

赤血球をバイオマーカーとする生体酸化ストレス評価法の新規考案と
緑茶カテキン類の抗酸化活性の再評価に関する研究

平成 27 年 3 月博士（学術）授与論文
博乙第 27 号

共立女子大学大学院
家政学研究科 人間生活学専攻

井上 葉子

目次

略語表.....	4
序章 緒論.....	6
参考文献.....	11
第 1 章 赤血球膜酸化障害を指標とした各種カテキン類の抗酸化能の評価.....	13
1.1. 背景.....	13
1.2. 実験方法.....	13
1.2.1. 赤血球膜酸化障害測定法について.....	13
1.2.2. カテキン類の抗酸化能の評価.....	18
1.3. 結果.....	20
1.3.1. 赤血球膜酸化障害を指標とした各種カテキン類単独添加の効果.....	20
1.3.2. 赤血球膜酸化障害を指標としたカテキン類組み合わせ添加の効果.....	24
1.4. 考察.....	24
1.5. 小括.....	31
1.6. 参考文献.....	32
第 2 章 赤血球膜酸化障害評価法を指標としたエピガロカテキンガレートの抗酸化機序の 検討.....	34
2.1. 背景.....	34
2.2. 実験方法.....	34
2.2.1. 試料.....	34
2.2.2. 光増感溶血反応.....	34
2.2.3. 赤血球膜酸化障害の評価.....	35
2.2.4. 統計処理.....	39
2.3. 結果.....	39
2.3.1. 一重項酸素曝露洗浄赤血球への EGCg 添加効果.....	39
2.3.2. EGCg の一重項酸素捕捉能.....	39
2.3.3. 赤血球膜と EGCg との相互作用の検討.....	45
2.3.4. 赤血球膜過酸化連鎖反応における EGCg の抑制効果.....	45
2.3.5. EGCg 前処理赤血球の赤血球膜過酸化脂質の抑制効果.....	50
2.3.6. 赤血球膜タンパク質への EGCg 添加の影響.....	50

2.4. 考察	50
2.5. 小括	56
2.6. 参考文献	57
第3章 流血中におけるエピガロカテキンガレートの抗酸化能の評価.....	58
3.1. 背景	58
3.2. 実験方法	58
3.2.1. 試料.....	58
3.2.2. 光増感溶血反応	58
3.3. 結果	62
3.3.1. 全血への光増感反応における EGCg 添加効果	62
3.3.2. 赤血球膜酸化障害における EGCg 前処理全血赤血球の効果.....	62
3.4. 考察	62
3.5. 小括	68
3.6. 参考文献	69
第4章 めし負荷一過性生体酸化ストレス評価法への抗酸化物質添加の検討	71
4.1. 背景	71
4.1.1. めし負荷一過性生体酸化ストレス評価法について	71
4.2. 実験方法	77
4.2.1. 試料.....	77
4.3. 結果	79
4.3.1. めし摂取量による生体酸化ストレスへの影響.....	79
4.3.2. ヒトにおける生体酸化ストレスへの感受性	81
4.3.3. 麦めし摂取における生体酸化ストレスおよび血糖値への影響	81
4.4. 考察	88
4.5. 小括	91
4.6. 参考文献	92
第5章 生体酸化ストレス評価法を指標とした緑茶摂取の影響	95
5.1. 背景	95
5.2. 実験方法	96
5.2.1. 試料.....	96

5.3. 結果	99
5.3.1. 緑茶摂取における生体酸化ストレスへの影響	99
5.3.2. 緑茶摂取における血糖値への影響	101
5.4. 考察	101
5.5. 小括	105
5.6. 参考文献	106
第6章 総括	108
謝辞	110

略語表

AAPH : 2-2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride

AGE : 最終糖化産物

AlPcS₄ : アルミニウムフタロシアニン四硫酸塩 (光増感剤)

ApoE : アポプロテイン E

AUC : 溶血曲線曲線下面積

EC : エピカテキン

ECg : エピカテキンガレート

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

EGC : エピガロカテキン

EGCg : エピガロカテキンガレート

eNOS : 血管内皮型一酸化窒素合成酵素

FADH₂ : フラビンアデニンジヌクレオチド

FMD : flow mediated dilatation

GAPDH : グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ

GLUT2 : グルコーストランスポーター2

GTE : 緑茶抽出物

NADH : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

NADPH : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸

NF- κ B : 核内因子 κ B

NO : 一酸化窒素

NO₂⁻ : 亜硝酸イオン

NO₃⁻ : 硝酸イオン

OGTT : グルコーストレランス試験

PARP : ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ

PBS : リン酸緩衝液生理食塩水 (10mM リン酸緩衝液 pH7.4, 1mM EDTA, 0.15M NaCl)

PKC : プロテインキナーゼ C

RBCs : 赤血球

ROS : 活性酸素種

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

TBA : チオバルビツール酸

Trp : トリプトファン

序章 緒論

スーパーオキシドアニオンラジカル($O_2^{\cdot-}$)やヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)等の活性酸素種は、血管内皮細胞の賦活化や細胞内シグナル伝達に關与するなど¹⁾生体恒常性維持に不可欠な一面を担っている。一方、ストレスや炎症などで活性酸素種が過剰に産生され、内因性抗酸化系で抗しきれない状態に陥ると、細胞酸化障害が惹起され、心疾患をはじめとする様々な疾病発症・進展の引き金が下ろされるものと推論されている。たとえば、生体酸化ストレスの亢進とそれに伴う酸化障害が、冠動脈疾患における血管損傷をもたらすことや²⁾、高血圧と深く関係している可能性を有することもある³⁾。

このように、活性酸素が起因となる疾病は多数あるが、その一つに糖尿病の合併症の進展がある。糖尿病は生活習慣病の一つで、平成 24 年度国民栄養調査の結果から、糖尿病が強く疑われる人は約 950 万人⁴⁾ともいわれている。糖尿病は自覚症状に乏しいため気付かないうちに進行し、合併症を引き起こす場合がある。糖尿病の三大合併症は、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症および糖尿病性神経症であり、糖尿病治療においては、これらの合併症を防ぐことが最重要課題となっている。また、これらは血管内皮細胞機能不全が引き金になり発症することが知られている。

高濃度グルコースあるいは遊離脂肪酸による活性酸素種 (ROS) 産生については、培養平滑筋細胞並びに血管内皮細胞を用いて検討した場合であるが、グルコース (400mg/dL) あるいはパルミチン酸塩 (200 μM) の添加で、有意に ROS の産生が増加したとの報告⁵⁾がある。その機序として、プロテインキナーゼ C 依存 NAD(P)H オキシダーゼの活性化によって ROS が産生されたと推察している。また、高血糖により活性化されたプロテインキナーゼ C β は血管内皮機能を低下させるとの報告もある⁶⁾。

細胞内のグルコース濃度が高い時、アルドース還元酵素はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) を消費しながら、グルコースをソルビトールに還元する。ソルビトールは後にフルクトースに酸化される⁷⁾。これはポリオール経路と呼ばれており、高濃度グルコースによってこの経路が亢進すると、還元型グルタチオンの再生にも必要な NADPH が不足するため、還元型グルタチオン量が低下し、その結果、酸化ストレスへの感受性が高まるとされている⁸⁾。

その他、血中グルコースは非酵素的にタンパク質やアミノ酸のアミノ基と反応し、シッフ塩基やアマドリ転位化合物などを形成後、最終的に終末糖化産物 (AGE) を形成する。

AGEは、血管内皮細胞で血管内皮増殖因子の分化誘導を介して管腔形成促進を引き起こす。このことからAGEは、糖尿病細小血管合併症の原因となる可能性が考えられるとの報告もある⁹⁾。

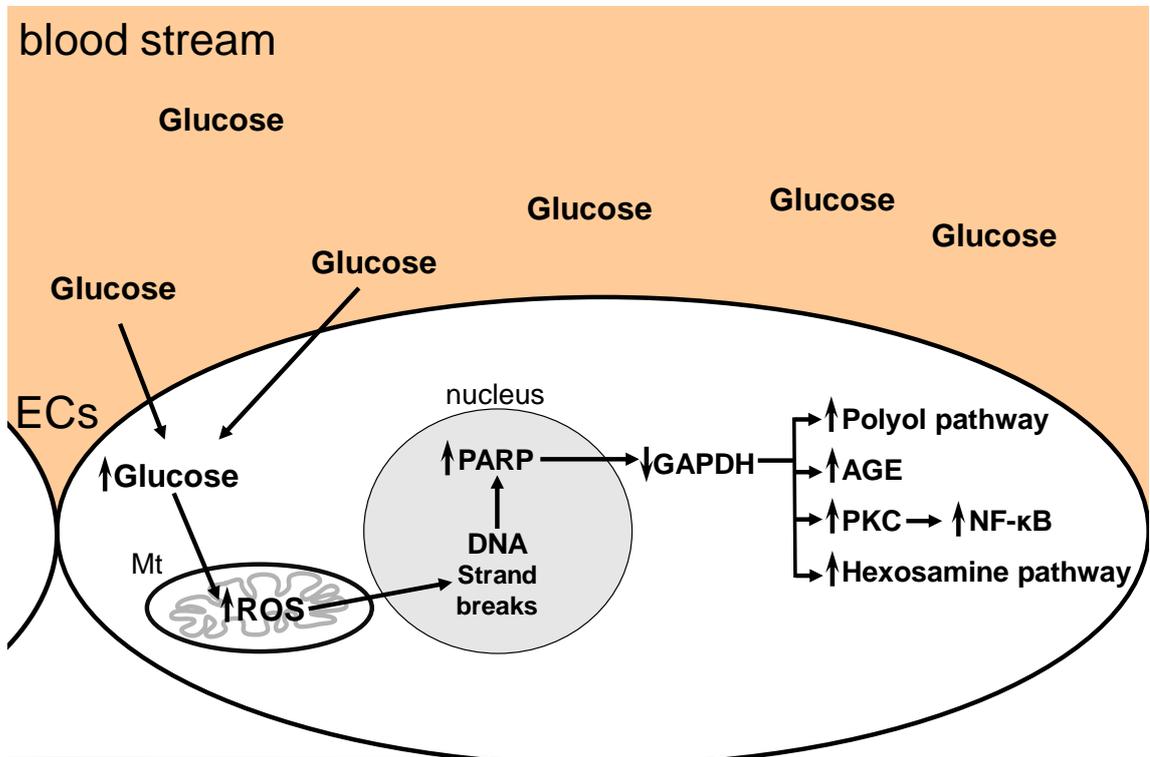
以上のように、高血糖による血管内皮細胞障害の機序については様々な報告があるが、Brownleeら⁸⁾によりこれらを統合した機序が論じられている。

毛細血管においては、高血糖により大量のグルコースがTCAサイクルで酸化を受けることで大量の電子ドナーであるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)およびフラビンアデニンジヌクレオチド(FADH₂)が生成される。続いて、大量の電子ドナーはミトコンドリア内膜の電子伝達系で代謝されることになる。その結果、電子伝達系の電圧勾配が限界に達し、電子伝達系が停止、行き先を失った電子ドナーにより大量にROSが産生される。これにより、ミトコンドリアから大量にROSが放出される。ROSは核内に拡散され、DNAの断片化を起こし、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)を活性化する。PARPはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を修飾するためGAPDHの活性は低下する。GAPDH活性の低下により、ポリオール経路の亢進、細胞内AGEの増加、プロテインキナーゼC(PKC)の活性化に続き、核内因子κB(NF-κB)の活性化、ヘキソサミン経路の亢進が引き起こされると示唆されている。この概念図を図0-1に示す。

大血管においては、脂肪細胞から血管内皮細胞へ遊離脂肪酸が流入し、その結果、脂肪酸のβ酸化が亢進する。β酸化により産生されたアセチルCoAはTCAサイクルで代謝され、電子ドナーであるNADHとFADH₂が大量に産生される。これ以降の機序は毛細血管と同様、ミトコンドリアからの大量のROSの放出に続き、4つの経路が亢進され、血管内皮細胞の機能不全へと繋がっていくと推察している。

このほか、マウス腎切片に高濃度グルコース(20~30mM)を曝露し、糸球体血管内皮NOシンターゼ(eNOS)の活性について検討した論文では、高濃度グルコースはPKC-βを活性化することにより、eNOS活性化が抑制され、その結果、高濃度グルコースは血管内皮からのNOの産生を抑制すると推察している¹⁰⁾。

一方、過剰のROSによりNOの不活性化が起こり、それが、血管内皮細胞機能不全の原因となるとの報告もある¹¹⁾。高濃度グルコースによって、ミトコンドリアより大量のROSが産生されるとすれば、NOに対するROSの影響も無視できない。アポプロテインE(apoE)/eNOSのダブルノックアウトマウスは、apoEノックアウトマウスに比べ、アテローム性の



ECs: endothelial cells; Mt: mitochondrion; PARP: poly(ADP-ribose) polymerase; ROS: reactive oxygen species; GAPDH: glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase; AGE: advanced glycation end products; PKC: protein kinase C

図 0-1 高濃度グルコースによる血管内皮細胞機能不全機序の概念図

Diabetes 54:1615-1625, 2005⁸⁾より一部改変

損傷範囲が大きいことから、eNOS 欠損とアテローム性動脈硬化症の進展が強く関連付けられている¹²⁾。

以上のように、高血糖による血管内皮細胞機能不全の機序は、徐々に解明されつつあるが、それぞれの経路の関係性などまだ解明できていない部分も多い。また、血管内皮細胞不全に強く関与すると考えられる活性酸素による障害の機序やそれを防止する手段を解明することは、合併症の予防のためにも急務であると考えられる。

このような観点から、酸化障害に対して生体を保護することの重要性は明白である。従って、抗酸化物質として機能する天然物、中でも食品に含まれる抗酸化性成分の探索やその作用機序に関する研究が活発になされてきている。

活性が高い抗酸化物質の一つとして注目されているカテキン類は、緑茶などでその含量が高い。カテキン類は、2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) カチオンラジカル消去作用、一重項酸素クエンチング作用、 O_2^- 消去作用のほか^{13), 14)}、酸化 LDL 抑制効果¹⁵⁾を示すことなど様々な角度から研究されており、また、茶ポリフェノールによる抗腫瘍作用¹⁶⁾なども示唆されている。その他、疫学調査によれば、緑茶摂取による冠動脈疾患の改善^{17), 18)}なども推測されている。

ところで、経口摂取したカテキン類では、その 1.5～3 時間後にエピガロカテキンガレート (EGCg) の血漿濃度は最大となるが、血中カテキン類の大半は抱合型としての存在比が高く、遊離型のそれは相対的に低値 ($1 \mu M$ 以下) であると考えられている^{19), 20)}。しかし、血中の半減期が短いとしても、微量存在すると考えられる遊離型カテキンと血漿成分あるいは血液系細胞との相互作用を抗酸化活性の強弱と併せて考究することは、カテキン類の Bioavailability や機能性の解明に新たな情報を与えるものであると考えられる。

以上より、本論文は、緑茶カテキン類、特にエピガロカテキンガレート (EGCg) の抗酸化活性の再評価をすること、ヒトが緑茶を摂取した際の食後一過性高血糖状態における生体酸化ストレスへの影響を検討することを目的とした。

第 1 章では、赤血球の溶血反応から抗酸化活性を評価する赤血球膜酸化障害評価法を用い、緑茶カテキン類であるエピカテキン (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 ex vivo における各々の抗酸化能を評価した。さらに、第 2 章では、EGCg の抗酸化機序について詳細に検討し、第 3 章では血漿成分存在下における EGCg の抗酸化能について検討した。第 4 章では、ヒトに一過性の糖負荷を行った際の血管内の酸化ストレス状態を包括的に評価し、この評価法が食品微量成分の抗酸化評価法としての利用が可能で

あるか麦めしを摂取することにより確認した。第 5 章では、第 4 章で用いた評価法にて、緑茶摂取による生体内の酸化ストレス抑制効果について検討した。そして第 6 章を総括とした。

参考文献

- 1) Irani K (2000) Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling *Circ Res* **87**,179-183.
- 2) Touyz RM (2004) Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* **44**, 248-252
- 3) Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, Guichard C, Bachler JP (2007) Relationship between oxidative stress and essential hypertension. *Hypertens Res* **30**, 1159-1167
- 4) 厚生労働省 (2013) 平成 24 年度国民健康・栄養調査 結果の概要 平成 25 年 12 月
- 5) Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H (2000) High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* **49**, 1939-1945
- 6) Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Creager MA (2002) Inhibition of protein kinase C β prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ Res* **90**, 107-111
- 7) Yabe-Nishimura C (1998) Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol Rev* **50**, 21-33
- 8) Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications – A unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615-1625
- 9) Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, Satozawa N, Kawakami T, Nomura M, Yamamoto H (1997) Advanced glycation end products-driven angiogenesis *in vitro*. *J Biol Chem* **272**, 8723-8730
- 10) Chu S, Bohlen HG (2004) High concentration of glucose inhibits glomerular endothelial eNOS through a PKC mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**, F384-F392

- 11) Higashi Y, Yoshizumi M (2004) Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol Ther* **102**, 87-96
- 12) Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL (2001) Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E / endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* **104**, 448-454
- 13) Guo Q, Zhao B, Shen S, Hou J, Hu J, Xin W (1999) ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta* **1427**, 13-23
- 14) Nanjo F, Mori M, Goto K, Hara Y (1999) Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 1621-1623
- 15) Leung LK, Su Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen Z (2001) Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr* **131**, 2248-2251
- 16) Liang Y, Chen Y, Lin Y, Lin-Shiau S, Ho C, Lin J (1999) Suppression of extracellular signals and cell proliferation by the black tea polyphenol, theaflavin-3,3'-digallate. *Carcinogenesis* **20**, 733-736
- 17) Arts IC, Hollman PC (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 317S-325S
- 18) Vita JA (2003) Tea consumption and cardiovascular disease: effects on endothelial function. *J Nutr* **133**, 3293S-3297S
- 19) Yang CS, Chen L, Lee M, Balentine D, Kuo MC, Schantz SP (1998) Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**, 351-354
- 20) Rietveld A, Wiseman S (2003) Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J Nutr* **133**, 3285S-3292S

第1章 赤血球膜酸化障害を指標とした各種カテキン類の抗酸化能の評価

1.1. 背景

緑茶等に含まれるカテキン類は抗酸化活性のほか、抗がん作用^{1,2)}などの様々な機能性を持つと広く知られている。緑茶に含まれる主なカテキン類はエピカテキン (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) であり、その抗酸化活性は異なる³⁾。

本研究で用いた赤血球膜酸化障害評価法は、赤血球の溶血反応から食品微量成分の抗酸化活性を評価する方法である。抗酸化能を判定する方法として溶血反応はしばしば用いられるが、溶血反応惹起試薬として AAPH などの水溶性ラジカル反応開始剤^{4,5)}を使用することが多い。しかし、本研究では、光照射により一重項酸素を産生する光増感剤のアルミニウムフタロシアン四硫酸塩 (AIPcS₄) を使用することとした。その理由として光照射時間により一重項酸素の産生量を調節できること、さらに光照射停止により一重項酸素産生を停止することができるため、その後の酸化障害の進展を観察することが可能なことが挙げられる。

本章では、構築した赤血球膜酸化障害評価法を用いて、各種カテキン類の抗酸化能を比較検討することとした。各種カテキン類の単独添加および、カテキン類を組み合わせた相乗効果について、赤血球膜酸化障害評価法を用いて検討を行った。

1.2. 実験方法

1.2.1. 赤血球膜酸化障害測定法について

本研究では、赤血球に活性酸素の一つである一重項酸素を曝露した時の溶血パターンとそこへ食品微量成分を添加したときの溶血パターンとを比較することで、食品微量成分の抗酸化能の評価を行っている。以下に、本研究で用いた赤血球膜酸化障害評価法について述べる。

1.2.1.1. 赤血球懸濁液

本研究では、本論文著者の井上葉子の肘静脈から採取した血液を用い、溶血により漏出

したヘモグロビン量を吸光度の測定により求め、その溶血パターンから酸化ストレス状態を判定した。

ヘモグロビンの可視部吸収スペクトルは、波長 415nm で極大吸収を認めた (図 1-1)。一方、光増感剤として AlPcS₄ を用いたが、その極大吸収は 670nm 付近 (図 1-2) であり、波長 415nm のヘモグロビンの吸光度には影響を及ぼさないことを確認した。

赤血球懸濁液の 100% 溶血時における 415nm の吸光度が 1.000 となるようにリン酸緩衝液生理食塩水 (10mM リン酸緩衝液 pH7.4, 1mM EDTA, 0.15M NaCl : PBS) で希釈調製した。これは、細胞数約 5.0×10^7 個/ml PBS⁶⁾ に相当する。

1.2.1.2. 赤血球と光増感剤、アルミニウムフタロシアニン四硫酸塩のプレインキュベーション時間および光照射時間と溶血パターン

Sonoda ら⁷⁾の方法を改良し、光照射のためのランプや赤血球懸濁液等は図 1-3 のように設置した。光照射前に行ったプレインキュベーションと光照射は室温にて行った。光照射後のインキュベーションは 37°C で行った。光照射時のランプによる発熱が溶血パターンに影響を与えると考えられたため、ランプと赤血球懸濁液の入った石英セルとの間に、蒸留水を入れたビーカーを置き、熱の影響を受けないようにした。ランプとセルの距離は 30 cm とし、光の強さを一定 (7,000 ルクス) にした。また、光照射時に赤血球のセル内での沈澱を防ぐため、マグネティックスターラーにて攪拌しながら光照射を行った。なお、スターラー攪拌子からの物理的な刺激による溶血は起らないことを確認している。

以上の条件において、AlPcS₄ の濃度、赤血球懸濁液とのプレインキュベーション時間、光照射時間を検討した。その結果、AlPcS₄ 濃度は 11.2 μ M (終濃度)、プレインキュベーション時間 10 分、光照射 5 分で実験上最適な溶血パターンを得ることができた (図 1-4)。本研究は、室温でプレインキュベーションおよび光照射を行っているため、室温により溶血パターンが異なることがあった。そこで、実験に際しては、毎回、溶血パターンの確認後、必要に応じて光照射時間を調節し、溶血パターンの調整を行った。

本評価法の特長として、光照射を停止することにより、一重項酸素の産生を止めることができることにある。そこで、一重項酸素曝露量は光照射中に溶血が引き起こされない量とし (initiation 反応)、続く post-illumination の過程 (propagation 反応) で溶血するように調節した。つまり、initiation 反応で内因性の抗酸化活性が酸化ストレスに抵抗し、その枯渇ののちに溶血となるものと推定している。

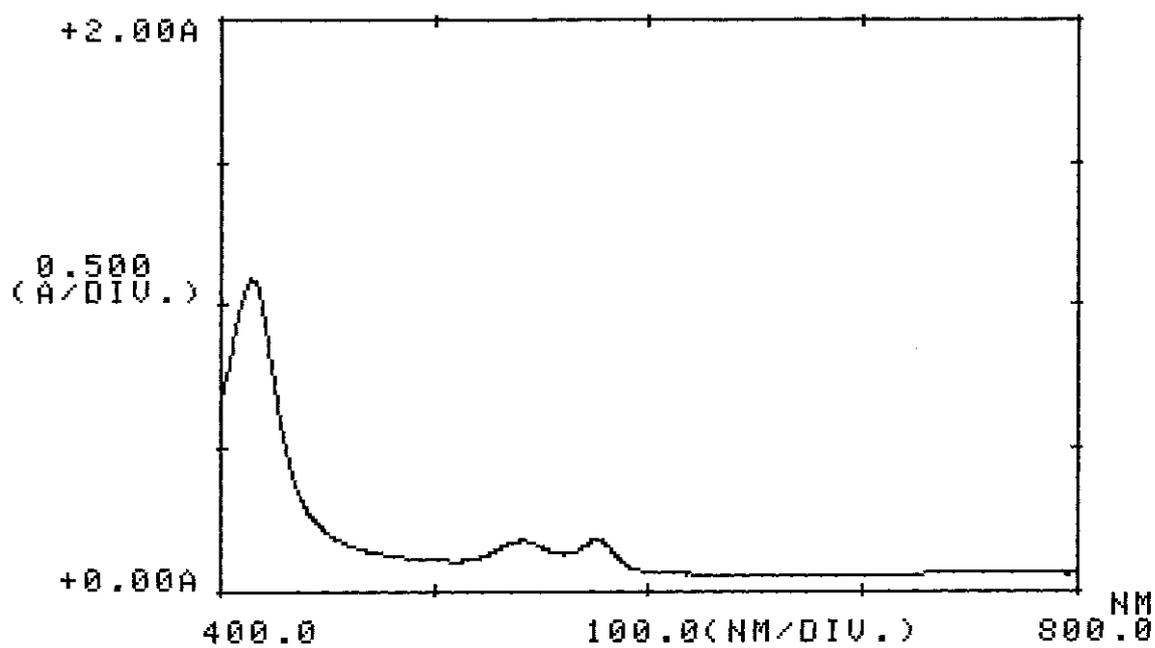


図 1-1 ヘモグロビンの可視吸収スペクトル

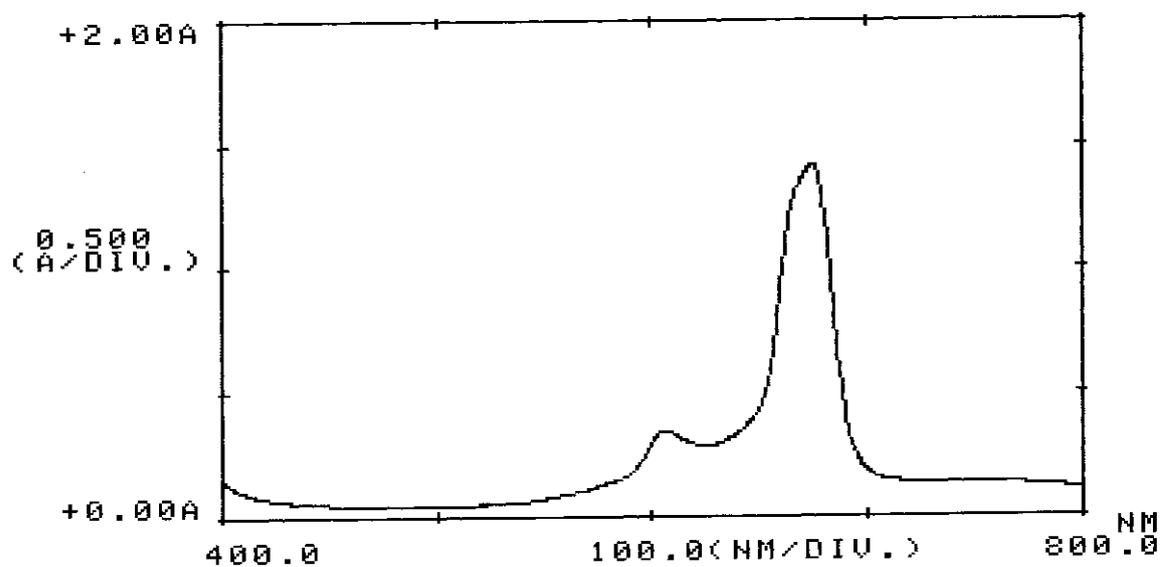


図 1-2 アルミニウムフタロシアニン四硫酸塩の可視吸収スペクトル

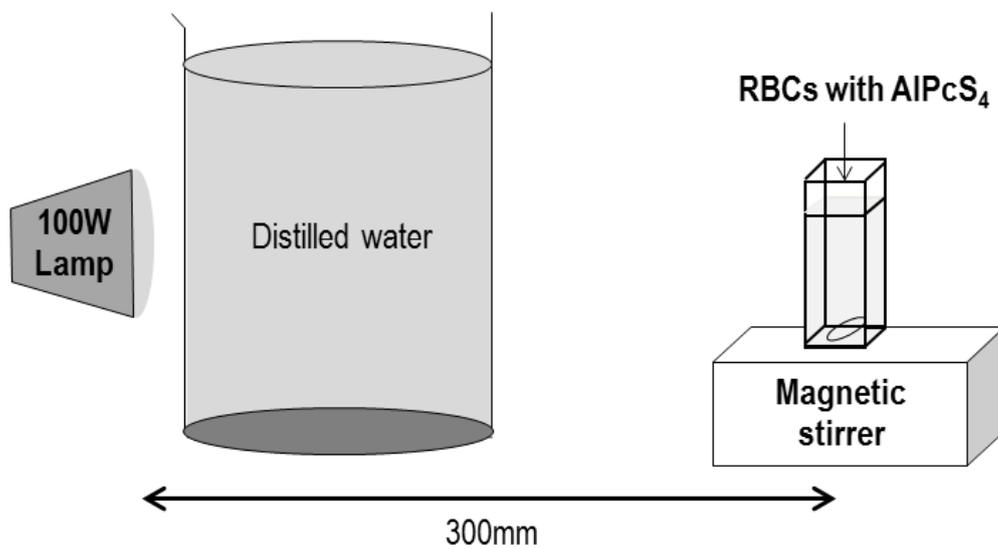


図 1-3 光増感反応による一重項酸素曝露法

赤血球懸濁液と AIPcS₄ を石英セルに入れ、マグネティックスターラーにて攪拌しながらタングステンランプにより光照射を行うことで、赤血球に一重項酸素の曝露を行った。タングステンランプの発熱による溶血を防ぐため、ランプとセルの間に蒸留水を置いて、熱を遮断した。

