

急性肝炎モデルマウスにおける香煎茶の抗酸化作用

芳野恭士 *1・真壁勇那 *1

Antioxidative Activity of Kosencha Extract on Mouse Model for Acute Hepatitis

YOSHINO Kyoji *1, MAKABE Isana *1

Abstract: Multiple health beneficial effects of tea (*Camellia sinensis*) have been interested worldwide. Kosencha is a secondary processed tea which is produced by treating Yabukita green tea at high temperature and high pressure. Kosencha is characterized by less astringency and bitterness as compared to the original green tea. In this study, preventive effects of Kosencha extract on mouse model for acute hepatitis were examined. Mouse hepatitis model was made by oral administration of carbon tetrachloride. Mice were given with 0.1%, 0.25%, and 0.5% (w/v) aqueous solutions of the extracts of Kosencha and the original Yabukita green tea as a drinking water 24 hr prior to the administration of carbon tetrachloride. Biochemical tests for mouse plasma, liver, and kidney were performed 24 hours after the administration of carbon tetrachloride. The contents of liver triglyceride and total cholesterol, the levels of liver lipid peroxide, and the activities of plasma glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase were significantly increased in mice treated with carbon tetrachloride only as compared to those in healthy mice, so severe fatty liver and hepatitis would be caused in mice administered with carbon tetrachloride. Administration of the extracts of Kosencha or green tea could not prevent these biochemical changes in hepatitis mice except for the case of liver lipid peroxides. Intake of tea extracts significantly suppressed the elevation of liver lipid peroxide levels in hepatitis mice in relation to the doses of water intake. No difference was observed between the effects of the extracts of Kosencha and those of green tea. The antioxidative components in Kosencha would be catechin monomers and their derivatives.

Key Words: Kosencha, Tea, Hepatitis, Carbon tetrachloride, Antioxidative activity

1. はじめに

近年、肥満や生活習慣病と関連のある非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) /非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の日本における患者数の増加が社会問題となっている[1]。また、ウイルス感染が原因とされることが多い急性肝不全も注視されている[2]。肝炎には様々な動物モデルが知られているが、四塩化炭素により実験的に肝硬変を起こさせる手法はこれまでによく用いられてきた[3]。四塩化炭素は、その肝臓壊死などの重篤な急性障害が肝小胞体のチトクローム P-450 系のモノオキシゲナーゼ活性に依存していることから、小胞体によって代謝されてトリクロロメチルラジカルが生成し、これが活性酸素の生成や脂質過酸化反応を起こすために細胞膜の損傷や細胞死が起こるものと考えられている[4]。四塩化炭素による肝炎以外でも、いくつかの抗酸化物質について、脂質過酸化反応や炎症から肝細胞を保護し、肝細胞の壊死を予防

する効果のあることが報告されている[5,6]。肝臓に対して抗酸化作用のあることが知られている緑茶 (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) あるいはそのカテキン成分[7,8]もまた、虚血再灌流で誘導された脂肪肝と肝障害[9]、肥満モデルマウスにおける脂肪肝と肝障害[10]、ガラクトサミン誘発のウイルス性肝炎モデルラットにおける肝障害[11,12]など、様々な肝障害を予防する効果が報告されている。

香煎茶は、ヤブキタ栽培品種の緑茶をさらに加圧加熱処理することで製造され、カテキン類の没食子酸エステルを分解して渋みを軽減するとともに香ばしさを高め、飲み易さを向上させた二次加工茶である[13,14]。我々は、香煎茶に緑茶と同様に抗酸化作用があることを、in vitro の系[15]および糖尿病モデルマウスや高脂食摂取マウスによる in vivo の系[16,17]で確認している。また、ベニフウキ緑茶の香煎茶にマウス皮膚炎に対する抗炎症作用があることも報告している[18]。そこで本研究では、四塩化炭素誘発の急性肝炎モデルマウスにおける、ヤブキタ緑茶から製造した香煎茶の抗酸化作用について検討し、原料茶のそれと比較した。

*1 物質工学科

2. 材料および方法

2. 1 茶抽出物の調製

サンダイヤ社より供与されたヤブキタ緑茶とその香煎茶の茶葉 8 g を、1 L の沸騰水に加えて 10 分間抽出を行った。これらの抽出液を定性ろ紙 No.2 でろ過し、凍結乾燥を行うことで各茶の抽出物を得た。緑茶および香煎茶の抽出物の葉からの収量は、それぞれ 29.3%(w/w)および 30.5%(w/w)とほぼ差が見られなかった。

