

## 杜仲茶の抗酸化性

Antioxidant activity of extracts from Tu-Chung (*Eucommia ulmoides*, Oliv.) leaves

角橋明美\*, 神田知子\*\*, 安藤真美\*\*\*, 桑守正範\*\*\*\*, 人見英里\*#  
Akemi KADOHASHI\*, Tomoko KODA\*\*, Mami ANDO\*\*\*, Masanori KUWAMORI\*\*\*\*, and Eri HITOMI\*#

Abstract:

To clarify the food functions of Tu-Chung (*Eucommia ulmoides*, Oliv.) leaves, their antioxidative activity was examined. The antioxidative activities of hot-water extracts of roasted and unroasted leaves, geniposidic acid and a n-hexane extract of used leaves were evaluated on the basis of several lipid peroxidation model systems. Hot-water extracts of both roasted and unroasted leaves showed high activities in the AAPH radical-scavenging method, inhibition of methyl linoleate oxidation and inhibition of the rat microsome oxidation. A hot-water extract of roasted leaves effectively scavenged an intracellular reactive oxygen species induced by 4-hydroxy 2-nonenal. Geniposidic acid showed an antioxidative activity only in a microsome system and an intracellular reactive oxygen species scavenging system. An n-hexane extract of used leaves showed no activity. These results suggest that hot-water extracts of Tu-Chung leaves could possibly act as an antioxidant.

キーワード：杜仲茶，抗酸化性

Keywords：Tu-Chung, *Eucommia ulmoides*, antioxidant activity

杜仲とは、中国四川省原産のトチュウ科トチュウ属トチュウという“一科一属一種”の落葉喬木(*Eucommia ulmoides*, Oliv)であり、葉、根、種子・種子殻、樹皮はトチュウゴムというイソプレン単位が重合した疎水性の高い物質を含んでいる<sup>1)</sup>。樹皮の部分は生薬としての歴史が古く、その薬効は二千年以上も前から長期にわたり利用されてきた<sup>1)</sup>。トチュウが日本に導入されたのは大正時代であるが、現在では国内各地で栽培されており、その葉が健康茶として利用されている<sup>1)</sup>。

杜仲の葉は、樹皮と異なり医薬品ではなく食品に分類されるが、杜仲の樹皮と類似した成分を含むことが報告されている<sup>2,3)</sup>。杜仲茶は、この杜仲の葉を焙煎して作られるものであり、健康茶の一種として利用されてきた。最近はペットボトル飲料としても販売されている。この杜仲葉の生理作用として、葉に含まれるイリドイド配糖体であるゲニポシド酸により利尿作用、血圧降下作用<sup>1,4)</sup>が認められ、トチュウ葉配糖体を関与成分とし、「本飲料は、杜仲葉配糖体を含んでおり、血圧が高めの方に適した食品です」などの表示が許可

された特定保健用食品も発売されている。また、杜仲茶水抽出エキスにより、肝臓において蓄積されたコレステロール及び中性脂肪を減少させる効果<sup>5)</sup>についても報告されている。

本研究では杜仲茶の機能性の一つと考えられる抗酸化能に着目し、焙煎前および焙煎後の茶葉熱水浸出液、茶葉熱水浸出液を凍結乾燥した茶葉熱水抽出物、固有成分のゲニポシド酸、熱水抽出後杜仲茶葉のヘキサン抽出物を用いて、5種のモデル系において抗酸化能の検討を行った。

### 実験方法

#### 1. 試料及び試葉

焙煎後の茶葉は杜仲茶(小林製薬株式会社)を購入し試料として用いた。焙煎前の茶葉、熱水浸出後の乾燥茶葉(いわゆる茶殻)は、日立造船バイオ株式会社(現在は杜仲茶部門は小林製薬に委譲された)より譲渡していただいたものを用いた。浸出液の調製は茶葉3gに対して1Lの蒸留水を用い20分間沸騰させ、茶葉を入れたまま冷却し、濾紙(No.2)を使用して濾過

