

緑茶飲用による肝障害の抑制効果について

長谷川隆一[#]・武木田 薫・佐井君江・梅村隆志
谷村顕雄^{*}・井上 達・黒川雄二

Inhibitory Effect of Green Tea Infusion on Hepatotoxicity

Ryuichi Hasegawa[#], Kaori Takekida, Kimie Sai, Takashi Umemura,
Akio Tanimura^{*}, Tohru Inoue and Yuji Kurokawa

We first showed a drinking of green tea infusion can inhibit chemically induced possible hepatic tissue damages in animal experiments, although it has been shown that oral administration of green tea extract can inhibit some organ toxicities. In this review, our data are summarized and a possibility of the effectiveness in humans is discussed. Male rats or mice in the series of experiments were given 2% green tea infusion as a drinking water 1 or 2 weeks before the chemical treatment and until the termination. In the study of rats, green tea effectively inhibited the hepatotoxicity induced by a single intraperitoneal injection or by repeated gavage administration of 2-nitropropane, and a single intraperitoneal injection of galactosamine. However, any possible effects were not observed when green tea was given, on the hepatotoxicity by a single or repeated gavage administration of carbon tetrachloride. In the study of mice, green tea inhibited the hepatotoxicity induced by administration of pentachlorophenol in diet. In conclusion, 2% green tea infusion can prevent the hepatotoxicity by at least some chemicals in experimental animals. It is inferred that the amount of green tea taken by animals in this experiment might be equivalent to the daily intake in Japanese general population, by calculation based on the content of epigallocatechin gallate, a major component of green tea, and the species differences between experimental animals and humans, suggesting the preventive effectiveness in humans.

Keywords: green tea infusion, chemically induced hepatotoxicity, chemoprevention

はじめに

緑茶 (*Camellia sinensis*) は日本人が日常習慣的に飲用している嗜好飲料の一つであるが、近年、緑茶あるいはその主成分であるカテキン類はヒトの健康維持に有益な作用のあることが明らかとなってきた。その主なものは、*in vitro* で化学物質によるサルモネラ菌の復帰突然変異原性の抑制作用¹⁾、化学物質による酸化の抑制作用²⁾、あるいは抗菌作用³⁾が、また、*in vivo* では、各種の発がん物質、例えばアフラトキシン B1⁴⁾ やニトロサミン⁵⁾ による肝臓がん、あるいはジメチルヒドラジン⁶⁾ による大腸がんなどの抑制作用が示されている。さらに、抗アレルギー作用⁷⁾、血清コレステロール低下作用⁸⁾、血圧低下作用⁹⁾ など非常に広範な有益作用が認められている。一方、臓器機能障害

に対する紅茶あるいは緑茶の効果として、アスピリンおよびインドメタシンなどによる胃潰瘍¹⁰⁾、エチオニンによる急性肺炎¹¹⁾、腎部分切除による腎障害¹²⁾、ストレプトゾトシンによる糖尿病の誘発¹³⁾ に対する抑制効果が報告された。

著者らは以前から酸化ストレスを介する環境発がん物質の発がん機構解明の目的で、発がん標的臓器中の酸化的 DNA 損傷を 8-ヒドロキシデオキシグアノシンを指標に解析すると共に、それに対する緑茶飲用の効果を検討してきた¹⁴⁻¹⁶⁾。これらの実験で、ヒトが日常飲用している 2% 緑茶浸出液で、肝発がん物質による酸化的 DNA 損傷が抑制されたこと¹⁷⁾ から、肝毒性に対しても同様に抑制効果が期待された。そこで、本研究では、数種の化学物質による肝障害誘発に対する緑茶の前飲用による抑制効果について解析した。なお、本実験で動物が前飲用または併用飲用した緑茶の量が、ヒトの場合どの程度の量に相当するかを推定した。

1. 緑茶浸出液の調製および成分

緑茶はその製造方法から、煎茶、玉露、番茶、抹茶など

^{*}昭和女子大学・生活機構研究科

[#] To whom correspondence should be addressed: Ryuichi Hasegawa; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9878; Fax: 03-3707-6950; E-mail: hasegawa@nihs.go.jp

Table 1. Concentration of components in 2% green tea infusion (Tea) and crude catechin extract solution (Ext) in this experiment, and practical green tea infusion in human use (Pract)

Components	Tea (μ g/ml)	Ext (μ g/ml)	Ext/Tea (%)	Pract ^a (μ g/ml)
EGC	469 $\pm$ 24.8	342 $\pm$ 14.2	69.0	299
Caf	397 $\pm$ 50.2	23 $\pm$ 1.8	5.7	313
+C	24 $\pm$ 2.3	20 $\pm$ 1.1	85.6	13.4
EGCG	796 $\pm$ 93.3	774 $\pm$ 12.3	97.2	412
EC	152 $\pm$ 12.8	123 $\pm$ 9.6	80.9	93
ECG	131 $\pm$ 16.2	128 $\pm$ 7.5	97.7	69
Carbohydrate	1.28 $\pm$ 0.03mg/ml	0.124 $\pm$ 0.005mg/ml	9.7	1.09mg/ml
Protein	402 $\pm$ 16.5	341 $\pm$ 35.2	84.8	289
Vitamin C	190 $\pm$ 27.0	178 $\pm$ 23.5	93.7	166

a: prepared by adding 100 ml of boiling water to 2 g of green tea leaves for 2 min.

EGC; Epigallocatechin, Caf; Caffeine, +C; (+)Catechin,

EGCG; Epigallocatechin gallate, EC; Epicatechin, ECG; Epicatechin gallate

様々な種類があるが、日本で一般に飲用されているものは煎茶である。本実験では市販の中クラスの煎茶を使用した。一般に、カテキン含量は値段の違いとは関連していないといわれている。緑茶浸出液とは茶葉を熱湯で浸出した液で、通常ヒトが飲用している緑茶であり、緑茶抽出物とは、凍結乾燥物またはそれから抽出したポリフェノール類を主成分としたものである。この実験での緑茶浸出液は、750 ml の沸騰直後の湯に15 g の茶葉を入れて30分放置し、その遠心上清である。また、緑茶浸出液からクロロホルム可溶性画分を除き、さらに酢酸エチル可溶性画分を分離し、蒸発乾固残分を元の量の蒸留水に溶解して緑茶抽出液とした。なお、日本人が通常飲用している緑茶浸出液としては、2%緑茶を2分間浸出したものを調製した。

緑茶浸出液の成分は Table 1 に示すように、カテキン類の中ではエピガロカテキンガレート (EGCG) が最も多く、約800 μ g/ml であり¹⁷⁾、既報とはほぼ同様の結果であった¹⁸⁾。また、抽出処理により、カフェインおよび糖類は約10分の1となったが、そのほかの成分については顕著な減少は見られなかった。金属類はこの処理で完全に除去された。なお、日本人が日常飲用している緑茶浸出液中のEGCG 含量は約400 μ g/ml であった。

