

表7 病理検査結果 (大腸)

Rat NO.	腺癌	腺腫	Rat NO.	腺癌	腺腫	Rat NO.	腺癌	腺腫
C-1	0	0	G-1			S-1	0	2
C-2			G-2	0	4	S-2	0	3
C-3	0	0	G-3	0	7	S-3	0	7
C-4	0	1	G-4	0	1	S-4	0	0
C-5	0	2	G-5	0	0	S-5	0	1
C-6	0	1	G-6			S-6	0	1
C-7	0	1	G-7	0	1	S-7	0	0
C-8	0	0	G-8	0	5	S-8	0	3
C-9	0	0	G-9	0	1	S-9	0	3
C-10	0	0	G-10	0	0	S-10	0	8
C-11	0	0	G-11	0	5	S-11		
C-12			G-12			S-12	0	3
C-13	0	0	G-13			S-13	0	4
C-16	2	0	G-16	0	0	S-16		
C-17	0	2	G-17			S-17	0	3
C-18	0	2	G-18	0	1	S-18	0	1
C-19	0	1	G-19	0	0	S-19	0	1
C-20	0	0	G-20	0	11	S-20	0	3
C-21			G-21	0	2	S-21	0	0
C-22	0	1	G-22	0	0	S-22	0	1
C-23	0	0	G-23	0	1	S-23	0	4
C-24	0	0	G-24			S-24	0	1
C-25	3	0	G-25	0	0	S-25	0	0
C-26	0	0	G-26	0	1	S-26	0	1
C-27	0	1	G-27			S-27	0	1
C-28	0	0	G-28	0	1	S-28	0	0
Σ	5	12	Σ	0	41	Σ	0	51
Mean	0.22	0.52	Mean	0.00	2.16	Mean	0.00	2.13
S.E.	0.15	0.15	S.E.	0.00	0.68	S.E.	0.00	0.43

C-14	1	0	G-14	0	0	S-14	0	0
C-15	0	0	G-15	0	0	S-15	0	0
C-29	0	0	G-29	0	0	S-29	0	2
C-30	0	0	G-30	0	0	S-30		
Mean	0.25	0.00	Mean	0.00	0.00	Mean	0.00	0.67

	途中死亡
--	------

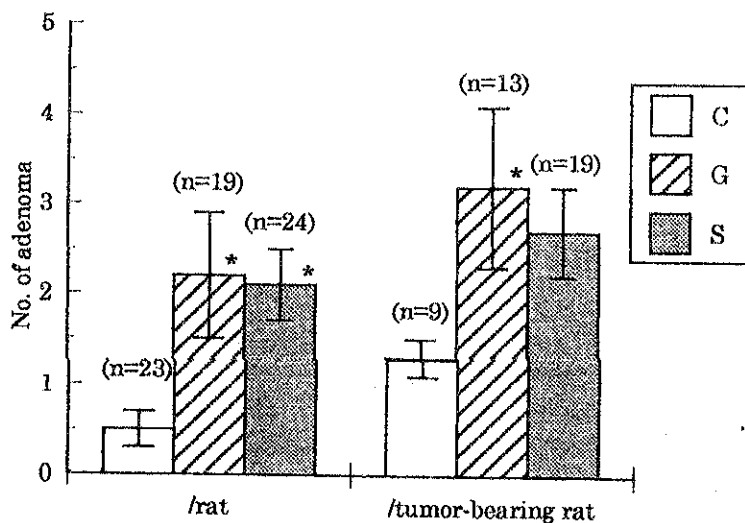


図7 大腸におけるDMH投与ラットの腺腫数
Values are mean±S.E. *p<0.05 vs C group.

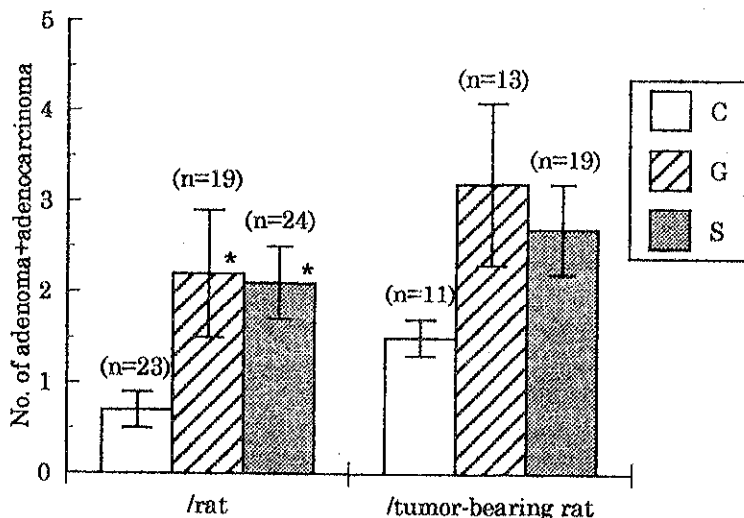


図8 大腸におけるDMH投与ラットの腺腫+腺癌数
Values are mean±S.E. *p<0.05 vs C group.

表8に見られるように腺腫の検出されたラットの割合、あるいはそれに腺癌の検出されたラットをあわせたものの割合はソルベステリン投与でともに上昇した。群中の全ラットで平均した腺腫数(表9)、腺腫+腺癌数(表10)はいずれもソルベステリン投与で有意に上昇した。

ソルベステリンは体重や血清脂質濃度を抑制すると同時に胆汁酸その他の脱抱合酵素の活性を抑制し(図3、図4)、二次胆汁酸の生成(図5)及び総胆汁酸分泌量(図6)を抑制したと考えられる結果を得た。従って、化学発癌剤においても胆管分泌形態からの脱抱合は抑制されているものと推定される。しかしながら、腸内環境は著しく高濃度の脂質に満たされており(図1)、発癌関連物質は少量であっても効率よく腸管上皮細胞と相互作用を行ったものと推定される。その結果、ソルベステリン投与群の腫瘍発生率は水溶性食物繊維と同様に対照群よりも有意に上昇した。しかし、プロモーション以降の病変の進行は顕著ではなかった。二次胆汁酸などのプロモー

ター活性の証明されている成分の糞便中濃度が減少していることと矛盾しない結果であった。

実験条件では人の食生活では考えられない高濃度ソルベステリンを用いており、本実験の結果を直ちに人の食生活にあてはめる事は困難であるが、極端に偏った食生活は不健康である事を示していると考えられる。即ち、水溶性食物繊維の場合には不溶性食物繊維との摂取量比を適正に保つ事が大腸癌の抑制につながると考えられ、低カロリー脂肪も著しい高濃度は避けて他の栄養素との摂取比率などを適正に保つ事が大腸がんの予防という点からも不可欠であると思われる。

