博 士 論 文

植物性食品に含まれるポリフェノール成分とその生体機能調節作用に関する研究

1997年3月

新潟大学大学院 自然科学研究科
生命システム科学専攻

立山 千草

STUDIES ON POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN DIETARY PLANTS AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITES

Doctoral Program in Biosystem Science
Graduate School of Science and Technology
Niigata University

DOCTORAL THESIS

by

Chigusa Tateyama

March 1997

目次

第１章　序論…… 1

第２章　食用花弁のポリフェノール類含有量と抗酸化活性

2-1　緒言…… 9

2-2　実験方法……10

2-2-1 供試試料及び試薬……10

2-2-2 試料溶液の調製法……10

2-2-3 ポリフェノール，アントシアニン．フラボノールの定量法……10

2-2-4 抗酸化活性の測定法……14

2-3　実験結果及び考察……15

2-3-1 ポリフェノール類の含有量……15

a) ツバキ科 ……15

b) バラ科 ……20

c) キク科 ……20

2-3-2 各種花弁抽出液の抗酸化活性……20

2-3-3 各種花弁抽出液のポリフェノール類含有量と抗酸化活性……21

a) ツバキ科 ……21

b) バラ属 ……27

c) バラ属以外のバラ科 ……27

d) キク科 ……27

2-4　要約……28

第３章　食用花弁抽出液のフリーラジカル消去活性

3-1　緒言……29

3-2　実験方法……30

3-2-1 供試試料及び試薬……30

3-2-2 試料溶液の調製法……30

3-2-3 フリーラジカル消去活性の測定法……32

a) DPPHラジカルの消去活性 ……32
b) ヒドロキシルラジカルの消去活性 ……32
c) スーパーオキシドの消去活性 ……32
3-2-4 ポリフェノールの定量法……35
3-2-5 抗酸化活性試験の測定法……35
3-3 実験結果及び考察……36
3-3-1 各種花弁抽出液のフリーラジカル消去活性とポリフェノール含量……36
3-3-2 各種花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性 ……36
a) 各種花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性とポリフェノール含有量 …36
b) 各種花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性と抗酸化活性 ……36
3-3-3 各種花弁抽出液のヒドロキシルラジカル消去活性と
ポリフェノール含量……41
3-3-4 各種花弁抽出液のスーパーオキシド消去活性とポリフェノール含量……41
3-3-5 茶浸出液（ローズティ・煎茶）のDPPHラジカル消去活性 ……44
3-4 要約……47

第４章 茶葉の血小板凝集抑制作用
4-1 緒言……48
4-2 実験方法……49
4-2-1 供試試料及び試薬……49
4-2-2 茶浸出液の調製……51
4-2-3 血小板凝集惹起物質の調製……51
4-2-4 HPLCの測定条件 ……51
4-2-5 血小板凝集抑制作用の測定……51
4-3 実験結果及び考察……55
4-3-1 茶浸出液の血小板凝集作用……55
a)浸出条件と血小板凝集抑制作用 ……55
b)各種茶浸出液の血小板凝集抑制作用 ……55
4-3-2 茶浸出液の血小板凝集曲線とHPLC分析 ……56
4-3-3 主な茶葉成分の血小板凝集抑制作用……56

4-2-4 茶浸出液中の有効成分についての検討……59
4-3-5 血栓症予防における茶浸出液の有効量の考察……59
4-4 要約……64

第５章 総括……65

謝辞……69
参考引用文献……70
Summary……74

略語

HPLC	high performance liquid chromatography
BHA	3(2)-*t*-Butyl-4-hydroxyanisole
BHT	2,6-Di-*t*-butyl-4-methylphenol
ESR	electron spin resonance
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide
DETAPAC	diethylenetriamine pentaacetic acid
XOD	xanthine oxidase
C	catechin
EC	epicatechin
GC	gallocatechin
EGC	epigallocatechin
ECg	epicatechin gallate
EGCg	epigallocatechin gallate
TFF	theaflavin free
TFMg-A	theaflavin mono gallate-A
TFMg-B	theaflavin mono gallate-B
TFD	theaflavin di gallate
ADP	Adenosine-5'-diphosphoricacid
PRP	Platelet Rich Plasma
PPP	Platelet Poor Plasma

第1章　序論

食品の役割に対する価値観は時と共に変化を遂げるものであり，それに従い食品の研究も推移していく．

近年，終戦から30年頃までは，食品にはヒトの体の成長・維持に必要な炭水化物，タンパク質，脂質，ビタミン，ミネラルなどの栄養素の質と量が，食品・食品素材としての優劣を左右するものと考えられてきた．そのため，栄養学の研究も古くは栄養素のもつ，生体を構成する素材およびエネルギー供給源としての栄養・エネルギー性機能（一次機能）の解明に大きなウエイトが置かれてきた．時代が高度経済成長期に入ると人々は食品においしさ，感覚嗜好機能（二次機能）を求めるようになり，食品学は栄養と嗜好を主流に研究が進められてきた．そして，最近昭和50年後半頃からは，高齢化社会の到来が現実の問題として捉えられ，食生活の面においても，健康で長生きできる食べ方に注目されはじめるとともに，生活習慣病（成人病）を予防できる食品の選択に関心が集まっている．これらに適切に対処するために，免疫系・分泌系・神経系・循環系・消化系といった生体の生理系統を調節することによって病気を予防する生体調節機能（三次機能）を有する食品の三次機能成分の探索研究が盛んに世界各国で行われるようになっている．これは，食品が栄養および嗜好だけでなく，生体内における生体防御，体調調節，精神調節などの高次の生命の恒常性（ホメオスタシス）の維持と活性化に関与しているという考えに基づいているものである．

これら食品のもつ生理機能については，その一部は科学的根拠が明らかにされているものの，まだ伝承的なものも多く，学術的には未解決な問題が多く残されている．また，食品中のいろいろな成分が関与するといわれている生体機能は極めて広範囲に渡っている（表1-1）．このような生理機能の調節や恒常性の維持に関与する物質は，多種類の食品中に存在するといわれており，特に植物起源の食品素材は注目を集めている．

食品中の生理活性成分を分子レベルでみると，分子の大きさでは2000以下の低分子物質から，数万以上の高分子物質にまでわたるといわれており，前者には多種類の天然有機化合物が包含され，後者ではタンパク質を中心に多糖にまでおよんでいる．低分子有機化合物は，食用植物，特に野菜，穀物や果物類にも含まれており，

表1-1　食品成分の関与が知られている生体機能調節機能[1)]

免疫系	免疫増強，マクロファージ活性化
分泌系	成長ホルモン，インスリン，アドレナリンなどの分泌機能増強
神経系	脳神経調節，鎮静
循環系	赤血球産生，血圧降下，抗血栓，コレステロール低下作用
消化系	カルシウム，アミノ酸の吸収促進，腸管エネルギーの補給，回腸平滑筋の収縮，腸内細菌の制御(整腸作用)
細胞系	成長・分化因子，抗菌・抗ウイルス作用，細胞膜保護(抗酸化，酸化障害の防御)
抗腫瘍	抗変異原(抗イニシエーション)，抗プロモーーション

速効的な生理活性は示さず，温和な生理活性を示すものが多い．

これらの温和な生理作用は，生体の恒常性維持に役立っているものが多く，野菜由来の生薬で例えばニンニク，ショウガ等があげられる．また，その結果を示唆する事柄のひとつとして，野菜や果実など植物性食品をよく摂取するヒトにはガンをはじめとして，種々の成人病の罹患率や死亡率が低いことが疫学調査でも示されている[2)]．

表1-2に，食用植物を中心とする植物起源の低分子有機化合物で，種々の生理作用を示すことが知られている物質を示した．表1-2に示したように，ポリフェノール類は，表1-1に示した多くの生理作用に寄与している．これは，栄養成分以外ではポリフェノール類が多種類の食品中に存在していること，また，ポリフェノール類は動物細胞に対して親和性が高く，動物の生体機能に対して影響を及ぼすことを示唆している．

野菜，お茶，果物，嗜好性食品などには，フラボノイド，ヒドロキシ桂皮酸類，アントシアニンが含まれることが多い．アメリカ人では，一人一日当たりのフラボノイド摂取量は1gに達するといわれている．また，最近では，赤ワインの摂取量の多いフランス人は，飽和脂肪酸を多く含む高脂肪食を摂取する機会が多いにもかかわらず，赤ワインの摂取量の少ない他の欧米諸国のヒトに比べて，心臓疾患の罹病率が低いことが明らかになり，フレンチパラドックスとして注目を浴びている[3)]．

このようにポリフェノールは，日常の摂取量が多いばかりでなく，*in vitro* で示す抗酸化能や*in vivo* で示す発ガン抑制作用をはじめとする多様な機能が期待されている．

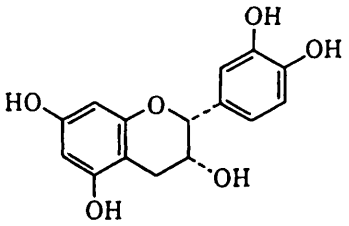
現在，ポリフェノール類に期待される機能のひとつとして抗酸化作用の機構は，ポリフェノールが，共存物質を還元し，酸化を抑制することに由来しているといわれている．

ポリフェノール類は，ごく緩和な条件（pH 5.4程度，室温）で溶液中の遷移金属イオンであるCu^{2+}，Fe^{3+}，Cr^{6+}などをそれぞれCu^{+}，Fe^{2+}，Cr^{3+}などに還元する．このとき，ポリフェノールの分子は，キノン構造へと酸化されると同時に，相手を還元するといわれている．このようにポリフェノールが酸化されやすいという性質は，アルコール性水酸基をもつ化合物とは異なり，フェノール性水酸基がイオンに解離しやすいこととも関係があるとされている[4)]．

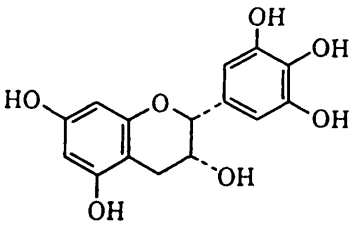
表1-2　食用植物中生理機能を示す低分子有機化合物[1)]

生理作用	機能性物質
抗ガン性 (抗プロモーション作用も含む)	エラグ酸，コーヒー酸，ジンゲロール，クマリン，ベンズアルデヒド，ポリゴディアール，バニリン，ナリンジン，ルチン，イソビテキシン，ケンフェロール，トコフェロール，カロテン
抗変異原性	ＮＤＧＡ，アスコルビン酸，トコフェロール，システイン，コーヒー酸，ケイ皮酸
抗炎症性	ケルセチン，オイゲノール，ダイゼイン，クマリン，ケンフェロール，ナリンジン，ショウガオール，ジンゲロン，ルチン
抗アレルギー性	グリチルリチン，ヘスペリジン，テルピネオール
抗菌性(抗カビ，抗ウイルス，細胞毒性をも含む)	ＮＤＧＡ，コーヒー酸，エラグ酸，カテキン，アリル２－プロペンチオスルフィナート，α－テルチエニル，チモール，アリルイソチオシアナート
抗酸化性	ケルセチン，オイゲノール，没食子酸，ＮＤＧＡ，コーヒー酸，カテキン，セサミノール，チモール，トコフェノール
抗腫瘍性	オイゲノール，ＮＤＧＡ，シンナムアルデヒド，ナリンジン，ジンギベレン
酵素阻害作用	
リポキゲナーゼ阻害	クロロゲン酸，ρ－クマル酸，カテキン，ＮＤＧＡ，ケルセチン，ルチン
キサンチンオキシダーゼ阻害	没食子酸，エラグ酸，カテキン
シクロオキシゲナーゼ阻害	ジンゲロール，アホエン，α－スルフィニルジスルフィド，オイゲノール
アンジオテンシン変換酵素阻害	没食子酸，エラグ酸
抗血小板作用(血小板凝集阻害)	オイゲノール，アホエン，ジンゲロール，α－スルフィニルジスルフィド，メチルアリルトリスルフィド，ケルセチン，アデノシン，ラブダンジアルデヒド
抗喘息性	アリルイソチオシアナート，ベンジルイソチオシアナート，グリチルリチン，テオブロミン，テルピネオール
抗ヒスタミン，抗セロトニン作用	ジンゲロール，エレミシン，ケンフェロール，ルテオリン
低コレステロール作用	ジアリルジスルフィド，ガロカテキンガレート，フルクトオリゴ糖，イソマルトオリゴ糖
血糖低下作用	ギムネマ酸

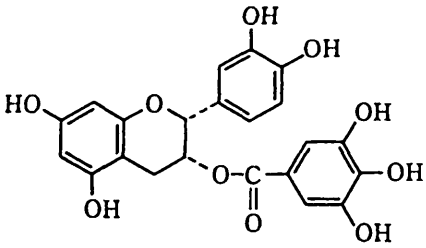
ＮＤＧＡ：ノルジヒドログアル酸



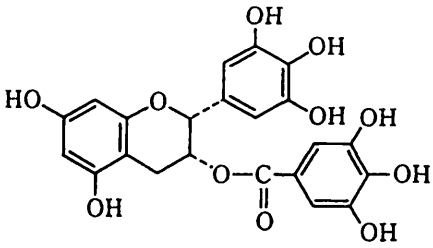
エピカテキン(EC)



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)

図 1-1 茶カテキン類の構造式

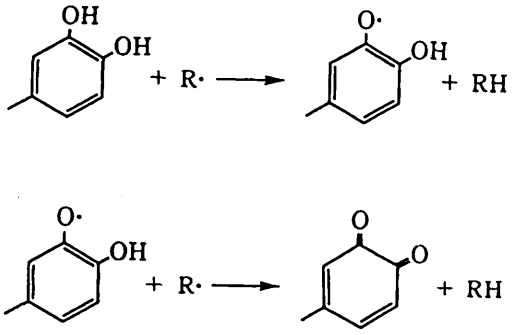


図 1-2 カテキン類の抗酸化機構

一方，これとは異なる作用機構によってもポリフェノールは共存物質の酸化を抑制すると考えられている．それは，ポリフェノール物質のもつラジカル捕捉効果である．しかしながら，例えばフラボノイドについてみても，フラボノイドの構造と抗酸化作用との相関性については多くの研究がなされているのもかかわらず，いまなおいくつかの説があり，十分には解明されていない．それら諸説の中で共通していることとして，フラボノイドのB環に存在するカテコール構造があげられる．佐野は茶カテキン類の抗酸化作用をこのB環のもつカテコール構造で説明している[5]（図 1-1，図 1-2）．すなわち，脂質の過酸化反応により生成する脂質ペルオキシルラジカルに対し，カテキン類のフェノール性水酸基が水素原子を供与して，脂質ラジカルの連鎖反応が停止する．一方，フェノキシルラジカルとなったカテキンはさらにもうひとつのラジカルを捕捉し，キノン構造をとり安定化するというものである．

この作用機構は，α-トコフェロールが，フェノール性水酸基から生じる安定フリーラジカルに基づいて抗酸化作用を示すことと似ており，ゴマ成分のセサミノールなどの抗酸化作用も同様と考えられる．また，合成抗酸化剤にもポリフェノールまたはフェノール性のものは多く，3(2)-*t*-Butyl-4-hydroxyanisole（butylatedhydroxyanisol=BHA），2,6-Di-*t*-butyl-4-methylphenol（butylatedhydroxytoluene=BHT）もフェノール性抗酸化剤である．しかし，これらは極めて強い抗酸化剤でありながら安全性に不安があり，実際上ほとんど使用されていない．

さらに，天然ポリフェノール類には分子内にフェノール性水酸基の数が多く，かつ分子が大きいという構造上の特徴があり，このことが抗酸化効果の持続性を支えていると考えられている[4]．

そこで，このような観点から本研究は，ポリフェノールを多く含む植物性食品の生体調節機能性因子の実態を研究するために，植物性食品を材料として，抗酸化活性，活性酸素・フリーラジカル消去活性および血小板凝集抑制作用などの生体調節機能について検討を行い，機能性を有する食品とその食品に含まれるポリフェノール成分との関連性について明らかにすることを目的とした．

研究に用いた試料は，食用花弁および茶葉（緑茶，紅茶，中国茶）とした．花菜に分類される食用花弁は，その形状からも示されるように鮮やかな色彩を呈してい

るものが多く，花弁色素の構成にはポリフェノール類が大きく関与している[6]．しかし，それら花弁におけるポリフェノール成分について広く定量的に調べられらた報告はほとんどなく，生理活性についての報告も少ない．一方，茶葉の生理活性機能については，茶の主要成分で渋味，苦味の本体であるカテキン類を中心に数多くの報告があり（表1-3），最も生理機能の解明が進んでいる食品のひとつといえる．

このような背景から，食用花弁においては，最も身近で摂取量の多い花弁を選んで，そのポリフェノール類含有量の測定を行った．また，種々の生理活性が期待されるポリフェノール成分に着目して，抗酸化活性の試験および生体系における老化や発ガンの原因になるえる活性酸素・フリーラジカルの消去活性の試験を測定方法を含めて検討をおこない，これらの結果に基づいて，花弁における生体防御機能調節因子についての一考察を行った．茶葉については，日常飲用する茶浸出液におけるプロスタグランジンの生合成により促進される血小板凝集に対する抑制作用について検討を行った．なお，茶浸出液の主要成分であるカテキン類とテアフラビン類が同時に分析できるHPLC分析法についても検討を行った．テアフラビン類は，とくに紅茶の品質では極めて重要な成分である．また最近，多様な遺伝子障害を抑制することが明らかにされるなどその生理機能についても注目されている[7]．

以下に得られた結果を詳述する．

表1-3　茶カテキン類の生理活性機能[8)]

抗酸化作用	松崎，原ら(1985)；Namiki et al.(1986)
抗突然変異作用	Okuda et al.(1984)；Kada et al.(1985)
抗ガン作用	Mukuta et al.(1988)；Oguni et al.(1989)
血漿コレステロール低下作用	Muramatsu et al.(1986)
LDL酸化防止作用	三浦，富田ら(1993)
血圧上昇抑制作用	原ら(1987)
血糖上昇抑制作用	Hara et al.(1990)
血小板凝集抑制作用	並木ら(1991)
抗菌作用	原ら(1989)；Toda et al.(1991)
抗ウイルス作用	中山，島村ら(1989)；小野ら(1991)
虫歯予防作用	Sakanaka et al.(1989)；原ら(1989)
腸内フロラ改善作用	Ahm et al.(1990)
抗アレルギー作用	前田ら(1987)

第2章　食用花弁のポリフェノール含有量および抗酸化活性

2-1　緒言

近年，日常に摂取する植物性食品中に含まれる抗酸化成分は，単に食品の酸化による劣化の抑制だけでなく，生体における活性酸素・フリーラジカルにより引き起こされる酸化的傷害を抑制し，最終的には種々の疾患の予防に寄与するものとして注目されている[1]．植物起源の抗酸化物質としては，果物や緑黄色野菜に含まれるα-カロテン，β-カロテンやゼアキサンチンといったカロテノイド類，アスコルビン酸およびフラボノイド類がよく知られており[2)~6)]，また茶葉のポリフェノール成分であるカテキン類による抗酸化活性についても報告されている[7]．

植物の花には，花菜として食用にされるものがあり，近年の食生活の洋風化・多様化に伴い，食用菊などの伝統的なものに加え，視覚を重視したエディブルフラワーやハーブとして新たな需要が増大し，現在，供給量を別にすると50種類を越える花が食用に利用されており[8) 9)]，今後その種類，量ともに増えるものと思われる．

これまで，花に関する化学的研究の大部分は，その色素の天然物有機化学的研究[10)]が主なものであった．一部，生薬的立場での研究[11)~13)]も見られる．これらに対して，食用としての立場での研究は少なく，主として食文化的[14)]なものに限られ，ことに食品としての特性や機能についての研究は全くなされていない．