2. 化学物質による肝毒性発現の緑茶による防御効果

ここで対象とした肝毒性物質は、すでに著者らが他の目的の実験で肝臓が標的臓器であることを明らかにしている2-ニトロプロパンおよびペンタクロロフェノール、また、一般的に肝毒性物質として汎用されているガラクトサミン

および四塩化炭素を用いた。データの解析は、F-検定により分散比を求めた後、Student の t-test または Cochran の t-test により、危険率 0.05% または 0.01% での有意差を検定することにより行った。

a. 2-ニトロプロパン

2-ニトロプロパンは工業用溶剤として使用されているが、全ての変異原性試験で陽性を示し、ラットの実験では経口投与、吸入曝露の何れの投与経路でも高頻度で肝細胞癌を引き起こす^{19,20)}。2-ニトロプロパンはその代謝過程でラジカルを生じることから²¹⁾、それが肝細胞壊死などの肝障害を引き起こすと推定される。

2-ニトロプロパン (100 mg/kg) の投与後、短時間に肝毒性の生じることを確認後、緑茶前飲用の効果を検討した¹⁷⁾。F-344 雄性ラットに2週間緑茶浸出液あるいは緑茶抽出液を飲ませた後、2-ニトロプロパンを0.1% tween 含有滅菌生理食塩水に溶解後単回腹腔内投与したときの結果の一部を Fig. 1 に示す。投与6時間後の肝臓の過酸化脂質レベルおよび血清トランスアミラーゼは顕著に増加し、緑茶浸出液はこれらを有意に減少させた。緑茶抽出液は、やや緑茶浸出液よりは弱いものの、同様の効果が認められたので、以後の実験は緑茶浸出液 (以下緑茶) のみを用いて行った。2-ニトロプロパン投与15時間後では、これらの肝毒性指標はさらに顕著に増加したのに対して、緑茶投与群ではこれを明確に抑制した。病理組織学的には、投与15時間後に小葉中心性に肝細胞の腫脹および変性が顕著に認められたが、緑茶の前飲用群では、肝細胞腫脹は依然観察されるものの、明らかな変性像は認められなかった。

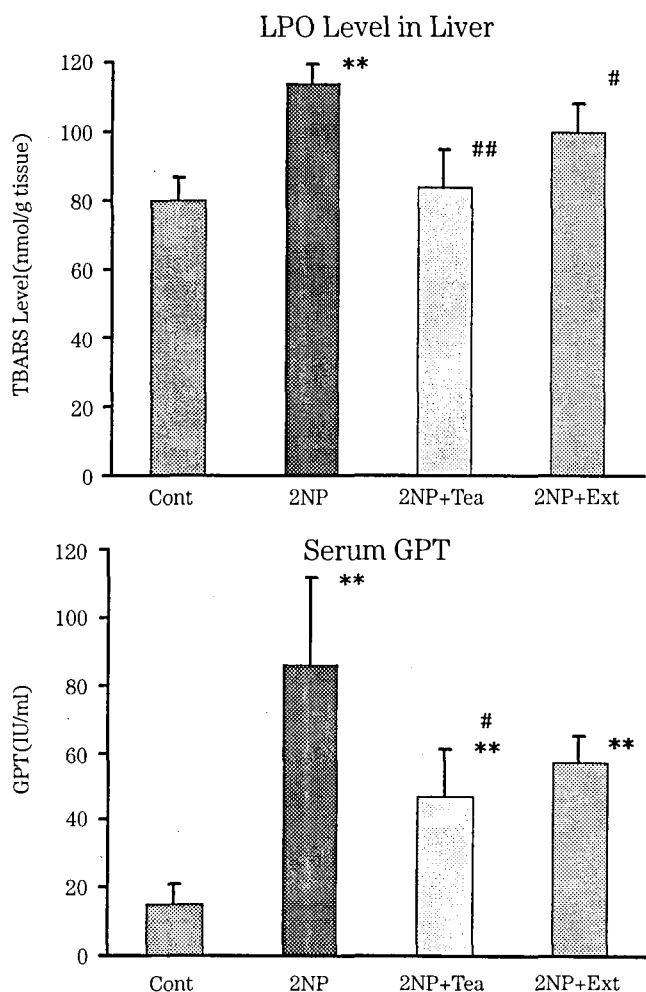


Fig. 1 Effect of green tea on lipid peroxide (LPO) level in liver and serum GPT of male rats at 6 hrs after a single peritoneal administration of 2-nitropropane¹⁷⁾

Animals were given 2% green tea infusion (Tea) or the extract solution (Ext) 2 weeks before 2-nitropropane (2NP) treatment and until the termination of experiment. Analysis was conducted 6 hrs after a single IP administration of 2-nitropropane (100 mg/kg).

** : $p < 0.01$ vs Cont, # : $p < 0.05$ vs 2NP, ## : $p < 0.01$ vs 2NP

単回投与の実験で、2-ニトロプロパンにより顕著な肝臓のグリコーゲンレベルの減少、ならびに緑茶によるその減少抑制効果が認められたので¹⁷⁾、肝毒性発現機構解明の一環として、肝ミトコンドリアの呼吸機能の解析を行った²²⁾。2-ニトロプロパンを投与したラットから単離した肝ミトコンドリアの呼吸調節率は、有意に低い値を示したが、その程度は肝グリコーゲンの減少および乳酸の蓄積に比べて軽度で、加えてNOの産生を示唆する肝亜硝酸性窒素および硝酸性窒素の顕著な増加が認められた。一方、NOは低酸素濃度（生理的濃度）下で、単離ミトコンドリアの呼吸を強く抑制することが報告されている²³⁾。したがって、*in*

