シグナルのケミカルシフトの差から評価してきた^{4), 14)}。ホップ抽出成分-CI 複合体は質量分析で検出可能と考えられる。本研究ではホップ抽出成分の NMR, MS 分析法の確立と CI の相互作用の有無を CI を連結しているグリコシド結合変化として検証することを目的として検討を進めた。原料ホップ抽出液は予測以上に不安定で仮説を実証することはできなかったが、ホップ, CI 研究の一助となることを確信してここに報告する。

実験および方法

1. 試薬

溶媒、試薬は特級またはそれに準ずるものを用いた。CI_{plus}は株式会社シー・アイ・バイオ製を乾燥してそのまま用いた。ホップ抽出物は提供された Beta Tec 社製の Beta Stab 10A を用いた。二酸化炭素抽出法で抽出された pH 10.5-11.5 の微褐色澄明水溶液であり、開封後 5 日で懸濁化が生じた。遠心分離によりデカンテーションした後、可能な成分は凍結乾燥に処し、それぞれサンプル名をつけた (Figure 4)。

2. 機器

核磁気共鳴スペクトル(NMR)は JEOL NM-LA500 を用い、5mm ϕ 試料管で測定した。標準的には約 5 mg の CI_{plus} を重水 (ALDRICH 99.9 atom%)あるいは重メタノール(関東化学株式会社製 99.8%) 0.75 ml に溶かし、アセトン(2.100 ppm)を内部標準として、30°Cにて測定した。詳細は各脚注に示した。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析計 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS))は AB SCIEX

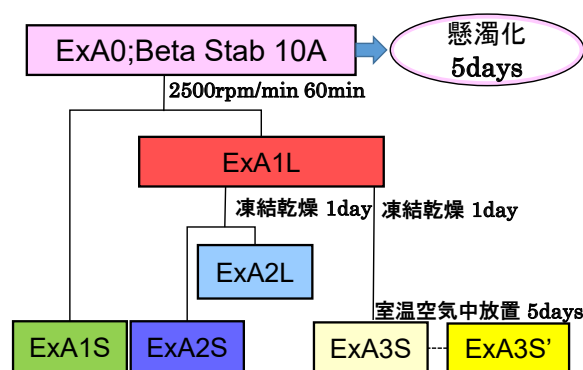


Figure 4. Beta Stab 10A の分離

社製 TOF/TOF™5800 にて、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(東京化成工業株式会社製)をマトリックスとして測定した。液体成分試料 (ExA0, ExA1L, ExA2L) はあらかじめ作成したマトリックス溶液 (20 μl)に加えエタノール (20 μl)で希釈後、Opti-TOF™384-Well Insent (123 \times 81 mm)プレートに滴下し、測定した。固体試料 (ExA1S, ExA2S, ExA3S, ExA3S')はそのままとリックス溶液に加え、エタノール希釈後、プレートを用意し測定した。ホップ抽出成分と CI_{plus}相互作用解析混合試料 (ExA1S- CI_{plus}混合物; Table)は ExA1S (0.3 mg)と、CI_{plus} (0.5 mg)。エタノール (20 μl)と純水 (10 μl)混合液にて混合し、同様に Opti-TOF™384-Well Insent (123 \times 81 mm)にて測定した。

遠心分離機は TOMY LC-100 を、凍結乾燥機は EYELA FDU-810 型を、pH は東亜 DKK 社製 MH-30R 型を用いた。

3. 試量調製

Beta Stab 10A

懸濁原液(ExA0)を遠心分離 (2500 rpm/min) したのち、固形物と液体を分離した。変質過程確認の目的で、各試料は凍結乾燥、室温放置、真空乾燥処理して常法に従って保存した。ドライアイス-アセトン (-70 °C)でも完全凍結乾燥物を得られなかった成分は、油状物として分離しそのまま保存した。

ホップ成分と CI 相互作用検討用試料

NMR 測定用に分離したホップ成分の固体試料 ExA3S を用い、CI_{plus}を重メタノールと重水混合溶媒に溶かした。

Table CI_{plus}との相互作用検討試料

	ExA3S/mg	CI/mg	CD ₃ OD/ml	D ₂ O/ml
試料 1	0.0	4.0	0.3	0.2
試料 2	1.8	4.0	0.3	0.2
試料 3	1.8	0.0	0.3	0.2
試料 4	1.8	0.0	0.5	0.0

