

（第14回）2018年度・研究助成報告

研究題名	微粉末化した緑茶葉におけるカテキン類の生体内吸収率の向上に伴う機能性発現強化に関する研究
研究期間	2018年4月1日～2020年3月31日
研究機関・所属 研究者名	静岡県立大学食品栄養科学部 増田 修一

1. 2018（2019）年度研究成果の概要

本研究では、静岡県の地場産品である緑茶葉を微粉碎処理し、有効成分であるカテキン類の溶出率及び吸収率が上昇するか、また生体内において、緑茶の機能性が増強するかを明らかにするために実験を行った。緑茶葉原末及び微粉碎処理緑茶葉を各種温度条件で溶出し、溶出液中のカテキン濃度を、HPLCを用いて測定した。その結果、微粉碎処理により、抽出液中へのカテキン類の溶出率は上昇した。また、緑茶葉原末及び微粉碎処理緑茶葉を Wistar ラットに投与し、血液中のカテキン類濃度を測定した。その結果、緑茶葉原末投与投与群と比較して、微粉碎処理緑茶葉投与群において、血中カテキン類濃度が有意に増加した。さらに、鉄ニトリロ三酢酸を投与して、生体内でラジカル反応を誘導させた Wistar ラットに、緑茶葉原末及び微粉碎処理緑茶葉を投与したところ、微粉碎処理緑茶葉投与群において、腎臓における脂質過酸化及び酸化 DNA 損傷が強く抑制された。以上のことより、緑茶葉を微粉碎処理することにより、カテキン類の溶出率、吸収率が増大し、また、生体内でのカテキン類の機能性が増強する可能性が示唆された。

2. 助成期間内での研究成果の概要

1) はじめに

現在、健康食品が数多く市販されており、我々は日常的に摂取しており、厚生労働省では、これら健康食品を「栄養成分を補給し、又は特別な保健の用途に適するものとして販売に供するもので、かつ食品として通常用いる素材から成り、通常の食品の形状、または錠剤・カプセル剤等の形状を成すもの」と定義している。これら健康食品が保持する機能を、より強く生体内で発揮させるためには、含有されている機能性・活性成分が効率よく溶出され、また、生体内において、吸収率が向上することが必要である。しかし、これまでに活性成分の吸収率を向上させる目的で、微粉碎処理等の物理的処理して市販されている健康食品は少ない。

緑茶は、様々な機能性を発揮することが明らかになっており、その機能性の発現には、ポリフェノール類であるカテキン類が寄与している。カテキン類は、緑茶葉

において特に含有量の多い成分であり、緑茶の乾燥物中の10~20%を占めている。茶カテキンには、主に(-)エピカテキン(EGC)、(-)エピカテキンガレート(ECg)、(-)エピガロカテキン(EGC)、(-)エピガロカテキンガレート(EGCg)があり、その機能性として、発がん抑制作用、抗腫瘍作用、突然変異抑制作用、抗酸化作用、血中コレステロール上昇抑制作用、血糖上昇抑制作用、抗菌作用等がある。

本研究では、食品分野における微粉碎技術の有用性を明らかにすることを目的とし、様々な機能性を発揮する緑茶に注目し、緑茶葉を微粉碎処理することにより、機能性成分であるカテキン類の溶出率及び吸収率が上昇するか、さらに生体内での緑茶の機能性(ラジカル捕捉能)の発現が増強するのか、*in vitro*及びラットを用いた*in vivo*試験系を用いて、評価を行った。

(2) 実験方法

① 緑茶葉の微粉碎処理によるカテキン類の溶出率の変動

本研究では、高圧気流を利用して、加熱することなく、粒子を気流中で衝突させて粉碎できるジェットミル微粉碎処理装置(Fig. 1)を用いた。緑茶葉の原末(平均2~3mm)を、微粉碎処理装置により粉碎処理を行い(0.70MPa)、微粉末処理緑茶葉(平均径10 μ m)を得た。恒温相で一定温度(5~95 $^{\circ}$ C)にした水に、試料として、緑茶葉原末及び微粉碎処理緑茶葉を加えて攪拌し、添加3~20分後に、0.2 μ mのフィルターで濾過した後、HPLC分析に供した。試料中のカテキン類((-)エピカテキン(EC)、(-)エピカテキンガレート(ECg)、(-)エピガロカテキン(EGC)、(-)エピガロカテキンガレート(EGCg))濃度をHPLC(カラム:CAPCELL PAK C18(5 μ m 4.6 mm I.D.×150 mm、移動相:0.5 vol% H₃PO₄/CH₃OH=85/15、流速:1.0 ml/min、温度:40 $^{\circ}$ C、波長:260 nm)を用いて測定した。