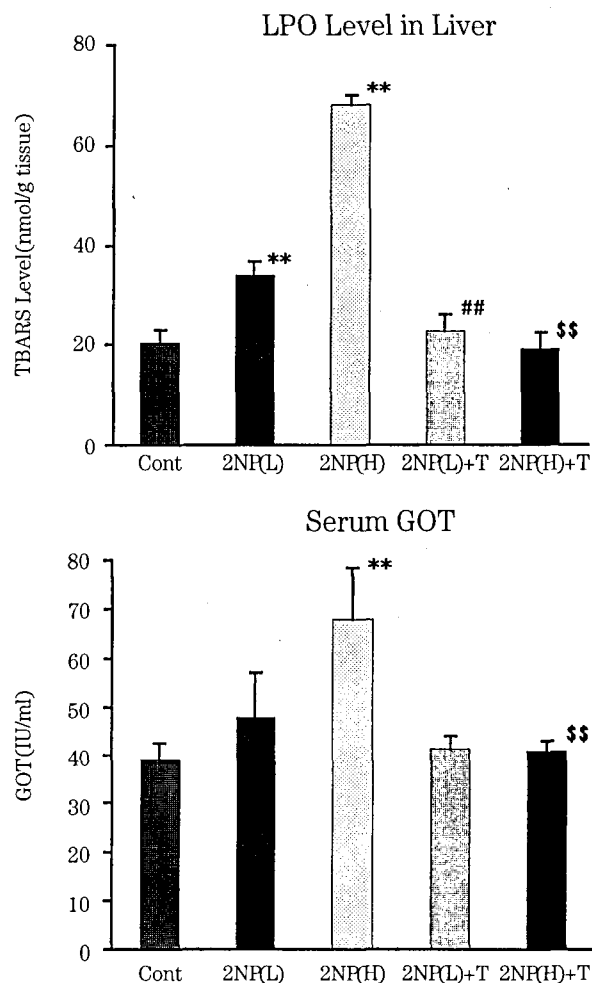


Fig. 2 Effect of green tea on lipid peroxide (LPO) level in liver and serum GOT of male rats after 2 weeks oral administration of 2-nitropropane²⁴⁾

Animals were given 2% green tea infusion (T) 1 week before onset of 2-nitropropane (2NP) treatment and until termination of experiment. Analysis was conducted 24 hrs after the last treatment of 2 weeks oral administration of 60 mg/kg (L) or 120 mg/kg (H) 2-nitropropane.

** : $p < 0.01$ vs Cont, ## : $p < 0.01$ vs 2NP(L), \$\$: $p < 0.01$ vs 2NP(H)

*in vivo*でも、2-ニトロプロパンの代謝物であるNOがミトコンドリアの呼吸抑制を引き起こしている可能性が推定された。また、緑茶を前飲用させた実験では²²⁾、測定した項目全般にわたって防御効果が認められたことから、緑茶成分によるラジカルトラッピング作用が発揮されたと考えられた。

反復経口投与の実験では、緑茶を1週間飲ませたのち、さらに緑茶を飲ませながら2-ニトロプロパンを60 mg および最大耐量である120 mg/kg/dayで10日間強制経口投与した²⁴⁾。その結果、肝臓の過酸化脂質レベルおよび血清トランスアミラーゼは用量依存的に増加し、緑茶はどちらも対照群のレベルまで抑制した (Fig. 2)。なお、病理組織学的検査においても顕著な抑制効果が認められた。

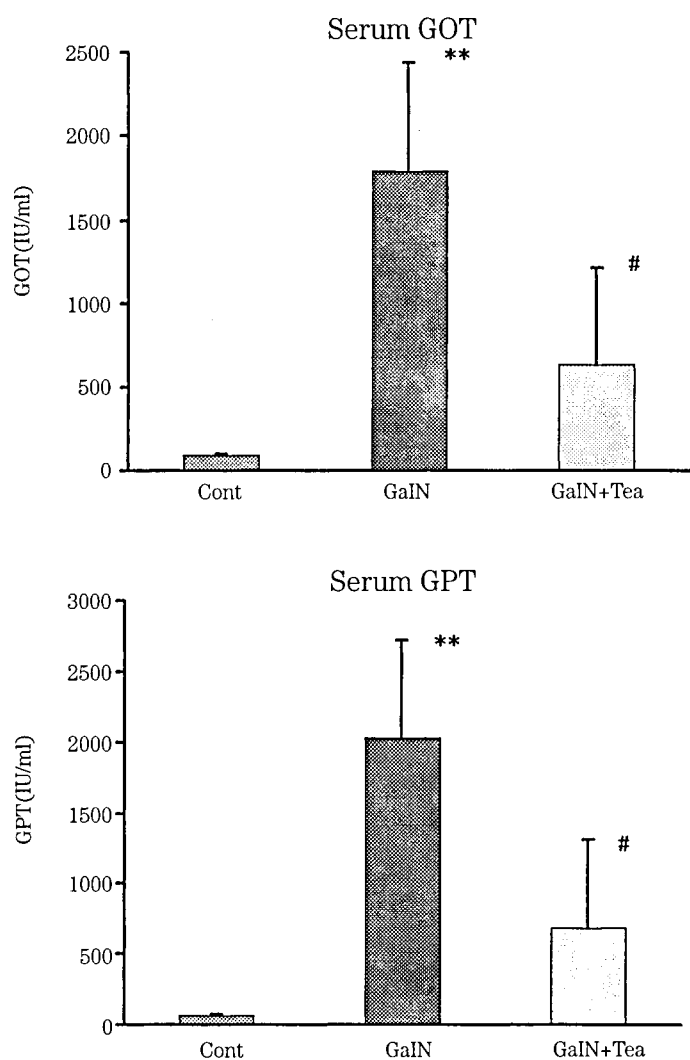


Fig. 3 Effect of green tea on serum GOT and GPT of male rats at 24 hrs after a single peritoneal administration of galactosamine²⁹⁾

Animals were given 2% green tea infusion 2 weeks before galactosamine (GalN) treatment and until termination of experiment. Analysis was conducted 24 hrs after a single intraperitoneal administration of 500 mg/kg galactosamine.

** : $p < 0.01$ vs Cont, # : $p < 0.05$ vs GalN

b. ガラクトサミン

ガラクトサミンは生体成分であるが、過剰投与により、ヒトのウイルス肝炎に類似した病理組織学的変化を示し、劇症肝炎様の病態を示すことから、ラットなどの実験動物で肝炎の病態モデルとして用いられている²⁵⁾。肝毒性の発現機構として、肝細胞内でガラクトサミンがUDP-グルコースと反応してUDP-ガラクトサミンを生成するため、UTPの減少、RNAの合成低下、タンパク質合成の阻害が起き、肝細胞膜障害から細胞壊死を引き起こすと考えられている²⁶⁾。また、そのほかに、毒性発現に活性酸素が関与することも推察されている²⁷⁾。すでに、緑茶抽出物の強制

経口投与では、ガラクトサミンによるラットの血清肝毒性指標の増加が抑制されることが報告されている²⁸⁾。

本実験では、日常的な緑茶飲用によっても、同様の抑制効果が期待できるかどうかを検討する目的で、F-344雄性ラットに2週間緑茶を飲ませた後、ガラクトサミンを滅菌生理食塩水に溶解後500 mg/kgで単回腹腔内投与し、24時間後に解析した²⁹⁾。Fig. 3に示したように、血清GOTおよびGPTはそれぞれおよそ20倍に増加し、緑茶はその増加を約70%抑制した。肝過酸化脂質レベルも約60%増加したが、それに対しては緑茶の影響は見られなかった。病理組織学的には、ガラクトサミンの投与により著しい肝細胞腫脹が観察され、さらに、炎症性細胞浸潤を伴った肝細胞の巣状壊死が認められた。この変性、壊死像は肝全体にび漫性に観察された。一方、緑茶の前投与により依然、肝細胞の腫脹が高度に認められるものの、変性、壊死した肝細胞は僅かに認められるのみで、緑茶による抑制効果は顕著であった。

c. 四塩化炭素

四塩化炭素はその毒性発現に際して過酸化脂質レベルの増加を伴うことが報告されている³⁰⁾。そこで、緑茶がこの過酸化脂質の増加を抑えることにより、肝毒性を抑制する可能性があるかと推定して実験を行った。

