

# 緑茶三番茶葉とウンシュウミカン未熟果を混合揉捻した 発酵茶の開発と機能性に関する研究

中山 久之

Studies on the development and function of fermented tea product obtained by the tea-rolling processing of third  
crop green tea leaves and unripe satsuma mandarin fruits

Hisayuki NAKAYAMA

## 目次

第1章 緒論 .....	55
第2章 緑茶三番茶葉とウンシュウミカン未熟果を混合した新たな発酵茶の製造と発酵茶に 含まれるヘスペリジンの溶解性を向上させる製造条件の検討 .....	58
緒言 .....	58
材料および方法 .....	59
結果 .....	61
考察 .....	63
第3章 未熟ミカン混合発酵茶の香味特性の解明 .....	65
緒言 .....	65
材料および方法 .....	66
結果 .....	68
考察 .....	72
第4章 萎凋時の熱風温度やミカン未熟果のスライス方法の違いがカテキン類の酸化効率お よび未熟ミカン混合発酵茶の品質に及ぼす影響 .....	74
緒言 .....	74
材料および方法 .....	74
結果 .....	75
考察 .....	77
第5章 異なる食餌条件が未熟ミカン混合発酵茶のラット脂質代謝に及ぼす影響 .....	81
緒言 .....	81
材料および方法 .....	81
結果 .....	82
考察 .....	84
第6章 未熟ミカン混合発酵茶の摂取がラット脂質代謝に及ぼす影響 .....	87
緒言 .....	87
材料および方法 .....	87
結果 .....	89
考察 .....	91

第7章 未熟ミカン混合発酵茶の食餌への添加量の違いがラット肝臓脂質濃度に及ぼす影響 と脂質濃度低下メカニズムの検討	96
緒言	96
材料および方法	96
結果	97
考察	103
第8章 総括	106
第9章 摘要	108
引用文献	109
謝辞	114
Summary	115

## 第1章

## 緒論

離島・半島地域が多く、平坦地の少ない長崎県は、厳しい営農条件にあるものの、各地域の特色を活かした農業が展開されている。近年、農業産出額が全国的に減少する中、長崎県においては増加傾向で推移している<sup>105)</sup>。しかし、農産物の栽培過程で慢性的に排出される低・未利用資源が多く存在する。これら資源を積極的に活用することは、循環型産業の形成や環境に対する負荷の低減などに資することができる。さらに、地域資源を活用した付加価値の高い製品開発は、農業所得の向上に寄与し、新たな産業の創出や地域のブランド化に繋がる可能性がある。

長崎県における茶 (*Camellia sinensis*) の主要産地は、東彼杵町や佐世保市であり、「そのぎ茶」、「世知原茶」の名は全国的に有名である。しかし、近年、他の飲料との競合により、緑茶の国内消費が低下し、茶業経営は厳しい情勢となっている。また、手軽に味わうことのできる茶飲料が普及し、一方で、荒茶価格は低迷している<sup>106)</sup>。

茶は、製法の違いにより不発酵茶および発酵茶に大きく分類され、それぞれの代表的な茶は、緑茶および紅茶であり、含まれる成分組成に違いがある<sup>123)</sup>。緑茶は、摘みとられてすぐに茶葉を蒸熱することで、茶葉に含まれるポリフェノール酸化酵素が失活する。ポリフェノール酸化酵素は、茶葉中のカテキン類を、橙赤から赤褐色のテアフラビンやテアルビジン等の紅茶ポリフェノール類に酸化する<sup>95)</sup>。このため、ポリフェノール酸化酵素を失活させると、茶葉の色や味がそのまま固定され、生葉に含まれる渋味の要因であるカテキン類が緑茶の主成分になる。一方、紅茶製造では、はじめに熱を加えず茶葉を萎凋し、次にカテキン類の酸化を促進するために強く揉捻する。揉捻は茶葉を揉みこむ作業であり、この揉捻により茶葉の細胞が破壊され、ポリフェノール酸化酵素が溶出し、次の酸化工程（揉捻後の茶葉を数時間放置する）で活性化することにより、カテキン類が酸化重合し、紅茶ポリフェノール類に変化する<sup>123)</sup>。しかし、わが国で栽培されている茶樹の大部分が緑茶製造に適した品種であり、インド産、スリランカ産の紅茶葉品種に比べると、茶葉のポリフェノール酸化酵素活性は弱いことから、外国産の紅茶葉品種と比較して、カテキン類の酸化が促進されにくいから、品質の優れる紅茶の製造は難しい<sup>90)</sup>。

茶葉は、摘み取り時期によって一番茶葉、二番茶葉、三番茶葉と呼ばれ、同じ茶樹および茶園から年3回程度の摘採が行われる。4月中旬頃から5月初旬に収穫される一番茶葉のカテキン含量は

少なく、テアニンなどのアミノ酸含量が多いため、渋みが弱く旨味が強い<sup>101)</sup>。また、一番茶葉は新茶独特の若芽の香りと合わさることから香味に優れ、高単価で市場取引される。一方、7月下旬から8月上旬収穫の三番茶葉では、カテキン高含有でアミノ酸含量が少ない<sup>102)</sup>。加えて硬葉臭があることから、香りに劣る。そのため、三番茶葉は香味に劣り、市場価値の低さから必ずしも有効利用されず、一部は刈り捨てられている。しかし、カテキン類は渋味を形成する一方、様々な生体調節機能を有する。エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレートおよびエピガロカテキンガレートは茶の主要なポリフェノールであり、動物実験において体脂肪低減や血清および肝臓トリグリセリド濃度ならびにコレステロール濃度低下など、多くの科学的エビデンスが確立されている<sup>8) 16) 26) 57) 70) 111)</sup>。カテキン類の中でも、エピガロカテキンガレートの抗酸化力は特に強く、茶葉に含まれる総カテキン量の5から6割を占める<sup>113)</sup>。刈り捨てられることの多い三番茶葉はカテキン類高含有であるとともに、一番茶葉および二番茶葉と比較し、エピガロカテキンガレート含量が多い<sup>99)</sup>。

一方、緑茶葉と比較し、紅茶葉の国内生産量はわずかである。紅茶葉は一般に、カテキン含量の多いアッサム種を原料として製造されるが、これを用いて緑茶を製造すると苦渋味が強く、飲料として適さない<sup>100)</sup>。それに対し、紅茶にすることで、カテキン類の大部分が酸化して苦渋味が緩和し、紅茶特有の旨味が形成される<sup>93)</sup>。また、紅茶をはじめとする発酵茶では、萎凋、揉捻、酸化の工程で、精油の主要成分であるモノテルペンアルコール類などが生成するため、花様の香気が付与される<sup>87) 91) 109)</sup>。そのため、渋味が多く香りに劣る三番茶葉も、カテキン類の酸化を促進することで、香味が改善すると推察される。

ウンシュウミカン (*Citrus unshiu*) は我が国の代表的な果樹である。長崎県におけるウンシュウミカンの産出額は、本県全体の農業産出額の5.6%を占めており<sup>105)</sup>、大村湾沿岸を中心に地域の基幹作物となっている。しかし、近年のミカン価格の低迷や生産者の高齢化および耕作放棄圃の増加などにより、生産量、栽培面積ともに減少傾向にある<sup>107)</sup>。ミカンは他の果樹同様、生果生産を目的で栽培されるが、皮を乾燥させた陳皮は、胃腸薬である六君子湯や神経の高ぶりを押さえる抑肝散加陳皮半夏などの多くの漢方薬に配合されており、その有効成分の一つがヘスペリジンである<sup>75)</sup>。ヘスペリジンは、ウンシュウミカン

はじめとするカンキツ果実に多く含まれる。Scarborough<sup>51)</sup>は、ヘスペリジンとそのアグリコンであるヘスペレチンが、ヒアルロニダーゼ活性を阻害することにより、毛細血管の透過性を抑えることを報告している。毛細血管の透過性が増すと、浮腫が進行し、出血や高血圧等を引き起こす。さらに血管の透過性亢進は、糖尿病、慢性静脈不全、潰瘍、紫斑などの発症リスクを高める。実際に、血管強度の低下や透過性亢進などの血管の不調からくる痛みを訴える患者らは、その治療のためにヘスペリジンを服用している<sup>55)</sup>。また、ヘスペリジンの摂取により、血圧低下、血清脂質濃度低減、血流改善等の多くの生理機能を発現することが認められている<sup>1) 2) 10) 28)</sup>。ミカン栽培においては、高品質果実を収穫するため、6月中旬頃から摘果を行う。摘果は、6月中旬から成熟果の収穫時期である10月頃まで定期的に行う。摘果には、年間労働作業時間の約15%を要し<sup>104)</sup>、多大な労力を費やす作業であるにも関わらず、摘果した未熟果の多くが利用されることなく廃棄されている。ところで、摘果した未熟果には、成熟果よりも、ヘスペリジンが高濃度に含まれている<sup>72)</sup>。ラットにおいて、未熟果の摂取は、成熟果よりも強い脂質代謝改善効果を有することが明らかにされており、この作用は、ヘスペリジンを中心とするフラボノイド類により惹起される可能性が高いことを、奥島<sup>80)</sup>は示唆している。しかし、ヘスペリジンは水に極めて難溶であり、小腸からの吸収性が低い<sup>69)</sup>。一般的なミカン摂取量において、ヘスペリジンが生体内で十分な生理機能を発揮するには、その水溶性を向上させる必要がある。ヘスペリジンの分子は、疎水性のヘスペレチン部分と親水性のルチノース部分から構成され、水溶液中ではヘスペレチン部分が疎水性相互作用で凝集(集合体を形成)するため、ヘスペリジンの結晶化が起こり、このことが水に対する溶解性低下の要因となっている。これまでヘスペリジンの水溶性を向上させる方法として、酵素処理によってグルコースを転移した糖転移ヘスペリジンが開発された。糖転移ヘスペリジンは、ヘスペリジンよりも小腸からの吸収性が高まる<sup>69)</sup>ことで、生理機能をより発揮しやすくなると推察されている<sup>38) 46) 94) 103) 121)</sup>。糖転移ヘスペリジンの主要成分であるモノグルコシルヘスペリジンを含む製品は、血中中性脂質濃度低下効果を有する特定保健用食品として認可されている。そのメカニズムは、肝臓における脂肪酸合成酵素活性の低下とβ酸化系酵素活性の亢進により惹起されることが示唆されている<sup>114)</sup>。しかし、酵素利用による製造は高コストであり、糖転移ヘスペリジンの製造においては、長時間高温を維持することで生じる特異な風味を軽減するための費用負担が大きくなり、その際に歩留まりの低下が起きやすいなどの

難点があるとされる<sup>77)</sup>。

三番茶葉やミカン未熟果といった低・未利用資源の有する特徴を活かして食品として利用するためには、設備投資を新たに行うことなく、既存の設備を用いて製造できることが望ましい。また、日々の食事の中で容易に取り入れられる食品でなければ、生産者利益へと還元されず、茶ならびにミカン生産者の所得向上に寄与することは難しい。宮田ら<sup>117)</sup>は、未利用資源であるピワの葉を三番茶葉に混合して揉捻することで、発酵茶を製造する技術を開発した。本技術は、茶工場に設置されている粗揉機や揉捻機などの製茶機械を使って品質の高い発酵茶を製造できることから、新たな設備投資を必要としない。また、紅茶ポリフェノール類を多く含有することから紅茶様の味を呈し、同じ三番茶葉から製造した緑茶よりも香味に優れることが報告されている<sup>117)</sup>。

宮田らの開発した発酵茶葉製造技術において、茶葉と混合する素材はピワ葉に限らない。五島市の特産物であるヤブツバキの葉は、そのえぐみの強さから、そのまま熱水抽出しても飲料に適さない。しかし、三番茶葉とツバキ葉を混合揉捻することで、香味に優れる飲料を製造することができる<sup>119)</sup>。Tanakaら<sup>64)</sup>は、緑茶に直径1.0 cm程度のミカン未熟果を混合して攪拌することでも、未熟果に含まれるポリフェノール酸化酵素により、紅茶ポリフェノール類が生成することを観察している。したがって、三番茶葉と未熟果を混合揉捻することで、多くの紅茶ポリフェノール類が生成し、三番茶葉の渋味が改善する可能性がある。