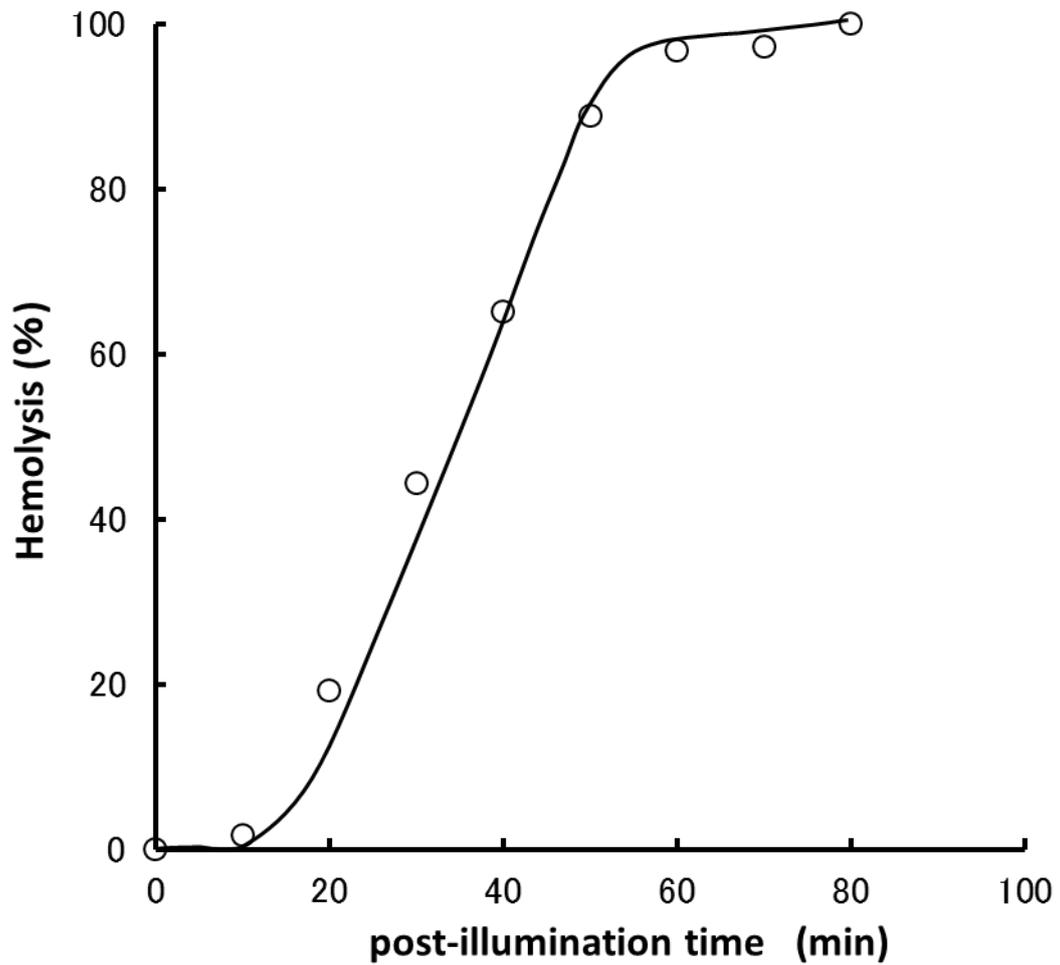


図 1-4 AIPcS₄ 光増感反応による溶血曲線

赤血球懸濁液を AIPcS₄ (11.2 μM) と 10 分間プレインキュベートした後、5 分間光照射を行った。遮光下 37°C でのインキュベート (post-illumination) 時における溶血度の変化を示した。

1.2.2. カテキン類の抗酸化能の評価

1.2.2.1. 試料

1) 洗浄赤血球の調製

本論文著者の井上葉子の静脈血を採取し、1,000 r.p.m.で5分間遠心分離 (Model 90-22 佐久間製作所製) し、血漿および Buffy coat を除去した。分離した赤血球に PBS を等量加えて緩やかに攪拌し、再度遠心分離 (1,000 r.p.m. 5分間) し上清を取り除いた。この操作を3回繰り返して洗浄赤血球を得た。

2) エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガラート、エピガロカテキンガラート溶液の調製

EC、EGC、ECg (カテキンキット: 栗田工業製) を PBS に溶解し、それぞれ濃度 2mM になるように調製したものを凍結保存し、用事 PBS で希釈して使用した。

EGCg (純度 80% : 栗田工業製) も上記カテキン類と同様に PBS に溶解し、濃度 2mM になるように調製したものを凍結保存し、用事 PBS で希釈して使用した。

1.2.2.2. 光増感溶血反応

1) コントロールの溶血度の測定

赤血球酸化障害評価法の通り、赤血球懸濁液 (細胞数約 5.0×10^7 個/ml PBS) ⁶⁾、11.2 μ M AlPcS₄ および PBS (全量 3,000 μ L) を 1cm 角石英セルに入れ、ミニスターレーパーで緩やかに攪拌しながら、遮光下、10分間プレインキュベートした。光照射を6分間実施することにより赤血球に一重項酸素を曝露した。

次に、一重項酸素曝露後の試料をマイクロチューブに分注し、遮光下 37°C でインキュベートした (Post-illumination)。70分間まで10分毎にマイクロチューブをインキュベーターから取り出し、遠心分離 (1,000 r.p.m.、5分間) 後、その上清の吸光度 (415nm) を測定した。同一の赤血球懸濁液に蒸留水を加えて完全溶血させたときの値を 100%-Hemolysis として各試料の溶血度を百分率で示した (図 1-5)。得られた溶血パターンをコントロールとした。

2) 各種カテキン類単独添加の溶血度測定

赤血球懸濁液、カテキン類を終濃度 50 μ M あるいは 100 μ M と AlPcS₄ 11.2 μ M を石英

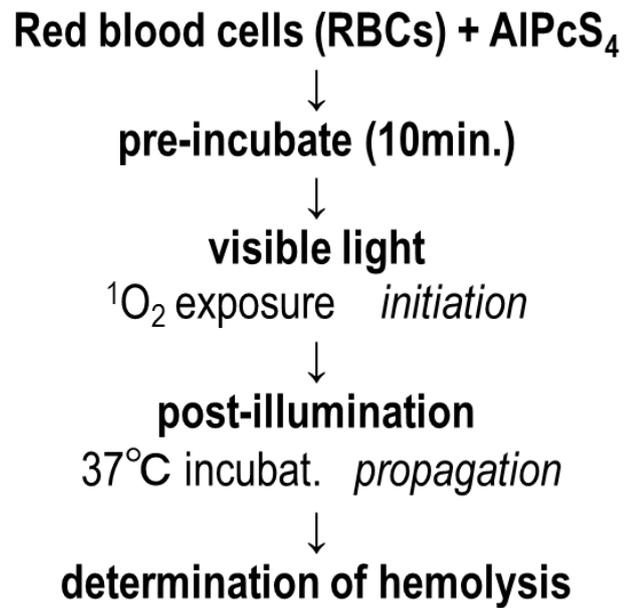


图 1-5 赤血球膜酸化障害

セルに入れ PBS で全量 3,000 μ L とし、コントロール溶血パターンと同様に、光照射、その後の吸光度測定を行い、溶血度を求めた (図 1-6)。

3) カテキン類組み合わせ添加の溶血度測定

赤血球懸濁液、PBS、EGCg 50 μ M (終濃度)、さらに EGC 100 μ M、EC 100 μ M あるいは ECg 50 μ M (いずれも終濃度) と AlPcS₄ 11.2 μ M を石英セルに入れ、1.2.2.2. 2) の方法と同様に測定を行い、溶血度を求めた。

4) 統計処理

検定は、溶血曲線の曲線下面積 (AUC) を比較することで行った。一元配置分散分析の手法を用い、多重比較は、正規分布に従いかつ、等分散性が仮定できるデータは Tukey の HSD 検定、正規分布に従いかつ、等分散性が仮定できないデータは Games-Howell 検定、正規分布に従わないデータは Steel-Dwass 法を用いた。Tukey の HSD 検定および Games-Howell 検定は IBM SPSS Statistics 22 を Steel-Dwass 法は R ver. 2.8.1 を使用し統計処理を行った。p<0.05 を統計的に有意とした。

1.3. 結果

1.3.1. 赤血球膜酸化障害を指標とした各種カテキン類単独添加の効果

赤血球懸濁液に EGC 100 μ M、EC 100 μ M、ECg 50 μ M、ECg 100 μ M あるいは EGCg 50 μ M (すべて終濃度) を加え、一重項酸素を曝露し、その後の Post-illumination における溶血度を測定した結果を図 1-7 に、AUC および検定の結果を表 1-1 に示した。

カテキン類を添加していないコントロールの 70 分における溶血度、平均値 \pm 標準誤差 92.6 \pm 1.7% と比べ、EGC 100 μ M、EC 100 μ M、ECg 50 μ M、ECg 100 μ M、EGCg 50 μ M の添加で、それぞれ 86.5 \pm 2.4%、72.7 \pm 5.3%、14.3 \pm 5.0%、13.2 \pm 2.2%、13.1 \pm 5.2% となった。また、AUC で比較すると、コントロール、EGC 100 μ M、EC 100 μ M、ECg 50 μ M、ECg 100 μ M、EGCg 50 μ M では、それぞれ 4113.7 \pm 310.4、3790.1 \pm 327.7、3173.9 \pm 416.3、852.2 \pm 222.1、396.3 \pm 46.9、378.3 \pm 143.1 であった。

ECg 50 および 100 μ M、EGCg 50 μ M の添加により、カテキン類を添加していないコントロールに比べ有意に AUC の増加を抑制した。また、ECg 50 および 100 μ M と EGCg

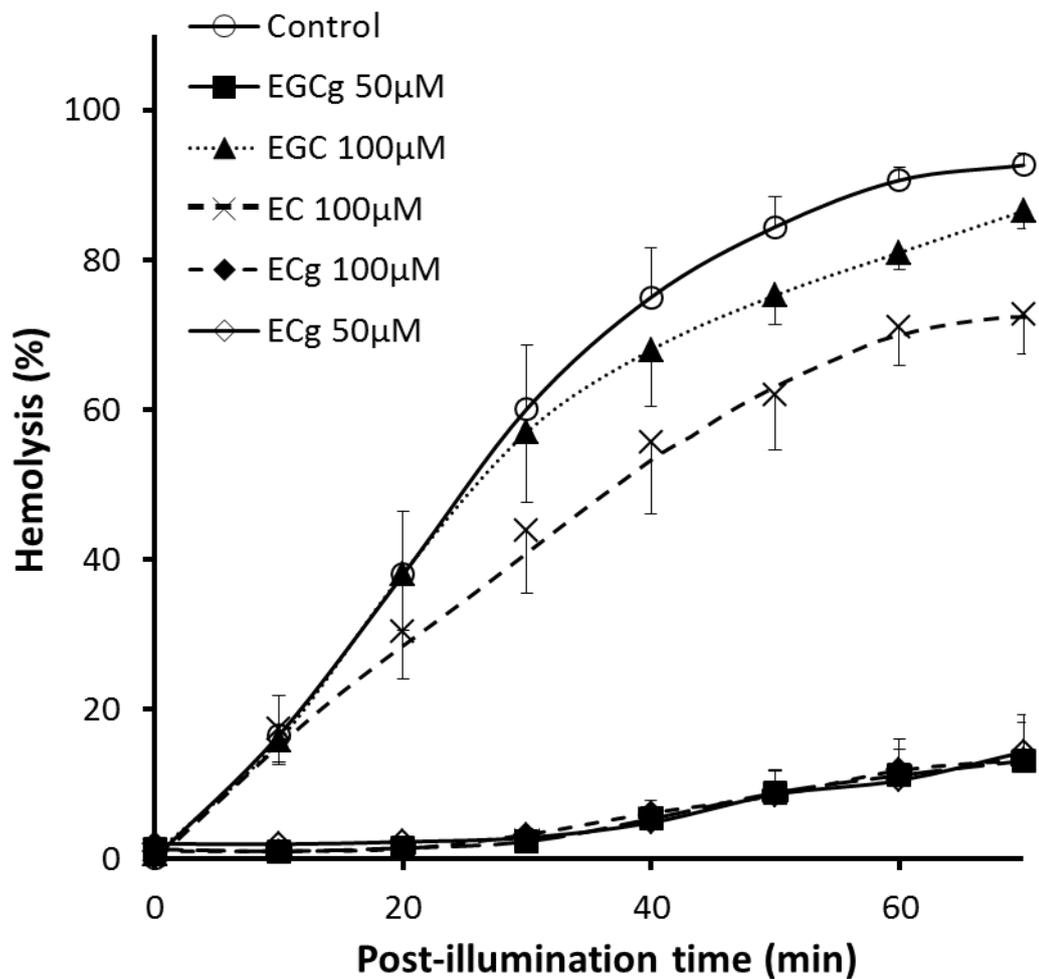


図 1-7 赤血球膜酸化障害における各種カテキン類添加の影響

赤血球懸濁液を AIPcS_4 ($11.2 \mu\text{M}$) と各種カテキン類を単独添加し、10 分間プレインキュベートした後、6 分間光照射を行った。遮光下 37°C でのインキュベート (post-illumination) 時における溶血度の変化を示した。

コントロール (○: $n=12$)、EGCg $50 \mu\text{M}$ (■: $n=9$)、EGC $100 \mu\text{M}$ (▲: $n=9$)、EC $100 \mu\text{M}$ (×: $n=9$)、ECg $100 \mu\text{M}$ (◆: $n=9$)、ECg $50 \mu\text{M}$ (◇: $n=9$)

平均値 ± 標準誤差で示した。

表 1-1 赤血球膜酸化障害における各種カテキン類添加の影響

	AUC	P				n
		vs Control	vs EGC 100 μ M	vs EC 100 μ M	vs ECg 100 μ M	
Control	4113.7 \pm 310.4	-	-	-	-	12
EGC 100 μ M	3790.1 \pm 327.7	0.977	-	-	-	9
EC 100 μ M	3173.9 \pm 416.3	0.487	0.847	-	-	9
ECg 50 μ M	852.2 \pm 222.1	0.000*	0.000*	0.004*	-	9
ECg 100 μ M	396.3 \pm 46.9	0.000*	0.000*	0.001*	0.407	9
EGCg 50 μ M	378.3 \pm 143.1	0.000*	0.000*	0.001*	0.500	9

MEAN \pm SE

検定はGames-Howell法により行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。
光照射6分

50 μ M の添加の間には有意な差はなく、溶血抑制効果は同程度であった。AUC 値でみると、ECg 100 μ M と EGCg 50 μ M の値は同程度であった。

1.3.2. 赤血球膜酸化障害を指標としたカテキン類組み合わせ添加の効果

赤血球懸濁液に EGCg 50 μ M を添加し、さらに ECG 100 μ M、EC 100 μ M あるいは ECg 50 μ M を加え、光増感反応により酸化ストレスを与えた。Post-illumination における溶血度を図 1-8 に、AUC と検定の結果を表 1-2 に示した。

コントロールの AUC 4113.7 ± 310.4 と比べ、ECG 100 μ M、EC 100 μ M あるいは EGCg 50 μ M と EGCg 50 μ M の添加により、それぞれ 875.3 ± 325.9 、 260.1 ± 92.3 、 138.0 ± 35.6 となり、いずれも有意に溶血を抑制していた。しかし、いずれにおいても EGCg 50 μ M 単独添加の AUC 378.3 ± 143.1 と比較し、有意な溶血抑制効果は認められず、カテキン類を組み合わせることにより、さらに溶血抑制を増強するような相乗効果は認められなかった。EGCg と EGC の組み合わせでは、EGCg 単独添加よりも溶血を促進している傾向にあった。

1.4. 考察

赤血球膜酸化障害に各種カテキン類を単独で、あるいは組み合わせて添加し、これらの抗酸化能を評価した。各種カテキン類の抗酸化効果は、EGCg > ECg > EC > EGC の順で高値を示した。

DNA の酸化による損傷に対し、カテキン類の EC、EGC、ECG、EGCg は、 μ M レベルでそれを抑制することができ、カテキン類の中で最もその活性が強いのは EGCg であるとの報告⁸⁾がある。また、パーオキシナイトライトの捕捉効果においても、EGCg の捕捉能が最も高いとの報告⁹⁾されており、本研究結果と一致していた。

カテキン類の構造を図 1-9 に示す。本研究において強い抗酸化能を示したカテキン類は、EGCg および ECg であった。どちらもガロイル部分をもつ化合物であることから、本研究で用いた赤血球膜酸化障害にはガロイル部分が抗酸化能に強く影響することが示唆された。

また、EGCg と ECg の抗酸化能を比較すると、EGCg 50 μ M と ECg 100 μ M の AUC が同程度であったため、より低い濃度で溶血を抑制した EGCg は ECg に比べ抗酸化能が高いことが考えられた。B 環の σ -ジヒドロキシグループと 3 位のガロイル部分の有無はラ

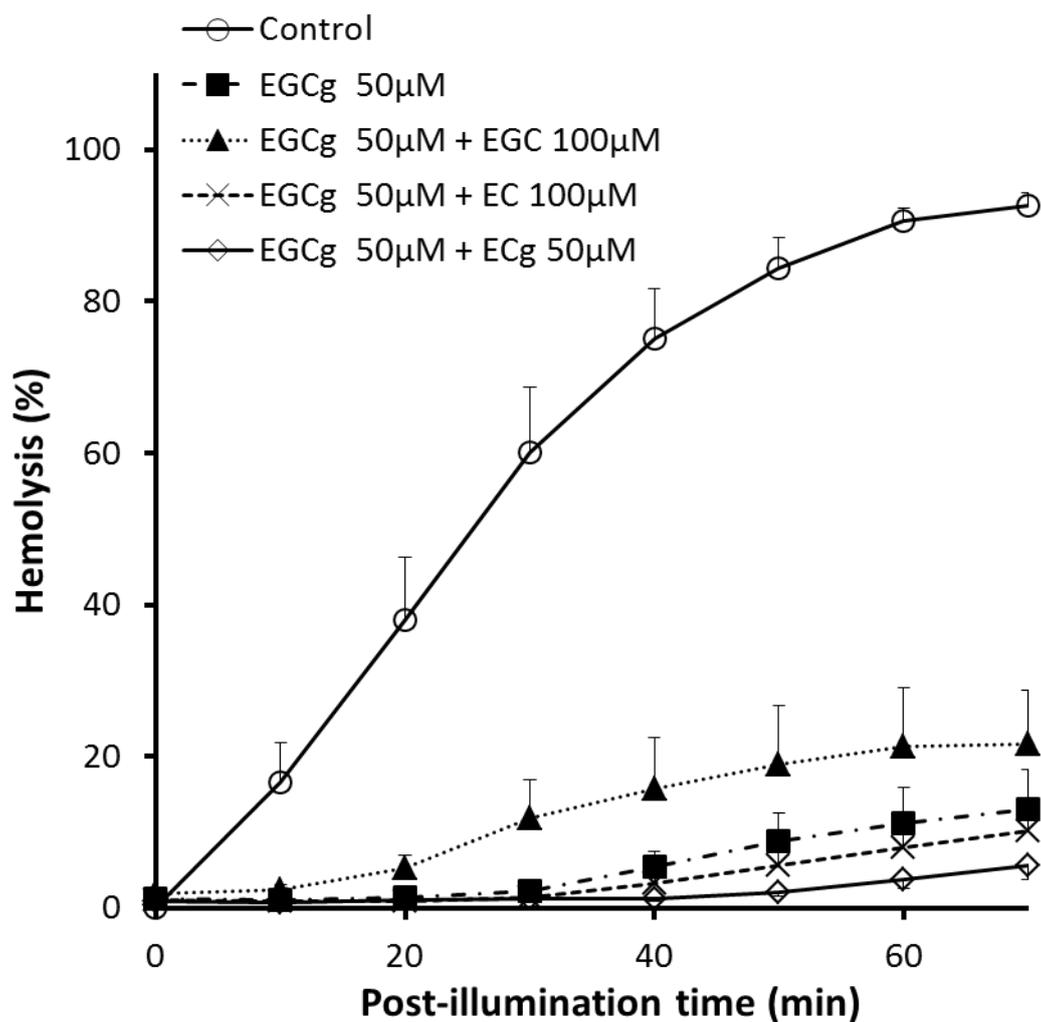


図 1-8 赤血球膜酸化障害に対するカテキン類添加の相乗効果

赤血球懸濁液と AIPcS_4 ($11.2 \mu\text{M}$) に EGCg と EGC、EC あるいは ECg を組み合わせて添加し、10 分間プレインキュベートした後、6 分間光照射を行った。遮光下 37°C でのインキュベート (post-illumination) 時における溶血度の変化を示した。
 コントロール (○ : $n=12$)、EGCg $50 \mu\text{M}$ (■ : $n=9$)、EGCg $50 \mu\text{M} + \text{EGC } 100 \mu\text{M}$ (▲ : $n=9$)、EGCg $50 \mu\text{M} + \text{EC } 100 \mu\text{M}$ (× : $n=9$)、EGCg $50 \mu\text{M} + \text{ECg } 50 \mu\text{M}$ (◇ : $n=9$) 平均値 ± 標準誤差で示した。

表 1-2 赤血球膜酸化障害に対するカテキン類添加の相乗効果

	AUC	P					n
		vs Control	vs EGCg 50μ M	vs EGCg 50μ M +EGC 100μ M	vs EGCg 50μ M +EC 100μ M	vs EGCg 50μ M +ECg 50μ M	
Control	4113.7 ± 310.4	-	-	-	-	-	12
EGCg 50μ M	378.3 ± 143.1	0.001*	-	-	-	-	9
EGCg 50μ M +EGC 100μ M	875.3 ± 325.9	0.002*	0.756	-	-	-	9
+EC 100μ M	260.1 ± 92.3	0.001*	0.964	0.647	-	-	9
+ECg 50μ M	138.0 ± 35.6	0.001*	0.522	0.270	0.978	-	9

MEAN±SE

検定はSteel-Dwass法により行い、p<0.05を有意差ありとした。
光照射6分

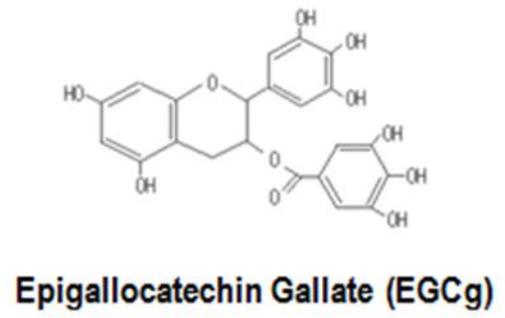
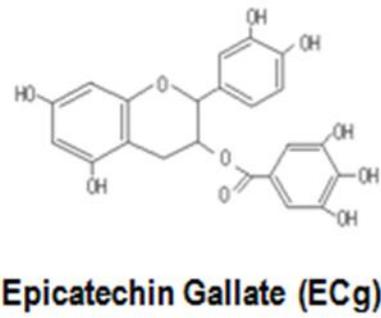
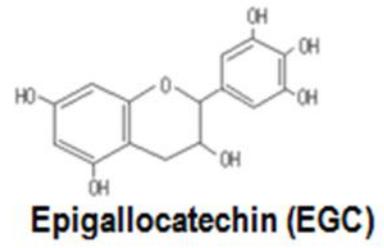
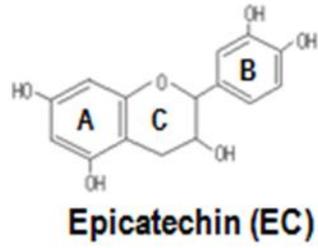


図 1-9 カテキン類の構造

ラジカル捕捉能に影響するため、カテキン類の中では最も EGCg の抗酸化効果が高いと報告⁹⁾されていることからガロイル部分が抗酸化能の強さに影響していることが推察された。

カテキン類を組み合わせることによる相乗効果は、EGCg と EGC の組み合わせでは、組み合わせることにより抗酸化能が低下していた。また、これ以外の組み合わせにおいても各カテキン類単独添加による溶血抑制効果に EGCg の溶血抑制効果が単にプラスされただけの結果となり、カテキン類を組み合わせることによる相乗効果は期待できないと示唆された。しかし、赤血球膜酸化障害評価法により得られた緑茶抽出物 (0.25mg/mL) を添加した結果と比較 (図 1-10) するとカテキン類の一つであるエピガロカテキンガレート (EGCg) の 100 μ M 添加に比べて溶血抑制能が高かった。茶葉のカテキン類の含有量を測定した文献¹⁰⁾から緑茶抽出物の EGCg 含有量を概算値で求めると、緑茶抽出物の EGCg 含有量は 100 μ M よりも低いことが確認できた。そのため、カテキン類による抗酸化能の相乗効果を期待し実験を行ったが、相乗効果は認められなかった。そこで、緑茶に含まれるカテキン類以外の成分 (表 1-3)¹¹⁾、例えば、アスコルビン酸等の抗酸化物質との組み合わせ等の影響により、強い抗酸化能が発揮されたのではないかと推察できた。

Fujisawa ら¹²⁾によると、 α -トコフェロールあるいは L-アスコルビル 2,6-ジブチラート (アスコルビン酸派生物) と EC、EGC、ECg あるいは EGCg と抗酸化相乗効果について検討し、その結果、EGCg が単独の場合は、最もラジカル捕捉能は高かったが、 α -トコフェロールあるいは L-アスコルビル 2,6-ジブチラートと共存させた場合、EGCg の添加によりラジカル捕捉能は低下したとある。また、抗酸化相乗効果は、フェノールの OH 結合の解離のエントロピーがビタミン E のそれよりも有意に高い時に現れると報告している。本研究において、EGCg と EC、EGC あるいは ECg を組み合わせ赤血球膜酸化障害への影響を検討したが、EGCg の電子構造により相乗効果が認められなかった可能性も考えられた。

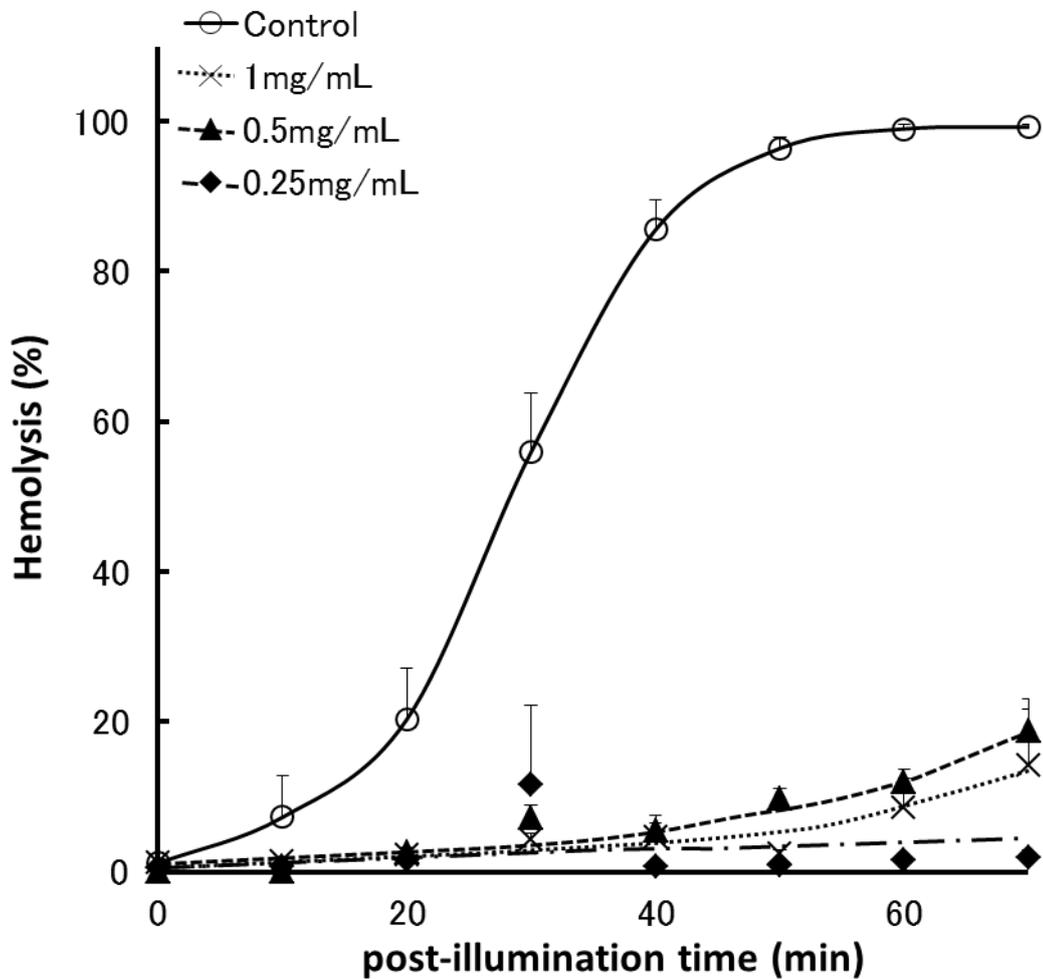


図 1-10 AIPcS₄ 光増感反応による赤血球膜障害への緑茶抽出物の効果

赤血球懸濁液とAIPcS₄ (11.2 μM)に緑茶抽出物(GTE)を添加し、10分間プレインキュベートした後、5分間照射を行った。遮光下 37°Cでのインキュベート (post-illumination) 時における溶血度の変化を示した。GTE は、緑茶茶葉 10g に蒸留水 200mL を加え、沸騰後 10 分間煮出し、濾過後、凍結乾燥し、茶葉 50mg/ml に調製したものをを用いた。

コントロール (○: n=13)、GTE 1 mg/mL (×: n=5)、GTE 0.5 mg/mL (▲: n=5)、GTE 0.25 mg/mL (◆: n=5)

平均値 ± 標準誤差で示した。

表 1-3 茶の成分¹⁾

茶種	タンニン	アミノ酸	カフェイン	遊離還元糖	ビタミンC	リン	カリウム	カルシウム	マグネシウム
玉露	乾物	5.15g	3.96g	0.77g	186.1mg	518.8mg	2.55g	246.5mg	280.4mg
	煎汁	452.9mg	179.9mg	36.6mg	18.3mg	14.7mg	167.0mg	2.0mg	10.5mg
煎茶(上)	乾物	5.25g	2.52g	1.25g	484.1mg	535.0mg	2.00g	254.5mg	162.1mg
	煎汁	117.4mg	19.7mg	12.3mg	10.7mg	2.4mg	20.3mg	0.4mg	1.0mg
煎茶(並)	乾物	3.85g	2.25g	1.50g	475.9mg	473.5mg	1.98g	300.0mg	168.9mg
	煎汁	53.2mg	17.2mg	12.5mg	6.7mg	1.5mg	15.8mg	0.4mg	1.0mg

(乾物100g・煎汁100ml中)

1.5. 小括

赤血球膜酸化障害にカテキン類を添加し、抗酸化能を評価したところ、単独添加では、EGCg>ECg>EC>EGC の順で溶血抑制効果が認められた。カテキン類のうちガロイル部分を持つカテキン類に強い抗酸化活性があることが示唆された。

