

## 【考察】

本研究では、ラットに脂肪酸組成を大きく偏らせた脂質含有食を摂取させ、小腸、肝臓および脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子の発現に対する PPAR リガンドとしての脂肪酸の影響について検討を行なった（実験 1、2）。さらに、実験 3 では PPAR リガンドとしての脂肪酸の特徴を評価するために、PPAR に対する脂肪酸リガンド結合性を調べ、さらに PPAR のリガンド結合ドメインのキメラタンパク質発現ベクターを用いたワンハイブリッドアッセイ系を構築し、転写活性化能を調べた。

実験 1 において食餌の摂取量は pair-feeding を行なったため各食餌群の間に差は見られなかったが、副睾丸白色脂肪組織重量は、低脂肪食摂取群に比べ高脂肪食摂取により増大を示した。しかしながら、n-3 系の $\alpha$ リノレン酸を多く含むアマニ油摂取においてその増大は比較的抑制されることが示された。また、アマニ油および n-6 系のリノール酸を多く含むコーン油の摂取は血中脂質濃度（総コレステロール、トリグリセリド）を顕著に低下させた。従来から多くの研究報告にも示されているように、アマニ油や魚油などの n-3 系多価不飽和脂肪酸を多く含む脂質の摂取は体脂肪蓄積や高脂血症などを抑制する効果があるとされる。これらの n-3 系多価不飽和脂肪酸の効果は、脂肪酸合成系の抑制および脂肪酸酸化分解系の亢進を遺伝子転写レベルで強く引き起こすことが原因の一つであると考えられる(10-12)。更に実験 2 よりこれらの作用は、n-3 系脂肪酸だけでなく、通常の食餌からは摂取しにくい少量の n-6 系アラキドン酸の摂取によっても同様に見られることが明らかとなり、n-6 および n-3 の多価不飽和脂肪酸のもつ共通の作用によるものと考えられた。なお、アラキドン酸負荷による本実験飼育条件下では、ラットにエイコサノイド過剰産生に由来する炎症などの異常な症状は特に観察されなかった。しかしながら、アラキドン酸を更に高濃度摂取（アラキドン酸最終含量 10%）させた予備実験においては、ラットの食餌摂取量は極度に低下し、それに伴い体重は実験食摂取開始時より減少した。また、そのラットの解剖時の所見では、小腸湿性重量が増大し、腸管腔内は水分で充満しており、アラキドン酸の大量投与では炎症が引き起こされる可能性が考えられた。

食餌から摂取される脂肪酸は、まず小腸においてその一部が PPAR のリガンドとなり標的遺伝子の発現を制御することが考えられる。著者らは、ラット小腸においては PPAR $\alpha$  および PPAR $\delta$  が顕著に発現していることを報告している(13,14)。さらにコーン油からなる高脂肪食摂取によりラット空腸の PPAR $\alpha$  mRNA 量が増大し、PPAR $\delta$  mRNA 量は減少することを見出している(13,15)。本研究においては、ラット空腸の PPAR $\alpha$  mRNA 発現量はアマニ油摂取により顕著に増大したが、コーン油摂取群では空腸 PPAR $\alpha$  mRNA 量の増大は認められなかった。その原因については明らかでないが、pair-feeding による食餌摂取量の制限が関与している可能性が考えられる。一方、空腸 PPAR $\delta$  mRNA 量はいずれの高脂肪食摂取によっても発現量の低下が見られ、脂肪の種類による差は見られなかった。また、Fig. 4 に見られるように、アラキドン酸の摂取によっても空腸 PPAR $\alpha$  mRNA 量の増大が見られたが、PPAR $\delta$  mRNA 量の変動は見られなかった。さらに、小腸における CRBP II、L-FABP および I-FABP の mRNA 量はいずれも高脂肪食摂取により増大した(Fig. 1)。従って、食餌由来の脂肪酸は空腸 CRBP II や FABP の遺伝子発現増大を引き起こし、小腸吸収細胞でのビタミン A や脂肪酸の吸収や代謝を亢進させるものと考えられる。しかしながら高脂肪食の種

類によりそれぞれの遺伝子で増大パターンに違いが見られたことは高脂肪食摂取によるこれらの遺伝子発現の増大が PPAR を介した機構だけでなく、その他の要因も関与していることを示唆している。一方、摂取するアラキドン酸量だけを変えた食餌では空腸 CRBP II、L-FABP および I-FABP の mRNA 量はいずれも同じような発現変動パターンを示した (Fig. 4)。従って、アラキドン酸によるこれらの遺伝子発現の変動は共通した機構によって平行して起こっているものと考えられた。望月らは小腸における PPAR 標的遺伝子の発現が PPAR  $\alpha$  と PPAR  $\delta$  の相対的な比によって制御されていることを報告している (13)。本研究の結果でも PPAR  $\alpha$ /PPAR  $\delta$  mRNA 相対比と I-FABP mRNA 量が良く対応しているので、空腸 I-FABP mRNA 量の各種高脂肪食摂取による増大は主に PPAR  $\alpha$  を介していると考えられる。

肝臓は様々な脂質代謝において最も重要な組織であり、肝臓において顕著に発現が見られる PPAR  $\alpha$  は多くの脂質代謝に関連する遺伝子発現を制御することが報告されている (2, 16)。肝臓の PPAR  $\alpha$  mRNA 量は小腸と同様アマニ油摂取により顕著に増大したが、コーン油およびオリーブ油摂取によってもアマニ油摂取群ほどではないが有意な増大を示した (Fig. 2)。この結果は、肝臓重量の変動 (Table 6) や PPAR の標的遺伝子でペルオキシソームでの脂肪酸  $\beta$  酸化系律速酵素であるアシル CoA-オキシダーゼ (AOX) の mRNA 発現量 (Fig. 2) と良く一致しており、不飽和脂肪酸摂取により肝細胞のペルオキシソームの増殖が起こり、肝臓重量の増大をもたらしたものと考えられた。また、肝臓 L-FABP mRNA 量は、PPAR  $\alpha$  mRNA 量と良く対応して発現変動を示した (Fig. 2)。更に *de novo* 脂肪酸合成系の律速酵素である脂肪酸合成酵素 (FAS) の mRNA 量は高脂肪食摂取により著しく減少していた (Fig. 2)。この高脂肪食摂取による肝臓の FAS mRNA 量の減少はこれまでも多く報告されており、特に多価不飽和脂肪酸を多く含む脂肪 (中でも n-3 系) の摂取により肝臓の FAS が顕著に低下することは良く知られている。この発現抑制機序は PPAR を介しておらず、FAS の転写因子のひとつである SREBP 1c (sterol regulatory element-binding protein 1c) の多価不飽和脂肪酸による発現量減少によることが最近明らかにされている (17)。アラキドン酸含量の異なる食餌を摂取したラットの肝臓では、PPAR  $\alpha$  mRNA 量は 1% および 2.5% アラキドン酸含有食摂取では増大する傾向を示したが、5% 含有食群ではむしろ顕著に減少した (Fig. 5)。しかし肝臓 L-FABP mRNA 量は 5% アラキドン酸含有食摂取でのみ増大が見られ、実験 1 の結果と明らかに異なっていた。この 5% アラキドン酸摂取による急激な肝臓 PPAR  $\alpha$  mRNA 量の低下の原因は明らかではないが、食餌より摂取するアラキドン酸含量は 2.5% までは安全でかつ PPAR  $\alpha$  を活性化する点でも効果的であると考えられる。現時点では肝臓における脂肪酸摂取による影響について十分な結論を述べることができないが、恐らく、肝臓において食餌から摂取される (多価) 不飽和脂肪酸は脂肪酸合成系の抑制 (PPAR 非介在) および PPAR  $\alpha$  の発現量の増大に伴う脂肪酸分解系の亢進 (PPAR  $\alpha$  介在) を遺伝子レベルで制御し、高脂血症抑制効果を発揮するものと考えられる。

白色脂肪組織は過剰に摂取された脂肪の貯蔵組織としてだけでなく、最近では食欲を制御するレプチンや腫瘍壊死因子 TNF  $\alpha$  などの生理活性物質の分泌としても機能していることが明らかにされてきた。脂肪細胞には PPAR  $\gamma$  2 アイソフォームが局在して発現しており、脂肪細胞特異的脂肪酸結合タンパク質 (ALBP/aP2) やリポプロテインリパーゼ (LPL) などを標的遺伝子として制御し、脂肪細胞の分化・成熟に関与していることがこれまで報告されている (18)。ラット副睪丸白色脂肪組織における PPAR  $\gamma$  ( $\gamma$ 1 および  $\gamma$ 2 を両方含む) mRNA