\* 山口県立大学大学院健康福祉学研究所

\*\* 山口県立大学看護栄養学部栄養学科

\*\*\* 大阪樟蔭女子大学学芸学部食物栄養学科

\*\*\*\* 美作大学短期大学部栄養学科

# 連絡先 (hitomi@yamaguchi-pu.ac.jp)

\* Yamaguchi Prefectural University Graduate School of Health and Welfare

\*\* Yamaguchi Prefectural University

\*\*\* Osaka Shoin Women's University

\*\*\*\* Mimasaka Junior College

#Corresponding Author

した。なお、今回用いた杜仲茶の成分は、茶葉1.5gを0.8Lの水に入れ、沸騰後弱火にて10分煮出した場合、0.8Lあたり、たんぱく質0g、脂質0g、炭水化物0g、ナトリウム0mg、ゲニポシド酸6mg、カフェイン0mgと報告されている（小林製薬株式会社による分析結果）。茶葉熱水抽出物は焙煎前および焙煎後の茶葉浸出液（30g茶葉/L）それぞれを凍結乾燥して調製した。杜仲茶葉熱水浸出後ヘキササン抽出物の調製は、熱水浸出後茶葉を用い、メスフラスコに茶葉25gを入れn-ヘキササンで250mlに定容し一昼夜常温で抽出した。抽出後n-ヘキササンを溜去し乾固物の重量を測定し、10mg/mLになるようにジメチルスルホキシド（DMSO）に溶かして用いた。用いた試薬として、 $\alpha$ -トコフェロールは東京化成工業（株）、4-Hydroxy 2-nonenal（HNE）はCayman chemical社、2',7'-dichlorofluorescein diacetate（DCFH-DA）はMolecular Probes社、その他の試薬は和光純薬（株）より購入した。実験に使用する際には、 $\alpha$ -トコフェロールおよびゲニポシド酸はエタノールに溶解して使用した。

## 2. ケミルミネッセンス法によるAAPHラジカル消去能<sup>6)</sup>

40mM 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH)/0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 200  $\mu$ Lに各試料（ゲニポシド酸は10  $\mu$ M、茶葉熱水浸出液は1000倍希釈、茶葉熱水抽出物は100  $\mu$ g/mL、10  $\mu$ g/mLに調製したサンプル溶液）200  $\mu$ Lを加え懸濁した。37°Cに設定したケミルミネッセンス装置（アロカ社、BLR-400）内で2分間静置後、ルミノール試薬（0.1mM ルミノール8mL：4  $\mu$ M チトクロームC 2mL：0.05Mほう酸緩衝液（pH9.3）18mL：メタノール 52mL）200  $\mu$ Lを加え、ルミノールと化学反応して放出される化学エネルギーによる発光を37°Cにて3分間検出した。3分間の発光強度の積算値の平均をコントロールと比較することで、各種サンプルの抗酸化能の強さを測定した。コントロールはサンプル溶液の代わりに0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.0）あるいはエタノール 200  $\mu$ Lを用いて測定を行った。

## 3. リノール酸メチル酸化抑制活性<sup>7)</sup>

リノール酸メチル酸化抑制活性は、増田らの方法<sup>7)</sup>を一部改変して行った。各試料溶液としては、茶葉熱水浸出液、茶葉熱水抽出物（添加濃度1 mg/mL、2.5mg/mL、5 mg/mL）、ゲニポシド酸（最終濃度25  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M）、杜仲茶葉熱水抽出後ヘキサ

ン抽出物（10mg/mL）、ポジティブコントロールとして50  $\mu$ M  $\alpha$ -トコフェロール、コントロールとして溶媒であるエタノール、ジメチルスルホキシド（DMSO）を用いた。これらの試料溶液40  $\mu$ Lに、リノール酸メチル33  $\mu$ Lと0.1M Tween20-0.05Mリン酸緩衝液（pH 7.4）2mlを加え試験管ミキサーにて2分間、超音洗浄器（IWAKI, USC-6D）にて3分間処理しミセル化したのち、0.2M 2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride (AAPH)水溶液100  $\mu$ Lを加え攪拌し、37°Cにて3時間振盪した。反応液50  $\mu$ Lを取り、メタノール950  $\mu$ Lを加えて希釈後、フィルター濾過し、その10  $\mu$ LをHPLCに導入し、生じたリノール酸メチルヒドロペルオキシドをカラム；COSMOSIL 5C18（150mm×4.6mm、ナカライテスク株式会社）、溶出溶媒；アセトニトリル：水＝9：1、流速；1.0mL/min、検出波長；234nmの条件で検出した。保持時間約4分40秒にて検出されるヒドロペルオキシドの3つのピークエリア値を合計し比較した。なお実験は3連で行い、結果はそれぞれの平均値と標準偏差で示した。

