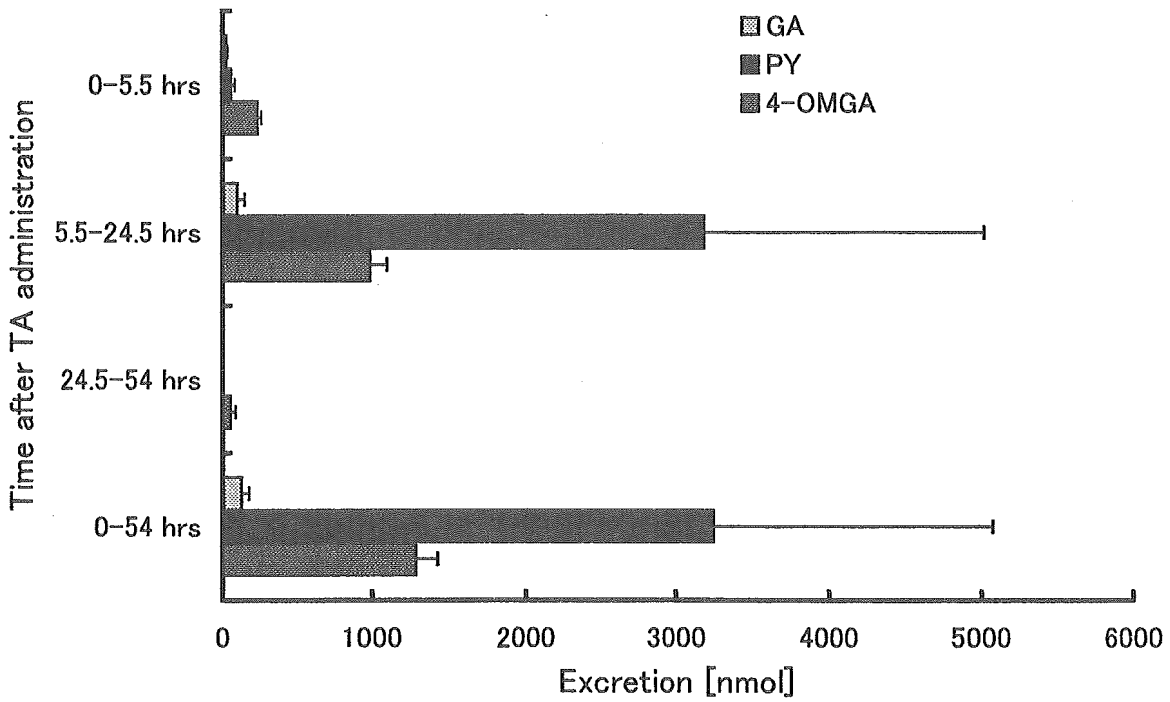


Urinary excretion of TA metabolites (total)



Urinary excretion of TA metabolites (free)

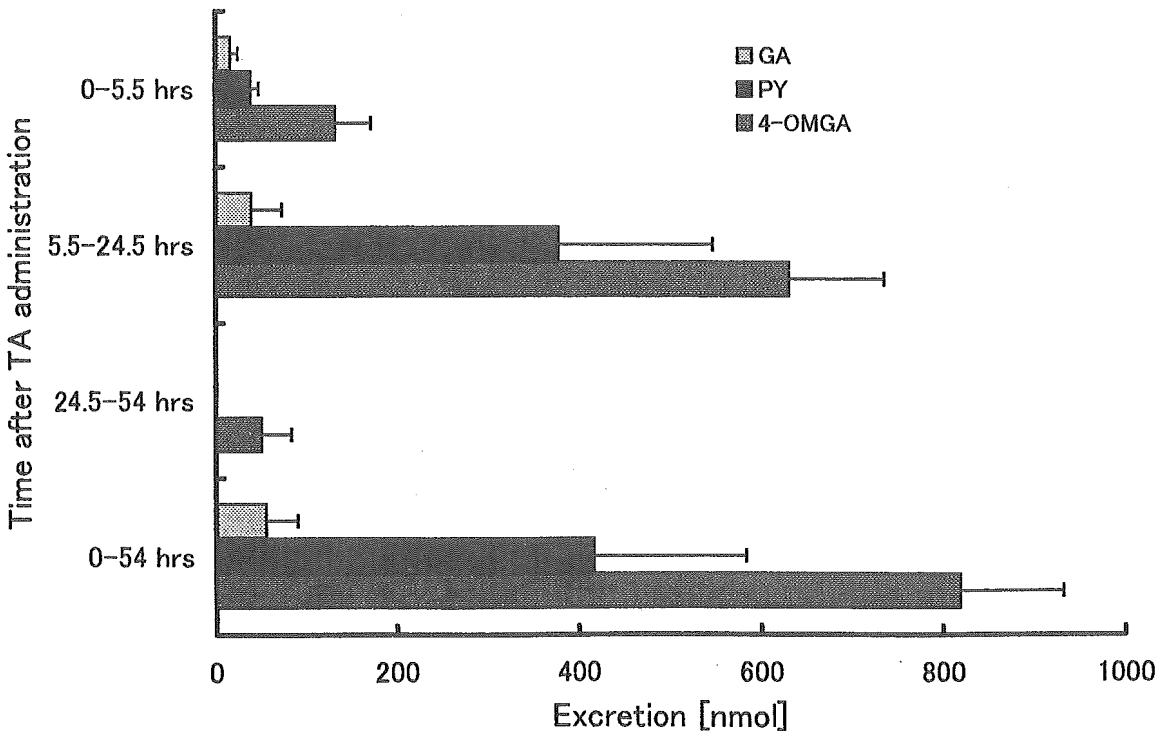
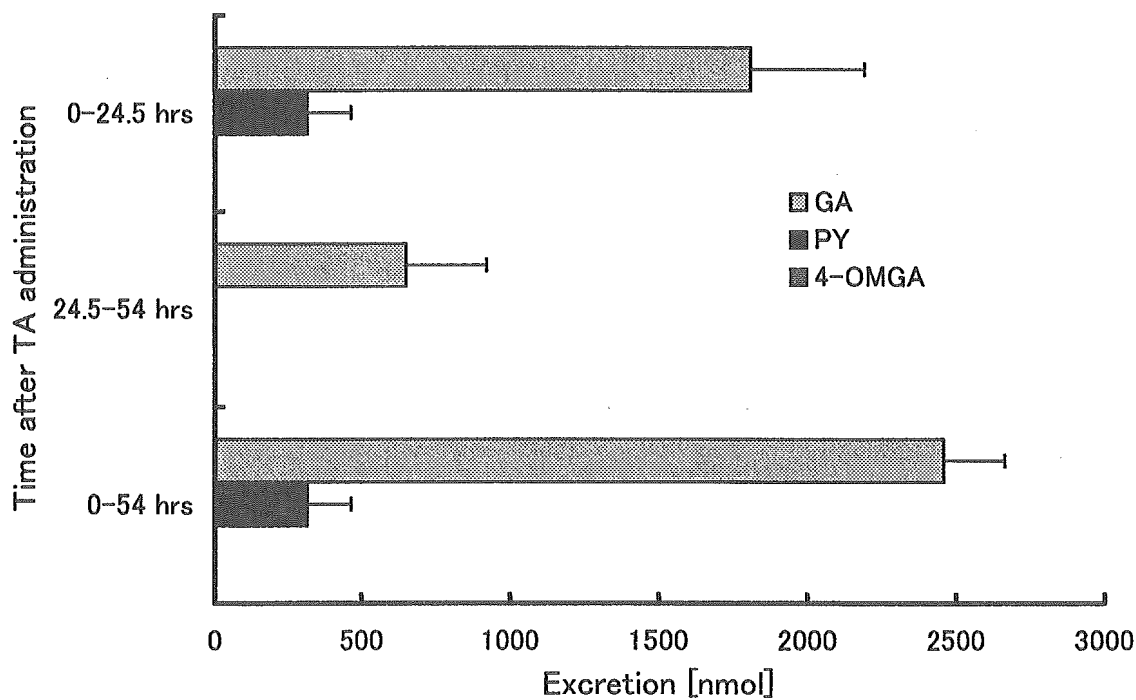


Figure 6 Urinary excretion of tannic acid metabolites as functions of time

Fecal excretion of TA metabolites (total)



Fecal excretion of TA metabolites (free)