表11 糞中胆汁酸、脂質、コレステロール、glucosidase、glucuronidase
の測定結果

	C	G	S
糞中総胆汁酸濃度 (nmol/g)			
10th wk	8399 ± 506a	9845 ± 515a	2696 ± 339b
20th wk	7750 ± 327a	11003 ± 1458b	2176 ± 213c
30th wk	9861 ± 646a	9648 ± 1226a	2586 ± 262b
糞中総胆汁酸量(nmol/day)			
10th wk	7474 ± 616a	15272 ± 1110b	3843 ± 586c
20th wk	7037 ± 417a	20017 ± 2868b	3666 ± 465c
30th wk	8613 ± 659a	14422 ± 1361b	4022 ± 487c
糞中一次胆汁酸濃度 (nmol/g)			
10th wk	1698 ± 405a	3082 ± 198b	465 ± 62c
20th wk	1494 ± 247a	2881 ± 283b	402 ± 47c
30th wk	1996 ± 256	1996 ± 347	273 ± 55c
糞中二次胆汁酸濃度 (nmol/g)			
10th wk	3960 ± 176a	9 ± 9b	1234 ± 124c
20th wk	3620 ± 170a	810 ± 469b	1318 ± 133c
30th wk	4808 ± 373a	3498 ± 1107	1283 ± 158c
糞中抱合体胆汁酸濃度 (nmol/g)			
10th wk	2120 ± 444a	112 ± 15b	443 ± 63c
20th wk	2482 ± 308a	252 ± 40b	408 ± 47c
30th wk	3579 ± 362a	1063 ± 427b	374 ± 93c
糞中遊離胆汁酸濃度 (nmol/g)			
10th wk	3553 ± 153a	3422 ± 215	1278 ± 127c
20th wk	2640 ± 128a	4098 ± 309b	1312 ± 135c
30th wk	3372 ± 296	4835 ± 815a	1181 ± 152c
糞中二次/一次胆汁酸			
10th wk	9.15 ± 4.5	0.00 ± 0.00a	3.66 ± 0.85
20th wk	4.60 ± 1.13a	0.81 ± 0.67b	3.50 ± 0.26
30th wk	3.61 ± 0.82	6.89 ± 4.66	5.33 ± 0.97
糞中遊離/抱合型胆汁酸			
10th wk	3.42 ± 0.93a	36.58 ± 4.82b	4.31 ± 0.98
20th wk	1.49 ± 0.31a	23.04 ± 4.89b	3.46 ± 0.28c
30th wk	1.14 ± 0.18a	12.11 ± 3.22b	5.12 ± 1.00c
糞中一次胆汁酸(%)			
10th wk	18.5 ± 3.7a	31.4 ± 1.4b	17.9 ± 1.8
20th wk	18.0 ± 2.7a	29.6 ± 2.9b	18.4 ± 1.2
30th wk	19.6 ± 2.3	23.2 ± 3.6	10.0 ± 1.6c
糞中二次胆汁酸(%)			
10th wk	47.9 ± 1.5a	0.1 ± 0.1b	48.3 ± 2.7
20th wk	46.8 ± 1.2a	5.3 ± 2.0b	60.7 ± 2.0c
30th wk	48.8 ± 1.8a	28.5 ± 7.6b	50.0 ± 3.6

糞中総脂質濃度(mg/g)			
10th wk	24.9 ± 17a	25.1 ± 2.8a	196.7 ± 10.4c
20th wk	11.2 ± 2.3a	17.0 ± 2.2a	148.0 ± 6.4c
30th wk	19.1 ± 1.1a	34.3 ± 1.8b	96.5 ± 5.3c
糞中総脂質 (mg/day)			
10th wk	22.4 ± 2.0a	43.2 ± 6.2b	274.5 ± 26.3c
20th wk	10.9 ± 2.5a	31.4 ± 4.1b	241.6 ± 21.1c
30th wk	17.0 ± 1.4a	53.5 ± 4.8b	152.7 ± 16.6c
糞中コレステロール濃度 (mg/g)			
10th wk	15.6 ± 0.5a	13.0 ± 0.6b	7.7 ± 0.8c
20th wk	16.0 ± 0.6a	14.4 ± 0.7a	9.7 ± 2.2c
糞中コレステロール (mg/day)			
10th wk	14.0 ± 1.0a	21.3 ± 1.8b	10.9 ± 1.5
20th wk	14.6 ± 0.8a	26.7 ± 2.3b	14.2 ± 1.7
糞中β-グルコシダーゼ活性(Umol/g20min.)			
10th wk	11.2 ± 4.4	30.6 ± 9.4	2.9 ± 0.4
20th wk	3.2 ± 0.9a	27.5 ± 5.7b	2.1 ± 0.4
30th wk	1.1 ± 0.2a	43.1 ± 8.6b	2.8 ± 0.5c
糞中β-グルクロニダーゼ活性(Umol/g20min.)			
10th wk	30.4 ± 5.9a	36.6 ± 5.7a	10.1 ± 1.3c
20th wk	21.1 ± 3.7	21.7 ± 2.0	9.1 ± 0.7c
30th wk	11.4 ± 1.9a	49.3 ± 18.7b	5.4 ± 0.7c

Data are expressed as means ± S.E..

Statistically significant differences are observed among a, b and c (p<0.05).

分担研究:フラボノイド化合物の生体内抗酸化能及び脂質代謝を指標とした
安全性評価に関する研究
茶ポリフェノール及びタンニン酸の脂質代謝, 抗酸化能及び
ミネラル排泄に及ぼす影響

中村 優美子：国立医薬品食品衛生研究所大阪支所食品試験部
津村 ゆかり：国立医薬品食品衛生研究所大阪支所食品試験部
吉井 公彦：国立医薬品食品衛生研究所大阪支所食品試験部
開原 亜樹子：国立医薬品食品衛生研究所大阪支所食品試験部
石光 進：国立医薬品食品衛生研究所大阪支所食品試験部
外海 泰秀：国立医薬品食品衛生研究所大阪支所食品試験部

【要旨】

ポリフェノールは植物の二次代謝産物として多種にわたり普遍的に存在する物質であり、ヒトや動物の食餌中に必ず存在する。多種多様なものがあり、食品では穀類、豆類、種実類、野菜、果物、ジュース類、茶、コーヒー、ココア、ワイン、ビール等の嗜好飲料中に多く含まれている。ポリフェノールは従来は非栄養素として考えられてきた。しかし、近年になって、ポリフェノールに抗酸化作用、抗癌作用、心臓血管系の病気の治療・予防に有用な作用のあること等が報告されるようになり、機能性食品素材として注目されるようになってきた。

今年度はポリフェノールのうち、日本人が古くから飲用しかつ抗癌作用等有用な作用が報告され近年注目されている緑茶ポリフェノール(Polyphenon)と、タンニンのうち様々な植物に含まれ最もよく知られたタンニン酸(加水分解性タンニン)の2種を選択し、様々な用量でWistar系雄性ラットに投与し、抗心臓血管病作用に関連の深い抗酸化能及び広くは研究されていない脂質代謝に及ぼす影響を調べ、併せてミネラル排泄に及ぼす影響についても検討し、以下の結果を得た。

- (1) タンニン酸は0.1 g/kg以上の投与量でラットの生長抑制作用を示したが、茶ポリフェノールは0.5 g/kg以上の摂取量でラットの生長を抑制する傾向が認められた。
- (2) 血清及び肝臓脂質濃度について、Polyphenon投与時には対照群のラットに比べ、血清HDL-コレステロール濃度が0.2-1.0 g/kg投与ラットで有意に低く、肝臓トリグリセライド濃度が0.5及び1.0 g/kg投与ラットで有意に高かった。また、タンニン酸投与時には対照群のラットに比べ、肝臓中トリグリセライド濃度が0.1, 0.2及び1.0 g/kg投与ラットで、肝臓中リン脂質濃度が0.5 g/kg投与ラットでそれぞれ有意に高かった。
- (3) 血清からはポリフェノールが全く検出されなかったが、血清TBARS値はPolyphenon 1.0 g/kg投与ラット及びタンニン酸0.1-1.0 g/kg投与ラットで有意に低下した。

(4) Polyphenon 投与時には、中性ステロイド排泄量 1.0 g/kg 投与群で対照群に比べ有意に増加したが、胆汁酸排泄量には有意な変動が認められなかった。Cp/Ch 比は 0.05, 0.1 及び 0.2 g/kg 投与群で、CDCACA/CDCA 比は 0.05, 0.2 及び 0.5 g/kg 投与群でそれぞれ対照群に比べ有意に低下し、一次胆汁酸の割合は 0.2 g/kg 投与群でのみ有意に増加した。また、タンニン酸を投与した場合は対照群に比べ、中性ステロイド排泄量 1.0 g/kg 投与群で、胆汁酸排泄量は 0.2 g/kg 投与群でそれぞれ有意に増加した。糞中の Cp/Ch 比は 0.5 g/kg 投与群で、CA/CDCA 比は 0.1 及び 0.2 g/kg 投与群で対照群に比べて有意に低下した。胆汁酸排泄量は 0.2 g/kg までは投与量が増加すると排泄量も増加する傾向があったが、0.5 g/kg 以上の投与量になるとかえって減少した。

(5) 肝臓中の Cu 及び Zn 含量についてはポリフェノール投与に対する有意な影響は全く認められなかった。Fe 含量はポリフェノール投与群でむしろ増加する傾向があり、Polyphenon 0.5 g/kg 投与群、タンニン酸 0.2 及び 1.0 g/kg 投与群では対照群に比べ有意に高かった。一方、糞中へのミネラル排泄量については、対照群に比べ、Polyphenon 1.0 g/kg 投与群の見かけの Ca 排泄率及びタンニン酸 1.0 g/kg 投与群での Ca 排泄量が有意に増加し、タンニン酸 0.1 g/kg 投与群で見かけの Fe 排泄率が有意に減少した以外には、有意な変動は認められなかった。