2. 2 四塩化炭素および茶抽出物のマウスへの投与

平均体重 32.4 g の 4 週齢 ddY 系雄性マウスを、1 群 4 匹として 8 群に分けた。健常群には飲料水として水道水を与え、3 日間飼育した。四塩化炭素投与群には飲料水として水道水を与え、飼育 2 日目に四塩化炭素：オリーブ油混液 (1:1) を体重 100 g あたり 0.6 mL となるように胃ゾンデで経口投与し、3 日目まで飼育した[19]。緑茶抽出物投与群と香煎茶抽出物投与群では、それぞれの抽出物の 0.1%、0.25%、0.5% (w/v) の水溶液を飲料水として与え、飼育 2 日目に肝炎群と同様に四塩化炭素を投与した後 3 日目まで飼育した。飼育期間中、飼料はすべての群でマウス用普通食である PMI 社製粉末飼料 LabDiet 4001 を与えた。四塩化炭素投与 24 時間後にマウスを安楽死させ、肝臓と腎臓および血液を採取した。肝臓と腎臓については、それぞれの重量を測定した後に、肝臓は生理食塩水で灌流し、腎臓は周囲の脂肪を取り除き生理食塩水で洗浄した。0.04M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて、それぞれの 20% (w/v) ホモジネートを調製し、肝臓についてはクロロホルム:メタノール混液 (2:1) で抽出した脂質中のトリグリセリド量と総コレステロール量を和光純薬工業社製臨床検査キットのトリグリセライド E-テストワコーとコレステロール E-テストワコーを用いて測定した。血液は、採取後遠心分離 (4°C, 3000 rpm, 10 分) して血漿を得た。血漿中のトリグリセリド量と総コレステロールを同様の臨床検査キットを用いて測定するとともに、低比重リポタンパク質 (LDL)・コレステロールの量を同社製臨床検査キットの L タイプワコー LDL-C・M とコレステロール E-テストワコーを用いて測定した。また、血漿中のグルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) およびグルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) の活性を、同社製臨床検査キットのトランスアミナーゼ CII-テストワコーで測定した。血漿および肝臓と腎臓の 20% ホモジネートについて、その過酸化脂質レベルをチオバルビツール酸法により測定した[20,21]。

得られた実験データは、平均値±標準偏差で表した。実験群間の差については、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) で解析し、次いで Tukey の多重比較法を用いて検定した。各

測定値間の相関性については、F-検定を用いて検定した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

3. 結果および考察

健常群、四塩化炭素投与群、0.1、0.25、0.5%の緑茶抽出物群または香煎茶抽出物群の飼育データおよびマウス血漿、肝臓および腎臓の生化学的データを表 1 に示す。マウスの飲水量は、平均で 2.6 mL/1 日/1 匹であり、各群間に有意差は認められなかったが、健常群や四塩化炭素投与群に比較して、緑茶抽出物および香煎茶抽出物の 0.5%群では飲水量が低下する傾向があった。この原因として、マウスが最も添加量の多かった茶飲料と普段摂取している水道水との味の違いを感じた可能性が考えられる。

四塩化炭素投与群では、肝臓のトリグリセリド量、総コレステロール量が健常群に比較して有意に上昇し、脂肪肝の形成が推測された。肝臓の過酸化脂質レベルも四塩化炭素の投与で有意に上昇するとともに、肝機能の指標である血漿 GOT 活性、GPT 活性の有意な上昇も見られ、肝障害の発症が確認された。一方、肝臓重量と血漿総コレステロール量は、四塩化炭素の投与により有意に減少した。それ以外の血漿トリグリセリド量、同 LDL-コレステロール量、同過酸化脂質レベル、腎臓重量、同過酸化脂質レベルの測定値については、四塩化炭素投与群と健常群に有意な差は見られなかった。