世界で最も早く超高齢社会になったわが国において、医療費の増大による国民の社会的負担は非常に大きい。直接的な疾病治療よりも、その予防に重点を置いた施策への転換および醸成が図られているが、栄養バランスの偏った食事の摂取や慢性的な運動不足などの生活習慣の乱れが問題視されて久しい。その結果、心疾患や脳血管疾患等の脂質代謝異常症により引き起こされる病気は、日本人の死因の常に上位を占める<sup>85)</sup>。脂質代謝異常症の一次予防には、食品や生活習慣の是正が大きく関与する。しかし、時間的制約の大きい現代において、運動による生活習慣の改善は難しい。一方、食品に含まれる成分には、生体調節機能を有するものが存在し、その作用機序の解明について多くの研究が行われている。最近、消費者庁において、食品の機能性表示制度が見直され、これまで特定保健用食品や栄養機能食品しか機能性表示が認められなかったが、一般食品についても機能性のエビデンスが確立されているものは、企業体の責任で、機能性の表示が可能となっている。そのため、機能性を有する食品素材の需要がますます高まると予想される。

前述の通り、三番茶葉およびミカン未熟果には、それぞれ脂質代謝異常症予防に寄与する成分が含まれている。ラットにおいて、ビワ葉混合発酵茶の摂取は、原料である三番茶葉やビワ葉単独と比較し、肝臓トリグリセリド濃度を、より強く低下させることが確認されている<sup>61)</sup>。また、ツバキ葉混合発酵茶においても、ヒトにおいて、食後の血糖上昇抑制効果が緑茶よりも強いことが報告されている<sup>79)</sup>。さらに、カテキン類の酸化によって生成する紅茶ポリフェノール類は、腓リパーゼ阻害活性を有し、特にテアフラビンは、エピガロカテキンガレートよりも強い腓リパーゼ阻害を示す<sup>29)</sup>。このことは、素材の機能を維持し、混合発酵茶葉製造によって、更なる機能性の向上が期待できることを示している。したがって、三番茶葉とミカン未熟果を混合揉捻することでも、紅茶ポリフェノール類が多く生成する可能性があり、香味の改善とともに、カテキン類、紅茶ポリフェノール類およびヘスペリジンなどの作用で、三番茶葉や未熟果単独よりも、強い脂質代謝改善効果が期待できる。そこで、低・未利用資源である三番茶葉とミカン未熟果を混合揉捻した新規発酵茶の開発に着手した。この未熟ミカン混合発酵茶の開発過程で、本発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性が、ミカン単独よりも高まる可能性が見出された。この要因については不明であるものの、ヘスペリジンと共存する溶液中の成分によっては、ヘスペリジンの溶解性に変化が生じることが報告されている<sup>86) 112)</sup>。そのため、未熟ミカン混合発酵茶に含まれる成分がヘスペリジンの溶解性に影響を与えると仮定した。

本論文の第2章において、三番茶葉とミカン未熟果を混合揉捻して製造した未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性を向上させるための製造条件を検討した。第3章では、未熟ミカン混合発酵茶の有する香味特性を明らかにするため、三番茶葉から紅茶葉を製造し、香味特性の比較・評価を行った。また第4章にて、カテキン類の酸化を効率よく促進するために、緑茶製茶機械を利用して三番茶葉の最適萎凋温度を追究し、さらにミカン未熟果のスライス方法の違いが品質に及ぼす影響を検討した。第5章では、未熟ミカン混合発酵茶の摂取期間および食餌条件の違いがラット脂質代謝に及ぼす影響を検討した。第5章の結果を基に、第6章にて、脂質代謝に及ぼす影響を、未熟ミカン混合発酵茶の素材であるミカン未熟果や緑茶と比較し、次に第7章で、本発酵茶の添加量の違いが脂質代謝に及ぼす影響について検討した。

## 第2章

緑茶三番茶葉とウンシュウミカン未熟果を混合した新たな発酵茶の製造と  
発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性を向上させる製造条件の検討

## 緒言

長崎県の茶業は、中国伝来の釜炒り茶を改良した「蒸製玉緑茶」の産地として発展した。釜炒り茶は、蒸すかわりに、高温で熱処理し、茶葉に含まれる酸化酵素を熱で不活化した後、揉捻、乾燥を経て製品とする。独特の香気と後味のさわやかさが特徴である<sup>122)</sup>。平成25年の長崎県の茶栽培面積は全国第11位の751haであり<sup>107)</sup>、長崎県の重要な園芸作物となっている。しかし、品種偏重による摘採期間の集中や茶樹の老木化による生産性低下が問題となっており、それに加え、茶の輸入増加やドリンク原料茶の低価格化ならびにリーフ茶の需要減により、毎年市場単価が続落し、番茶の取引数量が大幅に減少している。その結果、茶業経営は年々厳しくなり、品質や生産性の向上とともに、新商品の開発や新たな販路開拓が必要となっている。とりわけ、三番茶葉は一番茶葉よりも、味や香りなどの品質に劣り有効利用されていない。茶の旨味に関与するテアニンは、太陽光により分解を受けることで、最終的にカテキン類に変化する<sup>88)</sup>。そのため、夏場に収穫される三番茶の旨味は弱く、渋味は強くなる<sup>101)</sup>。したがって、三番茶葉は価格の安い下級茶葉として取り扱われ、一部は刈り捨てられている。

一方、平成25年の長崎県におけるウンシュウミカンの結果樹面積および収穫量はともに、全国第5位であり<sup>107)</sup>、県内各地域における基幹産業として位置づけられている。しかしながら、販売価格の低迷や担い手の減少、生産者の高齢化、生産基盤整備の立ち遅れ等により、農家経営は年々厳しい状況となっている。ウンシュウミカンをはじめとするカンキツ類は、高品質果実を安定的に生産するために、毎年6月頃から果実の収穫期まで定期的に摘果を行うが、摘果された未熟果は圃場内に放置されたままであり、利用されることはほとんどない。

カンキツ類は、ナリンゲニン、ナリルチン、ヘスペリジンおよびネオヘスペリジンといった特有のフラボノイドを含む<sup>78)</sup>。それぞれの生理作用に関して多くの研究が行われており、これまでに脂質代謝改善作用、抗肥満作用、血流循環改善作用、血圧上昇抑制作用、抗酸化作用などの機能を有することが報告されている<sup>104)</sup>。奥島<sup>80)</sup>は、ウンシュウミカン品種である「させぼ温州」果実を7月(未熟)から11月(成熟)にかけて採取し、ナリンゲニン、ヘスペレチン、ナリンギンおよびネオヘスペリジンは、いずれの時期の果実にも

含まれないのに対し、ヘスペリジンおよびナリルチンが、未熟果および成熟果の主要フラボノイドであることを報告している。また、果実の成熟にしたがって、これらフラボノイド類の含有率は経時的に漸減することを明らかにしている。そのため、初期に摘果したミカン未熟果は、成熟果よりもフラボノイドの含有率が高い。フラボノイドの中でもヘスペリジンは、糖およびクエン酸に次ぐ主要成分である<sup>78)</sup>。ヘスペリジンには、血管強化、血圧低下、血清脂質濃度低減、血流改善等の多くの生理機能が認められている<sup>1) 2) 10) 28)</sup>。ヘスペリジンの分子は、疎水性のヘスペレチン部分と親水性のルチノース部分から構成され(図2-1)、水溶液中ではヘスペレチン部分が強固に会合することで結晶化する。したがって、ヘスペリジンは水に極めて難溶で、小腸からの吸収性が低いことから、生体利用率が低い<sup>69)</sup>。そこで、酵素反応でグルコースを結合させることで、ヘスペリジンの水溶性を大幅に向上させた糖転移ヘスペリジンが開発され<sup>69)</sup>、飲食物、医薬品等に広く利用されている。しかし、糖転移ヘスペリジンの製造工程では、長く高温にさらされることで特異な風味が発生し、その低減のため、精製工程の費用負担が大きく、同時に歩留まりの低下が起きやすい<sup>77)</sup>。

三番茶葉に多く含まれるカテキン類由来の渋味を軽減する方法として、茶葉にピワ葉を混合して揉捻することで、既存の製茶機械を利用してカテキン類の酸化を効率良く促進させる技術が開発されている<sup>117)</sup>。本技術は、茶葉とピワ葉に含まれるポリフェノール酸化酵素が揉捻によって活性化することにより、短時間でカテキン類の酸化を促進するという特徴を有する。また、多くの紅茶ポリフェノール類が生成する。この混合発酵技術によって製造した茶は、紅茶様の味を呈し、同じ三番茶葉から製造した緑茶よりも渋味が少ない。さらに、緑茶葉の熱水抽出液に直径1.0cm程度のみカン未熟果を混合して攪拌することでも、カテキン類から紅茶ポリフェノール類が生成することを、Tanakaら<sup>64)</sup>は実験室レベルで確認している。したがって、ミカン未熟果と三番茶葉を用いて混合揉捻することで、ヘスペリジンと紅茶ポリフェノール類を含む新たな混合発酵茶の生成が期待できる。また、溶液中の成分によって、ヘスペリジンの水溶性が向上することから<sup>86) 112)</sup>、カテキン類や生成した紅茶ポリフェノール類がヘスペリジンの溶解性を変動させるかもしれない。

本章では、ミカン未熟果と三番茶葉からなる

未熟ミカン混合発酵茶を製造する技術を開発し、特に、ヘスペリジンの溶出率を高める未熟果と三番茶葉の混合比率、揉捻時間、酸化時間などの製造条件および抽出溶媒について検討した。

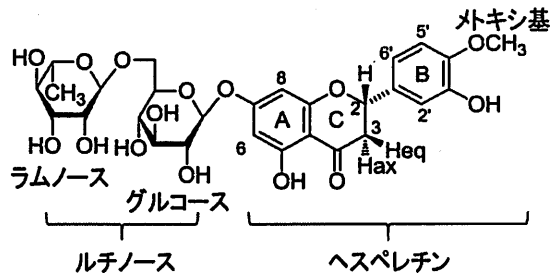


図 2-1 ヘスペリジンの構造式  
Heq, エカトリアル水素; Hax, アキシカル水素

## 材料および方法

### 1. 材料

ウンシュウミカン果実は、長崎県農林技術開発センター果樹研究部門（長崎県大村市鬼橋町）のカンキツ圃場で栽培している「原口早生」を供試品種として用いた。農薬を散布していない、直径 1.5 cm 程度の未熟果を 2012 年 6 月中旬頃に摘果し、製造に用いるまで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。三番茶葉の供試品種は「やぶきた」で、長崎県農林技術開発センター茶業研究室（長崎県東彼杵郡東彼杵町）圃場内の茶樹から 2012 年 7 月に摘採した。摘採した茶葉は、生葉自動コンテナ（1000 k 型、株式会社寺田製作所、静岡）に入れ、送風することにより茶葉の温度上昇と品質低下を抑えた。

### 2. 製造方法

本実験では、紅茶の製法<sup>76)</sup>に概ね準じ、ミカン未熟果と三番茶葉からなる未熟ミカン混合発酵茶葉を製造した。まず、三番茶葉を温度  $26^{\circ}\text{C}$ 、湿度 55% で 24 時間静置して自然萎凋を行った。萎凋を終えた時の茶葉の水分含量は約 50% であった。揉捻は揉捻機（60 k 型、カワサキ機工株式会社、静岡）を用いた。萎凋した茶葉とミカン未熟果を混合揉捻するための揉捻機投入量は 40 kg とした。ミカン未熟果は水分を多く含むことから、過剰な水分による成分流出を防止するため、未熟果の投入量は、揉捻機投入量の半量の 20 kg を最大とした。包丁でスライスしたミカン未熟果 10 kg あるいは 20 kg に対して、三番茶葉をそれぞれ 30 kg あるいは 20 kg 混合して揉捻した。それぞれの揉捻時間は、20 分または 40 分とした。揉捻を終えた未熟ミカン混合発酵茶葉を 0, 1, 2 あるいは 3 時間放置することで茶葉の酸化を行った。最終工程として、透気式乾燥機（50 k 型、カワサ