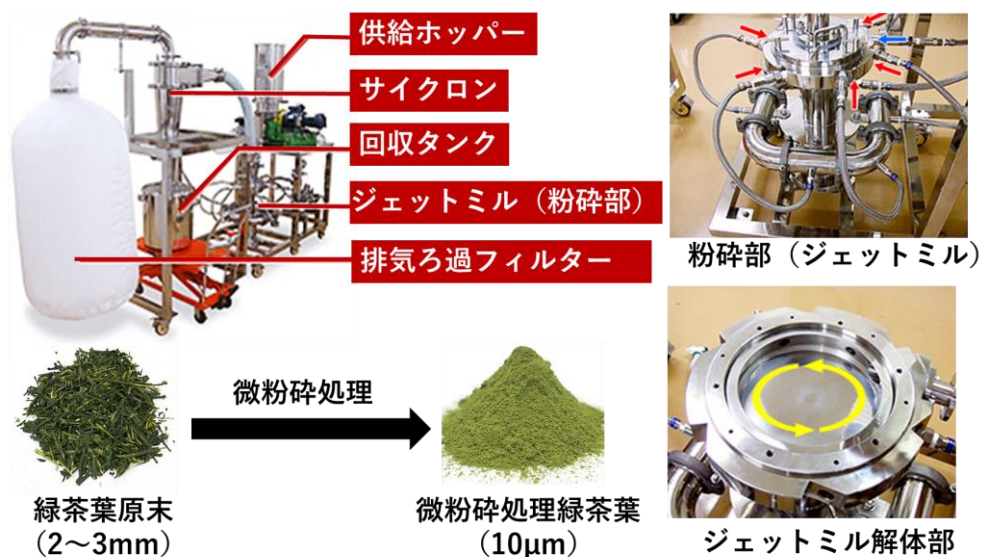


Fig. 1 微粉碎処理装置

②緑茶葉の微粉碎処理によるカテキン類の吸収率の変動

緑茶葉原末及び微粉末処理緑茶葉 500 mgを室温の水 50ml に加え、試験溶液とした。Wistar ラット (7~8 週齢・♂) に、試料溶液を 10ml/kg.b.w.の量で経口投与した。投与 30~360 分後に血液を採取した後、遠心分離し、得られた血漿にアスコルビン酸溶液を添加後、 -80°C で保存した。血漿を解凍後、Sulfatase、 β -D-glucuronidase を添加後、 37°C でインキュベートし、酢酸エチルを加えて抽出後、乾固させて、①と同様の条件で HPLC 分析によりカテキン類を測定した。

③ニトリロ三酢酸誘導性の酸化的損傷に対する微粉碎処理緑茶葉の抑制効果

緑茶葉原末及び微粉末処理緑茶葉 500 mgを室温の水 50ml に加え、試験溶液とした。Wistar ラット (7~8 週齢・♂) に、試料溶液を 10ml/kg.b.w.の量で経口投与した。緑茶葉試料投与 30 分後に鉄ニトリロ三酢酸 (15mg/kg BW) を腹腔内投与し、投与 1 時間後に腎臓を摘出した。摘出した腎臓は、過酸化脂質の分解で生じる 2-チオバルビツール酸反応性物質 (2-thiobarbituric acid reactive substances : TBARs) はの測定 (チオバルビツール酸試験) に供した。摘出した腎臓にリン酸緩衝液を加えてホモジナイズし、SDS、HCl 溶液、リタングステン溶液、トリクロロ酢酸溶液を加え、さらにチオバルビツール酸溶液を加えた。加熱後、試料液の蛍光強度 (Ex : 515nm、Em : 555nm) を測定した。また、摘出した腎臓は、酸化的 DNA 損傷を評価する Formamidopyrimidine-DNA-glycosylase (Fpg) 改変コメットアッセイ法に供した。摘出した腎臓をホモジナイズし、細胞試料とした。細胞試料に低融点寒天溶液を加えて、スライドガラスに滴下して広げた後、固化させた。固化後、低融点寒天溶液を滴下し、広げて固化させ、細胞標本とした。細胞標本を細胞溶解液に一晩浸した後、Fpg に浸した。電気泳動層に乗せ、細胞 DNA の unwindig を行った後、電気泳動を行った。電気泳動後、スライドガラスを中和緩衝液中で中和し、エタノールで浸した後、乾燥させた。乾燥させたスライドガラスにエチジウムブロマイドを滴下し、Comet Analyzer を用いて、細胞 100 個をカウントし、各細胞の Tail%DNA を求めた。