の発現量に対する各種高脂肪食摂取の影響を調べた結果、オリーブ油およびコーン油摂取群で低下する傾向を示したが有意な差ではなかった。また、同組織には PPAR $\delta$  mRNA も比較的多く発現していることが確認されたが、その発現量は多価不飽和脂肪酸を多く含むコーン油やアマニ油摂取群で顕著な減少を示した(Fig.3)。本研究では PPAR $\alpha$  mRNA については確認できなかったが、以前の我々の研究では多価不飽和脂肪酸を多く含むヒマワリ油やシソ油の長期摂取により脂肪組織の PPAR $\alpha$  mRNA 量が顕著に減少することが示されている(19)。多価不飽和脂肪酸を多く含む高脂肪食摂取により白色脂肪組織重量が低値を示すのは、白色脂肪細胞の数およびそのサイズの増大が抑制されるためであると推察されている(19)。即ち多価不飽和脂肪酸は脂肪細胞の分化・成熟を抑制する作用を示すと考えられる。このことは Fig. 3 に示した脂肪細胞分化のマーカー遺伝子の一つである aP2 の mRNA 量がコーン油およびアマニ油摂取群でのみ減少している結果からも支持される。最近、前駆脂肪細胞の増殖および分化には PPAR $\delta$  も重要な役割を担っているという報告が相次いでなされ(20,21)、さらに PPAR $\delta$  欠損マウスでは白色および褐色脂肪組織の重量が顕著に減少することが認められた(22)。従って、本研究で観察されたアマニ油摂取による白色脂肪組織重量の低下と PPAR $\delta$  mRNA 量の減少は密接に関連しているものと推察される。一方、アラキドン酸含量の異なる食餌を摂取したラットの副睾丸白色脂肪組織においても、脂肪組織重量の低下、および PPAR $\delta$  と PPAR $\gamma$  mRNA の減少が見られた。以上のことから、n-3 系及び n-6 系多価不飽和脂肪酸は、特に PPAR $\delta$  mRNA 発現量減少および脂肪酸合成の低下をもたらして脂肪細胞の成熟化を抑制するものと考えられる。

実験 3 では個々の脂肪酸の PPAR $\alpha$  に対するリガンドとしての特性について、PPAR $\alpha$ -RXR $\alpha$  ヘテロ二量体の DNA との結合活性(Fig. 7)、およびそれに続く PPAR $\alpha$  転写活性化(Fig. 8, 9)の視点から検討を行った。その結果、個々の脂肪酸によるヘテロ二量体の DNA 結合活性と PPAR $\alpha$  転写活性化能は良く対応していることが明らかとなった。本実験で用いた脂肪酸を比較してみると PPAR $\alpha$  リガンドとしては、アラキドン酸が最も強いリガンド活性を示しており、その他炭素数 20 以下の多価不飽和脂肪酸も強いリガンド活性を有していた。しかし炭素数 22 以上の多価不飽和脂肪酸ではリガンド活性が弱いことから、PPAR $\alpha$  のリガンドにはなりにくいものと推察された。また、一価不飽和脂肪酸、中鎖脂肪酸および炭素数 20 以上の飽和脂肪酸も PPAR $\alpha$  のリガンドにはなりにくいものと推察された。また、同様の実験を PPAR $\delta$  について行なったところ、PPAR $\alpha$  と異なり、殆どの脂肪酸は PPAR $\delta$  のリガンドとして作用しにくいことが明らかとなった。

本研究より、特に多価不飽和脂肪酸の摂取は、PPAR に対するリガンド量の増大をもたらし、更に脂肪酸の種類によってはリガンドとしての作用だけでなく、PPAR 自身の発現量を調節していることが明らかとなった。特に小腸や肝臓では PPAR $\alpha$  の増大とともに脂肪酸やビタミン A 吸収関連遺伝子の発現量の増大をもたらし、さらに肝臓では脂肪酸酸化系の亢進および脂肪酸合成系の抑制をもたらす。一方、脂肪組織では PPAR $\delta$  の減少とともに脂肪細胞分化・成熟の指標遺伝子の発現を低下することが明らかとなった。これらの多価不飽和脂肪酸の効果は n-3 系および n-6 系でいずれも同等であると考えられたが、摂取量の面を考慮すると n-3 系多価不飽和脂肪酸の方が安全性が高いことから、機能性脂肪酸としての有用性に優れているものと考えられる。

### 【参考文献】

- 1) Duplus, E., Glorian, M. and Forest, C. : Fatty acid regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* 275, 30749-30752, 2000.
- 2) Desvergne, B. and Wahli, W. : Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.*, 20, 649-688, 1999.
- 3) Kersten S, Desvergne B and Wahli W. : Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405, 421-424, 2000.
- 4) Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E. J., Owens, J. W., Kroetz, D. L., Fernandez-Salguero, P. M., Westphal, H. and Gonzalez, F. J. : Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3012-3022, 1995.
- 5) Peters, J. M., Lee, S. S., Li, W., Ward, J. M., Gavrilova, O., Everett, C., Reitman, M. L., Hudson, L. D. and Gonzalez, F. J. : Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol. Cell. Biol.* 20, 5119-5128, 2000.
- 6) Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., Eto, K., Tsubamoto, Y., Okuno, A., Murakami, K., Sekihara, H., Hasegawa, G., Naito, M., Toyoshima, Y., Tanaka, S., Shiota, K., Kitamura, T., Fujita, T., Ezaki, O., Aizawa, S. and Kadowaki, T. : PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell*, 4, 597-609, 1999.
- 7) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid-guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987.
- 8) Mochizuki, K., Suruga, K., Yagi, E., Takase, S. and Goda, T. : The expression of PPAR-associated genes is modulated through postnatal development of PPAR subtypes in the small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 1531, 68-76, 2001.
- 9) Forman, B. M., Chen, J. and Evans, R. M. : Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 4312-4317, 1997.
- 10) Kim, H-J., Takahashi, M. and Ezaki, O. : Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. *J. Biol. Chem.*, 274, 25892-25898, 1999.
- 11) Qu, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., Debose-Boyd, R. A., Bashmakov, Y., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. : Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c(SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 6027-6032, 2001.

- 12) Ide. T., Kobayashi, H., Ashakumary, L., Rouyer, I. A., Takahashi, Y., Aoyama, T., Hashimoto, T. and Mizugaki, M.: Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1485, 23-35, 2000.
- 13) Mochizuki, K., Suruga, K., Kitagawa, M., Takase, S. and Goda T. :Modulation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-dependent genes through disproportional expression of two subtypes in the small intestine. *Arch Biochem Biophys.* 389, 41-48, 2001.
- 14) Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M. and Wahli, W.: Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 137, 354-366, 1996.
- 15) Suruga, K., Mochizuki, K., Kitagawa, M., Goda, T., Horie, N., Takeishi, K. and Takase, S.: Transcriptional regulation of cellular retinol-binding protein, type II gene expression in small intestine by dietary fat. *Arch Biochem Biophys.* 362, 159-166, 1999.
- 16) Reddy, J. K. and Hashimoto, T.: Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu. Rev. Nutr.* ,21, 193-230, 2001.
- 17) Kim, H-J., Takahashi, M. and Ezaki, O. (1999) Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. *J. Biol. Chem.*, 274, 25892-25898.
- 18) Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M.: PPAR $\gamma$ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *J. Biol. Chem.*, 276, 37731-37734, 2001.
- 19) Okuno, M., Kajiwara, K., Imai, S., Kobayashi, T., Honma, N., Maki, T., Suruga, K., Goda, T., Takase, S., Muto, Y. and Moriwaki, H.: Perilla oil prevents the excessive growth of visceral adipose tissue in rats by down-regulating adipocyte differentiation. *J. Nutr.* 127, 1752-1757, 1997.
- 20) Bastie, C., Holst, D., Gaillard, D., Jehl-Pietri, C. and Grimaldi, P. A.: Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPARdelta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts. *J Biol Chem.* 274, 21920-21925, 1999.
- 21) Hansen, J. B., Zhang, H., Rasmussen, T. H., Petersen, R. K., Flindt, E. N. and Kristiansen, K.: Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta )-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 3175-3182, 2001.
- 22) Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, E. S., Nelson, A. C., Olefsky, J. M., Boland, R. and Evans, R. M.: Effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*, 99, 303-308, 2002.