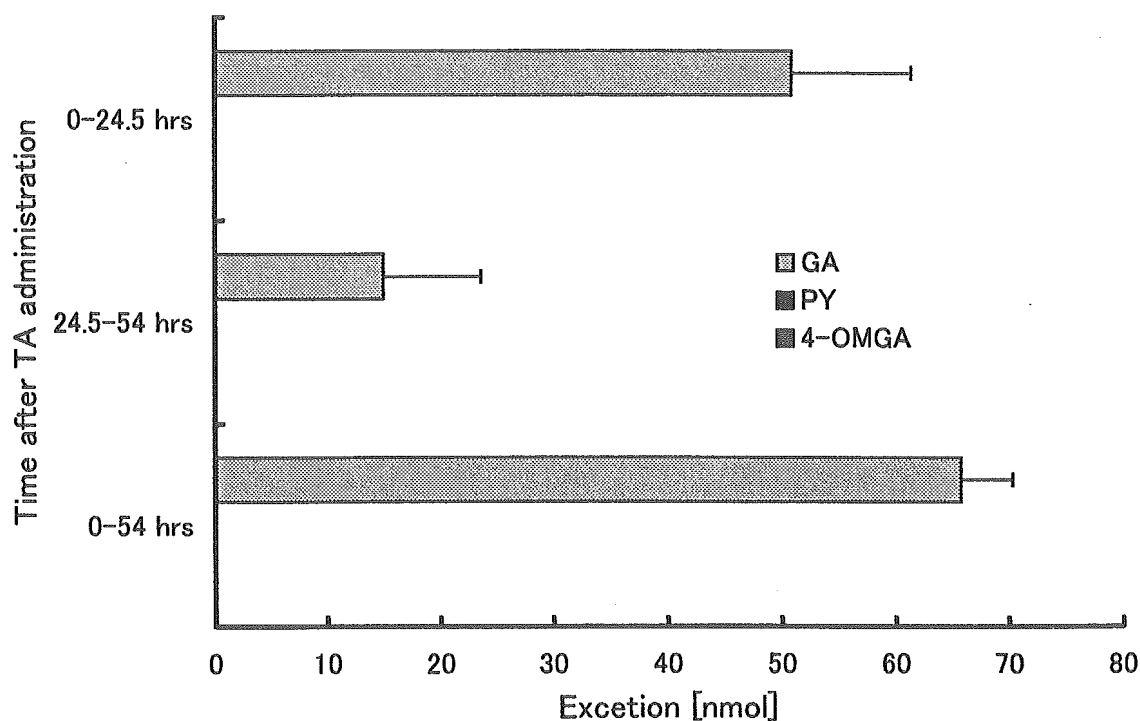


Figure 7 Fecal excretion of tannic acid metabolites as functions of time

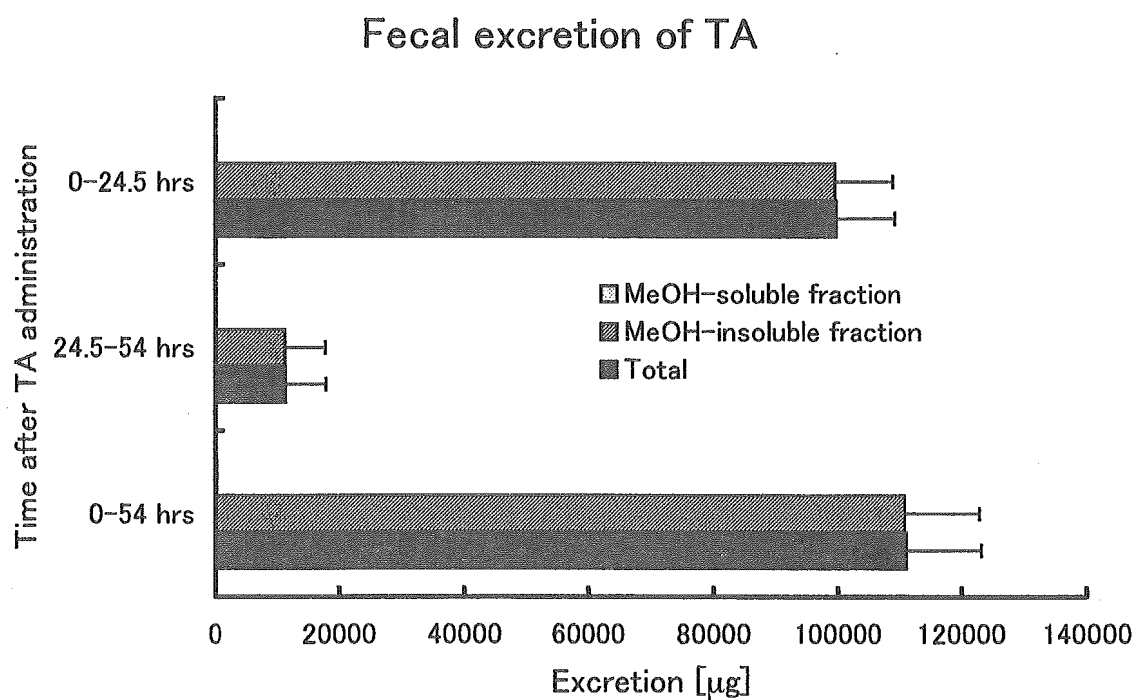


Figure 8 Fecal excretion of tannic acid as a function of time

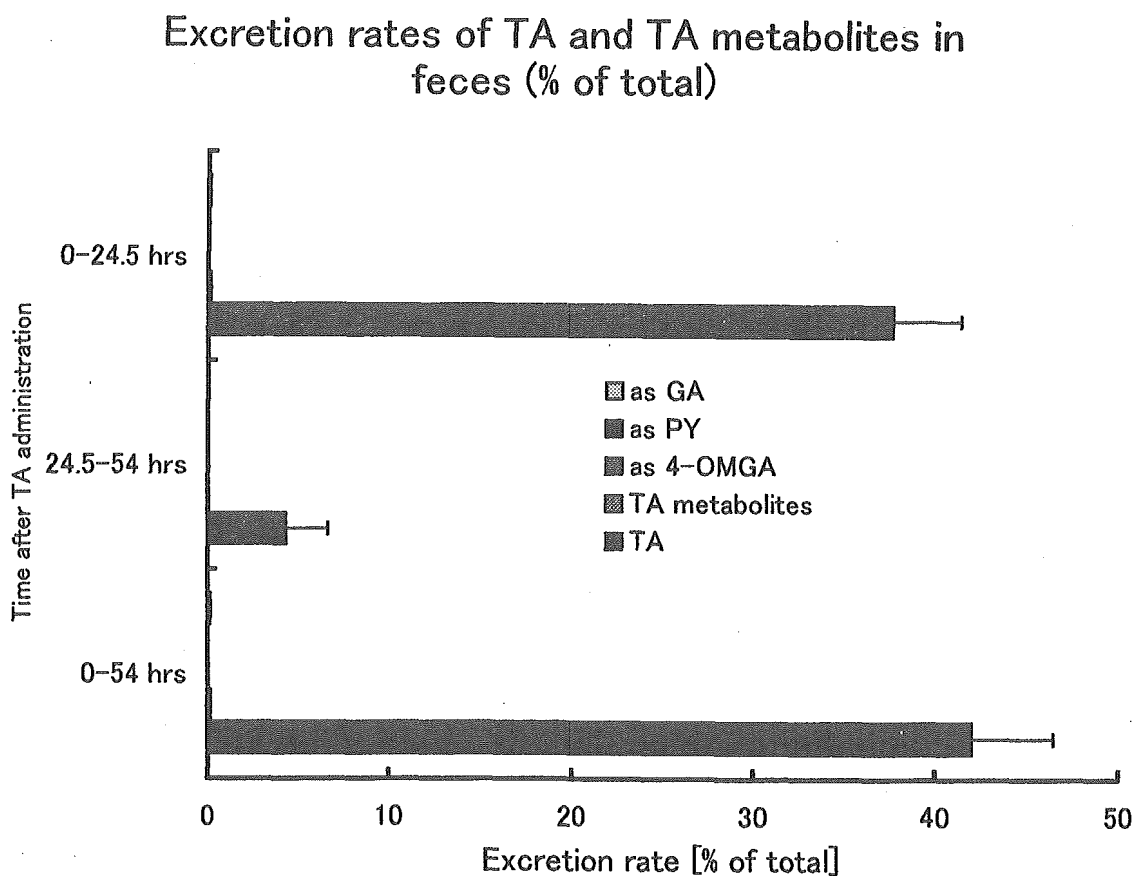
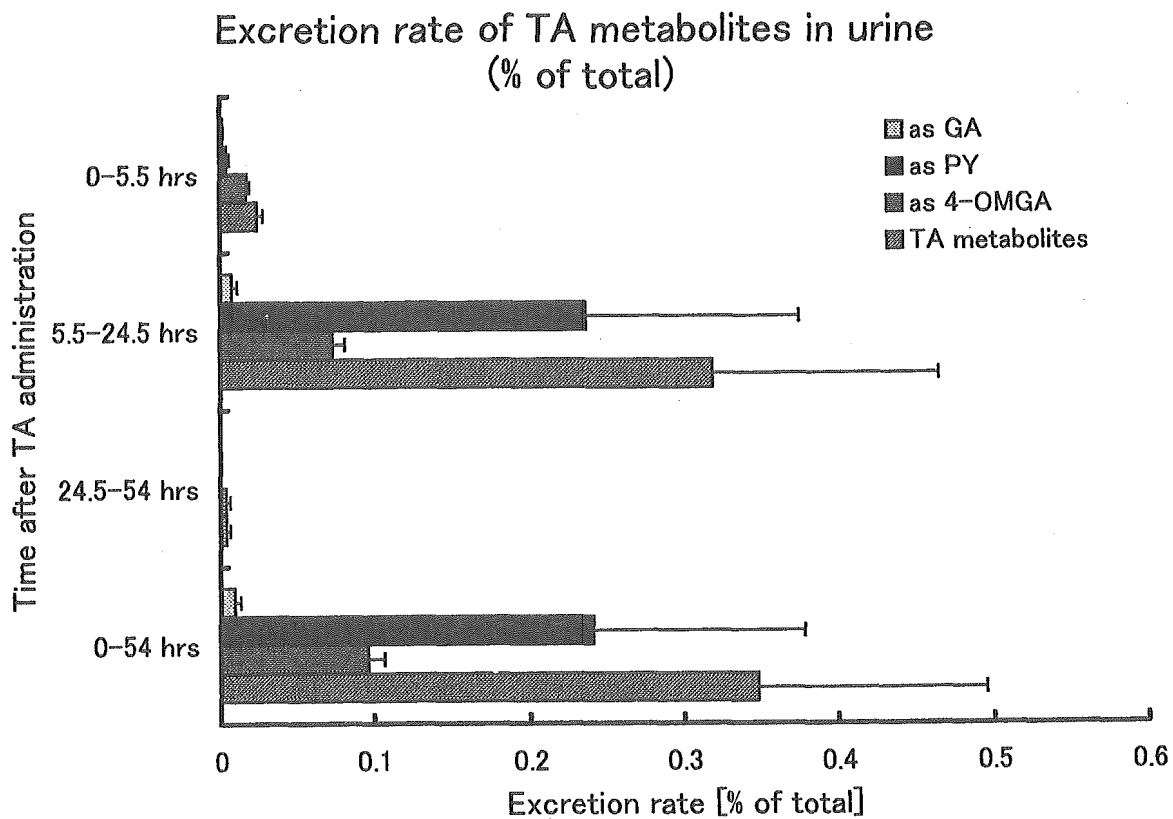