結果と考察

1. 提供ホップ抽出成分の保存と分離分析

入手した原液(Beta Stab 10A: ExA0)は微褐色澄明アルカリ溶液であったが、開封後、冷暗所に注意深く保存した

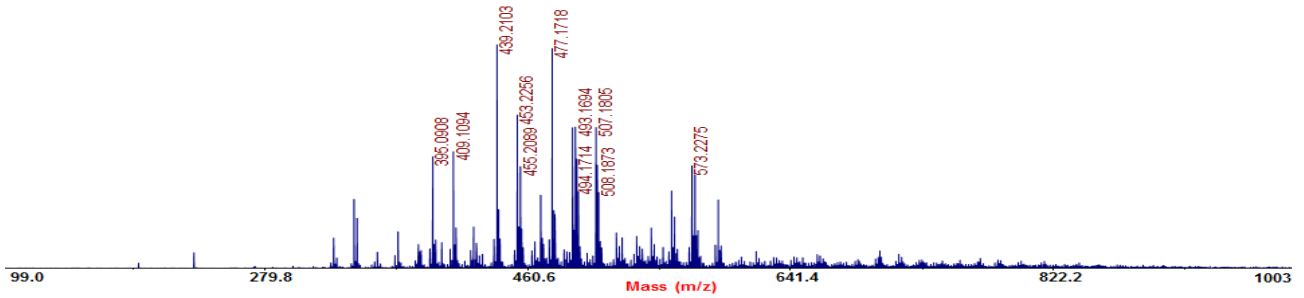


Figure 5. MAIDI-TOF MS spectra of ExA0

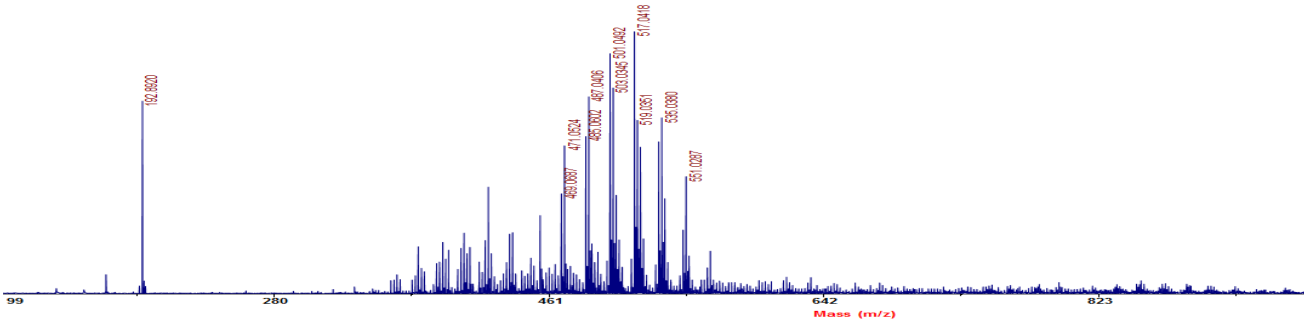


Figure 6. MAIDI-TOF MS spectra of ExA1S

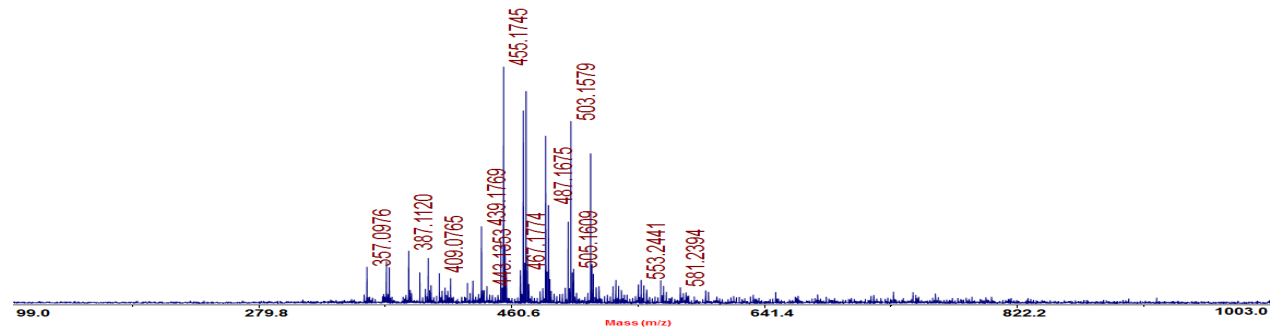


Figure 7. MAIDI-TOF MS spectra of ExA1L

にもかかわらず、数日で懸濁化した。再入手が難しく、この試料での検討を決断した。pHを確認したのち、懸濁液を2500 rpm/minで1時間処理し、デカンテーションにて固形物と液体に分離した。各試料は凍結乾燥、室温放置、真空乾燥に処した。ドライアイス-アセトン条件下(-70℃)でも完全凍結乾燥には至らなかった成分は油状物のまま保存した(ExA2L, ExA2S)。再検討の結果、一部は凍結乾燥物(ExA1L)として得た(Figure 4)。そのまま冷暗所に放置した試料 ExA0 は時間経過とともに懸濁物が著しく増加した。pH変化は観測されなかった。

2. ホップ抽出成分(Beta Stab 10A)各成分の分析

2-1 質量分析(MALDI-TOF MS)による分析