以上の結果より、高用量の茶ポリフェノール及びタンニン酸投与時には、ラットの脂質代謝に何らかの影響のあることが推察された。また、茶ポリフェノール及びタンニン酸には用量非依存的に中性ステロイド及び胆汁酸代謝に影響を及ぼしたが、茶ポリフェノールとタンニン酸とでは、糞中ステロイド排泄に及ぼす影響の機序が異なると考えられた。さらに、同時投与でない限りにおいては、茶ポリフェノール及びタンニン酸は、肝臓ミネラル含量や糞中ミネラル排泄量に顕著な影響を及ぼさず、ラットのミネラル吸収に大きな影響を与えないことが推察された。

従って、通常の量を摂取する限り茶ポリフェノールに有害な影響があるとはいえない、と思われる。しかし、ポリフェノールについては、その種類や代謝、生理作用等、未解明な部分が少なくなく、今後の研究が望まれる。

【研究目的】

ポリフェノールは植物の二次代謝産物として多種にわたり普遍的に存在する物質であり、ヒトや動物の食餌中に必ず存在する¹⁾。単純フェノール誘導体、フェニルプロパノイド誘導体やフラボノイドのように分子量の小さいものから分子量が 30,000 Da を越えるタンニン（加水分解性タンニン、縮合性タンニン）まで多種多様なものがあり、食品では穀類、豆類、種実類、野菜、果物、ジュース類、茶、コーヒー、ココア、ワイン、ビール等の嗜好飲料中に多く含まれている^{1,2)}。

ポリフェノールの一種であるタンニンに、経口投与時にタンパク質、ミネラル、ある種のビタミン吸収阻害作用、生長抑制作用、肝細胞壊死作用、腹腔内投与時にメトヘモグロビン血症惹起作用等の毒性が報告されていることより^{4,5)}、ポリフェノールは従来は非栄養素として考えられてきた¹⁾。しかし、近年になって、ポリフェノールに抗酸化作用、抗

癌作用, 心臓血管系の病気の治療・予防に有用な作用のあること等が報告されるようになり^{1,2,5,9-24)}, 機能性食品素材として注目されるようになってきた²⁵⁻²⁷⁾. 業界団体である (財) 日本健康・栄養食品協会の健康食品自主規格基準品目²⁸⁾は 2000 年 3 月 15 日現在で 47 品目であり, このうちポリフェノールの利用を明記されている食品は緑茶加工食品である²⁹⁾. しかし, 近年の健康及び老化予防への関心の増大とともにポリフェノールの利用はますます増大することが考えられる.

ポリフェノールは多岐にわたる化合物群であり, 未だに同定されていないもの, 生理作用の明らかでないものも多くない³⁾と考えられる. 食品中のポリフェノールの含量は分析法により大きく異なるものがあり³⁰⁾, 実際のポリフェノール摂取量は不明である³¹⁾.

今年度はポリフェノールのうち, 日本人が古くから飲用しかつ抗癌作用等有用な作用が報告され^{12,14,15,17,24)}近年注目されている緑茶ポリフェノールと, タンニンのうち様々な植物に含まれ³²⁾最もよく知られたタンニン酸 (加水分解性タンニン) の 2 種を選択し, 様々な用量でラットに投与し, 抗心臓血管病作用に関連の深い抗酸化能及び広くは研究されていない³⁾脂質代謝に及ぼす影響を調べ, 併せてミネラル排泄に及ぼす影響についても検討し, これらの物質の安全性に関する考察を行った.

【研究方法】

試薬・機器・使用動物

1) 試薬・機器

ラットへの投与試料として用いた緑茶ポリフェノール, 商品名 Polyphenon-100 (Lot No. 99A26, カテキン含量 80%以上)はフナコシ (東京, 日本) より, タンニン酸 (化学用) は和光純薬工業 (大阪, 日本) より購入した. 添付された資料による Polyphenon-100 の組成 (重量比) は, (-)-epicatechin (EC) 9.4%, (-)-epigallocatechin (EGC) 13.4%, (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) 53.9%, (-)-epicatechin gallate (ECG) 1.7%, (-)-gallocatechin gallate (GCG) 2.9%, (-)-catechin gallate (CG) 0.0%, 合計 81.3%である. これら 6 種化合物の化学構造式を Figure 1 に示す.

コレステロール (cholest-5-en-3 β -ol), 5 α -コレスタン, 5 β -コラン酸, リトコール酸 (LCA; 3 α -hydroxy-5 β -cholanolic acid), デオキシコール酸 (DCA; 3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholanolic acid), ケノデオキシコール酸 (CDCA, 3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholanolic acid), ヒオデオキシコール酸 (HDCA; 3 α ,6 α -dihydroxy-5 β -cholanolic acid) 及びコール酸 (CA; 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholanolic acid) は GL サイエンス (東京, 日本) より購入した. コプロスタノン (5 β -cholestan-3-one) は Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入した. コプロスタノール (5 β -cholestan-3 β -ol), ノルデオキシコール酸 (norDCA; 23-nor-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholanolic acid), 5-Cholenic acid 3 β -ol, イソリトコール酸 (ILCA; 3 β -hydroxy-5 β -cholanolic acid), ムロデオキシコール酸 (MDCA; 3 α ,6 β -dihydroxy-5 β -cholanolic acid), 6-ケトリトコール酸 (6KLCA; 3 α -hydroxy-6-oxo-5 β -cholanolic acid), 7-ケトリトコール酸 (7KLCA; 3 α -hydroxy-7-oxo-5 β -cholanolic acid), 12-ケトリトコール酸 (12KLCA; 3 α -hydroxy-12-oxo-5 β -cholanolic acid), α -ムリコール酸 (α MCA; 3 α ,6 β ,7 α

-trihydroxy-5 β -cholic acid), β -ムリコール酸 (β MCA; 3 α ,6 β ,7 β -trihydroxy-5 β -cholic acid), ω -ムリコール酸 (ω MCA; 3 α ,6 α ,7 β -trihydroxy-5 β -cholic acid), 7-ケトデオキシコール酸 (7KDCA; 3 α ,12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholic acid), 及び 12-ケトケノデオキシコール酸 (12KCDCA; 3 α ,7 α -dihydroxy-12-oxo-5 β -cholic acid) は Steraloids, Inc. (Wilton, NH, U.S.A.)より購入した。GC 分析における誘導体化試薬ヘキサフルオロイソプロパノール及び無水トリフルオロ酢酸は GL サイエンスより購入した。Choloylglycine hydrolase (EC 3.5.1.24, 1500 unit) は Sigma より購入した。

HPLC 用標準品の(-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-gallocatechin gallate (GCG), (-)-catechin gallate (CG), (+)-catechin (C), (-)-gallocatechin (GC)は Extrasynthèse (Gency, France) より購入した。特級ピロガロール (pyrogallol, Py), 生化学用エラグ酸二水和物 (ellagic acid, E), 一級没食子酸一水和物 (gallic acid, G) 及びフラボン (flavone) は和光純薬工業より購入した。1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG)及び 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (TGG)は当所天倉吉章技官を通じて岡山大学薬学部の吉田隆志教授より御供与いただいたものを使用した。

鉄, 亜鉛, 銅, カルシウム標準液 (いずれも 1,000 ppm, 0.1 N HNO₃ 溶液) 及び生化学用コール酸ナトリウムは和光純薬工業より購入した。

アセトニトリル, 酢酸エチル及びメタノールは HPLC 測定用を用いた。硝酸は有害金属測定用を用いた。その他の試薬は試薬特級を用いた。実験ではすべてイオン交換再蒸留水或いは純水を用いた。

市販の臨床検査用キット, コレステロール C II-テストワコー, HDL-コレステロールテストワコー, リン脂質 B-テストワコー, トリグリセライド G-テストワコー, 過酸化脂質テストワコーは和光純薬工業より購入した。