Figure 9 Percentage of tannic acid and its metabolites excreted into urine and feces [% of dose]

Table 1 Relative retention times and detection limits of polyphenols by STR ODS-II column

Polyphenol ¹⁾	Molecular weight	Relative retention time (flavone = 1.00) (determined by DAD)	Detection limit (S/N = 3) [pmol/mL]		Linear range of calibration curve [pmol/mL] (\bar{n})	
			Fluorescence (Ex 283 nm, Em 317 nm) (210 nm except 260 nm for EA)	Ultraviolet (210 nm except 260 nm for EA)	Fluorescence (Ex 283 nm, Em 317 nm) (210 nm except 260 nm for EA)	Ultraviolet
CT	290.3	0.585	13.6	67.8	13.6-6780 (0.995)	67.8-13560 (1.000)
EC	290.3	0.676	13.8	69.2	13.8-6920 (0.995)	69.2-13836 (1.000)
ProB1	578.5	0.535	37.6	37.6	37.6-3730 (0.993)	37.6-7468 (0.998)
ProB2	578.5	0.634	23.8	47.5	23.8-4750 (0.994)	47.6-9510 (1.000)
ProC1	866.8	0.695	12.9	51.4	12.9-2570 (0.995)	37.3-7468 (1.000)
GA	170.1	0.312		106		532-21260 (0.999)
3-OMGA	184.1	0.494		221		276-11060 (0.996)
4-OMGA	184.1	0.515		108		1077-10770 (0.998)
3,4-OMGA	198.2	0.725		103		257-10280 (0.999)
PY	126.1	0.276		809		1618-16180 (0.990)
EA	338.1	0.750		80.2		1003-4010 (0.958)
GC	306.3	0.436		29.3		145-58642 (0.997)
EGC	306.3	0.549		63.9		319-63866 (0.994)
CG	442.4	0.706		43.2		216-43220 (0.992)
ECG	442.4	0.753		232		116-46476 (0.993)
GCG	458.4	0.706		20.9		418-41800 (0.991)
EGCG	458.4	0.684		81.0		405-40490 (0.981)
TGG	788.6	0.734		236		473-23638 (0.995)
PGG	940.7	0.734		48.8		249-24918 (0.998)
Flavone (IS)	222.2	1.000				

1) Abbreviations are: CT, (+)-catechin; EC, (-)-epicatechin; ProB1, procyanidin B1; ProB2, procyanidin B2; ProC1, procyanidin C1; GA, gallic acid; 3-OMGA, 3-O-methyl gallic acid; 4-OMGA, 4-O-methyl gallic acid; 3,4-O-methyl gallic acid; EA, ellagic acid; PY, pyrogallol; GC, (-)-gallic acid; EGC, (-)-epigallocatechin; CG, (-)-catechin gallate; ECG, epicatechin gallate; GCG, (-)-gallocatechin gallate; EGCG, (-)-epigallocatechin gallate; TGG, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose; and PGG, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose.

Conditions for HPLC are as follows: Apparatus, Shimadzu Class VP series (pump LC-10ADVP + degasser DGU-14A + system controller SCL-10ADVP + autoinjector 10ADVP + column oven CTO-10ACVP + diode array detector (DAD) SPD-M10AVP + fluorescence detector RF-10AXL); column, STR ODS-II (ϕ 4.6 mm \times 250 mm); column oven temperature, 35 °C; mobile phase, (A) water/phosphoric acid 1000:1 (v/v), (B) acetonitrile/phosphoric acid 1000:1 (v/v); gradient program B, 0% (0 min) \rightarrow 15% (20 min) \rightarrow 30% (25 min) \rightarrow 100% (45-61 min) \rightarrow 0 (62-77 min); fluorescence detector, ex 283 nm, em 317 nm for CT, EC, Pro B1, Pro B2 and ProC2; DAD, monitoring wavelength, 260 nm for EA and 210 nm for others; injection volume, 10 μ L.

Table 2 Relative retention times and detection limits of polyphenols by Develosil 300 ODS-HG-5 column

Polyphenol ¹⁾	Molecular weight	Relative retention time (Flavone = 1.00) (determined by DAD)	Detection limit (S/N =3) [pmol/mL]		Linear range of calibration curve [pmol/mL] (r)	
			Fluorescence (Ex 283 nm, Em 317 nm)	Ultraviolet (210 nm except 260 nm for EA)	Fluorescence (Ex 283 nm, Em 317 nm)	Ultraviolet (210 nm except 260 nm for EA)
CT	290.3	0.507	33.9	170	67.8-13560 (1.000)	167-13560 (0.999)
EC	290.3	0.607	34.6	173	69.2-13836 (1.000)	173-13836 (0.999)
ProB1	578.5	0.467	83.4	167	83.4-7468 (0.998)	167-7468 (0.997)
ProB2	578.5	0.568	47.6	238	47.6-9510 (1.000)	119-9510 (0.998)
ProC1	866.8	0.649	37.3	187	37.3-7468 (1.000)	187-7468 (0.998)
GA	170.1	0.239		532		532-21260 (0.999)
3-OMGA	184.1	0.414		276		276-11060 (0.996)
4-OMGA	184.1	0.436		539		1077-10770 (0.998)
3,4-OMGA	198.2	0.672		257		257-10280 (0.999)
PY	126.1	0.223		1618		1618-16180 (0.990)
EA	338.1	0.748		1003		1003-4010 (0.958)
GC	306.3	0.357		145		145-58642 (0.997)
EGC	306.3	0.475		319		319-63866 (0.994)
CG	442.4	0.669		216		216-43220 (0.992)
ECC	442.4	0.732		116		116-46476 (0.993)
GCG	458.4	0.669		418		418-41800 (0.991)
EGCG	458.4	0.624		405		405-40490 (0.981)
TGG	788.6	0.720		473		473-23638 (0.995)
PGG	940.7	0.720		249		249-24918 (0.998)
Flavone (IS)	222.2	1.000				

1) Abbreviations are indicated in Table 1.