成分ごとにMALDI-TOF MS分析を行った。それぞれ最適のレーザーパワーでイオン化した。なお、192.9 m/zのピークはマトリックス2,5-ジヒドロキシ安息香酸である。以下、成分ごとの結果を示す。

2-1-1 ExA0

試料のpHは10.41であった。レーザーパワー3000から

10000の範囲の強度で測定し、3500以下ではピークはほとんど観測されなかった。強度順10ピークは439.2, 477.2, 453.2, 439.2, 507.2, 409.2, 395.1, 494.2, 508.2および539.2 m/zであった。colupulone, lupulone および adlupulone の理論値はそれぞれ439.2, 453.2および453.2 m/zであることより、colupulone, lupulone および adlupulone の存在を確認した。しかし、507.2および508.2 m/zに観測された高分子量成分を含有し、その化学構造は解明できていない(Figure 5)。

2-1-2 ExA1S

沈殿物, ExA1S のレーザーパワー強度4100における強度順10ピークは517.0, 501.0, 503.0, 487.0, 535.0, 519.0, 485.1, 471.1, 551.0および469.1 m/zであった。ExA0より高分子量領域に多くのピークが観測された。ホップ既知レジン成分(Figure 2)に同定できる分子量ピークは観測されず、再溶解水溶液のpHは6.34であった。明らかに成分が変質して沈殿が生じ、懸濁液となったと考えられる。最大100程度の分子量増加現象の詳細は未解明である(Figure 6)。

