

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：32648

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700743

研究課題名（和文） 茶カテキンとその異性体の生体利用性に関する研究

研究課題名（英文） Research on the bioavailability of tea catechins and their corresponding epimers

研究代表者

海野 知紀（UNNO TOMONORI）

東京家政学院大学・現代生活学部・准教授

研究者番号：90439753

研究成果の概要（和文）：茶に含まれるカテキン類は加熱により容易に異性化する。本研究では異性化カテキンの生体内吸収性を、それぞれのカテキン種で比較した。異性化カテキンはオートクレーブで誘導し、カラムクロマトグラフィによって分離・精製した。これをマウスに経口投与し、高速液体クロマトグラフィを用いて血中濃度を測定した。その結果、茶に元来含まれるカテキン種よりも異性化したカテキン種では血中濃度が低く、生体利用性が異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Tea catechins are easily converted into their epimers by heat treatment. The study aimed to compare the oral bioavailability between original tea catechins and their corresponding epimers. Catechins in the epimer form were induced by autoclaving, and were purified with a column chromatographic technique. High-performance liquid chromatographic determination revealed that the concentrations of epimer-form catechins in the plasma obtained after their oral administrations to mice were lower than the original tea catechins, possibly indicating a different bioavailability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：調理と機能性成分

1. 研究開始当初の背景

緑茶に含まれるポリフェノール化合物は、flavan-3-ol の基本骨格を有する(−)-エピカテキン(EC)、(−)-エピガロカテキン(EGC)、(−)-エピカテキンガレート(ECG)、(−)-エピガロカテキンガレート(EGCG) の4種類が存在する。これらは、加熱処理によってC環

の2位が異性化し、それぞれ(−)-カテキン(C)、(−)-ガロカテキン(GC)、(−)-カテキンガレート(CG)、(−)-ガロカテキンガレート(GCG)へと変化する。近年市場を拡大しているペットボトルなどの緑茶飲料は、その加熱殺菌工程によって元来緑茶の葉に含まれるカテキン類が異性化された異性化カテキンが含まれている。

吸収された食品成分が体内で代謝変換を受け、さらには尿中へと排泄されるという一連の動態を理解することは、その機能性・安全性の評価において重要視される。したがって、カテキンの有する機能性においても、その吸収・代謝を中心とした生体利用性の評価が重要な鍵となる。カテキンの生体内吸収、代謝、排泄に関する研究は 1990 年代から本格的に開始され、これまでに以下の知見が得られている。

- (1) 茶カテキン摂取後の血中への移行はその構造によって異なり、特に、EGCG、ECG のような没食子酸が付加されている茶カテキン類では非常に吸収性が低い
- (2) 茶カテキンの代謝変換はその構造によって大きく異なり、EGCG は血液中で多くが遊離体として存在しているのに対し、EC、EGC はグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、およびメチル化体として存在する割合が高い
- (3) 茶カテキンは腸内細菌によって代謝され、環分解した低分子ポリフェノールが生成することなどが明らかとなっている。

2. 研究の目的

これまでに得られている前述の知見は元来緑茶の葉に含まれる 4 種類のカテキン類を対象としたものである。緑茶飲料にはそれらの立体異性体が存在するが、異性化したカテキン類の生体利用性は詳細に調べられていない。緑茶飲料等に含まれるカテキン種の生体利用性は、それらの立体構造によって支配されるという仮説のもと、本研究ではカテキンと異性化カテキンの吸収性を比較することを目的とした。カテキンの吸収性が *in vivo* の条件下における機能性に寄与するとの考えのもと、カテキンの異性化体の吸収性を解明することは、緑茶（またはペットボトルなどの緑茶飲料）に含まれるカテキン類の構造－機能性相関の評価へと発展させて考えることも可能となる。本研究ではこれらの課題を解決するべく、緑茶に元来含まれるカテキンの立体異性体の調製（最適条件の検討）を行い、これを実験動物に経口投与することで生体利用性の違いを評価することとした。また、生体内における抱合体への変換について、茶カテキンの構造的観点から検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) 茶カテキン異性体の誘導と精製

① EC から C の誘導とカラムクロマトグラフィによる精製

市販の EC (Sigma-Aldrich 社) 1 g を 500 mL の蒸留水に溶解し、蓋付きの瓶容器に入れ、121°C、30 分間オートクレーブ処理することにより C を誘導した。得られた溶液は減圧下で 20 mL 程度にまで濃縮した。