著者らは，現在食用に用いられるている花弁を対象として，抗酸化機能を有する物質として注目を集めているポリフェノール類を中心にその成分と機能性について研究を行っているが，ここでは主にツバキ科，バラ科，キク科の花弁について各種ポリフェノール含有量と抗酸化活性について調べた結果を述べる．

2-2　実験方法

2-2-1　供試試料及び試薬

実験に用いた花弁はツバキ科 22 種，バラ科 46 種（内バラ属 18 種），キク科 11 種，その他 16 種の合計 95 種である（表 2-1）．供試試料は，新潟市大形地区および新潟県園芸試験場から提供されたものおよび市販のものを用いた．

試薬：リノール酸，ナカライテスク製特級品，

その他の試薬は和光純薬製の特級品を使用した．

シアニンは新潟大学星野力教授の好意より分与された．

煎茶は静岡産の市販品を使用した．

2-2-2　試料溶液の調製法

試料花弁は採取後，直ちに水洗し，凍結乾燥した．

この凍結乾燥物から下記の方法により抽出液を調製した．

① 50%メタノール pH 2.0 抽出液：乾燥物 0.1g を 0.1M クエン酸緩衝液（pH 2.0）とメタノールの 1:1（v/v）混合液 20m*l* とともにテフロンホモジナイザーで磨砕抽出し，No.2 濾紙で濾過後，残渣の洗液を合わせ 50m*l* に定容した．

② 80%メタノール pH4.5 抽出液：乾燥物 0.1g を 0.1M 酢酸緩衝液（pH 4.5）とメタノールの 2:8（v/v）混合液 20m*l* と共にテフロンホモジナイザーで磨砕抽出し，No.2 濾紙で濾過後，残渣の洗液を合わせ 50m*l* に定容した．

2-2-3　ポリフェノール，アントシアニン，フラボノールの定量

全ポリフェノールの定量は Folin-Denes 法[15] に従って行い，没食子酸相当量として算出した．すなわち適宜希釈した前記の①抽出液 2m*l* に，2 倍希釈の Folin 試薬 2m*l* を加え，3 分間放置後，10%（w/w）炭酸ナトリウム溶液 2m*l* を加え，30℃下で 30 分間放置した．それを遠心分離したのち 760nm で吸光度を測定した．

アントシアニンの定量は①抽出液を 510nm で吸光度を測定した[16]．花色の主要な色素成分はシアニジンであることから[17]，アントシアニンをシアニン相当量として算出した．

表 2-1　供試花弁

No. 学名（科・属・種）	花色	和名，その他
[A ツバキ科（*Theaceae*）]		
A 1（赤色系）		
1 *Camellia sasanqua*	pink	サザンカ，一重咲き
2 *Camellia sasanqua*	red	〃
3 *Camellia sasanqua*	pink	〃
4 *Camellia sasanqua*	light red	〃
5 *Camellia japonica*	red	ツバキ，八重咲き
6 *Camellia japonica*	pink	〃，西王母
7 *Camellia japonica*	pink	〃，筒状花弁
9 *Camellia japonica*	red	〃，あら獅子
10 *Camellia japonica*	light red	〃
12 *Camellia japonica*	red & pink	〃，ピンク斑，雪椿
14 *Camellia japonica*	pink	〃，雪椿
16 *Camellia japonica*	pink	〃，ｴﾝｼﾞｪﾙｳｨﾝｸﾞｽ
20 *Camellia japonica*	red	〃
A 2（非赤色系）		
8 *Camellia japonica*	white & red	〃，白地に小赤斑入
11 *Camellia japonica*	white	〃，獅子咲き
13 *Camellia japonica*	white	〃
15 *Camellia japonica*	white	〃，雪椿
17 *Camellia japonica*	white	〃
18 *Camellia japonica*	white	〃
19 *Camellia japonica*	white	〃，雪椿
23 *Stewartia pseudo-camerllia*	white	ナツツバキ
24 *Camellia sinensis*	white	茶花,村上市産
[B バラ科（*Rosaceae*）]		
1 B 1 バラ科バラ属（*Rosaceae Rosa*）	（赤色系）	
27 *Rosa hybrida*	red	バラ，食用市販
28 *Rosa hybrida*	red	〃
31 *Rosa hybrida*	red	〃
35 *Rosa hybrida*	red	〃，ﾛｰﾃ
36 *Rosa hybrida*	pink	〃
37 *Rosa hybrida*	vermilion	〃
38 *Rosa hybrida*	light pink	〃
40 *Rosa hybrida*	red	〃，抱え咲き
42 *Rosa rugosa*	red	ハマナス
1 B 2 バラ科バラ属（*Rosaceae Rosa*）	（非赤色系）	
29 *Rosa hybrida*	white	バラ
33 *Rosa hybrida*	white	〃
34 *Rosa multiflora*	white	〃，ﾉｲﾊﾞﾗ
41 *Rosa hybrida*	white	〃，ﾎﾜｲﾄｸﾘｽﾏｽ
30 *Rosa hybrida*	yellow	〃
32 *Rosa hybrida*	yellow	〃，ﾋﾟｰｽ

表 2-1 の続き

39 *Rosa hybrida*	yellow	〃, ﾋﾟｰｽ
43 *Rosa rugosa*	white	ハマナス
44 *Rosa rugosa*	white	〃, 八重咲き
２Ｂ１バラ属以外のバラ科（赤色系）		
25 *Prunus yedoensis*	light pink	サクラ, ｿﾒｲﾖｼﾉ
26 *Prunus pendula*	light pink	〃, ｴﾄﾞﾋｶﾞｼ
45 *Prunus spachiana*	pink	八重紅垂れサクラ
46 *Prunus lannesiana*	pink	サトザクラ, 八重
47 *Prunus* sp.	light pink	サクラ, ﾑﾗｻﾞｷｻｸﾗ
48 *Prunus* sp.	pink	〃
49 *Prunus avium*	light pink	サクランボ, ｻﾄｳﾆｼｷ
50 *Prunus avium*	light pink	〃
51 *Malus pumila*	pink	リンゴ,ﾂｶﾞﾙ
52 *Malus pumila*	pink	〃, ﾌｼﾞ
53 *Malus pumila*	pink	〃, ﾑﾂ
58 *Prunus tomentosa*	light pink	ユスラウメ
59 *Prunus persica*	dark pink	モモ
61 *Prunus persica*	pink	〃
62 *Prunus persica*	pink	ネクタリン
63 *Chaenomeles speciosa*	light red	ボケ
64 *Chaenomeles speciosa*	red	〃
66 *Spiraea japonica*	red	シモツケ
69 *Malus halliana*	light pink	カイドウ
70 *Prunus tomentomentosa*	pink	カリン
２Ｂ２バラ属以外のバラ科（非赤色系）		
54 *Prunus mume*	white	ウメ
55 *Raphiolepis umbellata*	white	シャリンバイ
57 *Prunus mume*	white	ウメ,八重咲き
60 *Prunus persica*	white	モモ,八重咲き
65 *Chaenomeles speciosa*	white	ボケ
67 *Sorbus commixta*	white	ナナカマド
68 *Spiraea thunbergii*	white	ユキヤナギ
72 *Kerria joponica*	yellow	ヤマブキ
[Ｃ キク科（*Compositae*）]		
Ｃ１（赤色系）		
95 *Chrysanthemum morifolium*	violet	菊
97 *Chrysanthemum morifolium*	light pink	〃
99 *Chrysanthemum morifolium*	purple	食用菊, 管状花弁
100 *Chrysanthemum morifolium*	light purplee	食用菊, 管状花弁
Ｃ２（非赤色系）		
92 *Chrysanthemum morifolium*	white	食用菊, 平花弁
94 *Chrysanthemum morifolium*	white	菊
102 *Chrysanthemum morifolium*	white	食用菊, 管状花弁
93 *Chrysanthemum morifolium*	yellow	食用菊, 平花弁
96 *Chrysanthemum morifolium*	yellow	菊

表 2-1 の続き

98 *Chrysanthemum morifolium*	yellow	食用菊, 平花弁
101 *Chrysanthemum morifolium*	yellow	食用菊, 管状花弁
[D その他の花弁]		
D 1 (赤色系)		
74 *Antirrhinum majus*	purple & yellow	ｷﾝｷﾞｮｿｳ, 食用市販
82 *Caryophyllaceae dianthus*	purple & white	ﾅﾃﾞｼｺ, 食用市販
84 *Delphinium hybrida*	violet	ﾗｯｸｽﾌｧｰ, 食用市販
89 *Magnlia lilifloral*	violet & white	モクレン
87 *Magnlia kobus*	violet	コブシ
103 *Tulipa* sp.	red	ﾁｭｳﾘｯﾌﾟ, ｵｯｸｽﾌｫｰﾄﾞ
108 *Lilium* sp.	red	ユリ, ｽﾀｰｹﾞｰｻﾞｰ
109 *Lilium* sp.	pale pink & red	〃, 斑入り, ﾙﾚｰﾌﾞ
D 2 (非赤色系)		
73 *Antirrhinum majus*	yellow	ｷﾝｷﾞｮｿｳ, 食用市販
81 *Primula acaulis*	blue	ﾌﾟﾘﾑﾗ, 食用市販
88 *Magnoliaceae magnlia*	white	タムシバ
105 *Tulipa* sp.	white	ﾁｭﾘｯﾌﾟ, ﾋﾟｭﾘｼﾏ
104 *Tulipa* sp.	yellow	〃, ｺﾞｰﾙﾃﾞﾝｵｯｸｽ
106 *Narcissus* sp.	yellow	スイセン, ﾔﾝｸﾞ
107 *Narcissus* sp.	white	〃
110 *Diospyros kaki*	light yellow	カキ
[E その他]		
119 *Theaceae Camellia sinensis*		静岡産,煎茶,茶葉

フラボノールはアルミニウム塩類を用いる比色法[16]で行った．すなわ前記②抽出液 1m*l* に 0.1M 塩化アルミニウム水溶液 2m*l*，0.2M 酢酸緩衝液（pH 4.5）7m*l* を加えて２時間放置し発色した後，0.1M 酢酸緩衝液（pH 4.5）とメタノールの 2:8（v/v）混合液で 25m*l* に定容後，410nm の吸光度を測定し，フラボノールをルチン相当量として算出した．

2-2-4　抗酸化性の測定

抗酸化性の測定は津志田らの方法[18]より測定した．すなわちβ-カロチン溶液（100mg/100m*l* クロロホルム），リノール酸（4g/100m*l* クロロホルム），ツイーン 40 溶液（20g/100m*l* クロロホルム）を作成し，それぞれ 0.55m*l*，0.55m*l*，1.1m*l* ずつを 200m*l* の三角フラスコに取り，窒素ガス通気によりクロロホルムを完全に除去した後，110m*l* の蒸留水を加え溶解し，リノール酸βカロチン溶液を作成した．この溶液 90m*l* に 8m*l* の 0.2M 燐酸緩衝液（pH 6.8）を加え，静かに撹拌後 4.9m*l* を試験管に分注し，0.1m*l* の花弁抽出液②を添加・混合し，すばやく 50℃の反応槽に移し 15 分後から 45 分後までの吸光度（470nm）の減少量を求めた．さらに，求めた減少量を基準溶液の BHA 溶液（1mg/100m*l* 0.1M 酢酸緩衝液(pH 4.5)とメタノールの 2:8(v/v)混合液）を添加し作成した反応液についての吸光度の減少量で割り抗酸化活性値とした．

2-3　実験結果および考察

2-3-1　各種花弁抽出液のポリフェノール類の含有量

花弁抽出液について全ポリフェノール量，アントシアニン量，フラボノール量の測定を行い，花弁乾物 100g 当たりの重量%の結果を表 2-2・表 2-3 に示した．なお，比較のため同一の方法で求めた煎茶の測定結果を示した．

各種花弁の全ポリフェノール量は最低値 0.11%から煎茶の 9.98%を越えた 14.83%の範囲であった．その平均値は 5.05%で，津志田[17]らが調べた市販の 43 種の茎・葉・根・果菜類の全ポリフェノール量の最高値 2.6%（シュンギク）を遥かに越えている．この結果は，花弁が一般野菜に較べてポリフェノールを多く含むことを示している．

さらに，花弁色素として重要なアントシアニン，植物に広く分布するフラボノール含有量を測定し，種（ツバキ科，バラ科，キク科の３群）並びに花色の違い（赤色系と非赤色系）に分けて比較検討した．

その結果，次に示すごとく，調べたポリフェノール類の含有量は花弁の種類及び花色によって異なることを認めた．

a) ツバキ科

ポリフェノール量は平均 8.74%で３群中最高値を示したが，フラボノールは 0.72%で最も低かった．

アントシアニン量については，赤色系が平均 0.88%，非赤色系が 0.07%で，花色による違いが明確に認められたのに対して，ポリフェノール量は赤色系 9.21%，非赤色系 8.06%と，花色による違いはほとんど認められなかった．

また，ポリフェノール量からアントシアニンとフラボノールの合計値を差し引いた値をアントシアニン及びフラボノール以外のポリフェノールとすると（以下，その他のポリフェノール）その含有量は 7.47%で，３群中最も多い．これはツバキ科ポリフェノールにはアントシアニンとフラボノール以外のフェノール類が構成成分として含まれていることを示唆している．

この「その他のポリフェノール」成分はツバキ属に共通に含まれる独特なポリフェノール成分である可能性が考えられる．なぜならば，ツバキ属であるチャの花弁には茶葉に存在するものと同種とみなされる特有なポリフェノール成分が，茶葉に

表 2-2　各種花弁のポリフェノール類含量および抗酸化活性

試料 No.*	ﾎﾟﾘﾌｪﾉｰﾙ量**	ｱﾝﾄｼｱﾆﾝ量**	ﾌﾗﾎﾞﾉｰﾙ量**	抗酸化活性***
[A ツバキ科（*Theaceae*）]				
A１（赤色系）				
1	6.40	0.54	0.77	0.87
2	6.89	2.46	1.28	0.74
3	11.50	0.32	0.45	0.93
4	6.96	1.14	0.84	0.75
5	9.83	1.30	0.40	0.63
6	10.73	0.17	0.36	0.56
7	8.69	0.57	0.37	0.87
9	8.55	1.39	0.50	0.97
10	11.49	1.40	0.44	0.80
12	7.26	0.45	0.50	0.74
14	11.77	0.03	0.77	1.00
16	8.25	0.06	0.73	1.00
20	11.39	1.60	0.97	0.88
A２（非赤系）				
8	8.07	0.07	0.38	1.12
11	12.03	0.21	0.43	0.58
13	10.95	0.04	0.77	0.75
15	8.23	0.06	0.73	1.27
17	10.09	0.04	0.83	0.87
18	8.27	0.05	0.91	1.02
19	7.12	0.05	0.87	0.89
23	4.25	0.07	1.43	0.84
24	3.56	0.04	1.14	0.70
[B バラ科（*Rosaceae*）]				
１Bバラ科バラ属（*Rosaceae Rosa*）				
１B１（赤系）				
27	11.03	1.56	1.37	0.05
28	11.73	4.82	1.57	0.03
31	8.13	1.71	1.51	0.21
35	14.83	3.40	1.60	0.16
36	10.20	0.09	1.39	0.56
37	3.52	0.60	1.45	0.35
38	5.20	0.16	2.72	0.26
40	7.05	3.09	1.47	0.04
42	5.35	0.86	1.04	0.16
１B２（非赤系）				
29	4.93	0.00	1.97	0.48
33	9.29	0.01	2.03	0.30
34	8.31	0.00	1.91	0.20
41	2.54	0.03	1.84	0.60
30	10.22	0.00	1.93	0.14

表 2-2 の続き

32	3.73	0.01	1.93	0.68
39	4.76	0.05	2.22	0.23
43	3.79	0.04	1.01	0.27
44	5.75	0.04	1.08	0.26
２Ｂバラ属以外のバラ科				
２Ｂ１（赤系）				
25	4.55	0.08	2.74	0.29
26	4.30	0.07	2.95	0.32
45	2.79	0.14	2.99	0.57
46	4.34	0.24	3.42	0.40
47	4.80	0.17	3.15	0.37
48	4.42	0.20	2.88	0.39
49	4.14	0.08	3.17	0.26
50	3.10	0.18	2.26	0.58
51	4.65	0.32	3.28	0.97
52	2.79	0.15	2.70	1.18
53	2.85	0.22	2.51	1.06
58	3.33	0.08	3.80	1.05
59	2.60	0.84	2.59	0.52
61	2.46	0.23	2.05	0.81
62	2.49	0.48	2.09	0.88
63	1.77	1.07	0.97	1.35
64	1.68	1.47	0.95	0.95
66	4.15	0.35	2.76	0.85
69	4.22	0.21	2.09	1.24
70	0.72	0.08	1.12	1.83
２Ｂ２（非赤系）				
54	3.62	0.04	5.02	0.29
55	4.21	0.23	2.20	0.77
57	4.67	0.05	4.13	0.41
60	2.99	0.03	3.05	0.87
65	1.55	0.10	0.93	1.72
67	1.99	0.09	1.82	1.26
68	4.25	0.07	3.09	1.13
72	0.11	0.07	0.83	1.70
[Ｃ キク科（*Compositae*）]				
Ｃ１（赤系）				
95	2.95	0.76	3.67	0.90
97	0.62	0.05	1.97	1.69
99	2.62	0.42	2.82	0.48
100	2.75	0.16	2.09	0.70
Ｃ２（非赤系）				
92	1.77	0.04	2.20	1.48
94	1.07	0.03	1.99	0.91
102	1.13	0.05	1.51	1.20

表 2-2 の続き

93	1.01	0.04	1.82	1.52
96	1.13	0.05	1.41	1.05
98	1.15	0.05	1.62	1.23
101	2.05	0.03	3.15	0.80
[D その他の花弁]				
D１（赤系）				
74	2.19	0.19	2.12	1.29
82	2.16	0.53	3.09	1.91
84	2.13	2.88	1.55	0.93
89	7.05	1.07	2.63	0.81
87	4.07	0.31	2.31	0.67
103	1.82	1.89	3.09	1.42
108	0.84	0.35	1.33	1.38
109	2.36	0.19	1.97	0.88
D２（非赤系）				
73	1.55	0.05	2.67	1.72
81	3.98	0.75	2.24	0.75
88	6.97	0.08	2.45	0.65
105	1.36	0.06	1.80	1.56
104	1.06	0.05	2.26	1.88
106	2.54	0.07	2.57	1.15
107	3.00	0.09	2.95	1.34
110	6.07	0.19	1.10	0.35
[E その他]				
茶葉（*Theaceae Camellia sinensis*）				
119	9.98	0.06	1.80	0.58

* 表 2-1 を参照

** 乾物重量当たり（%）

*** 抗酸化活性 $= \dfrac{\text{試料溶液（15 分 O.D.－45 分 O.D.）}}{\text{BHA (1mg/100ml)（15 分 O.D.－45 分 O.D.）}}$

表 2-3　各種花弁中のポリフェノール類含量および抗酸化活性の平均値

試料		ﾎﾟﾘﾌｪﾉｰﾙ量 $\bar{x}$ ±STD	ｱﾝﾄｼｱﾆﾝ量 $\bar{x}$ ±STD	ﾌﾗﾎﾞﾉｰﾙ量 $\bar{x}$ ±STD	抗酸化活性 $\bar{x}$ ±STD
[A ツバキ科（*Theaceae*）]					
A1 赤系	N=13	9.21±1.93	0.88±0.70	0.64±0.27	0.825±0.132
A2 非赤系	N=9	8.06±2.67	0.07±0.05	0.83±0.31	0.894±0.203
A 計	N=22	8.74±2.33	0.55±0.67	0.72±0.30	0.853±0.168
[B バラ科（*Rosaceae*）]					
「1 Bバラ科バラ属（*Rosaceae Rosa*）」					
1B1 赤系	N=9	8.56±3.46	1.81±1.54	1.57±0.44	0.204±0.162
1B2 非赤系	N=9	5.92±2.55	0.02±0.02	1.77±0.40	0.351±0.178
1B 計	N=18	7.24±3.31	0.92±1.41	1.67±0.43	0.277±0.185
「2 Bバラ属以外のバラ科」					
2B1 赤系	N=20	3.31±1.13	0.33±0.36	2.52±0.78	0.793±0.411
2B2 非赤系	N=8	2.92±1.48	0.09±0.06	2.63±1.38	1.018±0.450
2B 計	N=28	3.20±1.25	0.29±0.34	2.45±0.92	0.789±0.438
B1 赤系	N=29	4.94±3.24	0.79±1.14	2.23±0.82	0.610±0.446
B2 非赤系	N=17	4.51±2.59	0.05±0.05	2.18±1.08	0.665±0.495
B 計	N=46	4.78±3.02	0.52±0.97	2.21±0.93	0.630±0.466
[C キク科（*Compositae*）]					
C1 赤系	N=4	2.24±0.94	0.35±0.27	2.64±0.68	0.943±0.453
C2 非赤系	N=7	1.33±0.38	0.04±0.01	1.96±0.55	1.169±0.253
C 計	N=11	1.66±0.78	0.15±0.22	2.20±0.68	1.087±0.356
[D その他の花弁]					
D1 赤系	N=8	2.83±1.80	0.93±0.92	2.26±0.61	1.161±0.385
D2 非赤系	N=8	3.32±2.06	0.17±0.22	2.25±0.54	1.174±0.514
D 計	N=16	3.07±1.89	0.55±0.75	2.26±0.56	1.168±0.440
[花弁全体]					
赤系	N=53	5.45±3.52	0.80±0.99	1.90±0.98	0.780±0.430
非赤系	N=42	4.51±3.16	0.08±0.12	1.86±0.96	0.900±0.472
全体計	N=95	5.05±3.40	0.49±0.83	1.87±0.97	0.825±0.455

N:サンプル数

$\bar{x}$ ±STD:平均値±標準偏差

ほぼ同じ含有比率で存在するとと報告[19]されているからである.

b) バラ科

全ポリフェノール量はバラ属（１Ｂ）平均 7.24%，バラ属以外（２Ｂ）が 3.20%であり，バラ属が特に全ポリフェノール含有量が高い．そのため，バラ属を中心に検討を行った.