Conditions for HPLC are the same, except that the column used are Develosil 300 ODS-HG-5.

Table 3 Reactivity of polyphenol to tannase

Compounds		Contents			Tannase reactivity	GA yield [w/w %]	Detected compounds GC
		MW	[μ g]	[nmol]			
CG	Flavan-3-ol	442.4	191.2	432.2	○	32.59±0.28	GA+CT
ECG	Flavan-3-ol	442.4	205.6	464.7	○	31.72±0.45	GA+EC
GC	Flavan-3-ol	306.3	179.6	586.4	×		GC
EGC	Flavan-3-ol	306.3	195.6	638.6	×		EGC
GCG	Flavan-3-ol	458.4	191.6	418.0	○	32.04±0.51	GA+GCG
EGCG	Flavan-3-ol	458.4	185.6	404.9	○	32.31±0.50	GA+EGC
EA		338.1	135.5	400.8	×		
TGG	gallotannin	788.6	186.4	236.4	○	61.93±1.44	GA
PGG	gallotannin	940.7	234.4	249.2	○	61.47±1.36	GA
TA	gallotannin		202.4		○	80.60±0.12	GA
Polyphenon-100	green tea polyphenol		204.4		○	23.58±1.28	GA+GC+EGC+CT+EC

Table 4 Recoveries of tannic acid (TA) and their metabolites from serum, urine and feces

Polyphenol ¹⁾	Added amounts	Serum 0.5 mL	Urine 2 mL/50 mL for 1 day	Dried feces 0.2 g	
				Methanol-soluble fraction	Methanol-insoluble fraction
GA	53.2 nmol	108.3±3.4	85.3±2.4	94.5±1.9	not determined
3-OMGA	22.1 nmol	not determined	86.2±7.5	95.2±1.8	not determined
4-OMGA	21.5 nmol	96.8±4.3	83.1±2.7	95.9±1.6	not determined
3,4-OMGA	20.6 nmol	97.4±3.3	66.8±7.4	99.2±2.3	not determined
PY	32.4 nmol	94.7±3.3	87.5±3.6	95.6±1.6	not determined
EA	8.01 nmol	92.3±9.2	97.4±5.0	87.3±3.4	not determined
TA ²⁾	100 μ g	not determined	not determined	97.6±3.7	
	1000 μ g				81.9±5.0

Data are Mean±SD for 3-5 trials.

1) Abbreviations are: TA, tannic acid. Other abbreviations and conditions for HPLC are indicated in Tables 1 and 2.

第2章 ブドウ種子抽出物を含む健康食品中の プロアントシアニジン含量の分析

【研究目的】

ブドウ種子抽出物の有効成分であるブドウ種子ポリフェノールは赤ワイン中の主要なポリフェノールであり、flavan-3-olが重合したプロアントシアニジン (Figure 1)を主体とする縮合型タンニンの一つである¹⁴⁾。ブドウ種子ポリフェノールは *in vitro* で水系では catechin などよりも強い抗酸化作用を示す⁵⁻⁹⁾。近年ブドウ種子ポリフェノールに *in vivo* で抗酸化作用^{10,11)}、X線¹²⁾・紫外線¹³⁾に対する防護作用、肝障害抑制作用^{14,15)}、抗癌或いは抗腫瘍作用¹⁶⁻¹⁸⁾、動脈硬化抑制作用¹⁹⁻²¹⁾、コレステロール低下作用^{22,23)}等有用な作用が報告されるようになり、健康食品素材としても注目を浴びるようになってきた²⁴⁻²⁷⁾。

我が国では、ブドウ種子抽出物は酸化防止剤として既存添加物に指定されている。使用基準はお菓子、水産加工品に0.01～1%の濃度で添加することになっているが、添加物としての使用実績は殆どなく、実際には健康食品用素材として使用されている(日本食品添加物協会、浅野氏による)。国内の主要な生産メーカーはキッコーマン及び常磐植物化学研究所の二社であり、国内の需要は純品換算で約10 t/年とみられている²⁸⁾。

プロアントシアニジンの定量法は比色法が一般的であり²⁹⁾、バニリン-塩酸法^{29,31)}、ブタノール-塩酸法³²⁾、Folin-Ciocalteu法³³⁾等がある。このうちバニリン-塩酸法はカテキン類やプロアントシアニジン類を含む3-O-flavanolに極めて特異的な比色法である。その原理³¹⁾は以下の通りである:バニリンは酸性溶液中でプロトン付加して弱い親電子ラジカルを生じ、フラボノイド環の6或いは8位と反応する。この中間生成物は脱水されて赤色の化合物を生じる。この反応は、2,3位が単結合でB環のm位に遊離水酸基のあるフラバノールとジヒドロカルコンに特異的である。

本研究ではSunら²⁹⁾のバニリン-塩酸法を用い、ブドウ種子抽出物を含む健康食品中のプロアントシアニジンの定量を試みたので、ここに報告する。

【研究方法】

試薬・機器

1) 試薬

カテキン(純度98%以上)は栗田工業より購入した。バニリン及び塩酸は試薬特級を用いた。メタノールは試薬特級以上の品質のものを用いた。アセトニトリル及びn-ヘキサンは残留農薬試験用を用いた。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。

カテキン10 mgをメタノールに溶解し、10 mLに定容し、カテキン標準原液とした。カテキン標準原液をメタノールで希釈し、20-300 µg/mLの標準液を用時調製した。

バニリン及び濃塩酸をメタノールに用時溶解し、1%バニリン溶液及び9N塩酸溶液を調製した。

2) 機器

分光光度計は、Hitachi Spectrophotometer U-3210を用いた。

3) 試料

ブドウ種子抽出物を含む健康食品及びブドウ種子油は大阪府下の小売店で購入した。

健康食品について、固形のもののみはミルで粉砕した。プロアントシアニジン(総フラバノールとして)を 150-250 µg/mL 含む様に試料(粉体)を採取し、メタノールに溶解し、試料液とした。必要に応じて遠心分離(3000 rpm × 10分)し、上澄液を用いた。

ブドウ種子油については n-ヘキサン/アセトニトリル分配により脱脂した。即ち、試料 1 g を採取して n-ヘキサン 30 mL に溶解し、n-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL による振盪抽出を 3 回行った。アセトニトリル層を合わせ、減圧乾固後メタノール 2mL に溶解し、試料液とした。

実験方法

Sun ら²⁹⁾のバニリン-塩酸法により、全フラバノール含量をカテキン換算で求めた。詳細は以下の通りである。

1-1) 試験管に

- ①メタノール 1 mL + メタノール 2.5 mL + 9N 塩酸溶液 2.5 mL (コントロールゼロ)
- ②標準或いは試料溶液 1 mL + メタノール 2.5 mL + 9N 塩酸溶液 2.5 mL (コントロール)
- ③メタノール 1 mL + 1%バニリン溶液 2.5 mL + 9N 塩酸溶液 2.5 mL (サンプルゼロ)
- ④標準或いは試料溶液 1 mL + 1%バニリン溶液 2.5 mL + 9N 塩酸溶液 2.5 mL (サンプル)

を採り、ボルテックスミキサーでよく混和した。

2) 0℃の水浴中で 20 分静置した。

3) メタノールを対照とし、波長 500 nm における吸光度を測定した。

4) 標準溶液及び試料溶液それぞれについて、下の式に基づき A を算出した。

$$A = (A_s - A_b) - (A_c - A_0)$$

但し、 A_s : サンプルの吸光度

A_b : コントロールの吸光度

A_c : サンプルゼロの吸光度

A_0 : コントロールゼロの吸光度

標準溶液の A を用いて検量線を作成し、試料溶液の全フラバノール含量を算出した。

【研究結果及び考察】

本法による検出限界は 5 µg ((+)-catechin として)であり、10-400 µg の範囲で検量線の直線性が成立した。

様々なポリフェノールに対するバニリン-塩酸法の発色度を調べた結果を Table 1 に示した。23 種の標準品及び 6 種のポリフェノールのうち、バニリン-塩酸法で発色したのは flavan-3-ol, procyanidin oligomer, これらを含むブドウ種子ポリフェノール及び緑茶ポリフェノールのみであり、flavone, isoflavone, phenolic acid, gallotannin はバニリン-塩酸法では全く発色しなかった。各化合物の mol あたりの発色性については化合物の形態による差があり、procyanidin 類では重合度が高いほど発色性が高く、galloyl 基が多くなるほど発色性が低くなる傾向があった。また、

epicatechinの方が catechinより発色性が高い傾向があった。

バニリン-塩酸法の発色度について、Sarkar ら³¹⁾は dihydrochalcone がバニリン-塩酸法で発色すること及び flavanone も発色性は低いが発色することを示している。また、Procyanidin の重合度が高くなるほど発色性が高くなる現象はこれまで複数の研究者が報告している²⁹⁾。Sun ら²⁹⁾はバニリン-塩酸法に関する様々なパラメーターの検討を行い、反応系の水の含量が高くなるほど発色性が低くなることを示した。さらに、塩酸の代わりに硫酸を用いる方が感度が高く、Procyanidin の重合度による差が小さく測定値に誤差が少なくなるとして、バニリン-硫酸法を推奨している²⁹⁾。