この溶液には EC と C が混在していることから、親水性ビニルポリマーを基材としたトヨパール HW-40EC (東ソー株式会社) を充填したカラムを用いて分離・精製した。内径 5 cm のガラスカラムにトヨパール HW-40EC を充填し、50% (v/v) メタノールを毎分 5 mL で通液した。溶出液はフラクションコレクターで回収した。得られた溶出液中の EC と C は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で確認した。HPLC の測定条件は、カラム: Unison UK-C18 3 μ m (内径 4.6 mm \times 長さ 150 mm: インタクト株式会社), カラム温度: 室温, 移動相: 15% (v/v) アセトニトリル (0.1% リン酸を含む), 流速: 1.0 mL/分, 検出: UV 230nm である。

② EGCG から GCG の誘導とカラムクロマトグラフィによる精製

EGCG (市販) 1 g を 500 mL の蒸留水に溶解し、蓋付きの瓶容器に入れ、121°C、30 分間オートクレーブ処理した。得られた溶液は減圧下で 20 mL 程度にまで濃縮した。

この溶液に含まれる EGCG と GCG を分離・精製するために、①と同様にトヨパール HW-40EC を充填したカラムを用い、50%メタノール系による溶出を試みたところ、分離が不十分であった。そこで、内径 2.5 cm、長さ 50 cm のガラスカラムにデキストランをベースとした Sephadex LH-20 (GE ヘスルケアジャパン株式会社) を充填し、35% (v/v) アセトンを毎分 0.8 mL で通液したところ、良好な分離を得ることができた。溶出液はフラクションコレクターで回収し、溶出液中の EGCG と GCG を HPLC で測定した。HPLC の測定は、①に記載と同じ条件で行った。

(2) 動物実験

① EC と C および (+)C の経口投与

雄性 ICR マウス (5 週齢) を埼玉実験動物供給所より購入し、3 日間の予備飼育後、16 時間絶食させた。EC と C および市販の (+)-カテキン ((+)C) (ExtraSynthese, France) を蒸留水に溶解し、100 mg/kg 体重となるようにゾンデを用いて経口投与した。投与後 30 分後、60 分後においてジエチルエーテル麻酔下で心臓より採血した。得られた血液は、4°C、3,000 回転で 10 分間遠心分離し、血漿 50 μ L をマイクロチューブに分注し、さらに 10% (w/v) L-アスコルビン酸溶液 5 μ L を加え、分析まで -40°C で凍結保存した。なお、本実験は東京家政学院大学動物実験委員会の承認

を受けて実施した。

② EGCG と GCG の経口投与

雄性 ICR マウス (5 週齢) を、3 日間の予備飼育後、16 時間絶食させた。EGCG と GCG は蒸留水に溶解し、100 mg/kg 体重となるように経口投与した後、投与 30 分後にジエチルエーテル麻酔下で心臓より採血した。得られた血液は (2)① と同様にマイクロチューブに採取した。なお、本実験は東京家政学院大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。

(3) 血漿中カテキンの測定

① 血漿の前処理法

解凍した血漿サンプルに 10 μ L の 250 unit の β -グルクロニダーゼ (type X-A) と 10 μ L の 20 unit のスルファターゼ (type VIII) を加え、37 $^{\circ}$ C、45 分間恒温水槽中でインキュベートした。その後、10 μ L の 5 μ M 没食子酸エチル (内部標準物質) と 700 μ L の 0.5 mM EDTA/2Na を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.5) を加えた。これを良く攪拌した後、固相抽出カラムカートリッジ (Strata-X 33u 30 mg/mL、Phenomenex 社) に供した。また、カートリッジは事前に 1 mL の蒸留水、1 mL の 70% (w/v) ジメチルホルムアミド (DMF)、1 mL の蒸留水で洗浄しておいた。血漿サンプルを供した固相抽出カートリッジは 1 mL の蒸留水で洗浄し、溶出液として 700 μ L の 70%DMF (0.1% リン酸を含む) を加えた。溶出液を回収し、0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、ろ液 10 μ L を HPLC 分析に用いた。