アントシアニン量は，赤色系と非赤色系の花色間で著しい差が認められ，赤系の花弁に，多量にアントシアニンが存在した.

フラボノール量は，バラ属以外のバラ科植物にバラ属よりも多く認められた．全ポリフェノールに対するフラボノールの含有割合を比べると，バラ属は平均 23.1%とその他のバラ科 76.6%に比べて低かった.

バラ科の花弁のポリフェノール類含有量の構成は，バラ属ではアントシアニン，バラ属以外のバラ科ではフラボノールが多く含まれると推察される.

c) キク科

全ポリフェノール量は平均 1.66%，アントシアニン量 0.15%であって，ともに３群中最も低かった．全ポリフェノール量が低いにもかかわらず，フラボノール量は比較的高いので，供試キク属のポリフェノール成分の主体はフラボノールであると考えられる.

バラ属と同様に赤色系花弁に全ポリフェノール量が高く，アントシアニン量は赤色系に多く存在した.

2-3-2　各種花弁抽出液の抗酸化活性

各種花弁抽出液の抗酸化活性について調べた結果を表 2-2・表 2-3 に示した.

供試した花弁抽出液は対照の [0.1M 酢酸緩衝液（pH 4.5）とメタノールの 2:8（v/v）混合液（抗酸化活性値の平均 2.10）] に比べて，全てが抗酸化活性を示し，最高値は赤バラ（活性値 0.03），最低値がナデシコ（活性値 1.91）であった.

基準としたＢＨＡ（活性値 1）の示す抑制効果の 10 倍以上（活性値 0.1 以下）の極めて強い抗酸化活性を示した花弁は，いずれも，赤色のバラ属に所属していた．ちなみに，今回，比較として調べた煎茶の抗酸化活性値は，0.58 であって，赤色系バラ属の平均値 0.21 に及ばなかった.

BHA 溶液が示す抗酸化活性の２倍～10 倍（活性値 0.5～ 0.1）に相当する強い酸

化抑制効果を示した花弁はバラ科バラ属，サクラ属およびカキであった．キク科はBHA溶液が示す効果と同程度であった．

各種花弁をツバキ科，バラ科バラ属，バラ属以外のバラ科，キク科の花弁４群に分けて比較してみると，その活性の強さはバラ属 0.28，バラ属以外のバラ科 0.79，ツバキ科 0.85，キク科 1.09 の順であった．さらに花色別に比べると，赤色系はバラ属 0.20，バラ属以外のバラ科 0.79 ツバキ科 0.83，キク科 0.94 であり，非赤色系はバラ属 0.35，ツバキ科 0.89，バラ属以外のバラ科 1.02，キク科 1.17 であり，いずれも赤色系花弁で活性が高かった．

すなわち，各種花弁抽出液の抗酸化活性の違いは，科・属の違いで差が認められ，同科間では，赤色系花弁で活性が高かった．

2-3-3　各種花弁抽出液のポリフェノール類含有量と抗酸化活性

花弁の全ポリフェノール量と抗酸化活性の関係を調べた結果を図 2-1 に示した．各種花弁の全ポリフェノール量と抗酸化性の強さの相関係数は花弁全体（◆◇▼▽）では r=−0.494（p<0.01）であり，かなり相関があることが認められた．

花弁を赤色系と非赤色系に分けて，全ポリフェノール量と抗酸化性の相関係数値を比べると，赤色系花弁（◆▼）の相関係数 r=−0.440（p<0.01），非赤色系の花弁（◇▽）の相関係数 r=−0.548（p<0.01）であり，どちらもかなり相関があった．

ツバキ科は“その他のポリフェノール類”を多量に含みポリフェノールの質に特異性が認められたため，ツバキ科の結果を除いて全ポリフェノール量と抗酸化活性との相関係数を求めた．その結果，花弁全体（◆◇）の相関係数 r=−0.707（p<0.01），赤色系花弁（◆）の相関係数 r=−0.658（p<0.01），非赤色系（◇）の花弁の相関係数 r=−0.779（p<0.01）となり，赤色系，非赤色系に関わらず，全ポリフェノール量と抗酸化活性に強い相関があることが示された．

以上のことから，各種花弁抽出液の抗酸化性は，赤色色素成分の有無が活性を左右するのではなく，全ポリフェノール含有量に基づくものであること，そしてそのポリフェノール類の質的な違いが抗酸化活性に影響を及ぼすことが強く示唆された．そこで，次に，ポリフェノール類成分の違いと抗酸化活性についての知見を得る目的でアントシアニン，フラボノールの含有量と抗酸化活性の相関を図 2-2-1～図 2-2-4 に示した．

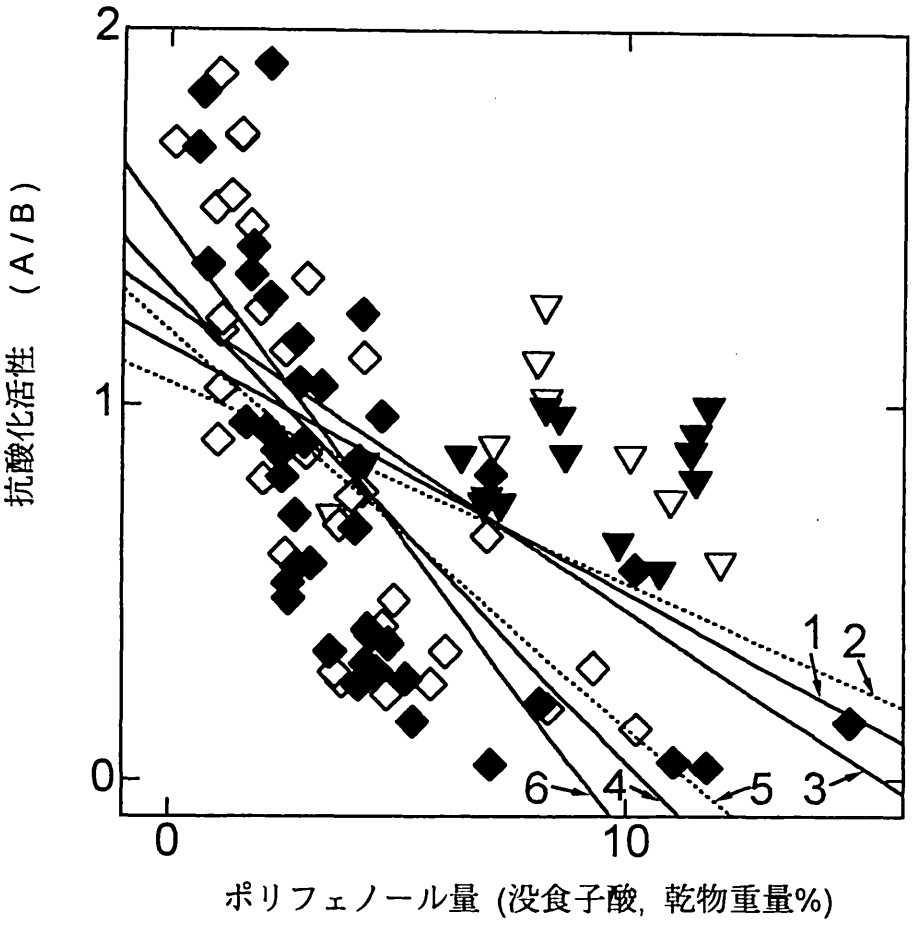
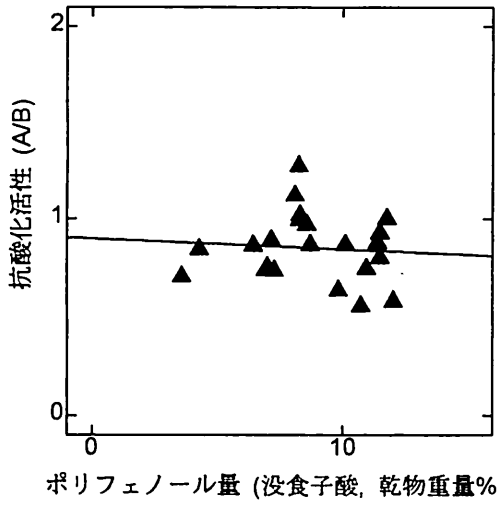


図 2-1　各種花弁抽出液の全ポリフェノール量と抗酸化活性

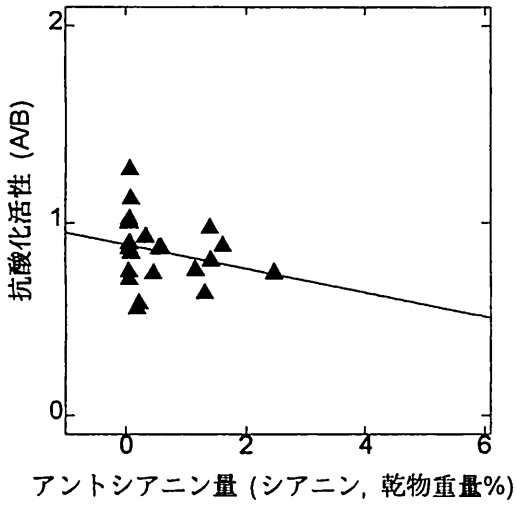
1 :	◆◇▼▽	(n=95)	y=-0.066x+1.159	r=-0.494	p<0.01
2 :	◆▼	(n=54)	y=-0.054x+1.063	r=-0.440	p<0.01
3 :	◇▽	(n=41)	y=-0.082x+1.270	r=-0.548	p<0.01
4 :	◆◇	(n=73)	y=-0.127x+1.316	r=-0.707	p<0.01
5 :	◆	(n=41)	y=-0.106x+1.201	r=-0.658	p<0.01
6 :	◇	(n=32)	y=-0.163x+1.476	r=-0.779	p<0.01

◆▼ : Total of red petals　◇▽ : Total of without red petals
▼▽ : Family *Theaceae*　◆◇ : Total of without Family *Theaceae*

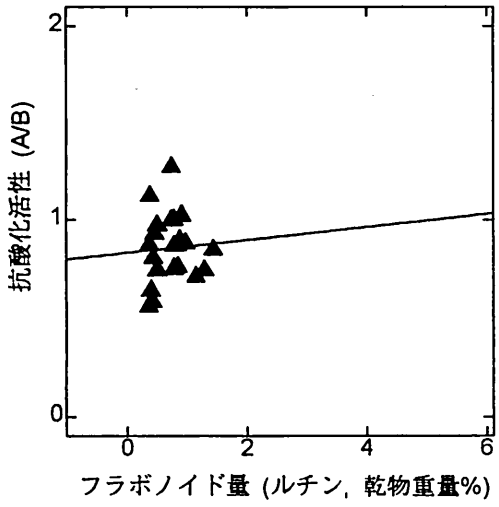
A / B　:　抗酸化活性
A　:　試料溶液（15 分 O.D.－45 分 O.D.）
B　:　BHA (1mg/100ml)（15 分 O.D.－45 分 O.D.）



▲ : Family *Theaceae* (n=22)　　y=-0.005x+0.901　r=-0.076

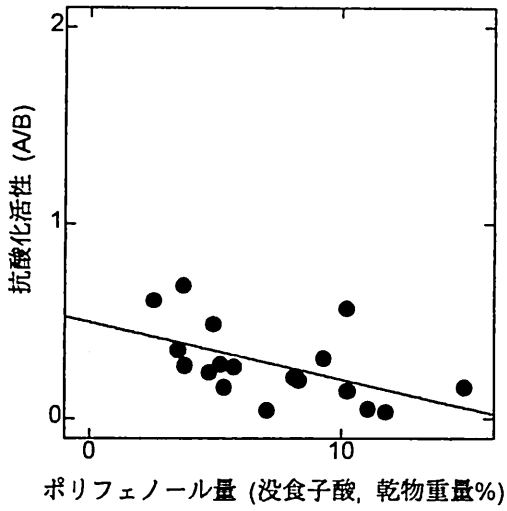


▲ : Family *Theaceae* (n=22)　　y=-0.062x+0.888　r=-0.249

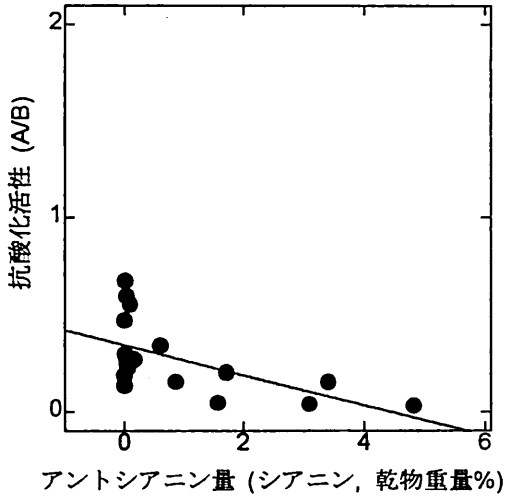


▲ : Family *Theaceae* (n=22)　　y=0.034x+0.829　r=0.060

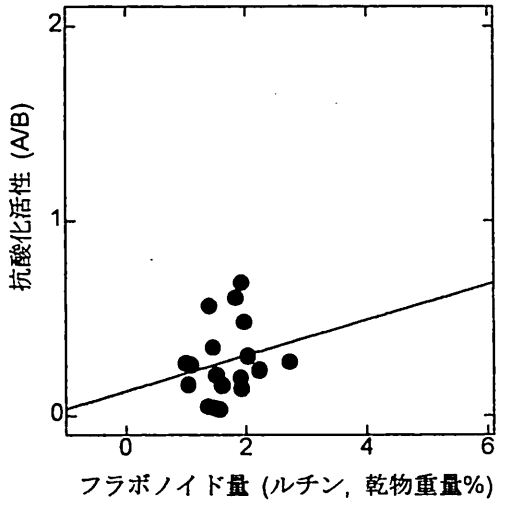
図 2-2-1　各種花弁抽出液のポリフェノール類量と抗酸化活性



● : Family *Rosaceae* (Genus *Rosa*) (n=18)　y=-0.029x+0.488　r=-0.520　p<0.02

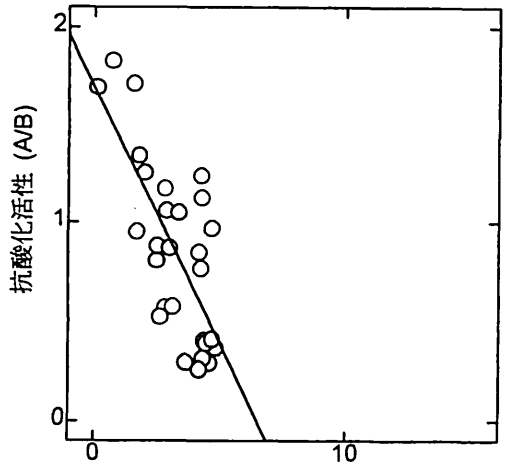


● : Family *Rosaceae* (Genus *Rosa*) (n=18)　y=-0.078x+0.349　r=-0.596　p<0.01



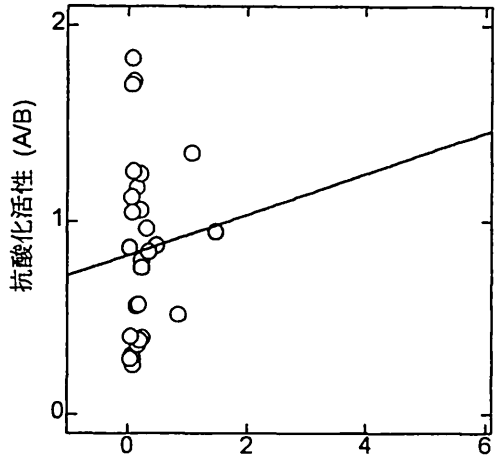
● : Family *Rosaceae* (Genus *Rosa*) (n=18)　y=0.090x+0.127　r=0.209

図 2-2-2　各種花弁抽出液のポリフェノール類量と抗酸化活性



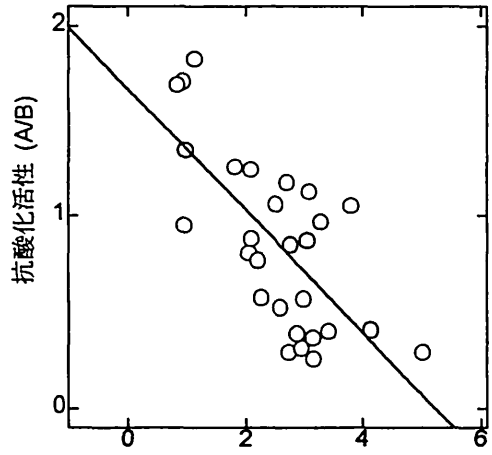
ポリフェノール量 (没食子酸, 乾物重量%)

○ : Family *Rosaceae* (without Genus *Rosa*) (n=28)　　y=-0.262x+1.696　r=-0.730　p<0.01



アントシアニン量 (シアニン, 乾物重量%)

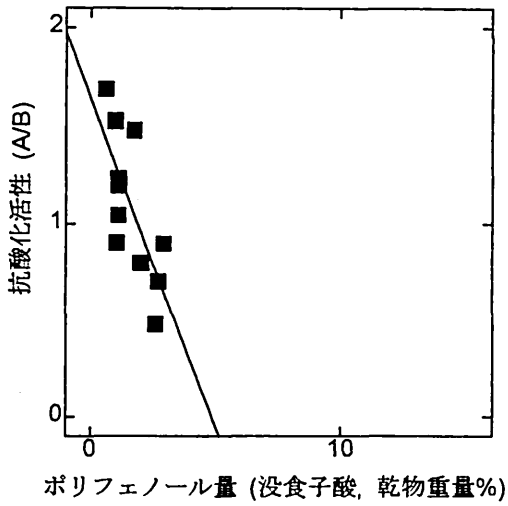
○ : Family *Rosaceae* (without Genus *Rosa*) (n=28)　　y=0.103x+0.830　r=0.075