次に、EGCg と EC、EGC あるいは ECg を組み合わせて赤血球酸化障害に対する溶血抑制効果を評価したところ、それぞれ 2 種類のカテキン類単独の溶血抑制効果以上の溶血抑制効果は示されなかった。また、EGCg と EGC の組み合わせでは、EGCg 単独添加よりも溶血抑制効果は弱くなった。このことから、EGCg とその他カテキン類を組み合わせることによる相乗効果は期待できないものと示唆された。

1.6. 参考文献

- 1) Ebeler SE, Brenneman CA, Kim G, Jewell WT, Webb MR, Chacon-Rodriguez L, MacDonald EA, Cramer AC, Levi A, Ebeler JD, Islas-Trejo A, Kraus A, Hinrichs SH, Clifford AJ (2002) Dietary catechin delays tumor onset in a transgenic mouse model. *Am J Clin Nutr* **76**, 865-872
- 2) Steele VE, Kelloff GJ, Balentine D, Boone CW, Mehta R, Bagheri D, Sigman CC, Zhu S, Sharma S (2000) Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by *in vitro* bioassays. *Carcinogenesis* **21**, 63-67
- 3) Nanjo F, Mori M, Goto K, Hara Y (1999) Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 1621-1623
- 4) Niki E, Komuro E, Takahashi M, Urano S, Ito E, Terao K (1988) Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. *J Biol Chem* **263**, 19809-19814
- 5) Li S, Su Y, Li M, Zou C (2006) Hemin-mediated hemolysis in erythrocytes: effects of ascorbic acid and glutathione. *Acta Biochim Biophys Sin* **38**, 63-69
- 6) 水上茂樹 (1977) 赤血球の生化学 東京大学出版会
- 7) Sonoda M, Krishna CM, Riesz P (1987) The role of singlet oxygen in the photohemolysis of red blood cells sensitized by phthalocyanine sulfonates. *Photochem Photobiol* **46**, 625-631
- 8) Anderson RF, Fisher LJ, Hara Y, Harris T, Mak WB, Melton LD, Packer JE (2001) Green tea catechins partially protect DNA from $\cdot\text{OH}$ radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. *Carcinogenesis* **22**, 1189-1193
- 9) Chung HY, Yokozawa T, Soung DY, Kye IS, No JK, Baek BS (1998) Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin. *J Agric Food Chem* **46**, 4484-4486
- 10) 西條了康, 武田善行 (1999) HPLCによる各種緑茶に含まれるカテキン類の分析. 日本食品科学工学会誌 **46**, 138-147

- 11) 村松敬一郎 (1994) 茶の科学 朝倉書店
- 12) Fujisawa S, Ishihara M, Atsumi T, Kadoma Y (2006) A quantitative approach to the free radical interaction between alpha-tocopherol or ascorbate and flavonoids. *in vivo* **20**, 445-452

第2章 赤血球膜酸化障害評価法を指標としたエピガロカテキングレートの抗酸化機序の検討

2.1. 背景

第1章において赤血球膜酸化障害を用いて各種カテキン類の抗酸化能を評価したところ、カテキン類の中でガロイル部分を有するエピガロカテキングレート (EGCg) の抗酸化能が最も高い結果となった。EGCg は腫瘍のアポトーシスを誘発する^{1),2)}、血管内皮細胞において NO の産生を介する血管弛緩に関与するとも報告されている³⁾など抗酸化活性以外にも様々な機能性を持つことが知られている。

EGCg は抗酸化活性をもつ主要な緑茶成分であることから、本章では EGCg に焦点を当て、その抗酸化機序について検討することとした。つまり、本章では赤血球膜酸化障害評価法を用いた溶血パターンに加え、赤血球膜脂質の過酸化脂質量や赤血球膜タンパク質の分解についても併せて総合的に評価した。

2.2. 実験方法

2.2.1. 試料

2.2.1.1. 洗浄赤血球の調製

1.2.2.1. 1) と同様

2.2.1.2. エピガロカテキングレート溶液の調製

1.2.2.1. 2) と同様

2.2.2. 光増感溶血反応

2.2.2.1. コントロール溶血パターン

1.2.2.2. 1) と同様

2.2.2.2. EGCg あるいは一重項酸素クエンチャー共存下の溶血パターン

1.2.2.2. 2) と同様、赤血球懸濁液、AlPcS₄および PBS の反応系に EGCg 100 μM あ

るいは一重項酸素のクエンチャーとして知られるトリプトファン (Trp) ⁴⁾をそれぞれ 1cm 角石英セルにセットし、プレインキュベート、光照射による一重項酸素曝露、post-illumination 反応を実施 (図 2-1) して溶血パターンを得た。

2.2.2.3. 一重項酸素捕捉能の測定

一重項酸素捕捉能の測定はニトロソアニリンブリーチング法 ⁴⁾を用いた。これは、光増感反応により発生した一重項酸素とイミダゾールが反応し、その反応生成物によりニトロソアニリンのブリーチングが起こることを利用し一重項酸素の生成量を推定する方法である。

ニトロソアニリン 33.5 μ M、イミダゾール 13.4mM、AlPcS₄ 11.2 μ M に EGCg あるいは Trp を加え、全量が 1mL になるように PBS を添加した後、光照射を 10 分間行った。この溶液の吸光度 (波長 440nm) つまり、ニトロソアニリンの吸光度を測定し、吸光度からブリーチング量を求め、この量を EGCg と Trp の一重項酸素クエンチャー能とした。

なお、この実験系からイミダゾールのみを除いた、つまりニトロソアニリン、AlPcS₄、EGCg あるいは Trp、PBS に光照射を行い、Trp や EGCg がブリーチングに影響しないか確認した。Trp は影響しないことが確認できたが、EGCg は若干ニトロソアニリンのブリーチングを起こし、吸光度を低下させた。そのため、EGCg を添加した際は、EGCg による吸光度の減少分を差し引いたものをブリーチング量とした。

2.2.2.4. 赤血球膜と EGCg との相互作用

遮光下にて赤血球懸濁液を EGCg とインキュベートしたのち遠心分離し、赤血球画分を PBS でさらに 3 回洗浄して EGCg 前処理赤血球を調製した (以降、「EGCg 前処理赤血球」とする)。この EGCg 前処理赤血球を試料として、すなわち、細胞外溶液に EGCg が存在しない条件下で一重項酸素を曝露して溶血パターンを求めた。EGCg を加えていないコントロール溶血パターンの作成には、赤血球懸濁液に PBS を加え 3 回 PBS で洗浄した赤血球を用いた (図 2-2)。

2.2.3. 赤血球膜酸化障害の評価

2.2.3.1. 赤血球膜脂質過酸化物の測定

一重項酸素曝露後の赤血球膜脂質過酸化物の測定はチオバルビツール酸 (TBA) 法にて

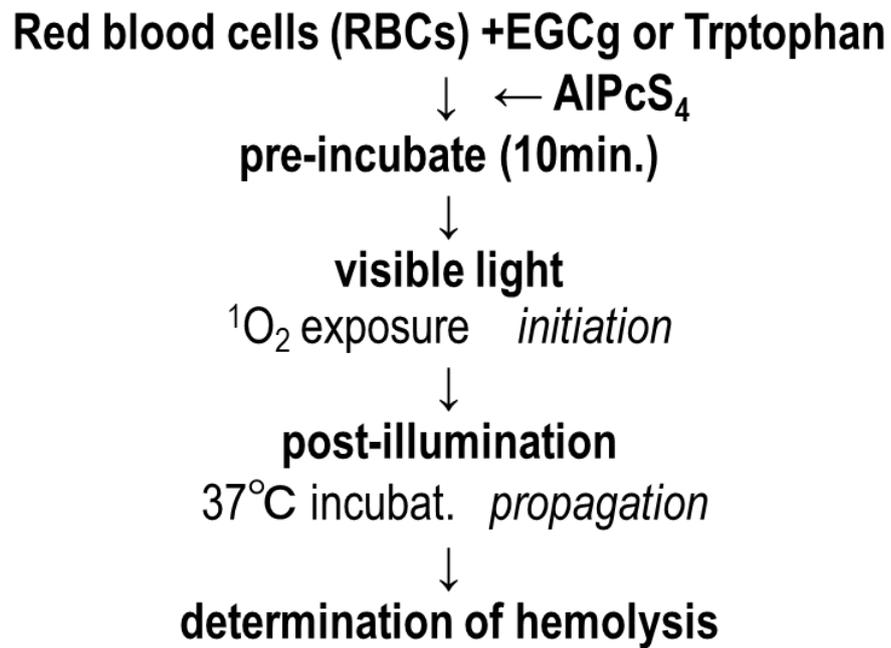


図 2-1 赤血球膜酸化障害における抗酸化物質の添加効果測定法

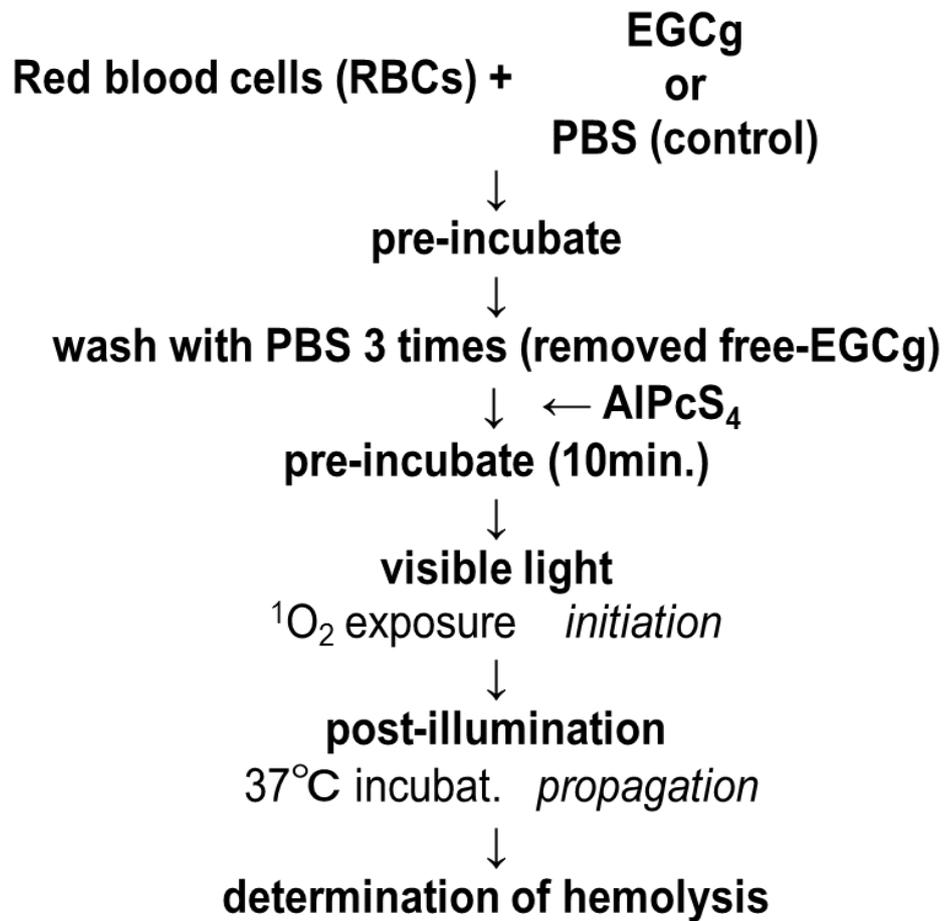


図 2-2 エピガロカテキンガレート前処理赤血球の調製および酸化障害測定法

行った。すなわち赤血球懸濁液に 1.2.2.2.と同様の方法で一重項酸素を曝露した後、post-illumination 0、15、30、60 分毎にサンプリングを行い、遠心分離（1,000 r.p.m.、10 分間）した。遠心上清を褐色遠沈管に移し、N/12 硫酸を 4mL 加えた。さらに、10% リンタングステン酸 0.5mL を加え、除タンパクを行った後、3,000 r.p.m. 10 分間遠心分離を行った。上清を捨て、蒸留水 4mL を加えて沈殿物をよく懸濁させた。そこへ TBA 試薬（2-チオバルビツール酸 3.35mg/mL）1mL を加え 60 分間沸騰水浴中で加熱し、冷却後 n-ブタノールで抽出した。得られたブタノール層の蛍光強度を蛍光光度計（RF-503A 島津製作所製）にて励起波長 515nm、蛍光波長 553nm で測定した。標準液として、1,1,3,3-テトラエトキシプロパン（5nmol/mL）0.05mL についても同様に操作し、標準液の蛍光強度 F および試料の蛍光強度 f を測定した。

過酸化脂質濃度は以下の計算式により算出した。

$$(\text{マロンジアルデヒドとして}) \text{ nmol/mL} = f / F \times 83.3^*$$

*標準液採取量は、0.05mL（1,1,3,3-テトラエトキシプロパン 5nmol/mL）であり、試料採取量は $10 \mu\text{L/mL} \times 0.5\text{mL} \times (0.3\text{mL}/0.5\text{mL}) = 3 \mu\text{L}$ であるため、1,1,3,3-テトラエトキシプロパンは過酸化脂質濃度として、 $5\text{nmol/mL} \times 0.05\text{mL}/0.003\text{mL} = 83.3\text{nmol/mL}$ となる。

2.2.3.2. 赤血球膜タンパク質の電気泳動像

1.2.2.2.の通り、赤血球懸濁液に一重項酸素を曝露し、post-illumination 0、20、40、60 分ごとに遠心分離（4℃、13,000 r.p.m.、30 分間）したのち、トリス塩酸緩衝液（10mM、pH7.4）を加えて赤血球を溶血させた。遠心分離とトリス塩酸緩衝液洗浄操作を繰り返し、赤血球膜画分を回収した。赤血球膜画分に 10% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液とサンプル緩衝液（0.5M トリス塩酸緩衝液 pH6.8 にブロモフェノールブルー、10%SDS、β-メルカプトエタノール、グリセリンを溶解）を加え、沸騰水浴中に 3 分間保持し泳動用試料とした。電気泳動は泳動ゲルプレート（PAGEL パジエル NPU10L、アトー社製）に泳動用試料 20 μL をアプライし、泳動緩衝液（0.25M トリス／0.192M グリシン／0.1%SDS）、90V、80mA で 120 分間実施した。泳動後、染色液（0.25%クマシーブリリアントブルー／50%メタノール／7%酢酸）で 1 時間染色後、脱色液（25%メタノール／7%酢酸）で脱色処理をした。

2.2.4. 統計処理

1.2.2.2. 4)と同様に、検定は、溶血曲線の曲線下面積 (AUC) を比較することで行った。一元配置分散分析の手法を用い、多重比較は、正規分布に従いかつ、等分散性が仮定できるデータは Tukey の HSD 検定、正規分布に従いかつ、等分散性が仮定できないデータは Games-Howell 検定、正規分布に従わないデータは Steel-Dwss 法を用いた。Tukey の HSD 検定および Games-Howell 検定は IBM SPSS Statistics 22 を Steel-Dwss 法は R ver. 2.8.1 を使用し統計処理を行った。p<0.05 を統計的に有意とした。

2.3. 結果

2.3.1. 一重項酸素曝露洗浄赤血球への EGCg 添加効果

EGCg の濃度を変化させたときの赤血球膜酸化障害に対する影響を図 2-3 に示し、表 2-1 に AUC と検定結果を示した。post-illumination 70 分におけるコントロールの溶血率、99.2±0.4% に比べ、EGCg の 10 μ M、50 μ M、100 μ M の添加で、それぞれ 96.4±3.0%、49.6±6.2%、17.0±7.5% の溶血率であった。EGCg の添加により濃度依存的に溶血を抑制した。AUC では、コントロール 4108.5±185.7 に対し、EGCg 50 μ M、100 μ M の添加で、それぞれ 1957.8±351.0、601.2±84.7 であり、有意に溶血を抑制していた。さらに、EGCg 100 μ M の添加は 10 μ M 添加に対しても有意に AUC が低値であった。EGCg 10 μ M の添加ではコントロールに比べ有意な差は認められなかった。

次に赤血球懸濁液に EGCg あるいは一重項酸素のクエンチャーである Trp を添加し、一重項酸素曝露後、post-illumination における溶血パターンを測定した (図 2-4)。Post-illumination 60 分後において、コントロールの溶血率、平均値±標準誤差、99.0±0.6% であるのに対し、EGCg 100 μ M、Trp 6.7mM、Trp 13.3mM はそれぞれ 11.0±2.0%、79.3±13.5%、28.5±16.0% であった。AUC (表 2-2) は、コントロール 3078.6 ±194.7 と比べ、EGCg 100 μ M、Trp 13.3mM は 461.6±73.9、565.2±321.2 であり、それぞれ有意に溶血を抑制していた。Trp 6.7mM の添加ではコントロールに対し有意な溶血抑制効果は認められなかった。

2.3.2. EGCg の一重項酸素捕捉能

EGCg および Trp の一重項酸素捕捉能の測定にはニトロソアニリンブリーチング法を用いた。結果は図 2-5 に示す。光照射 10 分間におけるブリーチング量 (440nm の吸光度減

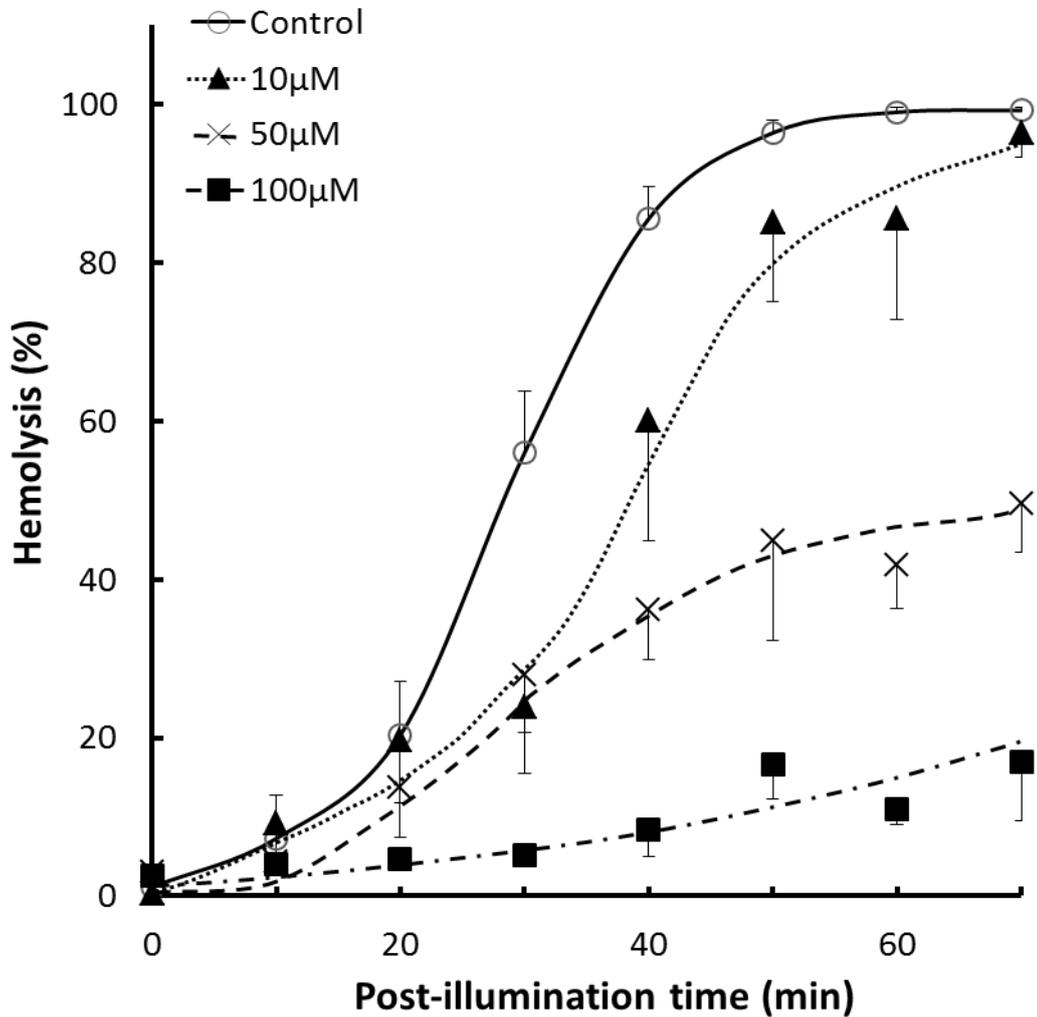


図 2-3 赤血球膜酸化障害へのエピガロカテキンガレート添加効果

赤血球懸濁液、AIPcS₄(11.2 µM)に EGCgを添加し、10 分間プレインキュベートした後、5 分間光照射を行った。遮光下 37°Cでのインキュベート(post-illumination)時における溶血度の変化を示した。

コントロール(O : n=13)、EGCg 10 µM(▲ : n=5)、EGCg 50 µM(× : n=5)、EGCg 100 µM(■ : n=7)

平均値±標準誤差で示した。

表 2-1 エピガロカテキンガレート添加時の溶血曲線 曲線下面積 (AUC 0-70)

	AUC	P			n
		vs Control	vs 10 μ M	vs 50 μ M	
Control	4108.5 \pm 185.7	-	-	-	13
EGCg 10 μ M	3295.1 \pm 384.8	0.364	-	-	5
EGCg 50 μ M	1957.8 \pm 351.0	0.007*	0.194	-	5
EGCg 100 μ M	601.2 \pm 84.7	0.002*	0.023*	0.086	7

MEAN \pm SE

検定はSteel-Dwass法により行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。
 光照射5分

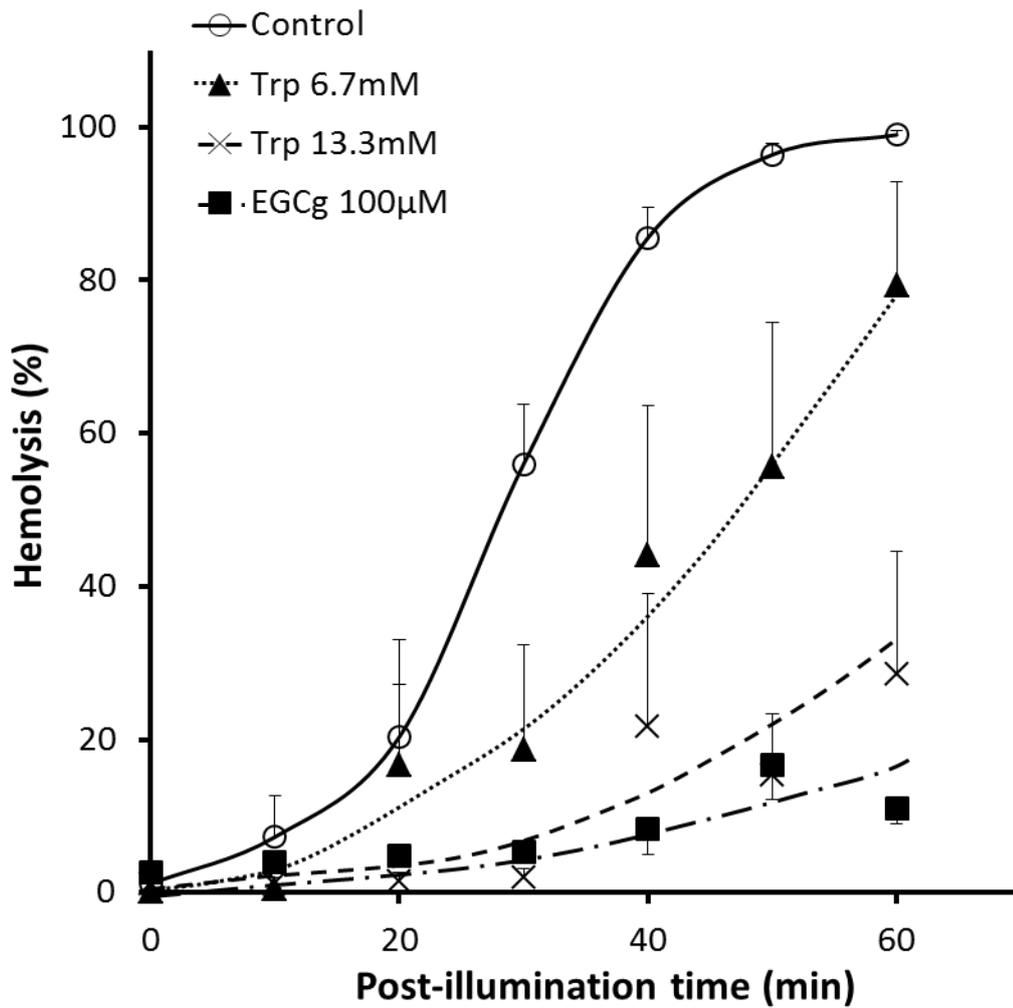


図 2-4 赤血球膜酸化障害への抗酸化剤添加の効果

赤血球懸濁液、AIPcS₄(11.2 µM)にトリプトファンあるいは EGCgを添加し、10 分間プレインキュベートした後、5 分間光照射を行った。遮光下 37°Cでのインキュベート(post-illumination)時における溶血度の変化を示した。

コントロール(○:n=13)、Trp 6.7mM(▲:n=5)、Trp 13.3mM(×:n=4)、EGCg 100 µM(■:n=7)

平均値±標準誤差で示した。

表 2-2 抗酸化剤あるいはエピガロカテキンガレート添加時の溶血曲線 曲線下面積 (AUC 0-60)

	AUC	P		n
		vs Control	vs Trp 6.7mM vs Trp 13.3mM	
Control	3078.6 ± 194.7	-	-	13
Trp 6.7mM	1750.9 ± 670.1	0.339	-	5
Trp 13.3mM	565.2 ± 321.2	0.003*	0.449	4
EGCg 100µ M	461.6 ± 73.9	0.000*	0.348	7

MEAN ± SE

検定はGames-Howell法により行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。
 光照射5分

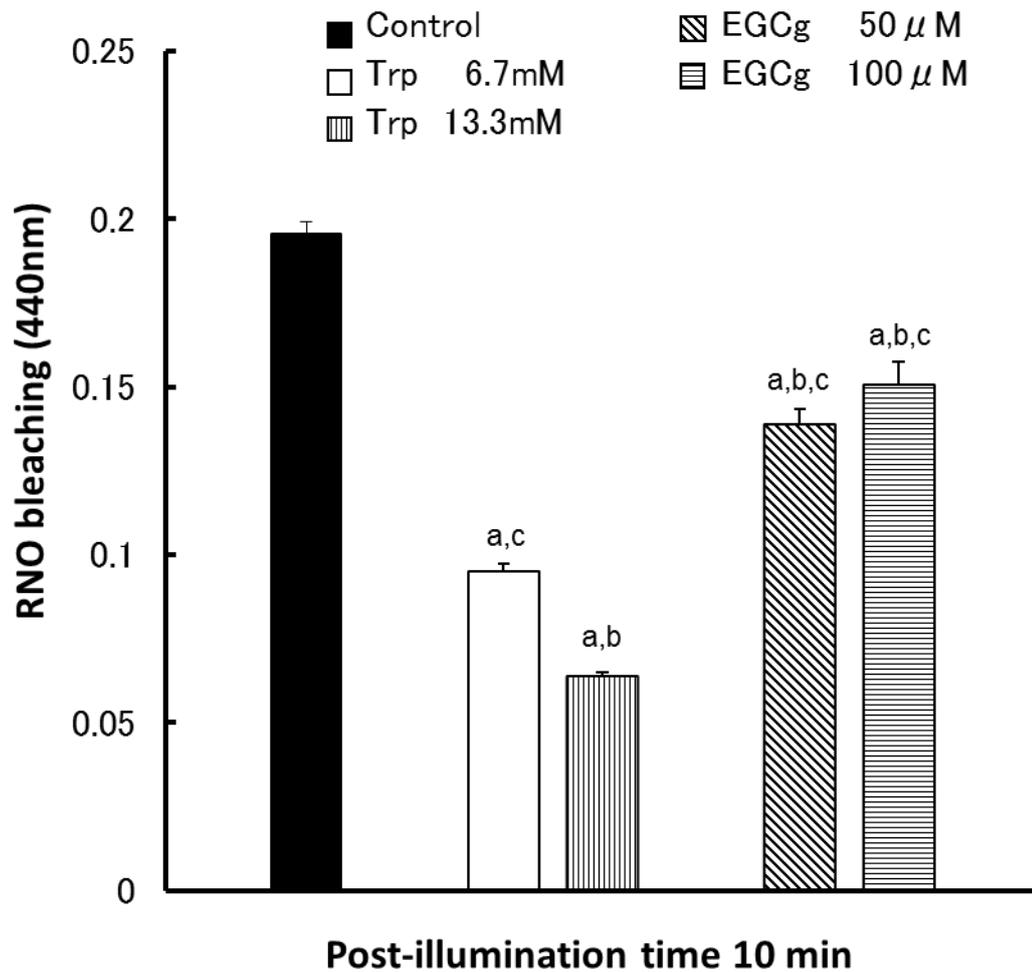


図 2-5 トリプトファンおよびエピガロカテキンガレートの一重項酸素捕捉効果

ニトロソアニリンとイミダゾールの入った溶液に、 AlPcS_4 とトリプトファンあるいは EGCg を加え、光照射を 10 分間行った際の吸光度 (440nm) のブリーチング量を示した。

コントロール (■ : n=8)、Trp 6.7mM (□ : n=6)、Trp 13.3mM (▣ : n=6)、EGCg 50 μM (▤ : n=6)、EGCg 100 μM (▥ : n=6)

