

博士學位論文

抹茶の品質と機能性に関する研究

2017年

中村 衣里

目次

緒論	1
----	---

第1章 抹茶の品質と含有成分

1.1 はじめに	3
1.2 実験方法	4
1.2.1 試薬	4
1.2.2 試料	4
1.2.3 試料調製方法	4
1.2.4 抹茶の主要遊離アミノ酸含量の定量	5
1.2.5 抹茶の総ポリフェノール量の定量	6
1.2.6 抹茶の主要カテキン含量の定量	6
1.2.7 統計処理	7
1.3 結果	8
1.3.1 抹茶の主要遊離アミノ酸含量の定量	8
1.3.2 抹茶の総ポリフェノール量の定量	12
1.3.3 抹茶の主要カテキン含量の定量	14
1.4 考察	18

第2章 抹茶の糖質消化吸收抑制作用

2.1 はじめに	20
2.2 実験方法	21
2.2.1 試薬	21
2.2.2 試料	21
2.2.3 試料調製方法	22
2.2.4 粗酵素溶液の調製	22
2.2.5 α -グルコシダーゼ活性阻害作用の測定	22
2.2.6 実験動物	23
2.2.7 胃・門脈カテーテル留置法	23
2.2.8 品質の異なる抹茶の糖質消化吸收抑制作用の比較	25

2.2.9	ヒト試験における抹茶摂取量の推定	25
2.2.10	ヒト試験対象者	25
2.2.11	ヒト試験用試料	25
2.2.12	健常人におけるヒト試験	28
2.2.13	統計処理	28
2.3	結果	29
2.3.1	品質の異なる抹茶の α -グルコシダーゼ活性阻害作用の比較	29
2.3.2	品質の異なる抹茶の糖質消化吸収抑制作用の比較	31
2.3.3	ヒト試験における抹茶摂取量の推定	33
2.3.4	ヒト試験における抹茶パン摂取による食後血糖値に与える影響	34
2.4	考察	35

第3章 抹茶の脂質消化吸収抑制作用

3.1	はじめに	39
3.2	実験方法	40
3.2.1	試薬	40
3.2.2	試料	40
3.2.3	試料調製方法	40
3.2.4	抹茶の膵リパーゼ活性阻害作用の測定	41
3.2.5	抹茶の脂質吸着試験	41
3.2.6	実験動物	41
3.2.7	胃・鎖骨下静脈カテーテル留置法	42
3.2.8	抹茶の脂質消化吸収抑制作用	44
3.2.9	統計処理	44
3.3	結果	45
3.3.1	抹茶の膵リパーゼ活性阻害作用	45
3.3.2	抹茶の脂質吸着試験	46
3.3.3	抹茶の脂質消化吸収抑制作用	47
3.4	考察	51

第4章 抹茶のタンパク質消化吸収抑制作用

4.1	はじめに	54
-----	------	----

4.2 実験方法	55
4.2.1 胃・門脈カテーテル留置ラットを用いたタンパク質消化吸収機能	
評価実験モデルの作成	55
4.2.1.1 試薬	55
4.2.1.2 試料	55
4.2.1.3 試料調製方法	55
4.2.1.4 実験動物	55
4.2.1.5 胃・門脈カテーテル留置法	55
4.2.1.6 胃・門脈カテーテル留置ラットによるタンパク質消化吸収機能	
評価モデルの開発	55
4.2.2 抹茶がタンパク質消化吸収に与える影響	56
4.2.3 抹茶抽出物がタンパク質消化吸収に与える影響	56
4.2.3.1 血液処理方法	56
4.2.3.2 血中遊離アミノ酸濃度の測定	56
4.2.3.3 統計処理	56
4.3 結果	58
4.3.1 胃・門脈カテーテル留置ラットを用いたタンパク質消化吸収機能	
評価実験モデルの作成	58
4.3.2 抹茶がタンパク質消化吸収に与える影響	61
4.3.3 抹茶抽出物がタンパク質消化吸収に与える影響	63
4.4 考察	65
総括	68
謝辞	73
文献	74
論文リスト	79

緒論

茶はツバキ科に属する常緑樹の葉から作られ、コーヒー、ココアとともに世界三大嗜好飲料の1つである。そのなかでも緑茶は古くから日本人に親しまれており、1988年にペットボトル茶が発売されて以来¹⁾、茶の需要は大幅に高まっている。また、茶は飲料としてだけでなく、茶葉そのものを加工して料理に利用することが出来、なかでも抹茶は、色の美しさや風味付け、入手や利用が容易なため、最近では料理や菓子類への利用が広まっている。また、茶が重要な嗜好飲料として発展した最大の原動力は、茶特有の化学成分、すなわちポリフェノールであるカテキン類、カフェイン、テアニンなどを含有しているためである。

茶カテキンの主要成分は、(-)-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) の4種類であり²⁾、これまでに血糖上昇抑制作用³⁾、抗糖尿病作用⁴⁾、抗肥満作用⁵⁾、血圧上昇抑制作用⁶⁾、抗腫瘍作用⁷⁾、動脈硬化抑制作用⁸⁾、抗アレルギー効果⁹⁾など様々な疾病予防機能を有することが報告されている。そのため、抹茶は日本人が抵抗なく摂取できる機能性食品として位置づけられている。

緑茶の品質評価は、一般に官能審査により行われており、味や香り、色などの品質により、価格にも大きな開きがある。近年では、緑茶の品質を客観的に評価する試みも数多くなされており、上級なほど全窒素量や遊離アミノ酸量が多いと言われているが、必ずしも全窒素量や遊離アミノ酸量が緑茶の価格に反映されておらず、緑茶の品質はアミノ酸の旨味や甘味だけでなく、カテキンの渋味なども重要な要素になっているものと考えられる。

このように、緑茶の品質や含有成分、機能性に関して多くの知見が報告されているが、抹茶の品質や含有成分、機能性に関する研究報告はほとんど無い。

そこで、本研究では抹茶の品質と含有成分との関係について検討し、さらに抹茶の機能性評価を行った。

第1章では、抹茶の品質と含有成分との関係について検討した。すなわち、3社(A~C社)の茶舗から品質(価格)の異なる抹茶を5種類ずつ購入し、フォーリン・チオカルト法により総ポリフェノール量、HPLCにより主要カテキン含量および主要アミノ酸含量を測定し、抹茶の品質(価格)と含有成分との関

係について、相関係数を算出して検討した。

第2章では、抹茶の糖質消化吸収抑制作用について検討した。第1章により、品質の異なる抹茶では、カテキン類をはじめ含有成分に大きな差があることが明らかとなったため、はじめに品質の異なる抹茶の糖質消化吸収抑制作用を比較した。すなわち *in vitro* 実験において、3社の最も品質（価格）の高い抹茶および最も品質（価格）の低い抹茶を用いて、糖質消化酵素である α -グルコシダーゼ（スクラーゼ（EC3.2.1.48）およびマルターゼ（EC3.2.1.20））活性阻害作用を測定したのち、胃・門脈カテーテル留置ラットにより糖質消化吸収抑制作用を比較した。次に、抹茶含有菓子パン（以下抹茶パン）によるヒト試験を行った。すなわち、胃・門脈カテーテル留置ラットにより、食後過血糖治療薬であるアカルボースおよび抹茶の糖質消化吸収抑制作用を比較し、抹茶パンに添加する抹茶量を推定したのち、抹茶パンを調製し、抹茶パン摂取後の健常人の食後血糖値に与える影響について検討した。

第3章では、抹茶の脂質消化吸収抑制作用について検討した。はじめに *in vitro* 実験において、脂質消化酵素である腓リパーゼ（EC3.1.1.3）活性阻害作用を測定した。抹茶は抽出液を飲用する緑茶と異なり、茶葉ごと摂取するため、茶葉中の食物繊維が消化吸収に影響を与える可能性が考えられる。そこで次に、試験管内試験において、抹茶の脂質吸着率を測定した。さらに、胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラットを用いて、ラットにおける脂質消化吸収抑制作用について検討した。

第4章では、抹茶のタンパク質消化吸収抑制作用について検討した。これまでにタンパク質の消化吸収について、血中アミノ酸濃度を指標として直接的に評価している報告は皆無である。これは、血中アミノ酸濃度を指標としてタンパク質の消化吸収を評価する場合、肝臓における代謝を受ける前のアミノ酸濃度を測定する必要があるが、門脈血を経時的に採取することは技術的に困難であることが原因である。そこで当研究室で開発した胃・門脈カテーテル留置ラットを用いて、タンパク質の消化吸収を評価できるか否かについて検討した。さらに、抹茶懸濁液および抹茶抽出物懸濁液がタンパク質の消化吸収に与える影響について検討した。

第1章 抹茶の品質と含有成分

1.1 はじめに

茶の品質評価は官能審査により行われており、審査基準は外観、香気、水色、滋味であり、抹茶の原料である碾茶の場合はこれに「から色」が加わる。官能審査が行われた抹茶は、品質により濃茶用、薄茶用、稽古用および料理用などに分類され、価格にも大きな開きがある。緑茶の茶葉中には、カテキン類、アミノ酸類、カフェイン、糖類、有機酸などが含まれており、これらの成分が複雑に影響し合うことで独特の味が形成されている。

緑茶の品質評価においては、旨味・甘味が強く、渋味・苦味の少ないものが高品質であるとされているが、近年では品質をより客観的に判定できるように茶の化学成分と品質の関係に関する研究が行われている。向井ら¹⁰⁾は、煎茶の品質（価格）と全窒素量および全遊離アミノ酸量の関係について検討し、煎茶の品質と全窒素量および全遊離アミノ酸量は正の相関関係にあること、また遊離アミノ酸の中でもテアニン量とアルギニン量は広い価格帯で正の相関関係を示すことを報告している。桑野ら¹¹⁾も市販緑茶の価格と含有成分の相関について検討し、緑茶の価格は旨味成分であるテアニン量と正の相関関係にあることを報告している。緑茶の品質とカテキンとの関係については、後藤ら¹²⁾が市販価格の高い緑茶ほど、カテキン総量が少なくなることを報告している。

一方、抹茶の原料である碾茶の品質と含有成分の関連性については、辻ら¹³⁾が官能審査評点と化学成分含有量の関係について検討し、一般生産茶、品評会出品茶ともに全窒素量および遊離アミノ酸量と各審査項目との間で高い正の相関関係を示すものの、品評会出品茶の中位以上の碾茶では、これらの成分が官能審査で評価できる上限以上に達しているものと考え、品質と化学成分の関係が不明瞭になると報告している。

このように、緑茶については、品質と構成成分との関係に関して多くの知見が報告されているが、抹茶の品質と構成成分との関係についての報告はほとんど無く、抹茶の品質と構成成分との関係性については明らかにされていない。

そこで本研究では、品質（価格）の異なる抹茶の主要遊離アミノ酸含量、総ポリフェノール量および主要カテキン含量を測定し、抹茶の品質と含有成分との関係について検討した。

1.2 実験方法

1.2.1 試薬

L-アスパラギンおよびアミノ酸混合標準液 H 型は、和光純薬株式会社のアミノ酸自動分析用を使用した。没食子酸一水和物は和光純薬株式会社製の一級品を使用した。(-)-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) および o-フタルアルデヒド (OPA) は、和光純薬株式会社製の生化学用を使用した。OPA 溶液は、OPA0.01g を無水エタノール 250 μ L に溶解し、2-メルカプトエタノール 10 μ L および 0.01M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH9.5) 2.24mL 加えて混合したものを用いた。フォーリン・チオカルト試薬は、和光純薬株式会社製のものを使用した。その他の試薬は、特級品を用いた。

1.2.2 試料

抹茶は A 社、B 社および C 社の品質（価格）の異なる銘柄のものを、各社 5 種類ずつ用いた（表 1-1）。

表 1-1. 抹茶の価格と銘柄

A 社		B 社		C 社	
銘柄	価格 (円/100g)	銘柄	価格 (円/100g)	銘柄	価格 (円/100g)
A-1	21,600	B-1	36,000	C-1	10,800
A-2	11,610	B-2	25,200	C-2	2,700
A-3	6,210	B-3	10,800	C-3	2,430
A-4	5,130	B-4	5,400	C-4	2,160
A-5	2,160	B-5	2,880	C-5	1,350

1.2.3 試料調製方法

抹茶 1.0g に対し 40 倍量の熱水を加え 30 分間攪拌抽出後、3,000r.p.m. で 10 分間遠心分離し、その上清を抹茶抽出液とした。

1.2.4 抹茶の主要遊離アミノ酸含量の定量

遊離アミノ酸含量は、OPAにより誘導体化した後、蛍光検出器付 HPLC により測定した¹⁴⁾。すなわち、抹茶抽出液を 0.45 μm フィルターで濾過し得られた濾液 20 μL に、0.01M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH9.5) 20 μL および OPA 溶液 20 μL を加えて混合し、4°C で 1 分間反応させたものを直ちに HPLC に供した。なお、緑茶に含まれる遊離アミノ酸のうち、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-グルタミン酸、L-アルギニンおよび L-テアニンで全遊離アミノ酸の 90% 以上を占める^{10,15)} ことから、これら 6 種類のアミノ酸の合計量を主要アミノ酸総量とした。HPLC は、表 1-2 に示した条件で測定した。

HPLC 装置は、送液ポンプ：S1-2/3201，オートサンプラー：S1-2/3020，カラムオーブン：S1-2/3014，UV-VIS 検出器：S1-2/3002 および蛍光検出器：S1-2/3213（いずれも株式会社資生堂製）を使用した。

表 1-2. 主要遊離アミノ酸含量定量の HPLC 分析条件

カラム	CAPCELL PAK C ₁₈ TYPE ; MG5 μm SIZE ; ϕ 3.0mm \times 150mm (株式会社資生堂)
移動相	A 液 ; 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) : メタノール : テトラヒドロフラン=95:4:1 B 液 ; 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) : メタノール=20:80
グラジエント	スタート時 A : B=100 : 0 からグラジエントをかけ、115 分後に A : B=0 : 100, 117 分後に A : B=100 : 0, 137 分後に A : B=100 : 0 となるよう溶出した。
流速	0.5 mL/分
カラムオーブン	30°C
注入量	10 μL
蛍光検出器	励起波長 340nm, 蛍光波長 460nm

1.2.5 抹茶の総ポリフェノール量の定量

総ポリフェノール量は、フォーリン・チオカルト法により測定した¹⁶⁾。すなわち、抹茶抽出液 0.5mL に 5 倍希釈フォーリン・チオカルト試薬 0.5mL を混合し 3 分間反応後、10%炭酸ナトリウム水溶液 0.5mL を混合し、さらに 1 時間反応させた後、750nm における吸光度測定をした。標準には没食子酸を用い、試料中のポリフェノール濃度を没食子酸相当量として算出した。

1.2.6 抹茶の主要カテキン含量の定量

主要カテキン含量は、抹茶抽出液を 0.45 μ m フィルターで濾過し得られた濾液を、HPLC に直接注入して測定した。分析条件は、表 1-3 に示した。なお、カテキン類としては、EC, EGC, ECG および EGCG の 4 種類を測定し、これらの合計量を主要カテキン総量とした。

表 1-3. 主要カテキン含量定量の HPLC 分析条件

カラム	CAPCELL PAK C ₁₈ TYPE ; MG5 μ m SIZE ; ϕ 4.6mm \times 250mm (株式会社資生堂)
移動相	A 液 ; 20mM リン酸二水素カリウム水溶液 B 液 ; アセトニトリル
グラジエント	スタート時 A : B=100 : 0 からグラジエントをかけ、20 分後に A : B=90 : 10, 25 分後に A : B= 85 : 15, 45 分後に A : B=75 : 25 となるよう溶出した。
流速	1.0 mL/分
カラムオーブン	40°C
注入量	10 μ L
測定波長	UV280nm

1.2.7 統計処理

実験データはすべて平均値±標準誤差で示した。各統計に関しては、4steps エクセル統計アドインソフト Statcel3（オーエムエス出版）を用いて解析を行った。

抹茶間の各種含有成分の比較は、Scheffe's F test の多重比較検定により行った。抹茶の価格と各種含有成分の相関は、ピアソンの相関係数を算出して検討した。

1.3 結果

1.3.1 抹茶の主要遊離アミノ酸含量の定量

抹茶 (A-5) の主要遊離アミノ酸の HPLC クロマトグラムを図 1-1 に示した。アスパラギン酸, アスパラギン, グルタミン, グルタミン酸, アルギニンおよびテアニンは, それぞれ 19.6 分, 22.2 分, 29.4 分, 30.7 分, 36.2 分および 45.4 分に溶出した。

A~C 社の各抹茶の主要アミノ酸含量を図 1-2 に示した。

A 社の抹茶のうち, 最も主要アミノ酸総量が高い銘柄は, 最も高品質な A-1 の $88.66 \pm 0.71 \text{ mg/g}$ であった。次いで A-2, A-3, A-4 の順で低下し, 最も主要アミノ酸総量が低い銘柄は, 最も低品質な A-5 の $40.12 \pm 0.61 \text{ mg/g}$ であった。

B 社の抹茶のうち, 最も主要アミノ酸総量が高い銘柄は, 最も高品質な B-1 の $82.91 \pm 0.95 \text{ mg/g}$ であり, 次いで B-2, B-3, B-4 の順で低下し, 最も主要アミノ酸総量が低い銘柄は, 最も低品質な B-5 の $29.77 \pm 0.85 \text{ mg/g}$ であった。

C 社の抹茶のうち, 最も主要アミノ酸総量が高い銘柄は, 最も高品質な C-1 の $62.25 \pm 0.65 \text{ mg/g}$ であり, 次いで C-3, C-2, C-4 の順で低下し, 最も主要アミノ酸総量が低い銘柄は, 最も低品質な C-5 の $27.14 \pm 0.29 \text{ mg/g}$ であった。

抹茶の主要遊離アミノ酸のうち, 最も含量が多い遊離アミノ酸はテアニンであり, 総量の約 50% を占めていた。次いで多い遊離アミノ酸はアルギニン, グルタミン酸, アスパラギンの順であった。

A 社および B 社の抹茶においては, 全ての遊離アミノ酸含量およびアミノ酸総量と抹茶の価格との間に, 正の相関関係が認められた。C 社の抹茶においては, アスパラギン酸, アスパラギン, グルタミン酸, アルギニン, テアニンおよびアミノ酸総量と抹茶の価格との間に, 正の相関関係が認められた (表 1-4)。

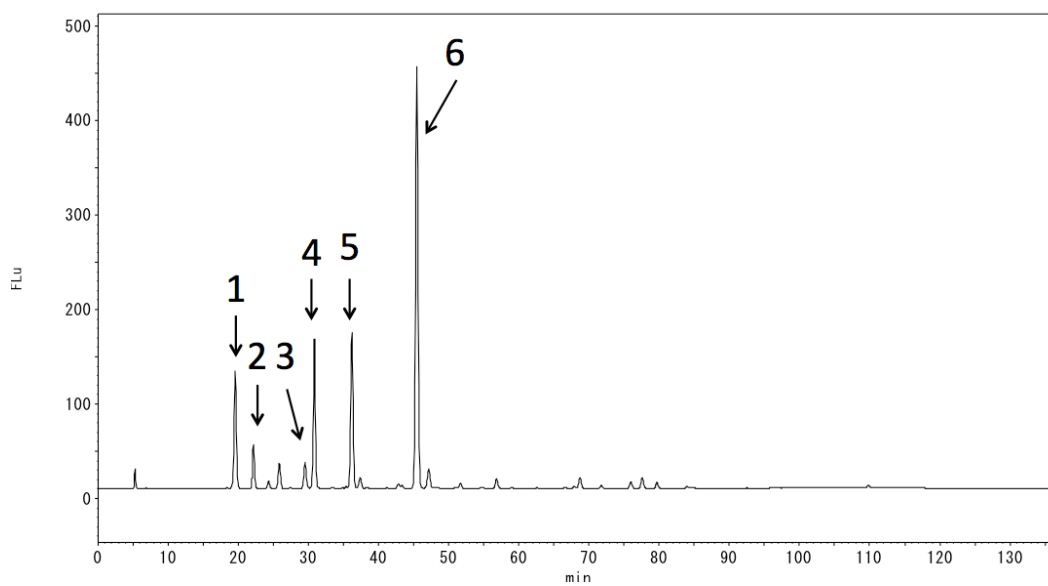
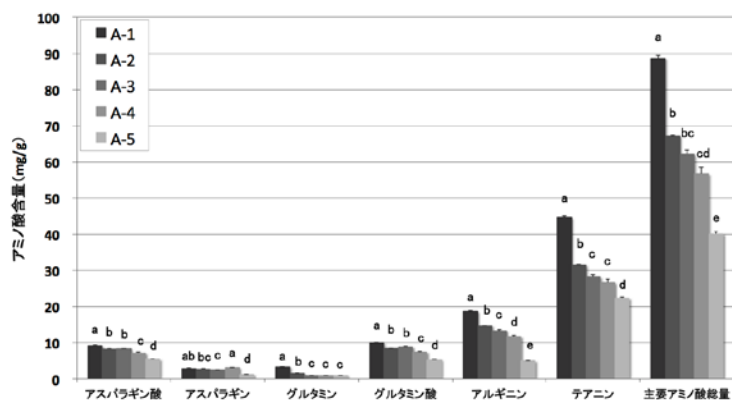
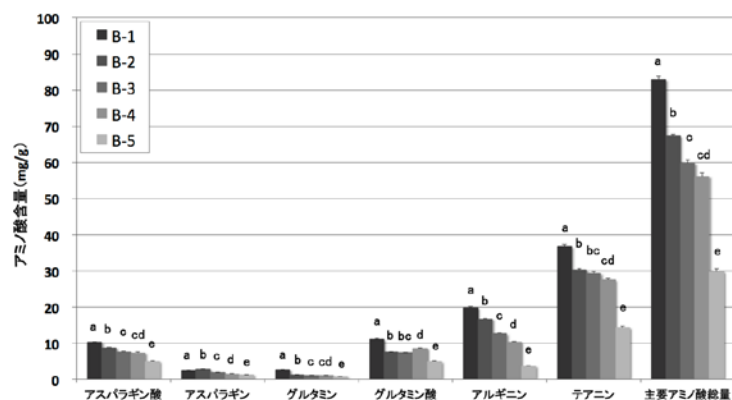


図 1-1. 抹茶 (A-5) の主要遊離アミノ酸の HPLC クロマトグラム
ピーク 1: アスパラギン酸, 2: アスパラギン, 3: グルタミン, 4: グルタミン酸, 5: アルギニン, 6: テアニン