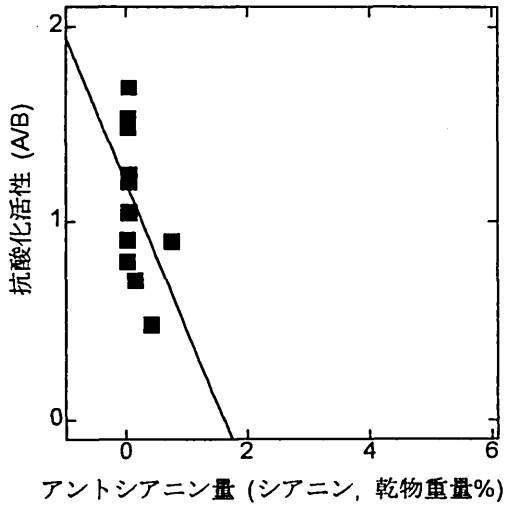
フラボノイド量 (ルチン, 乾物重量%)

○ : Family *Rosaceae* (without Genus *Rosa*) (n=28)　　y=-0.319x+1.673　r=-0.703　p<0.01

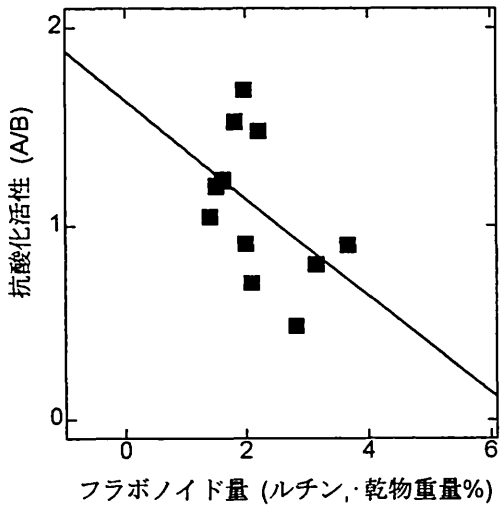
図 2-2-3　各種花弁抽出液のポリフェノール類量と抗酸化活性



■ : Family *Compositae* (n=11)　y=-0.336x+1.644　r=-0.730　p<0.01



■ : Family *Compositae* (n=11)　y=-0.739x+1.200　r=-0.458



■ : Family *Compositae* (n=11)　y=-0.248x+1.634　r=-0.476

図 2-2-4　各種花弁抽出液のポリフェノール類量と抗酸化活性

a) ツバキ科（▲）

図 2-2-1 に示したように，ほとんど相関が認められなかったので，抗酸化性とポリフェノール類量との関連を明らかにすることはできなかった．この点に関してはさらに，検討を進めている．

b) バラ属（●）

花弁抽出液のポリフェノール類含有量と抗酸化活性は，全ポリフェノール量との間で r=−0.520（p<0.02），アントシアニン量との間で r=−0.596（p<0.01）と，かなり相関があり，フラボノール量とは，弱い相関が示された．

全ポリフェノール量とアントシアニン量との相関を求めると r=−0.593（p<0.01）で，かなり相関があることが認められ，バラ属の抗酸化活性にアントシアニンの寄与が大きいことが示唆された．この結果は，最近のアントシアニンの機能性についてのいくつかの報告[20)~22)]からも支持される．

c) バラ属以外のバラ科（○）

花弁抽出液の抗酸化活性の強さは，全ポリフェノール量に，強い相関があるが（r=−0.731 p<0.01），アントシアニン量にはほとんど相関がなく，逆にフラボノール量とつよい相関（r=−0.703 p<0.01）を示した．バラ属以外のバラ科の花弁抽出物には多量にフラボノールを含むものが多く，この抽出物の抗酸化活性に寄与する成分は，バラ属と異なる成分であることを示唆している．これは同科の花弁であっても，属間でポリフェノールの構成が大きく異なる時，抗酸化活性の強弱に著しい影響を与えることが示唆される．

d) キク科（■）

花弁液のと抗酸化活性の強さは，全ポリフェノール含有量（r=−0.730 p<0.01），アントシアニン含有量（r=−0.458 p<0.10），フラボノール含有量（r=−0.476 p<0.10）のいずれにも，かなり相関があることが認められた．キク科花弁にはバラ属以外のバラ科と同様フラボノール含有量が多いものがあり，キク科の花弁抽出液の抗酸化活性は，フラボノールにより抗酸化能の寄与が大きいのではないかと考えられた．

以上，ポリフェノールは各種花弁抽出液の抗酸化活性に深く関係しており，その活性は，科・属間で著しい差が認められた．それは，花弁抽出液の全ポリフェノール含有量およびその構成成分が，科・属間で異なることによると考えられる．

2-4　要約

95 種の花弁（バラ科 (46)，ツバキ科(22)，キク科(11)，その他(16)）を凍結乾燥後，酸性の含水メタノールで抽出し，この抽出液についてポリフェノール類の含有量（全ポリフェノール含有量，アントシアニン含有量，フラボノール含有量）および抗酸化活性性を調べた．抗酸化性の測定は，リノール酸を基質としてエマルション系に添加し，β-カロテンの退色防止活性を指標とする試験法で行った．

（1）科別の全ポリフェノール量（乾物重量あたりの没食子酸量）の平均は，ツバキ科 8.74%，バラ科 4.78%，キク科 1.66%であった。全ポリフェノール含有量が最も高い値を示したのはバラ属の赤色花弁で 14.83%であった．

（2）抗酸化活性は，95 種の花弁全てが活性を示し，特にバラ属の赤色花弁の抽出液は，BHA 溶液（1mg/100m*l*）より約 10 倍強い活性を示した．

（3）花弁抽出液の抗酸化活性は，全ポリフェノール含有量との間に高い相関性が認められ，ポリフェノール類の抗酸化活性への寄与が明らかとなった．

（4）抗酸化活性に寄与するポリフェノール類の構成成分は科，属および花色でそれぞれ異なり，バラ属の赤色系花弁ではアントシアニンが，キク科ではフラボノールの寄与が大きいことが示唆された．

第３章　食用花弁抽出液のフリーラジカル消去活性

3-1　緒言

生体内において種々の要因により生成した活性酸素・フリーラジカルなどは脂質を始めタンパク質，酵素，核酸などに酸化的障害をもたらす．その結果，老化，発ガン，その他様々な疾病を引き起こすと考えられている[1)]．活性酸素やフリーラジカルに由来する障害を軽減するためには，それらの発生を抑制するか（予防的抗酸化剤），発生したラジカルをすみやかに消去する（連鎖切断型抗酸化剤）ことが必要であるといわれている[2)]．このような状況の中で，安全で副作用のない食品，食品素材中に含まれる抗酸化性物質への期待が高まりつつある．ことに植物性食品に広く含まれるポリフェノール成分は関心が持たれている物質のひとつである[3)]．

著者らも，このような観点から，現在食用とされている花弁を対象として，そのポリフェノール成分の示す様々な機能性について調べている．その結果，食用花弁の全ポリフェノール含有量と抗酸化活性に相関があること，食用花弁の抗酸化活性はそこに含まれる全ポリフェノール量に依存することを認めた[4)]．そこで，花弁抽出液が持つ生体防御機能についての役割をさらに深めるためフェノール性物質の持つラジカル消去能の面から検討を試みた．

本章では，バラ科を中心とした日常的に広く利用されている13種の食用花弁を用いて，その抽出液ついて，ヒドロキシルラジカルとスーパーオキシドの消去活性を，ESR装置を用いたスピントラップ法による試験，およびDPPHラジカルの消去活性（還元反応力）の評価をESR装置を用いて行い，それらのラジカル消去活性と全ポリフェノールとの関連性について検討した．その結果について述べる．

3-2　実験方法

3-2-1 試料及び試薬

供試試料は，新潟市大形地区にて採取したものおよび市販の食用花弁の計13種を用いた（表 3-1）．煎茶は静岡産市販品を使用した．

試薬：

ヒポキサンチンは，シグマ社製，キサンチンオキシダーゼ（XOD）は，ベリンガー・インゲルハイム社製，5,5－ジメチル－1－ピロリンN－オキシド（DMPO）は，第一化学薬品製，HPLC用蒸留水は，和光純薬製を使用した．その他の試験試薬は，和光純薬製の精密機器分析用または特級を用いた．

3-2-2 試料溶液の調製法

供試試料は採取後，直ちに水洗し，凍結乾燥した．次にこの凍結乾燥試料0.1gを，0.1Mクエン酸緩衝液（pH 2.0）とメタノールの1:1（v/v）混合液20m*l*と共にテフロンホモジナイザーで磨砕抽出し，No.2濾紙で濾過後，残渣の洗液を合わせ50m*l*に定容した．

全ポリフェノール量の測定には，上記のように調製した溶液を用いた．

ESRによる測定には，これらの調製溶液中から，メタノールを除去し，HPLC用蒸留水50m*l*に溶解して用いた．

茶浸出液（ローズーティ，煎茶）の調製は，以下に示す3方法で調製したものを用いた．

a.凍結乾燥した茶葉またはバラ属赤色花弁1gに，100℃の熱水50m*l*を加え，1分間加熱浸出後，No.2の濾紙で濾過した浸出液．

b.凍結乾燥した茶葉またはバラ属赤色花弁1gに，100℃の熱水50m*l*を加え，1分間静置浸出後，No.2の濾紙で濾過した浸出液．

c.凍結乾燥した茶葉またはバラ属赤色花弁1gに，2℃の水50m*l*を加え，8時間2℃庫内で静置浸出後，No.2の濾紙で濾過した浸出液．

なお，浸出液の調製条件は，食品成分表に記載されている緑茶及び紅茶の浸出液の調製条件とハーブティの浸出条件[5]に準じた．また最近とくに夏場に飲用される機会の多い冷茶（水だし煎茶）の浸出条件[6]についても考慮し設定した．

表 3-1　供試花弁試料

No.	学名 (科・属・種)	花色	和名，その他
1	*Rosaceae Rosa hybrida*	red	バラ　(市販)
2	*Rosaceae Rosa hybrida*	red	〃
3	*Rosaceae Rosa hybrida*	red	〃
4	*Rosaceae Rosa hybrida*	pink	〃
5	*Rosaceae Rosa rugosa*	red	ハマナス
6	*Rosaceae Rosa hybrida*	white	バラ
7	*Rosaceae Rosa hybrida*	yellow	バラ
8	*Rosaceae Rosa rugosa*	white	ハマナス
9	*Compositae Chrysanthemum morifolium*	purple	キク　(市販)
10	*Compositae Chrysanthemum morifolium*	white	〃　(市販)
11	*Compositae Chrysanthemum morifolium*	yellow	〃　(市販)
12	*Violales Violaceae viola×wittrockiana*	violet	パンジー　(市販)
13	*Violales Violaceae viola×wittrockiana*	white	〃　(市販)
14	*Theaceae Camellia sinensis*		静岡産, 煎茶, 茶葉

3-2-3　フリーラジカル消去活性の測定[7) 8)]

測定機器は，日本電子製 電子スピン共鳴（electron spin resonance : ESR）装置（JEOL　JES-FE1XG）を用い，室温（20℃）下で，表 3-2に示す測定条件で行なった．

本研究で測定したヒドロキシルラジカルとスーパーオキシドは，室温で短寿命の不安定なラジカルである．そのため，これらラジカルに反応性の高い試薬（スピントラップ剤）である5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide（DMPO）を付加させて捕捉をし，比較的安定なスピンアダクト（ラジカルアダクト）に変換して，ラジカルを測定する方法（スピントラップ法）を用いた．一方，1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl（以下DPPHラジカルと略す）は安定なラジカルであり，この方法は還元反応を観測している．

なお，ラジカル量の変化は，内部標準物質として酸化マンガン（Mn^{2+}）を使用して，　Mn^{2+}の信号強度とそれぞれのラジカルの信号強度との比から求めた（実際のDMPO-O_2HのESRスペクトルを図 3-1に示した）．以下に，各種フリーラジカルの測定方法を示す．

a) DPPHラジカル消去活性試験

試験管に150μM DPPHラジカルエタノール溶液（DPPH-EtOH）100μ*l*に，試料100μlを加え，10秒間撹拌後，反応液を高感度ESR水溶液セル（10mm×50mm，ラボテック社製 LLC04型）に移し，試料を加えてから60秒後よりESR装置を用いて，DPPHラジカルを測定した．得られたDPPHラジカル量からDPPHラジカル消去活性値を算出した．

b) ヒドロキシルラジカル消去活性試験

試験管に1mM硫酸第一鉄溶液(0.1M phosohate buffer pH 7.8)を75μ*l*，試料を50μ*l*，0.92M DMPOを20μ*l*，そして1mM過酸化水素水を50μ*l*加えたのち，撹拌しラジカルのスピンアダクト（DMPO-・OH）を測定した．得られたヒドロキシルラジカル量からヒドロキシルラジカル消去活性値を算出した．

c) スーパーオキシド消去活性試験

試験管に2mMヒポキサンチンを50μ*l*，5.5mM diethylenetriamine pentaacetic acid（DETAPAC）を50μ*l*，試料を50μ*l*，DMPOを15μ*l*そしてキサンチンオキシダーゼ（XOD）(0.272unit/m*l*）を50μ*l*加えたのち撹拌し反応液を高感度ESR水溶液セル

表 3-2　ESR装置の測定条件

	DPPH ラジカル	ヒドロキシル 消去活性	スーパーオキシド 消去活性
磁場 (G)	3360±100	3360±50	3360±50
出力 (mW)		8.0	
変調 (kHz)		100	
変調振幅 (G)		0.8	
掃引時間 (分)	4.0	4.0	2.0
応答時間 (秒)	1.0	1.0	0.3
測定温度 (℃)		20	

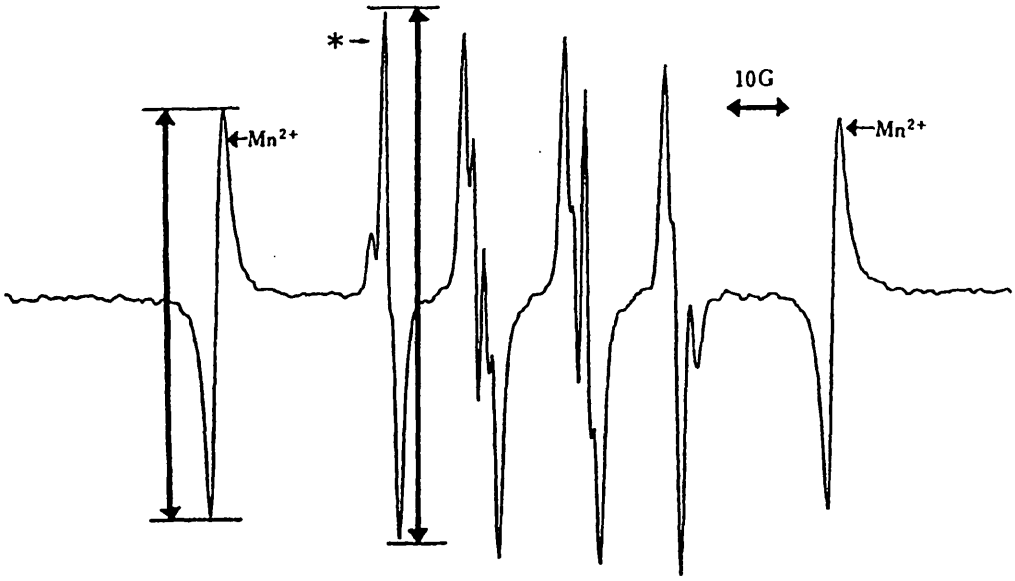


図 3-1　DMPO-O_2HスペクトルのESRスペクトル

DMPO-O_2Hスペクトルの第1シグナル（*）の高さを測ってスーパーオキシドのアダクト量とした.

に移し，XOD添加40秒後よりESR装置を用いて，スーパーオキシドのスピンアダクト（DMPO-O^{2-}）を測定した．得られたスーパーオキシドのスピンアダクト量からスーパーオキシド消去活性値を算出した．

以上3種のラジカル消去活性は選択的で特異な評価法である．

3-2-4　全ポリフェノールの定量

全ポリフェノールの定量は，前章[4]と同様にFolin-Denes法に従って行い，没食子酸相当量として算出した．すなわち適宜希釈した前記①抽出液2m*l*に，2倍希釈のFolin試薬2m*l*を加え，3分間放置後，10%（w/w）炭酸ナトリウム溶液2m*l*を加え，30℃下で30分放置した．遠心分離したのち760nmでの吸光度を測定した．

3-2-5　抗酸化性の測定

抗酸化性の測定は，前章[4]と同様に津志田ら[9]の方法より測定した．すなわちβ-カロチン溶液（100mg/100m*l* クロロホルム），リノール酸（4g/100m*l* クロロホルム），ツイーン40溶液（20g/100m*l* クロロホルム）を作成し，それぞれ0.55m*l*，0.55m*l*，1.1m*l*ずつを200m*l*の三角フラスコに取り，窒素ガス通気によりクロロホルムを完全に除去した後，110m*l*の蒸留水を加え溶解し，リノール酸βカロチン溶液を作成した．この溶液90m*l*に8m*l*の0.2M燐酸緩衝液（pH6.8）を加え，静かに撹拌後4.9m*l*を試験管に分注し，0.1m*l*の花弁抽出液②を添加・混合し，すばやく50℃の反応槽に移し15分後から45分後までの吸光度（470nm）の減少量を求めた．さらに，求めた減少量を基準溶液のＢＨＡ溶液（1mg/100m*l* 0.1M酢酸緩衝液(pH4.5)とメタノールの 2:8(v/v)混合液）を添加し作成した反応液について測定した吸光度の減少量で割り抗酸化活性値とした．

なお，抗酸化活性試験に用いた試料溶液は，以下に記す抽出液を用いた．すなわち，試料花弁を採取後，直ちに水洗し，凍結乾燥し，乾燥物0.1gを0.1M酢酸緩衝液（pH4.5）とメタノールの 2:8（v/v）混合液20m*l*とともにテフロンホモジナイザーで磨砕抽出し，No.2濾紙で濾過後，残渣の洗液を合わせ50m*l*に定容した抽出液である．

3-3　実験結果及び考察

3-3-1 各種花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性

著者らは，前章でバラ属赤色花弁抽出液が高い抗酸化活性を有し，その活性の強さは，全ポリフェノール含有量の寄与であることを明らかにした．そこで，バラ科を中心とした13種の花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性について，全ポリフェノール含有量および抗酸化活性との関連を比較検討した．

その結果を表 3-3に示した．なお，No.9,12,13を除く試料の全ポリフェノール含有量量および抗酸化活性値は前章[4] より引用した．

a) 各種花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性と全ポリフェノール含有量

実験結果より，DPPHラジカル消去活性値の高い試料は，比較的全ポリフェノール含有量も高いことを示している．各種花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性の効果と全ポリフェノール含有量との相関係数は，r=0.748（p<0.01）を示し，強い相関が認められた（図 3-2-1）．また，DPPHラジカル消去活性とこれらの全ポリフェノール含有量との濃度依存性を調べるため，消去活性値が99.9を示した抽出液についてさらに希釈して測定した．希釈後の活性は希釈率に比例するとして得られたラジカル消去活性値を加えて，消去活性の効果と全ポリフェノール含有量との相関係数を改めて計算すると，r=0.838（p<0.01）を示し，強い相関が認められた（図 3-2-2）．これより，各種花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性の効果は，抽出液中の全ポリフェノールの寄与が明らかになった．

b) 各種花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性と抗酸化活性

次に，13種の花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性と抗酸化活性の関連について検討した．その結果，DPPHラジカル消去活性の高い試料は，抗酸化活性の効果も高く，さらにバラ赤色花弁の中には，比較のため試験した煎茶よりも高い活性を示す花弁が認められた．奥田ら[10] は，甘草に含まれるフラボノイドおよび近縁化合物は，ヒト多形核白血病でのアラキドン酸代謝系で過酸化代謝産物の生成を抑制し，この過酸化抑制の強さの順位と各化合物のDPPHラジカル捕捉能の強弱の順位との間に相関が認められたと報告している．そこで，各種花弁のDPPHラジカル消去効果と抗酸化活性の強さの相関性を求めてみると，相関係数はr=−0.838（p<0.01）であり，強い相関が認められた（図 3-3）．よって，各種花弁抽出液の抗酸化活性の