**分担研究:抗酸化性食品素材の安全性と有用性に関する研究**  
**第1章 タンニン酸のラットにおける代謝**  
**第2章 ブドウ種子抽出物を含む健康食品中のプロシアニジン含量の分析**

分担研究者 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  
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普遍的に存在する物質であり、多種多様なものがある。ポリフェノールの一種であるタンニンについては蛋白質、ミネラル、ある種のビタミン吸収阻害等の毒性が報告されており、ポリフェノールは従来は非栄養素と考えられてきた。しかし近年、ポリフェノールに抗酸化作用、抗癌作用等有用な作用のあることなど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。しかし、その代謝については不明な点が多い。

タンニンは大別すると、プロシアニジン等の縮合性タンニン、タンニン酸等の加水分解性タンニンがある。食品として重要なのは縮合性タンニンであるが、加水分解性タンニンも柿等の食品に含まれる。そこで代表的な加水分解性タンニンの一つであるタンニン酸をラットに経口投与し、その代謝について調べた。さらに、縮合性タンニンの一つで近年食品素材として注目されているブドウ種子ポリフェノールを含有する健康食品中のプロシアニジン含量の分析を試みた。尚、ブドウ種子ポリフェノールのラットにおける代謝については現在検討中である。

**[ラットにおけるタンニン酸の代謝]**

Wistar 系雄性ラットに 1 g/kg/10 mL の用量でタンニン酸 (TA) を強制経口投与し、血清、尿及び糞中の TA 代謝物濃度及び糞中への TA 排泄量の経時的变化を調べた。

血清からはごく微量の 4-O-methyl gallic acid (4-OMGA) 及び pyrogallol (PY) が検出された。4-OMGA は投与 1.5 時間後に、PY は投与 4 時間後に血清中の濃度が最大になり、投与後 1 日ですべて血中より消失した。投与された TA のうち 0.35% が TA 代謝物即ち gallic acid (GA)、PY、4-OMGA としてほぼ 24 時間以内に尿中へ排泄された。また、54 時間以内に糞中へ 0.21% が代謝物即ち GA、PY として、42.0% が TA として未変化のまま排泄された。

**[ブドウ種子ポリフェノールを含有する健康食品中のプロシアニジン含量の分析]**

ブドウ種子ポリフェノールは複雑な組成を持ち、個々の成分の分析は非常に困難である。バニリン-塩酸法は比色法であるが、3-O-flavanol 即ちカテキン類やプロシアニジンに極めて特異的な分析法である。さまざまなポリフェノールの本法の反応性について調べ、健康食品のメタノール抽出物について本法を適用した。単純な組成の健康食品については表示量以上のプロシアニジンが検出された。しかし、共存エキスにより着色している場合や蛋白質を多く含む食品からはプロシアニジンの定量値は表示より低かった。特に高タンパク食品の場合は本法によるプロシアニジン分析は困難であり、ブドウ種子ポリフェノールが蛋白質と結合する可能性が示唆された。

## 第1章 ラットにおけるタンニン酸の代謝

### 【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<sup>1)</sup>。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<sup>1-3)</sup>。

ポリフェノールには単純フェノールやフラボノイド等の低分子量化合物と低分子の化合物が重合した高分子量のタンニンがある<sup>1)</sup>。タンニンは大別すると、プロシアニジン等の縮合性タンニン、タンニン酸等の加水分解性タンニンがある。食品として重要なタンニンは縮合性タンニンであるが、加水分解性タンニンも柿等の食品に含まれる。

タンニン酸(TA)は代表的な加水分解性タンニンの一つで、Figure 1 に示したように、糖に gallic acid (GA) が数個～十数個結合した gallotannin の混合物である。タンニン酸の代謝物としては GA, 4-O-methyl gallic acid (4-OMGA), pyrogallol (PY), ellagic acid (EA) 等が報告され、これらの化合物はさらに腸内細菌により分解されて TCA サイクルに入るとされている<sup>4-6)</sup>。

Figure 2 に TA 代謝物及びその関連化合物の化学構造式を示した。

TA の毒性或いは好ましくない作用として経口投与時に生長抑制作用<sup>7,8)</sup>、proline を多く含むタンパク質との結合<sup>9)</sup>作用、糞中への水分、脂質及び窒素の排泄増加作用<sup>10)</sup>、蛋白吸収阻害作用<sup>11)</sup>、メヘモグロビン血症<sup>12)</sup>、皰胃内投与(ヒツジ)投与時に皰胃、肝臓及び腎臓の損傷<sup>13)</sup>が報告されている。一方、TA の好ましい作用として抗変異原作用、抗腫瘍作用及び抗酸化作用<sup>14,15)</sup>、血中コレステロール及びトリグリセライド低下作用<sup>16-18)</sup>、インシュリンによる脂質産生抑制作用<sup>19)</sup>等が報告されている<sup>20)</sup>。

TA の代謝はヒツジ<sup>6,12,13)</sup>、ラット<sup>10)</sup>等について調べられてきたが、TA 自体の分析が困難なこともあり詳細は明らかではない。そこで TA の分析法について検討し、ラットに TA を強制経口投与して TA の代謝を詳細に調べた。

### 【研究方法】

#### 試薬・機器・使用動物

##### 1) 試薬

Gallic acid (GA, 没食子酸一水和物), flavone, ellagic acid (EA) 及びタンニン酸 (TA) は和光純薬工業より購入した。4-O-methyl gallic acid (4-OMGA), 3-O-methyl gallic acid (3-OMGA) は Apin Chemicals より購入した。3,4-O-Dimethyl gallic acid (3,4-O-GA) は SIGMA より、protocatechuic acid (PA) は Aldrich より購入した。(+) -Catechin (CT), (-) -epicatechin

( EC ), procyanidin B1 ( ProB1 ), procyanidin B2 ( ProB2 ), procyanidin C1 ( ProC1 ), catechin gallate ( CG ), epicatechin gallate ( ECG ), gallo catechin ( GC ), epigallocatechin ( EGCG ), gallo catechin gallate ( GCG ) 及び epigallocatechin gallate ( EGCG ) はフナコシより購入した。1,2,3,6-Tetra-*O*-galloyl  $\beta$ -D-glucose ( TGG ) 及び 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl  $\beta$ -D-glucose ( PGG ) は、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。投与 TA のうち GA 含量は 0.3 g/100 g 以下であった ( HPLC より算出, データ示さず )。

メタノール, アセトニトリル及び酢酸エチルは高速液体クロマトグラフ測定用を用いた。水はイオン交換再蒸留水をミリ Q で精製したものを用いた。その他の試薬は試薬特級を用いた。

タンナーゼ (*Aspergillus oryzae* 由来, EC 3.1.1.20) は 和光純薬工業より購入した。PH5.5, 30 °C で 1 分間に 1  $\mu$ mol タンニン酸のエステル結合を加水分解する酵素量を 1 unit と定義する。 $\beta$ -Glucuronidase 及び sulfatase は SIGMA より購入した。

脱水用の無水硫酸ナトリウムは 130 °C で一晩乾燥後デシケーター中で放冷したものを用いた。

HPLC 用カラム STR ODS- II (  $\phi$ 4.6 mm  $\times$  250 mm ) は信和加工より, Develosil 300 ODS-HG-5 (  $\phi$ 4.6 mm  $\times$  250 mm ) は野村化学より購入した。

## 2) 機器

ポリフェノールの分析には高速液体クロマトグラフ島津 Class-VP シリーズ ( system controller SCL-10AVP + pump LC-10ADVP + degasser DGU-14A + auto injector SIL-10ADVP + column oven CTO-10AC + dopde array detector SPD-M10AVP + fluorescence detector RF-10AXI付 ) を用いた。

ロータリーエバポレータの水浴は 40 °C 以下に設定した。

## 3) 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 °C, 湿度 55 $\pm$ 5% の動物舎で, 5 頭ずつ金網ケージにて集団で予備飼育した。実験期間中, ラットには固形飼料 F-2 (船橋農場, 千葉) 及び水を自由摂取させた。

実験には体重 252-285 g の Wistar 系雄性ラットを用い, 1 群 5-6 匹とした。

## 4) 投与試料

TA を脱イオン蒸留水に溶解し, 1.0 g/kg/10 mL の投与試料を用時調製した。

## 実験方法

### 1) 動物実験

#### 1-1) TA 及びその代謝物の血中濃度の経時的変化

ラットに 1 g/kg/10 mL の用量で TA を強制経口投与し, 投与 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 5, 6, 24 時間後にエーテル麻酔下でラットの心臓より採血し, 1,500 rpm で 10 分間遠沈することにより血清を得た。試料は分析時まで -20 °C 以下で冷凍保存した。

#### 1-2) 尿及び糞中への排泄量の経時的変化

ラットに 1 g/kg/10 mL の用量で TA を強制経口投与し, 1 匹ずつ代謝ケージに入れ, 糞, 尿を採取した。試料は分析時まで -20 °C 以下で冷凍保存した。

### 2) 分析法

#### 2-1) TA の加水分解



### 2-1-1) 酸加水分解

TA 200  $\mu\text{g}$  を試験管にとり、内部標準として flavone 23.6 nmol を加え、1 N 或いは 10 N 塩酸 1 mL を加え、37  $^{\circ}\text{C}$  或いは 100  $^{\circ}\text{C}$  で 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 時間必要に応じて還流しながら加水分解を行った。室温に戻した後、水 9 mL を加え、酢酸エチル 10 mL で 3 回振盪抽出を行った。酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、No.5A ろ紙でろ過後、ロータリーエバポレーターで減圧乾固した。残渣をメタノール 2 mL に溶解し、HPLC 用試験液とした。