2-1-3 ExA1L

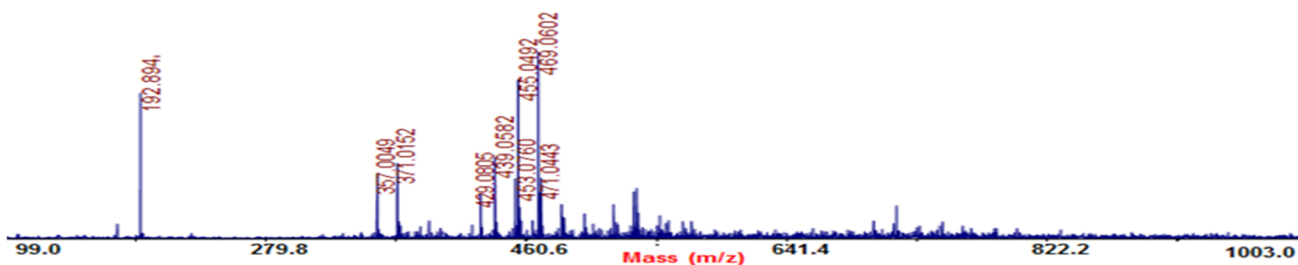


Figure 8. MAIDI-TOF MS spectra of ExA2S

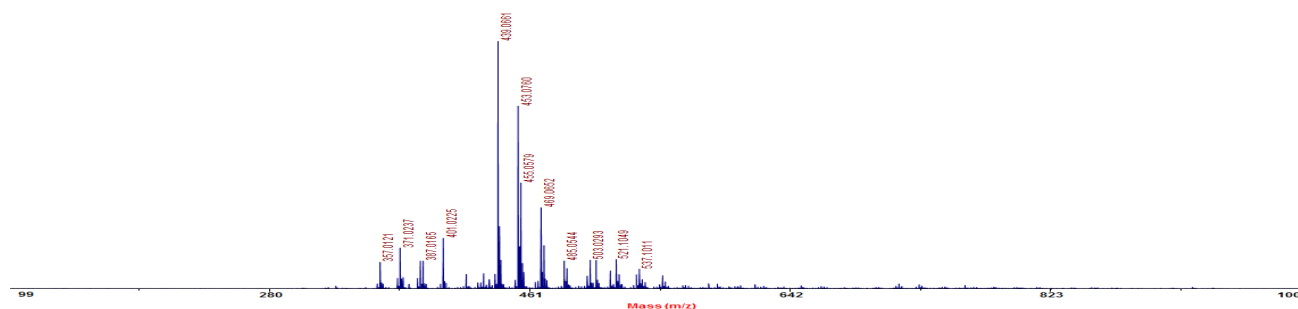


Figure 9. MAIDI-TOF MS spectra of ExA2L

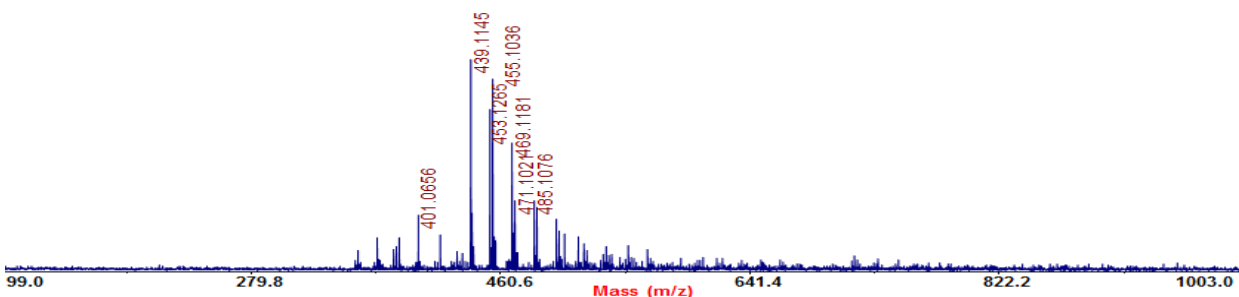


Figure 10. MAIDI-TOF MS spectra of ExA3S

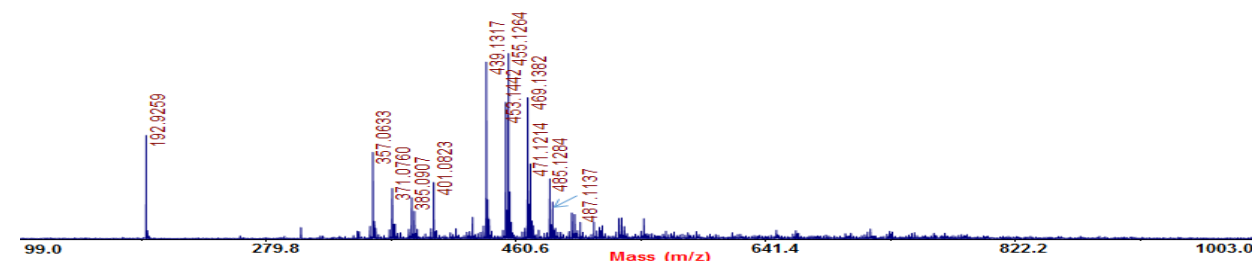


Figure 11. MAIDI-TOF MS spectra of ExA3S'

試料の pH は 10.97 であった。レーザー強度 4500 における強度順 10 ピークは 455.2, 503.2, 487.2, 439.2, 387.1, 467.1, 485.1, 505.2, 357.1 および 409.1 m/z であった。colupulone (Calcd.; 439.2 m/z), lupulone (Calcd.; 453.2 m/z), adlupulone (Calcd.; 453.2 m/z) のピーク群が重複して 454 m/z 付近に観測された。水溶性物質は ExA1s に移行し分離されたと考えられる (Figure 7)。