四塩化炭素の投与前から緑茶抽出物または香煎茶抽出物を摂取していた緑茶抽出物群および香煎茶抽出物群のマウスでは、四塩化炭素投与による肝臓のトリグリセリド量および総コレステロール量、血漿の GOT 活性および GPT 活性の上昇は抑制されなかった。しかし、四塩化炭素投与による肝臓の過酸化脂質レベルの上昇については、緑茶抽出物および香煎茶抽出物の 0.1%と 0.25%の群で添加量依存的に有意に抑制された。いずれの茶の抽出物でも 0.5%の群では過酸化脂質レベルの上昇は抑制されておらず、これらの群では他の添加量の群に比較してマウスによる摂取が十分でなかった可能性がある。なお、緑茶抽出物や香煎茶抽出物の 0.5%群で、肝臓重量と腎臓重量が低かったことについては、これらの重量と実験前のマウスの体重の間に弱い相関がみられたことから、茶抽出物の摂取の影響だけでなくマウスの個体差の偏りが原因であるものと推測される。その他の測定項目では、緑茶抽出物群および香煎茶抽出物群と四塩化炭素投与群の値に有意な差は見られなかったが、血漿 LDL-コレステロール量については、茶の抽出物群で四塩化炭素投与群に比較して値が高くなる傾向が見られた。緑茶カテキンの摂取には、血中 LDL-コレステロール量や肝臓のコレステロール量を低下させる効果のあることが報告されているが、腸管でのコレステロール

表 1 四塩化炭素誘発肝炎マウスに対する香煎茶含有飲料水の摂取の影響

	健常群	四塩化炭素 投与群	四塩化炭素 + 緑茶抽出物群			四塩化炭素 + 香煎茶抽出物群		
			0.1%	0.25%	0.5%	0.1%	0.25%	0.5%
飲水量 (mL/日/マウス)	2.6 ± 1.3	2.4 ± 1.4	3.3 ± 0.1	3.0 ± 0.3	1.9 ± 1.4	2.7 ± 0.7	2.8 ± 0.5	1.7 ± 0.9
血漿								
TG (mg/dL)	92.0 ± 8.6	109.5 ± 23.4	108.7 ± 39.5	89.3 ± 13.3	100.0 ± 24.3	130.0 ± 8.2	108.5 ± 16.5	133.0 ± 27.8
T-Chol (mg/dL)	75.6 ± 17.4*	54.3 ± 8.9	57.5 ± 15.7	56.6 ± 11.0	51.2 ± 8.2	51.1 ± 1.5	58.5 ± 5.1	61.5 ± 5.0
LDL-Chol (mg/dL)	13.5 ± 7.3	14.6 ± 2.9	26.8 ± 2.7	27.0 ± 3.6	25.1 ± 1.7	23.9 ± 7.3	22.7 ± 4.1	22.7 ± 9.3
LPOx (nmol/mL)	6.0 ± 0.2	5.5 ± 1.5	5.4 ± 0.2	5.4 ± 1.2	5.0 ± 1.0	4.4 ± 1.0	4.4 ± 1.1	4.8 ± 0.8
GOT (IU/L)	20.4 ± 7.7**	625.0 ± 16.9	644.9 ± 15.2	652.9 ± 16.6	646.9 ± 10.9	640.9 ± 8.7	629.4 ± 18.9	601.9 ± 5.1
GPT (IU/L)	11.2 ± 3.7	209.8 ± 109.5	165.4 ± 35.8	197.0 ± 123.6	213.7 ± 114.0	254.9 ± 185.4	177.7 ± 87.0	234.8 ± 55.4
肝臓								
WT (g)	2.19 ± 0.18*	1.95 ± 0.09	1.85 ± 0.15	1.90 ± 0.15	1.50 ± 0.06**	1.95 ± 0.11	1.78 ± 0.15	1.58 ± 0.12**
TG (mg/g)	37.0 ± 13.9*	74.6 ± 17.3	73.6 ± 25.4	76.1 ± 10.2	74.8 ± 15.0	83.9 ± 3.5	71.6 ± 18.5	84.7 ± 0.8
T-Chol (mg/g)	4.3 ± 1.6**	10.2 ± 2.7	11.1 ± 2.1	9.3 ± 2.6	12.1 ± 1.8	11.9 ± 1.8	10.5 ± 1.4	11.4 ± 0.7
LPOx (nmol/g)	61.8 ± 4.2**	249.7 ± 74.4	81.5 ± 8.1*	80.5 ± 26.7*	214.3 ± 96.5	90.3 ± 14.7*	70.7 ± 28.6**	245.4 ± 126.7
腎臓								
WT (g)	0.54 ± 0.05	0.57 ± 0.05	0.56 ± 0.09	0.49 ± 0.03	0.49 ± 0.01	0.59 ± 0.06	0.47 ± 0.05*	0.42 ± 0.04**
LPOx (nmol/g)	102.3 ± 8.6	94.5 ± 21.3	86.2 ± 20.7	111.8 ± 11.7	107.9 ± 21.3	104.1 ± 16.1	114.8 ± 5.4	111.4 ± 20.6