キ機工株式会社）で  $110^{\circ}\text{C}$ 、30 分の熱風処理により、茶葉の酸化停止と乾燥（含水率として 5% 程度）を行った。緑茶葉は、蒸気で蒸した三番茶葉を、60 k 型の製茶機（カワサキ機工株式会社）を用いて製造した。貯蔵に耐えうるよう、茶葉の水分率を 5% 以下にした。また、岩浅<sup>76)</sup>の製法に準じて、三番茶葉から紅茶葉を製造した。まず、三番茶葉を温度  $26^{\circ}\text{C}$ 、湿度 55% で 24 時間静置して萎凋を行った。萎凋した三番茶葉を揉捻機で 40 分揉捻後、4 時間酸化させ、未熟ミカン混合発酵茶葉と同様に乾燥したものを紅茶葉とした。

### 3. 溶媒に溶出するヘスペリジン量の測定

未熟ミカン混合発酵茶葉は、ミカン未熟果と三番茶葉の混合比率 1:3 および 1:1 のものを用いた。それぞれの揉捻時間は 20 分または 40 分で、茶葉の酸化時間は 0, 1, 2 あるいは 3 時間とした。ミカン未熟果中のヘスペリジン含量測定のために、未熟果を包丁でスライスして凍結乾燥したものを 100 mg 定量し、メタノール：ジメチルスルホキシド（1:1, v/v）100 mL に溶解した。未熟ミカン混合発酵茶葉あるいはスライスしたミカン未熟果 20 g を、1 L の熱水で 5 分間抽出して得られたエキスについて、凍結乾燥後、それぞれの凍結乾燥物 100 mg を 3 つずつ別のビーカーにとり、水、熱水あるいは 60% エタノールのいずれかを 100 mL 加え、常温下で 24 時間放置した。その後、 $0.45\ \mu\text{m}$  孔径のメンブランフィルターでろ過したものについて、超高速液体クロマトグラフ（Prominence UFLC, 株式会社島津製作所、京都）でヘスペリジン溶出量を測定した。分析は、大野および笹山<sup>78)</sup>の方法を一部改変して行った。カラムは Shim-pack C18（内径 4.6 mm × 長さ 75 mm）（株式会社島津製作所）を使用し、移動相 A 液にはアセトニトリル：10 mM リン酸（20:80, v/v）、B 液にはアセトニトリル：10 mM リン酸（70:30, v/v）を用いた。グラジエントは、移動相 B 液を 7 分間で直線的に 100% まで増加させた。流速は 0.6 mL/分、カラム温度は  $40^{\circ}\text{C}$  とし、検出波長 280 nm でモニタリングした。なお、ミカン未熟果の凍結乾燥物 100 mg 当たりに含まれるヘスペリジン量は 20.8 mg であった。

### 4. 60% エタノール抽出による未熟ミカン混合発酵茶のポリフェノール成分測定

ミカン未熟果と三番茶葉の混合比率を 1:3、揉捻時間 20 分、酸化時間 0 時間で製造した未熟ミカン混合発酵茶葉を供試した。茶葉をワーリングブレンダーで破碎して粉末にし、その 500 mg に 0.1% トリフルオロ酢酸含有 60% エタノールを 15 mL 添加し、バイアル中で 24 時間、常温振盪しながら抽出した。その後、 $0.45\ \mu\text{m}$  孔径のメンブランフィルターでろ過したものについて、日本分光株式会社（東京）の高速液体クロマトグラフ

(HPLC) を用いてポリフェノール成分を測定した。カラムは Cosmosil 5C18AR II (内径 4.6 mm × 長さ 250 mm) (ナカライテスク株式会社, 京都) を使用し, 移動相 A 液には 50 mM リン酸, 移動相 B 液にはアセトニトリルを用いた。グラジエントは, 移動相 B 液を 39 分間で 4% から 30% にし, その後 15 分間で 75% にした。流速は 0.8 mL/分, カラム温度は 35°C とし, 検出にはフォトダイオードアレイ (MD-910, 日本分光株式会社) を使用した。

### 5. 紅茶エキス水溶液添加により溶出したヘスペリジン量の測定

紅茶葉 20 g に 1 L の熱水を加えて 5 分間抽出し, ロータリーエバポレータで濃縮後, 凍結乾燥し, 紅茶エキス粉末 6.1 g を得た。そのうち 5.09 g を水で充填した Sephadex LH-20 カラム (内径 3.0 cm × 長さ 20 cm) (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社, 東京) に付して, 200 mL の水と 40% メタノールで溶出し, 糖, カフェインおよびフラボノール配糖体を主成分とするフラクション 1 (Fr.1) を 3.32 g (65%) 得た。次に, 200 mL の 60% メタノールと 80% メタノールで溶出してエピカテキン, エピガロカテキンおよび没食子酸を主成分とするフラクション 2 (Fr.2), さらに, 200 mL の 100% メタノールと 60% アセトンで溶出してエピカテキンガラート, エピガロカテキンガラート, テアフラビン, テアフラビン-3-O-ガラート, テアフラビン-3'-O-ガラート, テアフラビン-3, 3'-ジ-O-ガラート, テアシネンシン A, テアシネンシン B, テアシネンシン C およびテアルビジンなどのカテキン重合体を主成分とするフラクション 3 (Fr.3) を, それぞれ 0.90 g (18%) および 0.87 g (17%) 得た。ヘスペリジン標準品の水懸濁液 10 mg/mL を 5 本の 1.5 mL マイクロチューブに 0.2 mL ずつ分注したものに, 水, 紅茶エキス水溶液 (20 mg/mL, ヘスペリジン 2 mg に対して紅茶葉 53 mg に相当), Fr.1 水溶液 (12.6 mg/mL), Fr.2 水溶液 (3.8 mg/mL) あるいは Fr.3 水溶液 (3.6 mg/mL) をそれぞれ 0.8 mL 加えた。マイクロチューブは密閉後, 時々振り混ぜながら 80°C で 10 分間加熱し, その後常温で 2 時間放置した。遠心分離後, 上清を 0.45 μm 孔径のメンブランフィルターでろ過し, 溶液中のヘスペリジン量を HPLC (日本分光株式会社) で比較した。カラムは Cosmosil 5C18AR II (内径 4.6 mm × 長さ 250 mm) (ナカライテスク株式会社) を使用した。移動相 A 液は 50 mM リン酸, 移動相 B 液にはアセトニトリルを用いた。グラジエントは, 移動相 B 液を 39 分間で 4% から 30%, その後 15 分間で 75% まで増加させた。流速は 0.8 mL/分, カラム温度は 35°C とし, 検出にはフォトダイオードアレイ (MD-910, 日本分光株式会社) を使用した。

### 6. ヘスペリジン分子中の炭素に結合する水素原子の <sup>1</sup>H-NMR によるケミカルシフト値の測定

測定は, Murray ら<sup>41)</sup> の方法を一部改変して行った。ヘスペリジン 1 mg を 0.1 mL のジメチルスルホキシド-d<sub>6</sub> に溶かし, 0.9 mL の重水を加えたものを A 液とした。また, 紅茶から得た 10 mg の Fr.3 を 1 mL の A 液に溶かしたものを B 液とした。0.75 mL の A 液を NMR 測定管に入れて水素核磁気共鳴 (<sup>1</sup>H-NMR) スペクトルを測定した。次に, 同じ測定管に B 液を 0.05 mL 加えて混合した後, <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定し, ヘスペリジン分子中のグルコース 1 位, ヘスペレチンメトキシ基, ヘスペレチン A 環, ヘスペレチン B 環 2 位, ヘスペレチン C 環 2 位およびヘスペレチン C 環 3 位の炭素に結合する水素原子のケミカルシフト値を比較した。スペクトルは JEOL JNM-AL400 spectrometer (400 MHz) (日本電子株式会社, 東京) でジメチルスルホキシド-d<sub>6</sub> (δ 2.495) を内部標準として測定した。この実験では分子の会合が起こっているため, 通常の有機溶媒中での測定に比べて多くの水素がブロードなシグナルとして観察された。A 環 6 位および A 環 8 位のシグナルは, B 液添加前には完全に重なっていた。B 液添加後にわずかに分離したが, 高磁場側のシグナルは紅茶ポリフェノール由来のシグナルと重なったため, A 環のシグナルは低磁場側のシグナルの値を測定し, A 環 6, 8 位の帰属は行わなかった。B 環の 3 つの水素シグナルも重なっていたが, 最も高さが高い 2 位のシグナルとして読み取った。C 環の 3 位については, 高磁場側のエカトリアル配置の水素シグナル (H-3<sub>eq</sub>) が紅茶ポリフェノール類のフラバン骨格 4 位のシグナルと重なるため, アキシシャル側の水素シグナル (H-3<sub>ax</sub>) を観察した。

### 7. 統計処理

ヘスペリジン含量は, 3 回測定した結果の平均値 ± 標準偏差で示した。<sup>1</sup>H-NMR のケミカルシフト値は 1 回の分析結果とした。一連の統計処理には, 統計解析アドインソフト (エクセル統計 2006, 株式会社社会情報サービス, 東京) を用いた。抽出溶媒ならびに添加する紅茶エキス画分水溶液の違いによるヘスペリジン溶出率の平均値の差については, 一元配置分散分析の後, Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。また, 混合比率, 揉捻時間および酸化時間の 3 つの製造工程に関する要因がヘスペリジン溶出率に及ぼす影響を, 多元配置分散分析により検討した。統計的有意水準は, いずれも  $p < 0.05$  とした。



結果

1. ミカン未熟果と緑茶三番茶葉の混合比率、揉捻時間および酸化時間が異なる未熟ミカン混合発酵茶葉の溶媒に溶出するヘスペリジン量

ヘスペリジンの溶出率を表 2-1 に示す。すべての製造条件において、溶出率は、水抽出と比較し、熱水および 60%エタノール抽出で有意に高かった。ミカン未熟果のみの場合、熱水抽出より、60%エタノール抽出において溶出率は 2 倍以上高かった。ミカン未熟果 10 kg と三番茶葉 30 kg で製造した未熟ミカン混合発酵茶は、熱水抽出においても、60%エタノール抽出と同程度の溶出率であった。混合比率については、ミカン未熟果 20 kg と三番茶葉 20 kg より、未熟果 10 kg と茶葉 30 kg の混合で、水および熱水に対する溶出率は高かった。揉捻時間はいずれの混合比率においても、40 分より 20 分で溶出率が高い傾向にあったが、酸化時間については明確な影響は認められなかった。未熟ミカン混合発酵茶の各溶媒に対するヘスペリジン溶出率は、ミカン未熟果のみと比べ、いずれの製造条件においても高い値であった。特に、未熟果 10 kg と茶葉 30 kg の混合において、揉捻時間 20 分で製造した未熟ミカン混合発酵茶葉の熱水抽出における溶出率は、未熟果のみと比較し、4 から 5 倍高かった

2. 未熟ミカン混合発酵茶に含まれるポリフェノール成分

60%エタノールで抽出した未熟ミカン混合発酵茶に含まれるポリフェノール成分の HPLC クロマトグラムを図 2-2 に示す。未熟ミカン混合発酵茶には、ミカン由来のシネフリン、ナリルチンおよびヘスペリジン、茶葉由来の没食子酸、テオガリン、フラボノール配糖体、カフェインおよびカテキン類（エピカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンおよびエピガロカテキンガレート）が含まれていた。また、エピガロカテキンガレートの酸化生成化合物であるテアシトリン類（テアシトリン A およびテアシトリン C）、カテキン類の二量体であるテアフラビン類（テアフラビン、テアフラビン-3-O-ガレート、テアフラビン-3'-O-ガレートおよびテアフラビン-3, 3'-ジ-O-ガレート）やテアシネンシン類（テアシネンシン A、テアシネンシン B およびテアシネンシン C）およびカテキン重合体のテアルビジンなどの紅茶ポリフェノール類が検出された。