A 社



B 社



C 社

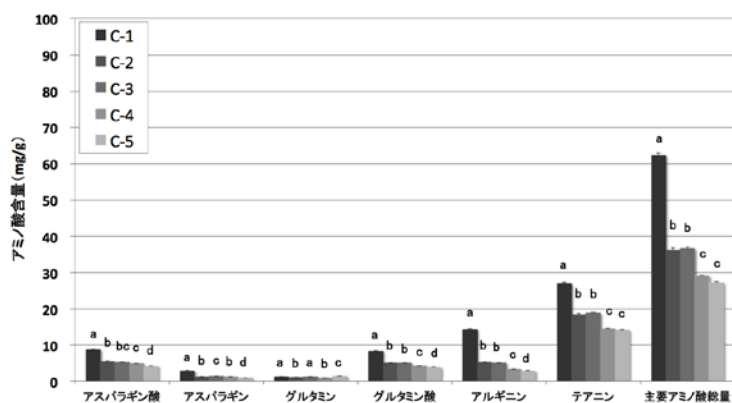


図 1-2. 抹茶の主要遊離アミノ酸含量
 $\text{mean} \pm \text{SE}$ (n=3)
 異なる英文字間は $p < 0.05$ で有意な差を示している

表 1-4. 主要遊離アミノ酸含量と抹茶の価格との相関係数

相関係数	A 社	B 社	C 社
アスパラギン酸	0.812	0.919	0.988
アスパラギン	0.522	0.880	0.989
グルタミン	0.967	0.892	-0.110
グルタミン酸	0.817	0.755	0.984
アルギニン	0.880	0.923	0.993
テアニン	0.987	0.802	0.941
主要アミノ酸総量	0.956	0.879	0.979

1.3.2 抹茶の総ポリフェノール量の定量

A~C社の各抹茶の総ポリフェノール量を図1-3に示した。

A社の抹茶のうち、最も総ポリフェノール量が低い銘柄は、最も高品質なA-1の 50.66 ± 0.39 mg/gであった。次いでA-2, A-3, A-4の順で高くなり、最も総ポリフェノール量が高い銘柄は、最も低品質なA-5の 73.36 ± 0.40 mg/gであった。

B社の抹茶のうち、最も総ポリフェノール量が低い銘柄は、最も高品質なB-1の 59.80 ± 0.09 mg/gであり、次いでB-2, B-3, B-4の順で高くなり、最も総ポリフェノール量が高い銘柄は、最も低品質なB-5の 78.91 ± 0.22 mg/gであった。

C社の抹茶のうち、最も総ポリフェノール量が低い銘柄は、最も高品質なC-1の 65.06 ± 0.30 mg/gであり、次いでC-2, C-4, C-3の順で高くなり、最も総ポリフェノール量が高い銘柄は、最も低品質なC-5の 81.26 ± 0.21 mg/gであった。

各社ごとに、総ポリフェノール量と抹茶の価格との関係を見たところ(表1-5), すべての会社において、総ポリフェノール量と抹茶の価格との間に負の相関関係が認められた。

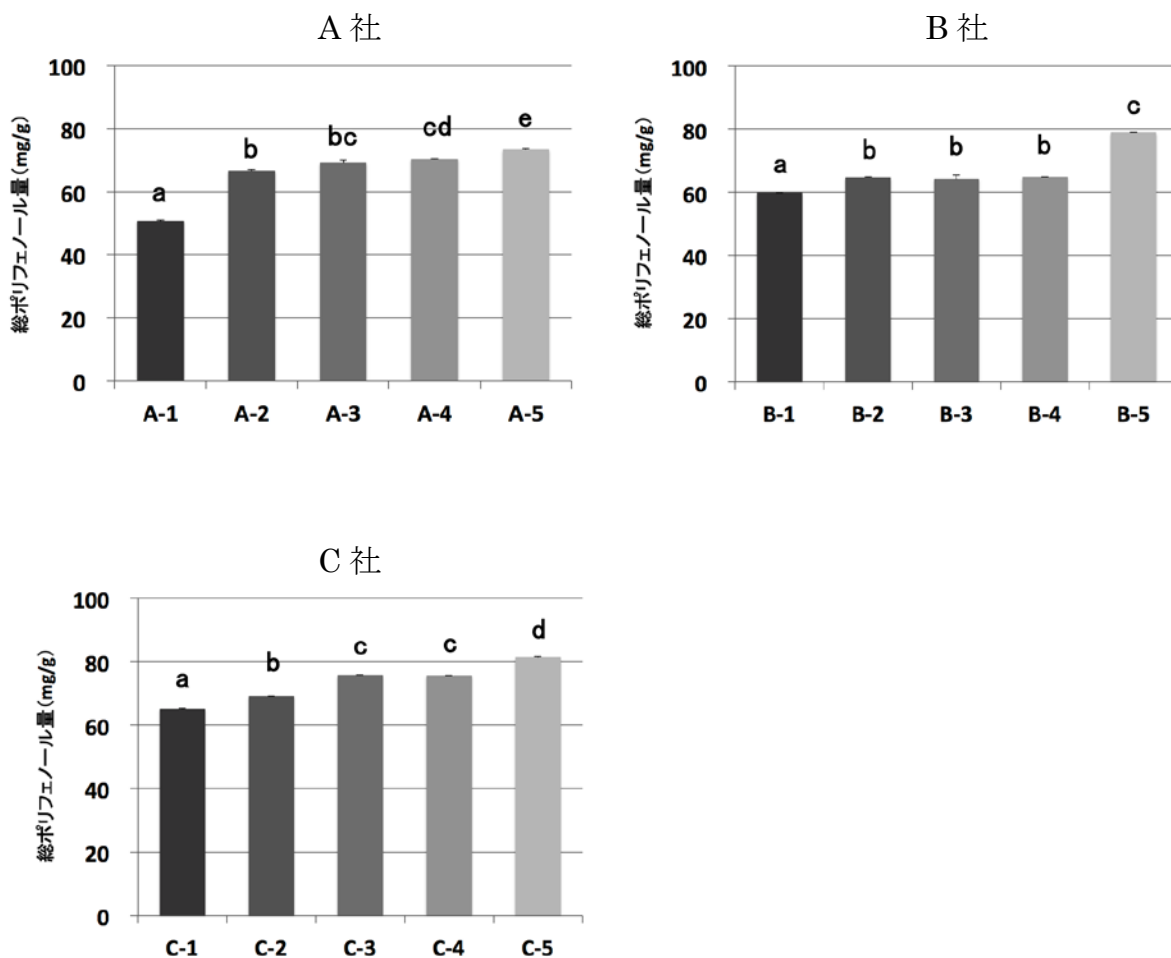


図 1-3. 抹茶の総ポリフェノール量
 mean ± SE (n=3)
 異なる英文字間は $p < 0.05$ で有意な差を示している

表 1-5. 総ポリフェノール量と抹茶の価格との相関係数

相関係数	A社	B社	C社
総ポリフェノール量	-0.976	-0.689	-0.805

1.3.3 抹茶の主要カテキン含量の定量

抹茶(A-5)の主要カテキンのHPLCクロマトグラムを図1-4に示した。EGC, EC, EGCG および ECG のピークは, それぞれ 26.1 分, 31.7 分, 32.1 分および 38.8 分に溶出した。

A~C 社の各抹茶の主要カテキン含量を図 1-5 に示した。

A 社の抹茶のうち, 最もカテキン総量が低い銘柄は, 最も高品質な A-1 の 21.20 ± 0.15 mg/g であった。次いで A-2, A-3, A-4 の順で高くなり, 最もカテキン総量が高い銘柄は, 最も低品質な A-5 の 34.81 ± 0.30 mg/g であった。

B 社の抹茶のうち, 最もカテキン総量が低い銘柄は, 最も高品質な B-1 の 24.36 ± 0.62 mg/g であり, 次いで B-2, B-3, B-4 の順で高くなり, 最もカテキン総量が高い銘柄は, 最も低品質な B-5 の 44.63 ± 0.40 mg/g であった。

C 社の抹茶のうち, 最もカテキン総量が低い銘柄は, 最も高品質な C-1 の 33.96 ± 0.34 mg/g であり, 次いで C-2, C-3, C-4 の順で高くなり, 最もカテキン総量が高い銘柄は, 最も低品質な C-5 の 45.79 ± 0.19 mg/g であった。

抹茶の主要カテキンのうち, 最も含量が多いカテキンは EGCG であり, 総量の約 40~50% を占めており, 次いで多いカテキンは EGC であった。

A 社および C 社の抹茶においては, EGC 含量, EC 含量, EGCG 含量およびカテキン総量と抹茶の価格との間に負の相関関係が認められた。B 社の抹茶においては, EGC 含量, EC 含量およびカテキン総量と抹茶の価格との間に負の相関関係が認められた (表 1-5)。

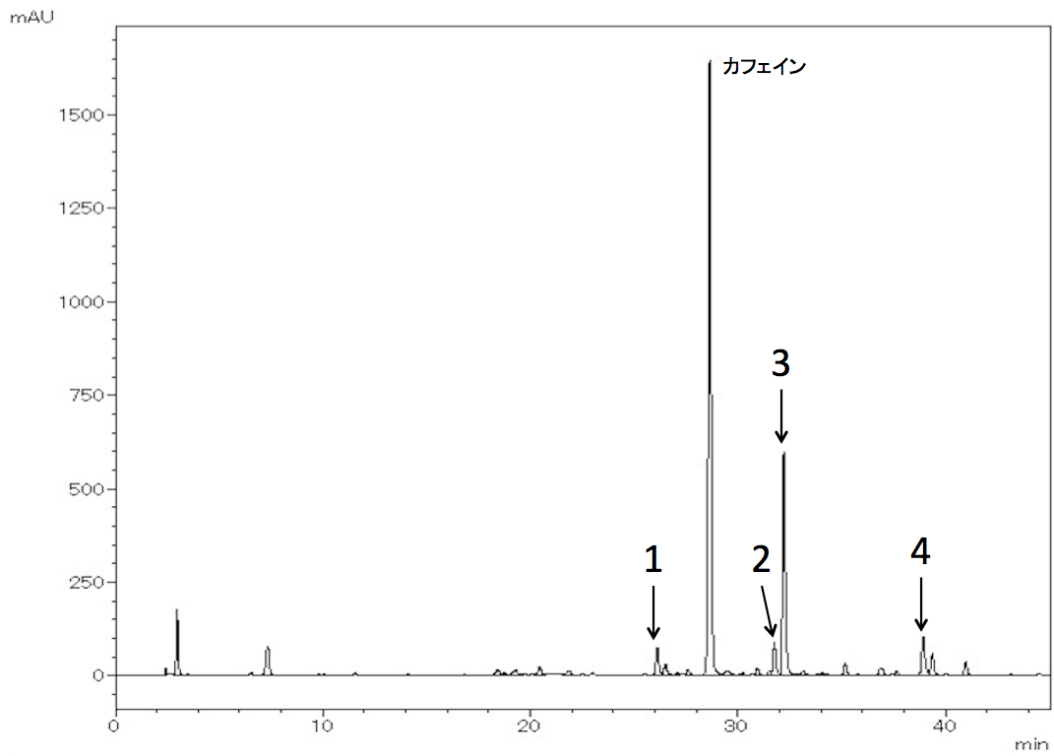


図 1-4. 抹茶 (A-5) の主要カテキンの HPLC クロマトグラム
ピーク 1 : EGC, 2 : EC, 3 : EGCG, 4 : ECG

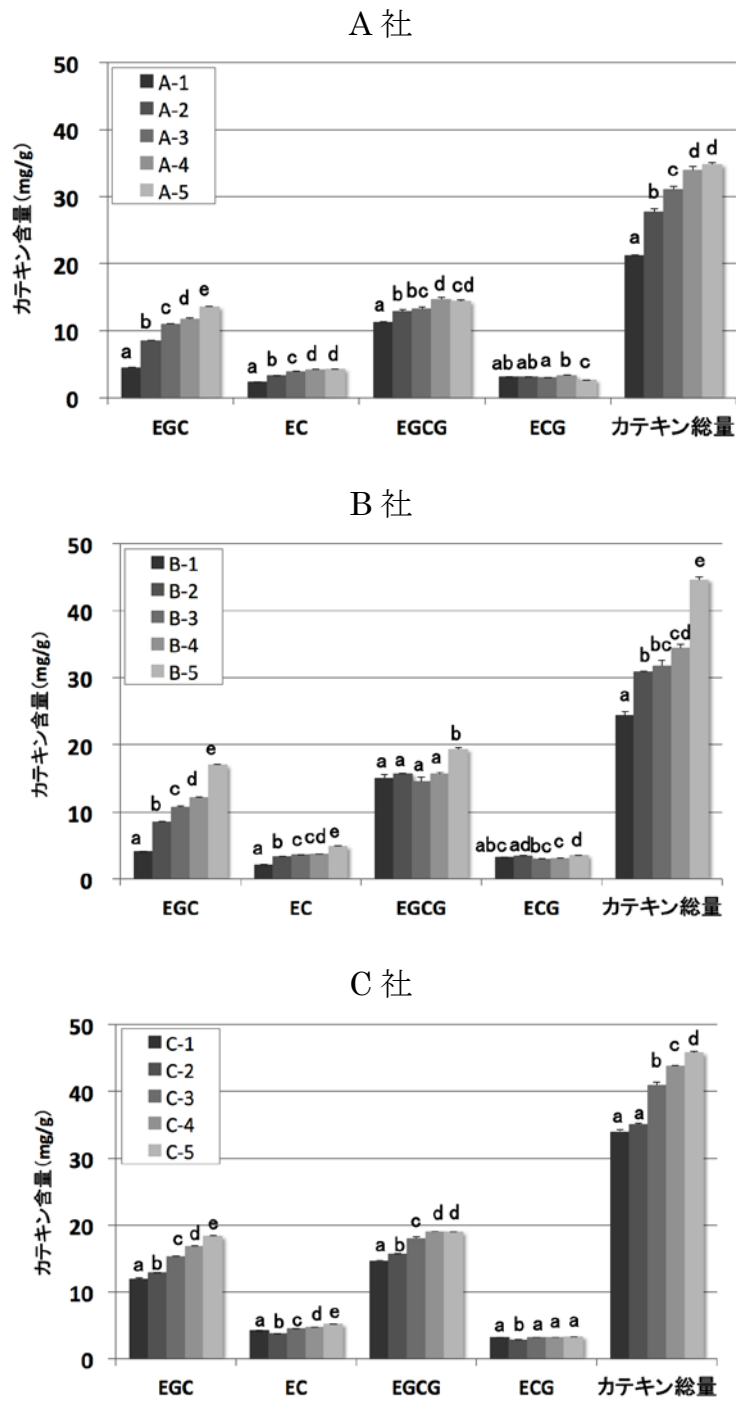


図 1-5. 抹茶の主要カテキン含量
 mean ± SE (n=3)
 異なる英文字間は $p < 0.05$ で有意な差を示している

表 1-5. 主要カテキン含量と抹茶の価格との相関係数

相関係数	A 社	B 社	C 社
EGC	-0.994	-0.934	-0.735
EC	-0.989	-0.893	-0.405
EGCG	-0.912	-0.484	-0.789
ECG	0.383	0.040	0.040
カテキン総量	-0.983	-0.844	-0.716

1.4 考察

本章では、抹茶の品質と含有成分との関係について検討した。抹茶の原料となる碾茶の品質評価が官能審査により行われていることから、審査員の個人差が生じる可能性が考えられた。そこで本研究では、この影響を最小限にするために同一茶舗の品質（価格）の異なる抹茶を用いて含有成分の比較を行った。また、茶舗は3社（A～C社）を選択し、各社の品質の異なる抹茶間での構成成分の差異を比較した。

まず抹茶の品質と遊離アミノ酸含量との関係について検討するため3社の抹茶の遊離アミノ酸含量を測定したところ、各社とも高品質な抹茶ほどテアニン、アルギニン、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン、アスパラギン酸などの遊離アミノ酸が多く含まれていた。A社およびB社の抹茶においては、全てのアミノ酸およびアミノ酸総量と抹茶の品質（価格）との間で、正の相関関係を示した。C社の抹茶においては、テアニン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸およびアミノ酸総量と抹茶の品質（価格）との間で、正の相関関係を示した。

池ヶ谷ら¹⁷⁾も価格の異なる抹茶の遊離アミノ酸含量を測定し、価格の高い抹茶ほど、テアニン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸などの遊離アミノ酸含量が多いことを報告している。アミノ酸は旨味や甘味成分であることから、遊離アミノ酸含量が多い抹茶ほど高品質であると評価されていると考えられた。

次に抹茶の品質と総ポリフェノール量およびカテキン含量との関係について検討するために、3社の抹茶の総ポリフェノール量およびカテキン含量を測定した。その結果、各社とも高品質な抹茶ほど、総ポリフェノール量、EGCG含量、EGC含量、EC含量およびカテキン総量が少なく、抹茶の品質との間に負の相関関係を示した。ポリフェノールやカテキン類は渋味や苦味成分であることから、ポリフェノールやカテキン類が多い抹茶ほど低品質であると評価されていると考えられた。

一方で、池ヶ谷ら¹⁷⁾は抹茶中のカテキン含量と価格の間に相関はないと報告している。この報告では、カテキン含量を酒石酸鉄吸光光度法により測定しているが、正確にはタンニン量を測定している¹⁸⁾ため、池ヶ谷らの結論と今回の結論の差は、測定項目の差によるものと考えられた。

以上の結果より、抹茶の品質の決定は、A～C社いずれにおいても、旨味や甘

味が多く渋味や苦味の少ない抹茶は高品質，旨味や甘味が少なく渋味や苦味の多い抹茶は低品質と判定されたものと推察され，これは抹茶に含まれる遊離アミノ酸含量，総ポリフェノール量およびカテキン含量が関与しているものと考えられた。

第2章 抹茶の糖質消化吸収抑制作用

2.1 はじめに

抹茶の品質評価は、一般に味や香り、色などの官能審査により品質が決められており、第1章では、高品質な抹茶には旨味や甘味成分の遊離アミノ酸含量が多く、渋味や苦味成分のポリフェノール量およびカテキン含量が少ないこと、その一方で、低品質な抹茶には旨味や甘味成分の遊離アミノ酸含量が少なく、渋味や苦味成分のポリフェノール量およびカテキン含量が多く含まれることが明らかとなった。

近年わが国では、食生活、運動習慣等の生活習慣の変化に伴い、糖尿病を始めとする生活習慣病が増加傾向にあり、生活習慣病の一次予防に重点が置かれるようになってきた。

茶、コーヒー、ココアは世界の三大嗜好飲料であり、そのなかでも緑茶は、古くから日本人に親しまれている嗜好飲料である。最近では緑茶の渋味成分である茶カテキンの機能性について注目されている。

茶葉（乾物）中には8～20%のカテキン類が含まれ、その主要成分は(-)-エピカテキン(EGC)、(-)-エピガロカテキン(EGCG)、(-)-エピカテキンガレート(EGCg)、(-)-エピガロカテキンガレート(EGCG)の4種類である²⁾。茶カテキン類の機能性については、これまでに血糖上昇抑制作用³⁾、抗肥満作用⁵⁾、血圧上昇抑制作用⁶⁾、抗腫瘍作用⁷⁾、抗アレルギー効果⁹⁾など様々な疾病予防機能を有することが明らかとされているため、これら茶カテキンの効能を期待して、カテキン含量を高めた特定保健用食品が高価で販売されている。

このように、緑茶については品質と構成成分の関係や構成成分の機能性に関して多くの知見が報告されている。一方、抹茶の品質と構成成分との関係についての報告は少なく、特に抹茶の品質、構成成分および機能性についての報告はほとんど無い。

そこで、胃・門脈カテーテル留置ラットを用いて、品質の異なる抹茶の糖質消化吸収抑制作用を比較した。すなわち、スクロースを持続投与したラットに、高品質な抹茶あるいは低品質な抹茶を投与し、門脈血中グルコース濃度の変化を測定することで、糖質消化吸収抑制作用を評価し、抹茶の品質と機能性との関係について検討した。

さらに、茶カテキン類は小腸粘膜のスクラーゼ活性やマルターゼ活性を強く抑制することが報告されており³⁾、砂糖のみならずデンプンなどの糖質を多く含む食品を摂取したときの血糖値の調節に適した機能性成分として、食品に応用できる可能性がある。

そこで、従来の菓子パンに比し血糖値の上昇を低く抑えることの出来る抹茶含有菓子パン（以下抹茶パン）の開発を試みた。すなわち、胃・門脈カテテル留置ラットにより、市販抹茶のスクロース消化吸収抑制作用を評価し、ヒトでの有効量の推定を行った。さらに、抹茶を含有する菓子パンを調製し、ヒト試験において血糖上昇抑制効果の検討を行った。

2.2 実験方法

2.2.1 試薬

スクロースおよびマルトースは、和光純薬工業株式会社の特級品を使用した。*in vitro* 実験における反応液中グルコース濃度の測定には、グルコース測定用キット（グルコース CII テストワコー：和光純薬工業株式会社）を用いた。血漿中グルコース濃度は、富士ドライケム 4000V、測定波長 505nm（富士フィルム株式会社）を使用して、富士ドライケムスライド GLU-PⅢを用いて酵素法（グルコースオキシダーゼ系）により測定した。アカルボースはバイエル薬品株式会社製のグルコバイ錠（1錠中アカルボース 100mg 含有）を用いた。

2.2.2 試料

品質の異なる抹茶の比較で用いた抹茶は、第 1 章で使用した 3 社（A, B, C 社）の抹茶のうち、各社の最も高品質な銘柄（A-1, B-1, C-1）および最も低品質な銘柄（A-5, B-5, C-5）を使用した。

ヒト試験における抹茶摂取量の推定およびヒト試験で用いた抹茶は、市販品の「羽衣（宇治の露製茶株式会社）」を用いた。市販抹茶の主要カテキン含量を、表 2-1 に示した。

表 2-1. 市販抹茶（羽衣）の主要カテキン含量

	(mg/g)
EGC	19.51±0.08
EC	4.37±0.01
EGCG	19.59±0.05
ECG	3.18±0.01
主要カテキン総量	46.65±0.04

mean ± SE (n=3)

2.2.3 試料調製方法

α -グルコシダーゼ活性阻害作用の試料調製方法は、1.2.3 に準ずる。

動物実験では、胃カテーテルを通過する粒径にするため、抹茶は粉碎器により 10 分間粉碎した後、熱水を加えて 10%抹茶懸濁液を調製した。アカルボースは 1 錠を水に懸濁して全量 10mL として用いた。

2.2.4 粗酵素溶液の調製

ラットを酸素・イソフルラン（導入期 2.5%，維持期 1.5%）混合ガス麻酔下に開腹し、腹大動脈採血法により脱血を行った。小腸は、Treitz 靱帯から回盲弁口側までの小腸を切断し、生理食塩水にて洗浄した。小腸を縦方向に切開した後、氷冷したシャーレ上で小腸粘膜表面をスライドガラスにてかきとり、重量を測定した。小腸粘膜の 4 倍量の生理食塩水を入れて 5 倍に希釈し、十分に混合後、氷中でホモジナイズした後、3,000r.p.m, 4°C, 15 分間遠心分離し、その上清を採取し粗酵素溶液とし、-80°Cで保存した。