表 3-3　各種花弁抽出液の
フリーラジカル消去活性，全ポリフェノール含有量および抗酸化活性

ｻﾝﾌﾟﾙ	DPPHﾗｼﾞｶﾙ 消去活性**		ヒドロキシルラジカル 消去活性**	ｽｰﾊﾟｰｵｷｼﾄﾞ 消去活性**	全ポリフェノール含有量 (%)***	抗酸化活性 (%)****
	×10	×100	×1	×1		
1	99.9	24.5	36.4	93.5	11.03	0.049
2	99.9	50.0	53.7	85.9	11.73	0.034
3	99.9	38.4	50.9	91.0	8.13	0.208
4	99.9	63.1	34.0	93.0	10.20	0.560
5	85.9		7.2	64.1	5.35	0.160
6	79.6		45.1	68.1	4.93	0.478
7	71.6		48.0	41.8	3.73	0.679
8	88.6		17.8	74.3	3.79	0.268
9	16.6		3.0	47.5	2.61	1.757
10	7.1		9.3	44.0	1.77	1.477
11	6.8		0.1	30.1	1.01	1.524
12	20.1		19.2	70.0	6.78	0.412
13	27.0		14.9	40.8	2.96	0.847
14	99.9	24.6	41.7	94.8	9.98	0.575

*：表 3-1参照
**：添加試料（＝H_2O）のラジカル量を100としたときの相対値（%）
***：乾物重量%（没食子酸相当）

****：抗酸化活性＝ $\dfrac{\text{試料溶液（15分O.D.－45分O.D.）}}{\text{BHA(1mg/100ml)（15分O.D.－45分O.D.）}}$

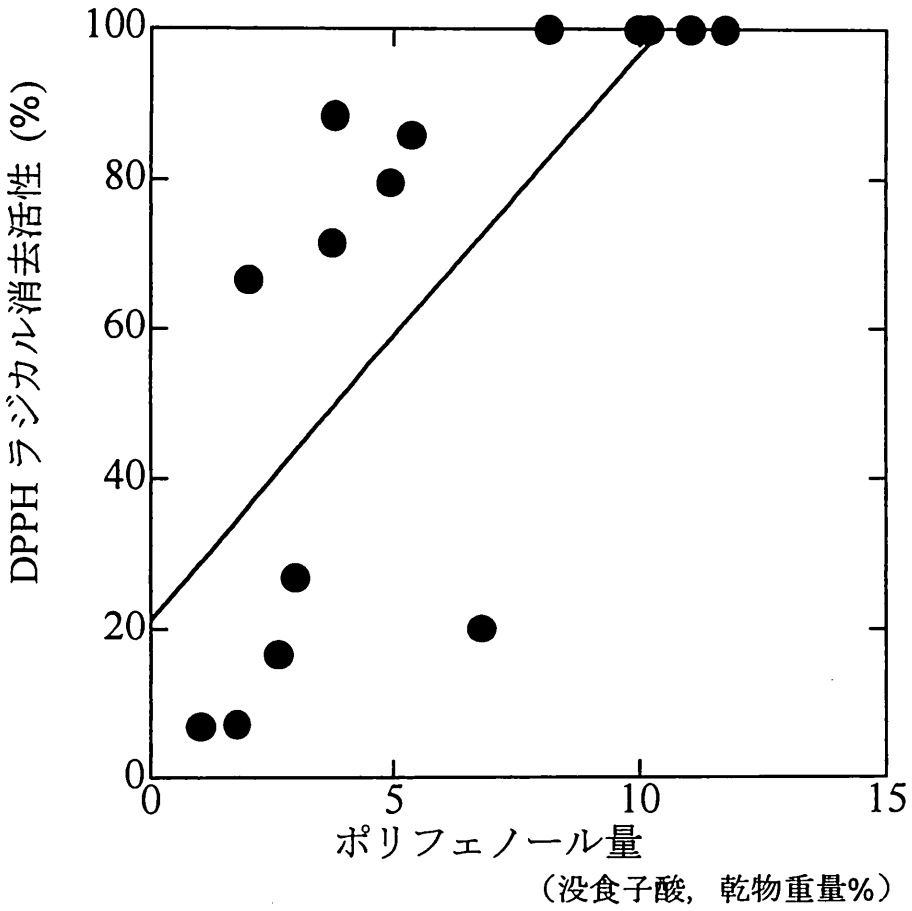


図 3-2-1　全ポリフェノール含有量とDPPHラジカル消去活性

●：食用花弁（n=13）　r=0.748　p<0.01

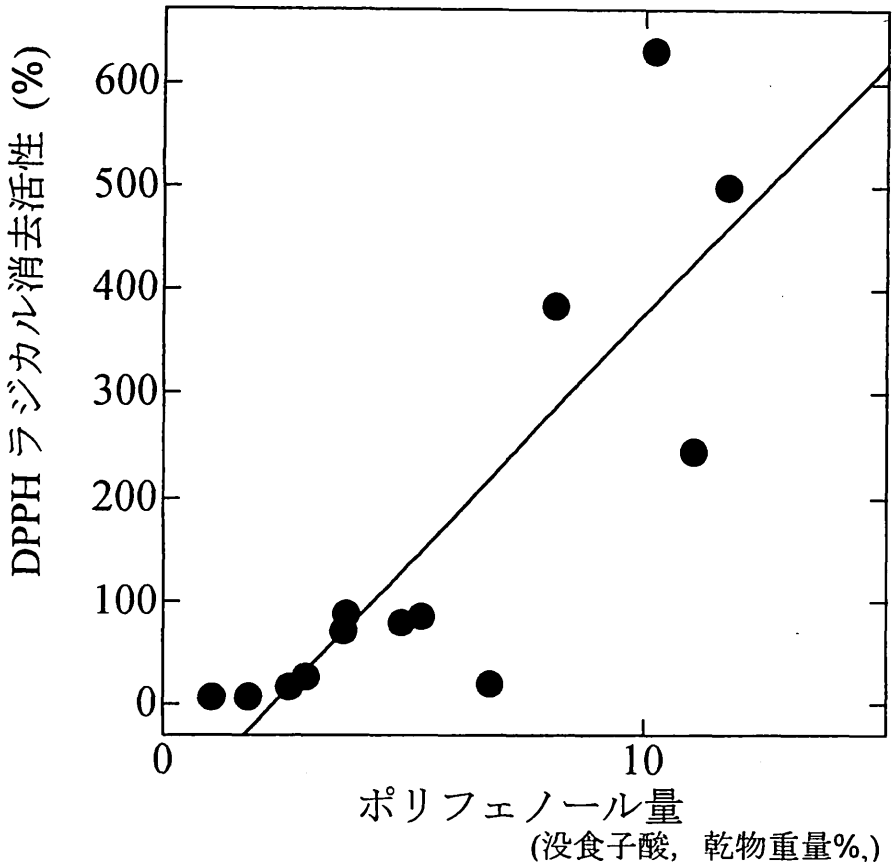


図 3-2-2　全ポリフェノール含有量とDPPHラジカル消去活性

●：食用花弁（n=13）　y=48.705x－111.026　r=0.8387　p<0.01

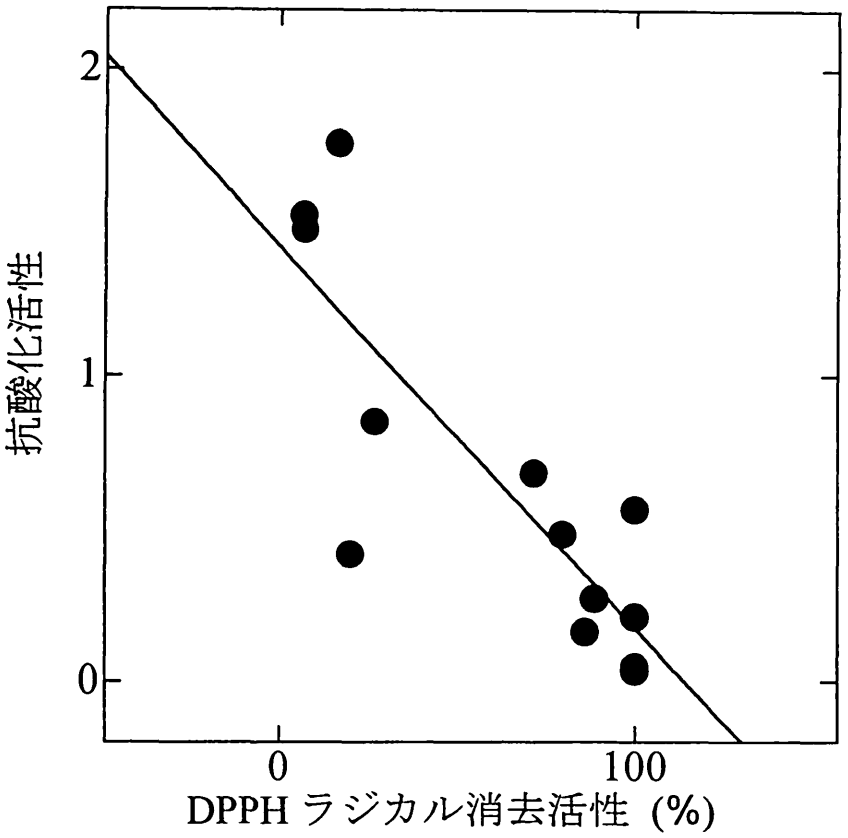


図 3-3　DPPHラジカル消去活性と抗酸化活性

●：食用花弁（n=13）　y=0.013x+1.423　r=-0.8388　p<0.01

$$\text{抗酸化活性} = \frac{\text{試料溶液（15分O.D.－45分O.D.）}}{\text{BHA(1mg/100ml)（15分O.D.－45分O.D.）}}$$

効果と各種花弁のDPPHラジカル消去活性の強弱の順位との間に相関が示された．この結果は，DPPHラジカル消去活性が全ポリフェノール化合物の還元力を表す指標となりうることを示唆している．

3-3-2 各種花弁抽出液の
ヒドロキシルラジカル消去活性と全ポリフェノール含有量

各種花弁抽出液は，前項より，ラジカルを速やかに捕捉するラジカル捕捉型抗酸化物の可能性が考えられる．そこで，ヒドロキシルラジカル消去活性について，全ポリフェノールとの関連を検討した．試験結果を表 3-3に示す．各種花弁抽出液は，DPPHラジカル消去活性と同様な傾向が認められた．そこで，各種花弁抽出液のヒドロキシルラジカル消去活性の効果と全ポリフェノール含有量との相関性を調べた．相関係数は，r=0.707（p<0.01）を示し，強い相関が認められた（図 3-4）．これより，各種花弁抽出液のヒドロキシルラジカル消去活性の効果には，抽出液の全ポリフェノール含有量の寄与が考えられる．ヒドロキシルラジカルは，反応性が非常に高く，ほとんどの生体物質と速やかに反応するフリーラジカル[11]で，例えば，膜脂質から水素原子を引き抜き，直接的に脂質過酸化反応を開始させることが可能であるとされている[12]．従って，各種花弁の中で，特に全ポリフェノール含有量の高いバラ赤色花弁抽出液は，生体内脂質の過酸化を予防する直接的因子として有用であると考えられる．

3-3-3 各種花弁抽出液のスーパーオキシド消去活性と全ポリフェノール含有量

次に，各種花弁抽出液のスーパーオキシド消去活性について全ポリフェノール含有量との関連から検討した．試験結果を表3-3に示す．各種花弁抽出液は，DPPHラジカル消去活性，ヒドロキシルラジカル消去活性と同じ傾向が認められた．各種花弁抽出液のスーパーオキシド消去活性の効果と全ポリフェノール含有量との相関係数は，r=0.904（p<0.01）を示し，強い相関が認められた（図 3-5）．このことから，各種花弁抽出液のスーパーオキシド消去活性の効果には，抽出液の全ポリフェノール含有量の寄与が指示される．スーパーオキシドは、ヒドロキシルラジカルと共に生体内の脂質過酸化反応に深く関与するといわれているとともに，これらの活性酸素・フリーラジカルは，老化、脳梗塞，動脈硬化，炎症，ガンなどにも関与すると

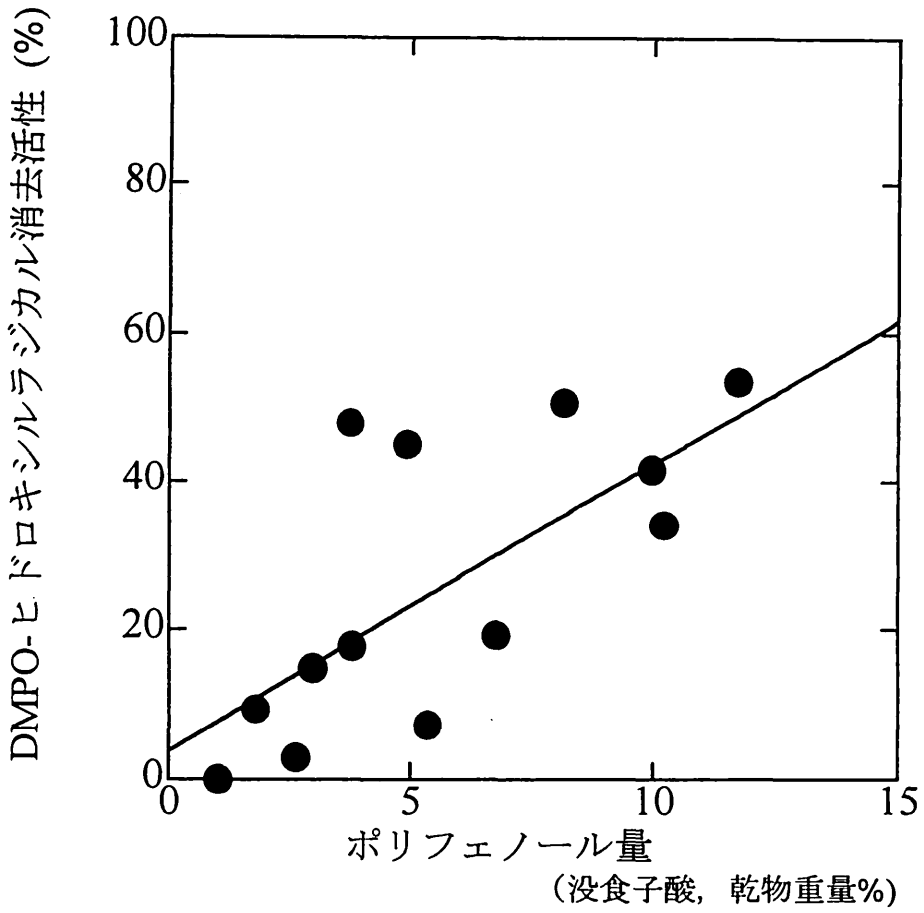


図 3-4　全ポリフェノール含有量とヒドロキシルラジカル消去活性

●：食用花弁（n=13）　y=3.99x+4.11　r=0.707　p<0.0.1

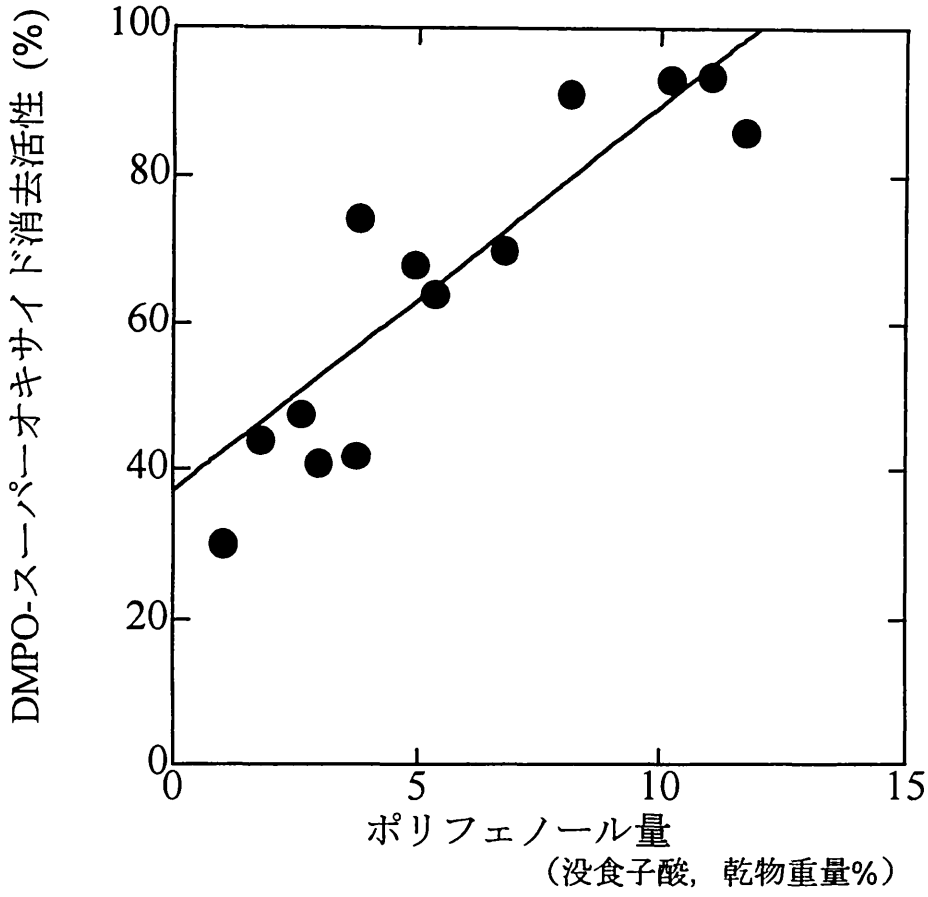


図 3-5　全ポリフェノール含有量とスーパーオキシド消去活性

●：食用花弁（n=13）　y=5.59x+33.11　r=0.904　p<0.01

いわれている[13]．全ポリフェノール含有量の高い花弁は，これらの発症予防にも有効であるかもしれない．しかし今回の検討は，あくまで*in vitro*におけるものであり，多成分溶液の花弁抽出液が，*in vivo*で同じような消去活性を示すか否かについては今後の課題である．

3-3-4 茶浸出液（ローズティ，煎茶）のDPPHラジカル消去活性

花弁抽出液に活性酸素・フリーラジカル消去作用が認められたので，現在ローズティとして用いられている花弁抽出液の利用における可能性を，茶浸出液について検討した．私たちが日常飲用している茶の入れ方は，茶の種類によって，浸出条件は異なっている．そこで，ローズティおよび煎茶を用いて，日常飲用する程度の花弁浸出液（すなわちフラワーティ）に，フリーラジカル消去活性の効果が期待できるのか，また，日常の茶の入れ方によって活性の効果に影響が及ぼされるのかどうか，DPPHラジカル消去活性の効果から検討した．図 3-6に茶浸出液（ローズティ，煎茶）のDPPHラジカル消去活性の強さの結果を示した．

この結果，ローズティ，煎茶とも同様に高い消去活性を示した．さらに，茶浸出液を希釈して試験を行なったところ，浸出条件の違いによる消去活性を比較すると，両茶の浸出条件の違いによる消去活性の挙動は大変類似していることが示された．消去活性の効果を浸出条件の違いから比較すると，最も高い活性を示した条件は，a：100℃の熱水50m*l*を加えて，1分間加熱を続ける方法であった．次に，c：2℃の水50m*l*を加えて，8時間2℃の庫内で静置浸出する方法，そして，b：100℃の熱水50m*l*を加えて，1分間静置加熱の方法の順であった．