2-1-4 ExA2S

試料の pH は 7.72 であった。レーザー強度 4100 におけ

る強度順 8 ピークは 469.1, 455.0, 439.1, 371.0, 357.0, 453.0, 471.0 および 429.1 m/z であった。colupulone (Found.; 439.0 m/z), lupulone (Found.; 453.1 m/z), adlupulone (Found.; 453.1 m/z) が同定された (Figure 8)。

2-1-5 ExA2L

試料の pH は 11.07 であった。凍結乾燥ができなかった油状成分 ExA2L のレーザー強度 4100 の強度順 10 ピークは 439.1, 453.1, 455.1, 460.1, 401.0, 371.0, 521.1, 503.0, 387.0 および 485.1 m/z であった。colupulone (Found.; 439.1 m/z),

lupulone (Found; 453.1 m/z), adlupulone (Found; 453.1 m/z)が同定された(Figure 9).

2-1-6 ExA3S

試料の pH は 9.57 であった. レーザー強度 4100 における強度順 7 ピークは 439.1, 455.1, 453.1, 469.1, 471.1, 485.1 および 401.1 m/z であった. coluplone (Found; 439.1 m/z), lupulone (Found; 453.1 m/z), adlupulone (Found; 453.1 m/z)が同定された(Figure 10).

2-1-7 ExA3S'

試料の pH は 9.56 であった. 劣化経過を観察するため, あえて空中放置した固体成分 ExA3S' のレーザー強度 4100 の強度順 10 ピークは 455.1, 439.1, 469.1, 453.1, 357.1, 471.1, 485.1, 401.1, 371.1 および 385.1 m/z であった. coluplone (Found; 439.1 m/z), lupulone (Found; 453.1 m/z), adlupulone (Found; 453.1 m/z)が同定された(Figure 11).

2-2 NMR スペクトルによる分析

成分ごとの分析はできなかった. 原液成分 ExA0 の重水中の ^1H NMR スペクトルを示す(Figure 12). 5 ppm 付近に水由来シグナルが観測され, 拡大すると 0.5 ~ 3 ppm に鋭いシグナルが観測された. 脂肪族炭化水素由来のシグナルと思われるが特定はできなかった. 通常, 糖由来シグナルは 3 ~ 4 ppm に観測される. 本試料ではシグナルは観測されていない. また, 芳香族由来シグナルも観測されていない.

^{13}C NMR スペクトルでは 200, 120~140, 10~50 ppm 付近にシグナルがそれぞれ観測された (Figure 13). それぞれカルボニル基, 二重結合由来と推測される. 60~100 ppm の範囲にはシグナルは観測されず, プロトン NMR の結果と合わせて糖成分は含有していないことを判明し, 配糖体も含

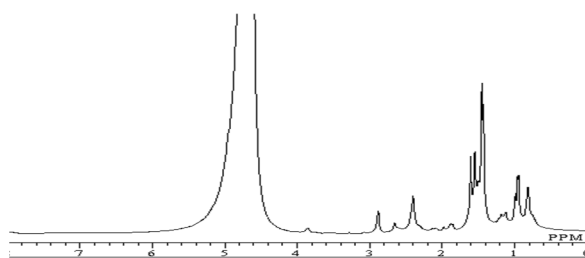


Figure 12. ^1H NMR spectrum of EXA0 in D_2O ; temp. 30°C, scan times 256.

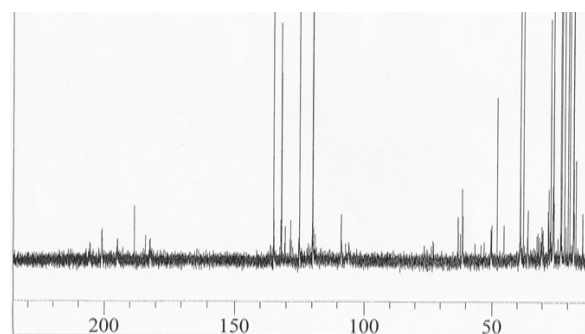


Figure 13. ^{13}C NMR spectrum of EXA0 in D_2O ; temp. 30°C, scan times 15000.

まれてはいない.