2.2.5 α -グルコシダーゼ活性阻害作用の測定

酵素活性の測定は、各種抹茶抽出液 50 μ L に、50mM スクロースあるいはマルトース/50mM マレイン酸緩衝液 (pH6.0) を加えた後、粗酵素溶液をスクロースあるいはマルトースに対して 0.05units/mL を混合した。ただし、1units は 1 分間に 1.0 μ mol のスクロースあるいはマルトースを加水分解する酵素量と

した。対照としては、試料溶液と等量の蒸留水を用いた。酵素反応は 37℃、30 分で行い、生成したグルコース量をグルコース CII テストワコー（和光純薬工業株式会社）で測定した。酵素阻害活性は、次式により算出した。

阻害率 (%) = (1 - 各種抹茶抽出液添加時のグルコース生成量 / 対照のグルコース生成量) × 100

2.2.6 実験動物

4 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット (Slc : SD,SLC(株)) を購入し、室温 23 ± 1℃、湿度 55 ± 7%、明暗周期 12 時間 (明期 8:00 ~ 20:00) の条件下で飼育した。固形飼料 (MF; オリエンタル酵母工業株式会社) および水は自由に与え、3 週間予備飼育後、実験に供した。なお、本動物実験は「武庫川女子大学動物実験規定」に基づき設置された武庫川女子大学動物実験委員会の承認を得て、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年 4 月 28 日 環境省告示第 88 号) を遵守して行った。

2.2.7 胃・門脈カテーテル留置法¹⁹⁾

ラットを酸素・イソフルラン (導入期 2.5%, 維持期 1.5%) 混合ガス麻酔下に開腹し、胃に試料注入用カテーテル (ビニールチューブ : 内径 0.5mm, 外径 1.0mm), 門脈に採血用カテーテル (ポリエチレンチューブ : 内径 0.28mm, 外径 0.61mm, シリコンチューブ : 内径 0.5 mm, 外径 1.0 mm) を挿入留置した。これらのカテーテルの他端は、皮下トンネルを通して背部に出し、ハーネスおよび保護コイルを通し、試料注入用カテーテルはスイベルに接続した (図 2-1)。採血用カテーテルは血液凝固による閉塞を予防するため、ヘパリン加生理食塩水 (300 単位/mL) を充鎮した。施術後のラットはステンレス製代謝ケージ内で個別に飼育し、この間固形飼料 MF および水は自由に与えた。糖質消化吸収の評価実験は 16 時間絶食した後、無作為抽出にて 1 群 6 匹ずつ分けて行った。

酸素ガスは、グリーンテクノスより購入し使用した。イソフルランは、和光純薬株式会社製を用いた。感染予防としての抗生物質はペニシリン系抗生物質製剤ビクシリン (Meiji Seika ファルマ株式会社) を用いた。

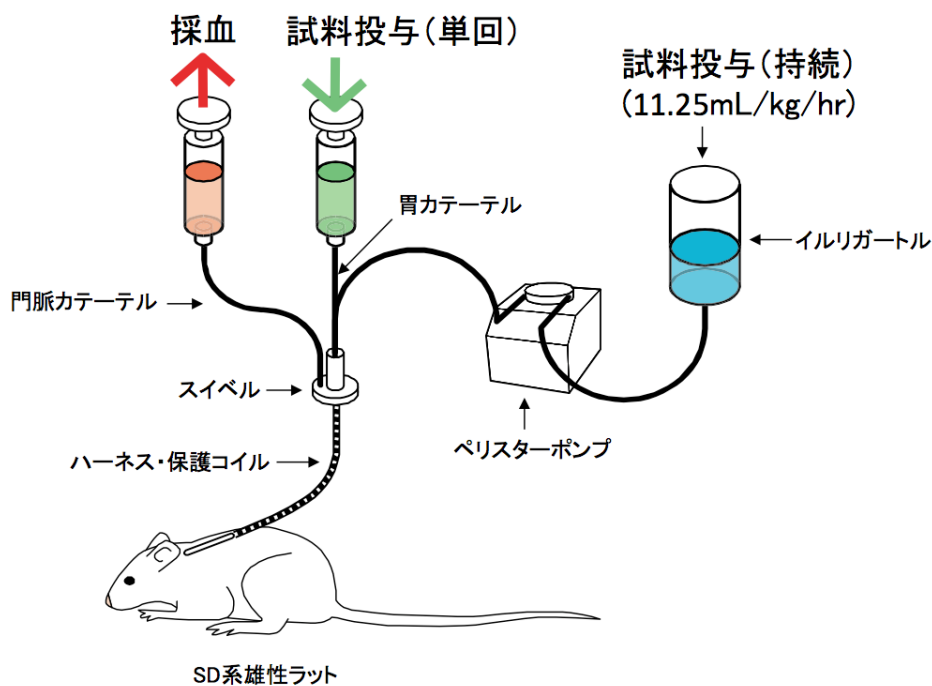
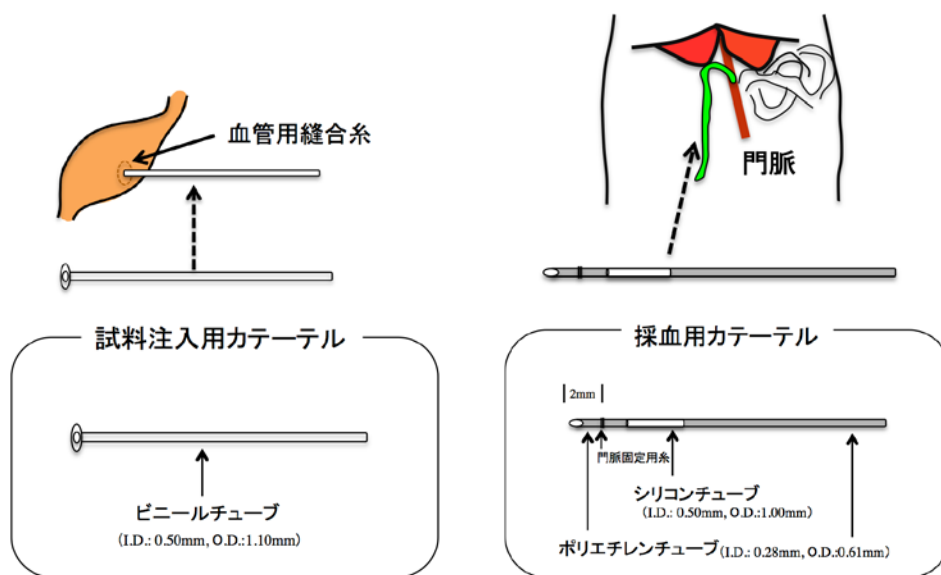


図 2-1. 胃・門脈カテーテル留置ラット

ラットを酸素・イソフルラン混合ガス麻酔下に開腹し、胃に試料注入用カテーテル、門脈にヘパリンを充鎮した採血用カテーテルを挿入留置した。これらのカテーテルの他端は、皮下トンネルを通して背部に出し、ハーネスおよび保護コイルを通し、試料注入用カテーテルはスイベルに接続した。

2.2.8 品質の異なる抹茶の糖質消化吸収抑制作用の比較

胃・門脈カテーテル留置ラットの試料注入用カテーテルより、15%スクロース水溶液をペリスターポンプにて 11.25mL/kg/hr の速度で持続的に投与した。門脈血中グルコース濃度は、持続投与開始 60 分以降に一定のレベルで維持されることから²⁰⁾、持続投与開始後 120 分に、10%抹茶懸濁液 (0.72g/kg) を試料注入用カテーテルより胃内に単回投与し、試料投与後、10 分おきに 60 分まで門脈カテーテルより門脈血 0.05mL を採取した。血液は、遠心分離して血漿とし、門脈血中グルコース濃度を測定した。

2.2.9 ヒト試験における抹茶摂取量の推定

胃・門脈カテーテル留置ラットの試料注入用カテーテルより、15%スクロース水溶液をペリスターポンプにて 11.25mL/kg/hr の速度で持続的に投与した。門脈血中グルコース濃度は、持続投与開始 60 分以降に一定のレベルで維持されることから²⁰⁾、持続投与開始後 120 分に、10%抹茶懸濁液 (0.72g/kg) あるいはアカルボース (0.024g/kg) を試料注入用カテーテルより胃内に単回投与し、試料投与後、10 分おきに 120 分まで門脈カテーテルより門脈血 0.05mL を採取した。血液は、遠心分離して血漿とし、門脈血中グルコース濃度を測定した。

糖質消化吸収抑制作用の評価方法は、試料投与前と投与後各時間帯の血中グルコース濃度を比較し、有意に低値を示した時間帯を作用持続時間とした。すなわち、対照医薬品として食後過血糖治療薬であるアカルボースの作用持続時間と抹茶の作用持続時間を測定し、アカルボース 1 錠に相当する抹茶の量を算出し、ヒト試験における抹茶摂取量を推定した。

2.2.10 ヒト試験対象者

対象者は、武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科に在籍する 4 年生とし、平成 24 年 5 月に実施した。試験実施にあたっては、ヘルシンキ宣言に基づき、試験の目的、方法、予想される効果および副作用、健康被害が発生した場合の治療および補償、結果の取り扱いに関する配慮を記載した文書を配布し、説明会を開催した後、本人の自由意志に基づく同意が得られた学生を対象とした。なお、本試験は武庫川女子大学倫理委員会の審議、承認を経て実施した。

2.2.11 ヒト試験用試料

ヒト試験では、抹茶パンを調製した。抹茶パンおよび対照パンの原材料を表 2-2 に示した。小麦粉は市販パン用強力粉（日清製粉）、酵母はインスタントドライイースト（サフ社）を用い、砂糖、塩、スキムミルク、無塩バターおよび全卵は、いずれも市販品を使用した。抹茶パンには、1 個あたり 0.75g の抹茶を添加し、無添加ものを対照パンとして用いた（写真 2-1）。製パンは、ストレート法により製造した（表 2-3）。なお、抹茶はフィリングに粉末のまま混入した。また、ニーディングには、ザ・ミキサー3005（ジャパンホームベーキングスクール）を用いて行った。抹茶パンおよび対照パンの栄養成分を表 2-4 に示した。なお栄養成分は、「五訂増補 日本食品標準成分表（2005）」を用いて算出した。

表 2-2. 抹茶パンおよび対照パンの材料

材料	抹茶パン	対照パン
パン生地		
強力粉	25.0g	25.0g
イースト	0.8g	0.8g
砂糖	2.5g	2.5g
塩	0.5g	0.5g
スキムミルク	1.3g	1.3g
無塩バター	2.5g	2.5g
全卵	3.8g	3.8g
水	13.3g	13.3g
フィリング		
無塩バター	1.3g	1.3g
砂糖	7.5g	7.5g
コーンスターチ	1.3g	1.3g
牛乳	12.5g	12.5g
抹茶	0.75g	-

パン 1 個分（1 人分）

抹茶パン



対照パン



写真 2-1. 抹茶パンおよび対照パン

表 2-3. 製パン方法

製法	条件・時間
ニーディング	20分
バター添加	ニーディング開始 10分後
一次発酵	30℃ 40分
ベンチタイム	10分
成型	三つ折り 2回
仕上げ発酵	35℃ 35分
焼成	200℃ 10分

表 2-4. 抹茶パンおよび対照パンの栄養成分

	抹茶パン	対照パン
エネルギー (kcal)	186	184
たんぱく質 (g)	4.8	4.5
脂質 (g)	4.5	4.5
炭水化物 (g)	30.8	30.5
ナトリウム (mg)	214	214

2.2.12 健常人におけるヒト試験

試験デザインは、クロスオーバー比較試験とし、被験者 10 名から無作為に 5 名を選出し、1 日目に抹茶パン、2 日目に対照パンを摂取させた。残り 5 名の被験者には、1 日目に対照パン、2 日目に抹茶パンを摂取させた。

被験者は、試験当日の朝食を絶食し、採血中は絶飲食とした。試験開始前に、ニプロランセット (30G, ニプロ株式会社) により採血し、血糖自己測定器 (ニプロフリースタイルフラッシュ, ニプロ株式会社) により血糖値を測定した。その後、抹茶パン 1 個あるいは対照パン 1 個を摂取させ、15 分、30 分、45 分、60 分、90 分および 120 分後に血糖値を測定した。

2.2.13 統計処理

実験データはすべて平均値±標準誤差で示した。各統計に関しては、4steps エクセル統計アドインソフト Statcel3 (オーエムエス出版) を用いて解析を行った。

品質の異なる抹茶における α -グルコシダーゼ活性阻害作用の比較および血中グルコース濃度の各時間帯の比較は、Student's-t 検定により行った。

ヒト試験における抹茶摂取量の推定の動物実験において、試料投与前と試料投与後の各時間の血中グルコース濃度比較には、Bonferroni/dunn の多重比較検定、ヒト試験では、各群同時刻の血糖値を、対応のある t 検定を用いて比較した。

2.3 結果

2.3.1 品質の異なる抹茶の α -グルコシダーゼ活性阻害作用の比較

ラット小腸粘膜由来のスクラーゼ活性あるいはマルターゼ活性に対する抹茶抽出液の阻害率を測定し、50%阻害濃度 (IC_{50}) を算出した (図 2-2~図 2-3)。スクラーゼ活性およびマルターゼ活性阻害作用は、すべての会社において、高品質な抹茶に比し、低品質な抹茶で強い阻害作用が認められた。

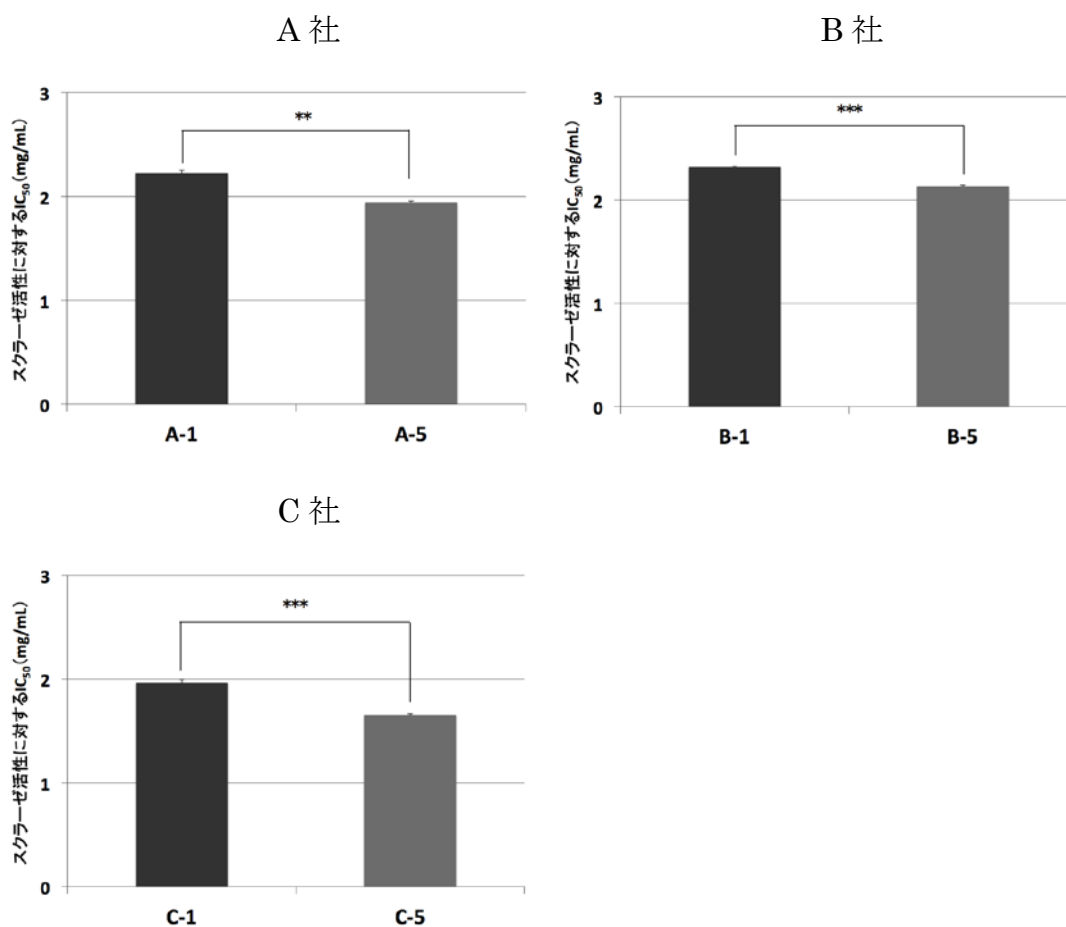


図 2-2. 抹茶のスクラーゼ活性に対する IC_{50}

抹茶抽出液 (対照: 蒸留水), 50mM スクロース溶液および 0.05units/mL 酵素溶液を混合し, 37°C, 30 分間反応させ, スクラーゼ活性阻害率を測定し, IC_{50} を算出した。

mean \pm SE (n=3), ** p <0.01, *** p <0.001

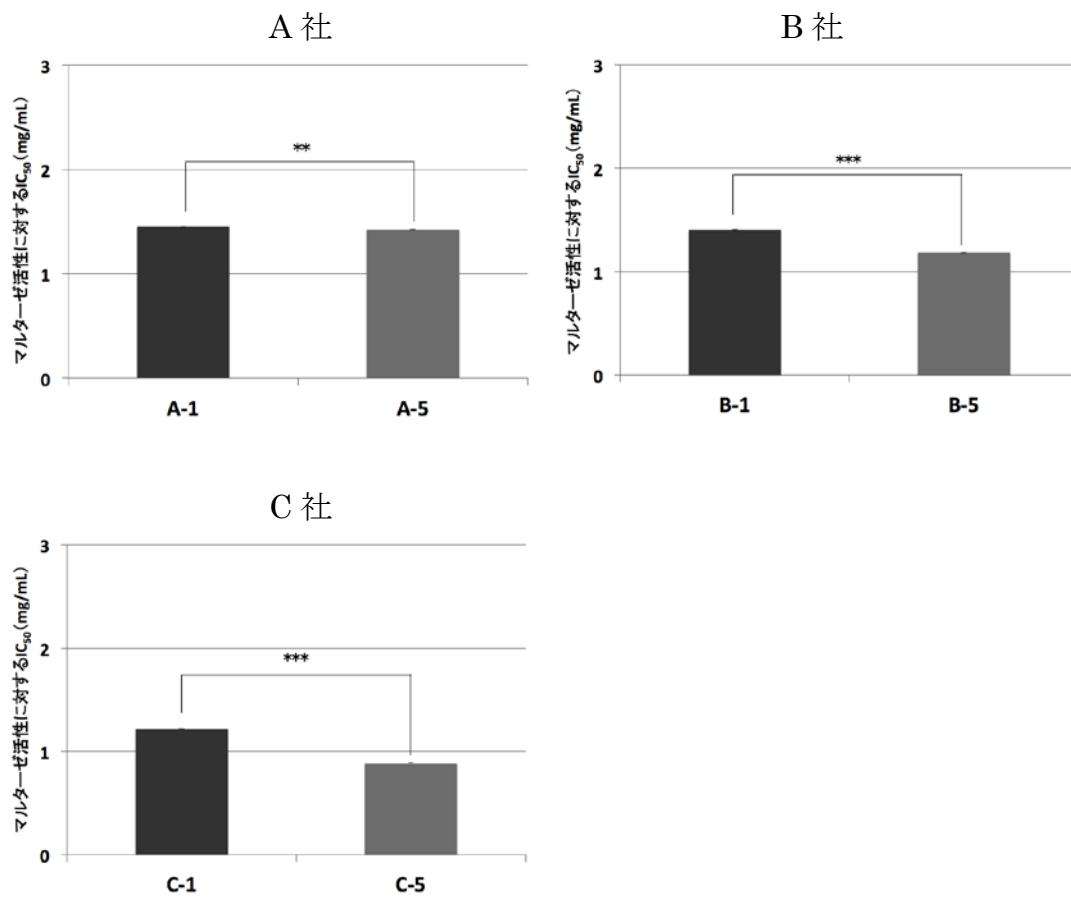


図 2-3. 抹茶のマルターゼ活性に対する IC₅₀

抹茶抽出液（対照：蒸留水），50mM マルトース溶液および 0.05units/mL 酵素溶液を混合し，37°C，30 分間反応させ，マルターゼ活性阻害率を求めて IC₅₀ を算出した。

mean ± SE (n=3), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

2.3.2 品質の異なる抹茶の糖質消化吸収抑制作用の比較

抹茶は、3社の最も高品質な銘柄（A-1, B-1, C-1）および最も低品質な銘柄（A-5, B-5, C-5）を使用し、胃・門脈カテーテル留置ラットにより糖質消化吸収抑制作用を比較した。15%スクロース水溶液を持続投与して門脈血中グルコース濃度が一定となったラットに、抹茶懸濁液を単回投与（0.72g/kg）した時の門脈血中グルコース濃度の変化を図 2-4 に示した。

A社の抹茶において、A-5の門脈血中グルコース濃度は、投与後10分および20分でそれぞれ 176 ± 3 mg/dL および 169 ± 3 mg/dL であり、それぞれA-1の 198 ± 9 mg/dL および 188 ± 7 mg/dL に比し、有意な低下が認められた。

B社の抹茶において、B-5の門脈血中グルコース濃度は、投与後20分で 170 ± 5 mg/dL と、B-1の 186 ± 5 mg/dL に比し有意に低値を示し、その後60分まで、B-5はB-1に比し、有意に低値を示した。

C社の抹茶において、C-5の門脈血中グルコース濃度は、投与後20分で 181 ± 6 mg/dL と、C-1の 200 ± 6 mg/dL に比し、有意に低値を示した。