これより，茶浸出液のDPPHラジカル消去活性には，熱を加えることによって抽出されやすくなる成分による影響も受けていると思われる．またこの消去活性成分は，強力なラジカル消去活性を有するビタミンCに由来するものではないと考えられる．なぜならば，バラ花弁（乾物重量100g中191mg[14]），煎茶（乾物重量100g中263mg[15]）は，ビタミンCを多く含む食品であるが，ビタミンCは加熱すると活性を失うといわれている（煎茶10g 90℃の湯430m*l* 1分の浸出液中では，4mgの残存と報告されている[15]．）．また，本試験においては，加熱抽出方法による浸出液の消去活性の効果の減少が認められなかったからである．

すなわち，日常飲用する程度のバラ赤花弁浸出液（ローズティ）には，煎茶並の

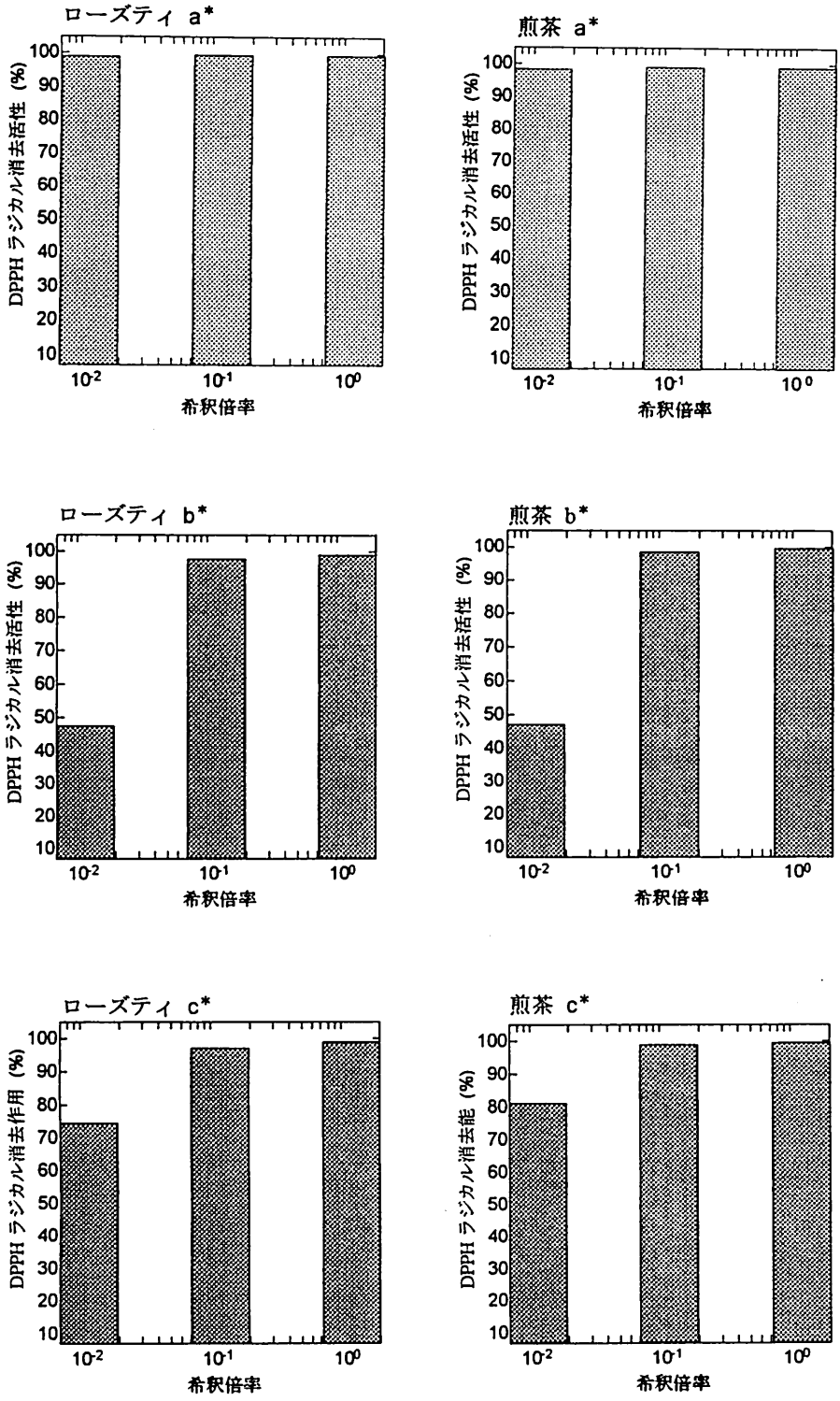


図 3-6　茶浸出液（ローズティ，煎茶）の DPPHラジカル消去活性

a：凍結乾燥試料1gに100℃の熱水50mlを加え，1分間加熱浸出した浸出液
b：凍結乾燥試料1gに100℃の熱水50mlを加え，1分間静置浸出した浸出液
c：凍結乾燥試料1ｇに2℃の水50mlを加え，8時間2℃の庫内で静置浸出した浸出液

DPPHラジカル消去活性の効果を有することが認められた．

消去活性の効果に影響を及ぼす成分中には，煎茶の消去活性成分の挙動と類似した加熱抽出法により浸出される成分の関与が考えられた．この成分は，前項において，フリーラジカル消去活性に強い寄与が考えられるポリフェノール成分が関与していると思われる．現在検討を進めている．

以上，各種花弁抽出液には，DPPHラジカル，ヒドロキシルラジカル，スーパーオキシド消去活性が認められ，その寄与因子として，全ポリフェノール含有量との関連が明らかになった．また，花弁抽出液の消去活性成分は，手軽な利用としての茶浸出液においても，失活は認められず有用であると考えられた．今後，消去活性の効果が高かったバラ赤色花弁を中心に，赤色花弁の成分，赤色花弁とフリーラジカル消去作用について検討を進めていきたいと考えている．

3-4　要約

日常的に広く利用されている食用花弁の水溶性抽出液について，DPPHラジカル，ヒドロキシルラジカルおよびスーパーオキシドの消去活性について，ESR法を用いる方法で試験を行い検討した．

(1) 13種の花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性と抗酸化活性との間に高い相関性が認められた．抗酸化活性の測定は，リノール酸を基質としたエマルション系に添加し，β-カロテンの退色の防止活性を指標とする試験法で行った．

(2) DPPHラジカル消去活性・ヒドロキシルラジカル消去活性・スーパーオキシド消去活性は，13種の花弁抽出液の全ポリフェノール含有量との間に，各々の相関性が認められ，全ポリフェノール含有量の各種フリーラジカル消去活性の寄与が示唆された．ポリフェノールの定量はFolin-Denes法に従って行った．

(3) 日常飲用するレベルの茶浸出液（ローズティ・煎茶）についても，DPPHラジカル消去活性の効果を認め，その中で，加熱する浸出液（ 試料1gに100℃の熱水50mlを加え，1分間加熱浸出した浸出液 ）の活性の効果が最も高かった．この活性はビタミンCに由来するものではないことを示唆している．

第４章　茶浸出液の血小板凝集抑制作用

4-1　緒言

茶は，古来から嗜好飲料として広く人々に親しまれてきたものであり，全世界では万余に及ぶ多種多様の茶が飲用されている．茶のもつ生理的な働きとしては．従来よりカフェインの興奮作用などが重要なものとされていたが，近年では色々の面からの茶の生理的な機能性についての究明が活発に行われてきている[1)2)]．

わが国は近年世界有数の長寿国となったが，一方では，高齢化に伴い脳梗塞や心筋梗塞のような高い死亡率とともに深刻な後遺症のある循環器系の病気が，医学的にも社会的にも大きな問題となっている．これらの疾患は，いづれも血液中の血小板機能の昂進と，血小板凝集に続いて起こる血栓形成による血管の塞栓が共通の原因となっており，その対策として主に治療を目的とする抗血小板剤の開発も進められる一方，食生活を中心とした予防にも強い関心が持たれている[3)4)]．

著者らも食生活による抗血栓効果を目的として，青果物その他各種の食品及びその成分の血小板凝集抑制作用について調べているが[5)]，本報告では，古くから世界中の人々の生活に深く係わっている“茶”に注目し，各種茶の浸出液について *in vitro* 系での血小板凝集抑制作用を調べ，その活性と含有茶成分との関連性について検討した結果について報告する．

4-2　実験方法

4-2-1　供試茶試料及び試薬

実験には，三井農林食品総合研究所において品質的に特徴を持つものとして選ばれた半発酵茶（4 種），発酵茶（6 種），後発酵茶（1 種）と市販の不発酵茶（10 種）の計 21 種を用いた（表 4-1）．

試薬：

(1) カフェイン標品

カフェイン（Caffeine）：米山薬品，試薬特級

(2) カテキン類標品

(＋) －カテキン（C）：三井農林 KK 供試品

(－) －エピカテキン（EC）：三井農林 KK 供試品

(＋) －ガロカテキン（GC）：三井農林 KK 供試品

(－) －エピガロカテキン（EGC）：三井農林 KK 供試品

(－) －エピカテキンガレート（ECg）：三井農林 KK 供試品

(－) －エピガロカテキンガレート（EGCg）：三井農林 KK 供試品

(3) テアフラビン類標品

テアフラビン　フリー（TF）：三井農林 KK 供試品

テアフラビン　モノガレート（TFMg-A&B）：三井農林 KK 供試品

テアフラビン　ジガレート（TFDg）：三井農林 KK 供試品

(4) HPLC 分析用試薬

アセトニトリル：HPLC 分析用

N-N-ジメチルホルムアミド：米山薬品，試薬特級

リン酸：米山薬品

蒸留水：HPLC 分析用

(5) 血小板凝集測定用試薬

血小板凝集惹起物質

コラーゲン：Collagen reagent Horm

SKF Buffer : pH2.7～2.9

ADP：ベーリンガー，マンハイムジャパン

表 4-1　供試茶試料

不発酵茶	玉露	(市販　静岡　川根)
	煎茶 A，B，C，D，E	(市販　川根，宇治，狭山)
	深蒸し煎茶	(市販)
	抹茶入り煎茶	(市販)
	抹茶	(市販　宇治)
	青柳茶	(市販)
半発酵茶	Taiwan Oolong（烏龍茶）	(三井農林　K.K.)
	China Shui Hsie（水仙）	(三井農林　K.K.)
	China Se Chung（色種）	(三井農林　K.K.)
	China Ti Kwan Yin（鉄観音）	(三井農林　K.K.)
発酵茶	Darjeeling	(三井農林　K.K.)
	Sri Lanka（Uva）	(三井農林　K.K.)
	Sri Lanka（Dimbula）	(三井農林　K.K.)
	Assam（CTC）	(三井農林　K.K.)
	Assam（Orthodox）	(三井農林　K.K.)
	Kenya	(三井農林　K.K.)
後発酵茶	Yunnan Pu Eth Tea（雲南プーアル茶）	(三井農林　K.K)

4-2-2　茶浸出液の調製

茶葉 1g に 100℃の熱水 40m*l* を加え，3 分間静置浸出後，濾紙（No.2）で濾過し，得られた茶浸出液を血小板凝集測定，および HPLC によるポリフェノール成分測定のための試料に調製した．即ち，血小板凝集測定試料は 0.45 μm (Hydrophilic)メンブランフィルターで濾過して用い，HPLC 分析用試料はアセトニトリルで 2 倍希釈したものを 0.50 μm (Hydrophobic)メンブランフィルターで濾過し，分析に供した．

この浸出条件は，食品成分表に記載されている緑茶及び紅茶の浸出液の調製条件に準じたもので，浸出条件の検討以外の全ての実験はこの調製方法による茶浸出液を用いた．

4-2-3　血小板凝集惹起物質の調製

血小板に刺激を与えて血小板を凝集させる惹起物質は，下記に示す濃度範囲で，実験に供する血液の凝集力に応じて変えて用いた．

コラーゲン：1 μg /m*l*, 2 μg /m*l*

ADP：1～3 μM（終濃度）

4-2-4　HPLC の測定条件

茶浸出液中の主要成分の分析については多くの報告があり，とくに最近は HPLC を用いた研究も多い[6)7)]．しかし，カフェイン，カテキン類およびテアフラビン類を同時に分離定量している例がない．著者らは HPLC の諸条件を検討した結果，図 4-1 に示すような分析条件を確立し，この方法によりこれまで行われていなかったカフェインおよび 6 種のカテキン類と 3 種のテアフラビン類を同時に定量的に分析することができた．

カフェイン，カテキン類およびテアフラビン類の標品は，各々アセトニトリル：水（1：1）混液で，1mg /m*l* となるように溶解して標準溶液とした．

4-2-5　血小板凝集抑制作用の測定

a）測定機器

二光バイオサイエンス社製ヘマトレーサー

b）測定方法

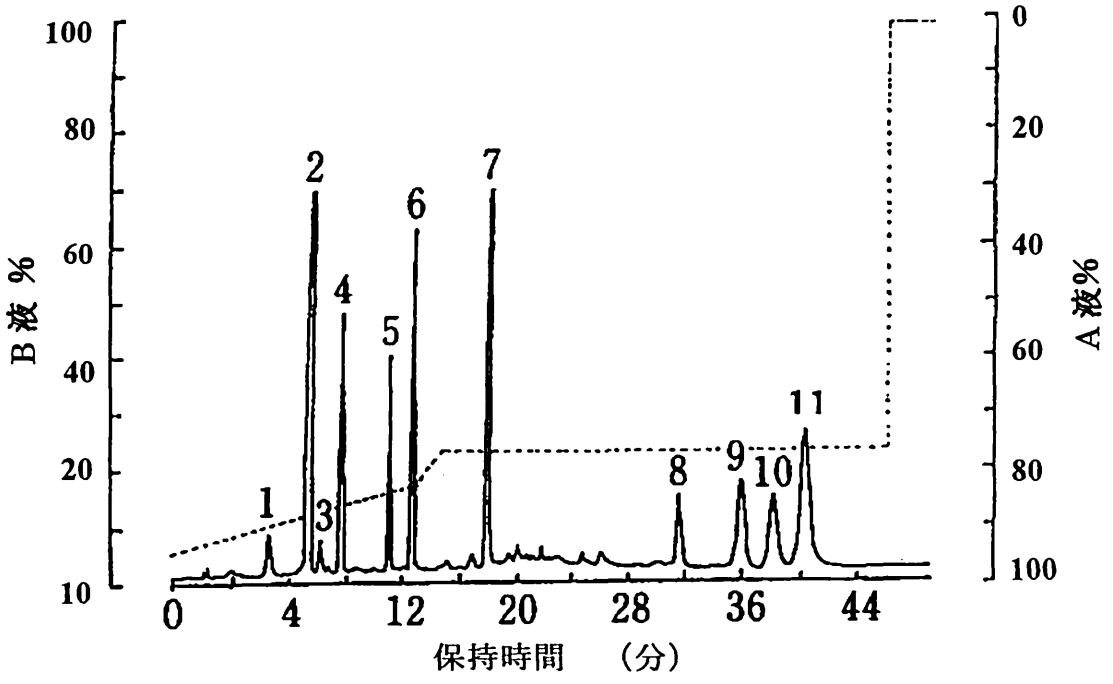


図 4-1 主要茶葉成分の HPLC クロマトグラム

Peak No. : 1.GC, 2.Caffein, 3.EGC, 4.C, 5.EC, 6.EGCg, 7.ECg,
8.TFF, 9.TFMA, 10.TFMB, 11.TFD

分析条件

機器：島津 LC-6A

カラム：Ultron N-18, 4.6×150mm

カラム温度：33℃

移動相：A 液 0.1%アセトニトリル及び 5% *N,N* ジメチルホルムアミド含有の 0.1%リン酸溶液

B 液 アセトニトリル

..... 移動相グラジェント条件

——— 主要茶葉成分標品のクロマトグラム

血小板の凝集能の測定は，凝集惹起物質添加による血小板刺激後の血小板浮遊液（PRP）の光の透過度の変化から血小板凝集率を求めた．先ず，採血量の 1/10 容量の 3.8%クエン酸ナトリウムを予め封入したシリンジを用いてヒトの静脈血を採り，採血した血液をゆるやかに混和後，直ちに室温で 1000 回転/分で 10 分間遠心分離を行い，この上清の血小板浮遊液（多血小板血漿 Platelet Rich Plasma，PRP）を得て，これを比濁計の透過率 0%とし，下層は更に室温で 3000 回転/分で 15 分間遠心分離を行って，その上清として得られる乏血小板血漿（Platelet Poor Plasma，PPP）を透過率 100%の基準値とした．

測定は，PRP 200 μ l を 37℃で攪拌している中に試験試料 20 μ l を加え，これに血小板凝集惹起物質 20 μ l を加えて血小板の凝集をおこさせ，添加した試料による凝集抑制の効果を調べた．

c）抑制効果の判定

抑制効果を評価する基準としては，凝集速度，凝集強度或いは最大凝集を示すまでの時間など様々の基準が用いられているが，本実験では，試料無添加（コントロール）PRP の惹起物質添加後 3 分における凝集率（Ao）と，試料を添加した場合の凝集率（As）から，次式により抑制率を求めた．

抑制率 ＝ Ao－As / Ao×100

上記の方法で，実際に煎茶および青柳茶の浸出液について測定した場合の凝集曲線を図 4-2-A に，抑制率を図 4-2-B に示した．

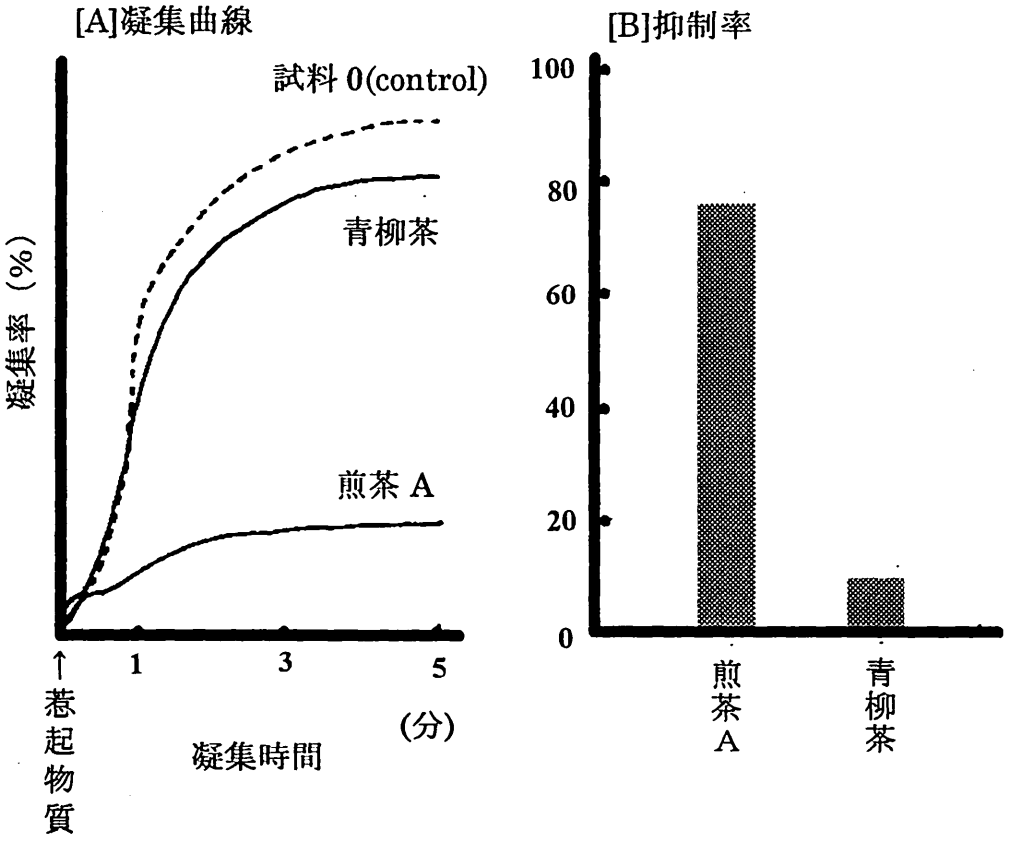


図 4-2　血小板凝集曲線と抑制率

$$抑制率 = \frac{A_0 - A_s}{A} \times 100$$

A_0：凝集 3 分におけるコントロールの凝集率
A_s：凝集 3 分における試料添加の凝集率

4-3　実験結果及び考察

4-3-1　茶浸出液の血小板凝集作用

a）浸出条件と血小板凝集抑制作用

日常茶を飲用する場合，それぞれの茶について浸出温度，浸出時間，浸出湯量や浸出回数などがかなり異なる．そこで，まず浸出条件が血小板凝集抑制作用に及ぼす影響について，平均して強い活性を示した紅茶または煎茶を用いて検討し，これらの浸出条件と抑制効果の結果を図 4-3 にまとめて示した．