## 4. ウサギ赤血球膜ゴースト系を用いた抗酸化試験

ウサギ保存血液は（株）日本バイオテスト研究所より購入し、実験に用いた。赤血球ゴーストの調製は津田ら<sup>8)</sup>の方法で行った。抗酸化試験は大澤ら<sup>9)</sup>の方法に従い、タンパク質濃度0.5mg/mlになるように希釈した赤血球膜ゴースト懸濁液0.45mlに、各試料（杜仲茶葉熱水浸出液、杜仲茶葉熱水抽出物は添加濃度1 mg/mL、2.5mg/mL、5 mg/mL、ゲニポシド酸は最終濃度25  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、杜仲茶葉熱水抽出後ヘキササン抽出物10mg/mL）25  $\mu$ Lまたは、ポジティブコントロールとして50  $\mu$ M  $\alpha$ -トコフェロール、コントロールとして蒸留水または、各試料の溶媒である蒸留水、エタノール、ジメチルスルホキシド（DMSO）25  $\mu$ Lを加え、さらに反応開始剤として24mM t-butylhydroperoxide 25  $\mu$ Lを加え、37°Cで20分間振盪させながらインキュベートし、終了後直ちに氷冷し反応を停止させた。脂質過酸化度の測定はチオバルビツール酸（TBA）法<sup>10)</sup>にて行った。

## 5. ラット肝ミクロソーム系を用いた抗酸化試験

ウィスター系雄ラット（Kud:Wistar）は九動株式会社より購入し実験に用いた。なお、動物実験は「実験動物の飼育及び保管等に関する基準（昭和55年3月、総理府告示第6号）」に則って実施した。

ラットより得られた肝臓を氷冷した0.9%塩化カリ

ウム水溶液で洗浄後細断し, 4倍容の0.25Mマンニトール-0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) を加えてガラステフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。得られたホモジネートを4℃, 6,000×gで10分間遠心分離して核や未破壊細胞を除去した。得られた上清を4℃, 100,000×gで超遠心分離し得られたペレット部分をマイクロソーム画分<sup>11)</sup>とした。これに0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH7.4): 0.15M塩化カリウム溶液 = 1:2を加えてホモジナイズしたものをマイクロソーム懸濁液とした。マイクロソーム懸濁液 (1.5mg タンパク質/mL) 0.25mLに対して, 各試料 (杜仲茶葉熱水浸出液, 茶葉熱水抽出物は添加濃度 1 mg/mL, 2.5mg/mL, 5 mg/mL, ゲニポシド酸は最終濃度が100, 50, 25 μM) 25 μl, または, ポジティブコントロールとして  $\alpha$ -トコフェロールを用いた。コントロールとしては, 試料と同様の蒸留水または, エタノールを用いた。試料に0.1Mトリス・塩酸緩衝液 (pH7.4) で溶解した 2mM ADP 0.25mL, 0.1mM-0.2mM EDTA-FeCl<sub>3</sub> 0.25mL, 2mM NADPH 0.25mL を加え, 混合して反応液とし, 37℃の湯浴中で30分間振とうさせながらインキュベートし<sup>8)</sup> 反応後直ちに氷冷し, 反応を停止させた。脂質過酸化度の定量はTBA法<sup>10)</sup>にて行った。なお, 実験は2連で行なった。

### 6. 細胞内活性酸素種の生成抑制

細胞内活性酸素種の生成抑制は, Fengらの方法<sup>12)</sup>を一部改変して行った。ラット正常肝由来RL34細胞を10% FBS-DMEM培地を用い6穴プレート (0.5×10<sup>6</sup> cells /well) で4日培養し, 培地を1 wellあたり1 mL添加した後に試料 (茶葉熱水浸出液は20 μL/well, ゲニポシド酸は最終濃度25 μM) を投与し37℃, 5% CO<sub>2</sub>条件下で24h培養を行った。処理後, 培地を交換し, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を最終濃度50 μMになるように投与し, 30分間37℃, 5% CO<sub>2</sub>条件下でインキュベーションした。その後PBSで2回洗浄し, 新たに1 mLの培地を加え, 4-Hydroxy 2-nonenal (HNE) を最終濃度50 μMになるように投与し, さらに30分37℃, 5% CO<sub>2</sub>条件下でインキュベーションした。その後PBSで2回洗浄後トリプシン処理を行い, 剥離した細胞を2mLのPBSに懸濁し, 2回洗浄を行った。洗浄後のRL34細胞を10mM EDTA-PBS 2mLに懸濁し, セルストレーナー (FALCON, #352235) を通した後, フローサイトメーター (Becton-Dickinson, FACSCalibur HG) を用い, 細胞内の活性酸素種と反応して生じた蛍光物質

dichlorofluorescein (DCF) を検出器 FL1 で検出し, 杜仲茶の細胞内活性酸素種生成抑制能を測定した。実験は2回以上繰り返して行い, 代表的なヒストグラムを結果として示した。