TG, トリグリセリド量; T-Chol, 総コレステロール量; LDL-Chol, 低比重リポタンパク質-コレステロール量; LPOx, 過酸化脂質レベル; GOT, グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ活性; GPT, グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ活性; WT, 重量。

マウスは各群4匹。マウスに茶抽出物含有飲料水を自由摂取させて24時間後に四塩化炭素を投与し、さらに24時間後に生化学的検査を行った。

四塩化炭素投与群との統計学的有意差: * p<0.05, ** p<0.01。

測定値間の有意な正の相関: p<0.01; 血漿GOT-血漿GPT, 血漿GOT-肝臓TG, 血漿GOT-肝臓T-Chol, 血漿GPT-肝臓TG, 血漿GPT-肝臓T-Chol, 肝臓TG-肝臓T-Chol。

測定値間の有意な負の相関: p<0.05; 飲水量-肝臓LPOx, 血漿LPOx-肝臓T-Chol, 肝臓WT-肝臓T-Chol, 腎臓WT-腎臓LPOx; p<0.01; 血漿T-Chol-血漿GOT, 血漿T-Chol-血漿GPT, 血漿T-Chol-肝臓TG, 血漿T-Chol-肝臓T-Chol。

の吸収の抑制[22]、胆汁コレステロールの分泌の促進[23]、肝細胞からのアポリポタンパク質 B の分泌の抑制[24]あるいは肝細胞の LDL 受容体の発現上昇[25]など、その作用機序は複数あることが考えられ複雑である。本実験では、茶の抽出物の影響だけでなく、四塩化炭素の肝障害による血中脂質と肝臓脂質の変動が関わっているため、血中 LDL-コレステロール値が茶抽出物群で高い傾向が見られた機構を理解することは難しいものと考えられる。

各測定値の間の相関関係からは、四塩化炭素の投与によりマウスの肝臓で酸化ストレスが高まり脂質が酸化されたことで、血中のトリグリセリドやコレステロールといった脂質が肝臓に補填されて脂肪肝が形成され、蓄積された脂質がさらに酸化されて細胞障害が起きたことで血中の肝機能マーカーである GOT 活性や GPT 活性が上昇したことが推測される。緑茶抽出物と香煎茶抽出物の摂取は、四塩化炭素によるマウス肝臓中の酸化ストレスをある程度抑制する機能は発揮したものの、今回の実験では四塩化炭素による脂肪肝と肝障害の程度が強かったため、肝臓の炎症を十分に抑制することまではできなかったものと考えられる。なお、マウスの飲水量と肝臓の過酸化脂質レベルとの間には負の有意な相関性が見られ、茶の抽出物の摂取量と肝臓での酸化ストレス抑制作用には一定の関係があったものと考えられる。

緑茶の抽出物に含まれる抗酸化成分としては、多量に含まれるカテキン単量体が考えられる。香煎茶の原料緑茶葉中のカテキン単量体の総量は 7.99% (w/w) と、その総ポリフェノール量 9.28% (w/w) の約 86% を占める[14]。一方、香煎茶葉中の総ポリフェノール量は 8.29% (w/w) と原料緑茶中の量の約 89% を保持しているが、カテキン単量体の総量は 4.40% (w/w)

と緑茶に比較して半減している。香煎茶の加工により没食子酸は 0.02% (w/w) から 0.11% (w/w) に増加しており、カテキンの没食子酸エステルの分解により渋みが軽減していると考えられるが、増加した没食子酸の量は香煎茶中のカテキン単量体以外のポリフェノールの量に当たる 3.89% (w/w) の 3% 程度でしかない。従って、香煎茶にはカテキン単量体および没食子酸以外のポリフェノールが約 46% 含まれていることになる。香煎茶に約半量が残存するカテキン単量体は、香煎茶の抗酸化作用に寄与しているものと考えられるが、緑茶と香煎茶の抗酸化作用が同程度であることから、カテキン単量体以外のポリフェノールもその作用に関与しているものと予想される。二次加工茶の一つで、緑茶を加熱処理することで製造されるほうじ茶にカテキンの重合物や分解物が含まれると考えられることから[26,27]、香煎茶にも同様の成分が含まれるものと予想している。今後、その有効成分について検討する必要がある。