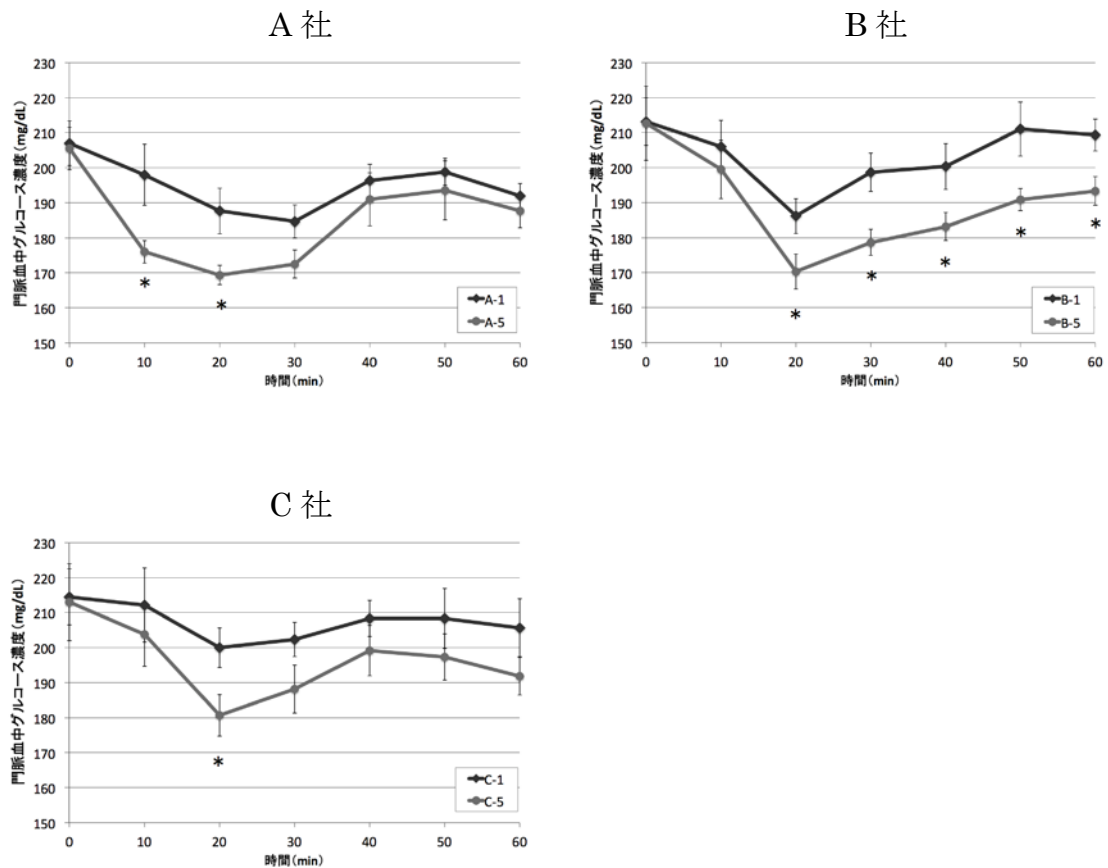


図 2-4. 品質の異なる抹茶の糖質消化吸収抑制作用の比較

胃・門脈カテーテル留置ラットに、15%スクロース水溶液を 11.25mL/kg/hr の速度で持続的に投与した。持続投与開始後 120 分に抹茶 (A-1, A-5, B-1, B-5, C-1 あるいは C-5) を胃内に単回投与 (0.72g/kg) した。抹茶投与後 10 分おきに 60 分まで採血を行い、門脈血中グルコース濃度を測定した。

mean ± SE (n=6), * $p < 0.05$

2.3.3 ヒト試験における抹茶摂取量の推定

抹茶およびアカルボースの糖質消化吸収抑制作用を胃・門脈カテーテル留置ラットにより評価した。すなわち、15%スクロース水溶液を持続投与して門脈血中グルコース濃度が一定となったラットに、抹茶を単回投与(0.72g/kg)した時の門脈血中グルコース濃度の変化を、食後過血糖治療薬であるアカルボース(0.024g/kg)と比較した。

その結果、アカルボース投与群では、投与後20分で $144 \pm 6 \text{mg/dL}$ と、投与前値の $169 \pm 4 \text{mg/dL}$ に比し、有意に低値を示し、その後110分まで投与前値に比し、有意に低値を示した。アカルボースの作用持続時間は100分であった。一方、抹茶投与群では、投与後10分で $135 \pm 5 \text{mg/dL}$ と、投与前値の $172 \pm 11 \text{mg/dL}$ に比し、有意に低値を示した。抹茶の作用持続時間は50分であった(図2-5)。

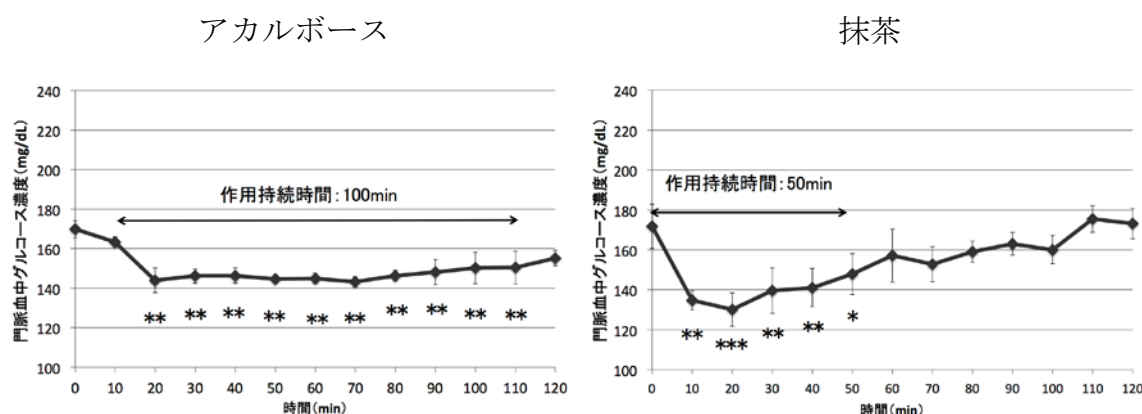


図 2-5. アカルボースおよび抹茶(羽衣)の糖質消化吸収抑制作用

胃・門脈カテーテル留置ラットに15%スクロース水溶液を 11.25mL/kg/hr の速度で持続的に投与した。持続投与開始後120分にアカルボース(0.024g/kg)あるいは抹茶(0.72g/kg)を胃内に単回投与した。試料投与後10分おきに120分まで採血を行い、門脈血中グルコース濃度を測定し、作用持続時間を算出した。

mean ± SE (n=6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. 0min

2.3.4 ヒト試験における抹茶パン摂取による食後血糖値に与える影響

健康人ボランティアを対象として、抹茶パン摂取後の血糖値の変化を測定した。その結果、抹茶パン摂取群では、摂取後 45 分および 60 分の血糖値はそれぞれ $141 \pm 3 \text{mg/dL}$ および $138 \pm 7 \text{mg/dL}$ で、対照パン摂取群の $165 \pm 6 \text{mg/dL}$ および $158 \pm 5 \text{mg/dL}$ に比し、いずれも有意に低値を示した (図 2-6)。

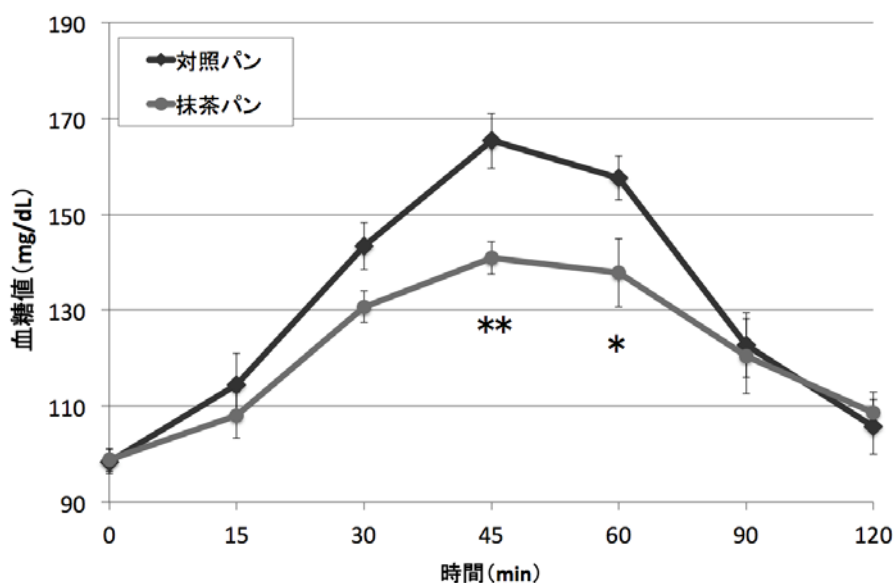


図 2-6. 抹茶パン摂取時の血糖値の経時的変化

健康人 10 名に抹茶パン (10 名) あるいは対照パン (10 名) を摂取させ、経時的に血糖値を測定した。 mean \pm SE (n=10), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2.4 考察

茶葉中に含まれる茶カテキン類には、血糖上昇抑制作用³⁾、抗肥満作用⁵⁾、血圧上昇抑制作用⁶⁾、抗腫瘍作用⁷⁾、抗アレルギー効果⁹⁾など様々な疾病予防機能を有することが報告されており、近年では健康志向食品の素材として注目されている。特に、碾茶を石臼で挽いて茶葉ごと摂取できる抹茶は、飲用のみならず菓子類や機能性食品など多方面に利用されている²¹⁾。

第1章では、抹茶に含まれる遊離アミノ酸やカテキン類、ポリフェノールなどの各種含有成分は、品質によって大きく異なることが明らかとなった。特に、茶の機能性成分であるカテキン類は、官能審査で低品質であると判定された抹茶に多く含まれることから、茶の機能性を活かした製品にはむしろ低品質と判定された抹茶を使用するほうが高い機能性をもつ製品になる可能性がある。

茶の機能性の一つである血糖上昇抑制作用は、*in vitro* 実験および動物実験において、茶カテキンにより糖類分解酵素である α -グルコシダーゼ活性（スクラーゼ活性およびマルターゼ活性）を阻害することが明らかにされている²²⁻²⁴⁾が、品質の異なる抹茶の糖質消化吸收抑制作用の比較を行った報告はない。

そこで本章では、品質の異なる抹茶の機能性の相違を比較することを目的として、*in vitro* 実験および胃・門脈カテーテル留置ラットを用いて、3社の最も高品質な抹茶（A-1, B-1, C-1）および最も低品質な抹茶（A-5, B-5, C-5）における、糖質消化吸收抑制作用を測定した。

まず、3社の高品質な抹茶と低品質な抹茶について、 α -グルコシダーゼ活性阻害作用を比較したところ、スクラーゼ活性およびマルターゼ活性阻害作用は、いずれの会社においても、カテキン含量の低い高品質な抹茶（A-1, B-1, C-1）に比し、カテキン含量の高い低品質な抹茶（A-5, B-5, C-5）で、阻害作用が強いことが明らかとなった。

次に実験動物を用いて、高品質な抹茶と低品質な抹茶の機能性、すなわち糖質消化吸收抑制作用の比較を行った。

普段摂取しているエネルギーのうち、約60%は糖質から摂取しており、その大部分がデンプンおよびスクロースである。食後血糖値の変動としては、スクロースを摂取した時の方が、デンプンを摂取した時よりも、食後血糖値の急激な上昇が起るため²⁵⁾、肥満や糖尿病を予防するという観点では、スクロース摂取後の急激な血糖値の上昇を抑制することが重要であると考えられる。

そこで、スクロースを持続投与したラットに品質の異なる抹茶を投与し、血

中グルコース濃度を指標として糖質消化吸収抑制作用を比較した。すなわち、胃・門脈カテーテル留置ラットを用いて、各社の最も高品質な抹茶および最も低品質な抹茶の糖質消化吸収抑制作用を比較したところ、全ての会社において、低品質な抹茶は、高品質な抹茶に比し、有意に高い有効性が認められた。

松井ら³⁾は、EGCG および ECG のスクラーゼ活性に対する 50% 阻害濃度 (IC₅₀) はそれぞれ 169 μ M および 172 μ M で、EC および EGC の 1080 μ M および 921 μ M に比し 5~6 倍強いことを報告している³⁾。したがって、今回の研究で観察されたラットにおける糖質消化吸収抑制作用の一因としては、抹茶中の EGCG 含量の差による可能性がある。

動物実験において、抹茶の糖質消化吸収抑制作用が確認できたため、さらにヒト試験により、抹茶の血糖上昇抑制作用について検証した。

緑茶に含まれるカテキン類は、 α -グルコシダーゼ活性を抑制することから、砂糖や麦芽糖など糖質の吸収を穏やかにする機能性食品素材として期待される。砂糖や小麦粉など多くの糖質を含む菓子パンは、エネルギー補給の目的には最適な食品であるが、肥満や糖尿病の予防の観点からは敬遠される食品である。血糖値の急激な変化は、肥満や糖尿病の要因となりうることから、菓子パンなど糖質が多く含まれる食品は、血糖値の急激な上昇を防ぐ工夫が必要であると考えられる。そこで、菓子パンに抹茶を配合することで、従来の菓子パンに比し血糖値の急激な変化を抑制することができるものと考え、抹茶含有菓子パン（以下抹茶パン）の開発を試みた。

in vitro 実験および動物実験において、抹茶の糖質消化吸収抑制作用は、高品質な抹茶に比し、低品質な抹茶において強い有効性が認められたため、抹茶パンに添加する抹茶は、品質（価格）の低い市販品を用いた。

菓子パンへの抹茶の配合量の推定は、スクロースを持続投与した胃・門脈カテーテル留置ラットにより、抹茶の糖質消化吸収抑制作用を医薬品の食後過血糖治療薬と比較し、算出した。作用持続時間は、濃度依存的に変化することから²⁶⁾、医薬品 0.024g/kg 投与時の糖質消化吸収抑制作用持続時間および抹茶 0.72g/kg 投与時の作用持続時間から、医薬品と同等の糖質消化吸収抑制作用を示す抹茶量は、1.44g/kg と算出された。したがって、ヒトでの医薬品の 1 回服用量 100mg に相当する抹茶量は約 6.0g と推定された。

抹茶パンは、あくまでも食品であることから、医薬品と同等の効果を有する必要はない。むしろ、医薬品との同時摂取などの可能性を考慮すると有効性が

確認できる最低限度の配合量が適当であると考えられた。糖質の吸収を穏やかにするとして市販されている特定保健用食品の有効性を評価した報告によると、特定保健用食品の効果は医薬品の 1/10 程度であることが報告されている²⁷⁾。したがって、抹茶の菓子パンへの配合量も動物実験により算出された医薬品 1 錠相当量 6.0g の 1/10 程度が適当であると考えられた。

一般に、抹茶を用いたパンに配合される抹茶量は 1 食あたり 0.5~1.0g であり^{28,29)}、抹茶ケーキや抹茶を使った和菓子などでは 1 食あたり 2~3g であった³⁰⁾。以上のことから、特定保健用食品と同程度の有効性、食経験上の安全性や菓子パンの味などの嗜好性を考慮し、抹茶の配合量は 1 食あたり 0.75g とした。

今回調製した抹茶パンには、1 食あたり小麦粉および砂糖由来の炭水化物が 30.5g 含まれており、これに対し抹茶を 0.75g 配合することで血糖値の上昇が有意に抑制できることが明らかとなった。

今回用いた抹茶 0.75g 中には、茶カテキン類の中で最も α -グルコシダーゼ活性阻害作用の強い EGCG²²⁾ が 15mg 含まれていた。これは緑茶 100mL (EGCG として 13mg)、ペットボトルの緑茶 200mL (EGCG として 14mg) に相当する量であり³¹⁾、日常生活で飲用される緑茶でも血糖上昇抑制作用は期待できるものと考えられた。

現在、糖質の吸収を穏やかにするとして市販されている特定保健用食品の主な成分は難消化性デキストリンである。難消化性デキストリンは、無味無臭で、水に溶けやすく、粘度も少ないことから、加工食品には最も利用しやすい素材であるが、十分な有効性を得るためには、1 食あたり 7g 程度の摂取が必要である³²⁾。一方、抹茶は苦味を有し、有効成分であるカテキン類は水に溶けにくいことから、食品への応用範囲は限定されたものになるが、配合量は難消化性デキストリンの 1/10 程度ですみ、さらに入手も容易であるメリットがある。そのため、抹茶のもつ味や特性を十分に考慮した上で、食品に応用することで、特定保健用食品と同程度の有効性を有する食品を開発することができるものと考えられた。

以上の結果より、*in vitro* 実験および動物実験において、低品質な抹茶は、高品質な抹茶に比し、糖質消化吸収抑制作用が強いことが明らかになった。また、ヒト試験においても、抹茶を配合した菓子パンは、対照菓子パンに比し、パン摂取後の急激な血糖値の上昇を抑制できることが明らかとなった。

したがって、高品質な抹茶は味や香りを重視した飲用として、低品質な抹茶

は機能性食品の原料として利用することで、低品質な抹茶の利用価値の向上が図れるものと考えられた。

第3章 抹茶の脂質消化吸収抑制作用

3.1 はじめに

我が国は、食の欧米化により肥満者の割合が増加している。平成元年の肥満者は男性で約14%、女性で約18%であったのに対し³³⁾、平成27年では男性で約30%、女性で約20%となっており³⁴⁾、男性の肥満率が約2倍に増加している。肥満は、食事から過剰に摂取されたエネルギーに関連することから、肥満を予防するためには、エネルギーを過剰に摂取しすぎないように糖質や脂質の摂取量を制限する、あるいは機能性成分を用いて糖質や脂質の吸収を抑制する必要があると考えられる。

茶はツバキ科に属する常緑樹の葉から作られ、世界で最も広く飲まれる嗜好飲料である。近年では緑茶に含まれるカテキン類の研究が多数行われており、血糖上昇抑制作用^{3,35)}、抗糖尿病作用⁴⁾、抗肥満作用⁵⁾、血圧上昇抑制作用⁶⁾、抗腫瘍作用⁷⁾、動脈硬化抑制作用⁸⁾、脂質吸収抑制作用³⁶⁾など様々な疾病予防機能を有することが報告されている。そのため、緑茶は肥満予防の機能性成分として期待されており、実際には「コレステロール高めの方の食品」および「血中中性脂肪・体脂肪が気になる方の食品」として、特定保健用食品に用いられている。

緑茶は抽出液であることから、食物繊維の含有量が少なく、その影響は少ないと考えられるが、碾茶を石臼で挽いて茶葉ごと摂取できる抹茶は、カテキン以外にも食物繊維を多く含むため、カテキンに加え食物繊維による健康効果も期待できる。

食物繊維の健康効果としては、血糖上昇抑制作用³⁷⁾、血清コレステロール濃度低下作用^{37,38)}、血清TG濃度低下作用^{37,38)}、便通改善効果³⁹⁾、プレバイオティクス効果⁴⁰⁾などが報告されている。

これまでに、緑茶の脂質消化吸収に関する報告はあるが、抹茶の脂質消化吸収に関する報告は無い。そこで本研究では、抹茶が脂質の消化吸収に与える影響について、胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラットを用いて検討した。

摂取された脂質は、小腸から吸収され胸管を経て、左静脈角で鎖骨下静脈血中に放出される。そこで、胃および鎖骨下静脈にカテーテルを挿入留置し、無麻酔・無拘束下で試料の胃内投与と鎖骨下静脈血の経時的な採取により、高感

度かつ短時間で脂質の消化吸収の評価を可能にした実験モデルである胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラットを用いて^{36,41)}、抹茶の脂質消化吸収に与える影響について検討した。本実験モデルは、脂肪乳剤および水等に可溶性試料を胃カテーテルから持続投与する仕様となっているが、抹茶は水に不溶であることから、本研究では、抹茶懸濁液を間欠的に投与し、鎖骨下静脈血中 TG 濃度を指標として脂質の消化吸収を評価した。

3.2 実験方法

3.2.1 試薬

トリオレイン、レシチン、コール酸ナトリウムおよびブタ由来腓リパーゼは和光純薬工業株式会社製を使用した。脂肪乳剤は、大豆油注射液（10%イントラリポス、大塚製薬株式会社）を使用した。血中トリグリセリド（TG）は富士ドライケム 4000V、測定波長 650nm（富士フィルム株式会社）、富士ドライケムスライド TG-PⅢを用いて酵素法（リポプロテインリパーゼ法）により測定した。血中遊離脂肪酸（NEFA）濃度は、NEFA C テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いて酵素法（ACS-ACOD 法）により測定した。

3.2.2 試料

腓リパーゼ活性阻害作用の測定に用いた抹茶は、2.2.2 に準ずる。

脂質吸着試験および動物実験に用いた抹茶は、A-5 を使用した。なお、抹茶 A-5 の不溶性食物繊維含量は 64%、水溶性食物繊維含量は 4%であった。

3.2.3 試料調製方法

腓リパーゼ活性阻害作用の試料調製方法は、1.2.3 に準ずる。

脂質吸着試験では、抹茶に加温した 0.2M リン酸緩衝液（pH7.0）を加えて、2.5%、5.0%および 10%抹茶懸濁液を調製した。セルロースは 0.2M リン酸緩衝液（pH7.0）を加えて、1.6%、3.2%および 6.4%セルロース懸濁液を調製した。

動物実験では、胃カテーテルを通過する粒径にするため、抹茶およびセルロースを粉砕器により 10 分間粉砕した。粉砕した抹茶に熱水を加えて 2.5%、5.0%および 10%抹茶懸濁液を調製した。また、粉砕したセルロースに水を加えて 6.4%セルロース懸濁液を調製した。

3.2.4 抹茶の腭リパーゼ活性阻害作用の測定

腭リパーゼ活性は、トリオレインからのオレイン酸遊離量を基に算出した⁴²⁾。トリオレイン 160mg, レシチン 20mg およびコール酸ナトリウム 10mg を 18mL の 0.1M トリス緩衝液 (pH7.0) 中で 10 分間超音波処理した後、室温で 1 時間静置し乳化させることで均一な懸濁液とし、これを基質液として用いた。酵素溶液は、ブタ由来腭リパーゼを生理食塩水に懸濁して用いた。

酵素活性の測定は、基質液 100 μ L に酵素溶液 50 μ L (最終濃度 0.88units/mL) および各種抹茶抽出液 100 μ L を混合した。酵素反応は 37°C, 30 分で行い、生成した NEFA 量を測定した。対照には蒸留水を用いた。酵素阻害活性は、次式により算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = (1 - \text{抹茶抽出液添加時の NEFA 生成量} / \text{対照の NEFA 生成量}) \times 100$$

3.2.5 抹茶の脂質吸着試験

0.2M リン酸二水素ナトリウム水溶液および 0.2M リン酸水素二ナトリウムを 39.0mL と 61.0mL 混合することで、0.2M リン酸緩衝液 (pH7.0) を調製した。

共栓試験管に大豆油 0.2g 計り取り、抹茶懸濁液あるいはセルロース懸濁液 10mL 加えて 1 分間攪拌後、37°C, 30 分間反応させた。反応終了後、ジエチルエーテル 10mL 加え 1 分間攪拌し、3,000r.p.m, 4°C, 5 分間遠心分離した後、エーテル層を回収した。回収したエーテル層は、予め重量を計っておいたナスフラスコ (Ag) に濾過し、その濾液をエバポレーターにて減圧濃縮させた。減圧濃縮後のナスフラスコ重量を計量し (Bg), 回収量を求めた。なお対照には、抹茶懸濁液あるいはセルロース懸濁液の替りに 0.2M リン酸緩衝液, ブランクには大豆油の替りに蒸留水を用いた。下記の計算式により脂質回収量および脂質吸着率を算出した。

$$\text{本試験あるいはブランク回収量 (g)} = B - A$$

$$\text{脂質回収量 (g)} = \text{本試験回収量} - \text{ブランク回収量}$$

$$\text{脂質吸着率 (\%)} = (1 - \text{抹茶添加時の脂質回収量} / \text{対照の脂質回収量}) \times 100$$

3.2.6 実験動物

2.2.6 に準ずる。

3.2.7 胃・鎖骨下静脈カテーテル留置法^{36,41)}

ラットを酸素・イソフルラン（導入期 2.5%，維持期 1.5%）混合ガス麻酔下に開腹し，胃に試料注入用カテーテル（ビニールチューブ：内径 0.5mm，外径 1.0mm），外頸静脈を経て左鎖骨下静脈に採血用カテーテル（ポリエチレンチューブ：内径 0.28mm，外径 0.61mm，シリコンチューブ：内径 0.5 mm，外径 1.0 mm）を挿入留置した。これらのカテーテルの他端は，皮下トンネルを通して背部に出し，ハーネスおよび保護コイルを通し，試料注入用カテーテルはスイベルに接続した（図 3-1）。採血用カテーテルは血液凝固による閉塞を予防するため，ヘパリン加生理食塩水（300 単位/mL）を充鎮した。施術後のラットはステンレス製代謝ケージ内で個別に飼育し，この間固形飼料 MF および水は自由に与えた。脂質消化吸收の評価実験は 16 時間絶食した後，無作為抽出にて 1 群 6 匹ずつ分けて行った。