1）浸出時間

紅茶 1g に熱湯 40m*l* を加え，1，3，5 分間静置浸出後の浸出液について血小板凝集抑制効果を調べた結果，浸出時間 1 分では抑制効果はまだ低く，3 分間浸出で活性はほぼピークに達することが認められた．このことから，浸出時間としては 3 分程度で十分と考えられ，有効物質は 2～3 分間で浸出される成分であることが推測された．以後の実験では，浸出時間はすべて 3 分間とした．

2）湯量

湯量については，1g の煎茶に 30，40，90，120m*l* の熱湯を加え 3 分間静置した場合の各浸出液について血小板凝集抑制効果を調べた．1g の茶に対して一般的な湯量である 40m*l* を用いた浸出液の抑制率を 1 とした場合，120m*l* での浸出液の抑制率は約 1/5 となった．

3）湯温

茶浸出の湯温は，紅茶では一般的に熱湯を用いるが，緑茶においては熱湯玉露などと言うものを除いてやや低い温度で浸出することが多い．そこで，煎茶 1g に 100℃，と 80℃の湯 40m*l* を加えて浸出した液について血小板凝集抑制効果をみると，100℃では約 83%の抑制率を示したが，80℃では 40%程度の抑制率となり，効果が半減することが認められた．

4）浸出回数

煎茶 lg に 40m*l* の熱湯を加えて浸出し濾別後，更に二番煎じ，三番煎じしてこれらの各浸出液の抑制効果をみると，二番煎じ以降は効果が激減することが認められた．

b）各種茶浸出液の血小板凝集抑制作用

前項において示された茶の浸出条件と浸出液の血小板凝集抑制効果との関連の検討をもとに，さらに日本食品成分表記載の煎茶および紅茶の浸出液調製法を参考として茶浸出液の調製条件を 1g の茶試料に熱湯 40m*l* で 3 分間浸出とし，この方法により各種の茶浸出液を調製して血小板凝集抑制効果を調べた．各々数回の実験を行った結果から抑制効果の強弱によって分類したものを表 4-2 に示した．この結果，茶の種類によって抑制率 50%以上のかなり強い活性を示すものから 10%以下の弱いものまで色々あるが，いづれの茶も飲用条件の浸出液で血小板凝集抑制効果を示した．しかし活性の差異と，発酵の有無などの製造方法との関係はとくに認められなかった．

4-3-2　茶浸出液の血小板凝集曲線と HPLC 分析

表 4-2 の結果から，各種茶の浸出液に抑制効果が認められたので，同じ浸出液について HPLC 分析を行い，浸出する茶葉成分と活性との関連について検討した．図 4-4 には，不発酵茶，発酵茶，半発酵茶および後発酵茶の代表的な茶の HPLC による分析結果と抑制率との関係を示した．不発酵茶におけるクロマトグラムから血小板凝集抑制活性について考察すると，50%以上の抑制率を示した煎茶 A は，青柳茶に比べ全体に浸出成分が多く，とくに(−)-エピガロカテキン，(+)-カテキン，(−)-エピカテキン，(−)-エピガロカテキンガレートが多かった．このことからこれらカテキン類が活性に寄与する可能性が考えられた．発酵茶では，抑制率 50%以上の高い効果を示したケニア産紅茶と 10%以下であったダージリン紅茶についてクロマトグラムを比較すると，発酵茶特有の紅色色素テアフラビン類の浸出量に顕著な差が認められ，また，カテキン類としては，(−)-エピカテキン，(+)-カテキンがケニア産紅茶に多く，これら成分の活性への寄与が推測された．半発酵茶は，本実験での浸出条件では顕著な活性を示したものがなくクロマトグラムにみられる浸出成分も少ない．後発酵茶は，活性は認められるが他の発酵茶，不発酵茶とクロマトグラムのパターンがかなり異なり，カテキン類などは極めて少なく，早い時間に浸出する不明な成分の多いことが特徴的である．この場合には，カテキン類以外の成分が血小板凝集抑制効果に寄与している可能性を示している．

4-3-3　主な茶葉成分の血小板凝集抑制作用

表 4-2　茶浸出液の血小板凝集抑制作用一覧

血小板凝集	製造方法			
抑制率	不発酵茶	発酵茶	半発酵茶	後発酵茶
50%以上	*煎茶 A 煎茶 B 煎茶 C	*ケニア		
50～30%	深蒸し煎茶 抹茶	スリランカ (ディンブラ) アッサム (オーソドックス)	*中国　色種 台湾　烏龍	*雲南プーアル茶
30～10%	煎茶 D 抹茶入り煎茶 玉露	アッサム (CTC)	中国　水仙 中国　鉄観音	
10%以下	*青柳茶 煎茶 E	*ダージリン		

*表 4-4 に浸出液中の主な茶葉成分量記載　茶葉 1g/40m*l* 熱水/3 分

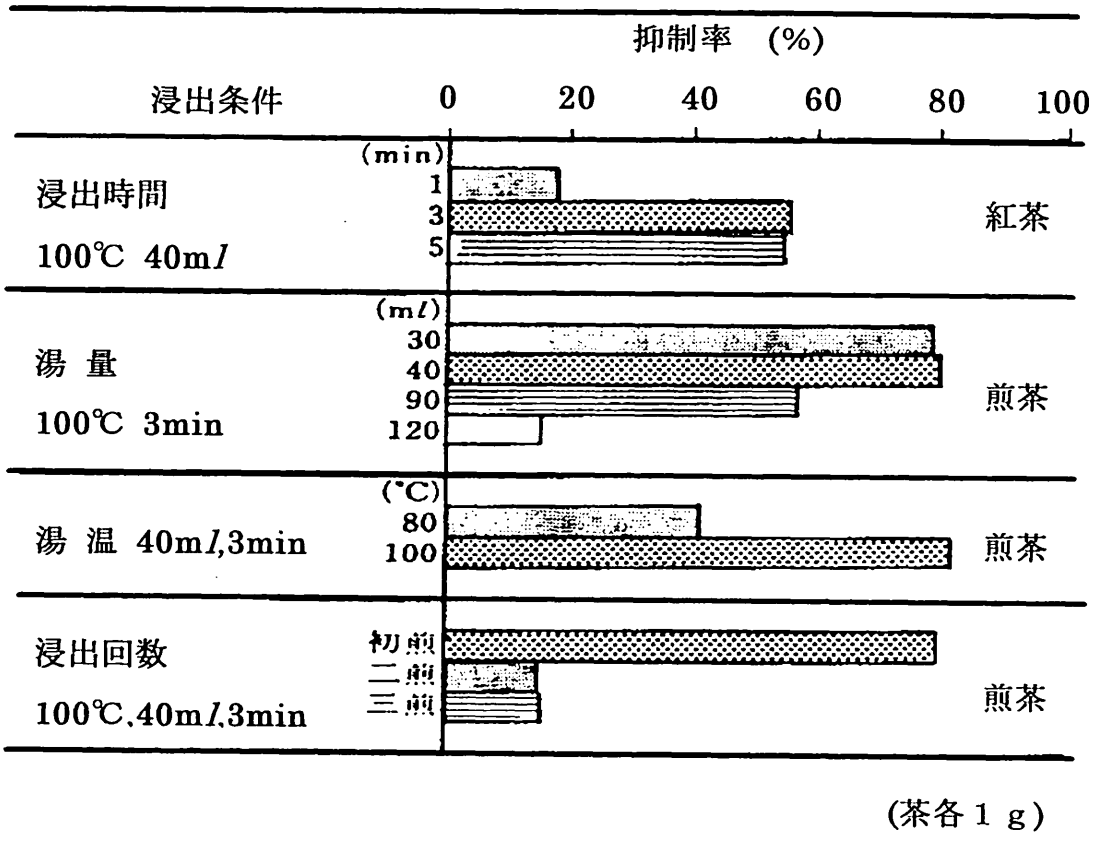


図 4-3 侵出条件と抑制効果

各種茶の浸出液の血小板凝集抑制作用の結果から茶葉成分中のカテキン類およびテアフラビン類の活性への寄与の可能性が考えられたので，標品を用いて主な茶葉成分の血小板凝集抑制作用を調べた．表 4-3 に示したように，活性の強弱はあるがカテキン類，テアフラビン類及びカフェインに血小板凝集抑制の効果が認められ，とくにカテキン類では，(−)-エピカテキン，(+)-カテキン，(+)-ガロカテキンに，またテアフラビン類ではテアフラビンモノガレートに強い活性が認められた．

4-3-4　茶浸出液中の有効成分についての検討

主な茶葉成分の比活性が得られたので(表 4-3)，この値と，製法別の代表的な茶(表 4-2 の*印)の浸出液中のそれらの成分含量(表 4-4)をもとに茶浸出液の効果に関する各成分の寄与の評価を試みた．その結果，煎茶 A 浸出液中では凝集抑制 50〜30%を示すと考えられる成分は，(−)-エピカテキン，(−)-エピガロカテキン，(−)-エピガロカテキンガレート，(+)-カテキン，(+)-ガロカテキンであり，ケニア産紅茶では，(−)-エピカテキン，(−)-エピガロカテキン，(+)-カテキン，(+)-ガロカテキン，テアフラビンモノガレートが，中国色種では，(−)-エピカテキン，(+)-ガロカテキン，(−)-エピガロカテキンが，また雲南プーアル茶では(−)-エピカテキン，(−)-エピガロカテキン，(+)-ガロカテキンが活性に寄与している可能性が考えられた．しかし，茶には本試験で標品分析を行っていない成分で有効なものも含まれている可能性もあり，それらの物質の解明を検討する必要がある．

4-3-5　血栓症予防における茶浸出液の有効量の考察

このような *in vitro* 系の試験で，煎茶その他の茶浸出液，及びそれらの茶の主要成分であるカテキン類などに血小板凝集抑制作用があることが明らかにされた．そこで，我々が日常飲んでいる茶の量で実際に血栓症の予防への寄与が期待できるであろうか．この点について考察してみたい．食品成分が *in vivo* でも有効であるかの判定は，最終的には臨床試験によって評価されなくてはならない．この場合，動物体内におけるカテキン類などの吸収や代謝が重要な問題となるが，ここでは茶の成分が殆どそのまま吸収されて血中で有効に働くと仮定して茶の飲用効果について検討を試みた．その一つの方法として，茶成分の抗血小板試験で最も強い活性を示した(−)-エピカテキンが 50〜30%の抑制を示す濃度を血液中の有効濃度と考え，これ

表 4-3　茶葉成分の血小板凝集抑制作用

mg/ml 終濃度 / 茶葉成分	1	0.5	0.1	0.05	0.02
C	＋＋＋	＋＋＋	＋＋	＋＋	＋
EC	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋	＋
GC	＋＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋
EGC	＋＋＋	＋＋	＋＋	＋	－
ECg	＋＋＋	＋	＋	＋	－
EGCg	＋＋＋	＋	＋	＋	＋
TFF	＋＋	＋	＋	＋	－
TFM(A&B)	＋＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋
TFD	＋＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋
Caffeine	＋＋＋	＋	＋	－	－
*アスピリン	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋

抑制率：50%以上＋＋＋　，50～30%＋＋　，30～10%＋，10%以下－
*活性コントロール

表 4-4　茶浸出液のカフェイン，カテキン，テアフラビン類量

茶葉 1g/40ml 熱水/3 分　　(mg)

成分名 / 茶	CAFFE	GC	EGC	C	EC	EGCg	ECg	TFF	TFMA	TFMB	TFD
煎茶 A	22.97	2.01	47.90	3.00	12.92	59.75	7.67	—	—	—	—
青柳	31.15	1.10	33.59	1.26	9.98	44.70	6.09	—	—	—	—
Kenya Tea	26.37	12.35	56.87	15.89	19.89	31.97	12.03	6.29	1.76	1.24	1.04
ダージリン	19.38	1.65	13.51	1.93	3.69	23.39	10.05	1.15	0.24	0.20	0.28
色種	22.75	6.05	19.88	1.29	7.38	27.82	4.05	0.23	—	—	—
雲南ﾌﾟｰｱﾙ茶	26.29	4.89	6.49	1.50	5.41	2.68	1.47	—	—	—	—

CAFFE：カフェイン
GC　：(+)-ガロカテキン
EGC　：(−)-エピガロカテキン
C　：(+)-カテキン
EC　：(+)-エピカテキン
EGCg：(−)-エピガロカテキンガレート
ECg　：(−)-エピカテキンガレート
TFF　：テアフラビンフリー
TFMA：テアフラビンモノガレート A
TFMB：テアフラビンモノガレート B
TFD　：テアフラビンジガレート

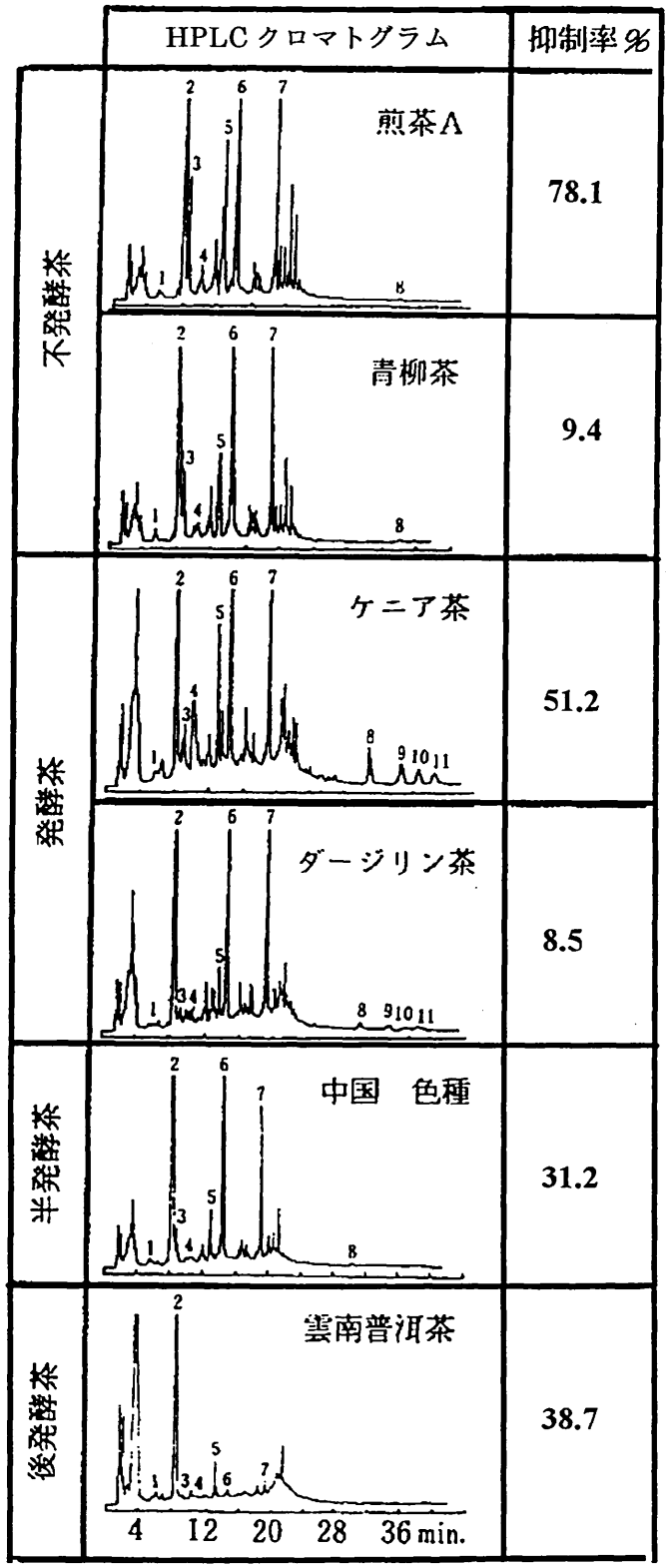


図　4-4　茶浸出液の HPLC と血小板凝集抑制率

と現在抗血小板剤として最も多く用いられているアスピリンが同程度の抑制効果を示す濃度で相対活性を求めると，(−)-エピカテキンの活性はアスピリンの約 2/5 となる．普通，アスピリンを抗血小板剤として投与する場合 80〜120mg/1 日であるので，上の相対活性からすると(−)-エピカテキンでは約 250mg/1 日となる．従って、この量を摂取するためには約 800ml の茶を飲用すれば良い事になる．なお，前述のように茶の浸出液の活性には他のカテキン類など多くの成分も寄与していると考えられ、推定必要量がもっと少なくなるとすると，日常飲用する茶の量でも効果がある程度期待できることになる．もちろん，実際の茶の飲用効果については，飲用成分の血中への移行率，血液中での有効濃度とその持続時間，その他の諸因子との関連，など多くの検討すべき要素があるので，臨床実験で十分研究されなければならない．それによって，茶の新しい機能性としての評価が明らかにされると共に，食と健康に関わる重要な因子としての茶の効用が解明されることが期待される．

4-4 要約

本研究では，食品の新しい生理活性機能の開発という視点から，茶の新しい機能性として血小板凝集抑制作用について *in vitro* 試験によって調べた．試験はヒト血液を用い，コラーゲン又は ADP により誘導される血小板凝集に対する抑制効果を調べた．

まず茶の浸出条件と血小板凝集抑制効果との関連を検討した結果，1g の茶試料を熱湯 40m*l* で 3 分間浸出することが適当であることが分かった．浸出時間は 1g の紅茶に対して熱湯を加えた場合では 3 分間でほぼ活性はピークとなり，湯の温度を 80℃に下げると抑制効果が約 1/2 に減少した．1g の茶に対する湯量は，一般的な量の 40m*l* での浸出が適当であり，120m*l* での浸出液では抑制率は約 115 に低下した．また，繰り返し浸出を行った場合は，二番煎じ以降の活性が激減することが示された．

製法の異なる各種茶についてこの条件で浸出したものの血小板凝集抑制作用を調べた結果，いづれの茶の浸出液にも効果が認められたが，煎茶などが強い活性を示し（抑制率 50%以上），青柳茶，ウーロン茶などは弱い傾向が認められた（抑制率 10%程度）．

各種茶の浸出液について HPLC 分析を行って主要成分を比較検討した結果，強い活性を示した煎茶に多い浸出成分としては(−)-エピガロカテキン，(+)-カテキン，(−)-エピカテキン，(−)-エピカテキンガレートなどが多くみられ，また紅茶の中で強い活性を示したものは，カテキン類としては(+)-カテキンと(−)-エピカテキンおよびテアフラビン類が多いことが認められた．

抽出精製したカテキン類 6 種，テアフラビン類 3 種およびカフェインの標品について血小板凝集抑制効果を調べた結果，いずれも効果が認められたが，とくにカテキン類では，(−)-エピカテキン，(+)-カテキン，(+)-ガロカテキンが，またテアフラビン類ではテアフラビンモノガレートが強い活性を示した．

第5章　総括

食品は単に栄養素の供給物質としてのみ機能するのではなく，様々な生体機能の調節に関与している．人間の健康はホルモン系，神経系，免疫系などを主体とする調節系によって維持され，この恒常性に乱れが生じてくると非健康状態に陥るが，その予防，回復に日常摂取している食品成分が大きく関わってくる．