② HPLC 条件

HPLC 装置は、ポンプ: LC-20AD、カラムオーブン: CTO-10AS、オートインジェクター: SIL-20A (以上、株式会社島津製作所)、検出器: 電気化学検出器クーロケム III (ESA)、解析ソフト: Chromato-Pro (株式会社ランタイムインスツルメンツ) で構成されている。なお、分析カラムは Unison UK-C18 3 μ m (内径 4.6 mm \times 長さ 150 mm; インタクト株式会社) を用い、カラムオーブンは 40 $^{\circ}$ C に設定した。移動相は、0.5 mM EDTA/2Na を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.5): アセトニトリル (85:15) を用い、流速 0.8 mL/分で通液した。電気化学検出器は、チャンネル 1 の印加電圧を -200 mV、チャンネル 2 は +200 mV に設定し、チャンネル 2 をモニターした。

(4) 統計解析

図中のデータは、平均値 \pm 標準偏差で示した。統計解析は、Tukey の多重比較検定を用い、5% を有意水準とした。

4. 研究成果

(1) 茶カテキン異性体の誘導と精製

カテキンサンプルの標準品をオートクレーブ (121 $^{\circ}$ C、30 分) にて加熱することで異性体を誘導することができた。しかし、その誘導率はほぼ 50% 程度であり、それ以上の効率性は得られなかった。次に合成樹脂を用いて精製を行った。図 1 には EGCG を加熱することで GCG を誘導し、Sephadex LH-20 に供した場合の EGCG と GCG の溶出パターンを示している。EGCG は GCG よりも早く溶出することから、その性質を利用してフラクション回収し、動物実験への投与サンプルとした。

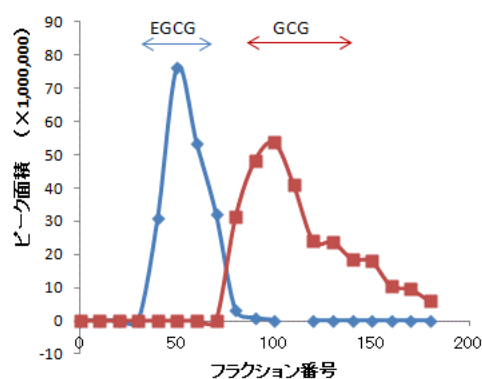


図 1 Sephadex LH-20 による EGCG と GCG の分離

(2) カテキンおよびその異性体の血中濃度と動態

① EC、C および (+)C の血中濃度

EC、C、(+)C を ICR マウスに経口投与し、投与 30 分後、60 分後に心臓より採血した。得られた血漿について、電気化学検出器を備えた HPLC を用いて血中濃度を測定した。

図 2 は、血漿を β -グルクロニダーゼとスルファターゼで処理し、脱抱合した場合の血中濃度 (遊離体と抱合体の合計) を示している。EC は投与 30 分後において最も高い血中濃度 (56 \pm 13 μ M) を示し、その異性体である C の血中濃度 (19 \pm 6 μ M) よりも 3 倍程度高い結果となった。また、(+)C の血中濃度 (34 \pm 7 μ M) よりも有意に高い結果が得られた。この結果は、投与 60 分後にも当てはまり、EC は C と比較して有意に高値を示した。