本法によるブドウ種子抽出物を含む健康食品及びブドウ種子油中のプロアントシアニジン量(3試行)を Table 2 に示す。GSP-1 及び GSP-2 はメタノールに不溶な成分が存在したが、ばらつきも少なく、自主規格基準法による値より若干高めではあったがよく合致する定量値が得られた。

健康食品について、A 及び B のように高濃度のエキスやタンパク質を含まない比較的単純な組成の健康食品については表示量以上のプロアントシアニジンが検出された。しかし、C のように高濃度のタンパク質を含有していたり、D のように高濃度の共存エキスにより着色している場合は、プロアントシアニジンの定量値は表示より低かった。本実験では添加回収実験を行っていないので断定はできないが、高タンパク食品の場合はブドウ種子ポリフェノールが蛋白質と結合する性質を持ち本法によるプロアントシアニジン定量は困難である可能性も考えられる。尚、ブドウ種子油についてはプロアントシアニジンは検出されなかった。

【引用文献】

- 1) B. Bartolomé, T. Hernández, M. L. Bengoechea, C. Quesada, C. Gómez-Cordovés and I. Estrella: Determination of some structural features of procyanidins and related compounds by photodiode-array detection. *J. Chromatogr. A.*, **723**, 19-26 (1996).
- 2) V. A. P. de Freitas, Y. Glories and M. Laguerre: Incidence of molecular structure in oxidation of grape seed procyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 376-382 (1998).
- 3) S. A. Lazarus, G. E. Adamson, J. F. Hammerstone and H. H. Schmitz: High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3693-3701 (1999).
- 4) Z. Peng, Y. Hayasaka, P. G. Iland, M. Sefton, P. Hø and E. J. Waters. Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reversed phase high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 26-31 (2001).
- 5) G. W. Plumb, S. de Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, V. Cheynier and G. Williamson: Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerization, galloylation and glycosylation. *Free Rad. Res.*, **29**, 351-358 (1998).
- 6) S. L. Nuttall, M. J. Kendall, E. Bombardelli and P. Morazzoni: An evaluation of the antioxidant activity of a standardized grape seed extract, Leucoselect®. *J. Clin. Pharm. Ther.*, **23**, 385-389 (1998).
- 7) 細山浩, 有賀敏明: 健康食品素材としてのブドウ種子抽出物. *FOOD Style* **21**, **2**, 66-70 (1998).

- 8) 有井雅幸: ポリフェノールの王様ブドウ種子ポリフェノールの魅力 主成分'プロアントシアニジン'の生理作用にせまる. *New Food Industry*, **41**, 43-48 (1999).
- 9) N. S.-C. de Gaulejac, C. provost and N. Vivas: Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 425-431 (1999).
- 10) T. Koga, K. Moro, K. Nakamori, J. Yamakoshi, H. Hosoyama, S. Kataoka and T. Ariga: Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of procyanidin-rich extract from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1892-1897 (1999).
- 11) D. Bagchi, M. Bagchi, S. J. Stohs, D. K. Das, S. D. Ray, C. A. Kuszynski, S. S. Joshi and H. G. Pruess: Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, **148**, 187-197 (2000).
- 12) J. Castillo, O. Benavente-García, J. Lorente, M. Alcaraz, A. Redondo, A. Ortuño and J. A. Del Rio: Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): Comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1738-1745 (2000).
- 13) M. Carini, G. Aldini, E. Bombardelli, P. Morazzoni and R. M. Facino: UVB-induced hemolysis of rat erythrocytes: Protective effect of procyanidins from grape seeds. *Life Sci.* **67**, 1799-1814 (2000).
- 14) G. Y. Sun, J. Xia, J. Xu, B. Allenbrand, A. Simonyi, P. K. Rudeen and A. Y. Sun: Dietary supplementation of grape polyphenols to rats ameliorates chronic ethanol-induced changes in hepatic morphology without altering changes in hepatic lipids. *J. Nutr.* **129**, 1814-1819 (1999).
- 15) S. S. Joshi, C. A. Kuszynski, M. Bagchi and D. Bagchi: Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells. *Toxicology*, **155**, 83-90 (2000).
- 16) J. A. Bomster, K. W. Singletary, M. A. Walling and M. A. L. Smith: Inhibition of TPA-induced tumor promotion in CD-1 mouse epidermis by a polyphenolic fraction from grape seeds. *Cancer Lett.*, **135**, 151-157 (1999).
- 17) J. Zhao, J. Wang, Y. Chen and R. Agarwal: Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seedss 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).
- 18) C. Agarwal, Y. Charma and R. Agarwal: Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: Modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis. *Mol. Carcinogenesis*, **10**, 103-111 (1997).
- 19) J. Yamakoshi, S. kataoka, T. Koga and T. Ariga: Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, **142**, 139-149 (1999).
- 20) 有井雅幸: ブドウ種子ポリフェノール(プロアントシアニジン) - LDLの酸化を抑え, 動脈硬化発症を抑制する. *ビタミン*, **73**, 747-749 (1999).
- 21) D. F. Fitzpatrick, R. C. Fleming, B. Bing, D. A. Maggi and R. M. O'Malley: Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 6384-6390 (2000).

- 22) K. Tebib, L. Bitri, P. Besançon and J.-M. Rouanet: Polymeric grape seed tannins prevent plasma cholesterol changes in high-cholesterol-fed rats. *Food Chemistry* **49**, 403-406 (1994).
- 23) K. Tebib, P. Besançon and J.-M. Rouanet: Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *J. Nutr.*, **124**, 2451-2457 (1994).
- 24) 有賀敏明:ブドウ種子中の抗酸化物質プロアントシアニジン. 食品衛生学雑誌, **40**, J-440-J442 (1999).
- 25) 有賀敏明:プロアントシアニジン(ブドウ種子抽出物)の機能性解明とその応用. その1 機能性解明. 食品工業, **1999-10.30.**, 44-52 (1999).
- 26) 有賀敏明:プロアントシアニジン(ブドウ種子抽出物)の機能性解明とその応用. その2 応用. 食品工業, **1999-11.30.**, 51-55 (1999).
- 27) 有賀敏明:ブドウ種子抽出物(プロアントシアニジン)の抗酸化機能及び生体防御機能並びにその応用. *JAFAN*, **20**, 53-64 (2000).
- 28) マーケットビュー 抗酸化食品. 本誌推計 ハーブや藻類由来が成長 ビタミンCやEをしのぐ伸び. 日経バイオビジネス, 2001年11月号, 129-130.
- 29) B. Sun, J. M. Ricardo-da-Silva, I. Spranger (1998): Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4267-4274.
- 30) J. L. Goldstein, T. Swain (1963): Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry* **2**, 371-383.
- 31) S. K. Sarkar & R. E. Howarth (1976): Specificity of the vanillin test for flavanols. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 317-320.
- 32) L. J. Porter, L. N. Hrstich, B. G. Chan (1986): The conversion of proanthocyanidins and prodelphehidins to cyanidins and delphenidins. *Phytochemistry* **25**, 223-230.
- 33) V. L. Singleton, J. A. Rossi, Jr. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.