### 2-1-2) 酵素加水分解

TA 200  $\mu\text{g}$  を試験管にとり、0.05 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 5.5) 5 mL 及びタンナーゼ溶液 (50 unit/mL, 0.05 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解) 1 mL を加え、30  $^{\circ}\text{C}$  で 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 20 時間インキュベートした。内部標準として flavone 23.6 nmol を加えた後 1 N 塩酸 1 mL を加えて反応を止め、酢酸エチル 10 mL で 3 回振盪抽出を行い、2-1-1) と同様にして HPLC 用試験液を調製した。

### 2-2) 血清及び尿中の TA 代謝物の分析

Zhu らの方法<sup>20)</sup>と同様にして TA 代謝物を酢酸エチルで抽出し、HPLC で分析した。

血清 0.5 mL 或いは尿 2 mL に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 2 mL, 4% アスコルビン酸水溶液, 4% EDTA-2Na 水溶液各 100  $\mu\text{L}$  及び 0.6 mol/L 塩酸カルシウム水溶液 200  $\mu\text{L}$  を加えた。 $\beta$ -Glucuronidase 1000 IU 或いは及び sulfatase 20 IU を加え (総量) 或いは加えず (遊離型) に 37  $^{\circ}\text{C}$  で 45 分インキュベートした。内部標準として flavone 23.6 nmol を加えた後 1 N 塩酸 1 mL を加えて反応を止め、酢酸エチル 10 mL で 3 回振盪抽出を行った。酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、No.5A ろ紙でろ過後、ロータリーエバポレーターで減圧乾固した。残渣をメタノール 2 mL に溶解し、HPLC 用試験液とした。

### 2-3) 糞中の TA 代謝物及び TA の分析

採取した糞は 40  $^{\circ}\text{C}$  で一晩乾燥し、粉碎した。糞乾燥試料 0.2 g を採取し、n-hexane 50 mL で脱脂後、メタノールで抽出し 50 mL に定容し、メタノール可溶性画分とした。また、残渣をメタノール不溶性画分とした。メタノール可溶性画分について、一部をとり、血清及び尿の場合と同様にして TA 代謝物を測定した。またメタノール可溶性画分及びメタノール不溶性画分について、0.05 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 5.5) 5 或いは 10 mL 及びタンナーゼ 500 或いは 5000 IU を添加し、30  $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間 TA の加水分解を行った。内部標準として flavone 23.6 nmol を加えた後 1 N 塩酸 1 mL を加えて反応を止め、酢酸エチル 10 mL で 3 回振盪抽出を行った。酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、No.5A ろ紙でろ過後、ロータリーエバポレーターで減圧乾固した。残渣をメタノール 2 mL に溶解し、HPLC 用試験液とした。

別に TA 10-1000  $\mu\text{g}$  を用い同様にしてタンナーゼで加水分解を行い、生じた GA から TA の検量線を作成した。GA 総量 (タンナーゼによる加水分解を行った場合) から遊離型 GA (タンナーゼによる酵素分解を行わなかった場合) を差し引き、TA 量を算出した。

### 2-4) HPLC 条件

ポリフェノール分析のための HPLC 条件は以下の通りである。

機器: 島津 Class-VP シリーズ。

カラム: STR ODS- II 或いは Develosil 300 ODS-HG-5

移動相: A 液, 水:リン酸 1000:1 (v/v); B 液, アセトニトリル:リン酸 1000:1 (v/v)。

グラジエントプログラム: B 液, 0% (0 分)  $\rightarrow$  15% (20 分)  $\rightarrow$  30% (25 分)  $\rightarrow$  100% (45-61 分)  $\rightarrow$

0% (62-77 分).

カラム恒温槽: 35 °C.

蛍光検出器: 励起波長 283 nm, 蛍光波長 317 nm (CT, EC, ProB1, ProB2, ProC1).

DAD: モニター波長 260 nm (EA), 210 nm (その他のポリフェノール), 280 nm.

注入量: 10  $\mu$ L.

リン酸自体が UV 吸収を持つため, ベースライン補正を行い, flavone を内部標準としてポリフェノールを定量した.

### 3) 統計処理

測定値は平均値  $\pm$ SD (分析条件の検討) 或いは平均値  $\pm$ SE (動物実験の結果) 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.

## 【研究結果】

### 分析条件の検討

#### 1) HPLC 条件の検討

STR ODS- II カラム及び Develosil 300 ODS-HG-5 カラムにおける各ポリフェノールの保持時間比 (flavone = 1.000), 検出限界及び検量線の直線範囲を Table 1 及び 2 に示した.

CT, EC, ProB1, ProB2, 及び ProC1 は蛍光検出により UV 検出より 10 倍以上感度よく測定することができた. EA は Develosil 300 ODS-HG-5 カラムではピークが広がり, 分析が困難であった. また, STR ODS- II カラムの方が Develosil 300 ODS-HG-5 カラムより一般的に分離能がよく, 検出限界が低い傾向にあった.

#### 2) TA の分析に関する検討

TA の GA への加水分解について, 酸加水分解とタンナーゼによる分解の 2 種の方法で比較した.

TA の酸加水分解について, 塩酸濃度が 1 N の時, 37 °C, 100 °C (沸騰水浴中) のいずれの場合も加水分解による新たな GA を生じなかった. 10 N の塩酸を用い場合, 37 °C では加水分解による新たな GA を生じなかったが, 100 °C では加水分解により GA を生じ, 8 時間でほぼ飽和状態になった. 100 °C で酸加水分解を行った場合に生じた GA 量の経時的変化 (3 試行) 及び 100 °C で 8 時間酸加水分解を行った場合の TA 量と GA 生成量との関係を Figure 3 に示す.

一方, タンナーゼを用いた場合, 反応時間 30 分の時点で TA はほぼ完全に加水分解されて GA を生じ, 反応時間が 2 時間の時に最大の活性を示した. タンナーゼによる加水分解を行った場合に生じた GA 量の経時的変化 (3 試行) 及び反応時間が 2 時間の場合の TA 量と GA 生成量との関係を Figure 4 に示す.

タンナーゼの種々のポリフェノールに対する反応性についての検討結果を Table 3 に示す. タンナーゼは TGG, PGG, TA のような gallotannin のみならず CG, ECG, GCG, EGCG のようなカテキン類のエステル結合にも作用し GA を生じることが明らかとなった.

#### 3) TA 代謝物及び TA の添加回収実験

上述の方法による、血清、尿及び糞からの TA 代謝物及び TA の添加回収率 (3-5 試行) を Table 4 に示した。TA 代謝物の添加回収率は血清で 92.3-108.3%, 尿で 66.8-97.4%, 糞のメタノール可溶性画分で 87.3-99.2% であり、尿からの 3,4-OMGA を除けばいずれも 83% 以上と良好であった。一方、糞からの TA の添加回収率はメタノール可溶性画分で 97.6%, メタノール不溶性画分で 81.9% といずれも良好であった。

## ラットにおける TA 代謝

### 1) 血清中の TA 代謝物濃度の経時的変化

血清中の TA 代謝物濃度の経時的変化を Figure 5 に示す。

血清からはごく微量の 4-OMGA 及び PY が検出された。4-OMGA は投与 1.5 時間後に、PY は投与 4 時間後に血清中の濃度が最大になり、投与後 1 日でいずれも血中より消失した。

### 2) 尿中 TA 代謝物排泄量の経時的変化

尿中への TA 代謝物排泄量の経時的変化を Figure 6 に示す。

尿中からは TA の代謝物である GA, PY, 4-OMGA が検出された。尿中の TA 代謝物はほぼ 24 時間以内に全て排泄された。GA は 44.4%, PY は 12.9%, 4-OMGA は 63.7% がグルクロン酸や硫酸による抱合を受けない遊離型であった。

### 3) 糞中 TA 代謝物及び TA 排泄量の経時的変化

糞中への TA 代謝物及び TA 排泄量の経時的変化を Figure 7 及び 8 に示す。

糞中からは TA の代謝物である GA, PY 及び TA が検出された。糞中の TA 代謝物は 24 時間以内に 76.7% が排泄された。糞中の GA は 97.3%, PY は 100% がグルクロン酸或いは硫酸による抱合を受けた形で存在していた。尚、タンナーゼによる糞中 TA の GA への加水分解が完全に行われていることを HPLC により確認した (データ示さず)。

### 4) TA 及びその代謝物の排泄率

投与した TA からタンナーゼにより生ずる GA 量を 100% とした場合の、尿中或いは糞中への TA 及びその代謝物の排泄率 (mol 量で計算) を Figure 9 に示す。

投与した TA の 0.35% が 54 時間以内に尿中へ代謝物として排泄された。

また糞中へは、投与された TA は 0.21% が代謝物として、42.0% が TA として排泄された。TA 代謝物のうち PY は 100%, GA は 73.6% が投与 1 日以内に排泄されており、遊離型は殆ど存在しなかった。糞中の TA は 99.7% がメタノール不溶性画分に存在し、89.7% が 1 日以内に排泄された。