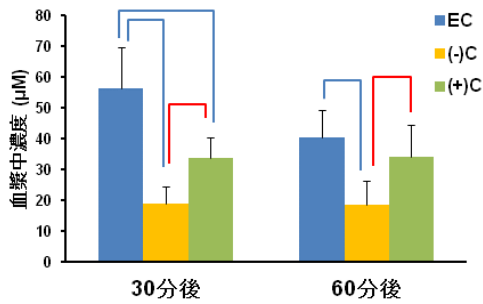


図2 マウスにおける投与30分後、60分後のEC、Cおよび(+)Cの血中濃度

② EC、Cおよび(+)Cの血中動態

次に、β-グルコニダーゼとスルファターゼを用いた酵素処理を行わず、遊離体での血中濃度を求め、抱合体比率を算出した。

抱合体比率(%) =

$$\frac{\text{酵素処理あり} - \text{酵素処理なし}}{\text{酵素処理あり}} \times 100$$

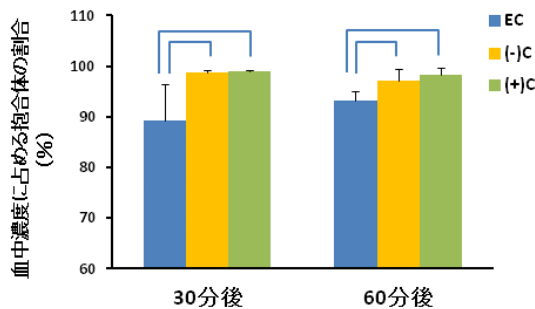


図3 EC、C、(+)C投与後の血中抱合体比率

図3にEC、C、(+)Cを投与した場合の抱合体の比率を示した。いずれのサンプルを投与した場合においても抱合体として存在している比率が高い結果が得られた。その中でもECはC、(+)Cに比べて抱合体の比率が低く(遊離体での存在比率が高く)、投与30分後、60分後においていずれも統計的な有意差が観察された。

③ EGCGとGCGの血中濃度

EGCGとGCGをマウスに経口投与し、投与30分後の血中濃度(遊離体と抱合体の合計)を図4に示した。EGCGの血中濃度は $0.28 \pm 0.19 \mu\text{M}$ であったのに対し、その異性体であるGCGは $0.04 \pm 0.04 \mu\text{M}$ とGCGはEGCGと比較して有意な低値を示した。

EGCG及びGCGはそれぞれ100 mg/kg (0.22 mmol/kg)で投与した。EC、C及び(+)Cの投与量は100 mg/kg (0.34 mmol/kg)であるが、単純に比較した場合、EC、C、(+)Cと比べEGCG、GCGの血中濃度は非常に低レベルであることも認められた。

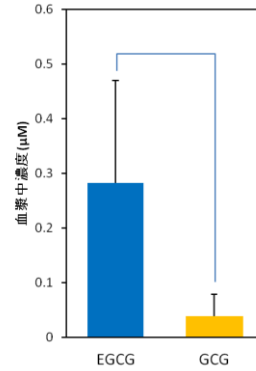


図4 マウスにおけるEGCGとGCG投与後30分後の血中濃度

(3) 考察

緑茶飲料等に含まれる異性化カテキンの生体吸収性を元来有するカテキンと比較した。

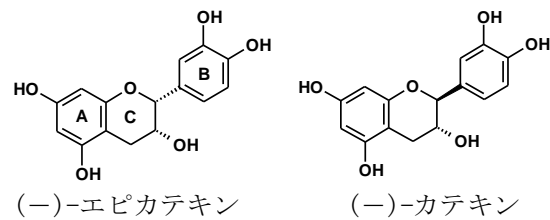


図5 ECとCの構造

ECを加熱処理することでC環の2位が異性化したCを得ることができた。これを実験動物に投与し、血中濃度を測定することでその吸収性を評価した。その結果、ECの血中濃度はCよりも有意に高値を示した。in vitroの条件下で求めた抗酸化性は、ECとCには変化がないことが報告されている。今回の試験により、実際に摂取した場合の吸収性に大きな差異が認められるということは、例えば生体内抗酸化作用などを比較する際にはin vitroでの条件がin vivoの条件下では当てはまらないということを示唆するものである。

同様に、血中動態を抱合体比率として算出した結果、ECはCに比べて抱合体比率が低く、つまり遊離体での存在が多いことが観察された。グルクロン酸抱合や硫酸抱合はフェノール性水酸基に付加するものであって、一般的には抗酸化性を減弱すると理解されている。少なくともECはCと比較して遊離体の

存在比率が高い結果であったことから生体内抗酸化性を発揮する場合においても有利に働くことが推測される。今後は、代謝物との関連性にも注目していく必要がある。

一方、没食子酸エステル型カテキンである EGCG と GCG の生体吸収性を比較したところ、こちらの場合も EGCG が異性化されることで吸収性が低下することが観察された。また、没食子酸が加わることで、吸収性が非常に低下することも認められた。このことは、上記に記載の通り、単純に *in vitro* の条件での評価が *in vivo* の条件で適用できないことをあらためて示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

- ① 海野知紀、薩秀夫、清水誠. エピカテキンとその立体異性体の生体内吸収について. 第65回日本栄養・食糧学会大会、平成23年5月15日、お茶の水女子大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海野 知紀 (UNNO TOMONORI)

東京家政学院大学・現代生活学部・准教授
研究者番号：90439753

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：