F-344雄性ラットに1週間緑茶を飲ませたのち、コーン油に溶解した四塩化炭素を200および800 mg/kgで強制経口投与し、その24時間後に採血・解剖を行った²⁹⁾。その結果、Table 2に示したように、投与量に依存した血清GOT、GPTなどの肝毒性パラメーターの増加は認められたが、緑茶の効果は認められなかった。さらに、ラットに2週間緑茶を飲ませ、一晩絶食後、500 mg/kgの四塩化炭素を強制経口投与し、24時間に分析した実験でも、同様にGOT、GPT、LDHなどが著しく増加したが、緑茶飲用の影響は認められなかった。また、肝過酸化脂質レベルは四塩化炭素により増加が認められたが、緑茶による影響は認められなかった。病理組織学的検査でも、四塩化炭素により広範な肝細胞変性が認められたが、緑茶の効果は認められなかった。

四塩化炭素の低用量反復投与の実験では、緑茶を1週間飲ませたのち、さらに緑茶を飲ませながら四塩化炭素を100 mg/kg/dayで2週間強制経口投与した²⁹⁾。その結果、軽度のGOT、GPTの増加は認められたものの、単回投与の実験と同様に緑茶の抑制効果は全く認められなかった (Table 3)。また、肝臓の病理組織学的検査でも、同様に緑茶の効果は認められなかった。

四塩化炭素の肝毒性に対して、methylenedioxybenzenes およびその類似物質によるCYP2E1の抑制³¹⁾、ubiquinol³²⁾あるいは schisandrin B³³⁾ による細胞内還元系の増加、rifampicin³⁴⁾ による直接的抗酸化、クッパー細胞活性化の

Table 2. Blood biochemistry of male rats at 24 hours after single oral administration of carbon tetrachloride (200 or 800 mg/kg) and the effect of green tea

Group		Control	CCl ₄ -200	CCl ₄ -800	CCl ₄ -200+Tea	CCl ₄ -800+Tea
Animal NO.		4	4	4	4	4
TP	g/dl	5.87±0.18	5.90±0.12	5.93±0.17	6.03±0.19	5.89±0.08
Alb	g/dl	4.04±0.17	4.08±0.16	4.01±0.11	4.19±0.16	4.07±0.06
A/G		2.23±0.29	2.26±0.17	2.11±0.15	2.28±0.15	2.23±0.10
BUN	mg/dl	19.5±1.9	22.4±1.0 *	22.9±1.0 *	23.3±2.3 *	22.8±0.8 *
CRN	mg/dl	0.27±0.02	0.27±0.01	0.27±0.02	0.26±0.02	0.26±0.01
Glc	mg/dl	102±8	100±3	113±4 *	96±5	107±7
PL	mg/dl	140±13	104±11 **	94±5 **	106±11 **	95±10 **
TG	mg/dl	110±29	34±8 *	23±8 **	41±12 **	34±14 **
TCho	mg/dl	74±4	49±8 **	40±3 **	49±5 **	39±4 **
AIP	mU/ml	834±35	969±52 **	1012±78 **	962±14 **	1187±73 **
GPT	mU/ml	82±9	127±27 *	1058±587 *	189±24 **	1097±712
GOT	mU/ml	100±12	137±12 **	868±365 *	196±36 **	1048±733
LAP	mU/ml	48±2	51±2 *	63±6 **	54±2 **	66±8 *
LDH	mU/ml	502±311	304±78	1546±697 *	864±652	1681±949

*: Significant differences against Control (p<0.05)

**: Significant differences against Control (p<0.01)

a: Green tea was given as a drinking water 1 week before and until termination.

Table 3. Effect of green tea on blood biochemical parameters of male rats after oral administration of carbon tetrachloride (100 mg/kg/day) for 2 weeks

Group		Control	CCl ₄ -100/day	CCl ₄ -100+Tea/day
Animal NO.		5	5	6
TP	g/dl	5.95±0.14	6.21±0.19 *	6.26±0.18 *
Alb	g/dl	3.71±0.12	3.90±0.14 *	3.94±0.13 *
A/G		1.66±0.08	1.69±0.10	1.70±0.09
BUN	mg/dl	14.5±1.6	16.5±1.9	18.1±1.3 **
CRN	mg/dl	0.26±0.02	0.26±0.02	0.26±0.02
Glc	mg/dl	143±11	138±9	138±7
PL	mg/dl	135±7	112±6 **	129±8
TG	mg/dl	105±10	62±28 *	77±25 *
TCho	mg/dl	54±3	43±2 **	49±5
AIP	mU/ml	800±62	969±90 **	999±38 **
GPT	mU/ml	53±4	200±90 *	258±145 *
GOT	mU/ml	72±5	158±60 *	207±87 *
LAP	mU/ml	43±2	48±5	49±3 **
LDH	mU/ml	407±216	412±87	606±402

*: Significant differences against Control (p<0.05)

**: Significant differences against Control (p<0.01)

a: Green tea was given as a drinking water 1 week before and until termination.

抑制^{35,36)}などの機構による抑制効果の報告があるが、 α -tocopheryl hemisuccinate および cholesteryl hemisuccinate³⁴⁾あるいは metallothionein 誘導物質³⁵⁾などによる抑制機構は明らかではない。一方で、ビタミン E³⁹⁾や BHT³³⁾などの抗酸化物質によって、肝毒性の抑制効果が見られなかったとの報告もある。

カテキン類には、四塩化炭素から産生されたラジカルに対する直接的な抗酸化作用あるいは肝細胞内の還元系の増加作用があると推定されるが、本実験では飲水による持続投与のため、四塩化炭素からのラジカル消去を行うのに十分な肝カテキン濃度に達しなかったものと推定される。