^ap<0.05 vs Cotrol、^bp<0.05 vs Trp 6.7mM、^cp<0.05 vs Trp 13.3mM
 平均値±標準誤差で示した。

少量) は 0.195 ± 0.004 であった (コントロール)。これに対し、Trp 6.7mM、13.3mM 添加では、それぞれ 0.095 ± 0.002 、 0.064 ± 0.001 であった。コントロールのブリーチング量を 100%とした Trp 添加のブリーチング量の割合は、6.7mM、13.3mM 添加でそれぞれ 49%と 33%であった。つまり、一重項酸素の捕捉量は Trp 6.7mM では 51%、Trp 13.3mM では 67%と見積もることができ、濃度依存的に一重項酸素を捕捉していた。一方、EGCg 50 μ M、100 μ M の添加では、それぞれ 0.139 ± 0.004 、 0.151 ± 0.007 であった。つまり、コントロールのブリーチング量に対する割合は、それぞれ 71%、77%で、一重項酸素の捕捉量は、EGCg 50 μ M の添加で 29%、100 μ M の添加で 23%と見積もられ、濃度に依存せず同程度であった。コントロールすなわち光照射 10 分間における一重項酸素生成量に対し、Trp、EGCg の添加により有意に一重項酸素を捕捉していた。捕捉能は高い順に Trp 13.3mM > Trp 6.7mM > EGCg 100 μ M = EGCg 50 μ M であった。

2.3.3. 赤血球膜と EGCg との相互作用の検討

洗浄赤血球に EGCg を添加し、その後、PBS にて洗浄することにより、赤血球懸濁液中に溶存する EGCg を除去した EGCg 前処理赤血球に一重項酸素を曝露した溶血度の結果を図 2-6 に、AUC と検定結果を表 2-3 に示した。post-illumination 70 分における溶血度は、コントロール、EGCg 前処理赤血球の EGCg 添加量 10 μ M、50 μ M、100 μ M では、平均値 \pm 標準誤差で $93.6 \pm 6.4\%$ 、 $80.9 \pm 8.8\%$ 、 $53.2 \pm 7.0\%$ 、 $9.3 \pm 4.0\%$ であり、洗浄赤血球に添加した EGCg 量の増加に伴い溶血率は低下した。また、AUC はコントロール、EGCg 前処理赤血球の EGCg 添加量 10 μ M、50 μ M、100 μ M、それぞれ 3715.7 ± 490.9 、 1798.8 ± 316.4 、 1031.0 ± 218.5 、 216.3 ± 107.6 であった。コントロールの AUC 値に比べ、EGCg 50 μ M、100 μ M の添加で有意に溶血抑制効果が認められた。さらに、EGCg 100 μ M は 50 μ M に比べ有意に溶血を抑制していた。

2.3.4. 赤血球膜過酸化連鎖反応における EGCg の抑制効果

洗浄赤血球に EGCg を加え、一重項酸素を曝露後、post-illumination 0、15、30、60 分毎にサンプリングした検液の過酸化脂質量を測定した。経時的な過酸化脂質量の変化を図 2-7 に、0~60 分の過酸化脂質量の総量と検定の結果を表 2-4 に示した。

図 2-7 より、コントロールおよび EGCg を加えた検液の過酸化脂質量は経時的に増加していることが分かり、溶血とともに過酸化脂質量が増加していた。過酸化脂質量総量

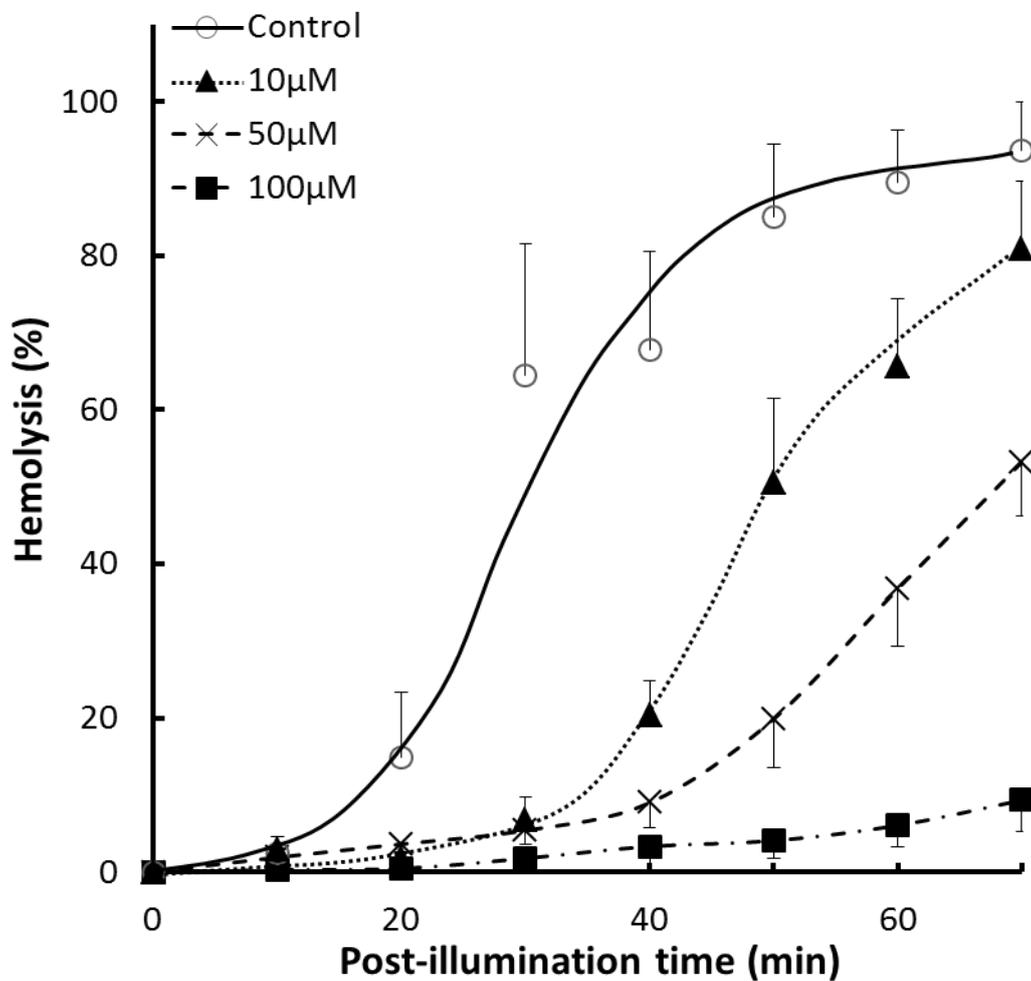


図 2-6 エピガロカテキンガレート前処理赤血球の溶血抑制効果

赤血球懸濁液に EGCg を添加した後、再洗浄を行い、赤血球懸濁液中の EGCg を除去した赤血球に AIPcS₄ を添加し、10 分間プレインキュベートした後、6 分間光照射を行った。遮光下 37°C でのインキュベート (post-illumination) 時における溶血度の変化を示した。

コントロール (○: n=7)、EGCg 10 µM (▲: n=7)、EGCg 50 µM (×: n=10)、EGCg 100 µM (■: n=5)

平均値 ± 標準誤差で示した。

表 2-3 エピガロカテキンガレート前処理赤血球の溶血曲線の溶血曲線 曲線下面積

	AUC	P		n
		vs Control	vs 10 μ M vs 50 μ M	
Control	3715.7 \pm 490.9	-	-	7
10 μ M	1798.8 \pm 316.4	0.114	-	7
EGCg前処理 50 μ M	1031.0 \pm 218.5	0.01*	0.460	10
赤血球 100 μ M	216.3 \pm 107.6	0.023*	0.037*	5

MEAN \pm SE

検定はSteel-Dwass法により行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。
光照射6分

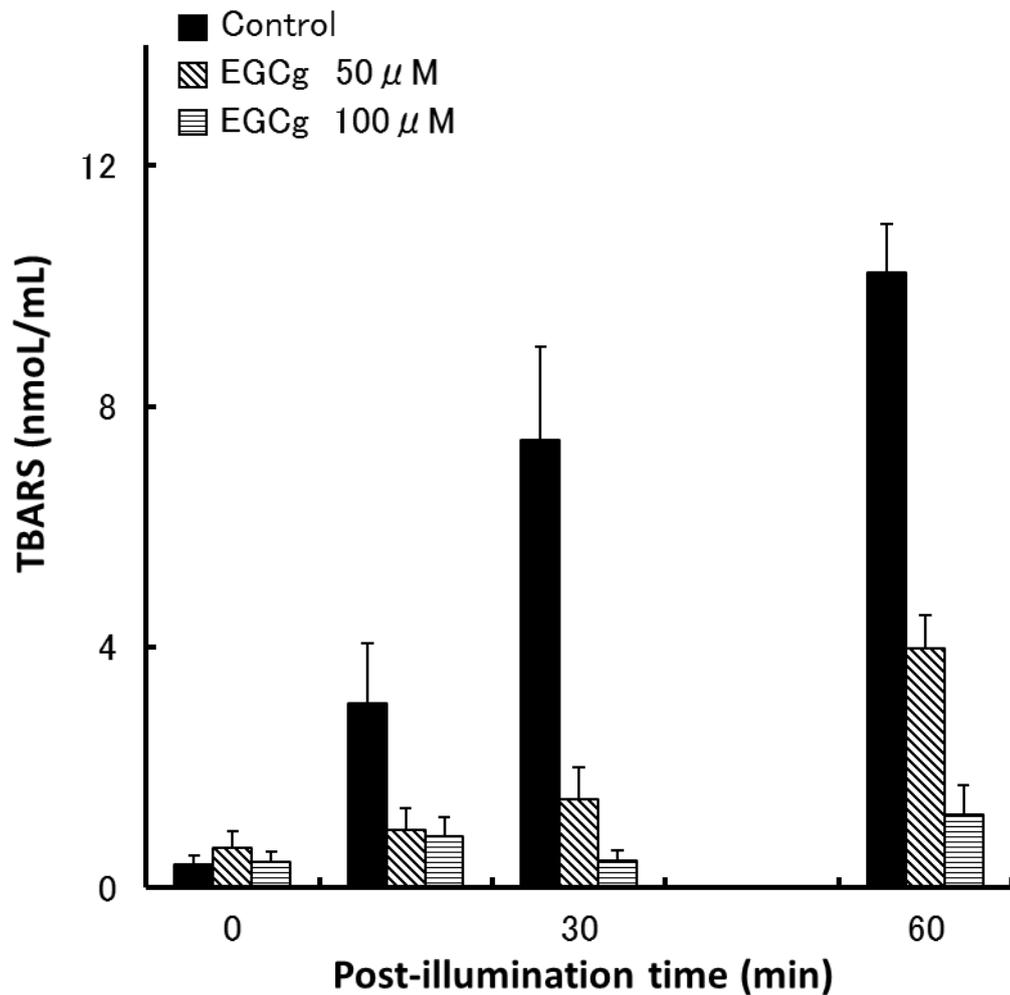


図 2-7 赤血球膜脂質過酸化反応へのエピガロカテキンガレート添加による効果

赤血球懸濁液、AIPcS₄ (11.2 μM) に EGCg を添加し、10 分間プレインキュベートした後、10 分間光照射を行った。遮光下 37°C でのインキュベート (post-illumination) 0、30、60 分後における過酸化脂質量を TBA 法にて測定した結果を示した。コントロール (■ : n=6)、EGCg 50 μM (▨ : n=6)、EGCg 100 μM (▩ : n=6) 平均値 ± 標準誤差で示した。

表 2-4 エピガロカテキンガレート添加時の過酸化脂質総量

	過酸化脂質量 TBARS		P	n
	nmol/ml(0~60分総和)	vs Control		
Control	21.12 \pm 3.17	-	-	6
EGCg 50 μ M	7.05 \pm 1.35	0.001*	-	6
EGCg 100 μ M	3.45 \pm 0.74	0.000*	0.443	6

MEAN \pm SE

検定はTukeyのHSD法により行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。
 光照射10分

(TBARS) は、コントロール 21.12 ± 3.17 nmol/mL に比べ、EGCg $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ の添加でそれぞれ 7.05 ± 1.35 、 3.45 ± 0.74 nmol/mL であり、有意に過酸化脂質量は低値を示した。

2.3.5. EGCg 前処理赤血球の赤血球膜過酸化脂質の抑制効果

洗浄赤血球に EGCg を添加、インキュベート後、再洗浄し赤血球懸濁液中に溶存する EGCg を除去した EGCg 前処理赤血球に、一重項酸素を曝露し、その後の post-illumination 0、15、30、60 分後の過酸化脂質量を測定した。post-illumination の経時的な過酸化脂質量の変化を図 2-8 に、post-illumination 0、15、30、60 分の過酸化脂質量を合わせた過酸化脂質総量と検定の結果を表 2-5 に示した。post-illumination 時の経時的な過酸化脂質量は、図 2-7 の結果と同様、経時的に過酸化脂質量は増加した。過酸化脂質総量 (TBARS) では、コントロール 26.72 ± 1.62 nmol/mL に比べ、EGCg 前処理赤血球、EGCg 添加量 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ では、それぞれ、 16.55 ± 1.45 、 1.18 ± 0.59 nmol/mL であった。EGCg $50 \mu\text{M}$ および $100 \mu\text{M}$ 前処理赤血球の過酸化脂質総量はコントロールに比べ、有意に低値を示した。

2.3.6. 赤血球膜タンパク質への EGCg 添加の影響

赤血球懸濁液に一重項酸素を曝露後、その後の post-illumination の赤血球から分離したタンパク質 (a)、赤血球懸濁液に EGCg を $100 \mu\text{M}$ 添加した後、a と同様に操作し得られたタンパク質 (b)、洗浄赤血球に EGCg $100 \mu\text{M}$ を添加し、プレインキュベート後、再洗浄を行った、EGCg 前処理赤血球を a と同様に操作し得られたタンパク質 (c) の電気泳動像を図 2-9 に示した。コントロールでは、レーン 4 に示す post-illumination 40 分経過後から 36.5KDa 付近のバンドの消失がみられるものの、EGCg 共存下の赤血球および EGCg 前処理赤血球では、このバンドの消失変化が大幅に遅延した。また、他のバンドにおいても、EGCg 共存下の赤血球並びに EGCg 前処理赤血球では、コントロールと比べて膜タンパク質の変性が抑制される結果が得られた。

2.4. 考察

2 章では、エピガロカテキンガレート (EGCg) とヒト赤血球との相互作用に視点を置

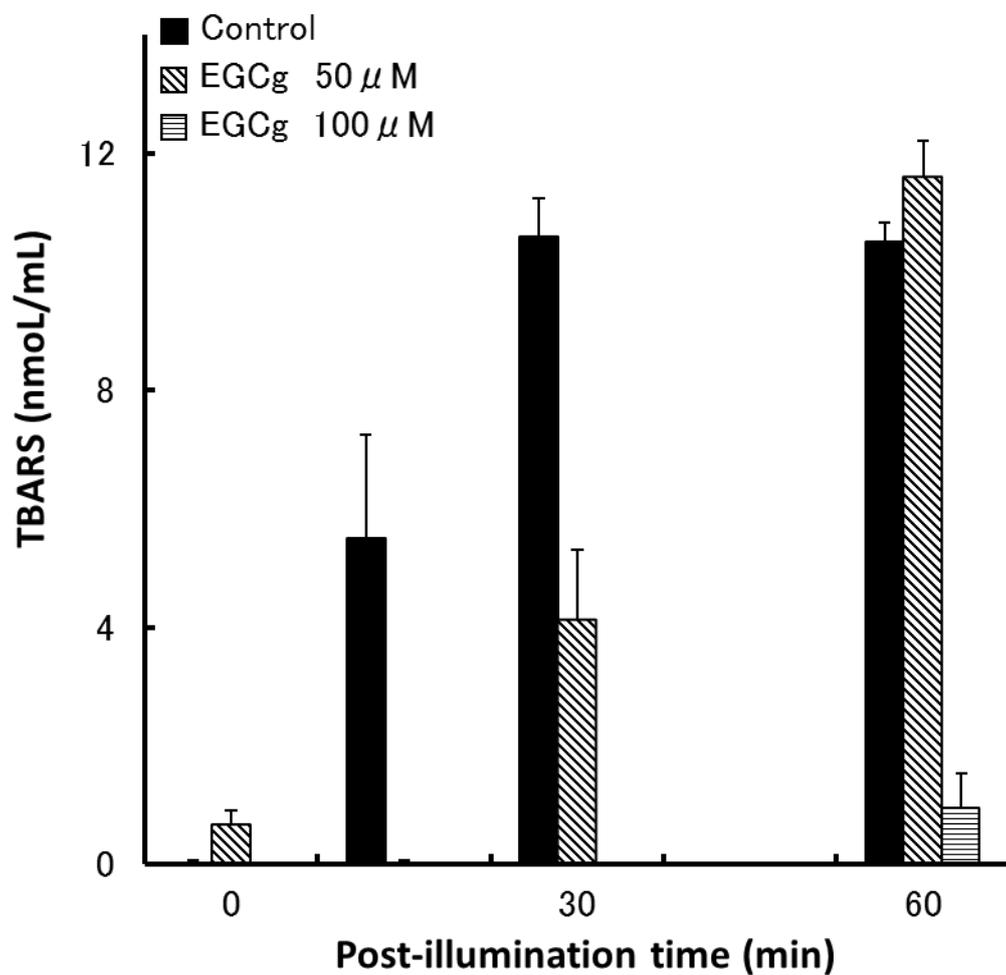


図 2-8 エピガロカテキンガレート前処理赤血球による膜脂質過酸化反応への影響

赤血球懸濁液に EGCg を添加した後、再洗浄を行い、赤血球懸濁液中の EGCg を除去した赤血球に AlPcS_4 を添加し、10 分間プレインキュベートした後、10 分間光照射を行った。遮光下 37°C でのインキュベート (post-illumination) 0、30、60 分後における過酸化脂質量を TBA 法にて測定した結果を示した。

コントロール (■ : n=8)、EGCg $50\ \mu\text{M}$ (▨ : n=8)、EGCg $100\ \mu\text{M}$ (▩ : n=8) 平均値±標準誤差で示した。

表 2-5 エピガロカテキンガレート前処理赤血球における過酸化脂質総量

	過酸化脂質量 TBARS		P	n
	nmol/ml(0~60分総和)	vs Control		
Control	26.72 \pm 1.62	-	-	8
EGCg前処理 赤血球	16.55 \pm 1.45	0.0046*	-	8
100 μ M	1.18 \pm 0.59	0.002*	0.002*	8

MEAN \pm SE

検定はSteel-Dwass法により行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。
光照射10分

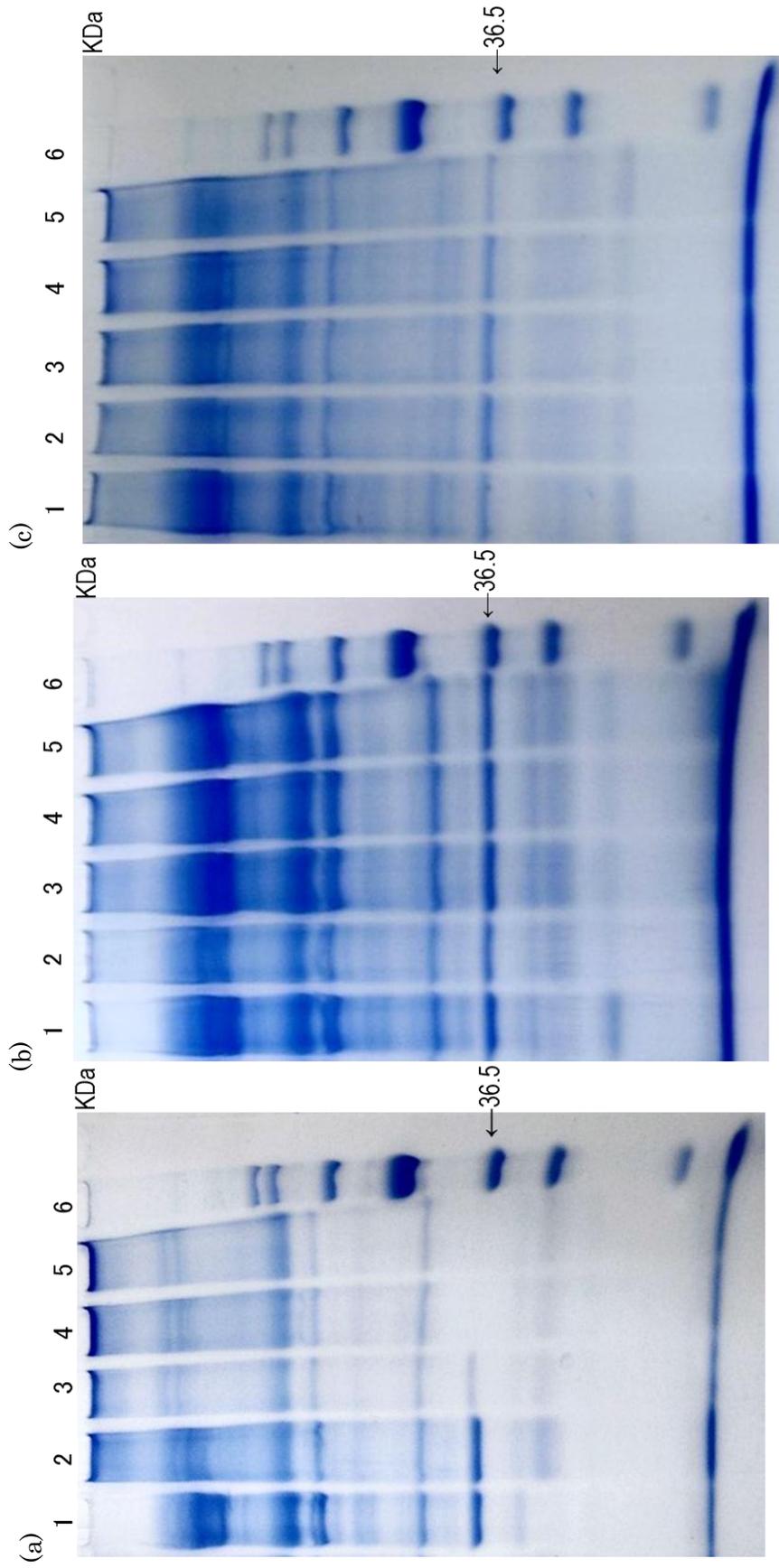


図 2-9 一重項酸素曝露により進展する赤血球膜タンパク質変性とエピガロカテキンガレートの効果

赤血球懸濁液に (a) 無添加 (コントロール)、(b) EGGg 100 μM 添加、(c) EGGg 100 μM 添加後、再洗浄し細胞外溶液の EGGg を除去、の 3 通りの処理をし、一重項酸素曝露後、その後の post-illumination における赤血球膜タンパク質変性を示した。レーン 1 照射前、レーン 2 post-illumination 0 分、レーン 3 20 分、レーン 4 40 分、レーン 5 60 分、レーン 6 分子量マーカー。この電気泳動像は n=3 の独立した実験の代表例である。

き、その抗酸化活性を詳細に検討した。

赤血球膜酸化障害において EGCg は、赤血球膜過酸化脂質量の増加 (図 2-7) および赤血球膜タンパク質の酸化変性 (図 2-9) を抑制することにより溶血を抑制 (図 2-3) すると示唆された。

著者は、緑茶抽出物 (GTE) と Trp の抗酸化機序について以下の 2 通りについて検討した結果を得ている。洗浄赤血球、光増感剤に GTE あるいは Trp を添加後、一重項酸素を赤血球に曝露した結果および洗浄赤血球と光増感剤に一重項酸素を曝露後、すなわち一重項酸素の産生を停止した後に Trp あるいは GTE を添加した結果である。これらの結果において、GTE 0.5mg/mL は一重項酸素曝露前に添加した場合も、曝露後に添加した場合も溶血を抑制していたが、Trp 13.3mM は一重項酸素曝露前に添加した場合は溶血を抑制したものの、曝露後に添加した場合には、溶血抑制効果は認められなかった。一重項酸素のクエンチャーである Trp は、光照射により産生される一重項酸素を直接捕捉することにより、赤血球の溶血を阻止するため、一重項酸素の曝露により既に赤血球膜が酸化ストレスにさらされ、脂質の過酸化連鎖反応が開始されると、Trp は赤血球膜の酸化を阻止することができないと推察された。しかしながら、GTE は赤血球膜脂質過酸化連鎖反応開始段階においても溶血を抑制できたことから、GTE 含有の抗酸化性成分は、赤血球膜表面であるいは、赤血球膜内に移行して膜成分の過酸化連鎖反応を抑制する可能性が示唆された。

本研究においても、EGCg は Trp とは異なり、一重項酸素を直接捕捉するよりも、赤血球膜に取り込まれて溶血抑制効果を示すことが推察できた (図 2-4、図 2-5)。また、EGCg 前処理赤血球では、赤血球膜過酸化脂質量増加の抑制 (図 2-8)、赤血球膜タンパク質の酸化変性の抑制 (図 2-9) を示す結果も得られたため、EGCg は赤血球膜に取り込まれる可能性が強く示唆された。

Hashimoto ら⁵⁾によれば、EGCg はリポソーム膜に高い親和性を持っており、また DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) 膜モデルにおいても、EGCg は膜表面に結合している可能性が報告されている⁶⁾。また、ガロイル部分を持つカテキン類のほうがリポソーム膜への親和性が高く⁷⁾、ガロイル部分とリン脂質のコリンを介して結合すると示唆している⁸⁾。これらのことを併せて考えると、EGCg が赤血球膜に結合する可能性は十分に予想され、また、経口摂取から血中に吸収移行する EGCg は、それが遊離型で存在する割合が微量であるとしても、流血中で赤血球のほか血管内皮細胞などに遊離型のまま捕捉され内因性抗酸化活性の増強に寄与している可能性は否定できない。

緑茶成分の EGCgは、水溶性の抗酸化物質とは異なり、赤血球膜に結合して酸化を抑制することが推測された。また、本研究で用いた測定方法は、一重項酸素曝露量を光照射時間で調節可能であるため、抗酸化物質の抗酸化機序、例えば活性酸素種を直接捕捉するのか、脂質過酸化連鎖反応を停止させるのかなどの推測が可能であるとわかった。さらに、赤血球が有する内因性抗酸化活性の変化量を計測できるこの測定法を応用することで、血管病変発症・進展の主要因の一つと目されている酸化ストレスに対する個々の生体の抵抗性のレベルが推定できるとの期待もされる。

2.5. 小括

赤血球懸濁液にアルミニウムフタロシアニン光増感反応により一重項酸素を曝露し、その **post-illumination** において引き起こされる溶血は、一重項酸素により赤血球膜脂質が酸化され、赤血球膜タンパク質も変性を受けることによるものと推測された。

赤血球膜酸化障害における EGCg の抗酸化活性について、その抗酸化機序を詳細に検討したところ、EGCg は、水溶性の抗酸化物質である **Trp** とは異なり、一重項酸素を直接捕捉することによって抗酸化活性を示すのではなく、赤血球膜に取り込まれて抗酸化活性を示すことが示唆された。

2.6. 参考文献

- 1) Nakagawa H, Hasumi K, Woo J, Nagai K, Wachi M (2004) Generation of hydrogen peroxide primarily contributed to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (–)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis* **25**, 1567-1574
- 2) Qanungo S, Das M, Haldar S, Basu A (2005) Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* **26**, 958-967
- 3) Kim J, Formoso G, Li Y, Potenza MA, Marasciulo FL, Montagnani M, Quon MJ (2007) Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and fyn. *J Biol Chem* **282**, 13736-13745
- 4) Kraljic I, Mohsni SE (1978) A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions. *Photochem Photobiol* **28**, 577-581
- 5) Hashimoto T, Kumazawa S, Nanjo F, Hara Y, Nakayama T (1999) Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 2252-2255
- 6) Kumazawa S, Kajiya K, Naito A, Saito H, Tuzi S, Tanio M, Suzuki M, Nanjo F, Suzuki E, Nakayama T (2004) Direct evidence of interaction of a green tea polyphenol, epigallocatechin gallate, with lipid bilayers by solid-state nuclear magnetic resonance. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 1743-1747
- 7) Kajiya K, Kumazawa S, Nakayama T (2001) Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 2638-2643
- 8) Nakayama T, Ishii T, Uekusa Y, Kato K, Kumazawa S (2012) Interaction of tea catechins with phospholipid-roles in their tastes and biological activities. *Journal of Food and Drug Analysis* **20**, 305-308

第3章 流血中におけるエピガロカテキングレート¹の抗酸化能の評価

3.1. 背景

カフェインを除いた緑茶抽出物を摂取したヒトの摂取1時間後の血漿中の濃度は、カテキン類の中でEGCgが最も高く、また血漿中に占める遊離型の割合も12~28%と最も高かったとの報告がある¹⁾。一方、緑茶を摂取した際のヒト血漿中のEGCg、EGCおよびECの存在状態について分析した結果、EGCやECは主に抱合体であったが、EGCgは主に遊離の状態であるとの報告もある^{2),3)}。

カテキン類は体内に吸収され、血液中に入ると殆どが硫酸抱合体やグルクロン抱合体となるが、EGCgは遊離型も存在すること、また緑茶に含まれるカテキン類の中で最も含有量が高いこと⁴⁾から、生体内においてもEGCgは赤血球膜に取り込まれる可能性が考えられる。第2章において、血漿成分を除いた洗浄赤血球に対して、EGCgは赤血球膜に結合あるいは取り込まれて抗酸化能を発揮すると推察された。そこで本章では、血漿成分を含む全血においてもEGCgは強い抗酸化活性を示すのか調べるため、全血中におけるEGCgと赤血球膜との相互作用を検討した。

3.2. 実験方法

3.2.1. 試料

3.2.1.1. 全血の調製

健康者静脈血を採取し、そのまま用いた。なお、試料は著者井上葉子より採取した血液とした。

3.2.1.2. エピガロカテキングレート溶液の調製

1.2.2.1. 2)と同様

3.2.2. 光増感溶血反応

3.2.2.1. コントロールの溶血度の測定

全血懸濁液(10倍希釈)、11.2 μ M AlPcS₄およびPBS(全量3,000 μ l)を1cm角石

石英セルに入れ、ミニ-スターラーバーで緩やかに攪拌しながら、遮光下、10 分間プレインキュベートした。その後、30cm の距離から 7,000 ルクス of 光照射を 35 分間実施することにより全血に一重項酸素を曝露した。

次に、一重項酸素曝露後の試料をマイクロチューブに分注し、遮光下、37°C でインキュベートした (Post-illumination)。70 分間まで 10 分毎にマイクロチューブをインキュベーターから取り出し、遠心分離 (1,000r.p.m.、5 分間) 後、その上清の吸光度 (415nm) を測定した。同一の赤血球懸濁液に蒸留水を加えて完全溶血させたときの値を 100%-Hemolysis として各試料の溶血度を百分率で示した。得られた溶血パターンをコントロールとした。