### 実験結果

#### 1. ケミルミネッセンス法によるAAPHラジカル消去能

杜仲茶のAAPHラジカル消去活性を図1に示した。図はコントロールの化学発光強度を100%として表しており, グラフのバーが短いほど, ラジカル消去活性が高いことを示す。本研究では, ケミルミネッセンス法は従来法に比べ高感度に測定が可能であるという利点があるため用いた。焙煎の有無に関わらず杜仲茶の浸出液および熱水抽出物凍結乾燥品は, 高い活性を示した。さらに熱水抽出物ではその効果は濃度依存的であった。しかし, 杜仲茶の固有成分であるゲニポシド酸 (10 μM) および熱水浸出後茶葉のヘキササン抽出物 (10mg/ml) はラジカル消去活性をほとんど持たなかった。化学構造からもゲニポシド酸はほぼラジカル消去活性を持たないと考えられ, ラジカル消去活性に対して杜仲茶葉中のゲニポシド酸の寄与はほとんど無いと考えられた。

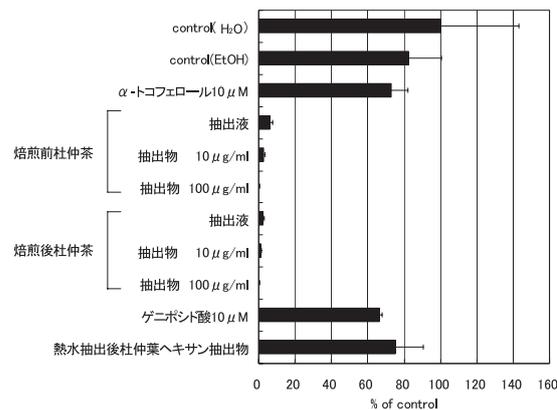


図1 ケミルミネッセンス法によるAAPHラジカル消去活性(n=3)

#### 2. リノール酸メチル酸化抑制活性

杜仲茶のリノール酸メチル酸化抑制活性を図2に示した。コントロールの過酸化度を100%として表しており, グラフのバーが短いほど, 抗酸化活性が強いことを示す。この方法は, 酸素存在下でラジカル発生剤AAPHにより定常的にペルオキシラジカルを発生させ, リノール酸メチルを酸化させる系である。前項の

ケミルミネッセンス法によるラジカル消去の測定法に比べ、より食品に近いモデルと考えられる。杜仲茶葉熱水浸出液は焙煎前、焙煎後ともに高い酸化抑制活性を示した。茶葉熱水抽出物は焙煎前、焙煎後ともに濃度依存的に抑制活性を示し、5 mg/mlでは、ほぼ浸出液と同等であった。前項のラジカル消去能と同じく、ゲニポシド酸の50 μM, 100 μM, 熱水抽出後茶葉のヘキササン抽出物において、酸化抑制活性はほとんど見られなかった。

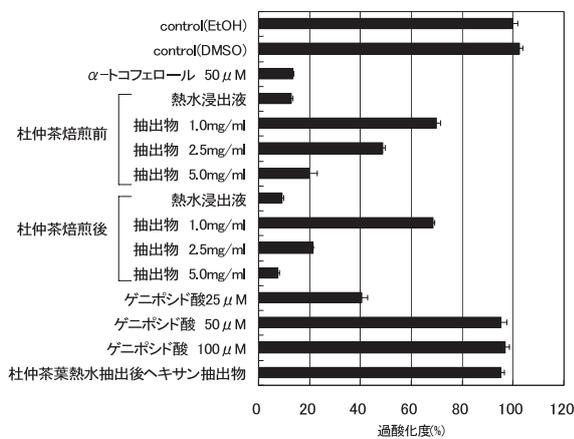


図2 リノール酸メチル酸化抑制活性 (n=3)

### 3. ウサギ赤血球膜ゴースト系を用いた抗酸化試験

生体膜モデルとして、ウサギ赤血球膜ゴーストを用いて行なった抗酸化試験の結果を図3に示した。コントロール（蒸留水）の過酸化度を100%として表しており、グラフのバーが短いほど、抗酸化性が強いことを示す。茶葉熱水浸出液の活性は、焙煎前が49.1%、

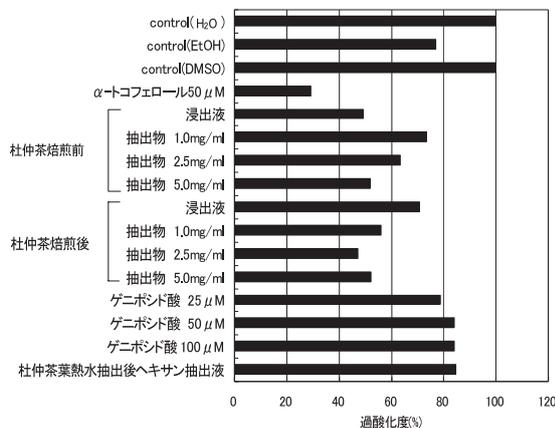


図3 ウサギ赤血球膜ゴーストの酸化抑制活性 (n=2)