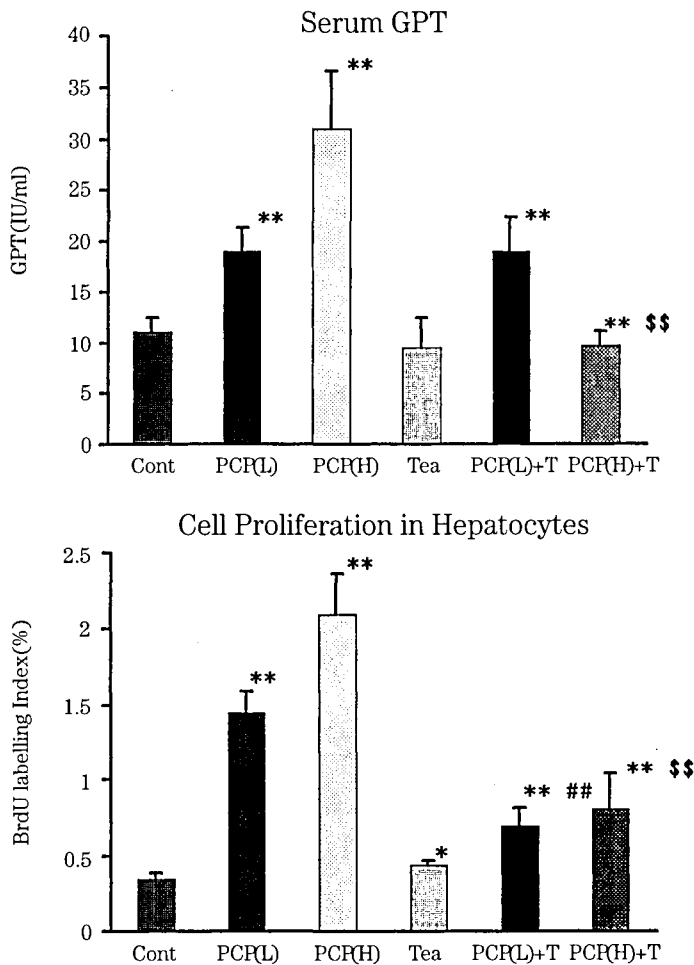


Fig. 4 Effect of green tea on serum GPT and cell proliferation in liver of male mice after 2 weeks treatment with pentachlorophenol in diet⁴²⁾

Animals were given 2% green tea infusion 1 week before onset of pentachlorophenol (PCP) treatment and until termination of experiment. Analysis was conducted after 2 weeks administration of 300ppm (L) or 600ppm (H) pentachlorophenol in diet.

*: $p < 0.05$ vs Cont, **: $p < 0.01$ vs Cont, #: $p < 0.01$ vs PCP(L), \$: $p < 0.01$ vs PCP(H)

d. ペンタクロロフェノール

ペンタクロロフェノールは木材の防腐剤、除草剤、防菌剤、防黴剤として使用されているが、変異原性はAmes試験および染色体異常試験で陰性、姉妹染色分体交換試験で弱陽性を示し、マウスでは肝細胞癌を引き起こす肝発癌物質である⁴⁰⁾。ペンタクロロフェノールは生体内で代謝されてテトラクロロヒドロキノンとなったのち、そのテトラクロロキノンとの可逆反応における酸化還元過程でスーパーオキシラジカルを生じ、これが最終的にDNAの酸化的損傷を引き起こし、発がんに至ると考えられている⁴¹⁾。

B6C3F1 雄性マウスにオリーブ油に溶解したペンタクロロフェノールを、単回あるいは5日間連続強制経口投与した実験では、肝毒性発現の徴候は認められなかった。しかし、ペンタクロロフェノールを混餌 (300, 600 ppm) でマウスに2週間投与した結果、Fig. 4に示すように、血清GPTの増加および肝細胞増殖亢進が顕著に認められた。こうした変化に対して、投与前1週間および投与期間中に緑茶を与えることにより、顕著な抑制作用が認められた^{42,43)}。したがって、緑茶はペンタクロロフェノールの代謝により生成した酸素ラジカルを捕捉することにより、肝毒性の発現を防御したものと考えられた。

3. 緑茶成分の体内動態

緑茶の有効性についての動物実験の結果をヒトの場合に当てはめるために、その主成分であるカテキン類の体内動態についての研究報告をまとめた。

最初の研究では、放射性同位体標識EGCGをラットに1匹当たり50 mg (250 mg/kgに相) 投与し、非吸収同位体量からEGCGの吸収率は約20%になると推定された⁴⁴⁾。その後、ラットに単回経口投与したカテキン類が門脈から検出され、体内に吸収されることが証明された^{45,46)}。さらに、EGCG、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECG)、エピカテキン (EC) は血中および尿中ではほとんどがグルクロン酸あるいは硫酸抱合体として存在し、ラットに3週間脱カフェイン緑茶抽出物を摂取させた実験では、血中にはEGCG、EGC、ECが存在し、尿中にはEGC、ECのみが排泄されることが示された⁴³⁾。また、1.2 gの脱カフェイン緑茶抽出物をヒトに投与した実験でも、1時間後の血中にEGCG、EGC、ECが、24時間の尿中にはEGCおよびECだけが検出された⁴⁷⁾。一方、ジャスミン茶をラットに与えると、血中から検出されたカテキンはEGCとECだけで、この状態で溶血防御効果が認められている⁴⁸⁾。

ラットとヒトを直接比較した実験として、緑茶あるいはEGCGを単回投与し、血中のEGCG濃度を分析した結果が2つの研究室から報告された。ひとつはラットに311 mg/kg、ヒトに1.62 mg/kgのEGCGを単回投与した実験⁴⁹⁾で、血中最大濃度を基準とした計算から、吸収率はそれぞれ0.012%および0.32%となり、その違いはラットに比べ、ヒトの方が約30倍高い値であった。ふたつめは、ラットに278 mg/kg⁵⁰⁾、ヒトに1.76 mg/kg⁵¹⁾のEGCGを投与した実験で、同様の計算方法を適用すると、吸収率はそれぞれ0.0022%および0.16%となり、その違いはラットに比べ、ヒトの方が約70倍高い値となる。これらの結果からでは、ヒトはラットに比べてEGCGの吸収が30~70倍高いことになる。

さらに、ラットにEGCGあるいは緑茶抽出物を単回経口および静脈内投与した実験で、EGCG、EGC、ECの吸

収率はそれぞれ0.1, 13.7, 31.2%であるが、血中からの消失はEGCGが有意に遅いことが示された⁵²⁾。

しかし、以上のヒトとラットの比較実験では、投与が単回で行われ、またラットへのEGCGの投与量が約300 mg/kgと高く、本実験の1日当たりEGCG 80 mg/kgの持続投与と条件が大きく異なっている。また、ラットに単回投与したときの血中EGCG濃度は、緑茶を1週間飲用させることにより、約10倍に増加するとの情報⁵³⁾もあり、現時点では、本実験条件での緑茶の摂取量をヒトの場合に外挿するための十分な情報は得られていないと判断した。