3. 紅茶エキス水溶液添加によるヘスペリジン溶出率

水のみを加えたヘスペリジンのピーク面積を 1.0 とした場合のヘスペリジン溶出率の相対値を図 2-3 に示す。紅茶エキス水溶液を加えたとき、

表 2-1 水、熱水および60%エタノール抽出において未熟ミカン混合発酵茶葉およびミカン未熟果から溶出するヘスペリジン量

製造条件			水	熱水	60%エタノール
混合比率	揉捻時間 (min)	酸化時間 (h)	溶出率 <sup>1)</sup> (%)	溶出率 (%)	溶出率 (%)
ミカン未熟果 10 kg	20	0	12.4 ± 1.0 <sup>a</sup>	45.2 ± 2.7 <sup>b</sup>	39.6 ± 7.4 <sup>b</sup>
		1	10.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	45.7 ± 2.9 <sup>b</sup>	38.8 ± 3.3 <sup>b</sup>
		2	11.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	39.0 ± 3.3 <sup>b</sup>	38.2 ± 4.2 <sup>b</sup>
緑茶三番茶葉 30 kg		3	10.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	38.7 ± 7.1 <sup>b</sup>	37.6 ± 4.0 <sup>b</sup>
		0	9.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	33.1 ± 6.5 <sup>b</sup>	35.0 ± 4.9 <sup>b</sup>
ミカン未熟果 10 kg	40	1	7.8 ± 1.7 <sup>a</sup>	31.5 ± 1.9 <sup>b</sup>	33.7 ± 8.8 <sup>b</sup>
		2	9.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	30.5 ± 1.3 <sup>b</sup>	33.3 ± 2.8 <sup>b</sup>
		3	8.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	32.0 ± 0.3 <sup>b</sup>	32.5 ± 7.8 <sup>b</sup>
緑茶三番茶葉 30 kg		0	4.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	23.7 ± 2.6 <sup>b</sup>	29.4 ± 2.4 <sup>c</sup>
		1	5.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	22.1 ± 3.7 <sup>b</sup>	29.2 ± 1.2 <sup>c</sup>
ミカン未熟果 20 kg	20	2	5.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	24.6 ± 0.6 <sup>b</sup>	29.2 ± 0.9 <sup>c</sup>
		3	5.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	24.0 ± 2.7 <sup>b</sup>	29.0 ± 3.9 <sup>b</sup>
緑茶三番茶葉 20 kg		0	5.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	23.9 ± 1.0 <sup>b</sup>	28.5 ± 2.7 <sup>c</sup>
		1	5.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	23.4 ± 3.3 <sup>b</sup>	28.8 ± 3.1 <sup>b</sup>
ミカン未熟果 20 kg	40	2	5.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	24.8 ± 1.4 <sup>b</sup>	28.8 ± 1.5 <sup>c</sup>
		3	5.4 ± 1.0 <sup>a</sup>	27.6 ± 1.4 <sup>b</sup>	29.1 ± 2.8 <sup>b</sup>
ミカン未熟果のみ			3.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	9.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	23.1 ± 0.5 <sup>b</sup>
統計処理 <sup>2)</sup>					
混合比率			* <sup>3)</sup>	*	NS
揉捻時間			*	*	*
酸化時間			NS	NS	NS

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

<sup>1)</sup> サンプル100 mgから溶出したヘスペリジン量をミカン単位重量当たりで算出した値

<sup>2)</sup> 混合比率、揉捻時間、酸化時間を要因とする多元配置分散分析による有意性

<sup>3)</sup> NSおよび\*はそれぞれ、多元配置分散分析により、有意差なしおよび有意差あり (p < 0.05)

<sup>abc</sup> 水、熱水、60%エタノールの3群間において、Tukey-Kramerの検定により、異なる文字間で有意差あり (p < 0.05)

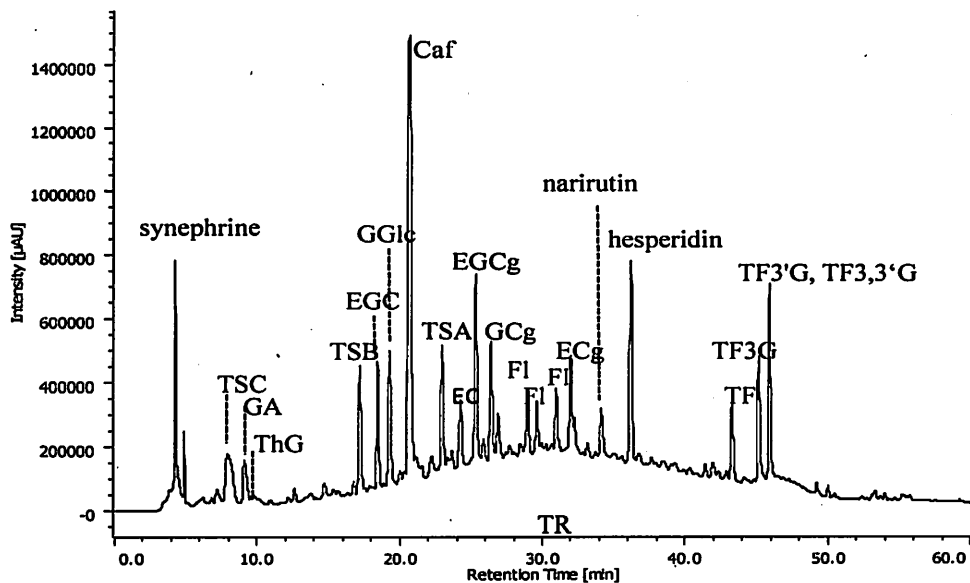


図 2-2 60%エタノールで抽出した未熟ミカン混合発酵茶に含まれるポリフェノール成分の HPLC クロマトグラム

Synephrine: シネフリン, TSC: テアシネンシン C, GA: 没食子酸, ThG: テオガリン, TSB: テアシネンシン B, EGC: エピガロカテキン, TCA: テアシトリン A, Caf: カフェイン, TSA: テアシネンシン A, EC: エピカテキン, EGCg: エピガロカテキンガレート, TCC: テアシトリン C, FI: フラボノール配糖体, ECg: エピカテキンガレート, narirutin: ナリルチン, hesperidin: ヘスペリジン, TF: テアフラビン, TF3G: テアフラビン-3-O-ガレート, TF3'G: テアフラビン-3'-O-ガレート, TF3, 3'G: テアフラビン-3, 3'-ジ-O-ガレート, TR: テアルビジン

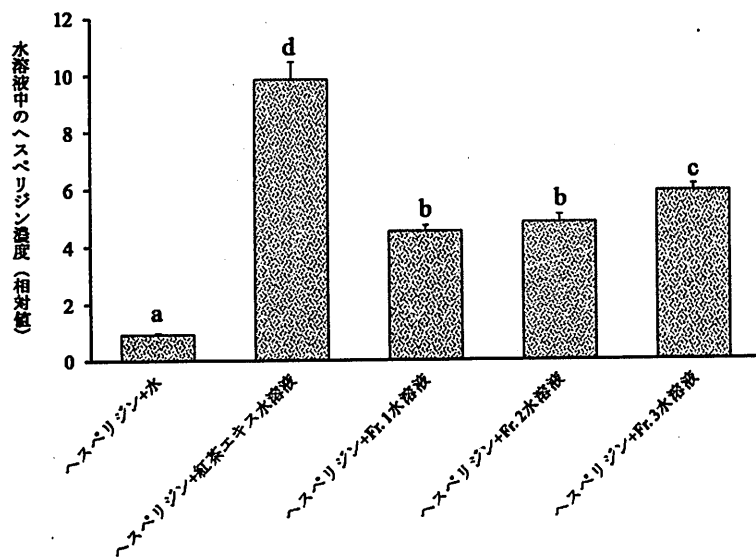


図 2-3 紅茶エキス水溶液および紅茶エキス画分水溶液によるヘスペリジンの溶解性 (相対値)

ヘスペリジン標準品の水懸濁液に紅茶エキス画分水溶液を添加した時の HPLC で定量したヘスペリジン溶出率の相対値を水のみ添加の溶出率を 1.0 として示した。各画分の添加量は寄与率を考慮してヘスペリジン 2 mg に対して紅茶葉 53 mg に相当する量とした。

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

<sup>a,b,c,d</sup> Tukey-Kramer の検定により、異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

紅茶エキス: Fr.1+Fr.2+Fr.3

Fr.1 水溶液: 主成分は、糖、カフェインおよびフラボノール配糖体

Fr.2 水溶液: 主成分は、エピカテキン、エピガロカテキンおよび没食子酸

Fr.3 水溶液: 主成分は、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、テアフラビン、テアフラビン-3-O-ガレート、テアフラビン-3'-O-ガレート、テアフラビン-3, 3'-ジ-O-ガレート、テアシネンシン A, テアシネンシン B, テアシネンシン C およびテアルビジン

ヘスペリジンの溶出率が最も高く、水のみ添加と比較すると、約 10 倍のヘスペリジンが溶液中に検出された。紅茶エキスに含まれる成分をクロマト分画した糖、カフェインおよびフラボノール配糖体を主成分とする Fr.1 水溶液の添加では、水のみ添加の 4.6 倍のヘスペリジンが溶出した。エピカテキン、エピガロカテキンおよび没食子酸を主成分とする Fr.2 水溶液の添加によるヘスペリジン溶出率は、Fr.1 水溶液添加と同程度であった。エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートおよび紅茶ポリフェノール類を主成分とする Fr.3 水溶液の添加では、Fr.1 および Fr.2 水溶液添加よりヘスペリジンの溶出率が高く、水のみ添加の約 6 倍であった。

溶液の濃度を増加させてもほとんど変化しなかった。ヘスペレチンメトキシ基および A 環由来のケミカルシフト値は、Fr.3 溶液の濃度に依存してある程度変化した。ヘスペレチン B 環 2 位の水素原子のケミカルシフトは、メトキシ基および A 環よりも、大きく高磁場(縦軸のマイナス方向)にシフトした。Fr.3 溶液濃度が 2 から 4 mg/mL の場合、ヘスペレチン C 環 2 位および C 環 3 位の水素原子のシグナルは、添加した紅茶成分のシグナルと重なったため測定できなかったが、1 mg/mL 以下の Fr.3 溶液濃度で、ヘスペレチン B 環 2 位と同程度、あるいは、より大きく変化する傾向が認められた。

考察

4. カテキン類および紅茶ポリフェノール類添加によるヘスペリジン分子中の炭素に結合する水素原子の <sup>1</sup>H-NMR ケミカルシフト変化

エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートおよび紅茶ポリフェノール類を主成分とする Fr.3 溶液を、濃度を変えて添加した時のヘスペリジン分子中のグルコース 1 位、ヘスペレチンメトキシ基、ヘスペレチン A 環、ヘスペレチン B 環 2 位、ヘスペレチン C 環 2 位およびヘスペレチン C 環 3 位の炭素に結合する水素原子のケミカルシフト変化を図 2-4 に示す。ヘスペリジンのグルコース 1 位の水素原子のケミカルシフト値は、Fr.3

未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶出率は、ミカン未熟果のみよりも高かった。また、40 分よりも 20 分の揉捻時間で溶出率が高い傾向にあったが、酸化時間は溶出率に明確な影響を及ぼさなかった(表 2-1)。したがって、製造工程を簡略にするために、揉捻時間を 20 分とし、酸化工程を設けない製造法が適していると考えられた。ミカン未熟果と三番茶葉を 1:1 の比率で混合揉捻するよりも、1:3 の比率で水および熱水抽出におけるヘスペリジン溶出率は増加した。このようにミカン未熟果と三番茶葉の混合揉捻

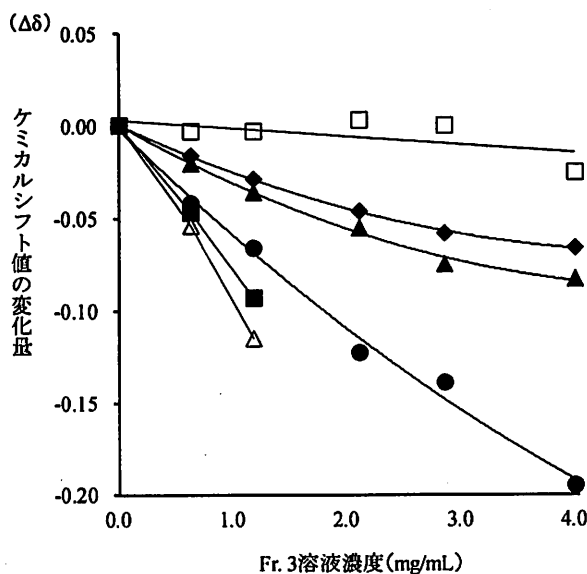


図 2-4 紅茶エキス画分溶液添加によるヘスペリジンの <sup>1</sup>H-NMR ケミカルシフト変化

ヘスペリジン溶液に紅茶エキス画分である Fr.3 溶液の濃度を変えて添加した時のヘスペリジン分子中のグルコース 1 位、ヘスペレチンメトキシ基、ヘスペレチン A 環、ヘスペレチン B 環 2 位、ヘスペレチン C 環 2 位および C 環 3 位 (アキシアル側) 水素のケミカルシフト変化を示す。