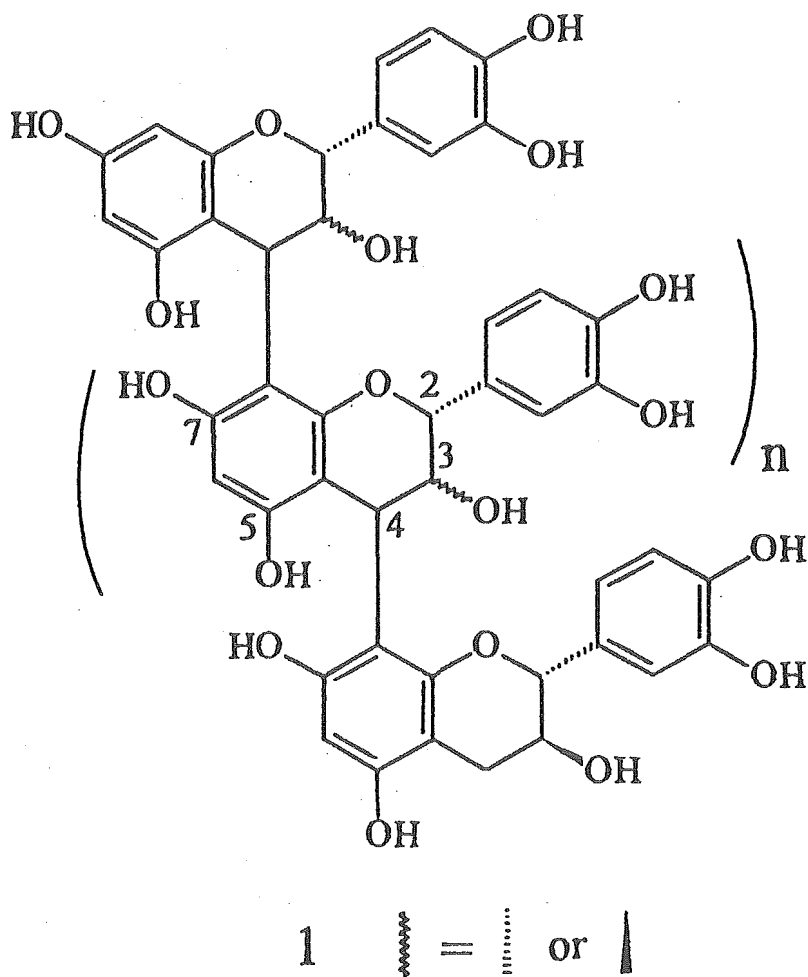


Figure 1 Proanthocyanidins

Table 1 Reactivity of various polyphenol to vanillin-HCl method

Compounds Trivial name	Category	Molecular weight	Vanillin-HCl method		Sensitivity (Catechin as 1.000) per mg	per μmol
			Reactivity	λ_{max} [nm]		
Flavone	Flavone	222.2	×	—	—	—
Diosmetin	Flavone	300.3	×	—	—	—
Quercetin	Flavonol	302.2	×	—	—	—
Rutin	Flavonol O-glycoside	610.5	×	—	—	—
Genistein	Isoflavone	270.2	×	—	—	—
Daidzein	Isoflavone	254.2	×	—	—	—
Formononetin	Isoflavone	268.3	×	—	—	—
Biochanin A	Isoflavone	284.3	×	—	—	—
Genistin	Isoflavone O-glycoside	432.4	×	—	—	—
Daidzin	Isoflavone O-glycoside	416.4	×	—	—	—
(+)-Catechin	Flavan-3-ol	290.3	○	498.6	1.000	1.000
(-)-Epicatechin	Flavan-3-ol	290.3	○	499.2	1.057	1.057
Procyanidin B1	Procyanidin dimer	578.5	○	499.4	1.683	3.354
Procyanidin B2	Procyanidin dimer	578.5	○	499.4	1.747	3.482
Procyanidin C1	Procyanidin trimer	866.8	○	501.0	1.533	4.577
(-)-Gallocatechin	Flavan-3-ol	306.3	○	504.4	0.449	0.474
(-)-Epigallocatechin	Flavan-3-ol	306.3	○	500.0	0.892	0.941
(-)-Catechin gallate	Flavan-3-ol	442.4	○	504.0	0.368	0.561
(-)-Epicatechin gallate	Flavan-3-ol	442.4	○	503.2	0.520	0.792
(-)-Gallocatechin gallate	Flavan-3-ol	458.4	○	504.0	0.344	0.544
(-)-Epigallocatechin gallate	Flavan-3-ol	458.4	○	502.0	0.431	0.680
Gallic acid	Phenolic acid	171.1	×	—	—	—
Tannic acid	Gallotannin	—	×	—	—	—
GSP-1	Grape seed polyphenol	—	○	503.8	0.482	—
GSP-2	Grape seed polyphenol	—	○	504.4	0.473	—
GSP-3	Grape seed polyphenol	—	○	502.8	1.118	—
GSP-4	Grape seed polyphenol	—	○	499.8	0.970	—
GSP-5	Grape seed polyphenol	—	○	500.2	1.023	—
Polyphenon-100	Green tea polyphenol	—	○	500.8	0.778	—

To 1 mL of the (+)-catechin solution (0-300 $\mu\text{g/mL}$ in methanol) or the test solution (150-250 $\mu\text{g/mL}$ polyphenols in methanol) in each test tube, 2.5 mL of methanol (control) or 1% vanillin solution in methanol (sample) and 2.5 mL of 9N HCl in methanol was added.

The reaction mixture was incubated for 20min at 30°C. Absorbance at 500 nm was measured by Hitachi Spectrophotometer U-3210.

The following A_0, A_b, A_c, A_s was measured for each standard and sample.

A_0 = Absorbance at 500 nm of the control of (+)-catechin 0 μg (methanol 1 mL + methanol 2.5 mL + 9N HCl 2.5 mL)

A_b = Absorbance at 500 nm of the sample of (+)-catechin 0 μg (methanol 1 mL + 1% vanillin solution 1 mL + 9N HCl 2.5 mL)

A_c = Absorbance at 500 nm of the control [(+)-catechin (20-300 $\text{mg}/\mu\text{L}$) or test solution 1 mL + methanol 2.5 mL + 9N HCl 2.5 mL]

A_s = Absorbance at 500 nm of the sample [(+)-catechin (20-300 $\text{mg}/\mu\text{L}$) or test solution 1 mL + 1% vanillin 2.5 mL + 9N HCl 2.5 mL]

Then, A was calculated for each standard and sample solution from the following equation: $A = (A_s - A_b) - (A_c - A_0)$.

Calibration curve was prepared using A for (+)-catechin solution. Total flavan-3-ol in each test solution was calculated from the calibration curve.

Table 2 Contents of procyanidins in health foods

Sample name	Manufacturer	Contents of procyanidins [mg/g]	Indication by manufacturer	Recommended intake indicated by manufacturer	Indication	Comments on the label
Health food A	A	239.8±1.5	200 (100 mg/500 mg)	100 mg/day	Tablet 500 mg per 2 tablets	Per 2 tablets (500 mg): Proanthocyanidin 100 mg Na 0.0336% Carbohydrates 90.6% Lipids 4.6% Protein 1.4% 2.05 Kcal
Health food B	B	249.6±0.6	200 (100 mg/500 mg)	100 mg/day	Tablet 500 mg per 2 tablets	Per 2 tablets (500 mg): Proanthocyanidin 100 mg Na 0.0336% Carbohydrates 90.6% Lipids 4.6% Protein 1.4% 2.05 Kcal
Health food C	B	0.109±0.004	10 (1 g/100 g)	no indication	Powder (sticky) Take about 10 g with dissolving in 200 mL of milk, apple juice or water.	Per 100 g: Proanthocyanidin 1 g Protein 81 g Lipids 0.3 g Carbohydrates 9.8 g Others (vitamins, minerals) 366 Kcal
Health food D	C	19.49±0.19	33.3 (50 mg/1.5 g)	50 mg/day	Tablet 1.5 g per 6 tablets	Per 6 tablets (1.5 g): grape seed extract 50 mg Melilotus extract 300 mg Citrus extract 300 mg Aloe dry powder 200 mg Fucus extract 120 mg Calcified seaweed 120 mg Marronier bark extract 100 mg 5.30 Kcal
Grape seed oil A	D	not detected	no indication	no indication	Oil (green colored)	Lipids 100% 900 Kcal per 100 g
Grape seed oil B	E	not detected	no indication	no indication	Oil (yellow-green colored)	Lipids 100% 900 Kcal per 100 g

Data are means±SD (n=3).
Procyanidins were analyzed by vanillin-HCl method as total flavanol.
Lipids in the grape seed oil was excluded by n-hexane/acetone/nitrite partition method.