2-3 Beta Stab 10A 含有化学物質

Beta Stab 10A は大変不安定で時間とともに懸濁化した. 含有成分安定保持のために凍結乾燥などの固体化が必要であるが pH が 10.1 溶液を凍結乾燥処理は化学的常法ではない. アルカリ成分の由来を知る必要があり, その上で安定固化処理が必要である. MALDI-TOF MS 分析により Beta

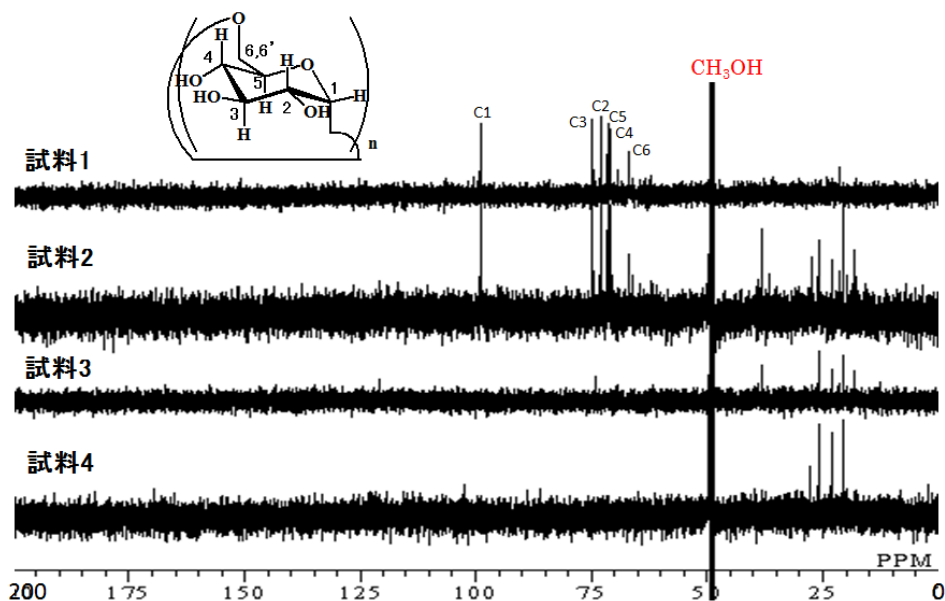


Figure 14. ^{13}C NMR spectra of mixture of extract from hop and CI_{plus} in CD_3OD ; temp.: 30°C, scan times:15000.

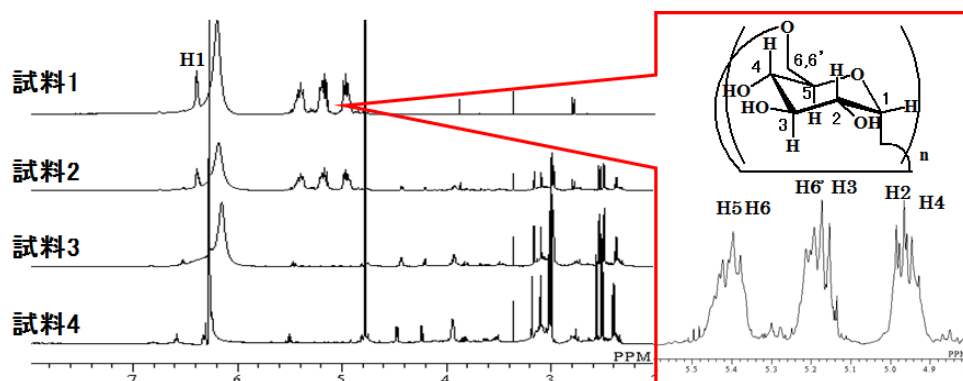


Figure 15. ^1H NMR spectra of mixture of extract from hop and CI_{plus} in CD_3OD ; temp.: 30°C , scan times:256

Stab 10A に lupulone, colupulone および adlupulone の含有を確認した. NMR の二重結合由来シグナルも矛盾しない. colupulone, lupulone および adlupulone は水溶性も高く, 凍結乾燥ができた. この特質が同定, 報告に繋がったのであろう. 懸濁化から沈殿化した高分子量化合物など, さらに分析検討が必要である. また, ^1H および ^{13}C NMR 解析から Beta Stab 10A には糖質, あるいは配糖体成分が含まれていないことがわかった. CI を添加しても NMR スペクトルの重複はなく, 相互作用検討の可能性は示された.