焙煎後が70.7%であり、焙煎前茶葉浸出液がより強くゴーストの酸化を抑制した。茶葉熱水抽出物は焙煎前、焙煎後ともにほぼ濃度依存的に過酸化を抑制した。ゲニポシド酸は、濃度に関係なく過酸化を抑制する効果はみられなかった。熱水抽出後茶葉のヘキササン抽出物においても過酸化を抑制する効果は見られなかった。

### 4. ラット肝ミクロソーム系を用いた抗酸化試験

ラット肝ミクロソーム系は、生体モデル系の一つであるが、前項のゴースト系とは異なる機構で脂質過酸化を引き起こすものである。この系は、ラットの肝ミクロソーム画分に含まれる酵素系によりNADPHを電子供与体として鉄を還元し、生じた2価鉄により脂質の過酸化を引き起こす<sup>11)</sup>。ラット肝ミクロソーム系を用いた抗酸化試験の結果を図4に示した。図はコントロールの過酸化度を100%として表しており、グラフのバーが短いほど、抗酸化活性が高いことを示す。焙煎前及び焙煎後ともに茶葉浸出液、抽出物は強くミクロソームの脂質過酸化を抑制した。ゲニポシド酸では25 μMで51.8%、50 μMで37.0%、100 μMで65.1%と、いずれの濃度でも過酸化を抑制する効果は茶葉浸出液、抽出物に比べて低かった。また杜仲茶葉熱水抽出後ヘキササン抽出物においては、162.4%とむしろ酸化を促進する結果となった。この理由については、明らかでない。

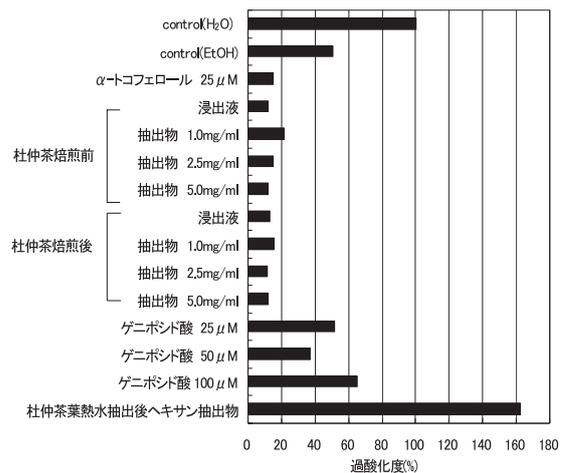


図4 ラット肝ミクロソーム酸化抑制活性 (n=2)

### 5. 細胞内活性酸素種の生成抑制

フローサイトメトリーとは、蛍光色素や蛍光標識した抗体を用いて細胞を標識し、細胞を浮遊液に乗せて流し、レーザー励起光を照射して細胞の発する蛍光や

散乱光を測定する方法である。本法はペルオキシド感受性のプローブ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて, 細胞内の活性酸素種の量をフローサイトメトリーによって測定するものである。DCFH-DAは膜を通過して細胞内に拡散し, 細胞内のエステラーゼによって加水分解され, 蛍光を持たない 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) を生じる。DCFHは細胞内の過酸化水素や脂質過酸化物(活性酸素種)と速やかに反応し強い蛍光を持つ 2',7'-dichlorofluorecein (DCF) が生成する。DCFは細胞内の活性酸素種の量に比例して生成することから, この蛍光強度をフローサイトメーターを用いて測定し, 杜仲茶処理による細胞内の活性酸素量を検討した<sup>13)</sup>。本研究では, 細胞を24時間焙煎後茶葉浸出液またはゲンボシド酸で処理し, その後洗浄した細胞をリノール酸の過酸化によって生じる毒性低分子アルデヒドである4-hydroxy 2-nonenal (HNE) 処理を行なって細胞を過酸化状態にし, 細胞内活性酸素種の生成抑制作用を検討した(図5)。横軸に蛍光強度を, 縦軸に細胞数を表す。HNE処理をしないコントロールでは細胞集団は最も左側に位置しており, 蛍光強度の低い(つまり過酸化状態でない)細胞集団であることを表している(図中の紫のヒストグラム)。HNE処理によって, 細胞内の過酸化状態が亢進するため, 細胞集団は右にシフトする(図中の水色のヒストグラム)。杜仲茶の茶葉浸出液(焙煎後), 25 μMゲンボシド酸をあらかじめ細胞に投与(24時間処理)しておくことで, その後HNE処理をしても細胞内の過酸化は完全ではないが抑えられ, ピークが左にシフトした(図中の白抜き色のヒストグラム)。しかし, 焙煎前茶葉浸出液では, ほとんど細胞内の過酸化状態は改善されなかった(結果は示していない)。細胞内の活性酸素種生成抑制では, 前項で示した各種