中枢神経機能を指向する新開発食品等の安全性に関する研究

志村二三夫:十文字学園女子短期大

【研究目的】

中枢神経機能を指向するハーブ、すなわちイチョウ葉(脳循環代謝・認知機能改善)、セイヨウオトギリソウ(抗うつ)、カバ(抗不安)はその有効性を見れば、ハーブの中の優等生ともいえる¹⁾。これらについては、ランダム比較臨床試験やメタアナリシスが実施され、有効性や安全性に関してある程度評価が定まってきており、高齢社会・ストレス社会が抱える心の生活習慣病、精神保健上の問題への効果が期待できるからである¹⁾。

このうちカバは、これまで我国では食薬区分が明確化されていないままに栄養補助食品等の名目で、その抽出物を粒剤等の形態にした製品が販売されているという実態があり、安全性確保の面で問題があることを既に筆者は指摘した²⁾。最近になって、すなわち平成 13 年 3 月 27 日の厚生労働省医薬局長通知「医薬品の範囲に関する基準の改正について」において、カバの根は専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト(例)に記載されるようになった。しかし、現実にはカバは依然として食品として販売されている実態がある。新開発食品の安全性確保の観点から、カバはしばらく目が離せない状況にあるといえる。

生薬としてのカバの歴史は長いが、近年の関心はその抽出物の抗不安作用にあり、多くのランダム化比較臨床試験がなされ、例えば、DSM-ⅢR(米国精神医学会編:精神疾患の分類と診断の手引第3版改訂(1987))により、不安障害(広場恐怖症、特定の恐怖症、社会恐怖症、全般性不安障害、不安を伴う適応障害のいずれかまたは重複)と診断された外来患者 101 名を対象に、規格抽出物 WS 1490 の効果が検討されている³⁾。

その試験の概要を示すと、WS 1490 の服用量は 1 カプセル当たり 90-110 mg [kavalactones を 70 mg 含有]のものを、1 日 3 回であり、期間は 24 週間である。被験者の平均年齢は 54 歳で、男女比は 27/73 である。不安症状は中等度ないし重度、すなわち Hamilton Anxiety Scale (HAMA) の総スコアが 19 以上(総スコアの平均値は 31)である。HAMA は不安に関する症状 13 項目を 5 段階で評価する尺度であるが、さらにほかの他者評価尺度、および自記式評価尺度をもとに、WS1490 による精神症状・身体症状の改善が確認されている。試験への認容性もプラセボに比べて WS1490 の方が良好であった。最近のメタ分析でも、不安症状の治療にカバ抽出物はプラセボより有効であることが確認されている⁴⁾。しかし安全面での検討が十分になされているようには見受けられない。

これらを背景に、今年度は主にカバを対象に実験研究を進めることとした。また、カバについての研究を実施することで、ハーブに共通の問題性や参考となる点が浮き彫りにされる可能性もある。今年度は、とくに肝臓の薬物代謝酵素 cytochrome P450 の分子種の誘導作用の面を中心に据えて検討した。

【実験材料ならびに方法】

(1) 試薬等

カバ抽出物(KVと省略する)を成分本質とし、Dietary Supplementとして販売されている Kava Pro という製品を Emerson Ecologics (<http://www.emersonecologics.com/main.asp>) より、インターネット取引で購入した。この製品の販売元は、ドイツの Schwabe 社 (Dr. Wilmar Schwabe GMBH & Co) の 100%子会社に当たる Murdock Madaus Schwabe Professional Products Inc. (米国ユタ州) である。Schwabe 社は KV の規格抽出物 WS1490 を用いた製品 (Laitan®) の製造元である。WS1490 については、上記のように多くのランダム化比較臨床試験・メタアナリシスにおいて不安症状の治療への有効性が確認されている。Kava Pro の組成や摂取方法等は表 1 (結果の項) に示す通りである。

セイヨウオトギリソウ抽出物 (SJW と省略する) を成分本質とする Jarsin300 は、Lichtwer Pharma 社より供与されたものを用いた。この製品は同社による規格抽出物 LI160 を用いた医薬品で、ドイツで軽度ないし中等度のうつ病の治療によく用いられており、ランダム比較臨床試験による検討例が盛んになされており、その有効性を認めたメタアナリシスが少なくない⁵⁾。バルクのセイヨウオトギリソウ抽出物粉末は(株)皇漢薬品研究所 (東京) より購入した。

カタレプシー試験に用いた haloperidol はシグマ社より購入した。SV Total RNA Isolation System はプロメガ (株) より、Rat Cytochrome P450 Competitive RT-PCR Set, Takara RNA LA PCR kit (Ver 1.1), およびプレキャストゲル (Reliant Gel System, 4% Nusieve 3:1) は宝酒造 (株) より購入した。他の試薬類はすべて特級ないし同等以上のものを用いた。実験に用いた水 (MQ) は、超純水装置 Mili-Q (日本ミリポア (株)) により調製した。

(2) 実験動物

体重約 200 g の SD 系の雄ラットを(株)埼玉実験動物供給所より入手して、空調システムを 22°C に設定し、6:00-18:00 を明期、18:00-6:00 を暗期とする環境下で飼育した。飲用水は少なくとも 2 日に 1 回は新鮮なものに交換し、オリエンタル酵母製ラット用飼料 MF とともに、自由に摂取させた。

カバ抽出物を連日投与する際は、Kava Pro のソフトカプセルを切開し、内容物を取り出して所定量を秤り取り、MQ を加えてよく攪拌して懸濁させた。このように調製した投与液を、サフィードフィーディングチューブ Fr.5 (テルモ) を用いて体重 1 kg 当たり 10ml の割合で胃内に投与した。カバ抽出物の投与量は、6.4mg/kg BW [KV(6.4)群]、128mg/kg BW [KV(128)群]、あるいは 640mg/kg BW [KV(640)群] とし、1 日 1 回 (11-13 時) の割合で投与した。カバ抽出物の投与期間等については実験結果の項で述べる。Kava Pro は 1 カプセル当たりで 128 mg のカバ抽出物を含み、通常は 1 日にこれを 3 カプセル服用することが推奨されている。ヒトの体重を 60 kg と仮定すると、KV(6.4)群、KV(128)群、KV(640)群の 1 kg 体重当たりのカバ抽出物の摂取量は、推奨摂取量のそれぞれ 1 倍、20 倍、および 100 倍に相当する。対照群のラットには MQ (10ml/kg BW) を投与した。

Cytochrome P450 (CYP) の分子種の遺伝子発現に対するカバの影響の特異性を検討するために、ヒトの常用量の 100 倍に当たるセイヨウオトギリソウ抽出物をラットに投与する実験も行った。この場合は、Jarsin300 の錠剤をテフロンシートにはさみ、ペンチで砕いたのち、ポリトロンホモジナイザーを用いて MQ に懸濁させて投与液を調製した。サフィードフィーディングチューブ Fr.5 を使用して、この投与液を体重 1 kg 当たり 10 ml の割合で胃内に投与した。ヒトにおける Jarsin300 の服用量の目安は、セイヨウオトギリソウ抽出物として 900 mg/day とされているので、体重を 60 kg と仮定すると、推奨量の 100 倍に相当する摂取量は、1,500 mg/kg

BW[SJW(1500)群]となる。対照群のラットには MQ(10 ml/kg BW)を投与した。

さらに、平成 13 年度の報告書²⁾に述べた方法に準じて、バルクのセイヨウオトギリソウ抽出物粉末から、超臨界二酸化炭素を用いて hyperforin 分画を精製し、ラットに投与して CYP 分子種の遺伝子発現への影響を観察した。ただし、前回の精製方法からの多少の変更点として、1回の精製における精製材料は 3g(前回は 1g)とした。この精製操作を 50 回ほど繰り返して、hyperforin 分画をプールし、約 500mg の hyperforin を含む分画を得た。この分画に含まれる hypericin は痕跡程度で、pseudohypericin は検出されなかった。得られた hyperforin 分画はコーン油に溶解させ、14.4mg/kg BW(1ml/kg BW)の用量で 1 日に 1 回(11-13 時)ずつ、8 日間にわたって連日投与した。対照ラットにはコーン油を投与したが、CYP 分子種の遺伝子発現へのコーン油投与の影響を認めるには至らなかった。よって、結果の項には、Jarsin300 および Kava Pro 投与ラットの対照に当たる水のみを投与したラットにおける結果を提示した。

飼育最終日の前日より絶食させ(~18時間)たラットを断頭屠殺し、血液を採取した後、肝臓を速やかに摘出し、トータル RNA の調製を行った。血清は、凝固血液を 700 x g, 20 分間遠心し、上清として得た。

haloperidol 誘発性カタレプシー試験、鎮痛試験、直腸温の測定等において Kava Pro の 1 回投与の影響を調べる場合は、128mg/kg BW の投与量を採用した。投与液の調製・投与方法・投与時刻は上記と同様に行った。