4. 緑茶のヒトにおける有効性についての推定

上述した2つの研究⁴⁹⁻⁵¹⁾から、ヒトでのEGCGの吸収はラットの30~70倍高いことになる。一方、学会の口頭発表ではあるが、緑茶をラットに前飲用させることにより、EGCG単回投与後の血中濃度が、無処置ラットの約10倍に増加するとの報告⁵³⁾を考慮すると、ヒトとラットの体内動態の違いを30~70倍と考えるのは現実的ではないと考えた。しかし、現時点ではほかにヒトとラットの違いを解析した情報がないので、化学物質や医薬品の体内動態の推定に用いられている生理的要因を考慮した外挿のための係数(補足を参照)を用いて、ヒトでの緑茶飲用の有効性を推定した。なお、緑茶の摂取量はその主要有効成分であるEGCG量に基づいて計算した。ラットの体重が200 g、1日当たりの摂水量が20 ml、緑茶中のEGCGが800 μ g/mlであることから、体重kgあたりの1日のEGCG摂取量は80 mgとなる。ヒトの体重を60 kgとすると、外挿係数は6.7となり、ヒトの体重kgあたりの1日のEGCG摂取量は約12 mgに相当することになる。一方、日本人が飲んでいる緑茶中のEGCGはTable 1に示した分析値から400 μ g/mlであり、60 kgのヒトが1日800 ml、5, 6杯飲むと仮定すると、5.3 mg/kg/dayとなり、上述の12 mg/kg/dayと大きな違いはないことになる。この推定結果からは、通常我々が飲んでいる緑茶の量で、肝毒性を示す一部の化学物質に対しては、抑制効果が期待できると考えられる。なお、本実験の成果をヒトに出来るだけ正確に外挿するためには、実験動物およびヒトで、適切な投与量での用量依存性のデータを得る必要があると考えられる。

最後に、生体に対する緑茶の効果は、多くがカテキン類によるものと考えられ、本実験で得られた肝毒性抑制効果も、発生した細胞内ラジカルの捕獲を介した抗酸化作用によるものが主であると推定される。しかし、ガラクトサミンの場合には、肝過酸化脂質の増加抑制が得られない状態で、肝毒性抑制効果が認められたことから、緑茶の生体への効果は、脂質過酸化抑制作用以外の生体作用、例えばNOラジカル産生酵素の誘導抑制⁵⁴⁾、細胞内蛋白性SH基のレベル維持⁵⁵⁾などの関与も重要であると考えられる。

さらに、緑茶により肝薬物代謝酵素のCYP1A1, 1A2, 2B1及びUDP-グルクロニルトランスフェラーゼが誘導されることが報告されており⁵⁶⁾、緑茶の肝障害抑制作用に大きく関与していると推定される。なお、CYP1A2は緑茶中のカフェインにより誘導を受けることが確認されたことから⁵⁷⁾、本実験の2-ニトロプロパンで見られた緑茶抽出物による抑制効果が緑茶浸出液より弱かった原因として、肝薬物代謝酵素の誘導の違いによることも考えられる。

一方、四塩化炭素の肝障害が緑茶により抑制されなかった原因として、緑茶により誘導された薬物代謝酵素により四塩化炭素からCCl₃ラジカル生成⁵⁸⁾が増加した可能性も考えられるが、四塩化炭素は薬物代謝酵素を顕著に阻害することから⁵⁹⁾、本実験条件下で生じた状況を推定することは容易でない。また、四塩化炭素は単離肝リソソームに対して、過酸化脂質の増加を伴わない直接効果により、 β -グルクロニダーゼの強力な遊離を引き起こすことから⁶⁰⁾、EGCGなどのカテキン類がこうした作用を抑制できなかった可能性も考えられる。

補 足

抗腫瘍治療薬はその対象疾患の性質から、臨床上で最大耐量が投与されている。Freireichら⁶⁰⁾は18種の抗腫瘍治療薬について、最大耐量あるいは10%致死量(mg/kg体重)を体表面積当たりとして表すと(mg/m²体表面積/kg体重)、ヒトおよび5種の実験動物、マウス、ラット、ハムスター、イヌ、サルは投与量はほぼ同じ値となることを示した。これは、ヒトや実験動物での毒性発現の感受性の違いは、体重当たりの体表面積の違いであることになる。

こうした考え方は、次のような情報からも支持される。外来物質に対する感受性の違いはその体内動態と反応性によって決まるが、反応性は種間で特殊な場合を除いて平均的には大きな違いはないと考えられ、体内動態の違いが重要な要素になる。肝臓、心臓、腎臓、肺などの主要器官重量および全血液量は体重をベースに計算すると、大動物から小動物まであまり違いがない。しかし、生理活動速度、すなわち、単位時間当たりの心臓の拍出量、腎臓の糸球体濾過速度、物質代謝速度、1日当たりの空気吸入量、食品および水の摂取量は大きく異なっている⁶¹⁾。この違いは体内動態速度の違いとなって現れ、感受性の違いとなる。結果として、これが単位体重当たりの体表面積とほぼ一致する。実際に臨床の場合でも、体表面積をベースに医薬品を投与する場合がある。

体重当たりの体表面積は式(A)となり、

$$\frac{\text{Body Surface Area}}{\text{Body Weight}} \text{ (m}^2/\text{g)}$$

$$= \frac{K \times W^{2/3}}{10^4} \times \frac{1}{W} = \frac{K}{10^4 \times W^{1/3}} \quad (A)$$

[K Values; Human; 9-11, Mouse; 9.0, Rat; 9.0]

ヒトと動物でのこの違いを計算すると、補正值 K はほぼ同じ値であるため、結果としてそれぞれの体重の3分の1乗の比 (式 B) となる⁶⁰⁾。

$$\frac{\text{Animal}}{\text{Human}} = \frac{K_a}{10^4 \times W_a^{1/3}} \times \frac{10^4 \times W_h^{1/3}}{K_h} \div \frac{W_h^{1/3}}{W_a^{1/3}} \quad (B)$$

ちなみにヒトの体重を60 kg、マウスの体重を40 g、ラットの体重を200 g とすると、それぞれ11.4および6.7である。この結果は1993年に発表された183種の医薬品の解析結果かからも支持される⁶²⁾。WHO あるいは各政府機関等ではこれらの値から、ヒトとマウスあるいはラットなどの実験動物との種差として、不確実係数を10として用いている⁶³⁾。