*in vitro*系とは異なる結果となったが, 培地中での抽出物の溶解性や細胞への杜仲茶成分の透過性などの点からこのような差が生じたのではないかと推測している。

考 察

杜仲茶の原料である「杜仲」は, 中国では古くから漢方薬の中でも不老長寿の仙薬として珍重されてきた。また, 漢方薬の中でも最も高貴なものとして, 五大漢方薬のひとつとされている。漢方では薬草の効能などにより, 上薬・中薬・下薬に分類されているが, 杜仲は不老長寿として「上薬」に分類されている。

本研究では, 杜仲茶の抗酸化能を, *in vitro*の系としては, ケミルミネッセンス法によるAAPHラジカル捕捉能, リノール酸メチル酸化の抑制活性, ウサギ赤血球膜ゴースト系, ラット肝ミクロソーム系で, より生体に近い細胞を用いた系として, フローサイトメトリー法により細胞内活性酸素種生成抑制活性の測定を行った。

先に結果の項で述べた通り, 杜仲茶の茶葉熱水浸出液, 茶葉熱水抽出物, ゲンボシド酸はそれぞれの系で強弱が見られるが抗酸化能を示した。

これらの系はそれぞれ原理が異なり, ケミルミネッセンス法は, 酸素存在下においてラジカルが発生するとスーパーオキシドアニオンが生成し, ルミノールと化学反応して放出される化学エネルギーによる発光を検出するものである。この方法は操作が簡便で応答が速く, さらに, ラジカルを発生させる基質に対して非常に敏感であり, また, 試料が懸濁していても測定可能というのが特徴である。この系において, 焙煎前後の茶葉浸出液および抽出物の抗酸化性が確認されたことから, その他の系においても検討を行った。

リノール酸メチル酸化の抑制活性は, 食品に近いモデル系として考えられ, リノール酸メチルをミセル化させラジカル発生剤であるAAPHにより酸化を促進させ, 生成した過酸化物をHPLC法にて測定した。ラジカル発生剤としてAAPHを用いている点においても, 図1で示したケミルミネッセンス法によるラジカル消去活性と同様であり, 結果からもラジカル消去活性の強かった焙煎前後の茶葉浸出液および抽出物で, 抗酸化性を示した。

赤血球膜ゴースト系は, 赤血球膜を用い, 過酸化の誘導剤t-ブチルヒドロペルオキシドによって膜脂質の過酸化を引き起こし, 抗酸化物質が酸化防御が可能か否かを評価する系である。杜仲茶の浸出液または抽出

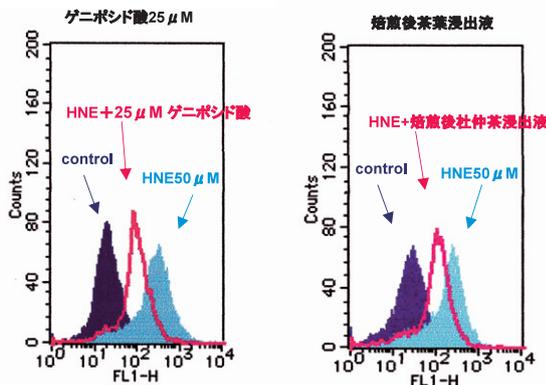


図5 細胞内活性酸素種の生成抑制活性

物はあまり高い活性を示さなかったが、この理由として熱水による浸出液や抽出物という親水性物質を用いていることから、膜脂質への親和性が低く、膜脂質の過酸化を抑制するのがかったためと考えられる。

ラット肝ミクロソーム系は、赤血球膜ゴースト系とは異なり、ミクロソーム中に存在する薬物代謝酵素による酵素的な過酸化を引き起こす系であり、生体内での酵素的脂質過酸化の抑制を評価できると考えられる。NADPHの存在下でミクロソームの酵素(NADPH-シトクロムP-450レダクターゼ)によってADP-Fe<sup>3+</sup>のキレートから、反応性の高い[ADP-Fe<sup>3+</sup>-O<sub>2</sub>]複合体または[ADP-Fe<sup>2+</sup>-O<sub>2</sub>]複合体がつくられ、過酸化脂質の生成が促進される第一段階(ペルフィリルイオン依存開始反応)と、それに続く過酸化物の分解反応を、NADPHを基質として還元されてできたEDTA-Fe<sup>2+</sup>のキレートが促進すると考えられる第二段階(脂肪酸ヒドロペルオキシド依存開始反応)、および第三段階として脂質の自動酸化を経て、その最終過酸化生成物であるTBA反応物質が生成するという、大きく分けて3つの段階を経てミクロソームの膜脂質の過酸化反応が進むと考えられている<sup>18)</sup>。先のウサギ赤血球膜ゴースト系と比較したところ、杜仲茶または茶成分はラット肝ミクロソーム系でより強く活性を示しているところから、主にミクロソームの酵素が関与している第1段階の反応を抑制していることが推測される。さらに、上記の結果とは異なりゲニポシド酸が活性を示したことは、ゲニポシド酸が酵素反応になんらかの作用を及ぼした可能性が考えられる。