Fr.3: 主成分は、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、テアフラビン、テアフラビン-3-O-ガレート、テアフラビン-3'-O-ガレート、テアフラビン-3,3'-ジ-O ガレート、テアシネンシン A、テアシネンシン B、テアシネンシン C、およびテアルピジンなどのカテキン重合ポリフェノール

□: グルコース 1 位, ◆: ヘスペレチンメトキシ基, ▲: ヘスペレチン A 環, ●: ヘスペレチン B 環 2 位, ■: ヘスペレチン C 環 2 位, △: ヘスペレチン C 環 3 位 (アキシアル側水素)

により、既存の緑茶製茶機械を使って、短時間でヘスペリジンの溶解性を向上させることを可能とした。そこで、ヘスペリジンの溶解性が向上した要因について検討を行った。図 2-2 に示すように、未熟ミカン混合発酵茶は、ヘスペリジン以外に茶葉由来のカテキン類、カテキン類の酸化によって生成したテアシトリン類、テアフラビン類、テアシネンシン類、テアルビジンなどの紅茶ポリフェノール類を含んでいた。茶葉に含まれるエピガロカテキンガレートは水溶性であるが、その分子には疎水性の部分が存在し、水溶液中ではその部分が、他の分子の疎水性部分と寄り添うことで水分子と反発する面積を減らしている<sup>71)</sup>。したがって、水溶液中では複数の分子が会合して存在している。紅茶ポリフェノール成分であるテアフラビン類など、多くのポリフェノール類も同様の性質を有することから、水溶液中の疎水性分子の共存と同様の理由で会合が起こる<sup>5) 62) 63)</sup>。そのため、水溶性ポリフェノールの疎水性部分とヘスペリジン分子中のヘスペレチン部分が会合する(疎水性相互作用)ことで、ヘスペリジン分子同士の会合を切り崩し、結果としてヘスペリジンの溶解性が向上すると推察される。そこで、紅茶抽出物をゲルろ過カラムにて3つの画分に分画し、収率に応じた量をヘスペリジンと水中で混和したところ、水溶性ポリフェノールであるエピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートおよび紅茶ポリフェノール類を主成分とする Fr.3 水溶液を添加したときに、最もヘスペリジンの溶出率が高まることが示された(図 2-3)。これは、ヘスペリジン分子の疎水性部分(ヘスペレチン)が、比較的水に溶けやすい茶葉由来のポリフェノールで覆われることで、全体として水和されやすくなり、溶解性が向上したためと推察される。Fr.3 と同様に、紅茶エキス成分を HPLC で分画した Fr.1 や Fr.2 水溶液添加においてもヘスペリジンの溶出率が増加した(図 2-3)ことから、カフェイン、フラボノール配糖体、エピカテキンおよびエピガロカテキンがヘスペレチン部分と会合して可溶化していることが考えられる。Fr.1、Fr.2 および Fr.3 をすべて含む紅茶エキス水溶液では、それらの会合が相加的に作用した結果、ヘスペリジンの溶解性が最も向上したと考えられる(図 2-3)。そこで、ヘスペリジンの溶解性向上が、ヘスペレチン部分と水溶性ポリフェノール類の会合によるものかを明らかにするための実験を行った。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルの測定において、測定する化合物の水素に、ベンゼン環をもつ共存物質が近づくと、ベンゼン環の  $\pi$  電子の影響を受けて、測定化合物の水素シグナルが高磁場側(図縦軸のマイナス方向)へシフトする。ポリフェノール類は多くのベンゼン環を有するため、ヘスペリジンとポリフェノール類が会合しているのであれば、両者を

混合するとヘスペリジン分子中の水素シグナルが高磁場にシフトする。図 2-4 に示すように、Fr.3 溶液の添加濃度に依存してヘスペレチン部分の水素原子のケミカルシフト値が変化した。特に、ヘスペレチン B 環 2 位、C 環 2 位および C 環 3 位の水素原子のケミカルシフトは大きく高磁場にシフトしていることが観察された。この結果は、ヘスペリジンの溶解性向上がヘスペリジンと水溶性ポリフェノール類の会合によることを強く示唆している。特に、水酸基が存在しないため最も疎水性の強いヘスペレチン C 環付近で水溶性ポリフェノール類と会合していることを示している。ヘスペリジンの溶解性が、ミカン未熟果 10 kg と三番茶葉 30 kg の混合揉捻で向上したのは、茶葉の量が多いことにより紅茶ポリフェノール類の前駆物質であるカテキン類が多いことによるものと考えられる。さらに、揉捻 20 分で、ヘスペリジンの溶出率が高い傾向にあった(表 2-1)。これは、ミカン未熟果を混合揉捻することで、カテキン類から紅茶ポリフェノール類への生成が進み、揉捻 40 分よりも 20 分で、ヘスペリジンの可溶化に至適なカテキン類と紅茶ポリフェノール類の組成になったことによるものと推察される。今後、製造工程中の水溶性ポリフェノール含量の経時変動を明らかにすることで、更なるヘスペリジンの溶解性向上に繋がる可能性がある。また、水溶性ポリフェノール成分の違いが、溶液中でヘスペリジンの溶解性に及ぼす影響を明確にする必要がある。

## 第3章

## 未熟ミカン混合発酵茶の香味特性の解明

## 緒言

宮田ら<sup>117)</sup>が開発した混合発酵茶葉の製法を応用し、低・未利用資源であるミカン未熟果と三番茶葉を1:3の比率で混合後、20分間揉捻して製造する未熟ミカン混合発酵茶を開発し(図3-1)、含まれるヘスペリジンの、水、熱水およびエタノールへの溶解性が向上することを前章で明らかにした。ヘスペリジンの溶解性向上は、化合物間の疎水性相互作用によって、ヘスペリジン分子のヘスペレチン部が、エピガロカテキンガレートや紅茶ポリフェノール類などの水溶性化合物と疎水会合することで、全体的に水和されやすくなることによって起こると推察された。また酸化工程を要することなく、ミカン未熟果と三番茶葉の揉捻工程のみで、カテキン類から紅茶ポリフェノール類への生成が促進することを確認した。

宮田ら<sup>117)</sup>は、ピワ葉混合発酵茶葉の熱水抽出物の品質について、香りや味に優れ、水色は鮮やかな紅色を呈するなど優れた特性を有することを報告している。ピワ葉混合発酵茶葉は、揉捻工程にて緑茶葉にピワ葉を添加して製造することから、茶葉のみで製造される緑茶や紅茶とは異なる香り特性を有する<sup>118)</sup>。(E)-2-ヘキセン酸-(Z)-3-ヘキセニル、(Z)-3-ヘキセニル、6-メチル-3,5-ヘプタジエン-2-オンなどは、新茶の香りに影響する成分であることが報告されている<sup>58)</sup>。一般に高級茶として取り扱われるてん茶や玉露には、海苔の重要な香り成分であるジメチルスルフィドが含まれている<sup>81)</sup>。また、茶葉の揉捻、発酵により、花様の香りの特徴とするリナロールオキシド類、リナロール、ベンズアルデヒド、ゲラニオール、フェニルエチルアルコールなどが生成する<sup>25)</sup>。一番茶葉と比較し三番茶葉は、夏場の高温により葉の硬化が促進され、硬化葉独特の好ましくない香りを呈するとされるが<sup>102)</sup>、三番茶葉を原料に製造した未熟ミカン混合発酵茶は、紅茶同様、茶葉の発酵によって花様の香りが生成し、三番茶葉の不快感な香りがマスキングされる可能性がある<sup>118)</sup>。また、ウンシュウミカンをはじめとするカンキツ類は、種々の機能性を発揮するヘスペリジンを特異的に含むだけでなく、フルーティーで甘い香りを有する<sup>82)</sup>。ウンシュウミカンに含まれる香りの主成分はd-リモネンであり、総香り成分の9割程度を占め<sup>6)</sup>、飲料、デザート、冷菓、キャンディー、菓子など様々な加工品のフレーバーとして利用されている。そのため、未熟ミカン混合発酵茶も、d-リモネンをはじめとするミカン由来の香り成分を保持することが期待できる。

味は香りとともに、茶の品質を決定づける重要な要素であり、嗜好性の高い味でなければ、毎日の食事の中に取り入れられることは難しい。茶の味は、アミノ酸やカテキン類、カフェインなどの旨味や苦渋味を有する呈味成分によって形成される<sup>98)</sup>。茶の旨味に関与するアミノ酸のテアニンは太陽光により分解され、最終的にカテキン類に変化する<sup>88)</sup>。そのため、春収穫の一番茶葉に比べると、夏場に収穫される三番茶葉の旨味は弱くなり、渋味が強くなる。渋味の軽減は、嗜好性の向上に大きく寄与するが、未熟ミカン混合発酵茶は三番茶葉を素材としているものの、カテキン類の酸化により、嗜好性の高い飲料である可能性がある。ただし、これら茶葉に含まれる成分の抽出率は、熱水温度によって異なることが推察される。前章において、水抽出と熱水抽出では、未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶出率に違いがあったが、これは、抽出温度が高いことにより、ヘスペリジンと会合するポリフェノール類の含量が多く抽出されたためと考えられる。したがって、ポリフェノールの抽出量が多いほど、ヘスペリジンの生体利用率は高いと推察される。

本章では、開発した未熟ミカン混合発酵茶が、ミカン由来の香りや味等の付与により、これまでの発酵茶と異なる香味特性を有する可能性があることから、食品素材としての有用性を評価するため、その香味特性について、同じ三番茶葉から製造した紅茶と比較・検討した。

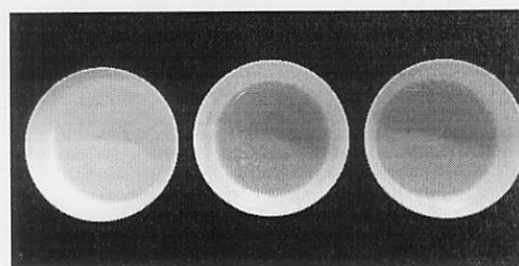


図3-1 緑茶(左)、紅茶(中央)および未熟ミカン混合発酵茶(右)

## 材料および方法

### 1. 材料

ミカン未熟果および三番茶葉は 2013 年産のものをを用いた。供試品種および収穫方法については、第 2 章と同様である。

### 2. 製造方法

三番茶葉を温度 26°C、湿度 55% で 24 時間静置して自然萎凋を行った。萎凋を終えた時の茶葉の水分含量は約 50% であった。包丁でスライスしたミカン未熟果 10 kg に対して、茶葉を 30 kg 混合し、揉捻機 (60k 型、カワサキ機工株式会社) を用いて、20 分間揉捻を行った。通常の紅茶製造においては、揉捻した茶葉を常温で放置することで、カテキン類の酸化を促進するが、混合発酵茶の製造においては、揉捻工程のみでカテキン類の酸化が十分に促進されるため、揉捻後の茶葉を放置する工程 (酸化工程) は設けなかった。最終工程として、透気式乾燥機 (50k 型、カワサキ機工株式会社) で 110°C、30 分の熱風処理により、カテキン類の酸化停止と茶葉の乾燥 (含水率として 5% 程度) を行った。また、岩浅<sup>76)</sup> の製法に準じて、三番茶葉から紅茶葉を製造した。まず、三番茶葉を温度 26°C、湿度 55% で 24 時間静置して萎凋を行った。萎凋した三番茶葉を揉捻機で 40 分揉捻後、4 時間常温に放置することで酸化させ、未熟ミカン混合発酵茶と同様に乾燥したものを紅茶葉とした。参考データとするため、三番茶葉から緑茶葉を製造した。緑茶葉は、蒸気で蒸した三番茶葉を恒温乾燥機を用いて、50°C、12 時間の通風乾燥により製造した。