酸素ガスは，グリーンテクノスより購入し使用した。イソフルランは，和光純薬株式会社製を用いた。感染予防としての抗生物質はペニシリン系抗生物質製剤ビクシリン（Meiji Seika ファルマ株式会社）を用いた。

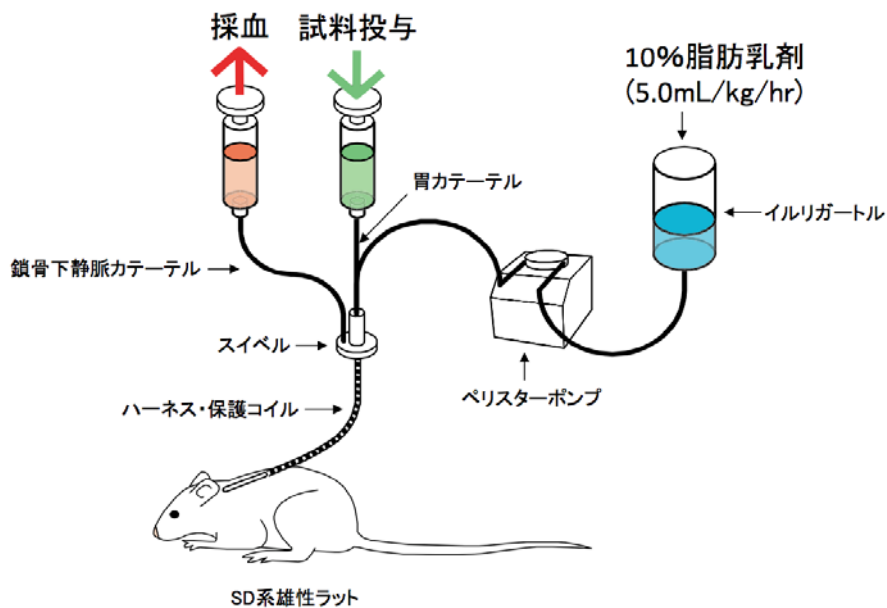
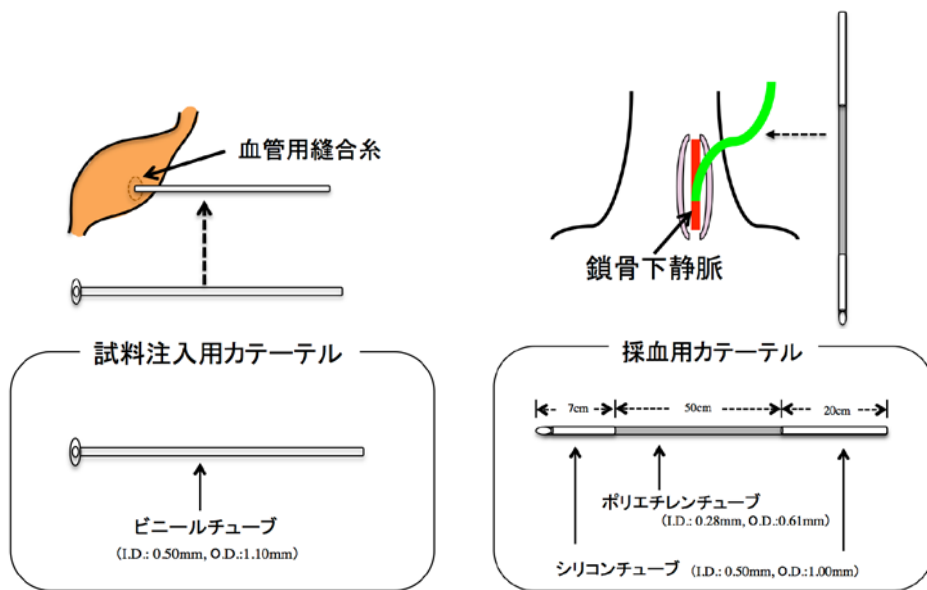


図 3-1. 胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラット

ラットを酸素・イソフルラン混合ガス麻酔下に開腹し、胃に試料注入用カテーテル、外頸静脈を経て左鎖骨下静脈にヘパリンを充鎮した採血用カテーテルを挿入留置した。これらのカテーテルの他端は、皮下トンネルを通して背部に出し、ハーネスおよび保護コイルを通し、試料注入用カテーテルはスイベルに接続した。

3.2.8 抹茶の脂質消化吸收抑制作用

胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラットの試料注入用カテーテルよりペリスターポンプにて、10%イントラリポスを 5.0mL/kg/hr の速度で胃内に持続的に投与した。それと同時に 2.5%、5.0%、10%抹茶懸濁液あるいは 6.4%セルロース懸濁液を 30 分おきに 360 分まで、5.6mL/kg/hr (=2.8mL/kg/30min) 間欠的に投与した。なお、対照群には試料と同量の蒸留水を間欠的に投与した。試料投与開始後、30 分おきに 360 分まで採血用カテーテルより鎖骨下静脈血 0.1mL を採取した。血液は、遠心分離して血漿とし、血中 TG 濃度および血中 NEFA 濃度を測定した。血中濃度から台形法により曲線下面積 (Area under the curve : AUC) を求めた。

3.2.9 統計処理

実験データはすべて平均値±標準誤差で示した。各統計に関しては、4steps エクセル統計アドインソフト Statcel3 (オーエムエス出版) を用いて解析を行った。

抹茶の腭リパーゼ活性阻害作用の比較、血中 TG 濃度および血中 NEFA 濃度の各時間の比較には、Student's-t 検定を用いた。抹茶の脂質吸着率、血中 TG-AUC および血中 NEFA-AUC の群間比較は、Scheffe's F test の多重比較検定により行った。

3.3 結果

3.3.1 抹茶の腭リパーゼ活性阻害作用

ブタ由来腭リパーゼ活性に対する抹茶抽出液の IC_{50} を図 3-2 に示した。腭リパーゼ活性阻害作用は、すべての会社において、高品質な抹茶に比し、低品質な抹茶で強い阻害作用が認められた。

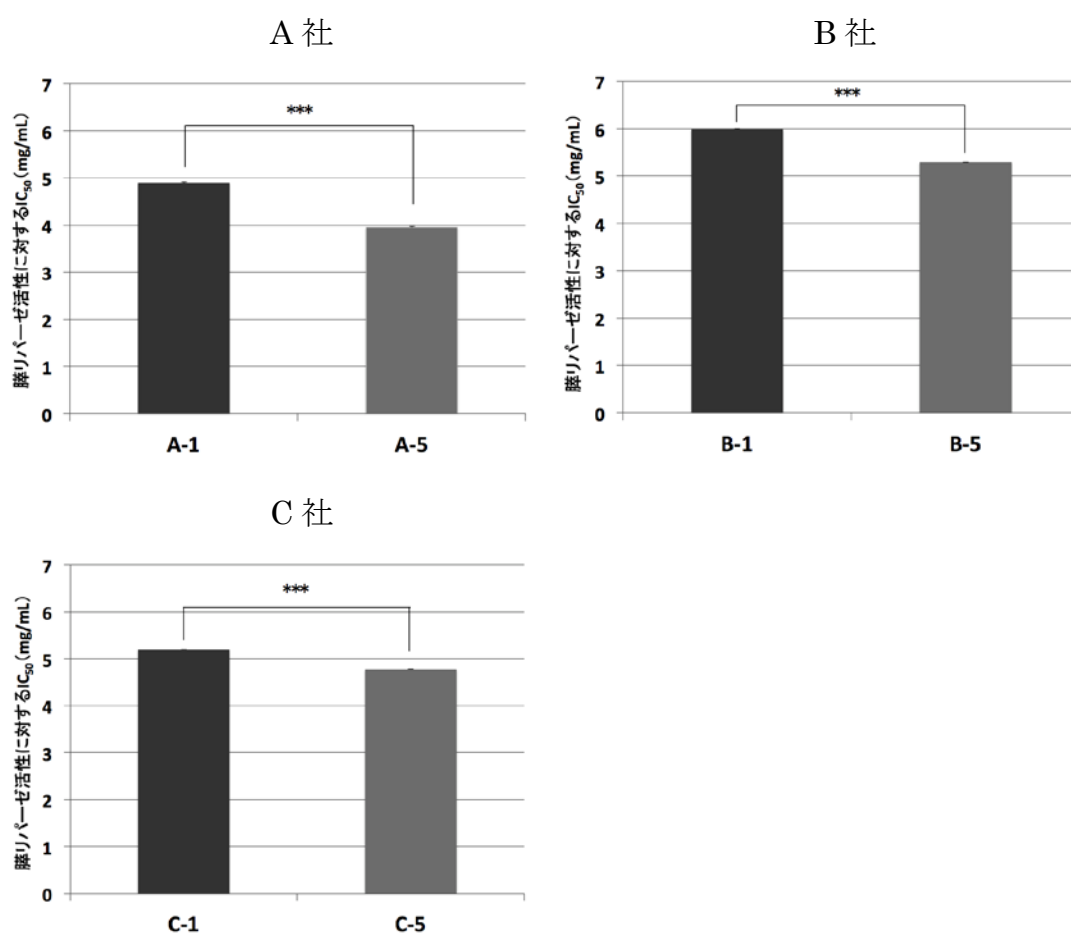


図 3-2. 抹茶の腭リパーゼ活性に対する IC_{50}

抹茶抽出液（対照：蒸留水），基質および 0.88units/mL 酵素溶液を混合し， $37^{\circ}C$ ，30 分間反応させ，腭リパーゼ活性阻害率を測定し， IC_{50} を算出した。

mean \pm SE (n=3), *** $p < 0.001$

3.3.2 抹茶の脂質吸着試験

抹茶およびセルロースの脂質吸着率を図 3-3 に示した。

抹茶の脂質吸着率は、2.5%抹茶で $2.72 \pm 0.64\%$ 、5.0%抹茶で $15.55 \pm 0.46\%$ 、10%抹茶で $25.46 \pm 0.07\%$ と、濃度依存的に吸着率は上昇した。

セルロースの脂質吸着率は、1.6%セルロースで $2.20 \pm 0.62\%$ 、3.2%セルロースで $2.23 \pm 0.52\%$ 、6.4%セルロースで $3.99 \pm 1.92\%$ であった。

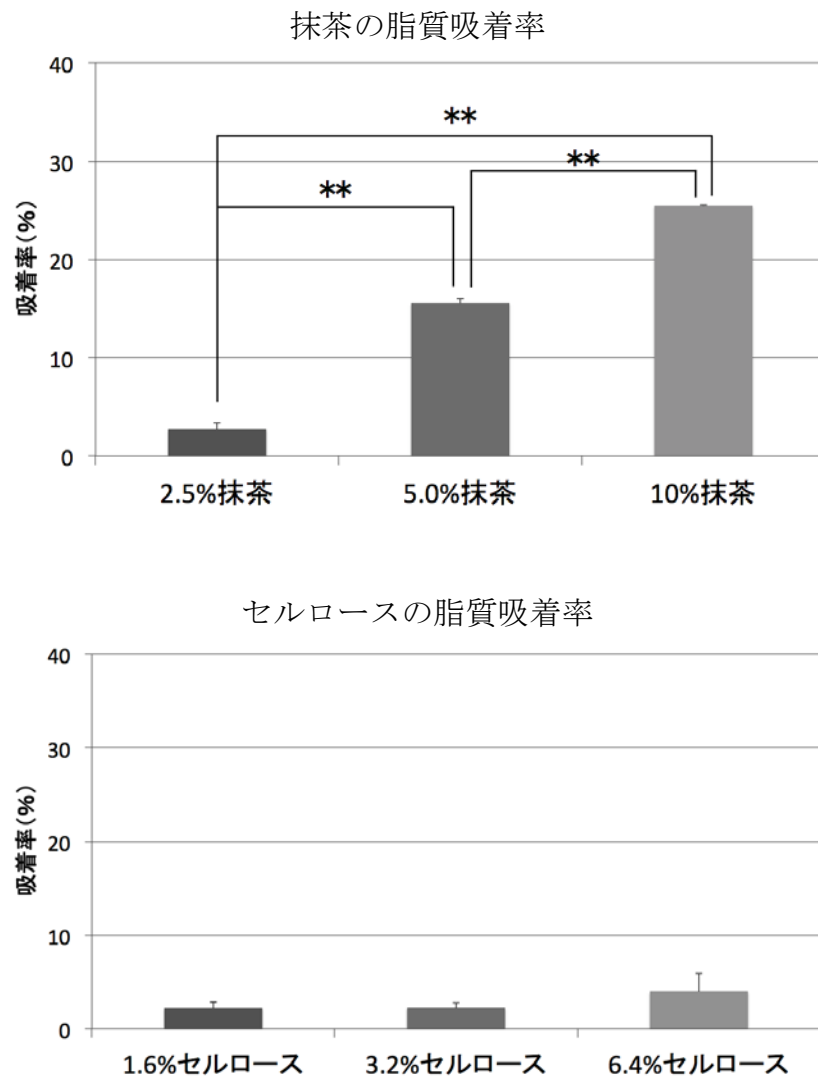


図 3-3. 抹茶およびセルロースの脂質吸着率

大豆油および抹茶懸濁液あるいはセルロース懸濁液（対照：リン酸緩衝液）を混合し、37°C、30 分間反応させ、脂質回収量を計り、脂質吸着率を算出した。

mean \pm SE (n=3), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.3.3 抹茶の脂質消化吸收抑制作用

10%イントラリポスの持続投与（5.0mL/kg/hr）と同時に、各種抹茶懸濁液あるいはセルロース懸濁液を間欠的に投与（2.8mL/kg/30min）したラットの血中 TG 濃度および血中 NEFA 濃度を図 3-4 および図 3-5 に示した。

血中 TG 濃度は、2.5%抹茶投与群では、イントラリポス持続投与とともに上昇したものの、120 分以降 180 分および 360 分で、対照群に比し有意に低値を示した。5.0%抹茶投与群では、120 分以降、対照群に比し有意に低値を示した。10%抹茶投与群では、ほとんど上昇することなく、60 分以降、対照群に比し有意に低値を示した。6.4%セルロース投与群では、投与後 150 分で対照群に比し有意に低値を示した。それ以降は、対照群に比し低値を示したものの有意な差は認められなかった。

血中 TG-AUC を比較すると、2.5%抹茶投与群および 6.4%セルロース投与群では、対照群に比し低値を示したものの有意な差は認められなかった。5.0%および 10%抹茶投与群では、対照群に比し、有意に低値を示した（図 3-6）。

血中 NEFA 濃度は、2.5%抹茶投与群では、対照群と同様に上昇し、有意な差は認められなかった。5.0%抹茶投与群では、60 分以降 180 分、240 分および 300 分以降、対照群に比し有意に低値を示した。10%抹茶投与群では、150 分以降、対照群に比し有意に低値を示した。6.4%セルロース投与群では、投与後 360 分で、対照群に比し有意に低値を示した。

血中 NEFA-AUC を比較すると、2.5%抹茶投与群および 6.4%セルロース投与群では、対照群に比し低値を示したものの有意な差は認められなかった。5.0%および 10%抹茶投与群においては、対照群に比し、有意に低値を示した（図 3-7）。

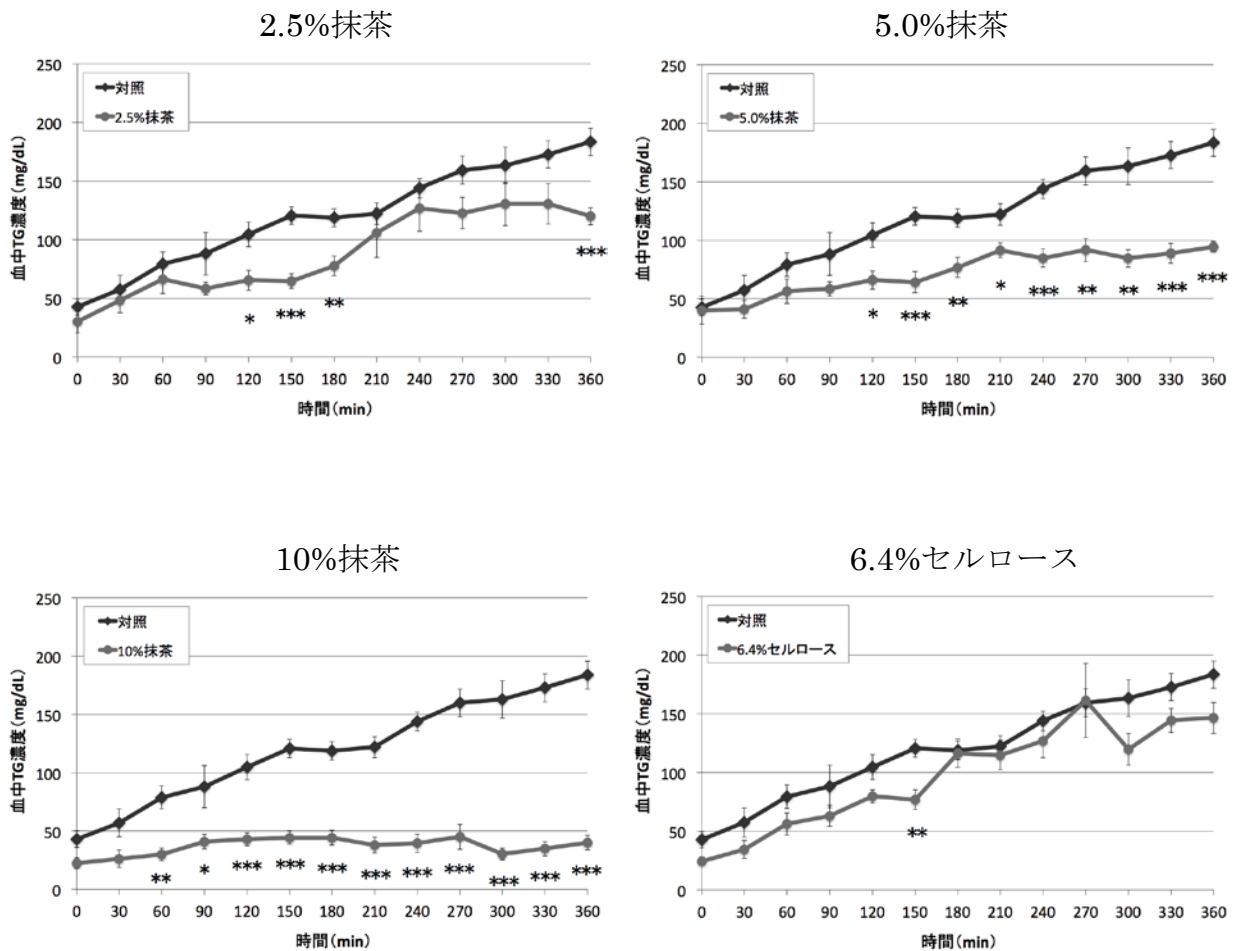


図 3-4. 抹茶およびセルロース投与時の血中 TG 濃度の経時的変化

胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラットに 10%イントラリポスを 5.0mL/kg/hr の速度で持続投与および抹茶懸濁液あるいはセルロース懸濁液を 30 分おきに 5.6mL/kg/hr (=2.8mL/kg/30min) 間欠的に胃内に投与した。試料投与開始後 30 分おきに 360 分まで採血を行い、血中 TG 濃度を測定した。

mean ± SE (n=6), * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001

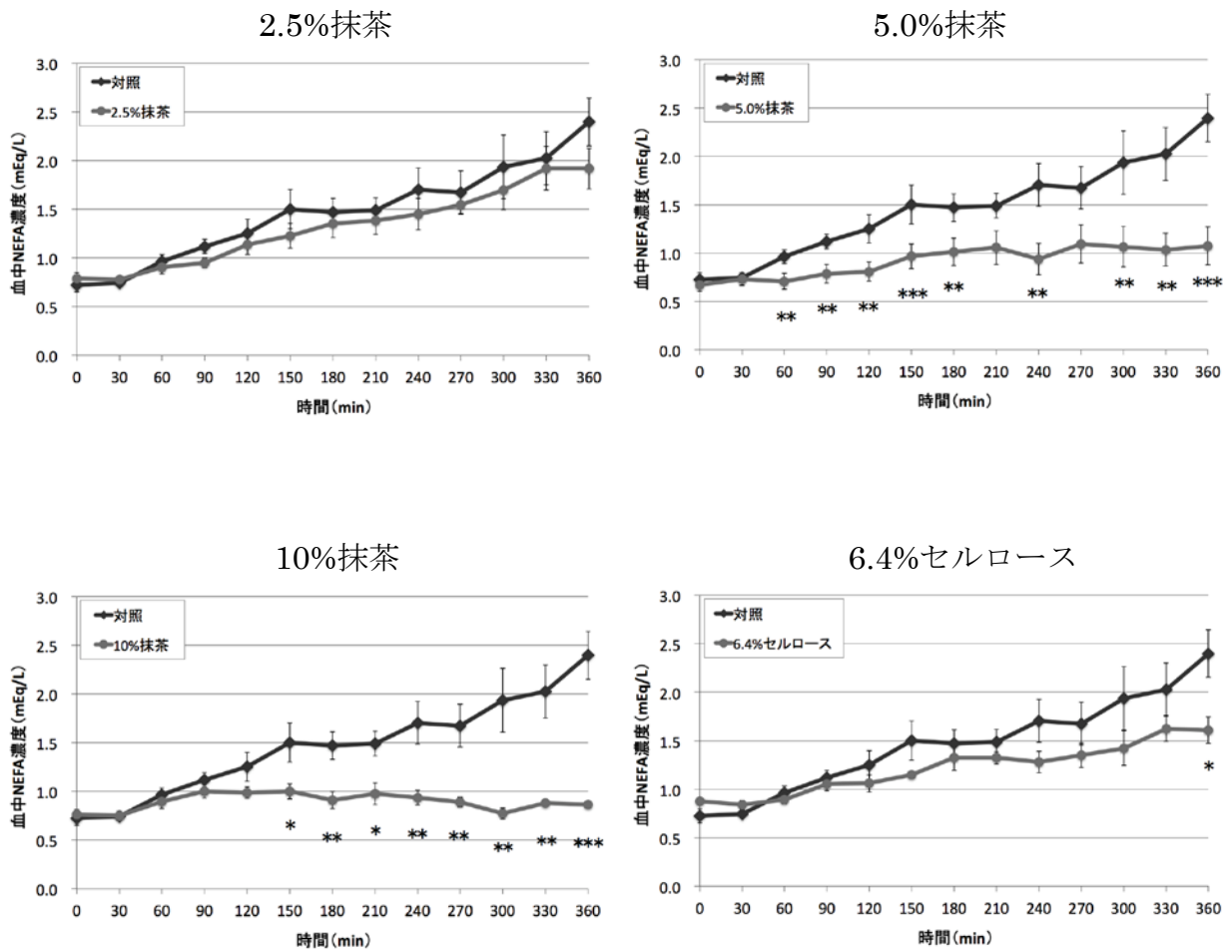


図 3-5. 抹茶およびセルロース投与時の血中 NEFA 濃度の経時的変化

胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラットに 10%イントラリポスを 5.0mL/kg/hr の速度で持続投与および抹茶懸濁液あるいはセルロース懸濁液を 30 分おきに 5.6mL/kg/hr (=2.8mL/kg/30min) 間欠的に胃内に投与した。試料投与開始後 30 分おきに 360 分まで採血を行い、血中 NEFA 濃度を測定した。

mean ± SE (n=6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

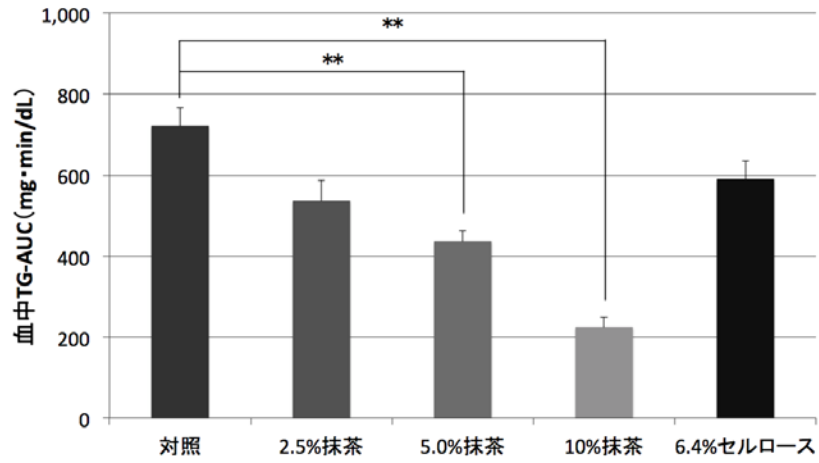


図 3-6. 抹茶およびセルロース投与時の血中 TG-AUC
 mean ± SE (n=6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