3. Beta Stab 10A とシクロデキストランの相互作用

ホップ成分と CI_{plus} 中の様々な CI と複合体を形成し, フレキシブルで種々な α -1,6 グリコシド結合角をグリコシドトランスフェラーゼ活性部阻害に適合した結合角になるのであれば, ホップ成分の相乗効果が証明できる. α -1,6-グリコシド結合はでんぷんや CyD の α -1,4-グリコシド結合より, さらにフレキシブルである. CI_{plus} に 50% 以上含有している非環状 α -1,6-オリゴデキストランもホップ成分により有効な阻害剤となるのであれば, ホップの相乗効果を説明できる.

グリコシド結合二面角はアノメリック炭素(C1)の ^{13}C NMR のシグナルシフト値と相関性がある^{30), 4), 14)}. ホップ抽出成分は糖成分はない. ホップ存在下のアノメリック C1 シグナル変化は α -1,6-グリコシド結合二面角変化のみ

を示す. 作成した 4 種の試料(Table)は難水溶性であったため重メタノールを添加した. 試料 3 も 4 も 100 から 150 ppm の二重結合あるいは芳香族由来のシグナル群, 200 ppm 付近の 4 級炭素群のシグナルを観測することができず, 脂肪族炭素由来のシグナル群だけが観測された. Figure 13 との矛盾は未解明である. CI のアノメリック C1 由来シグナルは CI 存在下スペクトルでは 100 ppm 近辺に観測されているが, シフト変化は観測されなかった. ^1H NMR スペクトルにおいても著しい変化は観測されなかった(Figure 15).

CyD 包接体においては非共有結合性複合体が MS にて観測されている^{31), 32)}. lupulone, colupulone および adlupulone と CI7 - CI19 複合体分子量が予測される 1520~2100 m/z 範囲を MALDI-TOF-MS で詳細に解析した(Figure 16). 439.1 m/z に colupulone, 455, 453 m/z 付近にそれぞれ lupulone, adlupulone と帰属されるピークが観測された. 1173, 1335, 1497 m/z に CI7 , CI8 , CI9 に帰属されるピークが観測された. しかし 1520~2100 m/z に予測された複合体由来分子量ピークは観測できなかった.

結論と展望

ホップ抽出成分の ^1H 及び ^{13}C NMR 測定した. しかしホップ抽出成分が CI と複合体を形成して相乗抗う蝕効果を示すという仮説を証明することはできなかった.

天然物の生理作用を含めた機能は, 相対的含有量に依存しない. したがって原則的にはすべてを同定し解析することが必要である. 本研究では達成できなかったが, 質量スペクトルの成分探査有効性を示すことができた.

謝辞

本研究の機会を与えていただきました日新精糖株式会社に深く感謝いたします.

参考文献

- 1) M. L. Bender and M. Komiyama, "Cyclodextrin Chemistry", Springer-Verlag, New York, 1978.
- 2) ナノマテリアルシクロデキストリン, 日本シクロデキス

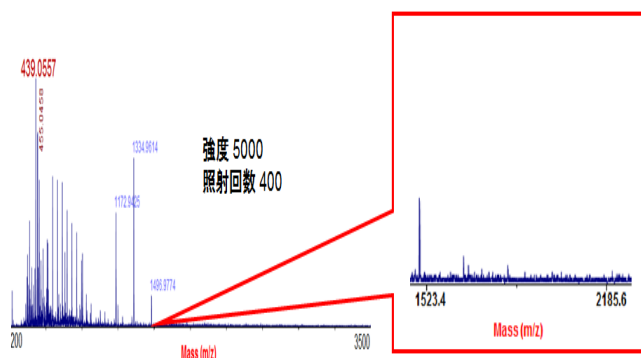


Figure 16. MALDI-TOF MS Spectrum of mixture of ExA3S and CI_{plus} (sample 2).