Sep-pak® plus C18 ミニカラムは Waters Corporation (Milford, Massachusetts, U.S.A.)より購入した。ヒューズドシリカキャピラリーカラム DB-210 (0.25 mm IDH 30 m, 膜厚 0.25 μ m or 0.5 μ m) は J&W Scientific (Folsom, CA, U.S.A.) より購入した。HPLC 用カラム STR ODS II (ϕ 4.6 mm \times 250 mm)は信和加工より購入した。

過酸化脂質測定用の褐色試験管及びピペット類は使用前に塩酸で洗浄した。

肝臓の湿式灰化にはホットブロックバス TB-620, 金属測定には京都光研 ICP 発光分析装置 UOP-1 Mark II を用いた。血清及び肝臓中の脂質の測定には U-3210 型吸光光度計 (日立製作所) を用いた。水素炎イオン化検出器 (FID), オートサンプラー AOC-17A, 及びインテグレーター C-R4A 付島津ガスクロマトグラフ GC-14A (京都, 日本)を糞中ステロイド分析に用いた。血清過酸化脂質測定には 650-60 型蛍光光度計 (日立製作所) を用いた。血清ポリフェノール測定には HP 1100 Series (binary pump G1312A + degasser G1322A + autosampler G1329A + thermomitter G1330A + column oven G1316A + diode array detector (DAD) G1315A, Hewlett Packard 社)を用いた。

2) 使用動物

4 週令の Wistar 系雄性ラットを日本クレア (東京, 日本) より購入した。ラットは明暗サイクル 12 時間毎 (7:00 ~ 19:00 明), 温度 23 \pm 1 $^{\circ}$ C, 湿度 55 \pm 5%の動物舎で, 5 頭ずつ金網ケージにて集団飼育した。ラットは実験期間中市販 F-2 固形飼料 (船橋農場, 千葉)及び水を自由摂取させた。体重 122-149 g のラットを実験に用い, 各実験において 1 群 5 匹

ずつとした。

3) 投与試料

Polyphenon-100 (以下 Polyphenon と略す) 及びタンニン酸は脱イオン蒸留水に溶解し、0.01-1.0 g/10 ml の投与試料を用時調製した。いずれも実験中は同一ロットのものを使用した。

実験方法

1) 動物実験

実験 1 では Polyphenon を 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 及び 1.0 g/kg の用量で 23 日間胃ゾンデにて 1 日 1 回強制経口投与した。実験 2 ではタンニン酸を 0.1, 0.2, 0.5 及び 1.0 g/kg の用量で 23 日間胃ゾンデにて 1 日 1 回強制経口投与した。各試料は全て毎日 10:00 から 12:00 の間に投与した。対照群のラットには脱イオン蒸留水を 10 mL/kg 体重経口投与した。18-20 日目にラットを代謝ケージに入れ糞及び尿を採取した。ラットは 22-23 日目に一晩絶食させた。23 日目にジエチルエーテル麻酔下で心臓より採血し、放血後心臓を速やかに摘出した。

血清及び肝臓は、分析時まで -20°C 以下で冷蔵保存した。

2) 分析法

2-1) 血清・肝臓脂質及び血清過酸化脂質の分析

血清総コレステロール、HDL-コレステロール、遊離脂肪酸、リン脂質及びトリグリセライド、過酸化脂質を市販のキットで測定した。

約 1 g の肝臓を精秤し、50 倍量のクロロホルム/メタノール混液 (2:1, v/v) を用い 10,000 回転で 3 分間ホモジナイズし、濾過した。よく混合した濾液(脂質抽出液)50-100 μL を 10%コール酸ナトリウム溶液 0.1 mL と混合し、窒素気流下で減圧乾固した。残渣中の総コレステロール、トリグリセライド及びリン脂質を市販キットを用いて分析した。

2-2) 糞中ステロイド分析

採取した糞は 60°C で一晩乾燥し、粉砕した。糞中中性ステロイド及び胆汁酸を Grundy ら³²⁾及び Setchell ら³³⁾の方法の改良法で分析した。

約 0.2 g の糞乾燥試料を精秤し、 5α -コレスタン、 5β -コラン酸及び norDCA を内部標準として加えた。糞中の脂質をエタノールで 2 回次いでクロロホルム/メタノール混液 (2:1, v/v) で 2 回超音波をかけ次いで還流して抽出した。クロロホルム/メタノール画分及びエタノール画分を併せ減圧乾固した。 70°C にて 2 時間メタノール含有水酸化カリウムで鹸化した後、中性ステロイドを *n*-ヘキサンで抽出した。*n*-ヘキサン画分のコレステロール、コプロスタノール及びコプロスタノン³⁴⁾を 5α -コレスタンを内部標準として GC-FID で分析した。

鹸化後の水層からメタノールを除去した後、リン酸で中和し、予めメタノール及び水で洗浄した Sep-pak® plus C18 ミニカートリッジに負荷した³⁵⁾。カラムを水で洗浄した後メタノールで胆汁酸を溶出した。溶出液を減圧乾固し、メタノール 2 mL に溶解し、遊離胆汁酸測定及び総胆汁酸 (遊離型及び抱合型) 測定のため二分した。遊離型胆汁酸測定のため、メタノールを除去し残渣を 2 N HCl に懸濁させ、胆汁酸をジエチルエーテルで 3 回抽出した。総胆汁酸測定のため、メタノールを除去し、choloylglycine hydrolase (EC 3.5.1.24)

で抱合型胆汁酸を脱抱合した³⁵⁾。HCl で酸性にした後胆汁酸をジエチルエーテルで3回抽出し、胆汁酸のヘキサフルオロイソプロピルエーテル-トリフルオロ酢酸(HFIP-TFA)誘導体を作成した³⁶⁾。5 β -コラン酸及びnorDCAを内部標準として胆汁酸のHFIP-TFA誘導体をGC-FIDで定量した。

2-3) 血清ポリフェノール分析

酵素加水分解を行う³⁷⁾(加水分解)或いは行わない(加水分解なし)の2方法で血清ポリフェノールの分析を行った。

加水分解を行わない場合：血清0.5 mLに内部標準としてフラボン18.9 nmolを添加し、さらに0.5 M塩酸1 mL及びメタノール1 mLを加えボルテックスミキサーで30秒間攪拌した。酢酸エチル4 mLを加え2分間振とう抽出し、有機層(上層)を分取した。同じ操作をもう1回繰り返す。遠心分離後有機層を合わせ40 $^{\circ}$ C以下で減圧乾固した後、メタノール2 mLに溶解しHPLC用試験液とした。

加水分解を行う場合：血清0.5 mLに内部標準としてフラボン18.9 nmolを添加し、0.1 Mリン酸緩衝液(pH5.0)2 mL, 2%アスコルビン酸/EDTA-Na溶液100 μ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間酵素加水分解を行った。メタノール1 mL及び0.5 M塩酸1 mLを加え、上述のようにポリフェノールを抽出し、HPLC用試験液を調製した。

2-4) 肝臓及び糞中ミネラルの分析

肝臓及び糞中ミネラルは既報³⁸⁾に基づき分析した。即ち、肝臓約0.5 g或いは糞0.1 gを精秤し、硝酸及び少量の過酸化水素水により湿式灰化した。硝酸濃度が5%になるように純水で100 mLに定容し、ICP発光分析(ICP-AES)用試料液とした。

2-5) 糞中ステロイド分析のGC条件

中性ステロイド分析のためのGC条件は以下の通りである。

カラム, DB-210 (0.25 mm \times 15 m, 膜厚 0.25 μ m); キャリアガス, He 1.5 mL/min; カラム温度, 60 $^{\circ}$ C(2 min) \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 180 $^{\circ}$ C \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 230 $^{\circ}$ C; 注入口及び検出器温度, 250 $^{\circ}$ C; 検出器, FID; 試料導入法, splitless; 注入量, 2 μ L.

胆汁酸分析のためのGC条件は以下の通りである。

カラム, DB-210 (0.25 mm \times 15 m, 膜厚 0.50 μ m); キャリアガス, He 1.5 mL/min; カラム温度, 60 $^{\circ}$ C(2 min) \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 235 $^{\circ}$ C; 注入口及び検出器温度, 250 $^{\circ}$ C; 検出器, FID; 試料導入法, splitless; 注入量, 2 μ L.