### 3. 総ポリフェノール量の測定

総ポリフェノール含量についてはフォーリン・デニス法<sup>97)</sup>にて定量し、没食子酸相当量として算出した。3.2 mL の蒸留水を入れた試験管に、2 g の茶葉から 100°C の熱水 180 mL で抽出し、No.2 のろ紙 (株式会社アドバンテック、東京) でろ過したろ液を 200  $\mu$ L 加えた。これに 200  $\mu$ L のフォーリン・デニス試薬を加えて攪拌した後、400  $\mu$ L の飽和炭酸ナトリウム溶液を加え、30 分間放置した。分光光度計 (Ultrospec 3300 pro, GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて、この溶液の検出波長 760 nm の吸光度を測定した。

### 4. 色調の測定

未熟ミカン混合発酵茶葉、紅茶葉および緑茶葉を 2 g ずつ秤量し、それぞれに 100°C の熱水 180 mL を加え 4 分間抽出した。冷却後、No.2 のろ紙 (株式会社アドバンテック) でろ過した抽出液をガラスセルに入れ、背後に白板を当てながら、分光測色計 (CM-2600d, コニカミノルタ株式会社、東京) を用いて、L\* 値 (明度)、a\* 値 (プラスの数

値が大きいほど赤みが強く、マイナスの数値が大きいほど緑みが強い) および b\* 値 (プラスの数値が大きいほど黄色みが強く、マイナスの数値が大きいほど青みが強い) を測定した。

### 5. 香気成分の測定

香気成分分析は、樋口ら<sup>110)</sup>の方法を一部改変して行った。未熟ミカン混合発酵茶葉、紅茶葉および緑茶葉を別々の 200 mL 三角フラスコに 2 g ずつ入れた。80°C の熱水を 180 mL、内部標準として 1% シクロヘキサノール水溶液を 50  $\mu$ L 加え密栓した。80°C で 5 分間加熱処理を行い、フラスコ内が気液平衡に達した後、膜厚が 50/30  $\mu$ m の SPME ファイバー (Carboxen™/PDMS, シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京) を 20 分間フラスコ内へ挿入することで香気成分をトラップした。分析は、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010, 株式会社島津製作所) で行った。250°C に加熱したカラム注入口に SPME ファイバーを挿入し、トラップした香気成分を 3 分間の熱脱着によりカラムに注入した。カラムは、Stabil-WAX (内径 0.25 mm × 長さ 60 m, 膜厚 0.25  $\mu$ m) (株式会社島津製作所) を使用し、カラム温度を 70°C で 3 分間保持後、250°C まで 10°C/分 で昇温し、その後 250°C で 12 分間保持した。注入口温度は 250°C、ヘリウム圧力は 120 kPa とした。成分同定の条件は、インタフェース温度 250°C、イオン化電圧 70 eV、イオン化電流 60  $\mu$ A とし、内部標準に対する相対ピーク面積を求めた。

### 6. 味認識装置による味覚特性の測定

味覚特性は、茶葉 2 g を 100°C の熱水 180 mL 中で 4 分間抽出後、No.2 のろ紙 (株式会社アドバンテック) でろ過したろ液をサンプルとし、味認識装置 (TS-5000Z, 株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー、神奈川) を使用して測定した。酸味および旨味に应答するセンサーをサンプルに浸漬し、基準液 (30 mM 塩化カリウムと 0.3 mM 酒石酸の混合液) とサンプルの電位差を酸味および旨味とした。また、渋味および苦味に应答するセンサーをサンプルに浸漬後、各センサーを軽度洗浄してから再度基準液に浸漬した時の最初の基準液との電位差をそれぞれの渋味および苦味とした。Hayashi ら<sup>13)</sup>の方法に従い、渋味は 0.65 mM および 0.26 mM のエピガロカテキンガレート溶液を、苦味は 2.0 mM および 0.5 mM の没食子酸エチル溶液をそれぞれのリファレンスとした。データは、装置に付属された味認識装置解析アプリケーション (バージョン 1.6.5) により、それぞれの味推定値に変換した。

### 7. 味覚官能検査

未熟ミカン混合発酵茶、紅茶および緑茶の味覚に関する官能検査を茶品評会審査の経験者 4 名

により、緑茶の検査法<sup>92)</sup>を一部改変して行った。すなわち、緑茶審査専用の米国式茶碗に、茶葉をそれぞれ2g採取し、100°Cの熱水180mLを加え、4分間放置して得られた抽出液の渋味、苦味および旨味について、合繊制により評価した。

### 8. カテキン、カフェイン、クエン酸および総遊離アミノ酸の定量

茶葉2gを100°Cの熱水180mL中で4分間抽出後、No.2のろ紙(株式会社アドバンテック)でろ過したろ液をサンプルとし、主要カテキン4種(エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガラートおよびエピガロカテキンガラート)およびカフェイン含量の測定を、超高速液体クロマトグラフ(Prominence UFLC, 株式会社島津製作所)で行った。カラムはShim-pack C18(内径4.6mm×長さ75mm)(株式会社島津製作所)を使用し、移動相A液には10mMリン酸、B液にはアセトニトリル:10mMリン酸(50:50, v/v)を用いた。グラジエントは、移動相B液を7分間で10%から25%にし、その後3分間で80%にした。流速は1.0mL/分、カラム温度は37°Cとし、検出波長230nmでモニタリングした。クエン酸含量は、Fキットクエン酸(株式会社J.K.インターナショナル, 東京)で測定した。総遊離アミノ酸含量の測定は、池ヶ谷ら<sup>74)</sup>の方法に従い、グルタミン酸を標準品として、ニンヒドリン比色法で定量した。

### 9. 嗜好性に関するアンケート調査

長崎県農林技術開発センター(長崎県諫早市貝津町)の職員38名を対象に、未熟ミカン混合発酵茶の有する香味について、嗜好性に関するアンケート調査を行った。未熟ミカン混合発酵茶葉と基準である紅茶葉を10gずつ採取し、100°Cの熱水1.8Lをそれぞれ加え、4分間放置して得られた抽出液を80°Cに冷ましたものを審査した。なお、アンケートの内容は、図3-2に示す通りである。質問事項のQ1-1およびQ1-2のみ、紅茶を基準として評価した。有効回答数を母数として、回答の比率を算出した。

### 10. 統計処理

データは、3回測定した結果の平均値±標準偏差で示した。一連の統計処理には、統計解析アドインソフト(エクセル統計2006, 株式会社社会情報サービス)を用いた。熱水温度の違いにより溶出する総ポリフェノール含量の平均値の差については、一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer法による多重比較検定を行った。また、色調、香气成分、味推定値および呈味成分に関して、不発酵茶である緑茶は種類の異なる茶であることから比較対象とせず、緑茶のデータは参考値とし、未熟ミカン混合発酵茶と紅茶をスチューデントのt検定により比較した。統計的有意水準は、 $p < 0.05$ とした。

いずれかに○をつけて回答してください

1. 評価者情報

性別	女性	男性			
年齢	20代	30代	40代	50代	60代

2. 飲む前に評価してください

Q1-1「紅茶」と香りは異なるか?	異なる	一緒			
Q1-2「異なる」と回答した方、「紅茶」よりも香りは?	好き	やや好き	どちらとも言えない	やや嫌い	嫌い
Q2-1「紅茶系」の香りを感じるか?	感じる	感じない			
Q2-2「感じる」と回答した方、「紅茶系」の香りは?	強い	やや強い	中程度	やや弱い	弱い
Q3-1「柑橘系」の香りを感じるか?	感じる	感じない			
Q3-2「感じる」と回答した方、「柑橘系」の香りは?	強い	やや強い	中程度	やや弱い	弱い

3. 飲んだ後に評価してください

Q1-1「紅茶」と風味は異なるか?	異なる	一緒			
Q1-2「異なる」と回答した方、「紅茶」よりも風味は?	好き	やや好き	どちらとも言えない	やや嫌い	嫌い
Q2-1「紅茶系」の風味を感じるか?	感じる	感じない			
Q2-2「感じる」と回答した方、「紅茶系」の風味は?	強い	やや強い	中程度	やや弱い	弱い
Q3-1「柑橘系」の風味を感じるか?	感じる	感じない			
Q3-2「感じる」と回答した方、「柑橘系」の風味は?	強い	やや強い	中程度	やや弱い	弱い
Q4飲み口は?	良い	やや良い	分からない	やや悪い	悪い
Q5後味は?	良い	やや良い	分からない	やや悪い	悪い
Q6新しいタイプの茶であるか?	思う	分からない	思わない		
Q7商品化された場合に買いたいとおもるか?	思う	分からない	思わない		
Q8品質改善効果が期待できるならば買いたいと思うか?	思う	分からない	思わない		

ご協力ありがとうございました。

図3-2 未熟ミカン混合発酵茶の嗜好性に関する質問事項(アンケート用紙)

Q1-1およびQ1-2は、同じ三番茶葉から製造した紅茶との比較



結果

1. 抽出温度の違いにより溶出する総ポリフェノール量

未熟ミカン混合発酵茶葉から熱水温度を変えて抽出した総ポリフェノール量を図 3-2 に示す。抽出温度が高いほど、総ポリフェノールの溶出量が増加し、熱水温度 100°C では、60°C と比較し、2 倍以上であった。

2. 未熟ミカン混合発酵茶の色調

未熟ミカン混合発酵茶の L\*値、a\*値および b\*値を表 3-1 に示す。未熟ミカン混合発酵茶の L\*値は、紅茶と同程度であった。未熟ミカン混合発酵茶の a\*値は、紅茶よりも低値であった。未熟ミカン混合発酵茶および紅茶の b\*値に差は認められなかった。

3. 未熟ミカン混合発酵茶に含まれる主要な香氣成分

未熟ミカン混合発酵茶に含まれる香氣成分のトータルイオンクロマトグラムを図 3-3 に示す。また、未熟ミカン混合発酵茶に含まれる香氣成分の内部標準に対する相対ピーク面積を表 3-2 に示す。未熟ミカン混合発酵茶に含まれる香氣成分のピークパターンは、紅茶と類似していた。図 3-3 に示すクロマトグラムのピーク面積の大きさより、未熟ミカン混合発酵茶および紅茶の主要な香氣はいずれも、d-リモネン、2-ヘキセナール、オシメン異性体およびリナロールであった。未熟ミカン混合発酵茶に含まれる d-リモネンは、紅茶よりも多かった。未熟ミカン混合発酵茶の 2-ヘキセナールおよびリナロールは、紅茶と同程度検出され、オシメン異性体は、未熟ミカン混合発酵茶で紅茶よりも多く検出された。

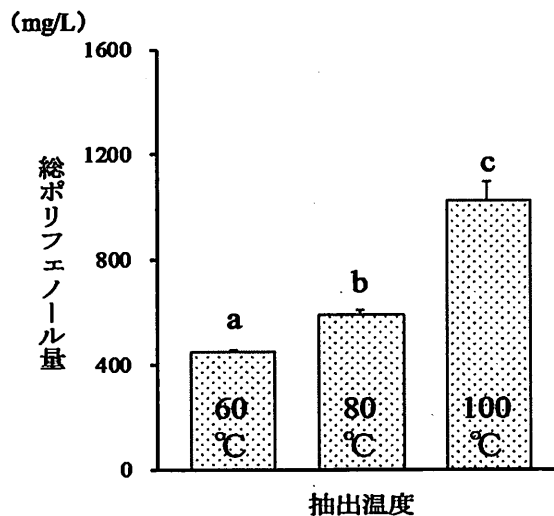


図 3-2 異なる熱水温度で抽出した、未熟ミカン混合発酵茶に含まれる総ポリフェノール量  
 平均値 ± 標準偏差 (n=3)  
 a,b,c 異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

表 3-1 未熟ミカン混合発酵茶の色調

	未熟ミカン 混合発酵茶	紅茶	緑茶 (参考)	有意差
L*	36.5 ± 1.2	35.3 ± 3.1	46.7 ± 4.4	NS
a*	8.0 ± 0.9	10.9 ± 0.2	-3.5 ± 0.8	p < 0.01
b*	44.4 ± 4.7	49.3 ± 3.0	14.2 ± 4.5	NS