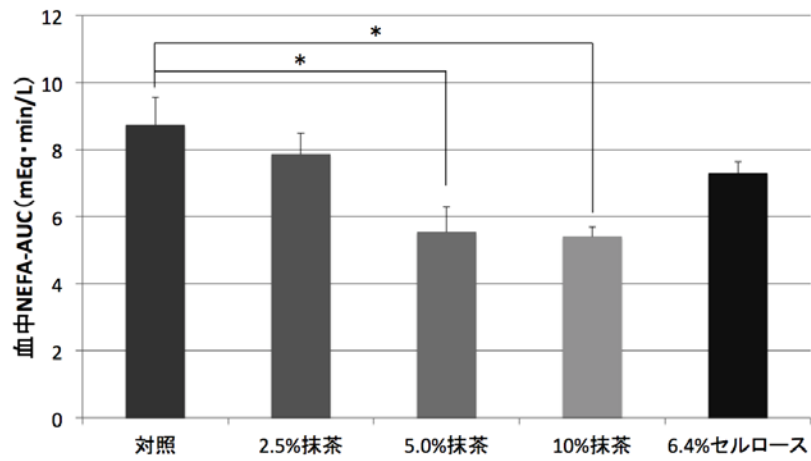


図 3-7. 抹茶およびセルロース投与時の血中 NEFA-AUC
 mean ± SE (n=6), * $p < 0.05$

3.4 考察

緑茶の種類には、玉露、煎茶、抹茶、かぶせ茶、玉緑茶および番茶があり⁴³⁾、抹茶とそれ以外の茶では、飲み方に大きな違いがある。玉露や煎茶などの茶の飲用時には、茶葉を湯あるいは水で一定時間抽出させた抽出液を飲む。一方、抹茶は碾茶を石臼で挽いて粉末状にしたものであり、飲用時には抹茶にお湯を入れて攪拌したものを飲むため、茶葉そのものを摂取することができる茶である。

そのため、抹茶の機能性成分としては、茶カテキンに加えて、食物繊維も機能性を有する可能性が考えられる。そこで本章では、抹茶が脂質の消化吸収に与える影響およびメカニズムについて検討した。

はじめに *in vitro* 実験により、各社の最も高品質な抹茶 (A-1, B-1, C-1) および最も低品質な抹茶 (A-5, B-5, C-5) の膵リパーゼ活性阻害作用を測定したところ、いずれの会社においても低品質な抹茶は、高品質な抹茶に比し、強い膵リパーゼ活性阻害作用が認められた。茶カテキンは脂質の消化酵素である膵リパーゼの活性を阻害することが報告されていることから⁴⁴⁾、本実験においても、高品質でカテキン含量の低い抹茶に比し、低品質でカテキン含量の高い抹茶で、より強い膵リパーゼ活性阻害作用が認められたものと考えられた。

緑茶の茶葉中には水溶性食物繊維が 5~15%、不溶性食物繊維が 20~30%含まれているため²⁾、茶葉そのものを摂取する抹茶では、他の茶と異なり食物繊維も摂取するため、食物繊維が脂質の消化吸収に影響を与える可能性も考えられる。

食物繊維は水溶性と不溶性に大別される。一般的に食物繊維は、食物の咀嚼回数や消化液の分泌を増加させたり、便通や腸内環境を改善したりするが、水溶性と不溶性で異なる生理作用もある。水溶性食物繊維は、消化管内において高粘度のゲルを形成し栄養素の拡散を抑制することで、その吸収を緩慢にする作用を有しており⁴⁵⁾、糖質や脂質の吸収を抑制することから、水溶性食物繊維の一種である難消化性デキストリンは、「血糖値が気になり始めた方の食品」「血中中性脂肪や体脂肪が気になる方の食品」の特定保健用食品として使用されている。不溶性食物繊維は、保水性がよく、便量の増加や腸の蠕動運動の促進、脂肪や胆汁酸、発がん物質等の吸着・排出作用を有する⁴⁶⁾。そのため、主に不溶性食物繊維を含んでいる小麦ふすまは、「お腹の調子を整える食品」の特定保健用食品として使用されている。このように食物繊維の摂取は、食塊の腸まで

の移動、酵素消化、吸収上皮細胞を通して吸収するプロセスに影響を与え、栄養素の吸収速度を遅延する要因となり得る⁴⁵⁾。

古市ら³⁸⁾は、セルロースあるいはトウモロコシ外皮由来の水溶性食物繊維混合飼料を、ラットに20日間経口摂取させたときの血中総コレステロール濃度およびTG濃度を測定したところ、いずれにおいても水溶性食物繊維摂取群は、コントロール（無繊維飼料）群およびセルロース摂取群に比し、有意に低値を示したことを報告していることから、不溶性食物繊維に比し、水溶性食物繊維の方が、脂質に吸着しやすいことが示唆された。

茶葉ごと摂取する抹茶においても、茶葉中の食物繊維により脂質を吸着する可能性があるため、試験管内試験において抹茶の脂質吸着能を評価したところ、抹茶は脂質を約25%吸着することが明らかとなった。本実験で使用した抹茶に含まれる不溶性食物繊維含量が64%であるため、2.5%、5.0%および10%抹茶懸濁液に相当するセルロース懸濁液（1.6%、3.2%および6.4%セルロース懸濁液）で脂質吸着能を評価したところ、10%抹茶懸濁液に相当する6.4%セルロース懸濁液の吸着率は約4%であったため、不溶性食物繊維も脂質を吸着することが明らかとなった。したがって、抹茶は脂質を吸着することによっても、脂質の消化吸収に影響を与える可能性が考えられた。

次に動物実験において、抹茶あるいはセルロースの脂質消化吸収抑制作用について、胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラットを用いて評価した。

胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラットは、脂肪乳剤（5.0mL/kg/hr）および試料（5.6mL/kg/hr）の同時持続投与により脂質の消化吸収を評価するため、抹茶懸濁液のような時間経過とともに沈殿が生じる試料の評価は不可能であった。そこで本研究では、試料の持続投与（5.6mL/kg/hr）の代わりに、30分間の試料投与量（2.8mL/kg/30min）を、30分おきに360分まで間欠的に投与することとした。

脂肪乳剤の持続投与とともに抹茶を間欠的に投与したときの血中TG濃度および血中NEFA濃度において、2.5%抹茶投与群では対照群に比しほとんど差が認められなかったものの、5.0%および10%抹茶投与群では対照群に比し有意に低値を示したこと、さらに血中TG-AUCおよび血中NEFA-AUCにおいて、5.0%および10%抹茶投与群は対照群に比し有意に低値を示し濃度依存性が認められたため、抹茶には脂質消化吸収抑制作用を有することが明らかとなった。

6.4%セルロース投与群の血中TG濃度は、投与後150分において対照群に比

し有意に低値を示した。血中 NEFA 濃度は、投与後 360 分において対照群に比し有意に低値を示した。また血中 TG-AUC および血中 NEFA-AUC においては、対照群に比し有意な差は認められなかったものの低値を示したため、セルロースも脂質の消化吸収に影響を与える可能性が示唆された。

以上の結果より、抹茶は脂質の消化酵素である膵リパーゼ活性を阻害するとともに脂質を吸着することで、脂質の消化吸収を抑制することが明らかとなった。

第4章 抹茶のタンパク質消化吸収抑制作用

4.1 はじめに

我が国は、世界の中でもトップクラスの長寿国であるが、近年では平均寿命よりも健康寿命、すなわち認知症や寝たきりにならずに基本的な諸動作の自立が維持されている状態で生活できる年数が注目されている。このような現状において、人々の健康への関心は高まり、それに伴い食品の三次機能である生体調節機能を目的とした特定保健用食品や栄養機能食品などの健康食品市場が大きくなっている。健康食品を開発する上で大切なことは、その商品の有効性や安全性に関する科学的根拠の有無である。食品成分の機能性の評価に関しては、動物実験において糖質、脂質およびミネラルなどの消化吸収に与える影響の評価についての報告は数多くあるが⁴⁷⁻⁴⁹⁾、その一方、タンパク質の消化吸収の評価をしている報告はほとんどなく、特に血中アミノ酸濃度を指標として直接的に評価している報告は皆無である。

そこでまず、タンパク質の消化吸収を門脈血中アミノ酸濃度の変化を指標として評価できる実験モデルの開発を行った。

血中アミノ酸濃度を指標としてタンパク質の消化吸収を評価する場合、肝臓における代謝を受ける前のアミノ酸濃度を測定する必要があるが、ラット門脈より採血できる本実験モデルはタンパク質の消化吸収を評価する上で最適なモデルであると考えられた。著者らが機能性成分の消化吸収機能に対する影響を迅速かつ少数の実験動物で実施できる動物実験モデルとして開発した胃・門脈カテーテル留置ラットは、ラットの胃および門脈にカテーテルを留置し、無麻酔・無拘束下で試料の胃内投与と門脈血の経時的な採取を可能にした実験モデルであり¹⁹⁾、これまでに糖質、ミネラルおよび医薬品の消化吸収機能の迅速評価法として利用している^{21,50-51)}。

そこで本研究では、胃・門脈カテーテル留置ラットを用いて、タンパク質の消化吸収を評価できるか否かについて検討を行った。

次に、本ラット実験モデルを用いて、抹茶および抹茶抽出物がタンパク質消化吸収に与える影響について検討した。

4.2 実験方法

4.2.1 胃・門脈カテーテル留置ラットを用いたタンパク質消化吸収機能評価実験モデルの作成

4.2.1.1 試薬

カゼインナトリウムは、和光純薬株式会社製を使用した。L-アスパラギンおよびアミノ酸混合標準液 H 型は、和光純薬株式会社のアミノ酸自動分析用を使用した。o-フタルアルデヒド (OPA) は、和光純薬株式会社製の生化学用を使用した。OPA 溶液は、OPA0.01g を無水エタノール 250 μ L に溶解し、2-メルカプトエタノール 10 μ L および 0.01M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH9.5) 2.24mL 加えて混合したものをを用いた。その他の試薬は、特級品を用いた。

4.2.1.2 試料

抹茶は、A 社の A-5 を用いた。

4.2.1.3 試料調製方法

抹茶は、胃カテーテルを通過する粒径にするため、粉砕器により 10 分間粉砕した後、熱水を加えて 10%抹茶懸濁液を調製した。

抹茶抽出物は、抹茶 1.0g に対して 20 倍量の熱水を加え 2 分間熱水抽出を行った。抽出液は濾過し、濾液を凍結乾燥したものを、水に懸濁し、20%抹茶抽出物懸濁液として使用した。

4.2.1.4 実験動物

2.2.6 に準ずる。

4.2.1.5 胃・門脈カテーテル留置法

2.2.7 に準ずる。

4.2.1.6 胃・門脈カテーテル留置ラットによるタンパク質消化吸収機能評価モデルの開発

胃・門脈カテーテル留置ラットの試料注入用カテーテルより、5%カゼインナトリウム水溶液をペリスターポンプにて 11.25mL/kg/hr の速度で持続的に投与した (カゼイン投与群)。試料投与開始後、30 分おきに 180 分まで門脈カテー

テルより門脈血 0.1mL を採取した。血液は、遠心分離して血漿とし、アミノ酸測定用試料とした。

4.2.2 抹茶がタンパク質消化吸収に与える影響

胃・門脈カテーテル留置ラットの試料注入用カテーテルより、10%抹茶懸濁液を単回投与（7.2mL/kg）すると同時に 5%カゼインナトリウム水溶液をペリスターポンプにて 11.25mL/kg/hr の速度で持続的に投与した（カゼイン+抹茶投与群）。試料投与後、30 分おきに 180 分まで門脈カテーテルより門脈血 0.1mL を採取した。血液は、遠心分離して血漿とし、アミノ酸測定用試料とした。なお、4.2.1.6 のカゼイン投与群を対照とした。

4.2.3 抹茶抽出物がタンパク質消化吸収に与える影響

胃・門脈カテーテル留置ラットの試料注入用カテーテルより、20%抹茶抽出物懸濁液を単回投与（7.2mL/kg）すると同時に 5%カゼインナトリウム水溶液をペリスターポンプにて 11.25mL/kg/hr の速度で持続的に投与した（カゼイン+抹茶抽出物投与群）。試料投与後、30 分おきに 180 分まで門脈カテーテルより門脈血 0.1mL を採取した。血液は、遠心分離して血漿とし、アミノ酸測定用試料とした。なお、4.2.1.6 のカゼイン投与群を対照とした。

4.2.3.1 血液処理方法

血漿 10 μ L に 6%5-スルホサリチル酸二水和物水溶液を 10 μ L 加え遠心分離し、その上清 10 μ L に水 490 μ L 加え、0.45 μ m フィルターにて濾過したものを HPLC 試料とした。

4.2.3.2 血中遊離アミノ酸濃度の測定

血中遊離アミノ酸濃度は、OPA により誘導体化した後、蛍光検出器付 HPLC により測定した¹⁴⁾。すなわち、HPLC 試料 20 μ L に、0.01M ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH9.5）20 μ L および OPA 溶液 20 μ L を加えて混合し、4°C で 1 分間反応させたものを直ちに HPLC に供した。

HPLC 装置および分析条件は、1.2.4 に準ずる。

4.2.3.3 統計処理

実験データはすべて平均値±標準誤差で示した。各統計に関しては、4steps エクセル統計アドインソフト Statcel3（オーエムエス出版）を用いて解析を行った。カゼイン持続投与時の各時間帯と投与前値（0分値）の血中遊離アミノ酸濃度の比較は、Bonferroni/dunn の多重比較検定により行った。抹茶懸濁液あるいは抹茶抽出物懸濁液投与群およびカゼイン投与群との各時間帯の血中遊離アミノ酸濃度の比較は、Student's-t 検定により行った。

4.3 結果

4.3.1 胃・門脈カテーテル留置ラットを用いたタンパク質消化吸収機能評価実験モデルの作成

16時間絶食後のラットの血中遊離アミノ酸の HPLC クロマトグラムを図 4-1 に示した。アスパラギン酸，アスパラギンを含め 16 種類のアミノ酸が分離，検出された。

5%カゼインナトリウム水溶液を 180 分間持続投与（11.25mL/kg/hr）したカゼイン投与群の門脈血中アミノ酸濃度の経時的变化を図 4-2 に示した。

血中遊離アミノ酸のうち，アスパラギン，ヒスチジン，セリン，グルタミン，アルギニン，チロシン，メチオニン，トリプトファン，バリン，フェニルアラニン，イソロイシンおよびロイシンにおいて，カゼイン持続投与とともに血中アミノ酸濃度は上昇し，カゼイン投与前値（0 分値）に比し，有意に高値を示した。アラニンおよびグルタミン酸においては，カゼイン持続投与とともに血中濃度は上昇したが，0 分値との有意な差は認められなかった。一方，アスパラギン酸およびグリシンにおいては，カゼインを持続投与しても，血中濃度の変化は見られなかった。

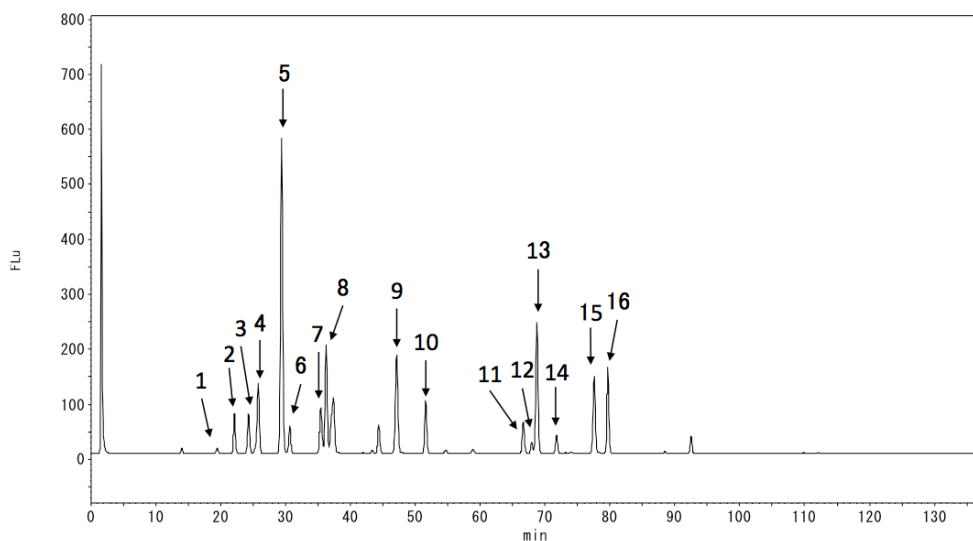


図 4-1. 血中遊離アミノ酸の HPLC クロマトグラム

ピーク 1 : アスパラギン酸, 2 : アスパラギン, 3 : ヒスチジン, 4 : セリン,
 5 : グルタミン, 6 : グルタミン酸, 7 : グリシン, 8 : アルギニン, 9 : アラニン,
 10 : チロシン, 11 : メチオニン, 12 : トリプトファン, 13 : バリン, 14 : フェ
 ニルアラニン, 15 : イソロイシン, 16 : ロイシン

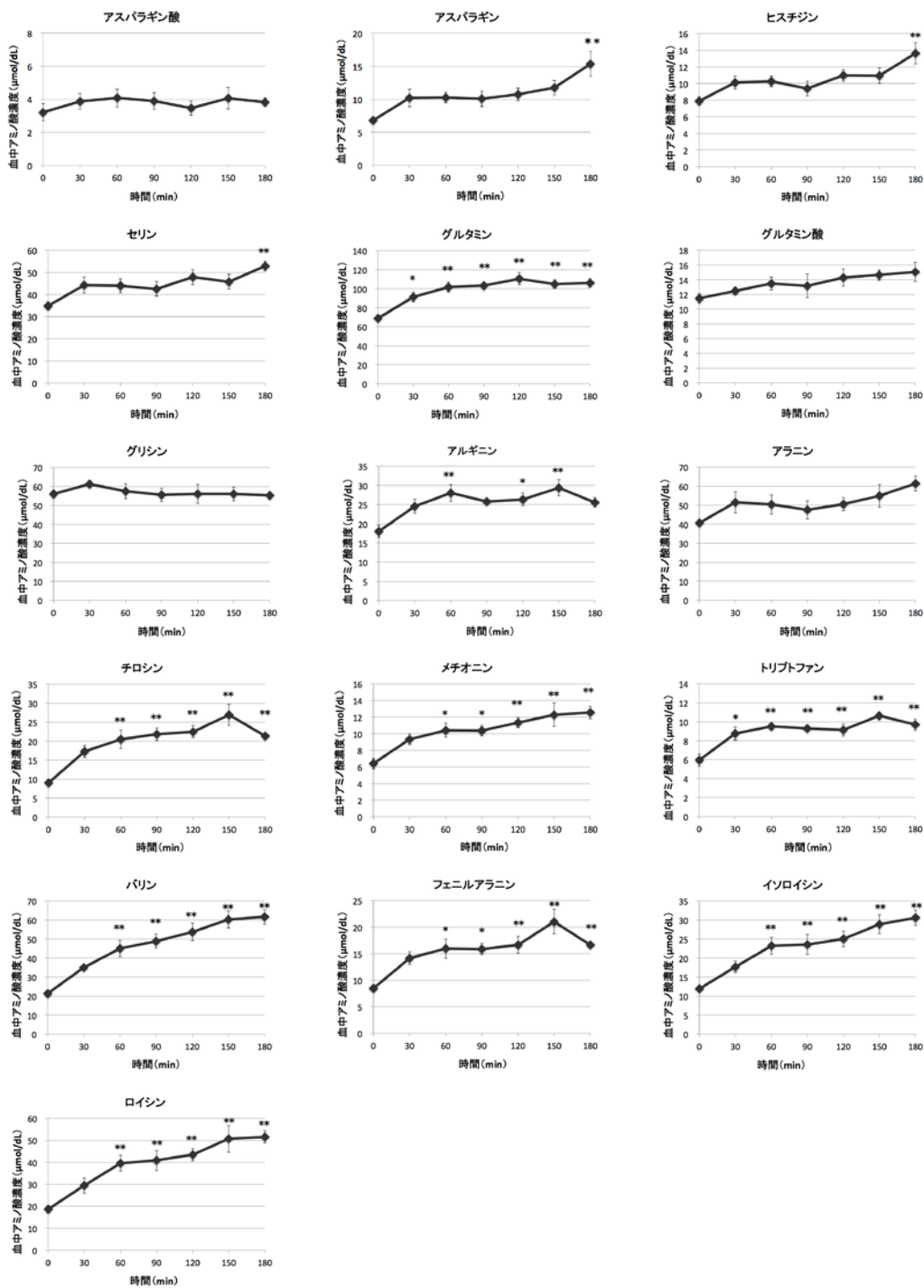


図 4-2. カゼイン持続投与時の門脈血中アミノ酸濃度の経時的変化
 胃・門脈カテーテル留置ラットに、5%カゼインナトリウム水溶液を
 11.25mL/kg/hr の速度で持続的に投与した。試料投与開始後、30分おきに180
 分まで採血を行い、門脈血中アミノ酸濃度を測定した。

mean ± SE (n=6), *p < 0.05, **p < 0.01 vs. 0min

4.3.2 抹茶がタンパク質消化吸収に与える影響

10%抹茶懸濁液単回投与では、血中アミノ酸濃度の経時的な変化に影響がないことを確認した（図 4-3）。

10%抹茶懸濁液単回投与と同時に 5%カゼインナトリウム水溶液を持続投与した群（カゼイン+抹茶投与群）および対照のカゼイン投与群の門脈血中アミノ酸濃度の経時変化を、図 4-4 に示した。なお本実験では、カゼイン持続投与後、30 分あるいは 60 分以降 180 分まで、投与前値（0 分値）に比し経時的に有意な上昇が認められた 8 種類のアミノ酸を指標とした。