- トリン学会編, 米田出版 **2005**.
- 3) K. Takahashi, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1991**, 929-930.
 - 4) K. Takahashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, *66*, 540-544, **1993**.
 - 5) K. Takahashi, and R. Furusho, *Polymer J.*, *28*, 458-464, **1996**.
 - 6) M. A Hossain, K. Hamasaki, K. Takahashi, H. Mihara, and A. Ueno, *J. Am. Chem. Soc.*, *123*, 7435-7436 **2001**.
 - 7) K. Takahashi, K. Imotani, and M. Kitsuta, *Polymer J.*, *33*, 242 - 247, **2001**.
 - 8) I. Suzuki, Y. Kato, Y. Egawa, J. Anzai, M. Wadamori, H. Yokomizo, and K. Takahashi, *J. Mol. Structure*, *602-603*, 223-231, **2002**.
 - 9) K. Takahashi, H. Narita, M. Oh-hashii, A. Yokoyama, and T. Yokozawa, *J. Incl. Phenom, Macrocy. Chem.*, *50*, 121-127, **2004**.
 - 10) K. Takahashi, *Recent Res. Devel. Chem.*, *2*, 91-103, **2004**.
 - 11) K. Takahashi, H. Yokomizo, K. Ishiyama, M. Kitsuta, and M. Oh-hashii, *J. Incl. Phenom, Macrocy. Chem.*, *56*, 95-99, **2006**.
 - 12) K. Takahashi, S. Morimoto, H. Nakamura, T. Narusawa, T. Seki, M. Ooe, K. Aoi, and A. Takada, *J. Incl. Phenom. Macrocy. Chem.*, *70*, 384-396, **2011**.
 - 13) S. Fujiwara, and K. Takahashi, *Supramol. Chem.*, *23*, 156-159, **2011**.
 - 14) K. Takahashi, K. Andou, and S. Fujiwara, *Polymer J.*, *44*, 850-854, **2012**.
 - 15) 高橋圭子, 蕪木和孝, 成澤俊明, 東京工芸大学紀要 *Vol.35 No.1*. 87-94, **2012**.
 - 16) T. Suzuki, A. Ei, Y. Takada, H. Uehara, T. Yamanobe, K. Takahashi, *Beilstein J. Org. Chem.*, *10*, 2997-3006, **2014**.
 - 17) T. Oguma, T. Hirouchi, and M. Kobayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *57*, 1225-1227, **1993**.
 - 18) F. C. McIntire, W. H. Peterson, and A. J. Riker, *J. Biol. Chem.*, *143*, 491-496, **1942**.
 - 19) P. M. Collins, and M. H. Ali, *Tetrahedron Lett.*, *31*, 4517-4520, **1990**.
 - 20) 舟根和美「シクロデキストラン」p205-210 早川幸男, 中久喜輝夫編「オリゴ糖の製法開発と食品への応用」シーエムシー出版 東京 **2012**
 - 21) M. Kobayashi, K. Funane, T. Oguma, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *59*, 1861-1865, **1995**.
 - 22) K. Funane, K. Terasawa, Y. Mizuno, H. Ono, S. Gibu, T. Tokashiki, Y. Kawabata, Y. M. Kim, A. Kimura, and M. Kobayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *72*, 3277-3280, **2008**.
 - 23) 藤原章司, 小澤開土, 成澤俊明, 高橋圭子 東京工芸大学紀要 *Vol.38 No.1*, 85-92, **2015**.
 - 24) 藤原章司, 高橋圭子, 東京工芸大学紀要 *Vol.38 No.1*, 99-101, **2015**.
 - 25) M. Dušek, J. Olšovská, K. Krofta, M. Jurková, and A. Mikyška, *J. Agric. Food Chem.*, *62*, 7690-7697, **2014**.
 - 26) R. Stelue, *Chem. Rev.*, *67*, 19-71, **1967**.
 - 27) G. Haselue, D. Intelmann, and T. Hofmann, *Food Chem.*, *116*, 71-81, **2009**.
 - 28) 公開特許「抗う蝕性組成物の製造方法」WO 2012172635 A1 公開日 **2012**.
 - 29) M. Murata, T. Nishikori, and S. Homma, *J. Home Econ. Jpn.*, *50*, 689-694, **1999**.
 - 30) K. Bock, A. Brigbole, and B. W. Sigurskjold, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1711-1713, **1986**.
 - 31) K. Hattori, S. Motooka, and K. Takahashi, *The Academic Reports The Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Polytechnics*, *22*, 39-43, **1999**.
 - 32) T. Yonezawa, T. Asano, T. Fujino, and H. Nishihara, *Chem. Phys.*, *419*, 17-22, **2013**.