## 【考察】

ポリフェノールには多種多様なものがあり、含量については分析法により異なった結果が得られている<sup>1,22,23)</sup>。Scalbert 及び Williamson<sup>24)</sup> はポリフェノールの一日摂取量を約 1 g/日であると報告している。

ラットにおける TA の代謝について調べるのに先立ち、まず TA 及び TA 代謝物の分析法について検討した。

TA 代謝物については低分子化合物であるため、Zhu らの方法<sup>21)</sup>と同様にして HPLC で測定した。

通常の HPLC 逆相カラムの孔径は 100 Å であり、分子量 1000 位までの低分子量の化合物は分析可能だが、分子量が高い化合物の場合はカラムから溶出しない可能性がある。ポリフェノールには高分子量のものも含まれるため、孔径 100 Å の逆相カラム STR ODS-II 及び孔径 300 Å の逆相カラム Develosil 300 ODS-HG-5 の両者について、ポリフェノールの分析条件を検討した。

Table 1 及び 2 を比較すると、STR ODS-II カラムの方が Develosil 300 ODS-HG-5 カラムより一般的に分離能がよく、検出限界が低い傾向にあった。従って、血清及び尿中のタンニン酸代謝物測定には STR ODS-II カラムを、糞中のタンニン酸及びその代謝物分析には Develosil 300 ODS-HG-5 カラムを用いることにした。

一方、TA の定量は Folin-Ciocalteu 法<sup>25)</sup>等の比色法が一般的であるが Folin-Ciocalteu 法は特異性に欠ける欠点がある。

ところで Nemoto ら<sup>26)</sup>はほ乳類の糞中細菌叢より TA-タンパク質結合を分解するグラム陰性菌を単離し、これらの菌がタンナーゼを産生することを示した。Rajakumar ら<sup>27)</sup>は *P. chrysogenum* から遊離されたタンナーゼによるタンニン酸の GA への分解過程で glucose-gallic acid を中間体として生じることを報告している。我々は糞中の腸内細菌等のタンパク質に結合して存在すると考えられる TA について、タンナーゼによる加水分解を利用して生じた GA を定量することにより TA を算出する方法を開発した。

タンナーゼによる TA の加水分解 (Figure 4) は酸加水分解 (Figure 3) より効率がよく且つ安定であった。タンニン酸は胃液と同様の環境と考えられる 37 °C にて 1 N 塩酸でインキュベートした場合、8 時間後にも加水分解されなかった (データは示さず)。即ち、投与されたタンニン酸は胃酸により加水分解を受けるのではなく、むしろ腸内細菌のもつタンナーゼにより一部が加水分解されて GA を生じると考えられた。

さらに Table 3 に示したように、タンナーゼは galloyl 化されたカテキン類のエステル結合に働きかけ GA を生ずる。従って、TA 以外に蛋白に結合した、複雑に galloyl 化された化合物群から成るブドウ種子ポリフェノール等の定量にもタンナーゼによる加水分解により生じた GA より算出する方法が適用可能であると考えられた。

尚、タンナーゼによる加水分解により生じた GA より TA を算出する方法及び塩酸酸性下での酢酸抽出により TA 代謝物を測定する方法は、Table 4 に示したように良好な回収率を示し、TA 代謝物及び TA の分析に十分応用できると考えられた。

Zong ら<sup>28)</sup>はタンニン酸代謝物の一つである GA をラットに投与し、GA 及び GA の無毒化された代謝物 4-OMGA が血中及び尿中に現れ、これらの化合物の尿中濃度が投与 3 時間後に最大になることを報告している。Sharzad ら<sup>29)</sup>はヒトの場合は投与された GA のうち 36.4% が GA 或いは 4-OMGA として排泄されると報告している。投与された GA のうち尿中から検出されなかった GA は、腸管から吸収されなかったか、腸内細菌の働きでさらに分解されて TCA サイクルに入った<sup>9)</sup>可能性が考えられる。

本実験で TA の代謝物として血清から検出された 4-OMGA 及び PY のうち、4-OMGA が PY より早い時間に最高濃度に達した (Figure 5)。元から TA に微量に含まれていた GA 及び腸管内でタンナーゼにより TA より生じた GA が腸管から吸収され、肝臓中でまず 4-OMGA に代謝さ

れ、さらに別の代謝経路で PY に代謝されることが示唆された。

尿中から検出された TA の代謝物である GA, PY, 4-OMGA のうち、抱合型の割合は 4-OMGA > GA > PY の順に少なくなることより、代謝物の毒性は 4-OMGA < GA < PY の順に大きくなることが推察された。TA にもとより含まれている遊離型の GA は 0.3%以下であり、GA の約 36%が GA 及びその代謝物として尿中から検出されるにすぎない<sup>29)</sup>。従って、投与した TA の 0.35%が 54 時間以内に尿中へ代謝物として排泄された (Figure 9) ことより、投与された TA から腸内細菌のもつタンナーゼの作用で GA が新たに生じたと考えられた。

一方、尿中 TA 代謝物と異なり、糞中から TA 代謝物として 4-OMGA は検出されず、殆ど全てが抱合型であった (Figure 7)。さらに糞中の TA は 99.7%がメタノール不溶性画分に存在する (Figure 8) ことより、未変化の TA の殆どが糞中の腸内細菌や未消化物中のタンパク質と結合して存在する可能性が示唆された。

即ち、糞及び尿中への TA 代謝物及び血清中の TA 代謝物の経時的変化の結果より、腸管内で生じた GA の一部は腸管より吸収されて肝臓等の臓器中でさらに 4-OMGA や PY に代謝され、グルクロン酸や硫酸による抱合を受け、1-2 日のうちに尿或いは糞中に排泄される事が明らかになった。しかし、代謝物として排泄されるのは投与された TA のうちそれぞれ 0.35%, 0.21%にすぎず、42%以上が蛋白質等と結合して吸収されずに糞中へ排泄されると推定された。

投与された TA の排泄について、Bravo ら<sup>10)</sup>はラットに TA を投与した場合、糞中へ排泄された TA は 4.6%と報告している。本研究での糞中 TA 排泄は 42% (Figure 9) であり Bravo ら<sup>10)</sup>の報告の約 9 倍であるが、これは TA の分析法の違いによると考えられる。一方、Carbonaro ら<sup>30)</sup>はラットの小腸を用いた実験で、腸管からの TA の消失率は 40-60%であることを示した。また Carbonaro ら<sup>30)</sup>は TA は食事のタンパク質の消化を阻害するよりむしろ小腸壁のタンパク質に結合し腸管機能を損ねることにより反栄養作用を示すことを示した。

従って、投与された TA のうち本実験で検出されなかった 56.5%は、腸管内でタンナーゼより生じた GA が腸内細菌によりさらに代謝されて TCA サイクルに入り、呼気などとして排出されると推定された。

TA の代謝について、Singh ら<sup>31)</sup>はウシの瘤胃液が TA を 24 時間で GA 及び PY に、48-72 時間で PY 及び resorcinol に完全に分解することを示した。また Zhu ら<sup>21)</sup>はヒツジに TA を臍胃内投与した場合、血漿中に GA, 4-OMGA, EA 及び TA, 尿中に GA, PY 及び 4-OMGA が検出されること、及び血漿中の GA, 4-OMGA, EA 及び TA 濃度は投与 8 時間後に最大となり、尿中の GA 及び 4-OMGA 濃度は投与 8 時間後に、PY 濃度は投与 12 時間後に最大になると報告している。ラットはウシやヒツジのような反芻動物と異なり瘤胃や臍胃は存在しない。また血清からは EA 及び TA は検出されなかった (Figure 5)。即ち、TA 代謝には種差がある可能性が考えられる。

有用な生理作用のため今後も食品におけるポリフェノールの利用は増大すると考えられる<sup>32)</sup>が、ポリフェノールの代謝、他の栄養素との相互作用や安全性については未解明な点が多い。今後の研究が望まれる。

## 【謝辞】

1,2,3,6-Tetra-O-galloyl  $\beta$ -D-glucose 及び 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl  $\beta$ -D-glucose を御供与くださった岡山大学薬学部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 (1999): Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.*, **99**, 213-218.
- 4) D. K. Potter, H. L. Fuller (1968): Metabolic fate of dietary tannins in chickens. *J. Nutr.* **96**, 187-191.
- 5) T. K. Bhat, B. Singh, O. P. Sharma (1998): Microbial degradation of tannins - A current perspective. *Biodegradation*, **9**, 343-357.
- 6) J. Zhu, L. J. Filippich, J. Ng (1995): Rumens involvement in sheep tannic acid metabolism. *Vet. Human Toxicol.*, **37**, 436-440.
- 7) M. A. Joslyn, Z. Glick (1969): Comparative effects of gallotannic acid and related phenolics on the growth of rats. *J. Nutr.*, **98**, 119-126.
- 8) Z. Glick, M. A. Joslyn (1970): Food intake depression and other metabolic effects of tannic acid in the rat. *J. Nutr.*, **100**, 509-515.
- 9) P. G. Waterman (1988): Tannins and plant-animal interactions. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **280**, 77-91.
- 10) L. Bravo, R. Abia, M. A. Eastwood, F. Saura-Calixto (1994): Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *Br. J. Nutr.*, **71**, 933-946.
- 11) Z. Glick, M. A. Joslyn (1970): Effect of tannic acid and related compounds on the absorption and utilization of proteins in the rat. *J. Nutr.*, **100**, 516-520.
- 12) J. Zhu, L. J. Filippich, M. T. Alsalami (1992): Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Res. Vet. Sci.*, **53**, 280-292.
- 13) J. Zhu, L. J. Filippich (1995): Acute intra-abomasal toxicity of tannic acid in sheep. *Vet. Human Toxicol.*, **37**, 50-54.
- 14) G. K. B. Lopes, H. M. Schulman, M. Hermes-Lima (1999): Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 142-152.
- 15) R. C. Srivastava, M. M. Husain, S. K. Hasan, M. Athar (2000): Green tea polyphenols and tannic acid act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Lett.* **153**, 1-5.