(3) 結果及び考察

①緑茶葉の微粉碎処理によるカテキン類溶出率の変動

緑茶葉原末からの各温度条件下におけるカテキン類溶出率を Fig. 2 に示した。緑茶葉原末を 5°C の水で抽出したところ、いずれのカテキン類においても、他の温度条件下に比べて、溶出率が低い傾向がみられた。しかし、溶出液の温度を上げていくにしたがい、各カテキン類の溶出率が上昇し、特に 95°C の温度条件下では、高濃度の各カテキン類が溶出された。カテキン類別に比較したところ、いずれの温度条件下においても、緑茶中に最も多く含まれている EGCG が特に高濃度に溶出され、低温条件下である 5°C においても、20 分間の溶出時間により 95°C の約 50% 量が検出された。ま

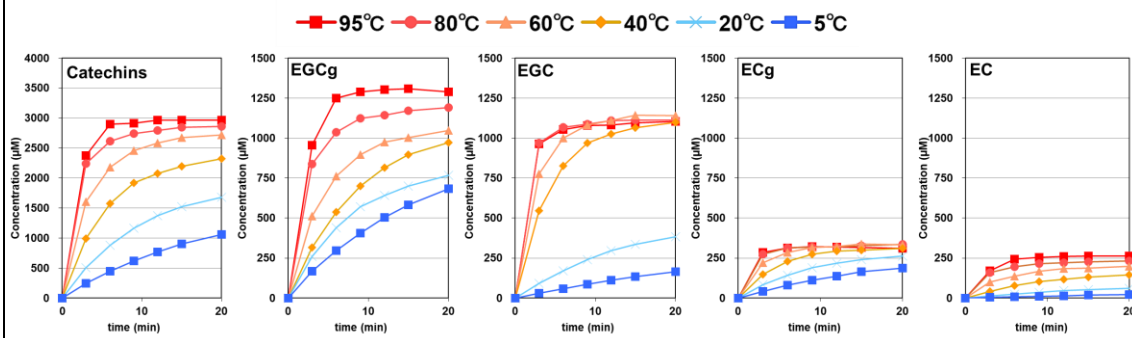


Fig. 2 各温度条件下における緑茶葉原末からのカテキン類の溶出量

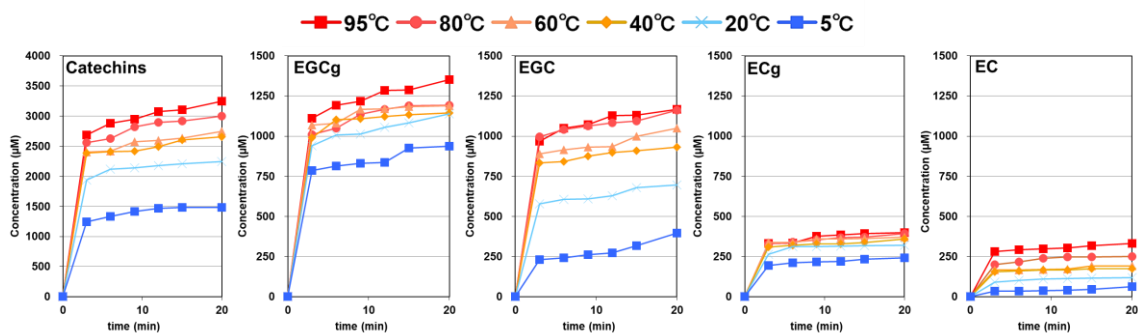


Fig. 3 各温度条件下における微粉碎処理緑茶葉からのカテキン類の溶出量

た、いずれのカテキン類においても、どの温度条件でも関わらず、溶出時間に依存して、その溶出率は増加する傾向がみられた。

微粉碎処理緑茶葉からの各温度条件下におけるカテキン類溶出率を Fig. 3 に示した。緑茶葉原末と同様に 5°C の水で抽出したところ、いずれのカテキン類においても、他の温度条件下に比べ、溶出率が低い傾向がみられたが、温度を上げることにより、各カテキン類の溶出率が上昇した。また、カテキン類別に比較したところ、いずれの温度条件下においても、EGCG が特に高濃度に溶出され、低温条件下である 5°C においても、20 分間の溶出時間により 95°C の約 80% 量が検出された。さらに、緑茶葉原末と微粉碎処理緑茶葉のカテキン類の溶出率を比較したところ、いずれのカテキン類においても、微粉碎処理されることにより、溶出率が増加する傾向がみられた。また、5°C のような低温条件下においても、短時間で溶出されることが確認できた。EGCG に着目すると、各温度条件においても、3 分間で約 80% のカテキン類が溶出されていることが明らかになった。以上の結果より、緑茶葉を微粉末処理することにより、5°C のような低温条件下でも、カテキン類が効率よく溶出されることが明らかになった。さらに、体温に近い 40°C においても、原末を 80°C で溶出した場合とほぼ同程度のカテキン類の溶出が確認できた。