一方，ポリフェノール化合物は，広く植物に含まれており，現在，これらポリフェノール成分は，日常の摂取量が多いばかりでなく，*in vitro* で示す抗酸化能や *in vivo* で示す発ガン抑制作用をはじめとする多様な機能が期待されている．

そこで，本研究では，このような観点に基づき，安全に使用でき，ポリフェノール成分を多く含む（であろう）食品を対象に、*in vitro*におけるその食品の生体防御機能調節因子の検索を中心に検討を行った．特に，日常において供するレベルでのその食品の生理活性の挙動についても明らかにすることにより，実際に用いられる際の可能性を模索することを含めて検討を行った．

研究に用いた試料は，広く食されているにも関わらず，いままで食品の機能に関する報告がほとんどない食用花弁と，最も生理機能の解明が進んでいる食品である茶葉について行い，下記に示す結論を得た．

1. 花弁のポリフェノール類の量と抗酸化活性

95種の花弁（バラ科，ツバキ科，キク科）の抽出液についてポリフェノール類の含有量（ポリフェノール含有量，アントシアニン含有量，フラボノール含有量）および抗酸化性を調べた．抗酸化性の測定は，リノール酸を基質としたエマルション系に花弁抽出液を添加し，β-カロテンの退色防止活性を指標とする試験法で行った．

ポリフェノール類の構成成分は科，属および花色でそれぞれ異なり，科別の全ポリフェノール含有量（乾物重量あたり，没食子酸量として）の平均は，ツバキ科8.74%，バラ科4.78%，キク科1.66%であった．最も高いポリフェノール含有値を示したのは，バラ属の赤色花弁で14.83%あった．

抗酸化活性は，95種の花弁全てが活性を示し，バラ属の赤色花弁の抽出液は，ＢＨＡ溶液（1mg/100m*l*）より約10倍強い活性を示した．さらに，各種花弁抽出液

の抗酸化活性は，ポリフェノール含有量との間に高い相関性が認められ，ポリフェノール類の抗酸化性への寄与が明らかとなった．抗酸化性に寄与するポリフェノール類の構成成分は，バラ属の赤色系花弁ではアントシアニン，キク科ではフラボノールの寄与が大きいことを示された．

2. 食用花弁抽出液のフリーラジカル消去活性

日常的に広く利用されている食用花弁の水溶性抽出液について，DPPH（1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル）ラジカル，ヒドロキシルラジカルおよびスーパーオキシドの消去活性について，電子スピン共鳴（electron spin resonance : ESR）装置（日本電子製 JES-FE1XG）を用いた方法により検討した．

13種の花弁抽出液は，全てDPPHラジカルの消去活性を示した．それらの花弁抽出液のDPPHラジカル消去活性は，その抗酸化活性との間に高い相関性（r=-0.838）を認めた．なお，抗酸化活性の測定は，リノール酸を基質としたエマルション系に添加し，βカロテンの退色防止活性を指標とする試験法で行った．

また，13種の花弁抽出液は，ヒドロキシルラジカル消去活性・スーパーオキシド消去活性も認められた．

これら各種フリーラジカル消去活性（DPPHラジカル消去活性・ヒドロキシルラジカル消去活性・スーパーオキシド消去活性）は，13種の花弁抽出液のポリフェノール含有量との間に相関性（0.839, 0.707, 0.904）が認められた．なお，ポリフェノールの定量は，Folin-Denes法に従って行った．

さらに，日常飲用するレベルの茶浸出液（ローズティ・煎茶）についても，DPPHラジカル消去活性を示し，最も加熱される方法の浸出液の消去活性効果が高かった．この結果は茶浸出液の持つラジカル消去活性が，ビタミンC由来ではないことを示唆している．

以上の結果より，各種花弁抽出液のこれらのフリーラジカル消去活性は，抽出液中のポリフェノール含量に高く依存していることが示された．

3.茶浸出液の血小板凝集抑制作用

茶の新しい機能性として血小板凝集抑制作用について*in vitro*試験によって調べた．試験はヒト血液を用い，コラーゲン又はADPにより誘導される血小板凝集に対

する抑制効果を調べた.

まず茶の浸出条件と血小板凝集抑制効果との関連を検討した結果，1gの茶試料を熱湯40m*l*で3分間浸出することが適当であることがわかった．浸出時間は1gの紅茶に対して熱湯を加えた場合では3分間でほぼ活性はピークとなり，湯の温度を80℃に下げると抑制効果が約1/2に減少した．1gの茶に対する湯量は，一般的な量の40m*l*での浸出が適当であり，120m*l*での浸出液では抑制率は約115に低下した．また，繰り返し浸出を行った場合は，二番煎じ以降の活性が激減することが示された.

製法の異なる各種茶についてこの条件で浸出したものの血小板凝集抑制作用を調べた結果，いづれの茶の浸出液にも効果が認められたが，煎茶などが強い活性を示し（抑制率50%以上），青柳茶，ウーロン茶などは弱い傾向が認められた（抑制率10%程度）.

各種茶の浸出液についてHPLC分析を行って主要成分を比較検討した結果，強い活性を示した煎茶に多い浸出成分としては(−)-エピガロカテキン，(+)-カテキン，(−)-エピカテキン，(−)-エピカテキンガレートなどが多くみられ，また紅茶の中で強い活性を示したものは，カテキン類としては(+)-カテキンと(−)-エピカテキンおよびテアフラビン類が多いことが認められた.

抽出精製したカテキン類6種，テアフラビン類3種およびカフェインの標品について血小板凝集抑制効果を調べた結果，いずれも効果が認められたが，とくにカテキン類では，(−)-エピカテキン，(+)-カテキン，(+)-ガロカテキンが，またテアフラビン類ではテアフラビンモノガレートが強い活性を示した.

以上，*in vitro*系での試験の範疇であるが，日常摂取している食品成分中に，極めて有効と思われる生体機能調節物質因子を認めるものと考えている.

現在，食品起源の生体調節物質の構造解析，作用の種類，作用の部位などの基礎研究が積極的に推進されている．食品による生体防御は，感染防御，代謝異常，アレルギー，老化さらにはホルモン系，神経系の制御と深い関係があることから，今後さらに生体防御食品素材の確保，製造加工，効果の評価法の確率，実用化上の問題などに関しておのおのの研究領域の視点のみではなく，総合的に検討する必要があるといわれている．今回，認められた生体防御物質因子・抗酸化物質は，植物性食品成分を摂取するに伴って，ヒトの生体防御機能を調節する一助に期待と可能性

が予測されるものであり，これは今後の全人類的規模の，長期間にわたるしかも強制されることのない健康を維持するための強力な手段となりえるだろうと思われる．よって，今後，本研究で注目したポリフェノール成分，それ以外のポリフェノール成分，その他の種々の植物性食品の含有成分，また，これらの生理活性成分を付与した食品についても，多面的な角度から，検証することが必要であると考えている．

謝辞

本研究を遂行するにあたり御指導，御鞭撻を賜りました新潟大学農学部　内山武夫教授，椙山女学園大学生活科学部　並木和子教授の各位に深く感謝致します．また，本研究に適切なご助言と御鞭撻を賜りました名古屋大学農学部　並木満夫名誉教授，日本電子株式会社応用研究センター　河野雅弘博士，県立新潟女子短期大学生活科学科　本間伸夫教授，新潟大学農学部　星野　力教授，新潟大学工学部　太田雅壽助教授に深く感謝致します．

さらに，本論文を作成するにあたり御指導を賜りました新潟大学農学部　石橋晃教授，新潟大学農学部　早川利郎教授，新潟大学農学部　鈴木敦士教授に深く感謝致します．

また，試料の御提供に御助力頂きました，三井農林株式会社　原　征彦博士，新潟県園芸試験場　築井　仁場長に厚く感謝申し上げます．

最後に，本研究に御助力頂きました元椙山女学園大学生活科学部　山中みどり助手ならびに椙山女学園大学生活科学部　食品化学研究室の皆様，元東邦大学医学部　五十嵐紀子博士，日本電子株式会社応用研究センター　ESR応用研究室の皆様，新潟大学農学部　内山研究室の皆様，新潟大学工学部　太田研究室の皆様，県立新潟女子短期大学　教職員の各位に厚く御礼申し上げます．

参考引用文献

第１章

1) 川岸舜朗：生物化学実験方法38　食品中の生体機能調節物質研究法，川岸舜朗編，初版（学会出版センター，東京）pp.1-6 (1996)

2) 篠原和毅：栄養と健康のライフサイエス，吉田勉編集人（学文社，東京）**1** No.4 pp.4-9 (1996)

3) E. N. Fankel, J. Kanner, J. B. German E Parks J. E. Kinsella : The Lancet **341** FEB20 pp.454-457 (1993)

4) 奥田拓男：活性酸素と医食同源，井上正康編著，初版（共立出版，東京）pp.224-232 （1996）

5) 佐野満昭：製薬工場，**7**，pp.780-784（1987）

6) 清水建美監修：週刊朝日百科 植物の世界　55号 5/7発行（朝日新聞社，東京・大阪）pp.223（1994）

7) 中山勉：がん予防食品の開発，大澤俊彦監修，初版（シーエムシー，東京）pp.147-155 (1995)

8) Kei-ichirou M : *International Symposium on Tea Culture and Health Science* (1996) Kakegawa city

第２章

1) 大澤俊彦・川岸舜朗：食品の生体調節機能，千葉英雄編，初版（学会出版センター，東京） pp.79-89 (1992)

2) 西野輔翼：がん予防食品の開発，大澤俊彦監修，初版（シーエムシー，東京）pp.93-100 (1995)

3) 牛島義男：抗酸化物質，二木鋭雄・島崎弘幸・美濃真編，初版（学会出版センター，東京） pp.59-69 (1995)

4) 倉田忠夫：抗酸化物質，二木鋭雄・島崎弘幸・美濃真編，初版（学会出版センター，東京） pp.79-86 (1995)

5) 寺尾純二：食品と開発，**28**，No.10，pp.10-13 (1993)

6) 高濱有明夫：活性酸素，中野稔・浅田浩二・大柳善彦編，新装版（共立出版，

東京）pp.342-347 (1993)
7）松崎妙子・原征彦：農化，**59**，No.2 pp.129-134 (1985)
8）橋本都三：花料理はエレガントなぜいたく，（農文協，東京）pp.16 (1989)
9）高宮和彦・阿部真帆・犬塚郁子・大河原歩美・大野敦子：調理科学，**24**，No.1 pp.32-35,
10）近田文弘：日食工誌，**38**，No.9 pp.874-880，(1991)
11）吉田久美：農化，**70**，No.1 pp.9-14，(1996)
12）Okuda, T, Hatano, T, Yazaki, K. and Ogawa, N. : *Chemical Pharmacentical Bulletin*, **30**, No.11 pp.4230-44233, (1982)
13）Okuda, T, Hatano, and Ogawa, N. : *Chemical Pharmacentical Bulletin*, **30**, No.11 pp.4234-4237, (1982)
14) Martin, M. J., Alarcon, C., Marhuenda, E., and Delgado, F.: *Ann. Pharmaceutiques francaise*, **46**, No.6 pp.371-375, (1988)
15）石田裕：調理科学，**26**，No.4 pp.378-384，(1993)
16）片山脩：栄養診断のための栽培植物分析測定法，作物分析法委員会編，第４版（養賢堂，東京）pp.392-399 (1980)
17）斉藤規夫：植物色素，林孝三編，初版（養賢堂，東.京） pp.268-277 (1980)
18）津志田藤二郎・鈴木雅博・黒木柾吉：日食工誌，**41**，No.9 pp.611-618，(1994)
19）坂本裕：茶業研究報告，**8**，pp.82-85，(1956)
20）Igarashi, K., Yosida, T. and Suzuki, E. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **40**, No.2 pp.138-143 (1993)
21）Tamura, H. and Yamagami, A. : *J.Agric. Food Chem.*, **42**, No.8 pp.1612-1615 (1994)
22）Tsuda, T., Watanabe, M., Oshima, K., Norinobu, S., Choi,S. W., Kawakishi, S. and Osawa, T. : *J. Agric. Food Chem.*, **42**, No.11 pp.2407-2410 (1994)

第３章

1）井上正康編：活性酸素と病態－疾患モデルからベットサイドへ－，初版（学会出版センター，東京）(1992)
2）寺尾純二：活性酸素と栄養，水木茂樹・五十嵐脩責任編集，初版（光生館，

東京） pp.159-178 (1995)
3) 五十嵐喜治：栄養と健康のライフサイエス，吉田勉編集人（学文社，東京）
1 No.3 p.71-77 (1996)
4) 立山千草・本間伸夫・並木和子・内山武夫：日食科工誌，（印刷中）
5) 小松美枝子：ハーブの知識と応用，岡本信弘編集人，（グラフ社，東京）
p.12 (1993)
6) 寺田洋子：茶，45，No.7 グラビア (1992)
7) 平松緑・枝松礼・門脇大・岡村容子・金倉圭一・森昭胤：磁気共鳴と医学，
小倉良平・吉川敏一編，（日本医学館，東京） Vol.3, pp.129-133 (1992)
8) 中井由美・橋本豊・大森大二郎・山倉文幸：ＥＳＲとフリーラジカル，
西川弘恭・吉川敏一編，（日本医学館，東京） pp.97-101 (1989)
9) 津志田藤二郎・鈴木雅博・黒木柾吉：日食工誌，**41**，No.9 pp.611-618，(1994)
10) 奥田拓男：抗酸化物質，二木鋭雄・島崎弘幸・美濃真編，初版（学会出版センター，東京） p.268 (1995)
11) B. Halliwell and J M. C. Gutteridge : *Biochem. J.*, **219**, pp.1-14 (1984)
12) K. Lfong, P. B. McCay, and J. L. Poyer : *J. Biol. Chem.*, **248**, pp.7792-7797 (1973)
13) B. Halliwell and J M. C. Gutteridge：フリーラジカルと生体，松尾光芳・
嵯峨井 勝・吉川敏一訳，初版（学会出版センター，東京） pp.299-338 (1988)
14) 高宮和彦・阿部真帆・犬塚郁子・大河原歩美・大野敦子：調理科学，**24**，p.32 (1991)
15) 科学技術庁資源調査会・編：四訂食品成分表，香川綾監修，初版（女子栄養大学出版部，東京） p.194 (1989)

第４章

1) 原征彦・松崎妙子・鈴木達夫：農化，**61**，p.803 (1987)
2) 松崎妙子・原征彦：農化，**59**，No.2 pp.129-134 (1985)
3) 五十嵐紀子・管野仁・柴忠明・山口了三・竹内節・白井達男・浅田敏雄：東邦医学誌，**34**，No.1 pp.28-34 (1987)
4) 柴忠明・山口了三・五十嵐紀子：東邦医学誌，**28**，No.28 pp.194-198 (1987)

5) 五十嵐紀子・管野　仁・田中京子・浅田敏雄・山口了三・白井達男・山中みどり・並木和子・並木満夫：東邦医学誌，**33**，No.3・4 pp.261-264 (1986)
6) 寺田志保子・前田有美子・増井俊夫・鈴木裕介・伊奈和夫：日食工誌，**34**，No.1 pp.20-27 (1987)
7) 阿南豊正・高柳博次・池ヶ谷賢次郎：日食工誌，**35**，No.7 pp.487-489 (1988)

その他１（植物学的分類に基づく花弁の名前）

1) 伊藤洋：新高等植物分類表，７版（北隆館，東京）(1994)
2) 本田正次・林弥栄・古里和夫：原色園芸植物大図鑑，初版（北隆館，東京）(1984)
3) 清水建美監修：週刊朝日百科 植物の世界　創刊号別冊付録（朝日新聞社，東京・大阪）１号4/17発行，（1994）

その他２（統計）

1) 吉田洋一・吉田正夫編者：新数学シリーズ９数表，初版（培風館，東京）pp.187 (1958)
2) 岡崎真：栄養調査・研究のための図解統計学，第１版（医歯薬出版，東京）(1993)

Summary

Phenolic compounds, especially flavonoids, occur widely in plants. Quercetin and rutin occur in tea, coffee, grains and a variety of fruits and vegetables being the most abundant. A number of flavonoids have been found to inhibit tumor development and antioxidant activity. The inhibitory effects of flavonoids may be based on the scavenging activity of the generated oxygen species. We investigated the antioxidant activity and free radical scavenging activity in the extracts of petals and tea. We also examined the inhibitory effects of tea extracts on platelet aggregation induced by collagen or ADP *in vitro*.

1. Correlation of polyphenol concentration in flower petal extracts with their antioxidant activity

The concentration of polyphenols, anthocyanins, and flavonols in petal extracts was determined spectrophotometrically in 95 kinds of flower petals, and antioxidative activities of the petal extracts examined by the decoloration method using β-carotene coupled with the oxidation of linoleic acid. The respective flower petals had different polyphenol content in the mean values, i.e., 8.74% in *Theaceae* (camellia), 4.78% in *Rosaceae* (rose) , and 1.66% in *Compositea.* (chrysanthemum). The data were calculated as gallic acid in 100g dry matter of petal. The highest phenolic content was found to be 14.83% in red *Rosa hybrida (Rosaceae*). Almost all of the petal extracts showed antioxidative activity, and good correlation between the activity and polyphenol content was observed. The results indicated that the direct contribution of polyphenols in the antioxidant activity. The highest activity observed in the red *Rosa hybrida* was ten times higher as that of BHA. Further examination indicated that the activity in the petal extracts from *Rosa hybrida* (rose genus) correlated with the anthocyanin which they contained. On the other hand, the activity of *Compositea* (chrysanthemum family) correlated with the flavonol which they contained.

2. Free radical scavenging activities of flower petals.

The scavenging activity of extracts from edible flower petal and green tea was investigated by ESR (electron spin resonance). Thirteen kinds of petal extracts scavenged

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical. The correlation coefficient of DPPH radical scavenging activity with the antioxidant activity was -0.838. The petal extracts also scavenged the hydroxyl radical and superoxide. These activities correlated closely with the concentration of polyphenols. The correlation coefficient of DPPH radical, hydroxyl radical and superoxide were 0.839, 0.707 and 0.904 respectively. Rose tea and green tea strongly scavenged DPPH radical. The tea extract which extracted with 50 ml of boiled water had strong activity. The result indicate that the activities are not based on vitamin C. These results exhibited that the free radical scavenging activities primarily depends on the polyphenol content.

3. Platelet aggregation inhibitory activity of tea extracts

Inhibitory effect of the hot water extracts prepared from various kinds of teas on the platelet aggregation induced by collagen or ADP was investigated by use of turbidimetry. The standard method used was the extraction with 40ml of boiling water for 3min on each g of tea sample. Examination on various teas with the different manufacturing process indicated that the aggregation inhibitory effect was observed generally on any kind of tea extract tested, although the activity differed from strong (e.g. Japanese green tea, over 50% inhibition) to weak (e.g. Aoyagi tea, about 10%). Among the black teas, Kenya and Sri Lanka Uva teas showed strong activity, while Darjeeling tea was weak. Japanese green teas were generally effective and the activity was in the order of Sencha> Maccha>Gyokuro. Chinese semi-fermented teas gave only weak activity. High-performance liquid chromatographic analysis on the main black and green tea extracts showed that the effective ones in the Japanese green teas were rich in of catechins and the black teas theaflavin and catechins. Among the purified samples of six catechins and three theaflavins and caffeine, (−)-epicatechin, (+)-catechin, (+)-gallocatechin, and theaflavin mono-gallate showed marked inhibitory activity.

In addition to being ornamental and herb, the edible flower petals were characterized by foods which possess antioxidant activity, it was also indicated that phenolics in tea has a new physiological function, a antithrombic activity. There has been

renewed interest on natural sources of antioxidant which belong to the phenolic compounds. Their effects of these compounds should be noted for our health and for prevention of deterioration of processed foods.