- 16) T. Yugarani, B. K. H. Tan, N. P. Das (1993): The effects of tannic acid on serum and liver lipids of Raif and Rico rats fed on high fat diet. *Comp. Biochem. Physiol.* ,**104A** , 339-343.
- 17) T. Yugarani, B. K. H. Tan, M. Teh, N. P. Das (1992): Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. *Lipids* ,**27** , 181-186.
- 18) T. Yugarani, B. K. H. Tan, N. P. Das (1993): The effects of tannic acid on serum lipid parameters and tissue lipid peroxides in the spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Planta Med.*, **59**, 28-31.
- 19) K. C. Ong, H. E. Khoo, N. P. Das (1995): Tannic acid inhibits insulin-stimulated lipogenesis in rat adipose tissue and insulin receptor function in vitro. *Experientia* **51** , 577-584.
- 20) T. Okuda (1998): Correlation of tannin structures with plant taxonomy and antitumor and antioxidant activities. *in* "Towards Natural Medicine Research in the 21st Century" ed. by H. Ageta, N. Aimi, Y. Ebizuka, T. Fujita and G. Honda, p.15-26, Elsevier Science.
- 21) J. Zhu , J. Ng , L. J. Filippich (1992): Determination of tannic acid and its phenolic metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **577** , 77-85.
- 22) S. S. Despande, M. Cheryan and D. K. Salunke: Tannin analysis of food products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **24**, 401-449 (1986).
- 23) A. Scalbelt, B. Monties, G. Janin (1989): Tannins in wood: Comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.* ,**37** , 1324-1329.
- 24) A. Scalbert and G. Williamson: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* , **130**, 2073S-2085S (2000).
- 25) V. L. Singleton, J. A. Rossi, Jr. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* ,**16** , 144-158.
- 26) K. Nemoto, R. Osawa, K. Hirota, T. Ono, Y. Miyake (1995): An investigation of Gram-negative tannin-protein complex degrading bacteria in fecal flora of carious mammals. *J. Vet. Med. Sci.*, **57**, 921-926.
- 27) G. S. Rajakumar, S. C. nandy (1986): Metabolism of tannic acid, chenulinic acid and gallic acid by *P. Chrysogenum*. *Leather Sci.*, **33**, 220-227.
- 28) L. Zong, M. Inoue, M. Nose, K. Kojima, N. Sakaguchi, K. Isuzugawa, T. Takeda, Y. Ogihara (1999): Metabolic fate of gallic acid orally administered to rats. *Biol. Pharm. Bull.* **22** , 326-329.
- 29) S. Shahrzad, K. Aoyagi, A. Winter, A. Koyama, I. Bitsch (2001): Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J. Nutr.* **131** , 1207-1210.
- 30) M. Garbonaro, G. Grant, A. Pusztai (2001): Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *Eur. J. Nutr.* ,**40** , 84-90.
- 31) B. Singh, T. K. Bhat, O. P. Sharma (2001): Biodegradation of tannic acid in ab in vitro ruminal system. *Livestock Product. Sci.* , **68** , 259-262.
- 32) 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 defense against reactive oxidative species. *Brit. J. Nutr.* , **80**, S77-S112 (1998).

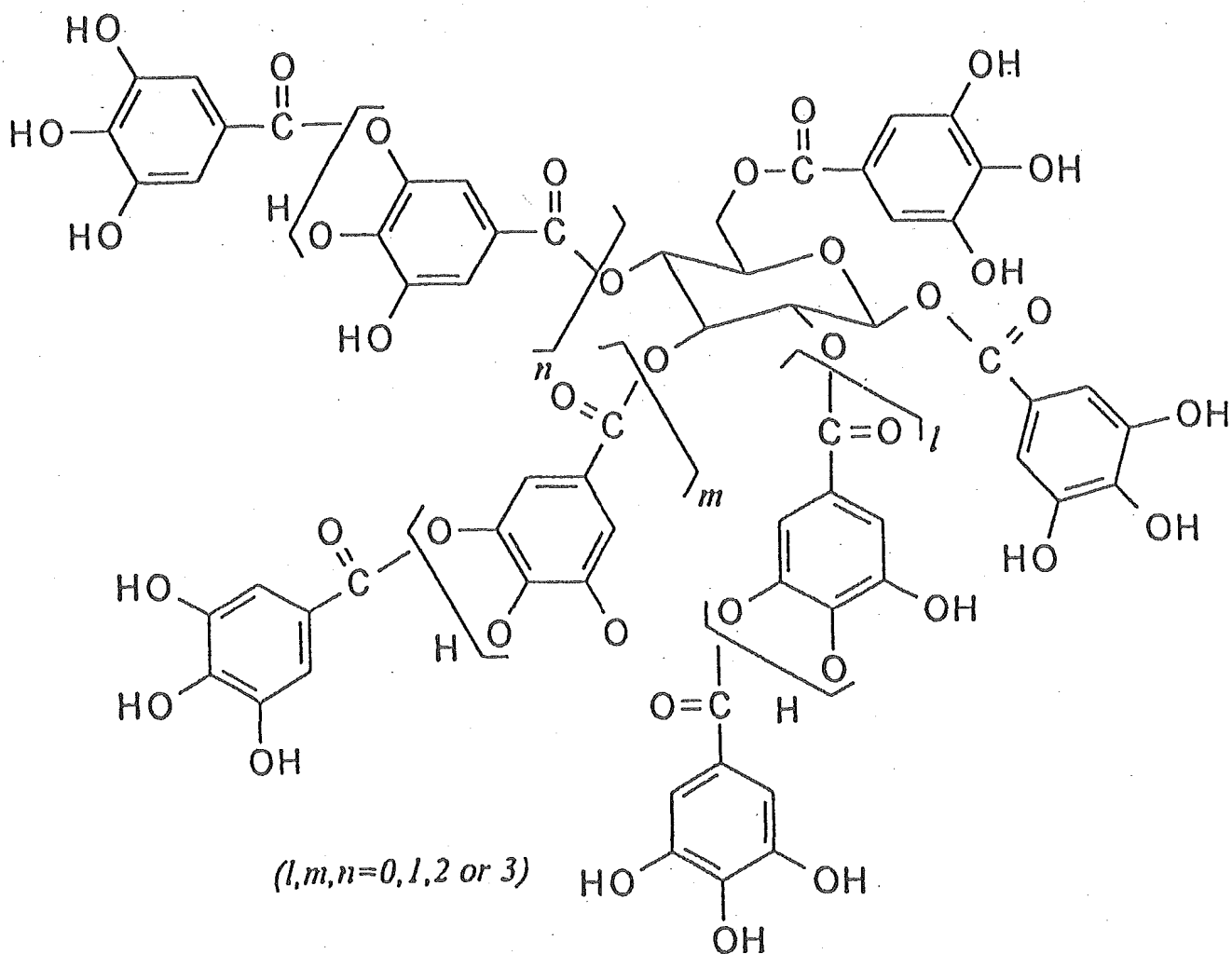
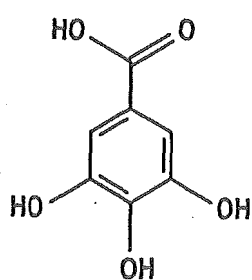
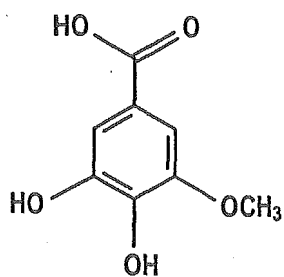