②緑茶葉中カテキン類の吸収に対する微粉碎処理の影響

緑茶葉原末及び微粉碎処理緑茶葉を投与されたラット血漿中のカテキン濃度を Fig.4 に示した。各緑茶葉試料を投与後に得られた血漿を酵素処理して脱抱合したところ、カテキン濃度が増加したことから、投与された緑茶葉中のカテキン類の多くが、生体内で抱合化反応を受けていることが示唆された。

緑茶葉原末を投与したラット血漿中の全カテキン濃度を見ると、投与 30 分後で最高濃度になり、60 分後、120 分後と徐々に減少することが明らかになった (Fig.4 (A))。また、カテキン類で比較したところ、ガレート基を持たない EGC、EC が多く見られ、投与 30 分後に最大値を示した。しかし、ガレート基を有する EGCG 及び ECg は検出されなかった。したがって、ガレート基を有するカテキン類は生体内において、代謝を受けてガレート基が外れることが示唆された。

微粉碎処理緑茶葉を投与したラット血漿中のカテキン濃度を測定したところ、緑茶葉原末を投与した場合と同様に、投与 30 分後で最高濃度になり、60 分後、120 分後と徐々に減少した (Fig.4 (B))。また、ガレート基を有する EGCG 及び ECg が検出されなかったことから、ガレート基を有さない EGC 及び EC が全カテキン類濃度に寄与していることが示唆された。緑茶葉原末の結果と比較したところ、投与 30 分後において、全カテキン濃度は約 1.5 倍の高値を示したことから、緑茶葉を微粉碎処理することで生体内でのカテキン類の溶出率が増加することで、血中濃度が増加したことが示唆された。

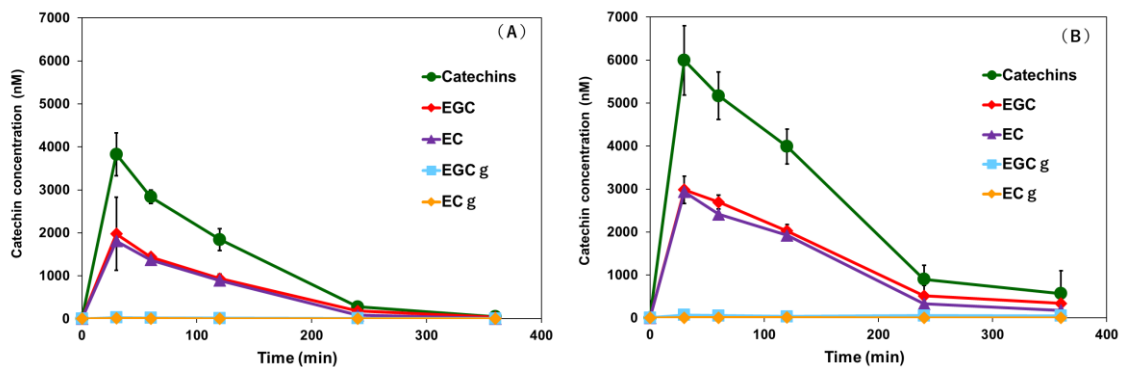


Fig. 4 緑茶葉原末及び微粉碎処理緑茶葉投与後の血中カテキン濃度

(A)：緑茶葉原末、(B)：微粉碎処理緑茶葉

③鉄ニトリロ三酢酸誘導性酸化的損傷に対する緑茶葉原末及び微粉碎処理緑茶葉の抑制効果 微粉碎処理緑茶葉の抑制効果

ラットに鉄ニトリロ三酢酸を投与することにより、生体内においてラジカル反応が起こり、腎臓において酸化的 DNA 損傷が起こることが明らかになっている。そこで、本研究では、生体内における酸化の指標である脂質過酸化物質 (TBARs) 量を測定した。さらに、遺伝毒性試験の一つであるコメットアッセイ法を用いて、DNA 損傷を評価した。特に、化学物質による酸化的 DNA 損傷の評価には、Fpg を用いたコメットア