カゼイン+抹茶投与群では、グルタミンは投与後 120 分以降、バリンは投与後 90 分および 180 分に、対照のカゼイン投与群に比し、有意に低値を示した。トリプトファンでは投与後 90~120 分および 180 分に、カゼイン投与群に比し、有意に高値を示した。その他 5 種類のアミノ酸は、カゼイン投与群に比べて有意な差は認められなかった。

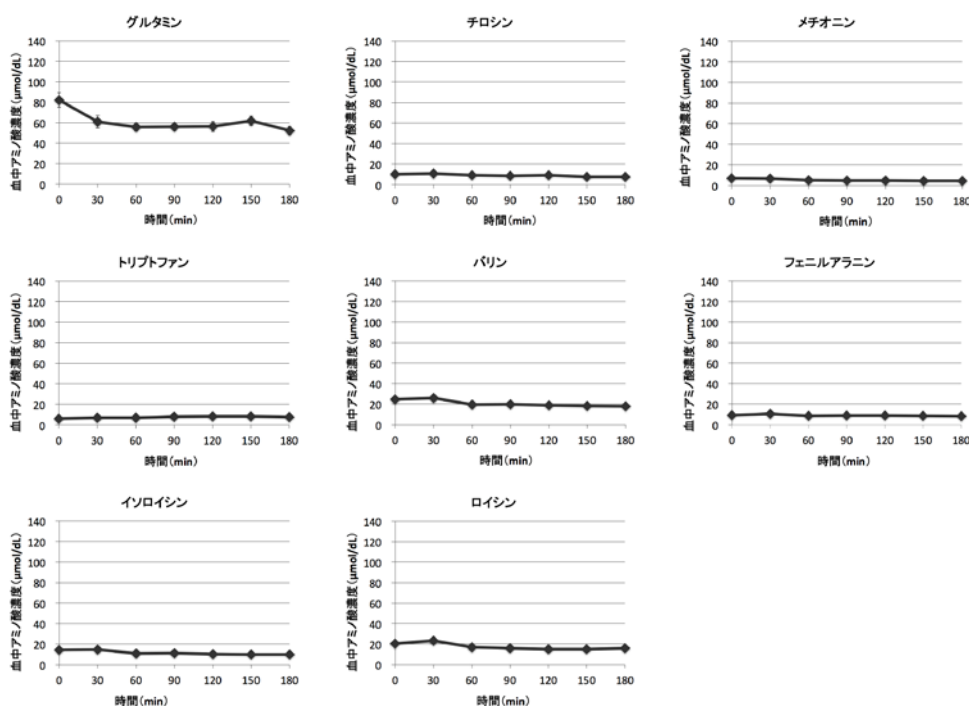


図 4-3. 抹茶懸濁液投与群の門脈血中アミノ酸濃度の経時的変化

胃・門脈カテーテル留置ラットに、10%抹茶懸濁液を単回投与（7.2mL/kg）した。試料投与開始後、30 分おきに 180 分まで採血を行い、門脈血中アミノ酸濃度を測定した。

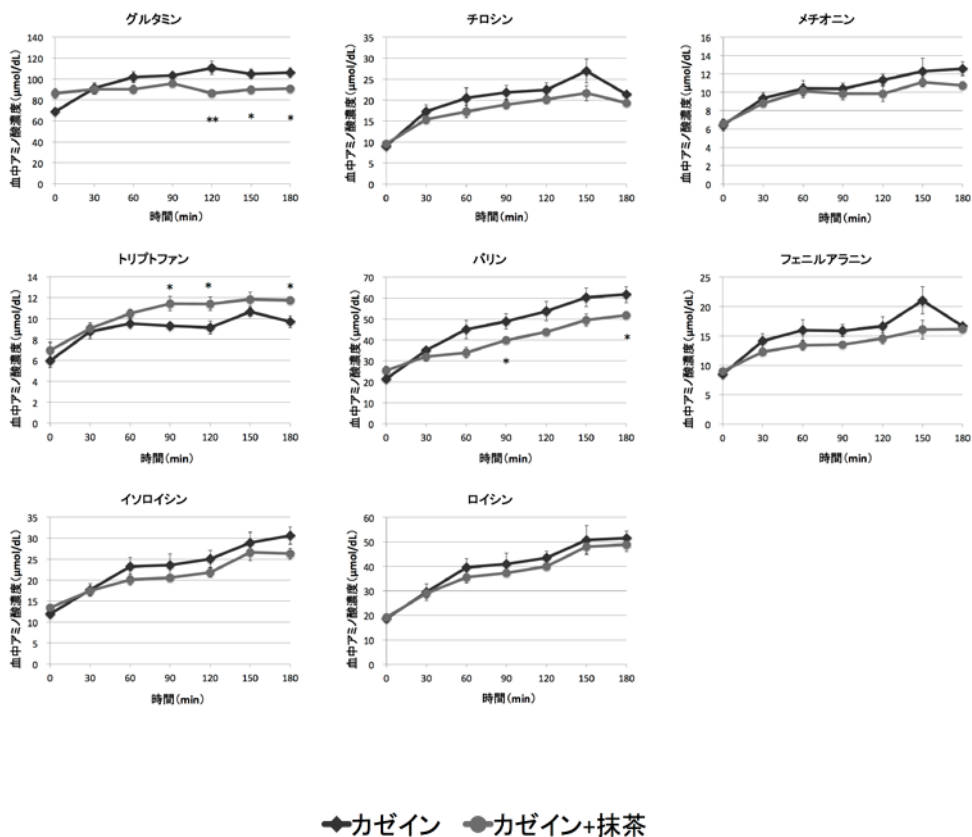


図 4-4. カゼイン投与群およびカゼイン+抹茶投与群の門脈血中アミノ酸濃度の経時的変化

胃・門脈カテーテル留置ラットに、10%抹茶懸濁液単回投与（7.2mL/kg）と同時に5%カゼインナトリウム水溶液を11.25mL/kg/hrの速度で持続的に投与した（カゼイン+抹茶投与群）。対照は5%カゼインナトリウム水溶液を持続投与した（カゼイン投与群）。試料投与開始後、30分おきに180分まで採血を行い、門脈血中アミノ酸濃度を測定した。

mean ± SE (n=6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4.3.3 抹茶抽出物がタンパク質消化吸収に与える影響

20%抹茶抽出物懸濁液単回投与では、血中アミノ酸濃度の経時的な変化に影響がないことを確認した（図 4-5）。

20%抹茶抽出物懸濁液単回投与と同時に 5%カゼインナトリウム水溶液を持続投与した群（カゼイン+抹茶抽出物投与群）および対照のカゼイン投与群の門脈血中アミノ酸濃度の経時変化を、図 4-6 に示した。なお本実験では、カゼイン持続投与後、30 分あるいは 60 分以降 180 分まで、投与前値（0 分値）に比し経時的に有意な上昇が認められた 8 種類のアミノ酸を指標とした。

カゼイン+抹茶抽出物投与群では、8 種類の血中遊離アミノ酸濃度はほとんど上昇することなく、カゼイン投与群に比し、有意に低値を示した。

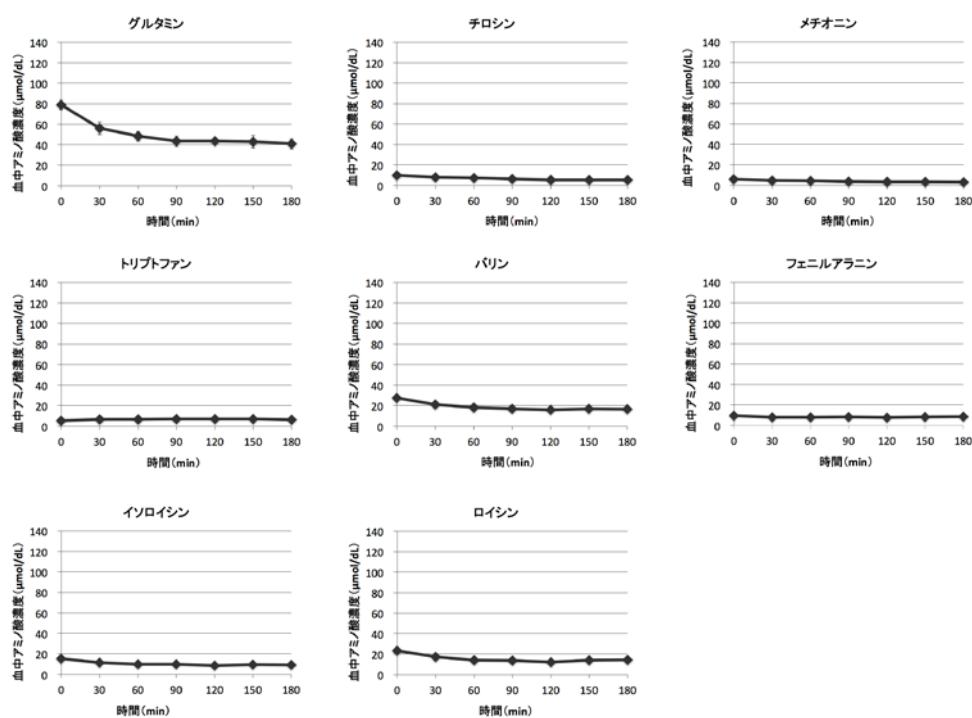
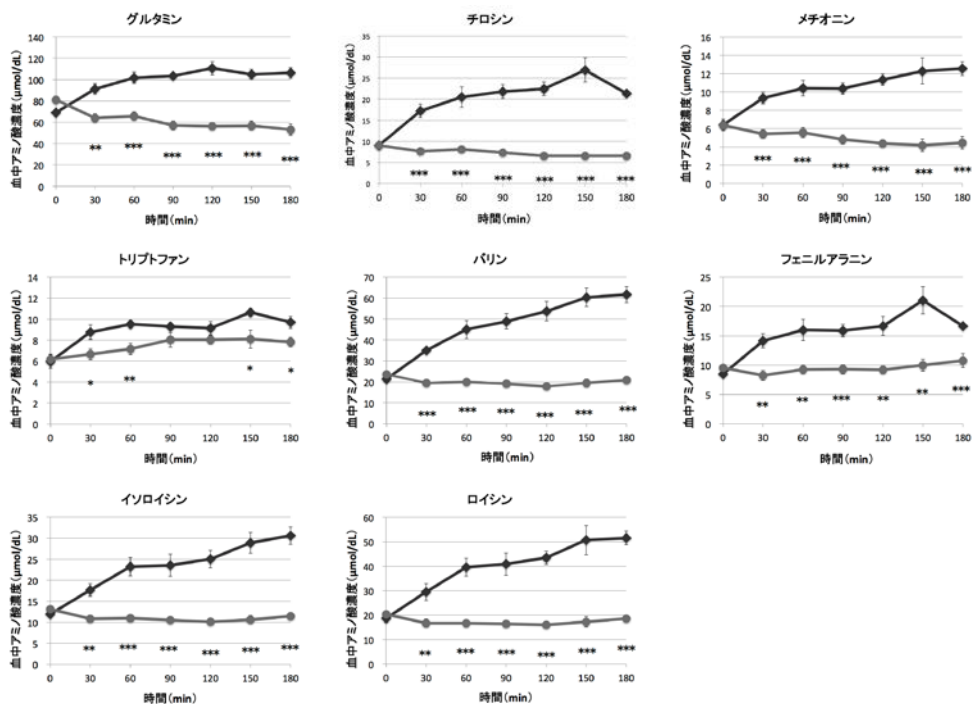


図 4-5. 抹茶抽出物投与群の門脈血中アミノ酸濃度の経時変化
胃・門脈カテーテル留置ラットに、20%抹茶抽出物懸濁液を単回投与（7.2mL/kg）した。試料投与開始後、30 分おきに 180 分まで採血を行い、門脈血中アミノ酸濃度を測定した。



◆カゼイン ●カゼイン+抹茶抽出物

図 4-6. カゼイン投与群およびカゼイン+抹茶抽出物投与群の門脈血中アミノ酸濃度の経時的変化

胃・門脈カテーテル留置ラットに、20%抹茶抽出物懸濁液単回投与(7.2mL/kg)と同時に5%カゼインナトリウム水溶液を11.25mL/kg/hrの速度で持続的に投与した(カゼイン+抹茶抽出物投与群)。対照は5%カゼインナトリウム水溶液を持続投与した(カゼイン投与群)。試料投与開始後、30分おきに180分まで採血を行い、門脈血中アミノ酸濃度を測定した。

mean ± SE (n=6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4.4 考察

動物実験におけるタンパク質の消化吸収に関する報告では、井上ら⁵²⁾は、マウスに多穀麴混合飼料を28日間経口摂取させた後解剖を行い、胃、小腸および大腸を摘出し、これらの内容物中の遊離アミノ酸量を測定、また飼料窒素摂取量と糞便中窒素排泄量からタンパク質の見かけの消化吸収率を算定することにより、多穀麴にはタンパク質分解促進作用を有することを報告している。また福井ら⁵³⁾は、ラットに分離大豆タンパク質を28日間経口摂取させ、摂取窒素量と糞便中窒素量からタンパク質の見かけの消化率を算出し、さらに解剖を行い腹部大動脈より採血し、総タンパク質 (TP)、アルブミン (Alb) など一般血漿成分の測定を行い消化吸収の評価をしたところ、タンパク質の見かけの消化率では有意差が認められたが、TP、Alb などの一般血漿成分では有意差が認められなかったと報告している。このように、これまでに報告されている動物実験におけるタンパク質消化吸収の評価方法は、長期間飼育したのち、飼料窒素摂取量と糞便中窒素排泄量から算出した見かけの消化率を算出する間接的な方法でしか行われていない。

著者らが開発した胃・門脈カテーテル留置ラットは、ラットの胃および門脈にカテーテルを留置し、無麻酔・無拘束下で試料の胃内投与と門脈血の経時的な採取を可能にした実験モデルである。この実験モデルを用いることで、消化管から吸収され、門脈に放出された成分を直接採取することができるため、肝臓における代謝を受けることなく、門脈血中の成分を迅速かつ高感度に測定することができる。そこで本研究では、まず胃・門脈カテーテル留置ラットによりタンパク質の消化吸収の評価が可能か否か検討するため、5%カゼインナトリウム水溶液を持続投与し、門脈血中アミノ酸濃度の経時的な変化を観察したところ、グルタミン、チロシン、メチオニン、トリプトファン、バリン、フェニルアラニン、イソロイシンおよびロイシンの8種類のアミノ酸において、カゼイン持続投与とともに、血中アミノ酸濃度は経時的に上昇し、30分あるいは60分以降180分まで、カゼイン投与前値(0分値)に比し、経時的に有意に高値を示したことから、これら8種類のアミノ酸を指標にすることにより、タンパク質の消化吸収機能を評価できるものと考えられた。0分値との有意な差が認められなかったアラニンおよびグルタミン酸、またカゼインを持続投与してもほとんど変化が見られなかったアスパラギン酸およびグリシンは、もとより血中濃度が高いため、今回のカゼイン投与量では変動が少なく血中濃度の差として

表れなかったものと考えられた。

胃・門脈カテーテル留置ラットによりタンパク質消化吸収機能の評価が可能となったことから、次に抹茶がタンパク質消化吸収に与える影響について検討を行ったところ、カゼイン+抹茶投与群の血中アミノ酸濃度は、グルタミンおよびバリンにおいて、カゼイン投与群に比し有意に低値を示した。一方、チロシン、メチオニン、フェニルアラニン、イソロイシンおよびロイシンでは、カゼイン群と比べて血中濃度の上昇は緩やかだが、有意差は認められなかった。そこで抹茶投与量の増加を試みたが、抹茶懸濁液は粘度があるため、胃カテーテルを通過できる最大濃度が 10%であった。そのため、カテキンがタンパク質の消化吸収に与える影響を検討するため、抹茶懸濁液の代わりに 20%抹茶抽出物懸濁液を調製し、実験を行った。抹茶抽出物がタンパク質消化吸収に与える影響について検討を行ったところ、カゼイン+抹茶抽出物投与群の血中アミノ酸濃度は、0 分値からほとんど上昇することなく対照のカゼイン投与群に比し有意に低値を示した。大西ら⁵⁴⁾は、ラットに緑茶ポリフェノールを混合した飼料を 15 日間経口摂取させ、窒素摂取量と糞中窒素排泄量からタンパク質の見かけの消化率を算出することで、タンパク質消化吸収における緑茶ポリフェノールの影響を間接的に評価し、緑茶ポリフェノールのタンパク質吸収抑制作用を報告している。したがって、カゼイン投与群に比し、カゼイン+抹茶抽出物投与群で血中アミノ酸濃度が低値を示したことより、胃・門脈カテーテル留置ラットを用いることで、抹茶抽出物のタンパク質消化吸収抑制作用を評価できたものと考えられた。

緑茶の茶葉中には 8~20%のカテキン類が含まれており、近年この茶カテキン類の機能性について研究が行われ、様々な生理活性機能が報告されている³⁻⁹⁾。その中でも、食品成分の消化吸収に与える影響に着目してみると、糖質においては α -グルコシダーゼ活性阻害による血糖上昇抑制作用^{3,35)}、脂質においては膵リパーゼ活性阻害による脂質吸収抑制作用^{36,44)}が報告されており、カテキンは消化酵素に特異的に結合することで、糖質および脂質の消化吸収を抑制することが明らかとなっている。そのため、タンパク質の消化吸収においても、タンパク質の消化酵素であるペプシン、トリプシン、キモトリプシンなどと特異的に結合することで、消化酵素の活性を阻害している可能性が考えられる。また本実験では門脈血中のアミノ酸濃度を指標としていることから、今回観察された抹茶抽出物によるタンパク質の消化吸収抑制作用はアミノ酸共輸送体の阻

害による可能性も考えられるが、現在までに抹茶成分によるアミノ酸共輸送体阻害に関する報告はない。また、食物繊維によるタンパク質の吸着については、これまでに報告されていないことから、現在のところ抹茶に含まれるカテキンが、タンパク質の消化酵素を阻害したことにより、タンパク質の吸収を阻害したものと考えている。

以上の結果より、胃・門脈カテーテル留置ラットを用いることにより、タンパク質の消化吸収機能を迅速かつ高感度に評価できるラット実験モデルを新規に開発することができた。また本実験モデルを用いて抹茶のタンパク質消化吸収機能に与える影響を調べたところ、抹茶抽出物がタンパク質の消化吸収を抑制することが明らかとなった。

総括

茶はツバキ科に属する常緑樹の葉から作られ、コーヒー、ココアとともに世界三大嗜好飲料の1つである。そのなかでも緑茶は古くから日本人に親しまれており、1988年にペットボトル茶が発売されて以来、茶の需要は大幅に高まっている。また、茶が重要な嗜好飲料として発展した最大の原動力は、茶特有の化学成分、すなわちポリフェノールであるカテキン類、カフェイン、テアニンなどを含有しているためである。

特定保健用食品の素材としても使用されている茶カテキンの主要成分は、(-)-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) の4種類であり、これまでに血糖上昇抑制作用、抗糖尿病作用、抗肥満作用、血圧上昇抑制作用など様々な疾病予防機能を有することが報告されている。

緑茶は玉露や煎茶など多くの種類に分類することができるが、その中でも抹茶は飲料としてだけでなく、色の美しさや風味づけ、さらには保健的効果を期待して、最近では料理や菓子類への利用が広がっている。

これまでに、緑茶の品質や含有成分、機能性に関する研究報告は数多くあるが、抹茶の品質や含有成分、機能性に関する研究報告はほとんどない。そこで本研究では、抹茶の品質と含有成分との関係について検討し、さらに抹茶の機能性評価を行った。

第1章では、抹茶の品質と含有成分との関係について検討した。すなわち3社(A~C社)の茶舗から品質(価格)の異なる抹茶を5種類ずつ購入し、フォーリン・チオカルト法により総ポリフェノール量、HPLCにより主要カテキン含量および主要アミノ酸含量を測定し、抹茶の品質(価格)と含有成分との関係について検討した。その結果、主要遊離アミノ酸含量はいずれの会社においても、最も品質(価格)の高い抹茶でその含量は最も高く、品質(価格)が低くなるにつれて減少し、最も品質(価格)の低い抹茶でその含量は最も低くなり、主要遊離アミノ酸含量と抹茶の価格との間には、正の相関が認められた。一方、総ポリフェノール量および主要カテキン含量は、最も品質(価格)の高い抹茶でその含量は最も低く、品質(価格)が低くなるにつれて増加し、最も品質(価格)の低い抹茶でその含量は最も高くなり、総ポリフェノール量と抹

茶の価格との間、および、主要カテキン含量と抹茶の価格との間には、負の相関が認められた。以上の結果より、抹茶の品質の決定は、A~C社いずれにおいても、旨味や甘味が多く渋味や苦味の少ない抹茶は高品質、旨味や甘味が少なく渋味や苦味の多い抹茶は低品質と判定されたものと推察され、これは抹茶に含まれる遊離アミノ酸含量、総ポリフェノール量およびカテキン含量が関与しているものと考えられた。