2-6) 血清中フラボノイド分析のHPLC条件

血清フラボノイド分析のためのHPLC条件は以下の通りである。

カラム, STR ODS II; カラム温度, 35 $^{\circ}$ C; 移動相, (A液) 水:リン酸 1000:1 (v/v), (B液) 水:アセトニトリル:リン酸 200:800:1 (v/v/v); グラジエントプログラム, B液 % 0 (0 min) \rightarrow 15 (5 min) \rightarrow 40 (30 min) \rightarrow 100 (40-55 min) \rightarrow 0 (56 min); 流速, 1 mL/min; 検出, DAD (210-370 nm); モニター波長, 210 nm, 260 nm, 280 nm; 注入量, 10 μ L.

Pyrogallol, GC, EGC及びellagic acidはOD260 nmで, gallic acid, C, EC, EGCG, GCG, CG, PGG, TGG, ECG及びflavoneはOD280 nmで定量した。ピークの同定は内部標準flavoneとの保持時間比及びポリフェノール標準液とのスペクトル(210-450 nm)比較により行った。

2-7) 肝臓及び糞中ミネラル分析のICP-AES条件

肝臓及び糞試料液中のミネラル測定のための分析条件は以下の通りである。

機器, 京都光研 ICP 発光分析装置 UOP-I Mark II ; RF generator, 1.0 kW, 27.12 MHz ; アルゴンガス流量, プラズマガス 13.0 L/min, 補助ガス 0.6 L/min, ネブライザーガス 0.38 L/min ; 測光高さ, 10 mm, 積分時間, 5 sec × 3 回 ; 分析波長, Ca II 393.366 nm, Fe II 259.940 nm, Cu I 324.754 nm, Zn II 202.548 nm.

3) 統計処理

測定値はすべて平均値 ±SE で示した. 統計処理は "StatLight シリーズ" (ユックムス社) を用いて行った. 各データについて 1-way ANOVA 次いで Dunnett の多重比較検定を行い, 対照群に対して $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した. 用量依存性の解析は回帰分析で行った.

【研究結果】

1) ラットの体重変化, 肝臓相対重量, 食餌摂取量, 糞乾燥重量

Polyphenon 0.5 及び 1.0 g/kg 投与ラット並びにタンニン酸 0.1-1.0 g/kg 投与ラットの糞は肉眼的に他群のラットに比べ黒色に着色していた. また, Polyphenon 0.5 及び 1.0 g/kg 投与ラット並びにタンニン酸 0.2-1.0 g/kg 投与ラットの尿は肉眼的に他群のラットに比べレモン色或いは黄色に着色していた.

ラットの 22 日間の体重増加量, 肝臓相対重量, 食餌摂取量及び糞乾燥重量を Table 1 に示す. 対照群に比べて有意な体重増加抑制は Polyphenon 0.5 g/kg 及びタンニン酸投与ラットで認められた. 肝臓相対重量の有意な低下は Polyphenon, タンニン酸各 0.5 g/kg 投与ラットにのみ認められた. Polyphenon, タンニン酸ともに, 食餌摂取量, 糞乾燥重量及び尿排泄量には有意な影響を及ぼさなかった.

2) 血清及び肝臓中の脂質濃度

投与開始 23 日目の一晩絶食ラットの血清及び肝臓脂質濃度を Tables 2-3 に示す.

Polyphenon 投与時には対照群のラットに比べ, 血清 HDL-コレステロール濃度が 0.2-1.0 g/kg 投与ラットで有意に低く, 肝臓トリグリセライド濃度が 0.5-1.0 g/kg 投与ラットで有意に高かった (Table 2). 血清総コレステロール, トリグリセライド及びリン脂質濃度, 肝臓総コレステロール及びリン脂質濃度には Polyphenon 投与による有意な影響は認められなかった.

タンニン酸投与時には対照群のラットに比べ, 肝臓中トリグリセライド濃度が 0.1, 0.2 及び 1.0 g/kg 投与ラットで, 肝臓中リン脂質濃度が 0.5 g/kg 投与ラットでそれぞれ有意に高かった (Table 3). 血清総コレステロール, HDL-コレステロール, トリグリセライド及びリン脂質濃度, 肝臓総コレステロール濃度にはタンニン酸投与による有意な影響は認められなかった.

3) 血清 TBARS 値及び血清ポリフェノール濃度

投与開始 23 日目の一晩絶食ラットの血清 TBARS 値は Tables 2-3 に示した通りである.

Polyphenon 投与時には, 1 g/kg 投与ラットでのみ対照群のラットに比べ有意に TBARS

値が低下した (Table 2) . ラットの血清からはカテキン類は全く検出されなかった.

タンニン酸投与時には, 0.1 g/kg 以上の投与量でいずれも対照群のラットより TBARS 値が低下した (Table 3) . TBARS 値はタンニン酸投与量が高いほど低い傾向があった (r^2 0.5944, $p < 0.001$) . しかし, タンニン酸の代謝物と報告³⁹⁾されている gallic acid (G), ellagic acid (E) 及び pyrogallol (Py) (Figure 2) は全く検出されなかった.

4) 糞中ステロイド排泄量

投与開始 18-20 日目のラットの糞中への中性ステロイド及び胆汁酸排泄量を Tables 4-7 に示す.

Polyphenon を投与した場合, 中性ステロイド総排泄量は 1.0 g/kg 投与ラットでのみ対照群のラットに比べ有意に増加した (Table 4). 糞中中性ステロイドの組成については, 0.05, 0.1 及び 0.2 g/kg 投与群のラットでは cholesterol の有意な増加及び coprostanol の有意な減少を反映して coprostanol/cholesterol 比が対照群のラットに比べて有意に低下した. 1.0 g/kg 投与群のラットでは coprostanone の排泄が有意に増加したが, 投与量が 0.5-1.0 g/kg になると coprostanol/cholesterol 比の対照群に対する有意な変動は認められなかった (Table 4).

一方, 胆汁酸総排泄量については, Polyphenon 投与による有意な影響は認められなかった (Table 5). 胆汁酸組成については, 0.05, 0.2 及び 0.5 g/kg 投与群のラットで, CA 系胆汁酸の IDCA 及び 12KLCA の有意な減少を反映して対照群に比べ CA 系胆汁酸 / CDCA 系胆汁酸比 (CA/CDCA 比) が有意に低下した. また, 0.1 g/kg 投与群のラットでは β -MCA の有意な増加及び HDCA の有意な減少を反映して, 一次胆汁酸の割合が対照群のラットに比べ有意に高くなった (Table 5).

タンニン酸を投与した場合, 中性ステロイド総排泄量は 1.0 g/kg 投与ラットでのみ対照群のラットに比べ有意に増加した (Table 6). 糞中中性ステロイドの組成については, 0.5 及び 1.0 g/kg 投与群のラットでのみ対照群のラットに比べ cholesterol の有意な増加及び coprostanol の有意な減少が認められ, 0.5 g/kg 投与群のラットでは対照群のラットに比べ coprostanol/cholesterol 比が有意に低下した (Table 6). Coprostanone 排泄についてはタンニン酸投与による有意な影響は認められなかった (Table 6).

一方, 胆汁酸総排泄量は 0.2 g/kg 投与群のラットでのみ対照群のラットに比べ有意に増加した (Table 7). 胆汁酸組成については, 0.1 g/kg 投与群のラットで CA 系胆汁酸の IDCA の有意な減少及び CDCA 系胆汁酸の有意な増加を反映し, また 0.5 g/kg 投与群のラットで CA 系胆汁酸の IDCA 及び 12KLCA の有意な減少を反映し, それぞれ対照群に比べ CA/CDCA 比が有意に低下した. 一次胆汁酸の割合については, タンニン酸投与による有意な変動は認められなかった (Table 7).

5) 肝臓ミネラル濃度

肝臓中 Fe, Cu 及び Zn 濃度を Table 8 に示す. 肝臓中の Fe 濃度は Polyphenon 0.5 g/kg 投与ラット及びタンニン酸 0.2, 1.0 g/kg 投与ラットで対照群に比べ有意に高かった. 肝臓中 Cu 及び Zn 濃度については, Polyphenon 及びタンニン酸投与による有意な影響は認められなかった.