3.2.2.2. EGCg 共存下の溶血パターン

1.2.2.2. 2)と同様にして、全血懸濁液 (10 倍希釈)、AlPcS₄ および PBS の反応系に EGCg を終濃度 50 μ M、100 μ M になるようにそれぞれ 1cm 角石英セルにセットし、プレインキュベート、光照射による一重項酸素曝露、post-illumination 反応を実施して溶血パターンを得た (図 3-1)。

3.2.2.3. 全血における赤血球膜と EGCg の相互作用の検討

全血懸濁液を EGCg と 10 分間インキュベートしたのち遠心分離し、血漿と反応溶液中の EGCg を除き、さらに赤血球画分を PBS でさらに 3 回洗浄して赤血球のみを集めた (以降、「EGCg 前処理全血赤血球」とする)。この EGCg 前処理全血赤血球を試料として、すなわち、細胞外溶液に EGCg が存在しない条件下で一重項酸素を曝露して溶血パターンを求めた。EGCg を加えていないコントロール溶血パターンの作成には、全血に PBS を加え 3 回 PBS で洗浄した赤血球を用いた (図 3-2)。

3.2.2.4. 統計処理

1.2.2.2. 4)と同様に、検定は、溶血曲線の曲線下面積 (AUC) を比較することで行った。一元配置分散分析の手法を用い、多重比較は、正規分布に従いかつ、等分散性が仮定できるデータは Tukey の HSD 検定、正規分布に従いかつ、等分散性が仮定できないデータは Games-Howell 検定、正規分布に従わないデータは Steel-Dwass 法を用いた。Tukey の HSD 検定および Games-Howell 検定は IBM SPSS Statistics 22 を Steel-Dwass 法は R

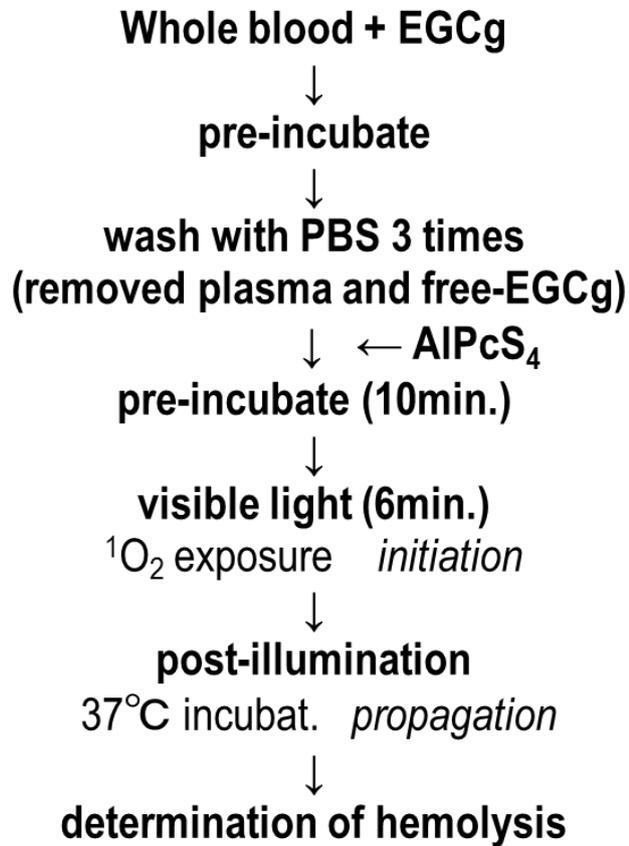


図 3-2 エピガロカテキンガレート前処理全血赤血球調製法および一重項酸素曝露法

ver. 2.8.1 を使用し統計処理を行った。p<0.05 を統計的に有意とした。

3.3. 結果

3.3.1. 全血への光増感反応における EGCg 添加効果

全血に EGCg を添加し、光増感反応による溶血度を測定した結果を図 3-3 に、AUC と検定結果を表 3-1 に示した。Post-illumination 70 分における溶血度の平均値±標準誤差は、コントロール 96.6±2.7%に比べ、EGCg 50、100、200 μM の添加でそれぞれ、91.8±3.0、88.8±4.1、8.9±3.3%であった。AUC を比較すると、コントロールの 5605.9±288.4 に比べ、EGCg 200 μM 添加では 280.3±55.4 であり、有意に溶血抑制された。一方、EGCg 50 μM および 100 μM の添加では溶血抑制効果は認められなかった。

3.3.2. 赤血球膜酸化障害における EGCg 前処理全血赤血球の効果

全血と EGCg をプレインキュベートした後、再洗浄を行い、遊離の EGCg を除去した EGCg 前処理全血赤血球に一重項酸素を曝露し、その後の post-illumination における溶血曲線を図 3-4 に、AUC と検定結果を表 3-2 に示した。Post-illumination 70 分での溶血度は（平均値±標準誤差）は、コントロール 94.7±0.9 に比べ、EGCg 100 μM では 95.0±1.7、200 μM では 86.9±2.5 であった。EGCg 200 μM 前処理全血赤血球の AUC 2713.8±131.8 はコントロールの 3497.4±120.2 と比べ、有意に溶血を抑制していた。

3.4. 考察

緑茶摂取後、吸収されたカテキン類は、ヒト血漿中ではグルクロン抱合や硫酸抱合などの抱合体として存在すると考えられていたが、EGCg は主に遊離の状態であるとの報告がある^{2,3)}ことから、EGCg が血液中で赤血球膜に取り込まれる可能性が考えられた。そこで、本章では、全血と EGCg の相互作用について検討を行った。その結果、全血に EGCg を添加し酸化障害を与えた全血においても、全血に EGCg を添加し、その後洗浄を行い血漿成分および遊離の EGCg を除去した EGCg 前処理全血赤血球においても、血漿成分を除去した赤血球に直接添加した EGCg に比べ抗酸化活性は低下していた。

カテキン類のウシ血清アルブミンへの結合親和力を検討した報告によると、ECG は EC

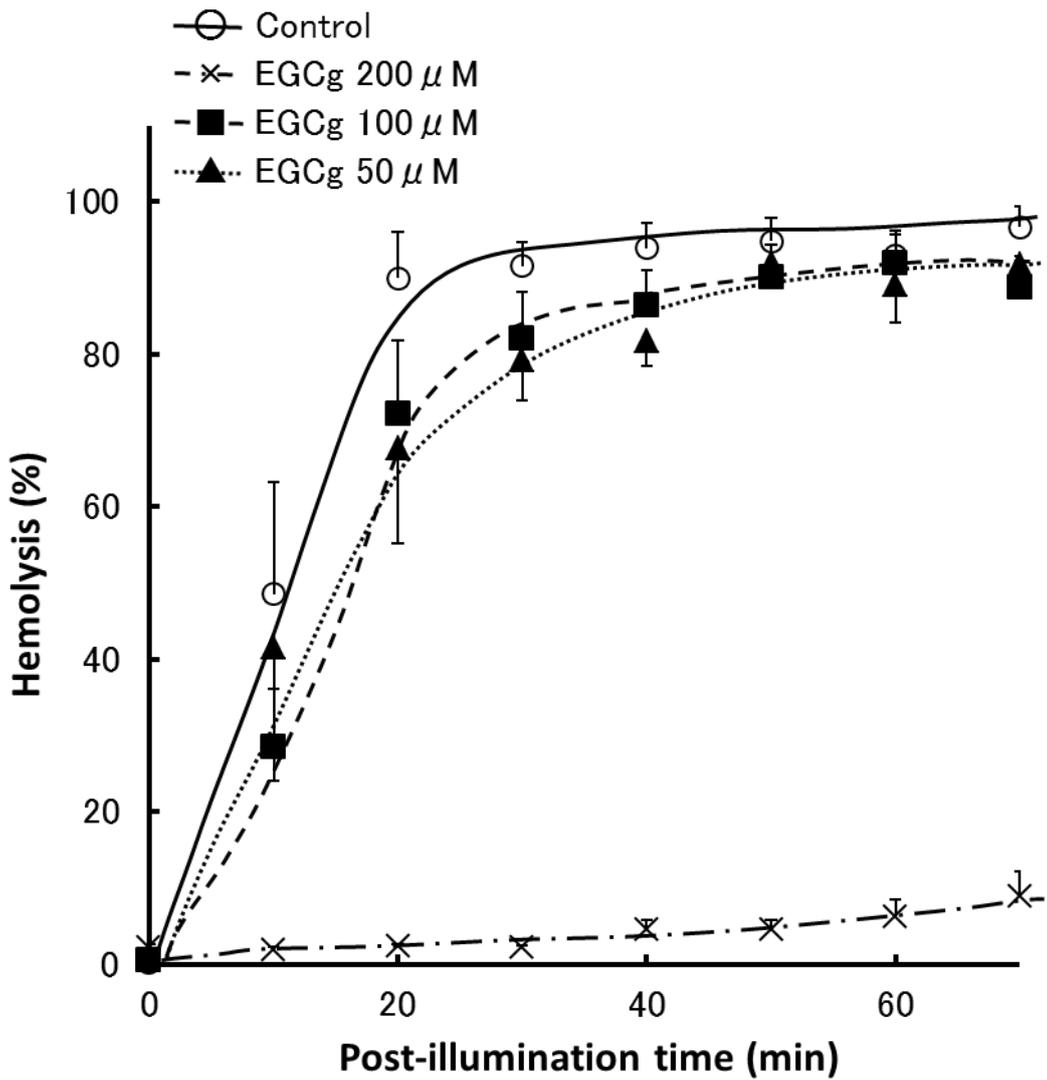


図 3-3 全血への一重項酸素曝露に対するエピガロカテキン添加の効果

全血、 AIPcS_4 ($11.2 \mu\text{M}$)に EGCgを添加し、10 分間プレインキュベートした後、35 分間光照射を行った。遮光下 37°C でのインキュベート (post-illumination) 時における溶血度の変化を示した。

コントロール (○: $n=6$)、EGCg $50 \mu\text{M}$ (▲: $n=6$)、EGCg $100 \mu\text{M}$ (■: $n=9$)、EGCg $200 \mu\text{M}$ (×: $n=6$)

平均値 ± 標準誤差で示した。

表 3-1 全血へのエピガロカテキンガレート添加時における溶血曲線 曲線下面積 (AUC 0-70)

	AUC	P		n
		vs Control	vs 50 μ M vs 100 μ M	
Control	5605.9 \pm 288.4	-	-	6
EGCg 50 μ M	4981.5 \pm 367.4	0.556	-	6
EGCg 100 μ M	4965.5 \pm 346.5	0.459	1.000	9
EGCg 200 μ M	280.3 \pm 55.4	0.000*	0.000*	6

MEAN \pm SE

検定はTukey HSD法により行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。
 光照射35分

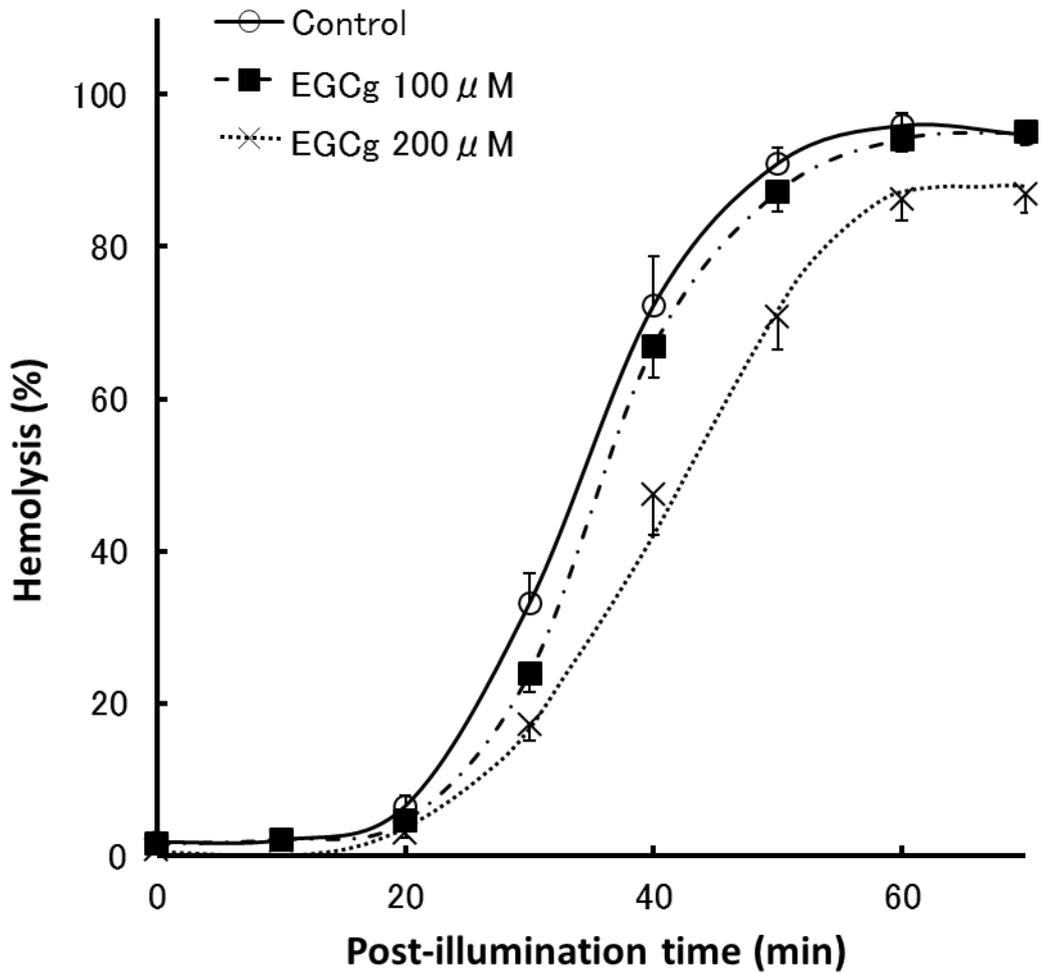


図 3-4 エピガロカテキングレート前処理全血赤血球の溶血への影響

全血に EGCg を添加後、再洗浄を行い、血漿および反応溶液中の EGCg を除いた EGCg 前処理全血赤血球に AlPcS_4 ($11.2 \mu\text{M}$) を添加し、10 分間プレインキュベートした後、6 分間照射を行った。遮光下 37°C でのインキュベート (post-illumination) 時における溶血度の変化を示した。

コントロール (○: $n=9$)、EGCg $100 \mu\text{M}$ (■: $n=9$)、EGCg $200 \mu\text{M}$ (×: $n=12$) 平均値 ± 標準誤差で示した。

表 3-2 エピガロカテキンガレート前処理全血赤血球の溶血曲線の曲線下面積 (AUC 0-70)

	AUC	P		n
		vs Control	vs 100 μ M	
Control	3497.4 \pm 120.2	-	-	9
EGCg 100 μ M	3278.0 \pm 78.3	0.438	-	9
EGCg 200 μ M	2713.8 \pm 131.8	0.000*	0.005*	12

MEAN \pm SE

検定はTukey HSD法により行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。
 照射6分

に比べ、血清アルブミンとの高い親和力を示し、アルブミンのサブドメインIIAのIの位置が主要な結合部位であると示している⁵⁾。また、ガロイル部分をもつECgやEGCgは、ガロイル部分を持たないカテキン類に比べ高いウシ血清アルブミンとの結合親和力が認められたとの報告もある⁶⁾ため、本研究で用いたEGCgは全血中に含まれる血清アルブミンと強く結合した結果、赤血球膜に微量しか取り込まれず、抗酸化効果が弱くなったと示唆された。

しかし、Zhuら⁷⁾によると、ココア抽出物を投与したラットから採取した血液の赤血球のみを取り出し、水のみを与えたラットの血漿と合わせ、AAPHによる溶血度を測定したところ、溶血抑制のピークが投与後180～240分であり、水のみ与えたラットの赤血球とココア抽出物投与ラットの血漿の組み合わせのピーク（投与後120～180分）と同程度の溶血抑制効果を示した。この結果から、胃内投与されたココア抽出物のポリフェノールが血漿中に移行し、さらに赤血球膜に取り込まれた可能性を示唆している。本研究では緑茶を摂取した際に血液中に存在するEGCgよりも相当高い濃度のEGCgでのみ溶血を抑制する結果であったが、この報告より、緑茶を摂取した場合においても血漿中に存在するEGCgが赤血球膜内に取り込まれる可能性もあると考えられた。また、前向きコホート研究では、緑茶摂取により、胃や食道ガン、結腸・直腸ガンのリスクの低下⁸⁾や心臓血管疾患死亡率の低下⁹⁾を認めたと報告している。

本研究ではex vivoにて全血とEGCgとを共存させると、その抗酸化活性は血漿成分を除去した洗浄赤血球に対するものより低下した。これは、血漿中のアルブミンとEGCgが結合したためであると示唆された。

3.5. 小括

全血と EGCg の相互作用について検討した結果、全血に EGCg を添加し、光増感反応による酸化障害を与えた全血は、EGCg の $200\ \mu\text{M}$ の添加により有意な溶血抑制効果を示した。しかし、洗浄赤血球に添加した場合と比べ、同程度の溶血抑制効果を得るには 2 倍以上の EGCg の添加量が必要であった。

また、全血に EGCg を加え再洗浄した、血漿成分および反応溶液中の EGCg を除いた EGCg 前処理全血赤血球では、 $200\ \mu\text{M}$ EGCg 前処理全血赤血球のみコントロールに比べ有意に溶血抑制効果が得られた。しかし、全血に EGCg の添加実験と同様、洗浄赤血球に添加し、再洗浄を行った結果のほうが、EGCg の半分以下の濃度で同程度以上の溶血抑制効果を示していた。

以上の結果より、全血に EGCg を添加した場合、EGCg の大半が血漿成分に含まれるアルブミンと結合することにより、抗酸化効果は減弱化されるものと示唆された。

3.6. 参考文献

- 1) Lee M, Wang Z, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S, Balentine DA, Yang CS (1995) Analysis of plasma urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **4**, 393-399
- 2) Lee M, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS (2002) Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (–)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 1025-1032
- 3) Chow HS, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Ranger-Moore J, Chew WM, Celaya CA, Rodney SR, Hara Y, Alberts DS (2005) Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* **11**, 4627-4633
- 4) 萩原拓幸, 清水充 (2011) 健康食等における関与成分 (機能性成分) の表示値と実際の含有量に関する実態調査. *大阪市立環科研報告* **73**, 45-49
- 5) Pal S, Saha C, Hossain M, Dey SK, Kumar GS (2012) Influence of galloyl moiety in interaction of epicatechin with bovine serum albumin: a spectroscopic and thermodynamic characterization. *PLOS ONE* **7**, e43321
- 6) Minoda K, Ichikawa T, Katsumata T, Onobori K, Mori T, Suzuki Y, Ishii T, Nakayama T (2010) Influence of the galloyl moiety in tea catechins on binding affinity for human serum albumin. *J Nutr Sci Vitaminol* **56**, 331-334
- 7) Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, Orozco TJ, Keen CL (2002) Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Exp Biol Med* **227**, 321-329
- 8) Nechuta S, Shu X, Li H, Yang G, Ji B, Xiang Y, Cai H, Chow W, Gao Y, Zheng W (2012) Prospective cohort study of tea consumption and risk of digestive system cancers: results from the Shanghai Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* **96**, 1056-1063
- 9) Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, Kikuchi N, Nakaya N, Nishino Y, Tsubono Y, Tsuji I (2006) Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease,

cancer, and all causes in Japan The Ohsaki Study. *JAMA* **296**, 1255-1265

第4章 めし負荷一過性生体酸化ストレス評価法への抗酸化物質添加の検討

4.1. 背景

食後高血糖など一過性高血糖状態でも心疾患のリスクファクターになるとの報告¹⁾や高血糖により引き起こされるポリオール経路の亢進は糖尿病合併症である網膜症の発症に深く関与するとの報告²⁾、健常者においても高濃度グルコースの血管内投与により血管内皮依存の血管弛緩機能を減弱させたとの報告がある³⁾。また、白米の摂取と2型糖尿病の発症リスクの関係について前向き研究を行った結果、女性において有意な関連性が示唆された報告もある⁴⁾。このように、一過性の高血糖であっても血管内皮細胞が酸化ストレスに晒され、その結果、血管内皮細胞機能不全などを引き起こすことが推察される。

ヒトの血管内皮機能評価法として、**flow mediated dilatation (FMD)**があり、ヒトを対象とした研究でしばしばこの方法が用いられる。測定および評価方法は、まず、ヒトの前腕を駆血することで血管にずり応力を惹起させ、**NO** を産生させる。次に、駆血解放後の**NO** 依存性弛緩反応による血管拡張度を超音波で測定し、安静時の血管径と比較することで血管拡張が正常に機能しているか評価する方法である。しかし、**NO** 依存性の血管拡張反応のみで血管内皮機能を十分に評価できるのかなどの問題点もある⁵⁾。

FMD は **NO** 依存性の血管弛緩反応のみを評価しているため、血管内皮細胞不全を包括的に評価するには、血管内皮細胞機能に影響を及ぼす酸化ストレスや **AGE** 形成など様々な因子を含めた評価法の開発が必要である。

そこで、本章では一過性に高血糖状態に晒された場合の流血中の酸化ストレスをリアルタイムに推定できる生体酸化ストレス評価法を用い、食物繊維を豊富に含む麦めしの効果を検討しつつ、生体酸化ストレス評価法が食品微量成分の生体内における抗酸化評価法として応用可能か検討を行った。

4.1.1. めし負荷一過性生体酸化ストレス評価法について

筆者が参画して構築した生体酸化ストレス評価法は、一過性の糖負荷を行うことにより、流血中の酸化ストレス値を一時的に上昇させ、そのストレス値をリアルタイムに測定する方法である。以下にこの評価法の詳細を述べる。

4.1.1.1. 指頭血への酸化ストレス追負荷法

図 4-1 に示す装置を用いて、指頭血に酸化ストレスを追負荷した。φ 35mm のディッシュに光増感剤としてアルミニウムフタロシアニン四硫酸塩 80 μ M と生理食塩水リン酸緩衝液 (PBS) を添加したが、光増感剤の濃度の誤差は大きく溶血反応に影響するため、ディッシュ内での光増感剤の 440nm の吸光度が 1.49~1.53 の範囲 (添加量として 300 μ L 程度) になるよう用時添加量を調整し、PBS で全量を 2,995 μ L とした。ディッシュを十分に冷却した後、指頭血を添加した⁶⁾。これらを十分に混和したのち、LED ランプにてディッシュ表面での照度が 10 万ルクスになるよう光を照射した。光照射、5、10、15、20、25 分後にディッシュより反応液 360 μ L をサンプリングし、冷却 PBS 840 μ L に加えた。静かに混和後、その 700 μ L 程度をシリンジに吸引し、セルロースアセテートメンブレン 0.2 μ m (DISMIC-13cp) でろ過し、光増感反応により溶血漏出したヘモグロビンを回収した。続いて、10%SDS 溶液を加え混和した (酸化溶血液)。残部の溶液には 10%SDS 溶液を直接加えて完全溶血溶液を得た (100%溶血液)。分光光度計により 415nm/490nm の二波長測定で各時間サンプルの酸化溶血液と 100%溶血液の吸光度を測定し、100%溶血液に対する酸化溶血液の割合を光増感反応溶血度 (被験赤血球の脆弱度) とした。さらに、各時間の溶血度をプロットし、溶血曲線の曲線下面積を求めた。(図 4-1)

図 4-2 に同一被験者かつ同一計測日に行った実験結果を示した。2 名の異なる被験者の結果であるが、同一被験者で同一計測日においては、ほぼ同じ溶血パターンが得られることを確認している。

4.1.1.2. 一過性糖負荷による生体酸化ストレス測定法

12 時間の絶食時の後、糖を摂取させることにより一過性の糖負荷を行った。空腹時および糖負荷後 30、60、90、120 分後に指頭血を採取した (図 4-3)。採取した指頭血に酸化ストレスを追負荷 (4.1.1.1.) することで、その指頭血中の赤血球の脆弱度つまり酸化ストレス度を評価することができる。一過性の糖負荷から経時的に測定した指頭血の酸化ストレス度を絶食時のそれと比較することにより、生体内の酸化ストレス状態を包括的に、かつリアルタイムに推定することが可能となる。

図 4-4 に、糖負荷としてグルコース 75g (トレーラン G 液 75g、味の素(株)製) を摂取した際の溶血パターンの変化を示した。この図は、2 名の被験者による代表例である。空腹時の指頭血の溶血パターンに比べ、グルコース 75g 摂取後はいずれの時間も溶血曲線が

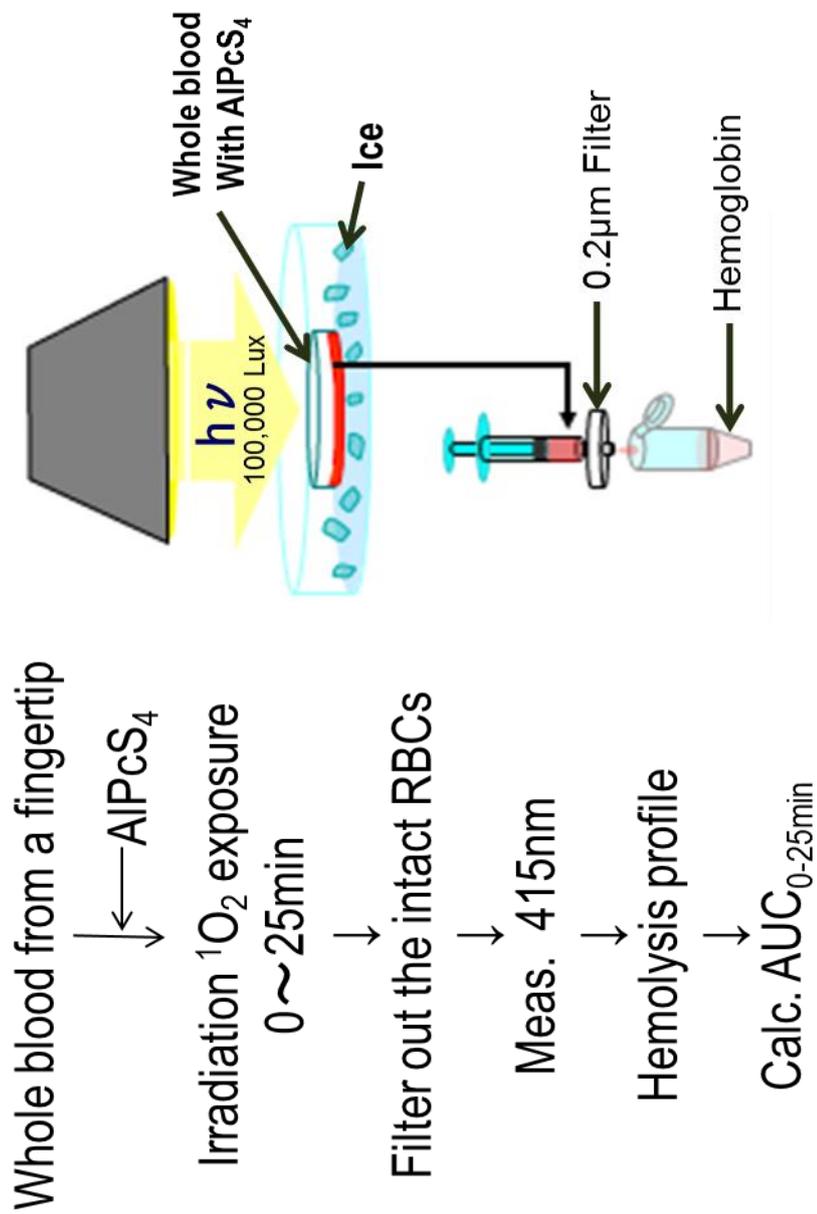


図 4-1 指頭血への酸化ストレス追負荷方法

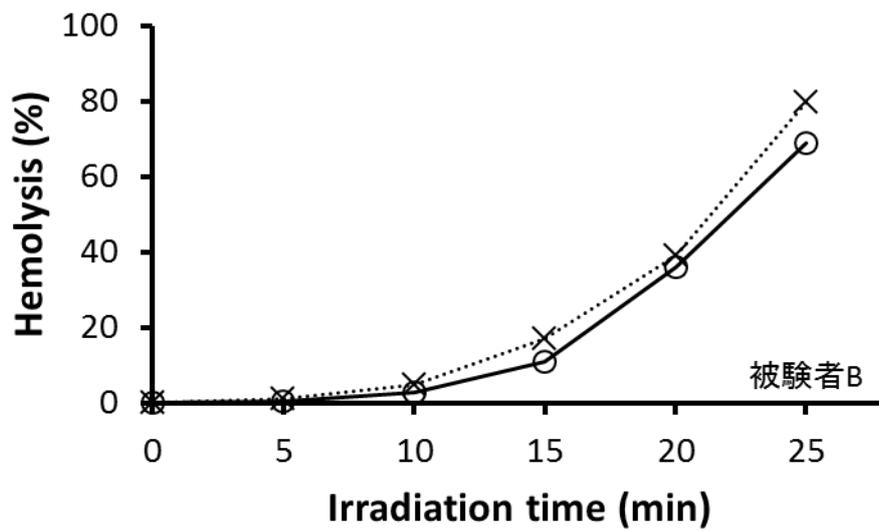
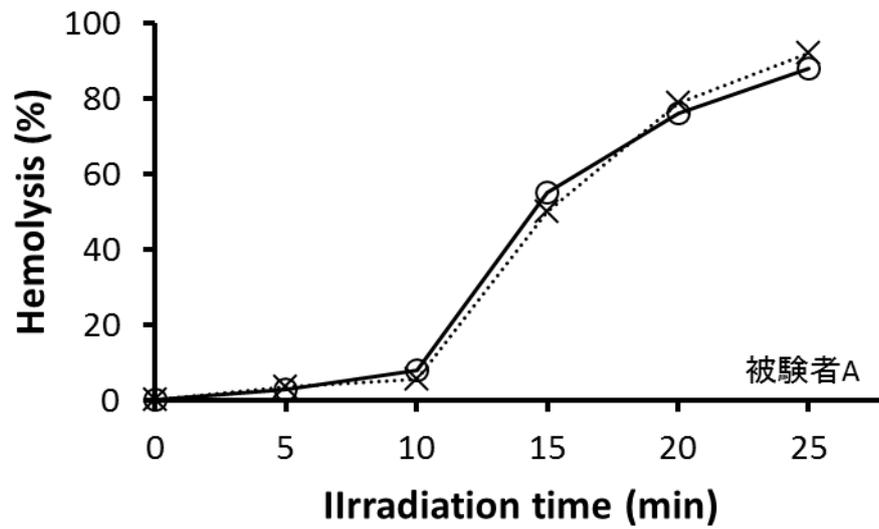