Figure 1 Tannic acid

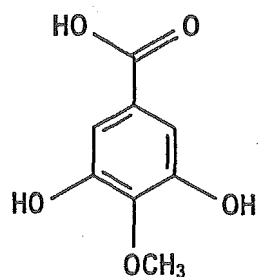




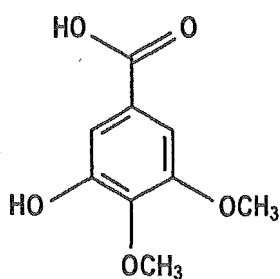
**Gallic acid  
(GA)**



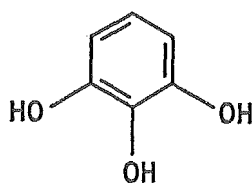
**3-O-methyl gallic acid  
(3-OMGA)**



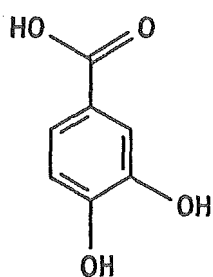
**4-O-methyl gallic acid  
(4-OMGA)**



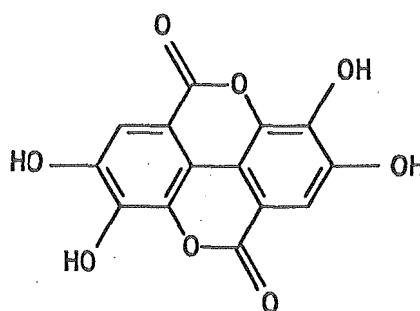
**3,4-O-dimethyl gallic acid  
(3,4-OMGA)**



**Pyrogallol  
(PY)**



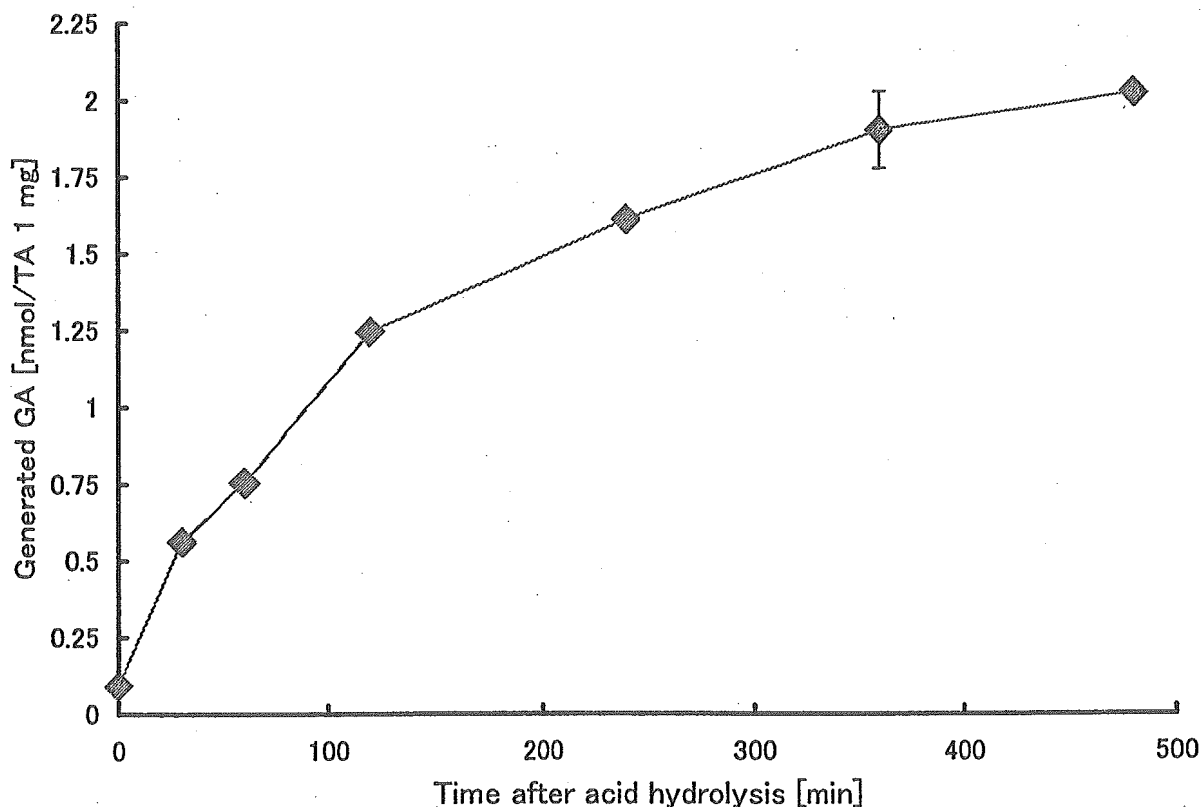
**Protocatechuic acid  
(PA)**



**Ellagic acid  
(EA)**

**Figure 2 Metabolites of tannic acid  
and their related compounds**

### Generated GA from TA as a function of time



### Dose-dependence of the generated GA from TA

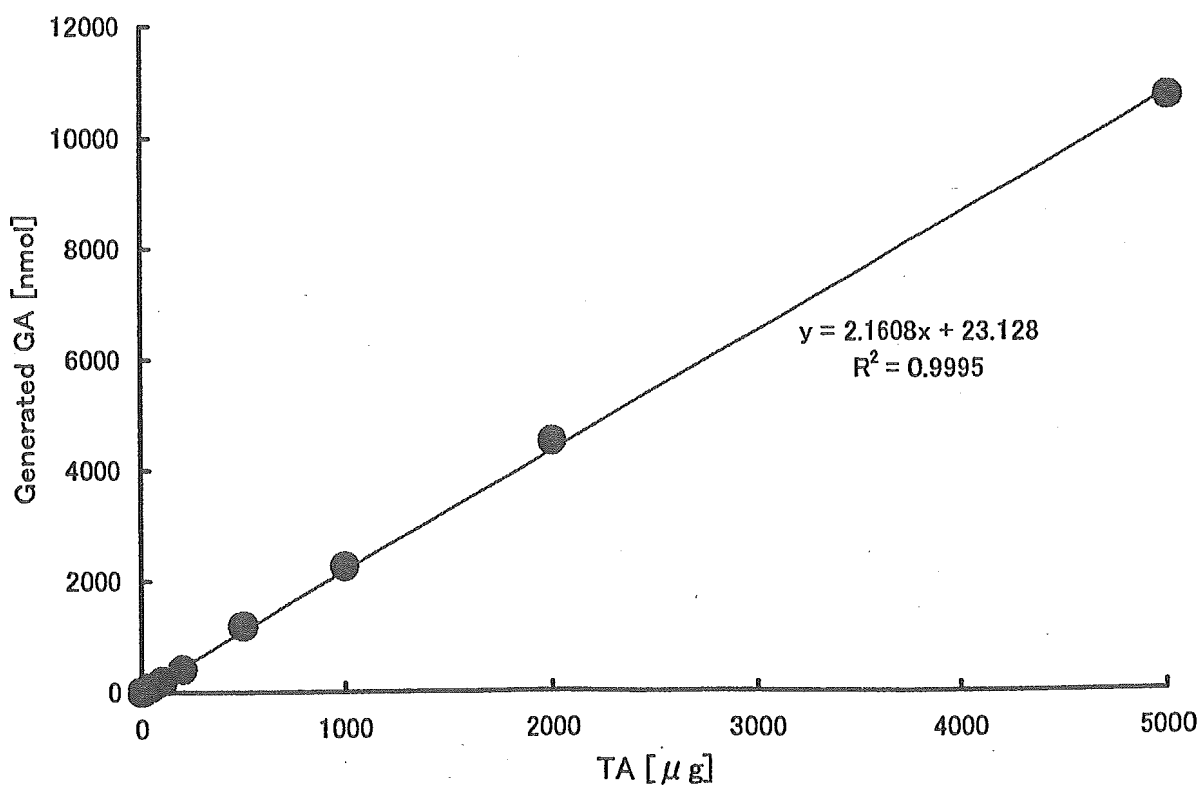
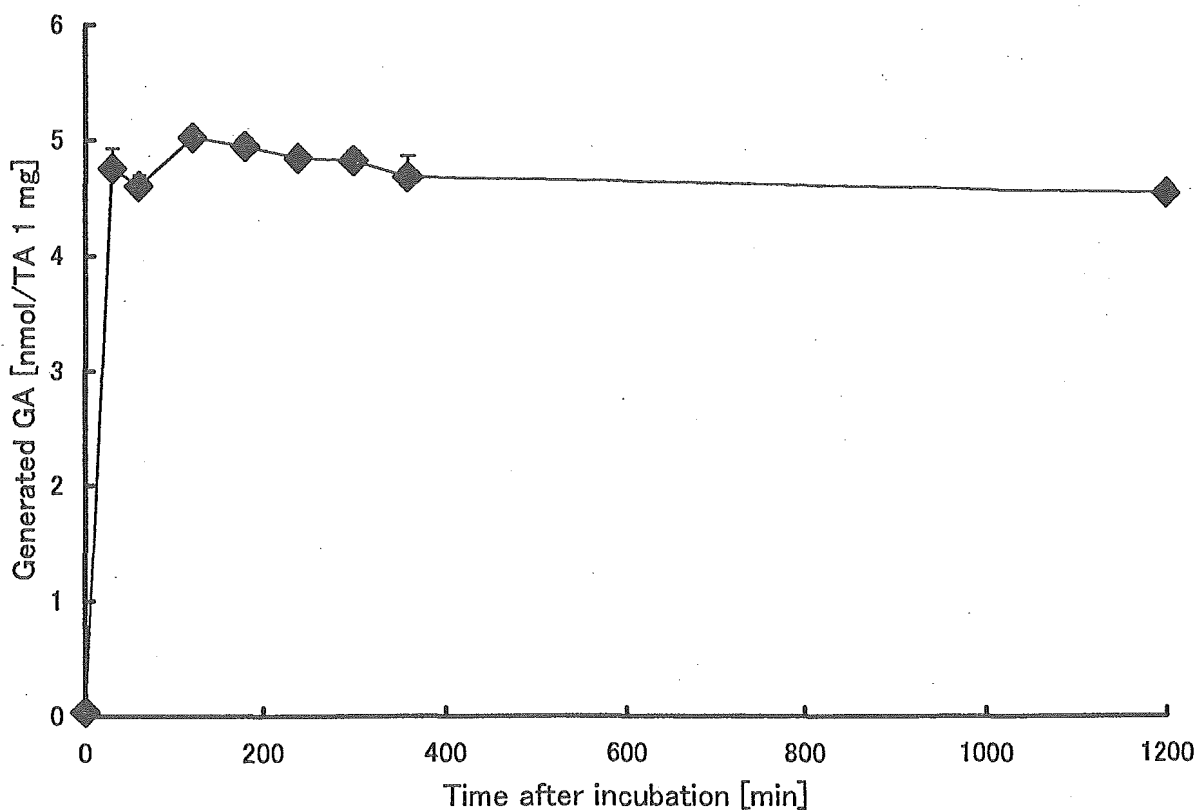