6) 糞中へのミネラル排泄量

糞中へのミネラル排泄量を Tables 9-10 に示す。

F-2 固形飼料中のミネラル含量は Ca $113.4 \pm 8.9 \mu\text{g/g}$, Fe $1.776 \pm 0.216 \mu\text{g/g}$, Zn $0.341 \pm 0.046 \mu\text{g/g}$, Cu $0.125 \pm 0.027 \mu\text{g/g}$ であった (5 試行の平均 \pm SD)。投与物の Polyphenon 及びタンニン酸中の Ca 含量はそれぞれ $4.768 \pm 0.322 \mu\text{g/g}$, $0.182 \pm 0.055 \mu\text{g/g}$ であった (5 試行の平均 \pm SD) が, Fe, Zn, Cu はいずれも検出されなかった。また, ラットが摂取したミネラルは 99.9%以上が飼料由来であった。

Polyphenon 投与ラットの投与後 18-20 日間の糞中への Ca, Fe, Zn, Cu 排泄量はいずれの投与群でも対照群に比べて有意な変動は認められなかった (Table 9)。見かけの排泄率 (排泄量/摂取量 $\times 100$ [%]) は, 1.0 g/kg 投与群のラットの Ca のみが対照群のラットに比べて有意に高かった以外は, 有意差は認められなかった (Table 9)。

タンニン酸投与ラットの投与後 18-20 日間の糞中への Ca, Fe, Zn, Cu 排泄量は, 1.0 g/kg 投与ラットの Ca 排泄量が対照群に比べて有意に高かった以外は, タンニン酸投与による有意な影響は認められなかった (Table 10)。見かけの排泄率 (排泄量/摂取量 $\times 100$ [%]) は, 0.1 g/kg 投与群のラットの Fe のみが対照群のラットに比べて有意に低かった (Table 10)。

【考察】

茶ポリフェノールやタンニン酸の代謝に関する報告は非常に少ない。茶ポリフェノールの代謝に関して, Pietta ら⁴⁰⁾は, ヒトに epigallocatechin gallate (EGCG) 400 mg に相当する緑茶カテキンを飲用させると血中 EGCG は投与 2 時間後に最大になり, その後漸減すると報告している。Piskula ら⁴¹⁾はラットに (-)-epicatechin gallate (EC) $172 \mu\text{mol/kg}$ をラットに経口投与してその吸収を調べ, EC は腸管粘膜でグルクロン酸抱合され殆どがグルクロン酸抱合体として血流に入り, 肝臓で硫酸抱合されさらに肝臓及び腎臓でメチル化されると報告している。一方, タンニン酸の代謝について, Potter ら⁴²⁾はニワトリにタンニン酸 0.5 g を 12 時間毎に 2 回経口投与すると, 尿中にゴール酸 (gallic acid, G), 4-O-メチルゴール酸 (4-O-methyl gallic acid, 4OMG), ピロガロール (pyrogallol, Py) が排泄されることを示した。Plumlee ら⁴³⁾は子牛にタンニン酸を投与した場合, 血清及び尿中に Py が検出されることを報告している。また, Zhu らはヒツジにタンニン酸を臍胃内に投与した場合タンニン酸は臍胃内で一部が G, Py 及び E に代謝され, 結晶中で GA, 4OMG, E 及びタンニン酸が検出され尿中へは G, Py, 4OMG が排泄されること^{39,44)}, 血漿中のタンニン酸濃度と肝臓壊死との間に正の相関のあること⁴⁵⁾を示している。

茶カテキン類のコレステロール低下作用に関する報告に比べ, タンニン酸についての報告は殆どない。Kono ら⁴⁵⁾は, 1991-1992 年に 49-55 歳の 2,062 名の男性自衛官を対象とした疫学調査で, 緑茶の飲用は血清総及び LDL-コレステロール濃度と負の相関があるが HDL-コレステロール及びトリグリセライド濃度とは相関のないことを示した。一方 Princen ら⁴⁶⁾は緑茶及び紅茶の飲用は喫煙者の血漿脂質及び抗酸化物質濃度と LDL 酸化に影響を及ぼさないことを示している。動物実験では, 高脂肪食或いは高コレステロール食

を摂取させたラット⁴⁷⁻⁵¹⁾、マウス⁵²⁾及びハムスター⁵³⁾で血中コレステロール或いは脂質濃度を低下させ、ハムスターの糞中へ中性ステロイド及び胆汁酸排泄を増加させる⁵³⁾ことが報告されている。その作用機構としては茶カテキン類がコレステロール吸収を抑制する⁴⁷⁻⁵¹⁾ためとされている。普通食を摂食させたラットについても、Valsaらはラットにカテキンを投与し、カテキンのコレステロール低下作用は10 mg/kg投与で最大で中性ステロイド及び胆汁酸排泄量が増加すること⁵⁴⁾、カテキンがコレステロールと結合してコレステロールの吸収を抑制し腸管でのコレステロール産生を増大させること⁵⁵⁾を報告している。一方、タンニン酸に関しては、Yugaraniら^{31,56)}が高脂肪食を摂取させたラットでは血清及び肝臓脂質濃度を有意に低下させたと報告している。

これらの報告は殆どが高脂肪食を摂取させたラットに100 mg/kgまでの低用量を投与した場合であり、普通食を投与した場合や高用量を投与した場合にどうなるかについての報告は殆ど見あたらない。本研究では、普通食を投与したラットに1 g/kgの高用量までの様々な投与量の茶ポリフェノールとタンニン酸を強制経口投与して実験を行った。

本研究で用いた茶ポリフェノール Polyphenon-100 中のカテキン含量はHPLCで測定したところ、重量比でGC 0.35%, EGC 13.34%, C 3.31%, EC 11.21%, EGCG 52.77%, GCG 3.73%, ECG 2.88%, 合計 88.81%であり、添付された資料と同等以上であった。一方、タンニン酸はさまざまな加水分解性タンニンの混合物である⁵⁷⁾が、本研究で使用したタンニン酸には成文の記載はなかった。HPLCで分析したところ成分不明の多数のピークが認められ、Gの含量は0.19%, PGA及びTGAの含量はPGAとして0.17%であった。即ち、いずれもポリフェノール混合物を投与したことになる。Figure 2に、タンニン酸の成分のうちよく知られたPGG及びTGGをタンニン酸の代謝物として報告されているG, Py及び4OMGと併せ示した。

Polyphenon, タンニン酸いずれを投与した場合も食餌摂取量、糞乾燥重量及び尿排泄量には有意な変化は認められなかった。Polyphenonを投与した場合(実験1)、0.5 g/kg投与群でのみ対照群に比べ有意な生長抑制と肝臓相対重量の減少が認められたが、タンニン酸を投与した場合(実験2)は、全てのタンニン酸投与群(0.1 g/kg以上)で有意な生長抑制が認められた(Table 1)。タンニン酸は5%までの含量の食事をラットに摂取させても無毒⁵⁸⁾とされているが、本実験で用いたタンニン酸の組成はこの報告とは異なる可能性が推定された。

本実験では糞中及び尿中のポリフェノールは測定していないが、肉眼的にPolyphenon 0.5及び1.0 g/kg投与ラット並びにタンニン酸0.1-1.0 g/kg投与ラットの糞は他群のラットに比べ黒色に、また、Polyphenon 0.5及び1.0 g/kg投与ラット並びにタンニン酸0.2-1.0 g/kg投与ラットの尿がレモン色或いは黄色に着色していたことより、Polyphenon, タンニン酸のいずれも一部はラット体内に吸収されて代謝され腎臓より排泄され、一部は吸収されずにそのまま糞中に排泄される可能性が考えられる。

血清及び肝臓脂質濃度について、Polyphenon投与時には対照群のラットに比べ、血清HDL-コレステロール濃度が0.2-1.0 g/kg投与ラットで有意に低く、肝臓トリグリセライド濃度が0.5及び1.0 g/kg投与ラットで有意に高かった(Table 2)。また、タンニン酸投与時には対照群のラットに比べ、肝臓中トリグリセライド濃度が0.1, 0.2及び1.0 g/kg投与ラットで、肝臓中リン脂質濃度が0.5 g/kg投与ラットでそれぞれ有意に高かった(Table 3)こ