図 4-2 指頭血への酸化ストレス追負荷による溶血曲線
同一被験者、同一計測日実施による同時再現性

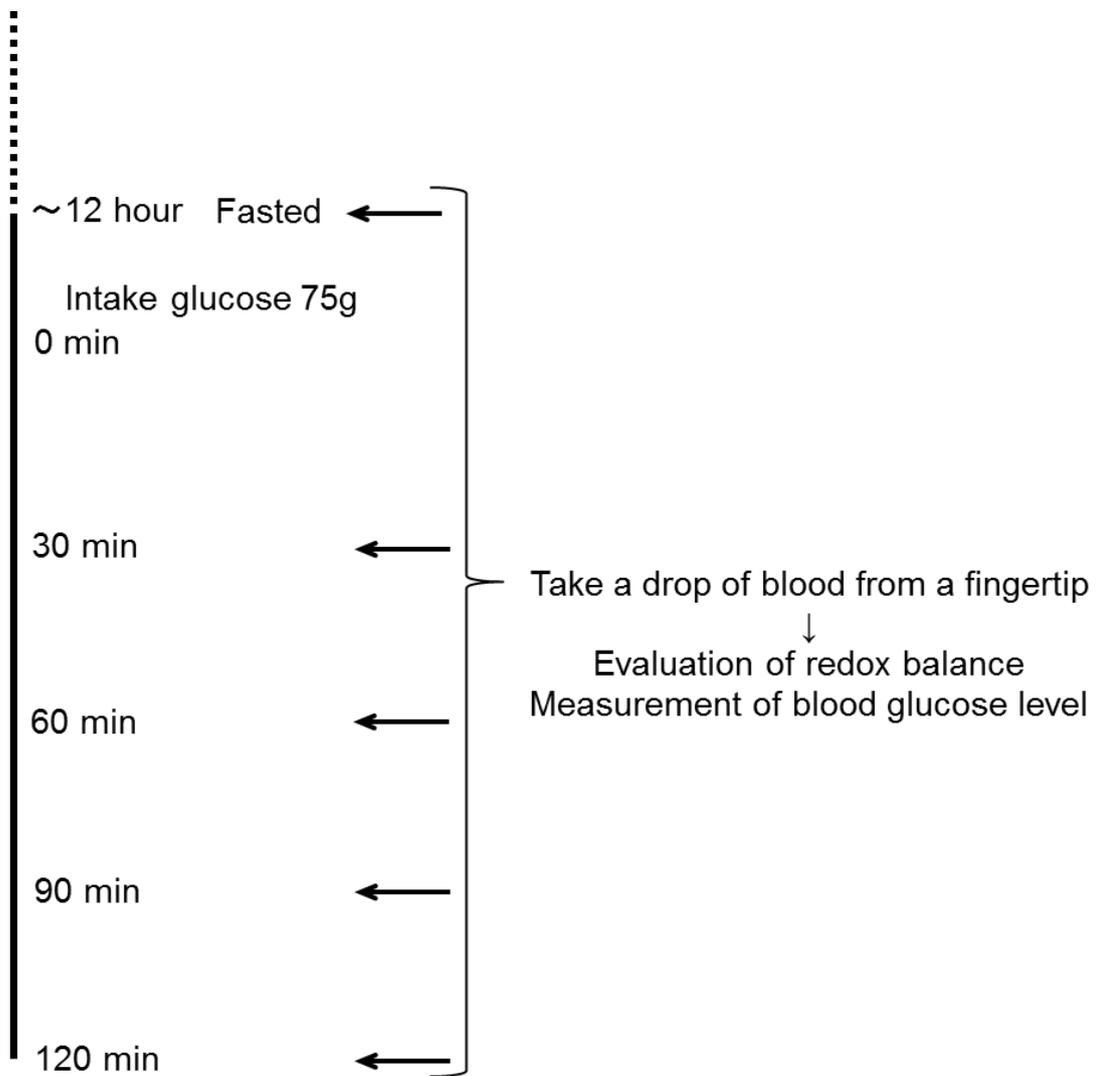


图 4-3 指頭血採取時間

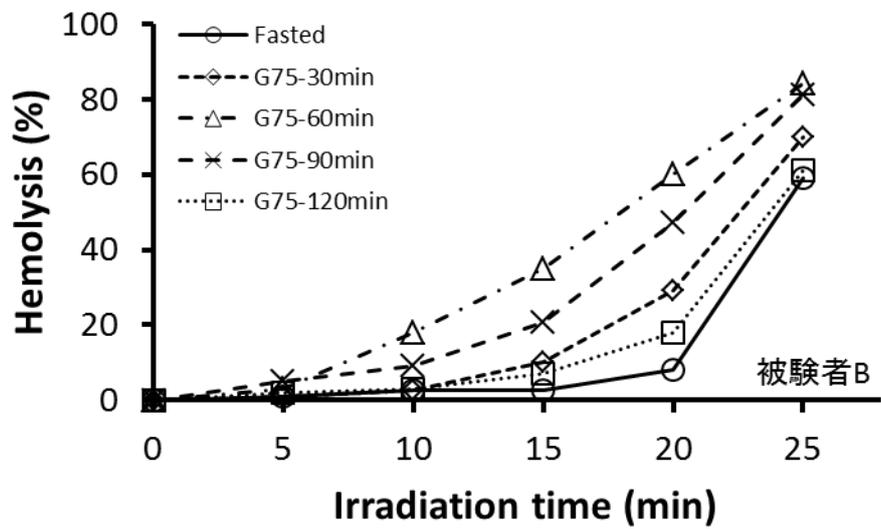
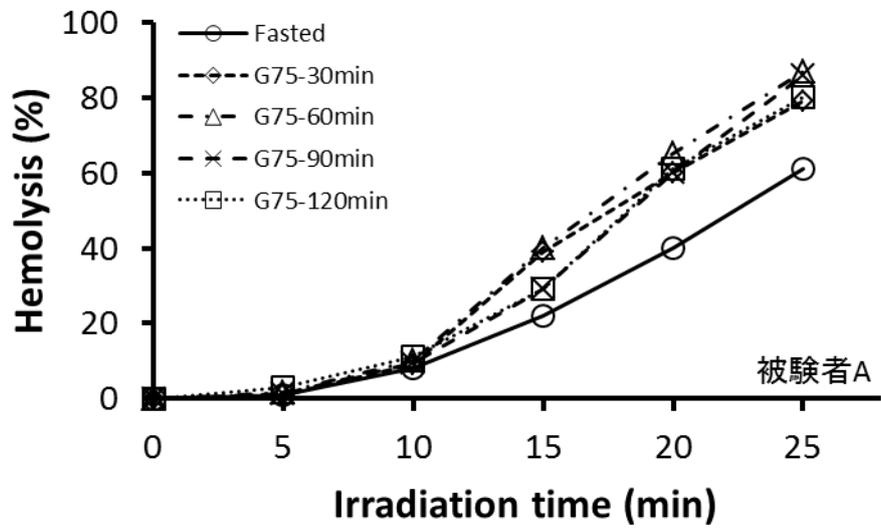


図 4-4 75g グルコース負荷による指頭血の溶血パターンの変化

左にシフトし、生体酸化ストレスが高くなっていることがわかる。

そこで、食品微量成分等を経口摂取した際の生体内酸化ストレスへの影響を評価するために、空腹時、糖負荷後、光増感反応 30 分、60 分、90 分、120 分の各溶血パターン計測時の曲線下面積を空腹時のそれと除した AUC (Area Under the Curve) 比を生体酸化ストレスとすることとした。本評価法を用いて、麦めし摂取における影響を検討した。

4.2. 実験方法

4.2.1. 試料

4.2.1.1. 被験者

21～22 歳の健康な女性 21 名を被験者とした。被験者には実験の主旨、方法などを説明し、被験者本人の同意を得た上で実施した。なお、実験実施に当たっては、共立女子大学・共立女子短期大学研究倫理審査委員会の承認を受けて行い、指頭血採取にあたっては被験者本人により自己採取した。

実験に際して、実験項目および繰り返し回数は被験者が同意できる範囲内で実施した。被験者数および同一被験者が異なる日に同条件の実験を行った繰り返し回数は以下の通りである。白米めし（以降「めし」とする）120g 摂取の被験者は 6 名、繰り返しの実施はなし、めし 180g 摂取は 9 名で、そのうち繰り返し 3 回および 2 回は各 2 名、めし 360g 摂取は 20 名で、そのうち繰り返し 3 回は 1 名、2 回は 3 名であった。麦めし摂取実験では、めし 240g+麦めし 120g 摂取は 6 名で、そのうち繰り返し 2 回は 3 名、めし 120g+麦めし 240g 摂取は 4 名で、そのうち繰り返し 3 回は 1 名、2 回は 2 名であった。

4.2.1.2. 白米めしおよび麦めし

めしは、市販国産米を炊飯器で炊き干して使用した。麦めしは、市販国産押麦を炊飯器で炊いたものを供した。めしおよび麦めしのエネルギー量、炭水化物量、食物繊維量は日本食品標準成分表 2010 ⁷⁾ のデータを基に算出し表 4-1 に示した。

4.2.1.3. 採血時間

採血は、まず、食後 12 時間以上経過した空腹時に指頭血 5 μ L をサンプリングした。その後、めし 360g 単味で、あるいは麦めしとめしを合わせた 360g を 10 \pm 2 分で摂取した後

表 4-1 めしおよび麦めしの栄養素成分値

	Rice 360g	Rice 240g + Barley 120g	Rice 120g + Barley 240g
Energy (kcal)	583	574	566
Protein (g)	10.0	10.0	10.1
Fat (g)	1.5	1.7	1.9
Carbohydrate (g)	126	127	127
Dietary Fiber (g)	0.82	5.79	10.76
Insoluble (g)	0.82	2.51	4.20
Soluble (g)	Tr	3.3	6.6
Vitamin B ₁ (g)	0.13	0.12	0.11

炊いためし及び麦めしは100g当たり、それぞれ精白米、押し麦45.5g相当(2.2倍)として、日本食品標準成分表2010から算出した。

30分、60分、90分、120分にそれぞれ指頭血を採取した。採血は、メディセーフファイナタッチ（テルモ社製）を用いて被験者自身が実施した。

4.2.1.4. 生体内酸化ストレス評価法

指頭血はキャピラリー（アズワン製リングキャップス）で $5\mu\text{L}$ を被験者が採取した。指頭血への酸化ストレス追負荷法は 4.1.1.1 の通りである。空腹時、めしあるいは麦めしとの混合めし摂取後 30分、60分、90分、120分における各溶血パターンの曲線下面積を空腹時のそれで除した AUC（Area Under the Curve）比を生体内酸化ストレスとした。

4.2.1.5. 血糖値の測定

血糖値の測定は、生体内酸化ストレス分析の採血時に行った。測定にはメディセーフミニ血糖測定キットを用いた。

4.1.2.6. 統計処理

得られたデータは、統計ソフト IBM SPSS Statistics 19 あるいは 22 により、二要因分散分析により交互作用の有無を判定した。有意な交互作用が認められたデータについては、さらに水準ごとの単純主効果の検定を Bonferroni 法にて行った。また、同群間の差については、一要因分散分析を行い、有意な主効果が認められたデータについては、多重比較検定を Bonferroni 法にて行った。なお、 $p<0.05$ を統計的に有意とした。

4.3. 結果

4.3.1. めし摂取量による生体内酸化ストレスへの影響

空腹時に指頭血を採取した後、めし 120g、180g あるいは 360g を摂取し、その後、30分、60分、90分、120分後に指頭血を採取した。空腹時および各時間に採取した指頭血の光増感溶血度をそれぞれ測定した。めし 360g を摂取し、酸化ストレスの亢進した被験者 1 名の溶血パターンを図 4-5 に示した。75g グルコース摂取（図 4-4）と同様、空腹時に比べめし 360g 負荷においても酸化ストレスが亢進することが確認できた。

各時間の酸化ストレス度を判定するため、各時間の溶血曲線の曲線下面積を算出し、空腹時のそれを基準として AUC 比を求めた。

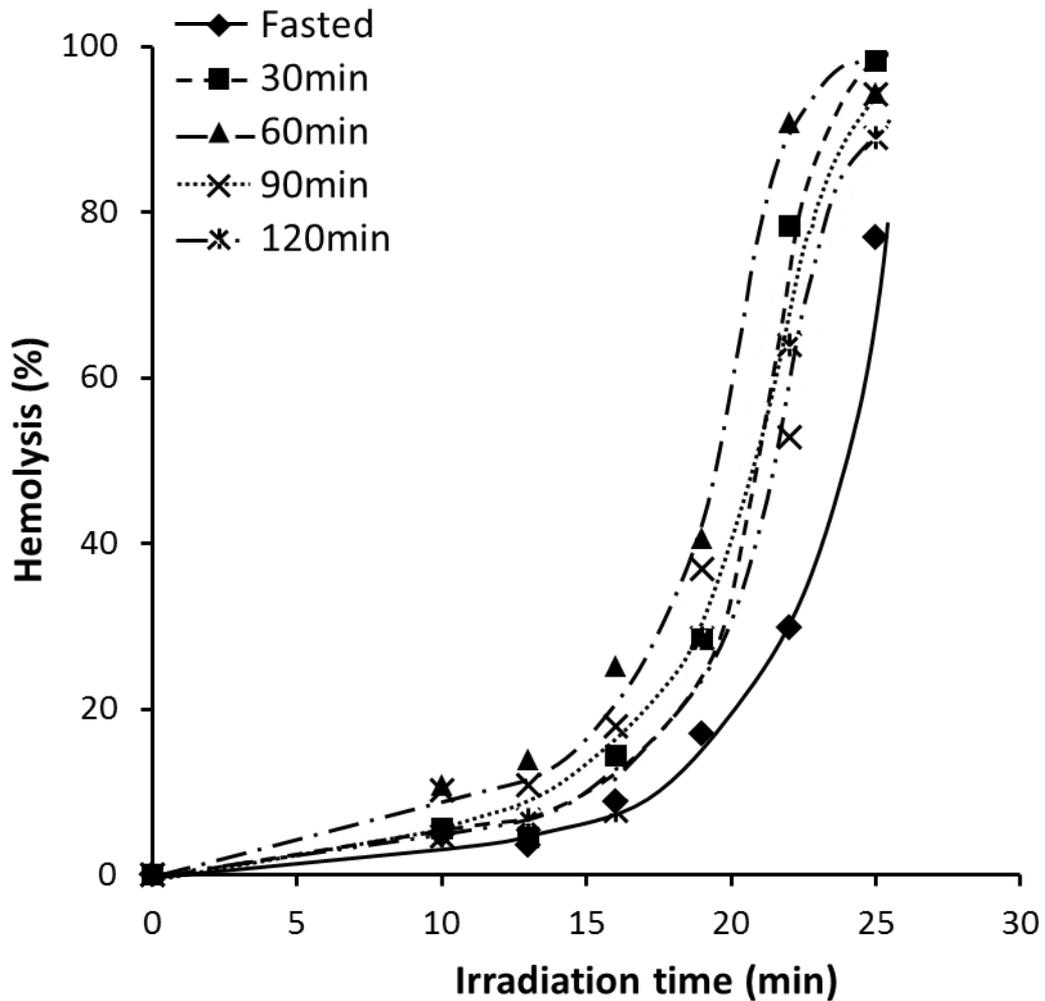


図 4-5 酸化ストレス検出被験者における空腹時およびめし 360g 摂取後の経時的な溶血度の変化

12 時間絶食後、めし 360g を摂取し、空腹時、めし摂取後 30、60、90、120 分後に指頭血を採取した。各時間に採取した指頭血に光照射により一重項酸素曝露を行い、その光照射時間における溶血度を示した。

空腹時 (◆)、めし摂取後 30 分 (■)、60 分 (▼)、90 分 (×)、120 分 (*)

めし 120g、180g、360g と摂取量の増加に伴い、酸化ストレス亢進の指標である AUC 比は増加傾向を示した (図 4-6)。

血糖値も、めし摂取量の増加に伴い高値を示す傾向にあった (図 4-7)。めし 360g 摂取における空腹時血糖値 81.2 ± 2.6 mg/dL に対して、めし 360g 摂取後 30 分、60 分、90 分、120 分はそれぞれ 154.0 ± 4.6 、 150.3 ± 5.2 、 134.0 ± 4.4 、 126.6 ± 2.8 mg/dL と有意に上昇し、めし 360g 摂取後 30 分に対して、90 分、120 分は有意に低下し、めし 360g 摂取後 60 分に対して、90 分、120 分で有意に血糖値は低下していた。

4.3.2. ヒトにおける生体酸化ストレスへの感受性

めし 360g 摂取の際、摂取後 30 分以降と空腹時とを比較するとめし摂取後の生体酸化ストレス値が変化しない被験者が半数程度存在した。

そこで、酸化ストレス不検出群と酸化ストレス検出群の 2 群に分けることとし、その AUC 比と血糖値を図 4-8 および図 4-9 に示した。血糖値に 2 群間の差はなかったが、AUC 比では生体酸化ストレス検出群は 30～120 分でそれぞれ 1.61 ± 0.21 、 1.62 ± 0.11 、 1.58 ± 0.09 、 1.42 ± 0.08 と、不検出群それぞれ 0.79 ± 0.06 、 0.87 ± 0.05 、 0.87 ± 0.07 、 0.83 ± 0.08 に比べ、めし摂取後 30 分～120 分すべてにおいて有意に高値を示した。

4.3.3. 麦めし摂取における生体酸化ストレスおよび血糖値への影響

めしと炭水化物量が同一の麦めしを摂取した際、生体酸化ストレス不検出群では生体酸化ストレスへの影響を評価できないと考えられたため、生体酸化ストレス検出群において麦めし摂取の影響を検討した。

めし 360g、めし 240g+麦めし 120g またはめし 120g+麦めし 240g をそれぞれ摂取した後の生体酸化ストレスの変化および血糖値を測定した (図 4-10 および図 4-11)。なお、摂取した炭水化物の量は全ての群においてほぼ同量である (表 4-1)。その結果、めし 360g およびめし 240g+麦めし 120g 摂取では、同群間において空腹時よりそれぞれ摂取後 30、60、90、120 分後で血糖値は有意に上昇し、摂取後 120 分では摂取後 30 分に比べ有意に血糖値は低下した。めし 120g+麦めし 240g 摂取では、空腹時に比べ摂取後の血糖値は先述の 2 群と同様、有意に上昇したが、摂取後 120 分では、摂取後 60 分に比べ有意に血糖値が低下した。つまり、めし等摂取後の血糖値には、3 群間の有意差はなかったが、めし 360g およびめし 240g+麦めし 120g は、血糖値のピークが摂取後 30 分であったのに対し、

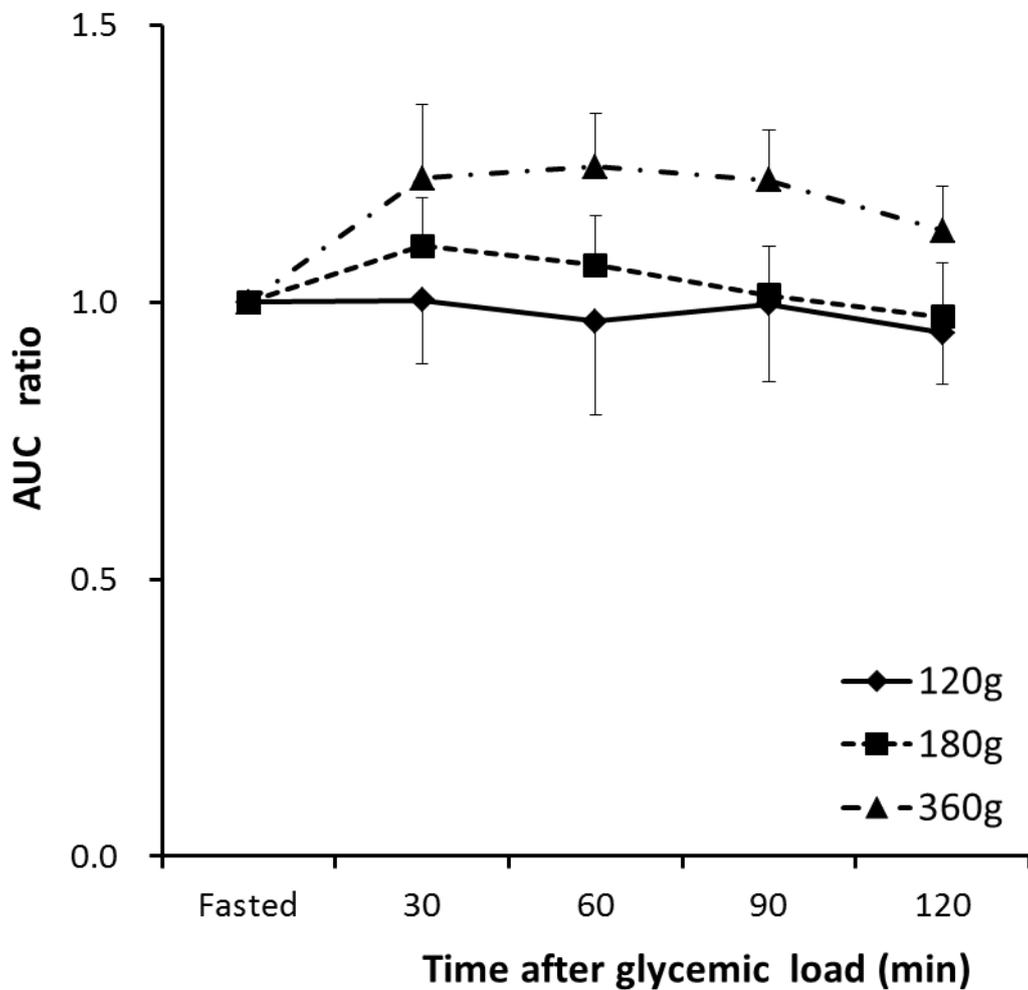


図 4-6 めし摂取量による AUC 比の変化

12 時間絶食後、めしを 120g、180g あるいは 360g 摂取した際の空腹時、めし摂取後 30、60、90、120 分後の AUC 比の変化を示した。AUC 比は、空腹時の溶血曲線の曲線下面積 (AUC) を 1 としたときの各時間の曲線下面積比 (AUC ratio) とした。

めし摂取量 120g (◆: n=6)、180g (■: n=15)、360g (▲: n=26)

平均値 ± 標準誤差で示した。

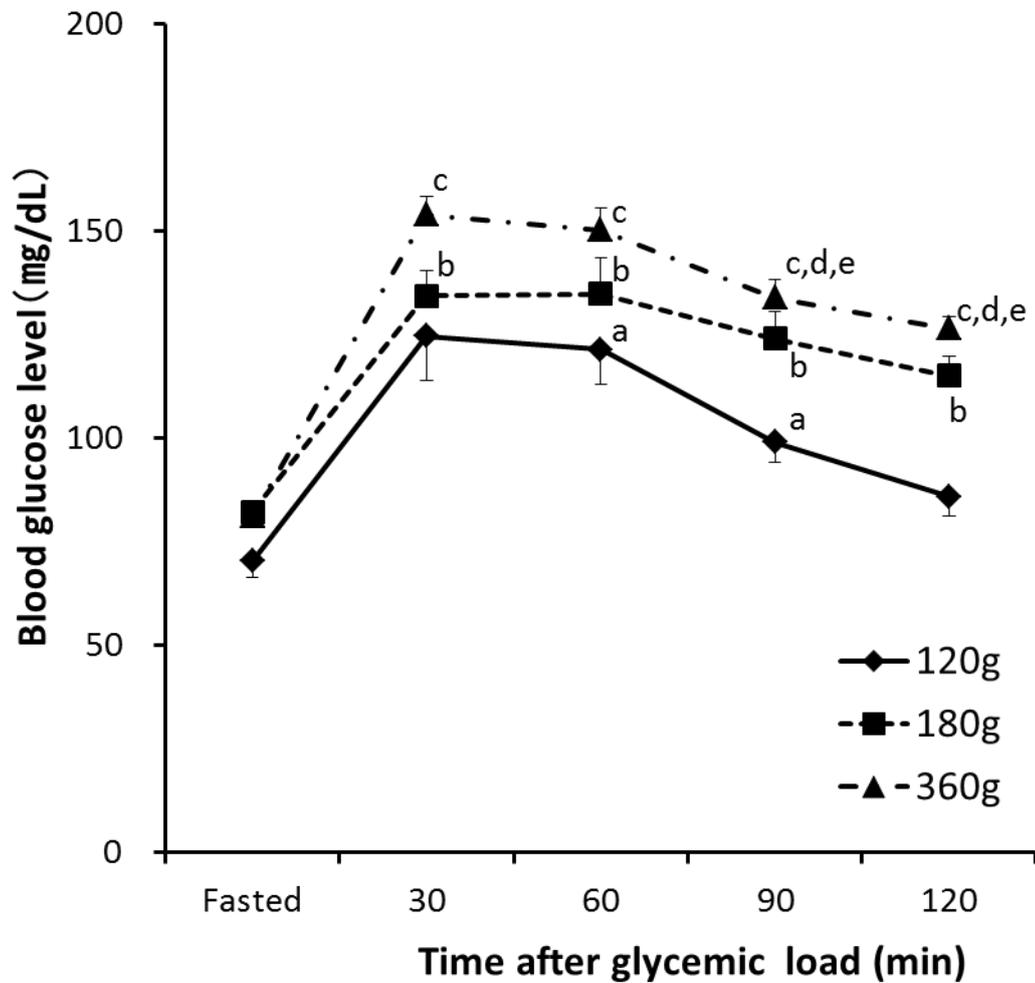


図 4-7 めし摂取量による血糖値の変化

12 時間絶食後、めしを 120g、180g あるいは 360g 摂取した際の空腹時、めし摂取後 30、60、90、120 分後の血糖値の変化を示した。めし摂取量 120g(◆: n=6)、180g (■: n=15)、360g(▲: n=26) ^ap<0.05 vs Fasted (120g)、^bp<0.05 vs Fasted (180g)、^cp<0.05 vs Fasted (360g)、^dp<0.05 vs 30min 360g Intake、^ep<0.05 vs 60min 360g Intake 平均値±標準誤差で示した。

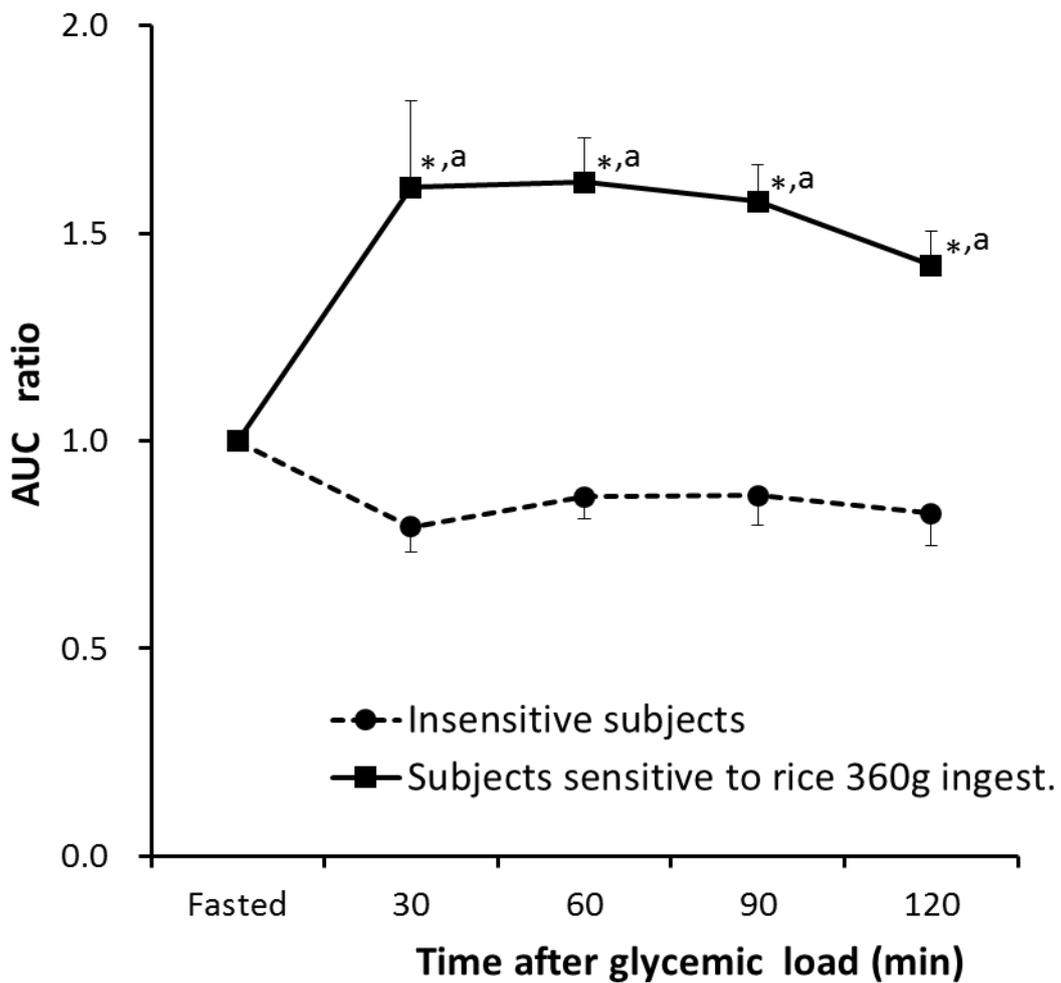


図 4-8 酸化ストレス不検出群と酸化ストレス検出群の AUC 比の比較

12 時間絶食後、めしを 120g、180g あるいは 360g 摂取した際の空腹時、めし摂取後 30、60、90、120 分後の AUC 比の変化を示した。AUC 比は、空腹時の溶血曲線の曲線下面積 (AUC) を 1 としたときの各時間の曲線下面積比 (AUC ratio) とした。酸化ストレス不検出群 (●: n=12)、酸化ストレス検出群 (■: n=13) *p<0.05 vs Insensitive subjects、^ap<0.05 vs Fasted Subjects sensitive to rice 360g ingest. 平均値±標準誤差で示した。