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

L\* : 明るさの指標。数値が大きいほど、色が明るいことを示す。

a\* : プラスの数値が大きいほど赤みが強く、マイナスの数値が大きいほど緑みが強い。

b\* : プラスの数値が大きいほど黄色みが強く、マイナスの数値が大きいほど青みが強い。

未熟ミカン混合発酵茶と紅茶との有意差

NS : 有意差なし



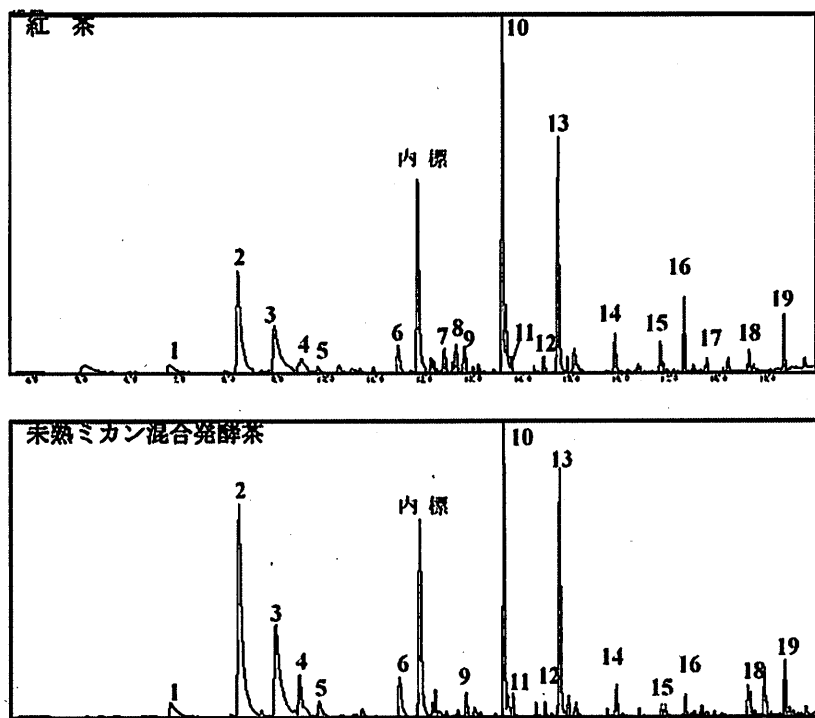


図 3-3 ガスクロマトグラフ質量分析計分析による、未熟ミカン混合発酵茶に含まれる香り成分のトータルイオンクロマトグラム

1. ヘキサナール, 2. d-リモネン, 3. 2-ヘキセナール, 4. オシメン異性体, 5. オクタナール, 6. 3-ヘキセン-1-オール, 7. cis-リナロールオキサイド, 8. 2,4-ヘプタジエナール, 9. trans-リナロールオキサイド, 10. リナロール, 11. 1-オクタノール, 12. 酪酸, 13. バックグラウンドピーク, 14. バックグラウンドピーク, 15. サリチル酸メチル, 16. グラニオール, 17. 2-フェニル-エタノール, 18. β-ヨノン, 19. ネロリドール

表3-2 未熟ミカン混合発酵茶に含まれる主要な香り成分

Peak	成分名	未熟ミカン 混合発酵茶	紅茶	緑茶 (参考)	有意差
1	ヘキサナール	0.15 ± 0.04	0.12 ± 0.01	ND	NS
2	d-リモネン	1.27 ± 0.09	0.80 ± 0.17	ND	p < 0.05
3	2-ヘキセナール	0.55 ± 0.18	0.44 ± 0.08	ND	NS
4	オシメン異性体	0.56 ± 0.11	0.16 ± 0.03	ND	p < 0.01
5	オクタナール	0.17 ± 0.13	0.04 ± 0.02	ND	NS
6	3-ヘキセン-1-オール	0.110 ± 0.052	0.103 ± 0.046	0.009 ± 0.003	NS
7	Cis-リナロールオキサイド	ND	0.04 ± 0.01	ND	-
8	2,4-ヘプタジエナール	ND	0.08 ± 0.03	ND	-
9	trans-リナロールオキサイド	0.09 ± 0.10	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.04	NS
10	リナロール	0.46 ± 0.04	0.52 ± 0.02	0.03 ± 0.01	NS
11	1-オクタノール	0.034 ± 0.004	0.017 ± 0.003	ND	p < 0.05
12	酪酸	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	ND	NS
15	サリチル酸メチル	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.02	ND	NS
16	グラニオール	0.07 ± 0.01	0.18 ± 0.04	ND	p < 0.01
17	2-フェニル-エタノール	ND	0.057 ± 0.003	ND	-
18	β-ヨノン	0.09 ± 0.02	0.05 ± 0.03	ND	NS
19	ネロリドール	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.01	NS

数値は内部標準 (シクロヘキサノール) に対する相対ピーク面積

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

ND: 検出限界以下

未熟ミカン混合発酵茶と紅茶との有意差

NS: 有意差なし

その他の香気成分として、1-オクタノールは、未熟ミカン混合発酵茶で紅茶よりも多かった。ゲラニオールは、未熟ミカン混合発酵茶よりも紅茶で多く検出され、cis-リナロールオキサイド、2,4-ヘプタジエナルおよび2-フェニルエタノールは、紅茶でのみ検出された。ヘキサナール、オクタナール、3-ヘキセン-1-オール、trans-リナロールオキサイド、酪酸、サリチル酸メチル、β-ヨノンおよびネロリドールのピーク面積に差は認められなかった。

**4. 未熟ミカン混合発酵茶の味認識装置による味推定値**

未熟ミカン混合発酵茶の味認識装置による味推定値を表3-3に示す。未熟ミカン混合発酵茶の渋味推定値は、紅茶よりも低値であった。未熟ミカン混合発酵茶の苦味推定値は、紅茶と同程度で、酸味の値は、紅茶よりも高値を示した。旨味推定値は、未熟ミカン混合発酵茶において、紅茶よりも低かった。

**5. 未熟ミカン混合発酵茶の味覚官能検査**

未熟ミカン混合発酵茶の官能検査結果を表3-4に示す。未熟ミカン混合発酵茶および紅茶の渋味および苦味は、いずれもやや弱かった。未熟ミカン混合発酵茶および紅茶の旨味は中程度の評価であった。

**6. 未熟ミカン混合発酵茶に含まれるカテキン類、カフェイン、クエン酸および総遊離アミノ酸量**

未熟ミカン混合発酵茶に含まれるカテキン類、カフェイン、クエン酸および総遊離アミノ酸量を表3-5に示す。エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、総カテキンおよびカフェイン含量は、紅茶よりも未熟ミカン混合発酵茶で少なかった。未熟ミカン混合発酵茶のクエン酸含量は、紅茶よりも多かった。未熟ミカン混合発酵茶と紅茶の総遊離アミノ酸含量は同程度であった。

**7. 嗜好性に関するアンケート調査**

未熟ミカン混合発酵茶の嗜好性に関するアンケート調査結果を表3-6に示す。未熟ミカン混合発酵茶の香りについて、8割程度の被験者が紅茶と「異なる」と回答し、紅茶よりも「嫌い」あるいは「やや嫌い」という回答よりも、「好き」あるいは「やや好き」と回答する割合が多かったが、明確な差ではなかった。9割の被験者が、紅茶系の香りを「感じる」と回答し、紅茶系の香りを「強い」あるいは「やや強い」と回答した被験者の割合は、「弱い」あるいは「やや弱い」と回答した割合と同程度であり、「中程度」が3割程度であった。一方、柑橘系の香りを感じる被験者の割合は4割程度で、そのうち、柑橘系の香りを「弱い」あるいは「やや弱い」と回答した被験者がほとん

表3-3 未熟ミカン混合発酵茶の味認識装置による味推定値

	未熟ミカン 混合発酵茶	紅茶	緑茶 (参考)	有意差
渋味	1.38 ± 0.02	2.74 ± 0.23	3.62 ± 0.42	p < 0.01
苦味	1.80 ± 0.23	2.02 ± 0.83	0.71 ± 0.92	NS
酸味	-26.5 ± 0.7	-35.1 ± 1.0	-45.6 ± 1.1	p < 0.01
旨味	1.04 ± 0.34	2.84 ± 0.14	4.80 ± 0.34	p < 0.01

数値は味認識装置分析による推定値。数値が大きいくほど、その味を感じやすいとされる。

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

未熟ミカン混合発酵茶と紅茶との有意差

NS: 有意差なし

表3-4 未熟ミカン混合発酵茶の味覚官能検査

	未熟ミカン 混合発酵茶	紅茶	緑茶 (参考)
渋味	やや弱い	やや弱い	やや強い
苦味	やや弱い	やや弱い	やや強い
旨味	中程度	中程度	やや弱い

5段階の強度尺度(弱い-やや弱い-中程度-やや強い-強い)を用い、茶品評会審査経験者4名(40代から50代の男性)の合議制で審査した。

表3-5 未熟ミカン混合発酵茶に含まれるカテキン類, カフェイン, クエン酸および総遊離アミノ酸含量

	未熟ミカン 混合発酵茶	紅茶	緑茶 (参考)	有意差
カテキン類 (mg/100 mL)				
エピカテキン	1.86 ± 0.01	3.54 ± 0.01	11.74 ± 0.01	p < 0.01
エピガロカテキン	1.39 ± 0.01	1.85 ± 0.03	47.29 ± 0.13	p < 0.01
エピカテキンガレート	1.83 ± 0.01	3.42 ± 0.05	13.63 ± 0.37	p < 0.01
エピガロカテキンガレート	3.36 ± 0.43	4.52 ± 0.14	66.40 ± 1.46	p < 0.05
総カテキン	8.45 ± 0.45	13.33 ± 0.22	139.05 ± 1.97	p < 0.01
カフェイン (mg/100 mL)	23.3 ± 0.1	35.4 ± 0.1	31.5 ± 0.1	p < 0.01
クエン酸 (mg/100 mL)	7.54 ± 1.78	2.32 ± 0.20	3.12 ± 2.01	p < 0.01
総遊離アミノ酸 (mg/100 mL)	9.98 ± 0.92	8.57 ± 0.03	22.58 ± 1.44	NS

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

未熟ミカン混合発酵茶と紅茶との有意差

NS: 有意差なし

表3-6 未熟ミカン混合発酵茶の嗜好性に関する官能結果

「紅茶」と香りは異なるか?	異なる: 78.9%, 一緒: 21.1%
「異なる」と回答した方, 「紅茶」よりも香りは?	好き: 3.4%, やや好き: 31.0%, どちらとも言えない: 44.8%, やや嫌い: 20.7%, 嫌い: 0.0%
「紅茶系」の香りを感じるか?	感じる: 91.9%, 感じない: 8.1%
「感じる」と回答した方, 「紅茶系」の香りは?	強い: 8.8%, やや強い: 29.4%, 中程度: 29.4%, やや弱い: 23.5%, 弱い: 8.8%
「柑橘系」の香りを感じるか?	感じる: 36.8%, 感じない: 63.2%
「感じる」と回答した方, 「柑橘系」の香りは?	強い: 0.0%, やや強い: 0.0%, 中程度: 7.1%, やや弱い: 42.9%, 弱い: 50.0%
「紅茶」と風味は異なるか?	異なる: 65.8%, 一緒: 34.2%
「異なる」と回答した方, 「紅茶」よりも風味は?	好き: 0.0%, やや好き: 62.5%, どちらとも言えない: 20.8%, やや嫌い: 12.5%, 嫌い: 4.2%
「紅茶系」の風味を感じるか?	感じる: 84.2%, 感じない: 15.8%
「感じる」と回答した方, 「紅茶系」の風味は?	強い: 2.9%, やや強い: 17.6%, 中程度: 29.4%, やや弱い: 35.3%, 弱い: 8.8%
「柑橘系」の風味を感じるか?	感じる: 26.3%, 感じない: 73.7%
「感じる」と回答した方, 「柑橘系」の風味は?	強い: 0.0%, やや強い: 10.0%, 中程度: 10.0%, やや弱い: 80%, 弱い: 0.0%
飲み口は?	良い: 24.3%, やや良い: 45.9%, 中程度: 16.2%, やや悪い: 13.5%, 悪い: 0.0%
後味は?	良い: 24.3%, やや良い: 45.9%, 中程度: 13.5%, やや悪い: 16.2%, 悪い: 0.0%
新しいタイプの茶であるか?	思う: 43.2%, 分からない: 29.7%, 思わない: 27.0%
商品化された場合に買いたいとおもうか?	思う: 11.1%, 分からない: 69.4%, 思わない: 19.4%
脂質代謝改善効果が期待できるならば買いたいと思うか?	思う: 81.8%, 分からない: 18.2%, 思わない: 0.0%