とより、高用量の茶ポリフェノール及びタンニン酸投与時には、ラットの脂質代謝に何らかの影響のあることが推察された。

血清からはポリフェノールが全く検出されないのに血清 TBARS が Polyphenon 1.0 g/kg 投与ラット及びタンニン酸 0.1-1.0 g/kg 投与ラットで有意に低下した (Tables 2, 3) のは、血清からは検出されなかった代謝物による抗酸化作用の可能性が考えられる。おそらくその抗酸化能はタンニン酸投与時の方が Polyphenon 投与時より強いものと推察される。

ポリフェノールの糞中ステロイド排泄に及ぼす影響については報告が殆どなく、茶ポリフェノールに関しては Chan ら⁵³⁾及び Valsa ら⁵⁴⁾の報告があるが、タンニン酸に関する報告は見あたらない。

Ikedo ら⁵⁵⁾はコレステロールのミセル溶解度を低下させる作用は EGCG > ECG > EGC, EC の順に弱くなり、EGCG, EGC のようなボール酸エステルの方がコレステロール吸収抑制作用の強いことを示している。本研究では Valsa ら⁵⁴⁾の報告とは異なり、Polyphenon 10 mg/kg 投与ではステロイド排泄量の増加は認められなかった (Tables 4, 5) が、これは投与した茶ポリフェノール組成の違いによる可能性が考えられる。Polyphenon 投与時には、中性ステロイド排泄量 1.0 g/kg 投与群で対照群に比べ有意に増加した (Table 4) が、胆汁酸排泄量には有意な変動が認められなかった (Table 5)。糞中ステロイド組成については用量非依存的な変化が認められ、対照群に比べ、Cp/Ch 比は 0.05, 0.1 及び 0.2 g/kg 投与群で、CDCACA/CDCA 比は 0.05, 0.2 及び 0.5 g/kg 投与群でそれぞれ有意に低下し、一次胆汁酸の割合は 0.2 g/kg 投与群でのみ有意に増加した (Tables 4, 5)。この結果より、茶ポリフェノール或いはその代謝物が腸内細菌叢に影響を与えたために中性ステロイド及び胆汁酸代謝に変動があったこと、及び、茶ポリフェノールは大量投与では中性ステロイド排泄量を増加させるが胆汁酸排泄量には影響しないことが示唆された。

タンニン酸を投与した場合 (実験 2) は対照群に比べ、中性ステロイド排泄量 1.0 g/kg 投与群で、胆汁酸排泄量は 0.2 g/kg 投与群でそれぞれ有意に増加した (Tables 6, 7)。組成については、Polyphenon 投与時ほど顕著な用量非依存的な変化はなく、糞中の Cp/Ch 比は 0.5 g/kg 投与群で、CA/CDCA 比は 0.1 及び 0.2 g/kg 投与群で対照群に比べて有意に低下した (Tables 6, 7)。胆汁酸排泄量は 0.2 g/kg までは投与量が増加すると排泄量も増加する傾向があったが、0.5 g/kg 以上の投与量になるとかえって減少した (Table 7) が、この理由は不明である。腸管内に存在するタンニン酸が胆汁酸を取り込んで不溶化し、分析できなかった可能性もある。この結果より、タンニン酸或いはその代謝物は腸内細菌叢に影響を与えて中性ステロイド及び胆汁酸代謝を変動させること、大量投与では中性ステロイド排泄量を増加させるが胆汁酸排泄量のかえって抑制する傾向があることが示唆された。また、茶ポリフェノールとタンニン酸とでは、糞中ステロイド排泄に及ぼす影響の機序が異なると考えられる。

タンニンにはタンパク質と結合する^{1,5,6,9-11,58)}以外に Fe 等のミネラルと複合体を形成する^{1,5,9,10)}作用がある。ミネラルの吸収抑制作用は茶ポリフェノールやワインポリフェノール等様々なポリフェノールについて報告されている^{1,5,9,10,59,60)}が、Fe の吸収には影響しないとする報告もある^{1,60,61)}。本研究では肝臓中のミネラル含量や糞中へのミネラル排泄量を測定することにより、茶ポリフェノールやタンニン酸がミネラル吸収にどの程度影響するかを調べた。

肝臓中のミネラル含量について、Cu, Znについてはポリフェノール投与に対する有意な影響は全く認められなかった (Table 8) . Fe 含量はポリフェノール投与群でむしろ増加する傾向があり, Polyphenon 0.5 g/kg 投与群, タンニン酸 0.2 及び 1.0 g/kg 投与群では対照群に比べ有意に高かった (Table 8) . 一方, 糞中へのミネラル排泄量については, 対照群に比べ, Polyphenon 1.0 g/kg 投与群の見かけの Ca 排泄率及びタンニン酸 1.0 g/kg 投与群での Ca 排泄量が有意に増加し (Tables 9, 10) , タンニン酸 0.1 g/kg 投与群で見かけの Fe 排泄率が有意に減少した (Table 9) 以外は, 有意な変動は認められなかった. 本研究においてミネラルは 99.9%以上が飼料由来で投与試料に含まれるミネラルの影響はないと考えてよく, さらに投与試料は飼料とは別に単独で投与した. 即ち Tables 8-10 はポリフェノールとミネラルの同時投与による結果ではない. 従って, 同時投与でない限りにおいては, 茶ポリフェノール及びタンニン酸は, 肝臓ミネラル含量や糞中ミネラル排泄量に顕著な影響を及ぼさず, ラットのミネラル吸収に大きな影響を与えないことが推察された.

以上の結果より, タンニン酸は 0.1 g/kg 以上の投与量でラットの生長抑制作用を示したが, 茶ポリフェノールは 0.5 g/kg 以上の摂取量でラットの生長を抑制する傾向が認められた. また, 本研究により, 茶ポリフェノール及びタンニン酸には用量非依存的に中性ステロイド及び胆汁酸代謝に影響を及ぼすことが明らかになった. さらに, 茶ポリフェノール及びタンニン酸は同時摂取しない限りミネラル吸収に顕著な影響を与えないことが推察された.

ヒトでのポリフェノール摂取量は現在のところ明らかではない⁶³⁾が, 茶ポリフェノール摂取量は他のフラボノイド摂取量⁶²⁻⁶⁴⁾から類推して数十 mg / 日と考えられる. ラットの生長を抑制する傾向の認められた polyphenon 0.5 g/kg 以上という投与量は, 非生理的な量と考えられる. 従って, 通常の量を摂取する限り茶ポリフェノールに有害な影響があるとはいえない, と思われる.

ポリフェノールについては, その種類や代謝, 生理作用等, 未解明な部分が少なくない. さらなる研究が望まれる.

【謝辞】

1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG)及び 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (TGG) を御供与くださった岡山大学薬学部の吉田隆志教授に深謝する.

【引用文献】

- 1) L. Bravo: Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333 (1998).
- 2) F. Shahidi ed. (1997): "Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications" 414pp., AOCS Press, Champaign, Illinois, U.S.A.
- 3) A. King and G. Young: Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am.*

Diet. Assoc., **99**, 213-218 (1999).