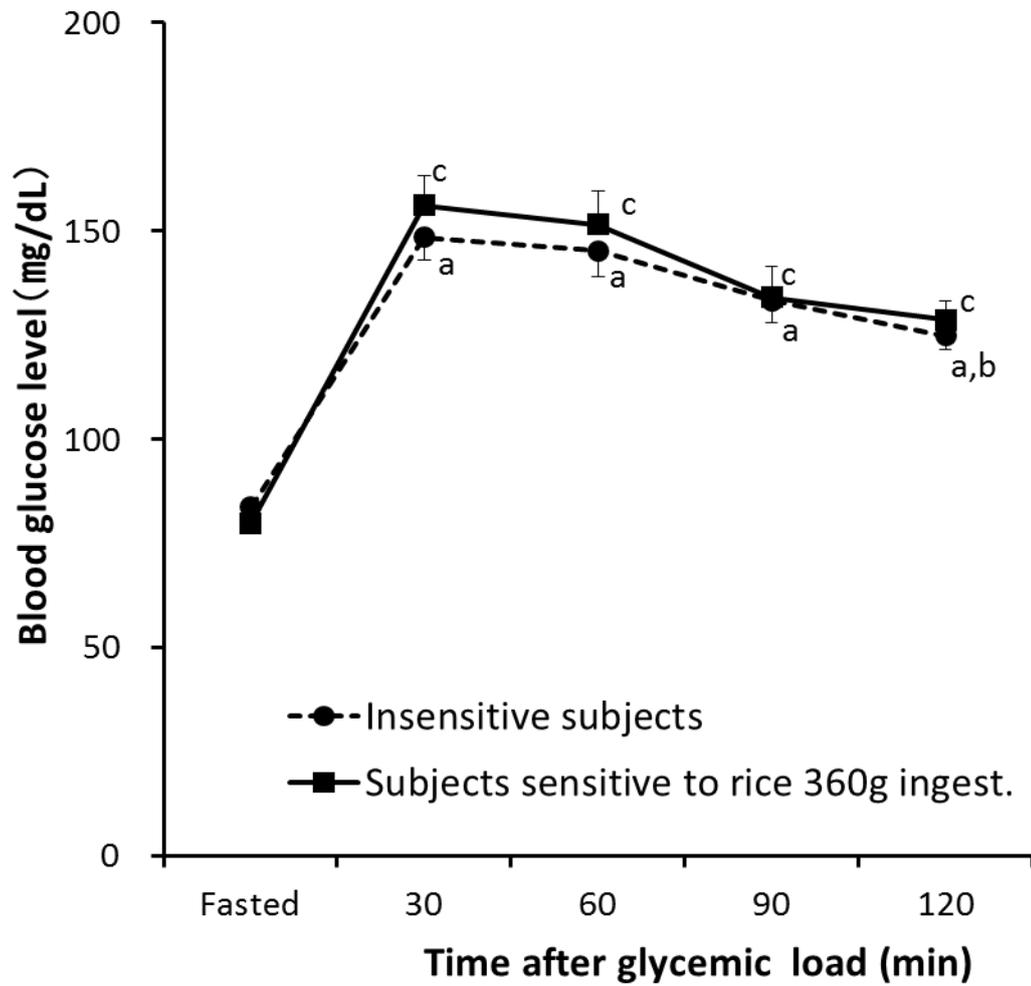


図 4-9 酸化ストレス不検出群と酸化ストレス検出群の血糖値の比較

12 時間絶食後、めしを 120g、180g あるいは 360g 摂取した際の空腹時、めし摂取後 30、60、90、120 分後の血糖値の変化を示した。酸化ストレス不検出群 (●: n=12)、酸化ストレス検出群 (■: n=13) ^ap<0.05 vs Fasted Insensitive subjects、^bp<0.05 vs 30min Insensitive subjects、^cp<0.05 vs Fasted subjects sensitive to rice 360g ingest. 平均値±標準誤差で示した。

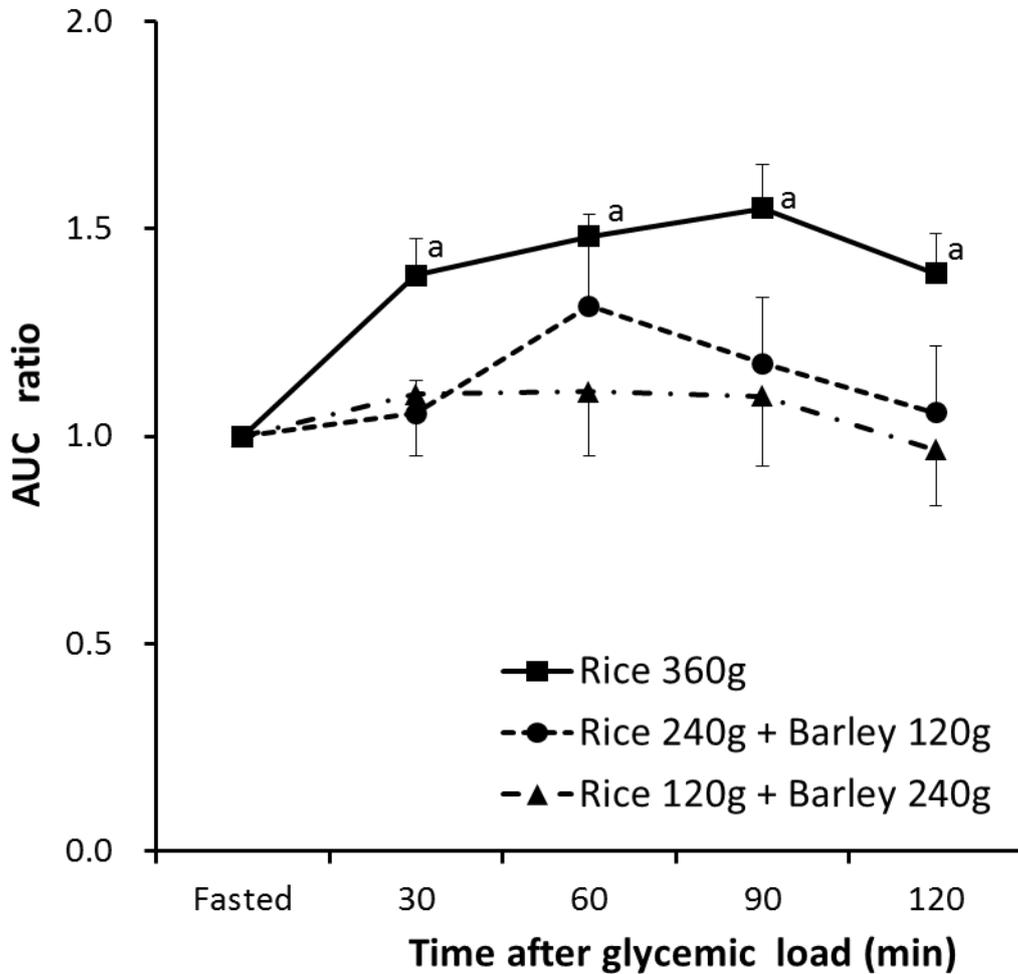


図 4-10 酸化ストレス検出群における麦めし摂取の AUC 比への影響

12 時間絶食後、めし 360g、めし 240g+麦めし 120g あるいはめし 120g+麦めし 240g を摂取した際の空腹時、めしあるいは麦めし混合めし摂取後 30、60、90、120 分後の AUC 比の変化を示した。AUC 比は、空腹時の溶血曲線の曲線下面積 (AUC) を 1 としたときの各時間の曲線下面積比 (AUC ratio) とした。めし 360g (■: n=11)、めし 240g + 麦めし 120g (●: n=9)、めし 120g + 麦めし 240g (▲: n=8) ^ap<0.05 vs Fasted Rice 360g 平均値 ± 標準誤差で示した。

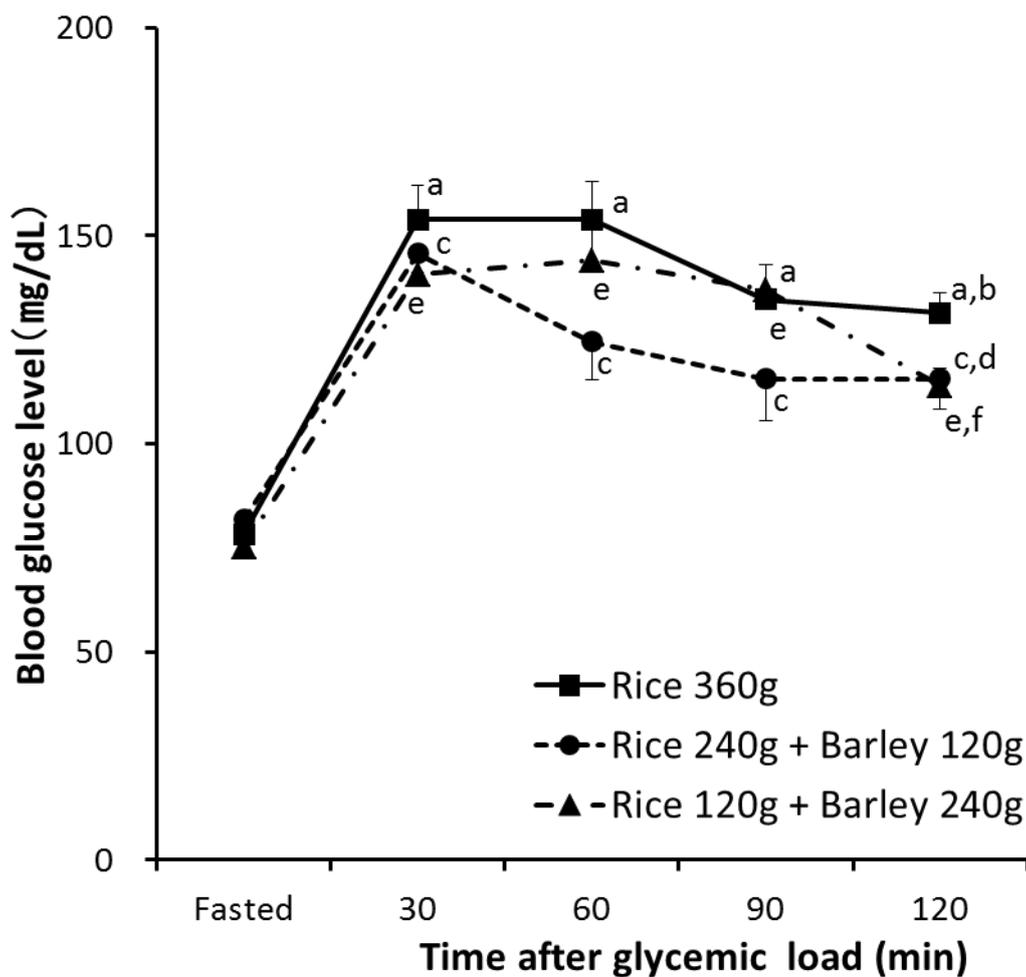


図 4-11 酸化ストレス検出群における麦めし摂取の血糖値への影響

12 時間絶食後、めし 360g、めし 240g+麦めし 120g あるいはめし 120g+麦めし 240g を摂取した際の空腹時、めしあるいは麦めし混合めし摂取後 30、60、90、120 分後の血糖値の変化を示した。めし 360g(■: n=11)、めし 240g+麦めし 120g(●: n=9)、めし 120g+麦めし 240g(▲: n=8)^ap<0.05 vs Fasted Rice 360g, ^bp<0.05 vs 30min Rice 360g, ^cp<0.05 vs Fasted Rice240g+Barley120g, ^dp<0.05 vs 30min Rice240g+Barley120g, ^ep<0.05 vs Fasted Rice120g+Barley240g, ^fp<0.05 vs 60min Rice120g+Barley240g 平均値±標準誤差で示した。

めし 120g+麦めし 240g では、60 分後に遅延し血糖値の上昇が緩やかな傾向にあった。

生体酸化ストレスは、3 群間に有意な差はなかったが、めし 360g 摂取は空腹時に比べ、摂取後 30、60、90、120 分で有意に高値を示した。一方、麦めし摂取の 2 群では、空腹時と摂取後 30~120 分後の AUC 比に有意な差はなかった。

4.4. 考察

本章では筆者が参画して構築した生体酸化ストレス評価法を用い、食物繊維を豊富に含む麦めしの効果を検討しつつ、生体酸化ストレス評価法が食品微量成分の生体内における抗酸化評価法として応用可能か検討を行った。

食後高血糖により NAD(P)H オキシダーゼ由来⁸⁾や、ミトコンドリア由来^{9),10)}の活性酸素種の産生など血管内皮由来の活性酸素産生について多数報告されている¹¹⁾⁻¹⁶⁾。このように複数の活性酸素産生源由来の活性酸素が大量に産生される結果、引き起こされる生体酸化ストレスを的確に、またリアルタイムに評価することは容易ではない。しかし、光増感反応を応用した本分析法は、生体酸化ストレス度を包括的に計測できるものである。

めし 360g を短時間で摂取した本研究においても、血管内皮細胞から漏出した活性酸素により血管内腔が酸化ストレス状態になることは十分に考えられる。めし摂取後、溶血開始時間が早められた、すなわち溶血曲線が空腹時に比べ、左にシフトした(図 4-5)ことは、高濃度グルコースに晒された血管内皮細胞から産生した活性酸素種により赤血球膜が脆弱化された結果であると仮定できる。

めし摂取量を 120g、180g、360g と変化させたところ、AUC 比はめし摂取量が増加するほど上昇傾向にあった(図 4-6)。また、AUC 比は血糖値の上昇と連動していた(図 4-7)。このことから、血液中のグルコース量の増加に伴い、酸化ストレスが充進すると推察できた。

本研究でめし 360g 摂取した被験者のうち、酸化ストレス不検出群が存在することが判明している。最近、緑黄野菜等に高含有の硝酸イオン(NO_3^-)が口腔内の嫌気性菌により亜硝酸イオン(NO_2^-)に還元され、 NO_2^- はさらに酸素分圧が低下した生体内で一酸化窒素(NO)に転換されるとともに、 NO_2^- の一部が唾液中に循環することによる NO_3^- - NO_2^- - NO 経路が提唱されている¹⁷⁾。 NO と $\text{O}_2 \cdot$ の反応速度が速いことから緑黄野菜などに含まれる NO_3^- の日常的な摂取が酸化ストレス不検出群と関連する可能性がある。

健常者に対する食後一過性高血糖の影響を検討した報告によると、グルコース 75 g を経口摂取した被検者はプラセボ摂取と比較し、摂取後血糖値は有意に上昇したが、FMD には影響を及ぼさないとの結果が示されている¹⁸⁾。一方、Title ら¹⁹⁾によると、健常者にグルコース 75 g を負荷した時の FMD は、グルコース摂取前のベースラインと比べ、グルコース摂取 2 時間および 3 時間後では有意に低下するとしている。以上のように、健常者におけるグルコースと FMD の関係には一貫した報告はみられなかった。さらに、Title ら¹⁹⁾はグルコースに加えビタミン C とビタミン E を同時に摂取させたところ、血糖値の上昇は抑制しなかったが、FMD の低下は抑制されたため、ビタミンの同時摂取は FMD の脆弱化を阻止できると示唆している。同様に、ビタミン C 投与は高血糖による血管内皮依存血管拡張機能の低下を抑制し、血管内皮機能を改善したとの報告もある¹³⁾。これらから、抗酸化物質の添加により、血糖値には影響を及ぼさないものの、血管内皮由来活性酸素による酸化ストレス状態を改善できる可能性が考えられた。

本報告においても、健常者にめし 360g を負荷した結果、酸化ストレスが検出された群と不検出群に分かれたが、両群の血糖値に差は認められなかった。そのため、血糖値の測定のみでは血管内皮における酸化ストレス状態を評価することはできないと推察された。

食物繊維による血糖値上昇抑制効果は知られており、Liljeberg ら²⁰⁾は健常者において、炭水化物量 31.5g に対し、食物繊維総量 15.4~24.8g (48.9~78.7g/100g 炭水化物) の摂取で血糖値上昇抑制効果を示したと報告し、一方、Juntunen ら²¹⁾は炭水化物量 50g に対し、食物繊維総量 12.8~ 17.1g (25.6~34.2g/100g 炭水化物) の摂取ではその抑制効果は示さないと報告している。従って、摂取炭水化物量に対してある程度以上の食物繊維の含有量がなければ血糖値の結果に反映されないこともあると考えられる。本研究においても麦めしの食物繊維により血糖値の上昇が抑制されると仮定し実験を行ったが、麦めし摂取による血糖値抑制効果は有意に示されなかった。このことは、本研究では炭水化物量 127g に対し、めし 120g+麦めし 240g 摂取でも食物繊維総量 10.8g(8.5g/100g 炭水化物) と食物繊維量が少なかったためと考えられた。しかし、めし 360g 摂取ではめし摂取により AUC 比、すなわち酸化ストレスが有意に上昇するものの、めし 240g+麦めし 120g およびめし 120g+麦めし 240g 摂取においては、摂取炭水化物量がめし 360g と同量であっても AUC 比の上昇を認めていない。このことから、麦めし摂取によって摂取できる食物繊維量は少なかったものの生体酸化ストレスの上昇を抑制することが示唆された。生体酸化ストレス低減に関与する成分の特定は今度の課題であるが、麦めしを摂取することで生

体酸化ストレスの低減が期待されると考えられる。

本研究において、麦めし摂取による生体酸化ストレスへの影響が評価できたことから、本評価法は経口摂取した食品微量成分の食後一過性酸化ストレスへの影響を評価する方法として利用できると確認できた。ただし、被験者により酸化ストレスへの感受性が異なるため、食品微量成分の評価をする前に、めし摂取のデータから本研究条件下における酸化ストレスの検出については確認する必要があると考えられた。

4.5. 小括

めし摂取における流血中の一過性酸化ストレス状態を包括的に評価する方法として、指頭血の溶血度から判定した生体内酸化ストレス評価法を用いて、麦めし摂取の影響を検討した。

めしの摂取量（120g、180g、360g）の増加に伴い、酸化ストレスおよび血糖値は上昇した。

めし 360g 摂取時において、酸化ストレスが検出できる群と酸化ストレス不検出群に分かれた。酸化ストレス検出群に対して、めし 240g+麦めし 120g あるいはめし 120g+麦めし 240g を摂取させ、めし 360g 摂取と比較したところ、めし 360g 摂取では摂取後、有意に酸化ストレスの上昇が認められたが、麦めし摂取群では、摂取後の有意な酸化ストレスの上昇は認められなかった。しかし、血糖値はめし 360g 摂取と有意な差はなかった。

麦めし摂取における酸化ストレスの上昇の抑制は、麦めしに含まれる食物繊維などによる可能性は考えられるが、その成分の特定は今後の課題である。

また、生体酸化ストレス評価法にて経口摂取した食品微量成分の効果を評価できることが確認できた。

4.6. 参考文献

- 1) Ceriello A (2005) Postprandial hyperglycemia and diabetes complications. Is it time to treat? *Diabetes* **54**, 1-7
- 2) Dagher Z, Park YS, Asnaghi V, Hoehn T, Gerhardinger C, Lorenzi M (2004) Studies of rat and human retinas predict a role for the polyol pathway in human diabetic retinopathy. *Diabetes* **53**, 2404-2411
- 3) Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy M, Simonson DC, Creager MA (1998) Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* **97**, 1695-1701
- 4) Nanri A, Mizoue T, Noda M, Takahashi Y, Kato M, Inoue M, Tsugane S (2010) Rice intake and type 2 diabetes in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Am J Clin Nutr* **92**, 1468-1477
- 5) 橋口照人, 丸山征郎 (2005) 血管内皮細胞機能検査法 *血液フロンティア* **15**, 2009-2014
- 6) 菌田勝 (2008) 生体内抗酸化活性の測定法. *特許公開* 2008-185577
- 7) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会 (2010) 日本食品標準成分表 2010, 全国官報販売協同組合, 東京
- 8) Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H (2000) High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* **49**, 1939-1945
- 9) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes H, Giarino I, Brownlee M (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**, 787-790
- 10) Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters* **416**, 15-18

- 11) Du X, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *PNAS* **97**, 12222-12226
- 12) Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato ELO, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R (2007) Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* **583**, 9-24
- 13) Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA (2001) Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* **103**, 1618-1623
- 14) Yabe-Nishimura C (1998) Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol Rev* **50**, 21-33
- 15) Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M (2001) Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* **108**, 1341-1348
- 16) Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications – A unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615-1625
- 17) Weitzberg E, Lundberg JO (2013) Novel aspects of dietary nitrate and human health. *Annu Rev Nutr* **33**, 129-159
- 18) Siafarikas A, Watts K, Beye P, Jones TW, Davis EA, Green DJ (2004) Lack of effect of oral glucose loading on conduit vessel endothelial function in healthy subjects. *Clinical Science* **107**, 191-196
- 19) Title LM, Cummings PM, Giddens K, Nassar BA (2000) Oral glucose loading acutely attenuates endothelium-dependent vasodilation in healthy adults without diabetes: an effect prevented by vitamins C and E. *JACC* **36**, 2185-2191
- 20) Liljeberg HGM, Granfeldt YE, Bjorck IME (1996) Products based on a high fiber barley genotype, but not on common barley or oats, lower postprandial glucose and insulin responses in healthy humans. *J Nutr* **126**, 458-466
- 21) Juntunen KS, Niskanen LK, Liukkonen KH, Poutanen KS, Holst JJ, Mykkänen HM

(2002) Postprandial glucose, insulin, and incretin responses to grain products in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* **75**,254–262

第5章 生体酸化ストレス評価法を指標とした緑茶摂取の影響

5.1. 背景

本論文では、第1章から第3章までは、緑茶に含まれ、強い抗酸化活性を示すエピガロカテキンガレート (EGCg) の抗酸化機序を述べた。単離した赤血球に酸化ストレスを与えた場合には、EGCg は強い抗酸化活性を示したが、血漿成分を含む全血には EGCg の抗酸化効果は弱く、生体内においては存在し得ない高濃度 (200 μ M) の EGCg の共存下のみ溶血抑制を示す結果となった。

緑茶は、アテローム性動脈硬化症の血管内皮機能不全の改善¹⁾、高血糖、高グリセロール血症および高インスリン血症亢進の抑制²⁾、高トリアシルグリセロール血症の抑制³⁾、ガン予防^{4),5)}など生体に有益な効果を示している。

フラバノールを多く含むダークチョコレートを3日間摂取し続けた健常者に OGTT を行った結果、フラバノールを含まないホワイトチョコレートを摂取した群に比べ一酸化窒素 (NO) 依存性の血管拡張反応である FMD が改善されたため、フラバノールの食後血管内皮機能の損傷を低下させる可能性を示唆している⁶⁾。また、赤ワインポリフェノールの摂取により血管内皮機能不全を抑制したの報告もある⁷⁾。

しかし、糖尿病ラットに12ヶ月間、水道水、ビタミンCとEおよび緑茶を与えた実験⁸⁾では、糖尿病による赤血球の還元型グルタチオン量の減少および血漿中の過酸化物の増加がみられたが、緑茶およびビタミンの添加により有意に改善された。また、網膜でのスーパーオキシド産生も緑茶およびビタミンの添加で改善された。一方、大動脈コラーゲン、腱コラーゲンおよび血漿タンパク質において、糖酸化反応生成物であるカルボキシメチルリジンは糖尿病により増加したが、緑茶およびビタミンの添加によって、有意には改善されず、さらに増加させた場合もあった。これらの結果から、糖尿病ラットに緑茶あるいはビタミンを摂取させることによって、糖尿病による病変を改善することもあれば、逆に状態を悪化させることもあると示唆している。

そこで、本章では第4章で食品微量成分の効果に応用可能であると示した、生体酸化ストレス評価法を用い、緑茶を経口摂取した際の流血中の酸化ストレスへの影響を検討した。

5.2. 実験方法

5.2.1. 試料

5.2.1.1. 被験者

本研究では、21～22 歳の健康な女性（3 名）および 60 歳代の健康な男性（1 名）を被験者とした。被験者には実験の主旨、方法などを説明し、被験者本人の同意を得た上で実施した。なお、実験実施に当たっては、共立女子大学・共立女子短期大学研究倫理審査委員会の承認を受けて行った。本研究では、めし 360g 摂取（以降「めし摂取」とする）において生体酸化ストレスが上昇する者のみを被験者とした。実験に際して、繰り返し回数は被験者が同意できる範囲内で実施した。被験者数および同一被験者が異なる日に同条件の実験を行った繰り返し回数は以下の通りである。めし摂取では、繰り返し 2 回の実施は、60 歳代の男性と 20 歳代の女性 2 名、めし 360g と緑茶浸出液同時摂取（以降「めし緑茶同時摂取」とする）では、繰り返し 2 回の実施は 20 歳代の女性 2 名、緑茶摂取 1 時間後にめし 360g 摂取（以降、「緑茶摂取 1 時間後めし摂取」とする）では、繰り返し 2 回の実施は 20 歳代の女性 2 名であった。なお、指頭血採取にあたっては被験者本人により自己採取した。

5.2.1.2. 緑茶浸出液の調製

80℃程度の湯で最もカテキン類が湯に浸出するとの報告⁹から 80℃の湯 60ml に緑茶乾燥茶葉 4g（市販緑茶：狭山茶 製造（有）宮野園）を加え、1 分間攪拌を行った。その後、茶こしにて十分に濾しとった浸出液を緑茶浸出液とした。緑茶浸出液は被験者が摂取する直前に調製した。調製方法は図 5-1 に示した。

5.2.1.3. 緑茶摂取時間および採血時間

第 4 章において、めし 360g 摂取の際、摂取後 30 分から血糖値の上昇および酸化ストレス値の上昇傾向が認められた。また、緑茶を摂取すると血漿中のカテキン類濃度は摂取後 1.4～2.4 時間程度でピークに達する¹⁰とのことから、カテキン類の血液中の存在量が最大値となる時間と生体内酸化ストレス値が高値となる時間を合わせた条件も考慮し、本研究では緑茶摂取の摂取タイミングをめし摂取と同時および緑茶摂取後 1 時間後にめしを摂取した 2 通りを検討した。緑茶摂取および採血の時間は図 5-2 に示した。採血は、まず食後

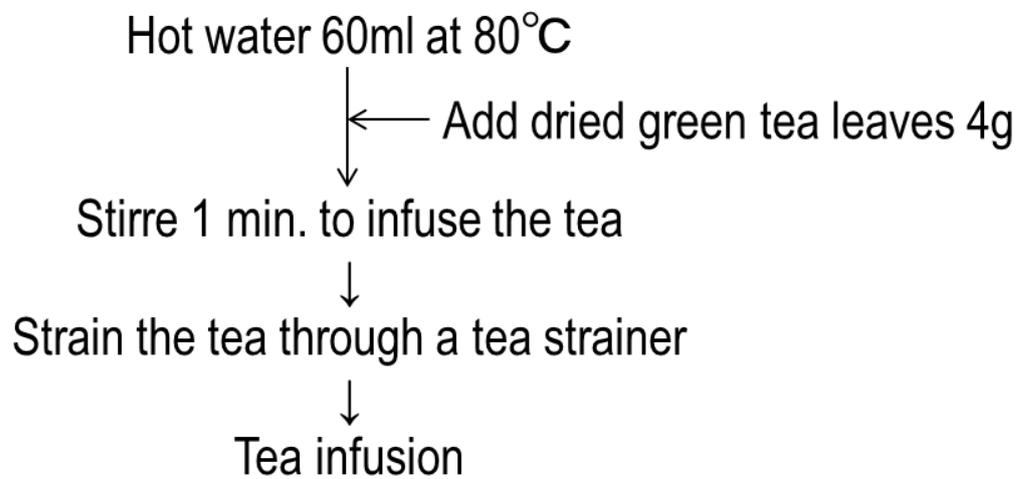


図 5-1 緑茶浸出液の調製方法

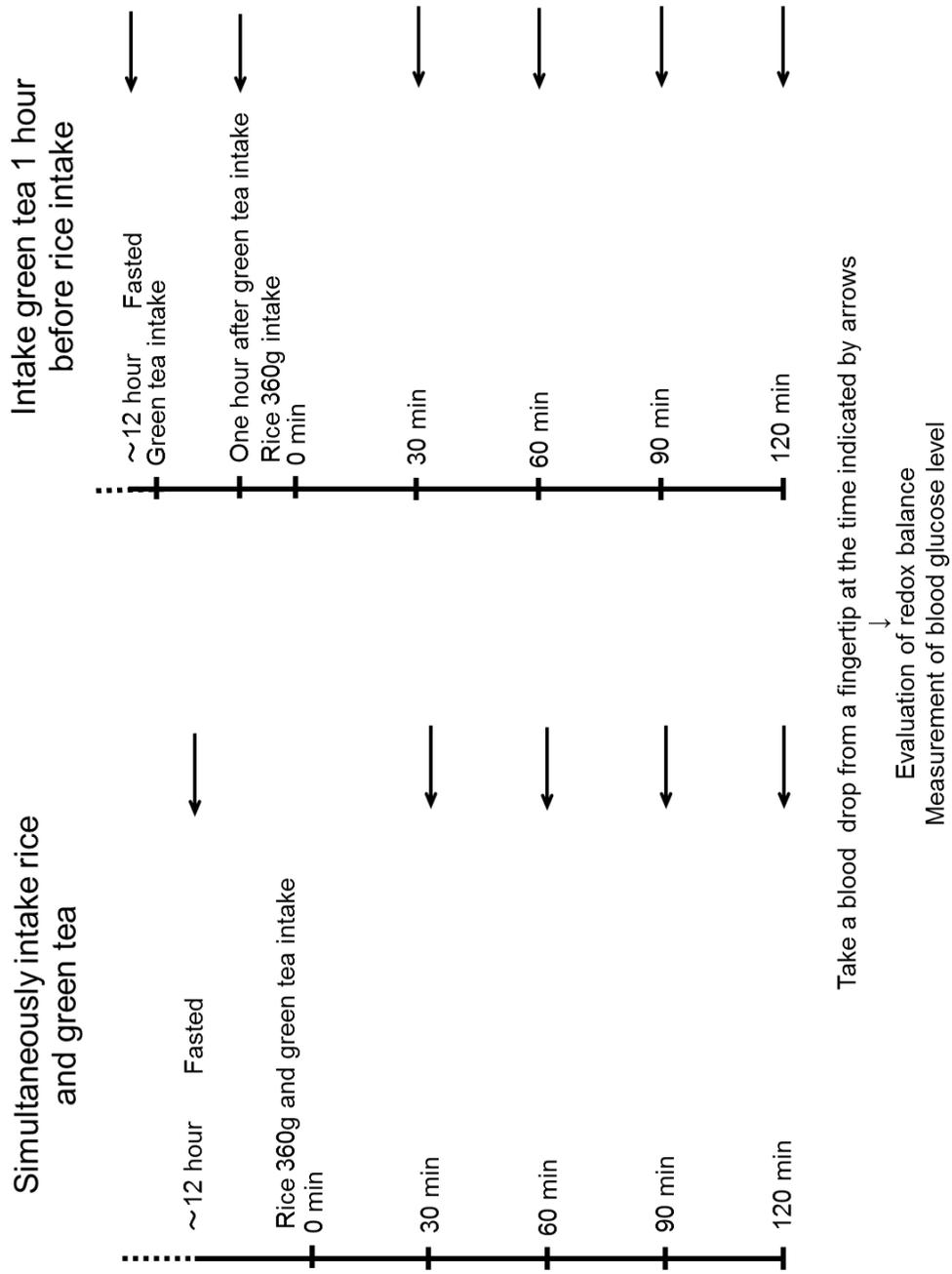


図 5-2 緑茶摂取および指頭血採取時間

12 時間以上経過した空腹時に指頭血 5 μ L を採取した。その後の採血時間は各群別に以下に示す。

コントロールとしてのめし摂取の場合は、めし 360g を 10 \pm 2 分で摂取し、その後 30、60、90、120 分の各時間に指頭血を採取した。

めし緑茶同時摂取の場合は、めしと緑茶浸出液を 10 \pm 2 分で摂取した後 30 分、60 分、90 分、120 分の各時間に指頭血を採取した。

緑茶摂取 1 時間後めし摂取の場合は、空腹時の指頭血のサンプリング直後に緑茶浸出液を摂取し、1 時間後に指頭血を採取した。その後、めし 360g を 10 \pm 2 分で摂取し、摂取後 30 分、60 分、90 分、120 分の各時間に指頭血を採取した。