第2章では、抹茶の糖質消化吸収抑制作用について検討した。第1章により、品質の異なる抹茶では、カテキン類をはじめ含有成分に大きな差があることが明らかとなったため、はじめに品質の異なる抹茶の糖質消化吸収抑制作用の比較を検討した。すなわち *in vitro* 実験において、3社の最も高品質な抹茶 (A-1, B-1, C-1) および最も低品質な抹茶 (A-5, B-5, C-5) を用いて、糖質消化酵素である α -グルコシダーゼ (スクラーゼおよびマルターゼ) 活性阻害作用を測定したところ、いずれの会社においても、低品質な抹茶は、高品質な抹茶に比し、強い阻害作用が認められた。次に、胃・門脈カテーテル留置ラットを用いて、3社の最も高品質な抹茶および最も低品質な抹茶の糖質消化吸収抑制作用を評価したところ、いずれの会社においても、低品質な抹茶は、高品質な抹茶に比し、強い糖質消化吸収抑制作用を示した。茶に含まれる茶カテキン類には、 α -グルコシダーゼ活性を阻害することが報告されていること、また第1章において、低品質な抹茶は、高品質な抹茶に比し主要カテキン含量が多いことが明らかになったことから、高品質な抹茶と低品質な抹茶の糖質消化吸収抑制作用の差は、カテキン含量の差によるものであると考えられた。

in vitro 実験および動物実験において、低品質な抹茶は、高品質な抹茶に比し、強い糖質消化吸収抑制作用を有することが明らかとなったことから、次に、低品質な市販抹茶を用いて抹茶含有菓子パン (以下抹茶パン) を調製し、ヒト試験を行った。抹茶パンへの抹茶配合量は、動物実験で得られた結果より推定した。すなわち、胃・門脈カテーテル留置ラットにおいて、市販抹茶および食後過血糖治療薬であるアカルボースの糖質消化吸収抑制作用を比較したところ、ヒトでの医薬品の1回服用量100mgに相当する抹茶量は約6.0gと推定された。抹茶パンはあくまでも食品であることから、医薬品と同等の効果を有する必要はなく、むしろ医薬品との同時摂取などの可能性を考慮すると有効性が確認できる最低限度の配合量が適当であること、また特定保健用食品の効果は医薬品の1/10程度であることが報告されていることから、抹茶の菓子パンへの配合量

も医薬品 1 錠相当量 6.0g の 1/10 程度が適当であると考えられたため、食経験上の安全性や味などの嗜好性を考慮し、抹茶の配合量は、1 食（パン 1 個）あたり 0.75g とし、抹茶パンを調製した。ヒト試験においては、健常人に抹茶パンあるいは抹茶を添加していない対照パンを摂取させ、摂取後の血糖値を測定したところ、抹茶パン摂取群は対照パン摂取群に比し、有意に血糖値の上昇を抑制した。以上の結果より、*in vitro* 実験、動物実験およびヒト試験において、抹茶の糖質消化吸収抑制作用が明らかとなった。

第 3 章では、抹茶の脂質消化吸収抑制作用について検討した。

緑茶は抽出液であることから、食物繊維の含有量が少なく、その影響は少ないと考えられるが、碾茶を石臼で挽いて茶葉ごと摂取できる抹茶は、カテキン以外にも食物繊維を多く含むため、カテキンに加え食物繊維による健康効果も期待できる。そこで、抹茶が脂質の消化吸収に与える影響およびメカニズムについて検討した。

はじめに *in vitro* 実験において、3 社の最も高品質な抹茶（A-1, B-1, C-1）および最も低品質な抹茶（A-5, B-5, C-5）を用いて、脂質消化酵素である腓リパーゼ活性阻害作用を測定したところ、いずれの会社においても、低品質な抹茶は、高品質な抹茶に比し、強い阻害作用が認められた。茶カテキンは腓リパーゼ活性を阻害することが報告されていることから、本実験における低品質な抹茶および高品質な抹茶における腓リパーゼ活性阻害作用の差は、カテキン含量の差によるものであると考えられた。

食物繊維は、消化管内においてゲルを形成し、栄養素の拡散を抑制することで、その吸収を緩慢にする作用を有しているため、抹茶にも脂質が吸着される可能性がある。そこで、試験管内試験により抹茶の脂質吸着能について検討したところ、抹茶は脂質を約 25% 吸着することが明らかとなったことから、抹茶は脂質を吸着することによっても、脂質の消化吸収に影響を与える可能性が考えられた。

次に、胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラットを用いて抹茶の脂質消化吸収抑制作用について検討した。

胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラットは、胃および鎖骨下静脈にカテーテルを挿入留置し、無麻酔・無拘束下で試料の胃内投与と鎖骨下静脈血の経時的な採取により、高感度かつ短時間で脂質の消化吸収の評価を可能にした実験モデルである。しかし、本実験モデルでは、脂肪乳剤（5.0mL/kg/hr）および試料

(5.6mL/kg/hr) の同時持続投与により、試料の脂質消化吸収に与える影響を評価しているため、溶解する試料しか評価できなかった。そこで、本研究では抹茶のような溶解できない試料でも、胃・鎖骨下静脈カテーテル留置ラットを用いて、脂質の消化吸収の評価が可能であるか否か検討した。すなわち、試料の持続投与 (5.6mL/kg/hr) の代わりに、30 分間の試料投与量 (2.8mL/kg/30min) を、30 分おきに 360 分まで間欠的に投与することで、抹茶懸濁液を持続的に投与することとし、抹茶の脂質消化吸収抑制作用を評価したところ、抹茶群の血中 TG 濃度および血中 NEFA 濃度は、対照群に比し、有意に低値を示した。また、血中 TG-AUC および血中 NEFA-AUC においても、抹茶の濃度依存的に有意に減少した。以上の結果より、抹茶は脂質の消化酵素である膵リパーゼ活性を阻害するとともに脂質を吸着することで、脂質の消化吸収を抑制することが明らかとなった。

第 4 章では、抹茶のタンパク質消化吸収抑制作用について検討した。

食品成分がタンパク質の消化吸収機能に与える影響について検討する方法として、ペプシン活性やトリプシン活性を測定する試験管内試験や消化管内の窒素量を測定する動物実験が行われているが、いずれの方法もタンパク質の消化を間接的に測定したもので、実際に消化吸収されたアミノ酸を直接的に測定したものではない。これは、血中アミノ酸濃度を指標としてタンパク質の消化吸収を評価する場合、肝臓における代謝を受ける前のアミノ酸濃度を測定する必要があるが、門脈血を経時的に採取することは、技術的に困難であることが原因である。そこではじめに、無麻酔・無拘束下で門脈血を経時的に採取できる胃・門脈カテーテル留置ラットを用いて、タンパク質の消化吸収を評価できるか否か検討した。胃・門脈カテーテル留置ラットに 5 %カゼインナトリウム水溶液を 11.25mL/kg/hr の速度で持続投与し、門脈血中アミノ酸濃度の経時的な変化を観察したところ、グルタミン、チロシン、メチオニン、トリプトファン、バリン、フェニルアラニン、イソロイシンおよびロイシンの 8 種類の血中アミノ酸において、カゼイン投与前値 (0 分値) に比し、経時的に有意な上昇が認められたため、これら 8 種類のアミノ酸を指標にすることにより、タンパク質の消化吸収機能を評価できることが示唆された。そこで、経時的に有意な上昇を示したこれら 8 種類のアミノ酸を指標として、抹茶がタンパク質消化吸収に与える影響について評価した。

まず、10%抹茶懸濁液がタンパク質の消化吸収に与える影響について検討し

た。胃・門脈カテーテル留置ラットに 10%抹茶懸濁液 7.2mL/kg 単回投与すると同時に 5%カゼインナトリウム水溶液を 11.25mL/kg/hr の速度で持続投与したところ、カゼイン+抹茶懸濁液投与群の血中アミノ酸濃度は、カゼイン群に比し低値傾向を示したものの、有意な差は認められなかった。そこで抹茶投与量の増加を試みたが、抹茶懸濁液は粘度があり、胃カテーテルを通過できる最大濃度が 10%であるため、次に抹茶懸濁液の代わりに 20%抹茶抽出物懸濁液を調製し、抹茶抽出物がタンパク質の消化吸収に与える影響について検討した。胃・門脈カテーテル留置ラットに 20%抹茶抽出物懸濁液 7.2mL/kg 単回投与すると同時に 5%カゼインナトリウム水溶液を 11.25mL/kg/hr の速度で持続投与したところ、カゼイン+抹茶抽出物懸濁液投与群の血中アミノ酸濃度は、カゼイン群に比し、経時的に有意に低値を示した。以上の結果より、抹茶はタンパク質消化吸収抑制作用を有することが明らかとなった。

以上、本研究では、抹茶の品質と含有成分との関係について検討し、さらに抹茶の機能性、すなわち抹茶が糖質、脂質およびタンパク質の消化吸収に与える影響について検討した。

抹茶の含有成分評価では、機能性成分は低品質な抹茶で高く、旨味成分は高品質な抹茶で高いことが明らかとなった。抹茶の機能性評価では、糖質消化吸収においては、抹茶は α -グルコシダーゼ活性を阻害することで糖質の消化吸収を抑制することが明らかとなった。脂質消化吸収においては、抹茶は腓リパーゼ活性を阻害するとともに脂質を吸着することで、脂質の消化吸収を抑制することが明らかとなった。タンパク質消化吸収においては、門脈血中アミノ酸濃度を指標とした、タンパク質消化吸収機能評価モデルを新規に開発した。この方法を用いて、抹茶がタンパク質の消化吸収を抑制することを明らかにした。

謝辞

本研究の機会を与えてくださり、長年にわたり終始御懇切な御指導と御鞭撻を賜りました武庫川女子大学 生活環境学部 食物栄養学科 教授 松浦寿喜先生に謹んで感謝の意を表します。

本研究の実験を進めるにあたり、御指導と御鞭撻を賜りました静岡県立大学 薬学部 名誉教授 富田勲先生に謹んで感謝の意を表します。

文献

- 1) 村松敬一郎：茶の科学. 朝倉書店, 東京, 1991, p77. (ISBN : 4-254-43031-0)
- 2) 衛藤英男, 富田勲, 榛村純一, 伊勢村護, 原征彦, 横越英彦, 山本(前田)万里：新版 茶の機能 -ヒト試験から分かった新たな役割-. 一般社団法人 農山漁村文化協会, 東京, 2013, p.19-25. (ISBN : 978-4-540-13100-4)
- 3) Matsui T., Tanaka T., Tamura S., Toshima A., Tamaya K., Miyata Y., Tanaka K., Matsumoto K. : α -glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J Agric Food Chem.*, 55, 99-105 (2007).
- 4) 丸山広達, 磯博康：緑茶・コーヒーの糖尿病予防効果 -JACC Study の結果から. 糖尿病, 51, 471-472 (2008).
- 5) Murase T., Nagasawa A., Hase T., Tokimitsu I., Shimasaki H., Itakura H. : Dietary tea catechins reduce development of obesity accompanied with gene expression of lipid-metabolizing enzymes in mice. *J Oleo Sci*, 50, 711-715 (2001).
- 6) 原征彦, 外岡史子：茶カテキンのラット血圧上昇に及ぼす抑制効果. 日本栄養・食糧学会誌, 43, 345-348 (1990).
- 7) Fujita Y., Yamane T., Tanaka M., Kuwata K., Okuzumi J., Takahashi T., Fujiki H., Okuda T. : Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse duodenum. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 503-505 (1989).
- 8) Miura Y., Chiba T., Tomita I., Koizumi H., Miura S., Umegaki K., Hara Y., Ikeda M., Tomita T. : Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J.Nutr.*, 131, 27-32 (2001).
- 9) 山本(前田)万里：緑茶の抗アレルギー作用とガン転移阻害効果. 日本食品科学工学会誌, 49, 631-638 (2002).
- 10) 向井俊博, 堀江秀樹, 後藤哲久：煎茶の遊離アミノ酸と全窒素の含量と価格との関係について. 茶業研究報告, 76, 45-50 (1992).
- 11) 桑野和民, 谷丸恵美子, 酒巻千波, 津久井亜紀夫, 三田村敏男：市販緑茶の価格と化学成分の相関. 家政学雑誌, 35, 652-655. (1984).
- 12) 後藤哲久, 長島等, 吉田優子, 木曾雅昭：市販緑茶の個別カテキン類とカ

- フェインの分析. 茶業研究報告, 83, 21-28 (1996).
- 13) 辻正樹 : てん茶の化学成分含有率と品質の関連性. 茶業研究報告, 90, 1-7 (2001).
- 14) 後藤哲久, 堀江秀樹, 向井俊博 : 緑茶中の主要アミノ酸の OPA によるプレカラム誘導体化高速液体クロマトグラフィーによる分析. 茶業研究報告, 77, 29-33 (1993).
- 15) 前田茂, 中川致之 : 各種緑茶の総合的理化学分析. 茶業研究報告, 45, 85-92 (1977).
- 16) 芳野恭士, 廣田雅恵 : 各種ポリフェノールの定量法の比較. 沼津工業高等専門学校研究報告, 34, 147-154 (2000).
- 17) 池ヶ谷賢次郎, 高柳博次, 阿南豊正 : 抹茶の化学成分. 茶業研究報告, 60, 79-81 (1984).
- 18) 化学研究室 : 茶の公定分析法. 茶業試験場研究報告, 6, 167-172 (1970).
- 19) 松浦寿喜, 施紅雲, 作道忠義, 土生允美, 市川富夫 : ラット門脈カテーテル留置法による消化吸收機能の評価法の開発. 消化と吸収, 19, 56-60 (1996).
- 20) 松浦寿喜, 吉川友佳子, 升井洋至, 佐野満昭 : 各種健康茶のラットにおける糖質吸収抑制作用. 薬学雑誌, 124, 214-223 (2004).
- 21) 中村衣里, 吉川友佳子, 戸根瑛美, 木戸和貴子, 松浦寿喜. : 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. 日本食品化学会誌, 19, 124-128 (2012).
- 22) Honda M., Hara Y. : Inhibition of rat small intestinal sucrose and α -glucosidase activities by tea polyphenols. Biosci. Biotech. Biochem., 57, 123-124 (1993).
- 23) Matsumoto N., Ishigaki F., Ishigaki A., Iwashina H., Hara Y. : Reduction of blood glucose levels by tea catechin. Biosci. Biotech. Biochem., 57, 525-527 (1993).
- 24) 吉川雅之, 西田典永, 下田博司, 高田美紀, 河原有三, 松田久司 : Salacia 属植物のポリフェノール成分 : α -グルコシダーゼ及びアルドースレダクターゼ阻害活性成分, Mangiferin, の定量分析. 薬学雑誌, 121, 371-378 (2001).
- 25) 松尾達博 : ラットにおける D-ブシコースの血糖上昇抑制作用. 日本栄養・食糧学会誌, 59, 119-121 (2006).
- 26) 松浦寿喜, 市川富夫 : ラット門脈血中グルコース濃度の変化を指標とした

- D-キシロースの α -グルコシダーゼ阻害作用の評価. 日本栄養・食糧学会誌, 50, 363-368 (1997).
- 27) 松浦寿喜, 吉川友佳子 : 健康食品および特定保健用食品のラットにおけるスクロース消化吸収抑制作用. 食品・臨床栄養, 1, 33-42, (2006).
- 28) Takahashi R. : アンパンブック. 1st Ed., 東京, 主婦の友社, 2010, p.20-29. (ISBN : 4-0727-7612-2).
- 29) 河崎秀明 : おかずパン おやつパン. 1st Ed., 東京, 株式会社グラフ社, 2010, p.44. (ISBN : 4-7662-1363-7)
- 30) 辻良平, 大西剛 : 日本茶巡り, 東京, JTB, 2002, p.69-73. (ISBN : 4-5330-4186-8)
- 31) 中村拓巳, 浅田絵美, 永田佳子, 金沢秀子 : 緑茶飲料中カテキン類のCYP3A4による代謝系への阻害効果の解析. 分析化学, 52, 769-773 (2003).
- 32) 別府秀彦, 松本美富士, 渡邊治夫, 園田茂, 中野達徳, 東口高志, 武重榮子, 椎野由裕, 土井直子, 神保寛 : 難消化性デキストリン含有食品「健糖楽茶」のシヨ糖負荷試験による血糖値抑制効果の検討. 生活衛生, 53, 153-159 (2009).
- 33) 国民健康・栄養調査 (平成元年) , 厚生労働省
- 34) 国民健康・栄養調査 (平成 27 年) , 厚生労働省
- 35) 吉川友佳子, 松浦寿喜, 中村亮太, 山本英樹, 鈍宝宗彦 : ラットにおける各種茶の血糖上昇抑制作用. 日本食品化学学会誌, 13, 51-55 (2006).
- 36) 上田 (吉川) 友佳子, 中村衣里, 橋本ゆかり, 戸根瑛美, 木戸和貴子, 松浦寿喜 : 緑茶, 烏龍茶, 紅茶および普洱茶のラットにおける脂質吸収抑制作用. 日本食品化学学会誌, 20, 147-152, (2013).
- 37) 池上幸江, 大澤佐江子, 町田聖子, 羽田明子 : 正常ラットとマウスの血糖値及び血清・肝臓脂質に対する精製とうもろこし食物繊維の影響. 日本栄養学雑誌, 55, 111-118, (1997).
- 38) 古市幸生, 谷口愛, 堀部敦子, 梅川逸人, 高橋孝雄, 勝呂公明, 今井照夫 : トウモロコシ外皮より調製した水溶性食物繊維のラット脂質代謝に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌, 47, 29-34, (1994).
- 39) 斎藤安弘, 斎藤正実, 山本邦男, 長尾光浩, 山本薫, 松井登, 尾関周二, 鈴木直人 : 大麦若葉不溶性食物繊維摂取がラットの盲腸内有機酸, 糞排泄および臓器重量に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌, 58, 307-313, (2005).
- 40) 腸内細菌情報オフィス 森下芳行 : 腸内細菌を健康に活かすプロバイオテ

- イクスとプレバイオティクス. 日本食物繊維研究会誌, 4, 47-58, (2000).
- 41) 吉川友佳子, 松浦寿喜 : 脂質の消化・吸収に影響を与える食品成分のスクリーニング簡易評価法の開発. 食品・臨床栄養, 3, 3-10 (2008).
- 42) 韓立坤, 李東霞, 向蘭, 弓小杰, 黄堂泰昌, 鈴木公, 奥田拓道 : スピルリナ含まれる腓リパーゼ活性阻害物質の単離及び食後の血中脂質上昇抑制作用. 薬学雑誌, 126, 43-49 (2006).
- 43) 中林敏朗, 伊奈和夫, 坂田完三 : 緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能, 東京, 弘学出版株式会社, 1991, p.10-12. (ISBN : 4-87492-068-3)
- 44) Ikeda I., Tsuda K., Suzuki Y., Kobayashi M., Unno T., Tomoyori H., Goto H., Kawata Y., Imaizumi K., Nozawa A., Kakuda T. : Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. J. Nutr., 135, 155-159, (2005).
- 45) 奥恒行, 池上幸江ら : 食物繊維 基礎と応用. 東京, 第一出版株式会社, 2008, p115-118, 167-171. (ISBN : 978-4-8041-1191-9)
- 46) 高橋陽子 : 繊維質と食物繊維. 日本食品科学工学会誌, 58, 186 (2011).
- 47) 米谷俊, 竹森久美子 : 柿ポリフェノールの機能性. 日本食品科学工学会誌, 63, 331-337, (2016).
- 48) 韓立坤, 浅見悦子, 齋藤雅人 : ラットにおける食後トリアシルグリセロールの上昇に及ぼすタマネギ外皮水抽出物の影響. 栄養学雑誌, 66, 77-81, (2008).
- 49) 太田篤胤 : 難消化性糖質(フラクトオリゴ糖)のミネラル吸収促進作用. 日本栄養・食糧学会誌, 52, 387-395, (1999).
- 50) 松浦寿喜, 岸本三香子, 市川富夫 : フラクトオリゴ糖を添加した成分栄養剤がラットの門脈血中アンモニア, カルシウム, マグネシウムおよびリン濃度に与える影響. 日本栄養・食糧学会誌, 52, 279-284, (1999).
- 51) 戸根瑛美, 橋本ゆかり, 中村衣里, 上田(吉川)友佳子, 木戸和貴子, 田代操, 松浦寿喜 : 水溶性食物繊維とアセトアミノフェンの相互作用. 日本食品化学学会誌, 20, 141-146, (2013).
- 52) 井上美保, 川田あゆみ, 宇野多津子, 今城小百合, 渡辺敏郎, 辻啓介 : マウスにおける多穀麴の蛋白質分解促進効果. 日本醸造協会誌, 102, 847-853, (2007).
- 53) 福井健介, 青山敏明, 橋本征雄, 山本孝史 : ラットの血漿コレステロール値およびタンパク質栄養価に及ぼす分離大豆タンパク質へのエクストルージョ

ン処理の影響. 日本栄養・食糧学会誌, 46, 211-216, (1993).

54) 大西竜子, 伊賀契子, 桐山修八 : 緑茶ポリフェノール摂取はラットのタンパク質利用と盲腸内発酵を抑制する. 日本栄養・食糧学会誌, 58, 199-208, (2005).

論文リスト

1. 本論文と関わりある論文

- 1) 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

中村衣里, 吉川友佳子, 戸根瑛美, 木戸和貴子, 松浦寿喜

日本食品化学学会誌, 19(2), 124-128 (2012)

- 2) 抹茶の品質と糖質吸収阻害作用との関係

中村衣里, 上田友佳子, 橋本ゆかり, 和田宏美, 松浦寿喜

日本食品化学学会誌, 21(3), 163-168 (2014)

- 3) ラット門脈カテーテル留置法におけるタンパク質消化吸收機能評価モデルの開発

中村衣里, 月向さやか, 富田勲, 松浦寿喜

日本食品化学学会誌, 24(2), 69-74 (2017)

2. その他論文

- 1) 市販されている桑の葉健康食品の血糖上昇抑制作用の比較

木戸和貴子, 吉川友佳子, 中村衣里, 橋本ゆかり, 戸根瑛美, 松浦寿喜

日本食品化学学会誌, 19(3), 185-190 (2012)

- 2) 水溶性食物繊維とアセトアミノフェンの相互作用

戸根瑛美, 橋本ゆかり, 中村衣里, 上田(吉川)友佳子, 木戸和貴子, 田代操, 松浦寿喜

日本食品化学学会誌, 20(3), 141-146 (2013)

- 3) 緑茶, 烏龍茶, 紅茶および普洱茶のラットにおける脂質吸収抑制作用

上田(吉川)友佳子, 中村衣里, 橋本ゆかり, 戸根瑛美, 木戸和貴子, 松浦寿喜

日本食品化学学会誌, 20(3), 147-152 (2013)

4) とろみ調整食品に利用される水溶性食物繊維への医薬品の吸着
橋本ゆかり，高井舞，中村衣里，松浦寿喜
日本食品化学学会誌，23(3)，113-117 (2016)

5) ラット門脈カテーテル留置法によるキサントランガムと医薬品の相互作用の
検討
橋本ゆかり，中村衣里，松浦寿喜
日本食品化学学会誌，23(3)，126-132 (2016)