- 4) Z. Glick and M. A. Joslyn: Effect of tannic acid and related compounds on the absorption and utilization of proteins in the rat. *J. Nutr.*, **100**, 516-520 (1970).
- 5) V. L. Singleton: Naturally occurring food toxicants: Phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv. Food Res.*, **27**, 149-242 (1981).
- 6) P. G. Waterman: Tannins and plant-animal interaction. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **280**, 77-91 (1988).
- 7) J. Shu and J. Filippich: Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Res. Vet. Sci.*, **53**, 280-292 (1992).
- 8) J. D. Reed: Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.*, **73**, 1516-1528 (1995).
- 9) K.-T. Chung, T. Y. Wong, C.-I. Wei, Y.-W. Huang and Y. Lin: Tannins and human health: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **38**, 421-464 (1998).
- 10) D. K. Salunkhe, S. J. Jadhav, S. S. Kadam and J. K. Chavan: Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **17**, 277-305 (1982).
- 11) E. Haslam, T. H. Lilley, Y. Cai, R. Martin and D. Magnolato: Traditional herbal medicines—the role of polyphenols. *Planta Med.*, **55**, 1-8 (1989).
- 12) A. Komori, J. Yatsunami, S. Okabe, S. Abe, K. Hara, M. Suganuma, S.-J. Kim and H. Fujiki: Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **23**, 186-190 (1993).
- 13) G. D. Stoner and Hasan Mukhtar: Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell. Biochem.*, **Suppl. 22**, 169-180 (1995).
- 14) T. Yamane, H. Nakatani, N. Kitaoka, H. Matsumoto, Y. Iwata, Y. Kitao, K. Oya and T. Takahashi: Inhibitory effects and toxicity of green tea polyphenols for gastrointestinal carcinogenesis. *Cancer*, **77**, 1662-1667 (1996).
- 15) M. Serafini, A. Ghiselli and A. Ferro-Luzzi: *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **50**, 28-32 (1996).
- 16) E. Haslam: Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.*, **59**, 205-215 (1996).
- 17) L. B. M. Tijburg, S. A. Wiswman, G. W. Meijer and J. A. Weststrate: Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis*, **135**, 37-47 (1997).
- 18) T. Hayak, B. Fuhrman, J. Vaya, M. Rosenblat, P. Belinky, R. Coleman, A. Elis and M. Aviram: Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 2744-2752 (1997).
- 19) J. Zhao, J. Wang, Y. Chen and R. Agarwal: Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis*, **20**, 1737-1745 (1999).

- 20) Di Stefano R.: Advances in the study of secondary metabolites occurring in grapes and wines. *Drugs Exptl. Clin. Res.*, **25**, 53-56 (1999).
- 21) T. Koga, K. Mori, K. Nakamori, J. Yamakochi, H. Hosoyama, S. Kataoka and T. Ariga: Increase of antioxidant potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1892-1897 (1999).
- 22) E. González de Mejía, E. Castaño-Tostado and G. Loarca-Piña: Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutat. Res.*, **441**, 1-9 (1999).
- 23) F. Ursini, F. Tubaro, J. Rong and A. Sevanian: Optimization of nutrition: Polyphenols and vascular protection. *Nutr. Rev.*, **57**, 241-249 (1999).
- 24) Second International Scientific Symposium on Tea and Human Health. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **220**, 194-275 (1999).
- 25) 酒井重男：機能性食品の開発の現状。食品工業，1999-2.28., 62-73 (1999).
- 26) A. T. Diplock, J.-L. Charleux, G. Crozier-Willi, F. J. Kok, C. Rice-Evans, M. Roberfroid, W. Stahl and J. Viña-Ribes: Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Brit. J. Nutr.*, **80**, S77-S112 (1998).
- 27) 吉川敏一監修 (1999)：「老化予防食品の開発」413pp., シーエムシー，東京。
- 28) 池上幸江：特定保健用食品・健康食品の意義と問題。日本薬剤師会雑誌，50, 187-193 (1998).
- 29) <http://www.health-station.com/jhnfa/>
- 30) S. D. Deshpande, M. Cheryan and D. K. Salunkhe: Tannin analysis of food products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **24**, 401-449.
- 31) T. Yugarani, B. K. H. Teh and N. P. Das: Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. *Lipids*, **27**, 181-186 (1992).
- 32) S. M. Grundy, E. H. Ahrens Jr. and T. A. Miettinen: Quantitative isolation and gas chromatographic analysis of total fecal bile acids. *J. Lipid Res.* **6**, 397-410 (1965).
- 33) K. D. R. Setchell, A. M. Lawson, N. Tanida and J. Sjövall: General methods for the analysis of metabolic profiles of bile acids and related compounds in feces. *J. Lipid Res.* **24**, 1085-1100 (1983).
- 34) J. O. Whitney and M. M. Thaler: A simple liquid chromatographic method for quantitative extraction of hydrophobic compounds from aqueous solutions. *J. Liquid Chromatogr.* **3**, 545-556 (1980).
- 35) H. Takikawa, H. Otsuka, T. Beppu, Y. Seyama and T. Yamakawa: Quantitative determination of bile acid glucuronides in serum by mass fragmentography. *J. Biochem.* **92**, 985-998 (1982).
- 36) K. Imai and Z. Tamura: Gas chromatography of bile acids as their hexafluoroisopropyl ester-trifluoroacetyl derivatives. *J. Chromatogr.* **120**, 180-186 (1976).
- 37) M. K. Piskula and J. Terao: Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.*, **128**, 1172-1178 (1998).
- 38) 中村優美子，津村ゆかり，外海泰秀，伊藤啓志男：希土類元素の生体影響に関する研究（第4報）4種希土類元素(Dy, Eu, Yb, Y)静脈内投与時のラット臓器内Ca, Mg及びP含量の変動。衛生化学，**39**, 44-55 (1993).

- 39) J. Zhu, J. Ng and L. J. Filippich: Determination of tannic acid and its phenolic metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **577**, 77-85 (1992).
- 40) P. Pietta, P. Simonetti, C. Gardana, A. Brusamoligo, P. Morazzoni and E. Bombardelli: Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **46**, 895-903 (1998).
- 41) M. K. Piskula and J. Terao: Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.*, **128**, 1172-1178 (1998).
- 42) D. K. Potter and H. L. Fuller: Metabolic fate of dietary tannins in chickens. *J. Nutr.*, **96**, 187-191 (1968).
- 43) K. H. Plumlee, B. Johnson and F. D. Galey: Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 263-267 (1998).
- 44) J. Zhu, L. J. Filippich and J. Ng: Ruminal involvement in sheep tannic acid metabolism. *Vet. Human Toxicol.*, **37**, 436-440 (1995).
- 45) S. Kono, K. Shinchi, K. Wakabayashi, S. Honjo, I. Todoroki, Y. Sakurai, K. Imanishi, H. Nishikawa, S. Ogawa and M. Katsurada: Relation of green tea consumption to serum lipids and lipoproteins in Japanese men. *J. Epidemiol.*, **6**, 128-133 (1996).
- 46) H. M. G. Princen, W. von Duyvenvoorde, R. Buytenhek, C. Blonk, L. B. M. Tijburg, J. A. E. Langius, A. E. Meinders and H. Pijl: No effect of consumption of green and black tea on plasma lipid and antioxidant levels and on LDL oxidation in smokers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**, 833-841 (1998).
- 47) 福興眞弓, 原征彦, 村松敬一郎: 茶葉カテキンの構成成分である(-)エピカテキンガレートの血中コレステロール低下作用. 日本栄養・食糧学会誌, **39**, 495-500 (1986).
- 48) T. Chisaka, H. Matsuda, Y. Kubomura, M. Mochizuki, J. Yamahara and H. Fujimura: The effect of crude drugs on experimental hypercholesterolemia: Mode of action of (-)-epigallocatechin gallate in tea leaves. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 227-233 (1988).
- 49) K. Muramatsu, M. Fukuyo and Y. Hara: Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 613-622 (1986).
- 50) N. Matsumoto, K. Okushio and Y. Hara: Effect of tea polyphenols on plasma lipids in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **44**, 337-342 (1998).
- 51) I. Ikeda, Y. Imasato, E. Sasaki, M. Nakayama, H. Nagao, T. Takeo, F. Yamabe and M. Sugano: Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **1127**, 141-146 (1992).
- 52) H. Matsuda, T. Chisaka, Y. Kubomura, J. Yamahara, T. Sawada, H. Fujimura and H. Kumura: Effects of crude drugs on experimental hypercholesterolemia. I. Tea and its active principles. *J. Ethnopharmacology*, **17**, 213-224 (1986).
- 53) P. T. Chan, W. P. Fong, Y. L. Cheung, Y. Huang, W. K. K. Ho and Z.-Y. Chen: Jasmine green tea epicatechins are hypolipidemic in hamsters (*Mesocricetus auratus*) fed a high fat diet. *J. Nutr.*, **129**, 1094-1101 (1999).
- 54) A. K. Valsa, B. Ushakumari and N. P. Vijayalakshmi: Effect of catechin on lipid metabolism.