ッセイ改変法が利用されている。Fpg は、DNA における酸化損傷部位を認識する修復酵素であり、Fpg で細胞を処理すると酸化的損傷がより高感度に検出することができる。本研究では、Fpg を用いたコメットアッセイ改変法を用いて、鉄ニトリロ三酢酸が誘導する腎臓における酸化的 DNA 損傷に対する微粉碎処理緑茶葉の抑制効果を検討した。

Fig.5 (A)に緑茶葉原末及び微粉碎処理された緑茶葉をラットに投与後、鉄ニトリロ三酢酸を腹腔内投与したラット腎臓における TBARs 量を示した。その結果、鉄ニトリロ三酢酸を投与することにより、腎臓における TBARs 量は増大したが、緑茶葉原末および微粉碎処理された緑茶葉を投与することにより、減少することが明らかになった。特に微粉碎処理された緑茶葉の投与により、強く TBARS 生成が抑制された。

Fig.5 (B)に Fpg コメットアッセイ改変法により得られた、ラット腎臓における酸化的 DNA 損傷を評価する Tail % DNA 値を示した。鉄ニトリロ三酢酸を投与することにより、腎臓における Tail % DNA 値は増大したが、緑茶葉原末および微粉碎処理された緑茶葉を投与することにより減少した。緑茶葉原末投与群と、微粉碎処理された緑茶葉投与群を比較したところ、微粉碎処理された緑茶葉の投与群において、有意な Tail % DNA 値の減少がみられた。以上の結果より、微粉碎処理された緑茶葉の投与により鉄ニトリロ三酢酸誘導性の酸化的損傷が抑制されることが明らかになった。

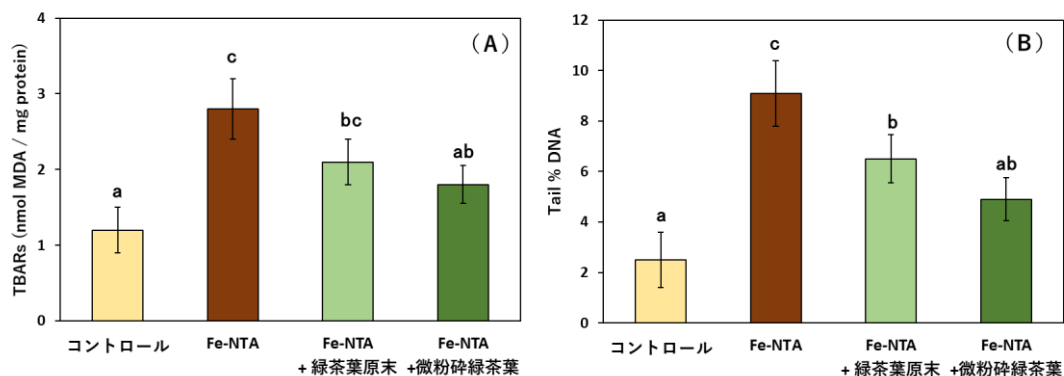


Fig. 5 鉄ニトリロ三酢酸誘導性酸化的損傷に対する緑茶葉原末及び微粉碎処理緑茶葉の抑制効果
(A) : TBARs、(B) : 酸化的 DNA 損傷 (

本研究により、緑茶葉を微粉碎処理することにより、カテキン類の溶出および吸収が増大することが明らかになった。また、それに伴い、生体内において、カテキン類の機能性が増大する可能性が示唆された。したがって、緑茶葉以外の食品素材においても微粉碎処理することにより、生体内において、含有する成分の機能性が増強することが考えられ。食品分野における微粉碎処理技術の活用が今後も期待される。

最後に本研究を行うにあたり、助成して頂きました粉体工学情報センターの関係各位に感謝申し上げます。

3. 研究発表

学会発表

1. Shuichi Masuda, Satoko Hinatsu, Shoko Suzuki, Yuko Shimamura: Change in elution and absorptivity of catechins from green tea leaves powdered by fine grinding, The 9th International Conference on Polyphenols and Health(Kobe), p.59, November 30(2019).