(3) haloperidol 誘発性カタレプシー試験

Hoffman と Donovan⁶⁾により報告されている方法に準じて実施した。ラットに 128mg/kg BW の Kava Pro(対照ラットには MQ)を 1 回投与した 1 時間後に、100 μ g/kg BW の haloperidol を背部皮下に注射した。haloperidol の投与液は、その 4 mg を 9.8 ml の 1%乳酸に完全に溶解させた後、これに 0.2ml の 0.1 N NaOH を加えて調製した。その投与液量は 0.5 ml/kg BW とした。haloperidol 投与後 60~150 分にかけて、水平バー方式のカタレプシーテストを行った。すなわち、テーブル面から 10 cm の位置に水平に置いたバーにラットを両手で掴ませ、体をあずけさせた後、ラットがバーから片手を放すまでの時間を記録した。水平バーはアルミパイプにゴム管を被せ、外形がほぼ 10 mm となるようにして用いた。無動時間が 180 秒以上に及んだ場合は、その時点で測定を打ち切り、180 秒の値をデータに用いた。

(4) 鎮痛試験

痛覚刺激に対する KVext 投与の影響を検討するために、Jamieson と Duffield が報告⁷⁾している方法を用いて実施した。すなわち、128mg/kg BW の Kava Pro を上述のようにラットの胃内に 1 回投与した後、経時的に尾部先端(3-4 cm)を温湯(48℃)中に浸し、ラットが尾を温湯から引き上げるまでの時間を測定した。ただし、ラットを試験に慣れさせるために、実際の試験を行うほぼ 24 時間前に、15 分ごとに 1 回の割合で計 4 回の試行試験を行った。

(5) 直腸温の測定

128mg/kg BW の Kava Pro を 1 回投与したラットについて、直腸温測定用プローブ(RET-2:Physitemp Instruments 社)を用い、BDT-100 型デジタルサーモメーター(バイオリサーチセンター(株))にて測定した。

(6) 血液生化学検査

血液化学検査は血清を試料として、生化学自動分析装置(富士ドライケム 3500S:富士写真フィルム)を用いて実施した。検査項目は次の通りである: GGT (γ

-glutamyltranspeptidase), GOT (L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase), GPT (L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase), ALP(alkaline phosphatase), LAP(leucine aminopeptidase), AMYL(amylase), GLU(グルコース), BUN(尿素窒素), CRE(クレアチニン), UA(尿酸), TCHO(総コレステロール), HDL(HDL-コレステロール), TG(中性脂肪), TBIL(総ビリルビン), TP(総タンパク質), ALB(アルブミン), Ca(総カルシウム), IP(無機リン), Mg(マグネシウム), NH₃(アンモニア).

(7) Competitive RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)によるラット肝臓における CYP 分子種の mRNA の発現の検討

新鮮なラット肝臓の肝葉のほぼ中央部からその一部を摘出し、約 30 mg の組織を得た。これを材料に、SV Total RNA Isolation System を用いて、概ねマニュアルに従って全 RNA (A260/A280≒2.0) を調製した。ただし、組織片を可溶化させる際、ディスパーザブルペッセルを用いて十分に攪拌を行った。Ultrospec 300 Pro 紫外・可視分光光度計(アマシャム ファルマシア バイオテック社)を用いて RNA 濃度を測定し、通常は 250ng RNA/μl に調整した試料について、Rat Cytochrome P450 Competitive RT-PCR Set および Takara RNA LA PCR Kit (AMV) Ver 1.1 を用いて、マニュアルの通りに逆転写反応を行った。その際、1分子中に cytochrome P450(8分子種)および cyclophilin のプライマー配列を含む RNA competitor を、1サンプルにつき4段階に濃度を変えて共存させ、反応を行った。次いで、各分子種に対するプライマーを添加した後、定法に従ってポリメラーゼ連鎖反応を行い、増幅産物についてアガロース製のプレキャストゲルを用いて泳動した。泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色した後、トランスイルミネーターによる紫外線照射下で画像データをプリントグラフ AE-6914 型(アトー(株))で記録した。

(8) その他

実験結果の統計処理には、統計解析用ソフトウェア StatView を用いた。

【結果】

I. Kava Pro の有効性に関する検討

今回実験に使用したカバ抽出物製品(Kava Pro)の組成や摂取方法等は表1に示した通りである。ヒトの臨床試験においてカバ抽出物(とくに WS1470)が抗不安作用を示すことはほぼ確立されていると考えられるので、その機序との関連は措くとしても、Kava 抽出物は実験動物においても当然何らかの行動薬理的な作用を示すものと期待される。筆者はすでに昨年度、表1に示す国内販売されている製品が haloperidol により誘発されるカタレプシーを抑制することを報告した²⁾が、この現象はカバ抽出物の行動薬理的な有効作用の一面と捉えることができると考えられる。そこで、Kava Pro について検討してみた。

(1) haloperidol 誘発性カタレプシーへの Kava Pro 投与の効果

カタレプシー(catalepsy)は動物に不自然な姿勢をとらせてもそのまま維持する状態を意味しており、脳内黒質-線条体におけるドパミン作動性神経の機能低下を反映した行動で、ヒトの錐体外路症状、とくにパーキンソン症状と関連している^{8, 9)}。haloperidol はメジャートランキライザーとして統合失調症の治療によく用いられており、その作用機序は線条体でのドパミン D₂受容体への強い拮抗作用によるとされているが、副作用としてパーキンソン症候群を生じることが知られている¹⁰⁾。haloperidol を正常動物に投与すると、錐体外路症状をもた

表1 購入したカバ抽出物利用食品の特徴

購入方法	インターネット取引で米国の業者から購入	通信販売で国内の業者から購入
商品名	Kava Pro	*****
食品の種類等	Dietary Supplement	ハーブエキス含有食品
原材料	カバ(根茎)抽出物乾燥品. 55%のカバラクトンを含有.	カヴァカヴァエキス
他の成分	米ヌカ油, ゼラチン, グリセリン, Carob(イナゴマメ)濃縮物, 水, シリカ, 二酸化チタン	微結晶セルロース, 酸化ケイ素, デキストリン, デンプン, グリコール酸ナトリウム, 水素添加植物油, アカシア
内容量	ソフトゲル50個(カバ抽出物128 mg/ソフトゲル)	90粒(450 mg/粒)
推奨摂取量等	1回1カプセル, 1日3回. 推奨量以上を摂取してはならない.	栄養補給のため, 目安として1日6粒程度を2~3回に分けて, そのまま水などと一緒にお召し上がり下さい.
注意事項	妊娠あるいは授乳中の方, またほかの薬を使用の方は, 本品のご使用前にヘルスケアの専門家にご相談下さい. いかなるアルコール飲料とも一緒に摂取してはいけません. 過剰摂取すると, 自動車の運転や重機械の操作に支障をきたすおそれがあります. 18歳以下の方にはおすすすめできません.	アレルギー体質や妊娠中, 授乳期の方は, お召し上がりにならないでください. また, 体調や体質によってまれにあわない場合があります. その場合は中止してください. 薬を服用あるいは, 医師の治療を受けている方はお医者様にご相談のうえ, お召し上がりください.
保存方法	子供の手の届かないところに保管すること.	直射日光をさけ, 乳幼児の手の届かないなるべく涼しい所に密栓して保管して下さい. また, 一度取り出した粒はボトルに戻さないようにして下さい.
使用期限	容器の底に記載.	別途記載
輸入または販売元	MURDOCK MADAUS SCHWABE PROFESSIONAL PRODUCTS INC.	***製薬株式会社
効果・効能等に関する表示	Kava Proは100%ピュアなポリネシア産カバカバの抽出物です. カバカバ(<i>Piper Methysticum</i>)はコショウ科の植物で, ポリネシアの島々の人達に3,000年以上も前から愛用され続けてきました. Kava Proは眠気をもたらしたり, 精神・身体活動の能率や記憶を低下させることはありません. Kava Proのカバラクトン含有量は55%として規格化されており, ほかのカバ抽出物よりも80%も高い濃度になっております. 最近の臨床研究では, 1日当たりのカバラクトンの摂取量として, 210mgが望ましいとされています. Kava Proは最適な効果・純度が得られ, また摂取に便利なように, 濃縮・規格化されています.	現代人の抱える心身の不調の大きな要因としてストレスがあります. ストレスをうまく解消していくことは, 現代人にとって非常に重要です. ***に使用されているカヴァカヴァは南太平洋の島で愛用されてきた植物です. 島の人々は昔から1日をゆったりとした気分で終えるためにカヴァカヴァを使用してきました.
栄養成分とその含有量等	記載なし.	1粒(400 mg)当り カヴァカヴァエキス・・・125 mg エネルギー・・・0.39 kcal タンパク質・・・0.002 g 脂質・・・・・・0.026 g 糖質・・・・・・0.039 g ナトリウム・・・0.60 mg
1日摂取基準量	“確定されていない”との表示.	記載なし.