Figure 3 Acid hydrolysis of tannic acid by 10 N HCl (100 °C, 8 hours)

### Generated GA from TA as a function of time



### Dose-dependence of the generated GA from TA

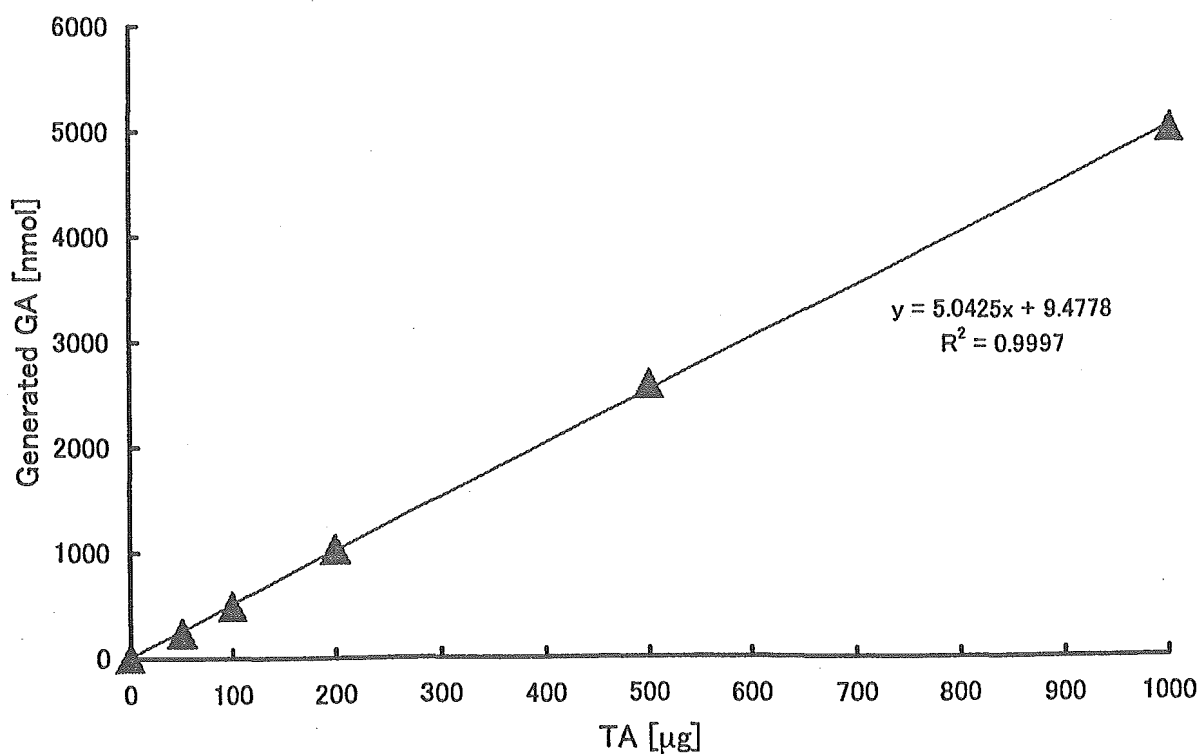


Figure 4 Enzymatic hydrolysis of tannic acid by tannase (30 °C, 2 hours)

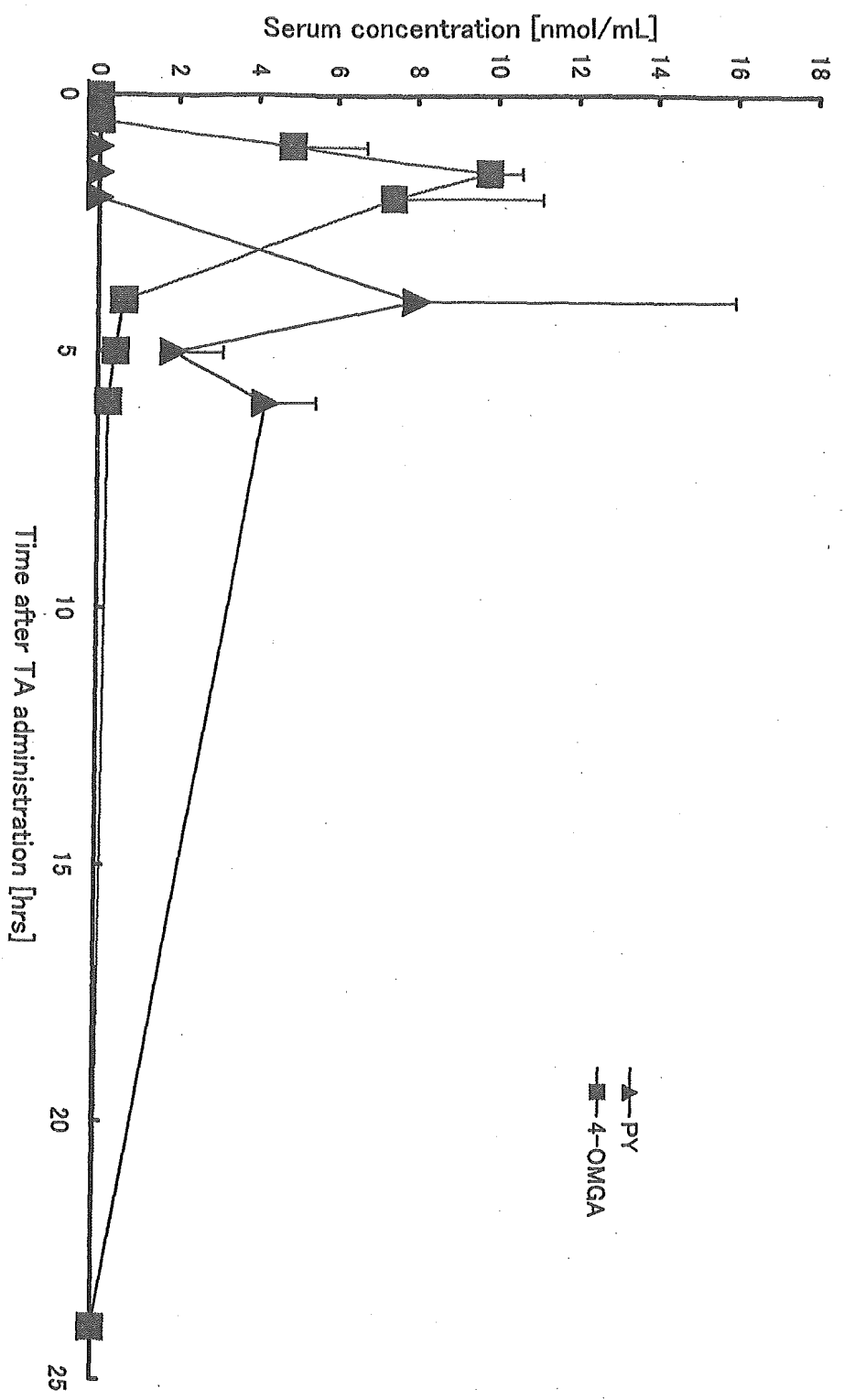


Figure 5 Serum concentrations of tannic acid metabolites as functions of time