Human; 60 kg

Mouse; 40 g $60000^{1/3} / 40^{1/3} = 11.4$

Rat; 200 g $60000^{1/3} / 200^{1/3} = 6.7$

文 献

- 1) Weisburger JH, Hara Y, Dolan L, Luo FQ, Pittman B, Zang E: Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol.* **371**, 57-63 (1996)
- 2) Zhang AQ, Chan PT, Luk YS, Ho WKK, Chen ZY: Inhibitory effect of jasmine green tea epicatechin isomers on LDL-oxidation. *J. Nutr. Biochem.* **8**, 334-340 (1997)
- 3) Tabak M, Armon R, Potasman I, Neeman I: In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 667-672 (1996)
- 4) Qin GZ, Gopalankriczky P, Su JJ, Ning YY, Lotlikar PD: Inhibition of aflatoxin B-1-induced initiation of hepatocarcinogenesis in the rat by green tea. *Cancer Lett.* **112**, 149-154 (1997)
- 5) Tamura K, Nakae D, Horiguchi K, Akai H, Kobayashi Y, Satoh H, Tsujiuchi T, Denda A, Konishi Y: Inhibition by green tea extract of diethylnitrosamine-initiated but not choline-deficient, L-amino acid-defined diet-associated development of putative preneoplastic, glutathione S-transferase placental form-positive lesions in rat liver. *Jpn. J. Cancer Res.* **88**, 356-362 (1997)
- 6) Yin PZ, JY Zhao, SJ Cheng, Y Hara, QF Zhu, ZG Liu: Experimental studies of the inhibitory effects of green tea catechin on mice large intestinal cancers induced by 1, 2-dimethyl-hydrazine. *Cancer Lett.* **79**, 33-38 (1994)
- 7) Ohmori Y, Ito M, Kishi M, Mizutani H, Katada T, Konishi H: Antiallergic constituents from oolong tea stem. *Biol. Pharmaceut. Bull.* **18**, 683-686 (1995)
- 8) Pugalendhi KV, Ramakrishnan S: Effect of coffee and tea on intestinal cholesterogenesis and the contents of cholesterol in serum, liver, duodenum, jejunum and ileum. *J. Coffee Res.* **20**, 28-36 (1990)
- 9) Sagesakamitane Y, Sugiura T, Miwa Y, Yamaguchi K, Kyuki K: Effect of tea-leaf saponin on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Yakugaku Zasshi* **116**, 388-395 (1996)
- 10) Maity S, Vedasiromoni JR, Ganguly DK: Anti-ulcer effect of the hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). *J. Ethnopharmacol.* **46**, 167-174 (1995)
- 11) Takabayashi F, Harada N, Hara Y: The effects of green tea catechins (Polyphenon) on DL-ethionine-induced acute pancreatitis. *Pancreas* **11**, 127-131 (1995)
- 12) Yokozawa T, Chung HY, He LQ, Oura H: Effectiveness of green tea tannin on rats with chronic renal failure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1000-1005 (1996)
- 13) Wada M, Takita T, Innami S: Some kinds of teas suppress a sideration of diabetes in streptozotocin-administered rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **20**, 61-69 (1996)
- 14) Sai K, Takagi A, Umemura T, Hasegawa R, Kurokawa Y: Relation of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat kidney to lipid peroxidation, glutathione level and relative organ weight after single administration of potassium bromate. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**, 165-169 (1991)
- 15) Takagi A, Sai K, Umemura T, Hasegawa R, Kurokawa Y: Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane. *Cancer Lett.* **91**, 139-144 (1995)
- 16) Sai-Kato K, Umemura T, Takagi A, Hasegawa R, Tanimura A, Kurokawa Y: Pentachlorophenol-induced oxidative DNA damage in mouse liver and protective effect of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 877-882 (1995)
- 17) Hasegawa R, Chujo T, Kato-Sai K, Umemura T, Tanimura A, Kurokawa Y: Preventive effects of green tea on oxidative DNA damage in liver and hepatotoxicity of rats treated by 2-nitropropane. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 961-970 (1995)
- 18) Chung FL, Xu Y: Increased 8-oxodeoxyguanosine levels in lung DNA of A/J mice and F344 rats treated with the tobacco-specific nitrosamine 4-(methyl-nitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* **13**, 1269-1272 (1992)
- 19) Lewis TR, Ulrich CE, Busey WM: Subchronic inhalation toxicity of nitromethane and 2-nitropropane. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **2**, 233-249 (1979)
- 20) Fiala ES, Czerniak R, Castonguay A, Conaway CC, Rivenson A: Assay of 1-nitropropane, 2-nitropropane, 1-azoxypropane, and 2-azoxypropane for carcinogenicity by gavage in Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* **8**, 1947-1949 (1987)