4. まとめ

本実験では、マウスに四塩化炭素を投与して肝障害を起こさせた際の、ヤブキタ緑茶とその香煎茶の抽出物を添加した飲料水の自由摂取の影響を検討した。四塩化炭素の投与で発症した脂肪肝と肝障害は、いずれの茶の抽出物の摂取によっても改善されなかった。しかし、0.1%あるいは0.25%の各茶抽出物を含む飲料水を摂取したマウスでは、肝臓の過酸化脂質レベルの上昇抑制効果が見られた。緑茶と香煎茶で本効果に差は見られず、渋みを抑えた香煎茶はより摂取しやすい飲料と考えられる。今回の実験では茶の抽出物の摂取による肝障害の悪化は認められなかったが、緑茶サプリメントの摂取

が肝障害と関係すると考えられる症例の報告もあることから [28]、大量の摂取には注意する必要があるものと考えられる。

参考文献

- [1] 岡上 武, 西原利治, 他 (2006): 肝臓, **47**, 529-549.
- [2] 持田 智 (2016): 日内会誌, **105**, 1463-1471.
- [3] Brattin, W. J., Glende, E. A. (1985): *Free Radical Biol. Med.*, **1**, 27-28.
- [4] Ghoshal, A. K., Recknagel, R. O. (1965): *Life Sci.*, **4**, 2195-2209.
- [5] Yoshikawa, T., Furukawa, Y., *et al.* (1996): *Digestion*, **25**, 222-229.
- [6] von Herbay, A., Stahl, W, *et al.* (1996): *Free Radical Res.*, **25**, 461-466.
- [7] Yoshino, K., Hara, Y., *et al.* (1994): *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 146-149.
- [8] Sano, M., Takahashi, Y., *et al.* (1995): *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1006-1008.
- [9] Fiorini, R. N., Donovan, J. L., *et al.* (2005): *Liver Transpl.*, **11**, 298-308.
- [10] Bruno, R. S., Dugan, C. E., *et al.* (2008): *J. Nutr.*, **138**, 323-331.
- [11] Abe, K., Ijiri, M., *et al.* (2005): *Biomed. Res.*, **26**, 187-192.
- [12] Sugiyama, K., He, P., *et al.* (1999): *J. Nutr.*, **129**, 1361-1367.
- [13] 清水康夫 (2014): 交流 **53**, 20-21.
- [14] 芳野恭士, 清水康夫, 他 (2015): *New Food Industry*, **57**, 1-10.
- [15] 芳野恭士, 杉本奈央, 他 (2018): *J. Technol. Educ.*, **25**, 37-45.
- [16] 芳野恭士, 芳野広起, 他 (2019): 沼津工業高等専門学校研究報告, **53**, 47-51.
- [17] 芳野恭士, 真壁勇那, 他(2022): *New Food Industry*; **64**, 441-446.
- [18] 芳野恭士, 石川伸之輔, 他 (2019): 沼津工業高等専門学校研究報告, **53**, 53-55.
- [19] 芳野恭士 (1991): 沼津工業高等専門学校研究報告, **25**, 67-71.
- [20] K. Yagi (1976): *Biochem. Med.*, **15**, 212-216.
- [21] 真杉文紀, 中村哲也 (1997): ビタミン, **51**, 21-29.
- [22] Ikeda, I., Imasato, Y., *et al.* (1992): *Biochim. Biophys. Acta*, **1127**, 141-146.
- [23] Hirsova, P., Kolouchova, G., *et al.* (2012): *Eur. J. Pharmacol.*, **691**, 38-45.
- [24] Yee, W. I., Wang, Q., *et al.* (2002): *Mol. Cell. Biochem.*, **229**, 85-92.
- [25] Bursill, C. A., Roach, P. D. (2007): *Lipids*, **42**, 621-627.
- [26] Nakagawa, M. (1967): *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1283-1287.
- [27] 芳野恭士, 青木実苗, 他 (1995): 日本食品化学学会誌, **2**, 9-13.
- [28] Bonkovsky, H. L. (2006): *Ann. Intern. Med.*, **144**, 68-71.