フローサイトメトリー法による細胞内過酸化物の生成抑制評価系は、前述の複数の系に比べて、細胞そのものを用いていることから、より生体に近い系と考えられる。焙煎後茶葉の熱水浸出液とゲニポシド酸の24時間細胞処理によって細胞内過酸化物の生成を抑制する効果が示されたことから、生体内において茶成分が十分に吸収されるならば、生体内の酸化ストレスを軽減する働きを持つ可能性が考えられる。しかし、焙煎前茶葉は他の系では抗酸化性を示しているものの、この系においては抑制効果がなかったことから、茶葉に含まれる後述のポリフェノールそのものでなく、むしろ焙煎により生成した反応物(メイラード反応によって生成した物質など)にその効果があることが考えられる。またゲニポシド酸に付いても、その構造からポリフェノール類にみられる抗酸化性の発揮とは異なるメカニズムでその作用を発現していることが推測される。

上記の結果を総合して考えると、それぞれの系で強弱はあるものの、大部分の系で焙煎の有無に関わらず杜仲茶葉熱水浸出液および熱水抽出物は比較的強い抗酸化性を示すことが確認された。しかし、熱水抽出後茶葉(茶殻)のヘキササン抽出物ではまったく活性を示さなかったことから、抗酸化性の本体は熱水中に抽出される成分であり、固有成分のゲニポシド酸の抗酸化性がほぼ見られなかったことよりゲニポシド酸以外の成分であることが考えられる。さらに細胞系以外では、焙煎前、焙煎後の杜仲茶の抗酸化性それほど大きな差が見られなかったことから、焙煎によって生じる褐変物質は杜仲茶の抗酸化性にそれほど大きく関与していないことが考えられる。

杜仲茶に含まれる成分については、中村らによって報告がなされている<sup>14)</sup>。それによると、イリドイドとして、ゲニポシド酸(geniposidic acid)、ゲニポシド(geniposide)、asperulosidic acid、deacetyl asperulosidic acid、aucubin、asperuloside、eucommiolの7種の化合物、フラボノイドとして、ケルセチン(quercetin)、quercetin 3-O-β-D-glc·pyrなどのケルセチン配糖体、及びケンフェロール(kaempferol)の配糖体がフェノールとして、プロトカテキユ酸(protocatechuic acid)、ピロガロール(pyrogallol)、p-trans-coumaric acid、クロロゲン酸(chlorogenic acid)、syringaresinol di-O-β-D-glc·pyrが報告されている。これらのうち、ケルセチンやその配糖体はその構造から高い抗酸化性を発揮することが考えられ、これらが相加的あるいは相乗的に杜仲茶の抗酸化性に寄与しているのではないかと考えられる。

杜仲茶葉熱水抽出物の抗酸化性については、これまでもモルモットに胃粘膜傷害を引き起こす系<sup>15)</sup>、DPPHラジカル捕捉活性<sup>16)</sup>、コメットアッセイ<sup>17)</sup>などが報告されている。これらの結果はいずれも杜仲茶の水溶性成分がラジカルを強く捕捉する活性を持ち、それによって抗酸化性を発揮するとしており、本研究の結果とも一致するものである。

これらの結果を踏まえ、今後、杜仲茶に含まれる抗酸化物質が杜仲茶の飲用の結果どの程度生体内に吸収され、代謝されていくのか、さらに他の茶飲料に比べ、杜仲茶特有の効果とは何か、その詳細を明らかにしていく必要があると考えられる。

本研究を遂行するにあたり、杜仲茶研究に関してさまざまなご助言をいただきました小林製薬株式会社中央研究所、焙煎前茶葉および熱水抽出後杜仲茶葉サン

ブルをご提供いただきました日立造船バイオ株式会社, フローサイトメトリー法についてご指導をいただきました名古屋大学生命農学研究科内田浩二博士, 岡山大学大学院自然科学研究科中村宜督博士, 山口県立大学看護栄養学部故森口覚教授に心より感謝申し上げます。