採血は、メディセーフファインタッチ（テルモ社製）を用いて被験者自身が実施した。

5.2.1.4. 生体内酸化ストレス評価法

4.2.1.4 と同様

5.2.1.5. 血糖値の測定

4.2.1.5 と同様

5.1.2.6. 統計処理

めし摂取、めし緑茶同時摂取、緑茶 1 時間後めし摂取の 3 群間の差については、二要因分散分析により交互作用の有無を判定した。有意な交互作用が認められたデータについては、さらに水準ごとの単純主効果の検定を Bonferroni 法にて行った。また、同群間の差については、一要因分散分析を行い、有意な主効果が認められたデータについては、多重比較検定を Bonferroni 法にて行った。統計ソフトは IBM SPSS Statistics 22 を使用した。なお、 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

5.3. 結果

5.3.1. 緑茶摂取における生体酸化ストレスへの影響

緑茶摂取における生体酸化ストレスへの影響を図 5-3 に示した。めし摂取、めし緑茶同時摂取および緑茶摂取 1 時間後めし摂取の 3 群間の有意な差は認められなかった。

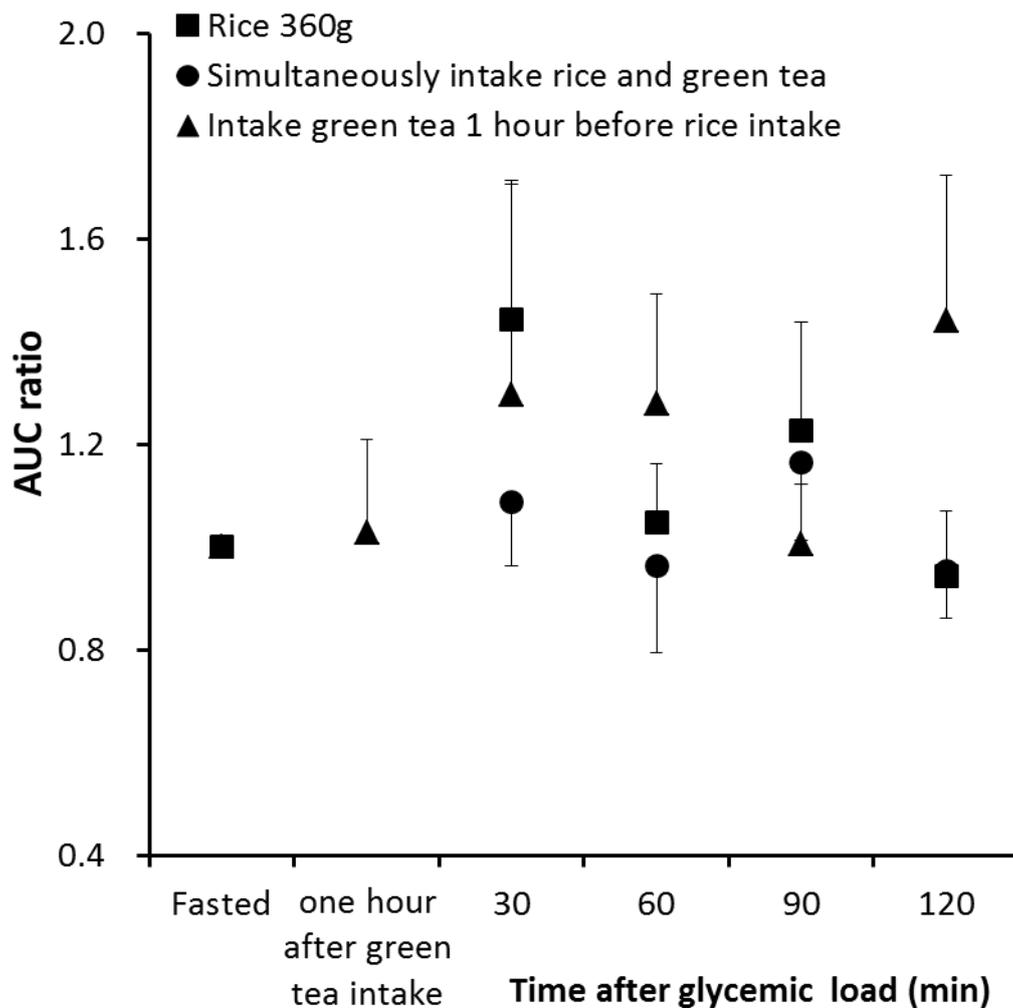


図 5-3 めし、緑茶同時摂取および緑茶摂取 1 時間後めし摂取の
生体酸化ストレスへの影響

12 時間絶食後、めし、めしと緑茶同時摂取あるいは緑茶 1 時間後めし摂取した際の空腹時、めし摂取後 30、60、90、120 分後の AUC 比の変化を示した。AUC 比は、空腹時の溶血曲線の曲線下面積 (AUC) を 1 としたときの各時間の曲線下面積比 (AUC ratio) とした。

めし摂取 (■: n=7)、めし緑茶同時摂取 (●: n=6)、緑茶摂取 1 時間後めし摂取 (▲: n=6)

平均値 ± 標準誤差で示した。

同群間における生体酸化ストレスの変化について検討したところ、めし摂取、めし緑茶同時摂取および緑茶摂取 1 時間後めし摂取のいずれの群も同群間内の有意な差は認められなかった。めし緑茶同時摂取では、摂取 30 分後 1.09 ± 0.12 、60 分後 0.96 ± 0.17 、90 分後 1.17 ± 0.15 、120 分後 0.95 ± 0.09 とめし摂取の摂取 30 分後 1.44 ± 0.27 、60 分後 1.05 ± 0.11 、90 分後 1.23 ± 0.21 、120 分後 0.94 ± 0.13 に比べ、酸化ストレスは低い傾向にあった。一方、緑茶摂取 1 時間後めし摂取では、めし摂取直前の緑茶摂取 1 時間後 1.03 ± 0.18 であり空腹時と同程度の酸化ストレスを示し、めし摂取 30 分後 1.30 ± 0.41 、60 分後 1.28 ± 0.21 で緩やかに酸化ストレスが上昇し、90 分後 1.01 ± 0.12 で低下していたが、120 分後 1.44 ± 0.28 に最も高い酸化ストレス値を示した。

5.3.2. 緑茶摂取における血糖値への影響

めし摂取、めし緑茶同時摂取あるいは緑茶摂取 1 時間後めし摂取後の血糖値の変化を図 5-4 に示した。3 群とも血糖値の変化のパターンは同様であり、3 群間に有意差はなかった。

同群間における血糖値の変化は、めし摂取では、空腹時血糖値 86 ± 3.9 mg/dL に対して、めし摂取 30 分後、60 分後、90 分後、120 分後はそれぞれ 154 ± 11.0 、 150 ± 11.8 、 129 ± 5.0 、 121 ± 3.6 mg/dL といずれも有意に血糖値の上昇が認められた。一方、めし緑茶同時摂取では、空腹時血糖値 87 ± 5.6 mg/dL に対して、緑茶とめし摂取後の血糖値は、摂取後 30 分、60 分、90 分、120 分でそれぞれ 144 ± 15.1 、 147 ± 16.2 、 129 ± 13.0 、 115 ± 8.7 mg/dL と有意な上昇を認めなかった。しかし、緑茶摂取 1 時間後めし摂取では、空腹時 86 ± 3.3 mg/dL および緑茶摂取後の血糖値 82 ± 2.3 mg/dL と比べ、めし摂取後 30、60、90、120 分ではそれぞれ 152 ± 12.6 、 157 ± 10.2 、 145 ± 9.8 、 129 ± 6.1 mg/dL となり、空腹時は 60、90、120 分で、緑茶摂取 1 時間後では 30、60、90、120 分で有意に血糖値の上昇が認められた。

5.4. 考察

本研究では、めし摂取により惹起した生体酸化ストレスに対する緑茶摂取の影響について検討した。緑茶摂取のタイミングは、緑茶を経口摂取すると血漿中のカテキン類の濃度は摂取後 1.4~2.4 時間でピークに達する¹⁰⁾ことから、緑茶摂取 1 時間後にめしを摂取した場合とめしと緑茶を同時に摂取した場合の 2 群とした。

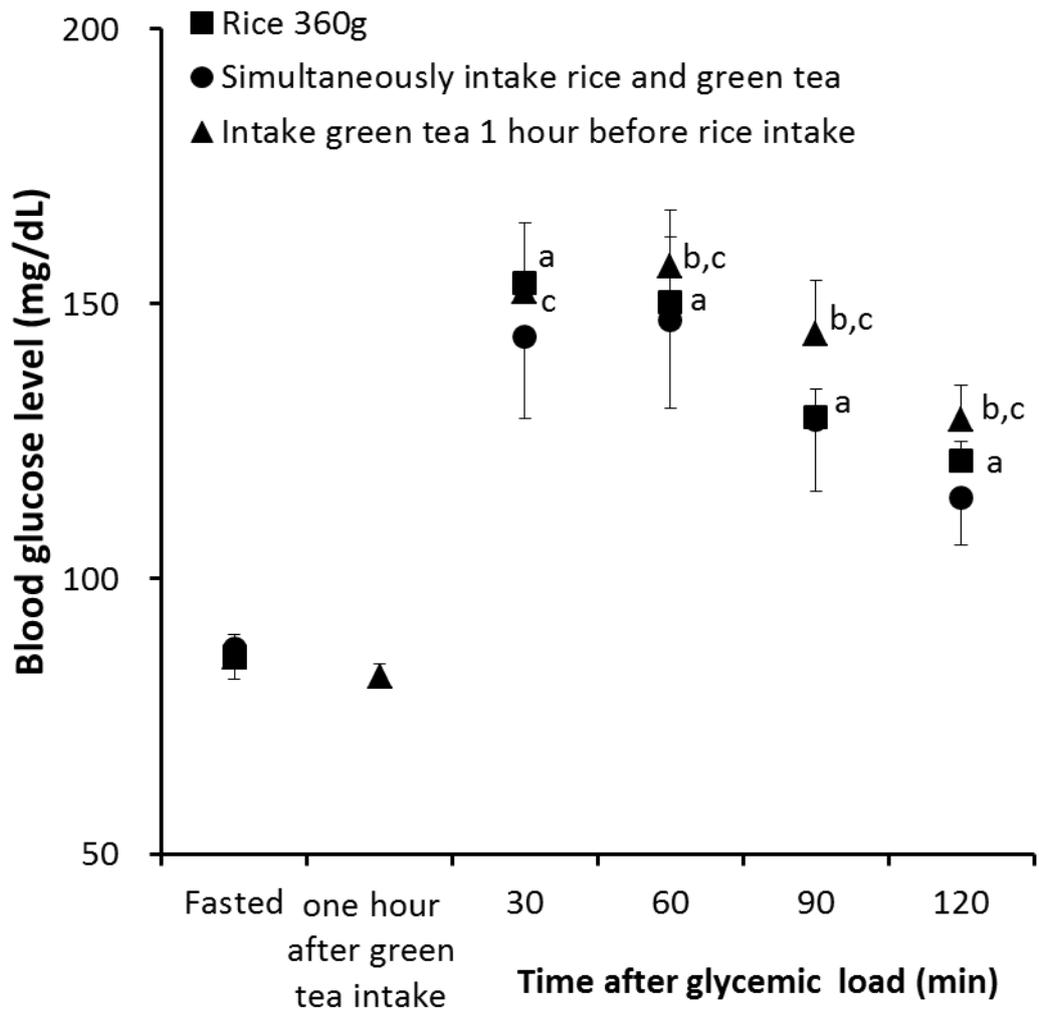


図 5-4 めし緑茶同時摂取および緑茶摂取 1 時間後めし摂取の
血糖値への影響

12 時間絶食後、めし、めしと緑茶同時摂取あるいは緑茶 1 時間後めし摂取した際の空腹時、めし摂取後 30、60、90、120 分後の血糖値の変化を示した。

めし摂取(■: n=7)、めし緑茶同時摂取(●: n=6)、緑茶摂取 1 時間後めし摂取(▲: n=6)

^a p<0.05 vs Fasted (Rice 360g)、^b p<0.05 vs Fasted (Intake green tea 1 hour before rice intake)、^c p<0.05 vs one hour after green tea (Intake green tea 1 hour before rice intake) 平均値±標準誤差で示した。

カテキン類を含む抹茶パンを摂取した健常な被験者は抹茶を含まない対照パンを摂取した被験者に比べ摂取後の血糖値を有意に低くしたとの報告がある¹¹⁾。また、Park ら¹²⁾は緑茶抽出物 (GTE) とグルコースを摂取した場合、GTE を摂取する時間によりグルコース耐性が変化することを報告している。GTE 摂取後ただちに OGTT を行ったヒトの血糖値は、OGTT のみの被験者に比べて有意に低値を示したが、GTE 摂取 1 時間後に OGTT を行った場合では、OGTT のみに比べ有意に血糖値が高値を示した。彼らはさらに、ラットを用いて、腹腔内へ直接 EGCg、ECG、EGC、EC を投与し、その 30 分後にグルコースを投与したところ、EGCg および ECG により血糖値の上昇を引き起こすとの結果を得たため、血糖値の上昇はガレート部位をもつカテキン類が原因である可能性を示唆している。また、GTE 摂取後ただちにグルコースを摂取した際の血糖値の上昇抑制の理由として、腸管内で GTE はグルコースの吸収を阻害するためであると報告している。カテキン類によるグルコースの吸収阻害については、グルコーストランスポーター2 (GLUT2) の阻害等ではなく^{13),14)}、 α -アミラーゼの活性を非競合阻害により阻害するとの報告もある^{13),15)}。

本研究においても、めし摂取の場合、空腹時に比べめし摂取後 30~120 分で有意に血糖値の上昇が認められたが、めし緑茶同時摂取ではめし摂取後の有意な上昇は認められなかったことから、めしと緑茶の同時摂取の場合は、めしの分解生成物であるグルコースの吸収を緑茶成分が阻害する可能性が示唆された。

緑茶摂取 1 時間後めし摂取の場合は、空腹時および緑茶摂取 1 時間後に比べ、めし摂取 60、90、120 分後では有意に上昇したため、グルコースの吸収阻害は十分ではなかったと考えられる。

本研究において緑茶の摂取による生体酸化ストレスへの影響について検討したが、めし緑茶同時摂取と緑茶摂取 1 時間後めし摂取の 2 群とも生体酸化ストレスの有意な低下は認められなかった。しかし、コントロールとなるめし 360g のみの摂取においても、空腹時に比べ生体酸化ストレスは上昇する傾向にあったが有意な上昇は認められず、めし摂取によって生体酸化ストレスを惹起することはできなかった。そのため、緑茶摂取による生体酸化ストレスの抑制効果をはっきりと示すことはできなかった。しかし、緑茶同時摂取では、生体酸化ストレスはめし摂取に比べ低い傾向にあった。これは、緑茶同時摂取では血糖値の有意な上昇を認めなかったことから、グルコースによる一過性の酸化ストレスが惹起されなかった結果であると考えられた。一方、緑茶摂取 1 時間後めし摂取では、摂取 120 分後に酸化ストレスが上昇していた。このことも血糖値が摂取後 60、90、120 分で空腹時

に比べ有意に上昇していることと関係していると推察された。

生体酸化ストレスは血糖値の変動に影響を受けることが考えられるが、Schramm ら¹⁶⁾によると、ココアフラバノールは砂糖やパンなどの炭水化物との同時摂取により単味で摂取するよりも血漿中フラバノール濃度の C_{max} (最高濃度) が高くなることから、緑茶をめしと同時に摂取した場合、緑茶カテキン類の吸収率が上昇し、血漿中のカテキン類量が増加した結果、生体酸化ストレス値を低く抑えることができた可能性も考えられた。

Zhu ら¹⁷⁾は、ココア抽出物を摂取したラットの赤血球と水を摂取したラットの血漿を組み合わせて、ココア抽出物ラットの血漿と水摂取ラットの赤血球の組み合わせと比較したところ、同程度の溶血パターンであったと報告している。このことから、経口摂取した緑茶抽出物のカテキン類は赤血球膜内に取り込まれる可能性も十分に考えられる。

本研究では、生体酸化ストレス評価法を用いてめし緑茶同時摂取と緑茶摂取 1 時間後めし摂取の 2 群について検討したが、緑茶とめしを同時に摂取した場合のほうが血糖値の上昇を抑制し、酸化ストレスも低い傾向を示した。これは、めしの消化吸収過程に緑茶が存在することによって血糖値の急激な上昇が抑制されたと考えられ、めしの摂取による流血中の一過性酸化ストレスを抑制するには緑茶を同時に摂取することが有益であると考えられた。しかし、本研究の結果では、めし摂取による生体酸化ストレスが有意に上昇しなかったため、緑茶の効果を明確に示すためにもさらにデータを蓄積していく必要がある。

5.5. 小括

生体酸化ストレス評価法を用いて緑茶摂取による影響を検討した。緑茶摂取は、緑茶摂取1時間後にめしを摂取した場合とめしと緑茶を同時に摂取した場合の2群とした。その結果、めし緑茶同時摂取は、めしのみ摂取に比べ、生体内酸化ストレスの上昇を抑制した傾向にあり、血糖値は空腹時に比べ有意な上昇を認めなかった。一方、緑茶摂取1時間後にめしを摂取した場合は、生体酸化ストレス上昇抑制効果および血糖値上昇抑制効果がともにめし緑茶同時摂取よりも低いと示唆された。

めしを摂取する際、緑茶と一緒に摂取することにより血糖値の上昇が抑制され、その結果、生体内酸化ストレスの上昇を抑制する傾向が認められたと考えられた。このことから、めしの摂取による流血中の一過性酸化ストレスを抑制するには緑茶を同時に摂取することが有益であると示唆された。

5.6. 参考文献

- 1) Drouin A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Belanger E, Fernandes P, Baraghis E, Lesage F, Gillis M, Villeneuve L, Hamel E, Ferland G, Thorin E (2011) Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H1032-H1043
- 2) Hininger-Favier I, Benaraba R, Coves S, Anderson RA, Roussel A (2009) Green tea extract decreases oxidative stress and improves insulin sensitivity in an animal model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *J Am Coll Nutr* **28**, 355-361
- 3) Ikeda I, Tsuda K, Suzuki Y, Kobayashi M, Unno T, Tomoyori H, Goto H, Kawata Y, Imaizumi K, Nozawa A, Kakuda T (2005) Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. *J Nutr* **135**, 155-159
- 4) Tsao AS, Liu D, Martin J, Tang X, Lee JJ, El-Naggar AK, Wistuba I, Culotta KS, Mao L, Gillenwater A, Sagesaka YM, Hong WK, Papadimitrakopoulou V (2009) Phase II randomized, placebo-controlled trial of green tea extract in patients with high-risk oral premalignant lesions. *Cancer Prev Res* **2**, 931-941
- 5) Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H (2003) Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *J Nutr* **133**, 2417S-2424S
- 6) Grassi D, Desideri G, Necozione S, Ruggieri F, Blumberg JB, Stornello M, Ferri C (2012) Protective effects of flavanol-rich dark chocolate on endothelial function and wave reflection during acute hyperglycemia. *Hypertension* **60**, 827-832
- 7) Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, Bedoui JE, Oak M, Muller B, Chataigneau T, Schini-Kerth VB (2006) Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* **71**, 794-802
- 8) Mustata GT, Rosca M, Biemel KM, Reihl O, Smith MA, Viswanathan A, Strauch C, Du Y, Tang J, Kern TS, Lederer MO, Brownlee M, Weiss MF, Monnier VM (2005) Paradoxical effects of green tea (*camellia sinensis*) and antioxidant vitamins in diabetic rats. *Diabetes* **54**, 517-526

- 9) Ziaedini A, Jafari A, Zakeri A (2010) Extraction of antioxidant and caffeine from green tea (*Camellia sinensis*) leaves: kinetics and modeling. *Food Sci Tech Int* **16**, 505-510
- 10) Yang CS, Chen L, Lee M, Balentine D, Kuo MC, Schantz SP (1998) Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**, 351-354
- 11) 中村衣里, 吉川友佳子, 戸根瑛美, 木戸和貴子, 松浦寿喜 (2012) 抹茶含有菓子パンの摂取が健常人の食後血糖値に与える影響. *日食化誌* **19**, 124-128
- 12) Park JH, Jin JY, Baek WK, Park SH, Sung HY, Kim YK, Lee J, Song DK (2009) Ambivalent role of gallated catechins in glucose tolerance in humans: a novel insight into non-absorbable gallated catechin-derived inhibitors of glucose absorption. *J Physiol Pharmacol* **60**, 101-109
- 13) Forester SC, Gu Y, Lambert JD (2012) Inhibition of starch digestion by the green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Mol Nutr Food Res* **56**, 1647-1654
- 14) Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee J, Kruhlak M, Levine M (2007) Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J* **21**, 366-377
- 15) Hara Y, Honda M (1990) The inhibition of α -amylase by tea polyphenols. *Agric Biol Chem* **54**, 1939-1945
- 16) Schramm DD, Karim M, Schrader HR, Holt RR, Kirkpatrick NJ, Polagruto JA, Ensunsa JL, Schmitz HH, Keen CL (2003) Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sciences* **73**, 857-869
- 17) Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, Orozco TJ, Keen CL (2002) Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Exp Biol Med* **227**, 321-329

第6章 総括

緑茶の抗酸化活性などによる生体への保護的効果について詳細に検討することを目的とし、食品微量成分の抗酸化能について赤血球膜酸化障害評価法および生体内酸化ストレス評価法を用い、その評価を行った。赤血球膜酸化障害評価法は、赤血球の溶血反応を利用して緑茶カテキン類、特にEGCgの抗酸化活性について *ex vivo* にて評価する方法であり、生体内酸化ストレス評価法は、経口摂取した食品微量成分の一過性高血糖酸化ストレスに対する影響を評価する方法である。

赤血球膜酸化ストレス評価法により緑茶カテキン類の抗酸化能を比較したところ、EGCg>ECg>EC>EGC の順で溶血抑制効果が認められ、ガロイル部分を持つカテキン類に強い抗酸化活性があることが示唆された。またカテキン類の中でEGCgが最も強い抗酸化能を持つことが判明した(第1章)。そこで、EGCgの抗酸化機序を詳細に検討したところ、赤血球は一重項酸素により膜脂質や膜タンパク質が酸化され、続く *post-illumination* により膜脂質過酸化連鎖反応の進展、膜タンパク質の酸化変性が引き起こされる結果、溶血に至ることが推察でき、EGCgは膜脂質と膜タンパク質の酸化を抑制することにより溶血を抑制していることが推察された。また、EGCgは、水溶性抗酸化物質であるTrpとは異なり、一重項酸素を直接消去することにより抗酸化能を発揮するだけでなく、赤血球膜内に取り込まれることにより強い抗酸化能を示すことが示唆された(第2章)。

流血中にEGCgが存在する場合でも、EGCgが赤血球膜内に取り込まれるのか検討したところ、洗浄赤血球にEGCgを添加した結果と比べ、同程度の溶血抑制効果を得るにはおよそ2倍量のEGCg濃度が必要であった。さらに、全血にEGCgを添加、再洗浄を行い血漿成分と反応溶液中のEGCgを除去したEGCg前処理全血赤血球では、EGCgの抗酸化効果はさらに低減したことから、全血に含まれる血清アルブミンとEGCgが結合する結果、抗酸化能は低下することが示唆された(第3章)。しかし、緑茶カテキン類摂取による様々な効果もあり、生体内に取り込まれたカテキン類が抗酸化能を示す可能性は捨てきれないことから、生体内における緑茶摂取の影響を検討することとした。

そこで、構築した生体酸化ストレス評価法を用いて、ヒトが摂取した食品微量成分による酸化ストレスの変化を捉えることができるか検証を行った。生体酸化ストレス評価法とは、めし摂取により食後高血糖を惹起し、これに伴う流血中の一過性酸化ストレス状態を

包括的に評価する方法である。めしの摂取量の増加（120、180、360g）に伴い、血糖値および酸化ストレスは上昇した。しかし、めし 360g 摂取において、酸化ストレスが亢進する群と酸化ストレスが検出できない群に分かれ、被験者により酸化ストレスの感受性が異なることが判明した。

次に、酸化ストレス上昇群に対し、食物繊維を豊富に含む麦めし摂取（めし 240g+麦めし 120g あるいはめし 120g+麦めし 240g）による影響を検討した。その結果、めし摂取に比べ、めし 120g+麦めし 240g 摂取は酸化ストレス値を低下させたが、血糖値には影響を及ぼさなかった。酸化ストレス値の低下は、麦めしに含まれる食物繊維によるものと推察されたが、麦めしに含有する微量成分の影響も無視できないと考えられた。

麦めし摂取によって酸化ストレス値が変化し、酸化ストレス抑制効果があると示されたことから、本研究で構築した生体内酸化ストレス評価法は生体内における食品微量成分の影響の検討に応用できることが示唆された（第 4 章）。

生体酸化ストレス評価法を用いて、緑茶摂取による影響をめしと緑茶同時摂取あるいは緑茶摂取 1 時間後にめし摂取の 2 通りについて検討した。めし摂取により酸化ストレス値が上昇する被験者に対して実験を行ったが、基準となるめし摂取の生体内酸化ストレス値が有意に上昇しなかったため、緑茶摂取の影響を明確に示すことができなかった。しかし、めしと緑茶の同時摂取では、めしのみ摂取に比べ生体酸化ストレスは低い傾向にあった。また、血糖値はめし摂取に比べ、めし緑茶同時摂取では血糖値の上昇を有意に抑制することができた。一方、緑茶摂取 1 時間後にめしを摂取した場合は、生体内酸化ストレス上昇抑制効果、血糖値上昇抑制効果どちらもめし緑茶同時摂取よりも低かった。したがって、めし摂取による生体酸化ストレスの上昇を抑制するには、緑茶を同時に摂取するほうがその効果は期待できると考えられた（第 5 章）。

以上の結果を総合すると、生体内において、緑茶カテキン類、主に EGCg が赤血球膜内に取り込まれる可能性は本研究結果から示すことができなかったものの、めしと同時に摂取した緑茶は、グルコースの吸収を抑制し血糖値の上昇を緩慢にさせる結果、急激なグルコース代謝の低減をもたらす酸化ストレスを抑制するのではないかと推察された。また、本研究で構築した赤血球膜酸化ストレス評価法は、*ex vivo* において、食品微量成分の抗酸化能を詳細に分析可能であること、生体酸化ストレス評価法は流血中の酸化ストレス状態を包括的に判定でき、経口摂取した食品微量成分の生体酸化ストレスへの影響も評価できる方法であると示唆された。

謝辞

本研究の遂行に当たり、ご懇篤なご指導・ご鞭撻を賜りました共立女子大学家政学部栄養学研究室 菌田勝教授に心より謝意を表します。

研究過程の様々な面で大変お世話になりました、村雲由佳助手、塩入麻由前助手、木村（長浦）亜希子前々助手にも深く感謝申し上げます。また、栄養学研究室の卒論生の皆様には、被験者等、実験にご協力いただきまして大変感謝しております。

共立女子大学家政学部食物栄養学科および家政学研究科の諸先生方にも多くのご指導およびご助言を賜りましたことを心より感謝申し上げます。

最後に、私の研究生生活に理解を示し、温かく励ましてくださった愛国学園短期大学の皆様と家族に心よりお礼申し上げます。