- 21) Bors W, Michel C, Dalke C, Stettmaier K, Saran M, Andrae U: Radical intermediates during the oxidation of nitropropanes-the formation of NO₂ from 2-nitropropane, its reactivity with nucleosides, and implications for the genotoxicity of 2-nitropropane. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 302-309 (1993)
- 22) 甲斐幸恵, 谷村顕雄, 佐井君江, 長谷川隆一, 井上達: 2-ニトロプロパンによるラット肝ミトコンドリア呼吸の抑制と緑茶の予防効果. 日本食品衛生学会 第73回学術講演会 東京 (1997)
- 23) Schweizer M, Richter C: Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 169-175 (1994)
- 24) 佐井君江, 甲斐幸恵, 梅村隆志, 長谷川隆一, 谷村顕雄, 黒川雄二, 井上達: 2-ニトロプロパンによるラット肝 DNA 酸化損傷および肝毒性に対する緑茶の予防効果. 日本癌学会 第55回総会 横浜 (1996)
- 25) Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K: Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp. Mol. Pathol.* **9**, 279-290 (1968)
- 26) Keppler DOR, Rudigier JFM, Bischoff E, Decker KFA: The trapping of uridine phosphates by D-galactosamine, D-glucosamine and 2-deoxy-D-galactose. *Eur. J. Biochem.* **17**, 246-253 (1970)
- 27) Shiratori Y, Kawase T, Shina S, Okano K, Sugimoto T, Teraoka H, Matano S, Matsumoto K, Kamii K: Modulation of hepatotoxicity by macrophages in the liver. *Hepatology* **8**, 815-821 (1988)
- 28) 林 真知子, 山添 寛, 山口 優, 国友 勝: ガラクトサミン負荷によるラットの肝障害に対する緑茶抽出物の効果. 日薬理誌 **100**, 391-399 (1992)
- 29) 武木田 薫, 谷村顕雄, 長谷川隆一, 佐井君江, 梅村隆志, 井上達: 緑茶による肝障害の予防効果に関する研究. 日本食品衛生学会 第74回学術講演会 福岡 (1997)
- 30) Rao KS, Recknagel RO: Early onset of lipoperoxidation in rat liver after carbon tetrachloride administration. *Exp. Mol. Pathol.* **9**, 271-278 (1968)
- 31) Zhao ZS, O'Brien PJ: The prevention of CCl₄-induced liver necrosis in mice by naturally occurring methylenedioxybenzenes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **140**, 411-421 (1996)
- 32) Takahashi T, Sugimoto N, Takahata K, Okamoto T, Kishi T: Cellular antioxidant defense by a ubiquinol-regenerating system coupled with cytosolic NADPH-dependent ubiquinone reductase: protective effect against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1005-1012 (1996)
- 33) Ip SP, Ko KM: The crucial antioxidant action of schisandrin B in protecting against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice: a comparative study with butylated hydroxytoluene. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1687-1693 (1996)
- 34) Huang R, Okuno H, Takasu M, Shiozaki Y, Inoue K: Protective effect of rifampicin against acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **69**, 325-334 (1995)
- 35) Yao T, Degli Esposti S, Huang L, Arnon R, Spangenberg A, Zern MA: Inhibition of carbon tetrachloride-induced liver injury by liposomes containing vitamin E. *Am. J. Physiol.* **267**, G476-484 (1994)
- 36) elSisi AE, Earnest DL, Sipes IG: Vitamin A potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: role of liver macrophages and active oxygen species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **119**, 295-301 (1993)
- 37) Fariss MW, Bryson KF, Hylton EE, Lippman HR, Stubin CH, Zhao XG: Protection against carbon tetrachloride-induced hepato-toxicity by pretreating rats with the hemisuccinate esters of tocopherol and cholesterol. *Environ. Health Perspect.* **101**, 528-536 (1993)
- 38) Hanna PM, Kadiiska MB, Jordan SJ, Mason RP: Role of metallothionein in zinc (II) and chromium (III) mediated tolerance to carbon tetrachloride hepatotoxicity: evidence against a tri-chloromethyl radical-scavenging mechanism. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 711-717 (1993)
- 39) Mak DH, Ip SP, Li PC, Poon MK, Ko KM: Effects of schisandrin B and alpha-tocopherol on lipid peroxidation, in vitro and in vivo. *Mol. Cell Biochem.* **165**, 161-165 (1996)
- 40) National Toxicology Program (NTP): Toxicology and carcinogenesis studies of two pentachlorophenol technical grade mixtures in B6C3F1 mice. TR349 (1989)
- 41) Naito S, Ohno Y, Somiya I, Inoue S, Ito K, Yamamoto K, Kawanishi S: Role of active oxygen species in DNA damage by pentachlorophenol metabolites. *Mutat. Res.* **310**, 79-88 (1994)
- 42) 加藤(佐井)君江, 梅村隆志, 長谷川隆一, 黒川雄二: ペンタクロロフェノールによるマウス肝酸化的 DNA 損傷に対する抗酸化物質および緑茶の抑制効果. 日本癌学会 第54回総会 京都 (1995)
- 43) 甲斐幸恵, 谷村顕雄, 梅村隆志, 佐井君江, 長谷川隆一, 黒川雄二, 井上達: ペンタクロロフェノールによるマウス肝の酸化的 DNA 損傷及び細胞増殖に対する緑茶の予防効果. 日本食品衛生学会 第71回 学術講演会 茨木 (1996)
- 44) Matsumoto N, Tono-oka F, Ishigaki A, Okushio K, Hara Y: The fate of (-)-EGCg in the digestive tract of rats, in Proceedings of the International Symposium on Tea Science, pp. 253-257 (1991)
- 45) Okushio K, Matsumoto N, Suzuki M, Nanjo F, Hara Y: Absorption of (-)-epigallocatechin gallate into rat portal vein. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 190-191 (1995)
- 46) Okushio K, Matsumoto N, Kohri T, Suzuki M, Nanjo F, Hara Y: Absorption of tea catechins into rat portal vein. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 326-329 (1996)
- 47) Lee MJ, Wang ZY, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S, Balentine DA, Yang CS: Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **4**, 393-399 (1995)
- 48) Zhan AQ, Zhu QY, Luk YS, Ho KY, Fung KP, Chen ZY: Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sci.* **61**, 383-394 (1997)
- 49) Nakagawa K, Miyazawa T: Chemiluminescence high-performance liquid chromatographic determination of tea catechin, (-)-epigallocatechin 3-gallate, at picomole levels in rat and human plasma. *Anal.*

- Biochem.* **248**, 41-49 (1997)
- 50) Unno T, Takeo T: Absorption of (-)-epigallocatechin gallate into the circulation system of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1558-1559 (1995)
- 51) Unno T, Kondo K, Itakura H, Takeo T: Analysis of (-)-epigallocatechin gallate in human serum obtained after ingesting green tea. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 2066-2068 (1996)
- 52) Chen LS, Lee MJ, Li H, Yang CS: Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab. Dispos.* **25**, 1045-1050 (1997)
- 53) 藤木博太, 菅沼雅美, 小森敦正, 末岡栄三朗, 岡部幸子, 神津知子, 末岡尚子, 菅謙司, 今井一枝, 中地敬: 発がんプロモーションの抑制を介するがん化学予防の基礎的研究. 日本癌学会 第56回総会シンポジウム 京都 (1997)
- 54) Lin YL, Lin JK: (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol. Pharmacol.* **52**, 465-472 (1997)
- 55) Miyagawa C, Wu C, Kennedy DO, Nakatani T, Ohtani K, Sakanaka S, Kim M, Matsuiyusa I: Protective effect of green tea extract and tea polyphenols against the cytotoxicity of 1, 4-naphthoquinone in isolated rat hepatocytes. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1901-1905 (1997)
- 56) Sohn, OS, Surace, A, Fiala, ES, Richie, JP Jr, Colosimo, S, Zang, E, Weisburger, JH: Effects of green and black tea on hepatic xenobiotic metabolizing systems in the male F344 rat. *Xenobiotica.* **24**, 119-127 (1994)
- 57) Chen L, Bondoc, FY, Lee, MJ, Hussin, AH, Thomas, PE, Yang, CS: Caffeine induces cytochrome P4501A2: induction of CYP1A2 by tea in rats. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 529-533 (1996)
- 58) Slater, TF: Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* **222**, 1-15 (1984)
- 59) 長谷川隆一, 櫛谷真美, 小室徹雄, 伊阪 博: 有機汚染物質と細菌内毒素(LPS)のマウス肝に対する協同作用に関する研究 [四塩化炭素と LPS の同時投与により生じる肝リソソームの不安定化について]. 衛試報告 **105**, 78-81 (1987)
- 60) Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE: Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother. Rep.* **50**, 219-244 (1996)
- 61) U.S. Environmental Protection Agency, Draft report: A cross-species scaling factor for carcinogen risk assessment based on equivalence of mg/kg^{3/4}day; *Fed. Reg.*, **57**, 24151-24173 (1992)
- 62) 加藤隆一: 薬物の臨床用量と反復投与毒性試験における無毒性量および体内動態との関連. 臨床薬理 **24**, 595-602 (1993)
- 63) WHO: Special Issue "Tolerable Daily Intake of PCDDs and PCDFs". *Toxic Sub.J.* **12**, 101-332 (1992)