#### 参 考 文 献

- 1) 難波恒雄, 疲れたら杜仲でいっぷく, ハート出版 (1994).
- 2) Charles J. S., Ravikumar P.R., Huang F.C.: Isolation and Synthesis of Pinoresinol Diglucoside, a Major Antihypertensive Principle of Tu-Chung (*Eucommia ulmoides*, Oliver) , *J.Am.Chem.Soc.*, **98**, 5412-5413 (1976).
- 3) Deyama, T., Ikawa, T., Kitagawa, S., Nishibe, S.: The Constituents of *Eucommia ulmoides* OLIV. III. Isolation and Structures of Three New Lignan Glycosides, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 523-527 (1986).
- 4) 難波恒雄, 服部征雄, 葉加南, 馬永華, 野村靖幸, 金子周司, 北村佳久, 小泉保, 片山和憲, 盧禕: 杜仲茶の研究 (I) 水抽出画分の一般薬理作用. 和漢医薬会誌, **3**, 89-97 (1986).
- 5) 仲佐輝子, 山口真由美, 沖中靖, 目鳥幸一, 高橋集七: 高脂肪高コレステロール食投与ラットの血漿および肝臓中の脂質に及ぼす杜仲茶抽出液の影響, 日本農芸化学会誌, **69**, 1491-1498 (1995).
- 6) 安藤真美, 原田和樹, 田村良行: ケミルミネッセンス法による中国茶浸出液の抗酸化能測定, 食品工業, **45**, 44-47 (2002).
- 7) 増田俊哉, 小山保夫, 稲葉譲, 戸井由紀子, 荒田智祐, 武田美雄, 中本勝男, 國永秀樹, 西里さおり, 野中亮: 沖縄産食薬植物エタノール抽出物の抗酸化関連活性, 日食工誌, **49**, 652-661 (2002).
- 8) Tsuda, T., Watanabe, M., Oshima, K., Norinobu, S., Choi, S.W., Kawakishi, S., Osawa, T.: Antioxidative Activity of the Anthocyanin Pigments Cyanidin 3-O-beta-D-Glucoside and Cyanidin, *J Agric Food Chem*, **42**, 2407-2410 (1944).
- 9) Osawa, T., Ide, A., Su, J. D., Namiki, M. Inhibition of *in vitro* lipid peroxidation by ellagic acid, *J Agric Food Chem*, **35**, 808-812 (1987)
- 10) *Methods in Enzymology*, Biomembranes Part D: Biological Oxidations Mitochondrial and Microbial Systems. Vol LIII, Academic Press, New York, p.306 (1978).
- 11) 川岸舜朗: 生物化学実験法38食品中の生体機能調節物質研究法, 学会出版センター, 東京, p.18 (1996).
- 12) Feng, Q., Kumagai, T., Torii, Y., Nakamura, Y., Osawa, T., Uchida, K.: Anticarcinogenic Antioxidants as Inhibitors Against Intracellular Oxidative Stress, *Free Radic. Res.*, **35**, 779-788, (2001).
- 13) 栢木善朗: FACSによるperoxidesの分析, 細胞工学別冊 実験プロトコールシリーズ 活性酸素実験プロトコール, 第2版, 秀潤社, 東京, pp. 50-54 (1995).
- 14) Nakamura, T., Nakazawa, Y., Onizuka, S., Satoh, S., Chiba, A., Sekihashi, K., Miura, A., Yasugahira, N., Sasaki, Y.: Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves) : 1. The Clastogen-Suppressing Effects of Tochu Tea in CHO Cells and Mice, *Mutat Res*, **388**, 7-20 (1997).
- 15) Yang, J., Kato, K., Noguchi, K., Dairaku, N., Koike, T., Iijima, K., Imatani, K., Sekine, H., Ohara, S., Sasano, H., Shimosegawa, T.: Tochu (*Eucommia ulmoides*) Leaf Extract Prevents Ammonia and Vitamin C Deficiency Induced Gastric Mucosal Injury. *Life Sci*, **73**, 3245-3256 (2003).
- 16) Cho, E.J., Yokozawa, T., Rhyu, D.Y., Kim, S.C., Shibahara, N., Park, J. C.: Study on The Inhibitory Effects of Korean Medicinal Plants and Their Main Compounds on The 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl Radical. *Phytochemistry*, **10**, 544-551 (2003).
- 17) Yen, G.C. and Hsieh, C.L.: Inhibitory effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. on Oxidative DNA Damage in Lymphocytes Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Teratog. Carcinog. mutagen.*, **23**, 23-34 (2003).
- 18) 中村良, 川岸舜朗, 渡邊乾二, 大澤俊彦: 食品機能化学, 三共出版, 東京, pp.89-90 (1991).