どであった。未熟ミカン混合発酵茶の風味について、紅茶と「異なる」と回答した被験者の割合は6割以上で、そのうち、6割以上の被験者が紅茶よりも「やや好き」と回答した。また、紅茶系の風味を8割以上の被験者が感じたが、そのうち、4割以上が「弱い」あるいは「やや弱い」と回答した。柑橘系の風味を感じる被験者の割合は3割未満と低く、そのうちの8割が柑橘系の香りは「やや弱い」と回答した。未熟ミカン混合発酵茶の飲み口および後味について、7割の被験者が「良い」あるいは「やや良い」と回答した。半数近くが、未熟ミカン混合発酵茶を新しいタイプの茶と回答したが、商品として購入するかとの問いに、購入すると回答した被験者の割合は1割程度であった。しかし、未熟ミカン混合発酵茶を飲むことで、脂質代謝改善効果が期待できるという条件を提示すると、購入すると回答した被験者の割合が8割以上にまで増加した。

### 考察

第2章にて、未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性向上は、水溶性ポリフェノール類の量が多いことにより惹起されると推察された。そこでまず、未熟ミカン混合発酵茶葉から溶出する総ポリフェノール量と抽出時の熱水温度の関係について検討した。熱水温度が高いほど、総ポリフェノールの溶出量が増加し、温度100°Cでは、60°Cと比較し、2倍以上となった(図3-2)。そのため、ヘスペリジンの溶出率向上には、抽出時の熱水温度を高くすることが望ましいと考えられるが、ポリフェノールの溶出量が多いと、カテキン類などの渋味成分も多く抽出される。しかし、官能検査の結果において、抽出温度を100°Cにした場合でも、未熟ミカン混合発酵茶の渋味は「やや弱い」との評価であった(表3-4)。したがって、味覚官能検査や呈味成分評価のための熱水抽出温度は100°Cに設定した。

宮田ら<sup>117)</sup>は、ピワ葉混合発酵茶の製造において、カテキン含量の減少率が大きいと紅茶ポリフェノール類が多く生成することで、熱水抽出液の色調が鮮やかになることを報告している。ピワ葉混合発酵茶は、ピワ葉を添加していない一般の発酵茶よりもカテキン含量の減少率が大きい。未熟ミカン混合発酵茶においても、茶葉とミカン未熟果に含まれるポリフェノール酸化酵素の作用で、紅茶よりもカテキン類の酸化が促進されると予想したが、未熟ミカン混合発酵茶の色調について、紅茶よりも弱い赤橙色であった(図3-1および表3-1)。本実験において、紅茶葉の製造には4時間の酸化工程を設定している。一方、未熟ミカン混合発酵茶葉の製造においては、酸化工程を省略しているため、このことにより、カテキン類の酸化

率に違いが生じた可能性があるが、ピワ葉混合発酵茶の研究においては、酸化工程を省略しても、本実験と同様に製造した紅茶葉よりもカテキン類の減少率が大きい<sup>117)</sup>。素材である茶葉の割合に違いがあるため、単純な比較はできないが、ミカン未熟果に含まれるポリフェノール酸化酵素の作用は、ピワ葉よりも弱いと考えられる。

緑茶の製造においては、茶葉を蒸熱処理するため香氣成分の多くが揮散することから、緑茶の香氣成分含量は減少する<sup>73)</sup>。一方、紅茶製造においては蒸熱処理を施さない。そのため、紅茶の香氣成分は揮散せず、萎凋、揉捻、酸化を行うことで、香氣成分の生成が促進される。本実験においても未熟ミカン混合発酵茶および紅茶で多くの成分が検出され、緑茶においては検出限界以下の成分が多かった(表3-2)。未熟ミカン混合発酵茶に含まれる主要香氣は、紅茶よりも多く含まれていたd-リモネンおよびオシメン異性体と、紅茶と同程度検出された2-ヘキセナールおよびリナロールであった(表3-3および表3-2)。これら成分はいずれも紅茶の主要香氣であり、緑茶では、リナロールを除いて検出限界以下であったことから、茶葉の発酵によって増加あるいは生成すると考えられる。また、d-リモネンは、ウンシュウミカンの最も主要な香氣であり<sup>6)</sup>、カンキツ系の爽快な香りに関与し、香水などの主成分として使用されることが多い。未熟ミカン混合発酵茶のd-リモネン含量は紅茶よりも多いことから、茶葉の発酵のみならず、ミカン未熟果を混合することによって増加した可能性は高い。官能調査では、カンキツ系の香りを感じる被験者は半数以下であったため(表3-6)、ヒトが違いを明確に認識できるほどの差でないものの、d-リモネンは未熟ミカン混合発酵茶の香りの特徴づける成分であるといえる。オシメン異性体はd-リモネンと同様、モノテルペン類で、ユリやカーネーション、チューリップなどの主要香氣である<sup>24) 47) 48)</sup>。d-リモネンと同じく、オシメン異性体も香水等で利用される成分の一種であることから、未熟ミカン混合発酵茶の重要な香氣成分と考えられる。茶葉の発酵程度は、紅茶葉の方が大きいと推察されるものの、2-ヘキセナールやリナロールは、未熟ミカン混合発酵茶と紅茶で差はない(表3-2)。2-ヘキセナールやリナロールはカンキツ類の微量香氣であることから<sup>108)</sup>、未熟ミカン混合発酵茶においては、ミカン未熟果の混合で、これら成分が付加され、結果として紅茶と同程度検出されたと考えられる。主要香氣をはじめ、未熟ミカン混合発酵茶に含まれる香氣成分のクロマトグラムピークパターンは、紅茶と類似していた。一方、官能調査では、混合発酵茶の香りについて、ほとんどの被験者が紅茶系の香りを感じると回答したが、そのうちの8割が紅茶と香りは異なる」と回答した(表3-6)。その

ため、d-リモネンおよびオシメン異性体含量の違いが影響した可能性がある。また、cis-リナロールオキサイド、1-オクタノール、グラニオール、2,4-ヘプタジエンールおよび2-フェニルエタノールなど差が認められた微量成分も相加的に作用した可能性が考えられる。いずれにせよ、未熟ミカン混合発酵茶は、紅茶と異なる独特の香り特性を有するといえる。

味覚特性分析に用いた味認識装置は、ヒトの舌に類似した味覚認識メカニズムを持ち、食品が有する複雑な味を数値化できる。味認識装置で分析した渋味に関して、未熟ミカン混合発酵茶は紅茶よりも低い推定値を示した(表3-3)。味認識装置の渋味センサーは、茶カテキンの主要成分であるエピガロカテキンガレートに対して強い応答を示すことから<sup>96)</sup>、未熟ミカン混合発酵茶において渋味の推定値が紅茶より低くなったのは、カテキン類の酸化によって紅茶ポリフェノール類の生成が促進され、結果的にエピガロカテキンガレート含量の減少率が大きかったことによるものと考えられる(表3-5)。未熟ミカン混合発酵茶の官能検査において、口内で感じる渋味は緑茶より弱く(表3-4)、飲み口および後味の嗜好性も比較的高いことから(表3-6)、口あたりの柔らかい飲料であると評価できる。

茶の苦味の主要成分であるカフェイン含量は、未熟ミカン混合発酵茶で紅茶より少ないものの(表3-5)、官能評価において、未熟ミカン混合発酵茶と紅茶の苦味は同等の評価を得た(表3-4)。また、味認識装置による未熟ミカン混合発酵茶の苦味推定値も紅茶と同程度の値を示した(表3-3)。味認識装置の苦味センサーに反応する成分は明らかでないものの、未熟ミカン混合発酵茶に含まれるカフェインやカテキン類をはじめとした苦味を有する成分含量は、紅茶同様に少ないといえる。

官能検査で酸味については評価していないが、味認識装置による分析において、未熟ミカン混合発酵茶の酸味推定値は紅茶よりも高値を示した(表3-3)。味認識装置の仕様では、基準液をゼロとしてサンプルの味を相対的に評価する。ただし、酒石酸由来の酸味が基準液に含まれるため、酸味の無味点は-13となっている。未熟ミカン混合発酵茶の酸味推定値は、紅茶よりも高値であるものの、無味点よりも低い。一般にミカン果実は、酸味の主成分であるクエン酸を多く含む。実際、未熟ミカン混合発酵茶に含まれるクエン酸含量は紅茶よりも多かったが(表3-5)、ミカン果実に比べると、クエン酸含量は圧倒的に少ない。しかし、クエン酸に由来する酸味の検知閾値は、65歳以上の高齢女性において、溶液100 mLあたり2 mg程度であることが示されている<sup>115)</sup>。そのため、ヒトの舌ではクエン酸由来の酸味を感じる可能

性が高く、クエン酸は、未熟ミカン混合発酵茶の味を表現するうえで重要かもしれない。

味認識装置の旨味センサーに強く応答する物質はアミノ酸類である。未熟ミカン混合発酵茶の総遊離アミノ酸含量に、紅茶と差がなく(表3-5)、官能検査による旨味も、紅茶同様の評価であった(表3-4)。一方で、味認識装置による旨味推定値は、紅茶で高値を示した(表3-3)。旨味センサーの出力値は、茶に含まれるポリフェノール含量と正の相関関係にあることが報告されている<sup>12)</sup>。そのため、紅茶の旨味推定値が未熟ミカン混合発酵茶よりも高値を示したのは、総ポリフェノール含量の違いによるものと推察される。したがって、未熟ミカン混合発酵茶の旨味に関して、紅茶との違いは少ない可能性がある。ただし、ヒトの味覚に影響を与える要因を、特定の呈味成分の量だけで説明するのは難しく、旨味や渋味、苦味といった呈味成分の濃度と成分相互の調和が重要であることを中川<sup>98)</sup>は指摘している。緑茶の総遊離アミノ酸含量は、未熟ミカン混合発酵茶や紅茶よりも多かったものの(表3-5)、旨味はやや弱いとの評価であった(表3-4)。これは、緑茶の苦渋味がやや強かったために、旨味がマスキングされたと考えられる。

また、官能検査による未熟ミカン混合発酵茶と紅茶の渋味、苦味、旨味の強度は同程度であるが(表3-4)、アンケート調査において、未熟ミカン混合発酵茶の風味は紅茶と異なると回答した被験者の割合は半数以上であり、そのうち、6割以上の被験者が紅茶よりも「やや好き」と回答した(表3-6)。また、新しいタイプの茶飲料であると半数近くの被験者が回答しており、このことは、カテキン類、カフェインおよびクエン酸含量などの違いによって、紅茶とは異なる味覚特性になったことが推察される。アンケート調査による未熟ミカン混合発酵茶の飲み口や後味は、7割の被験者で「良い」あるいは「やや良い」との評価であったが、購入すると回答した被験者の割合は1割程度であった(表3-6)。そのため、香味だけで消費者の購買意欲を促すことは難しいと判断され、脂質代謝改善作用等の機能性を本発酵茶が有するのであれば、訴求力が大幅に向上することが示された(表3-6)。したがって、未熟ミカン混合発酵茶の有する機能性を追究する必要がある。

以上の結果より、未熟ミカン混合発酵茶は、同じ三番茶葉から製造した紅茶とは異なる香味特性を有すると考えられ、嗜好性の高い、新たな茶製品である可能性が示された。

## 第4章

## 萎凋時の熱風温度やミカン未熟果のスライス方法の違いが カテキン類の酸化効率および未熟ミカン混合発酵茶の品質に及ぼす影響

### 緒言

2012年産(第2章)および2013年産(第3章)の未熟ミカン混合発酵茶葉製造工程において、茶葉と揉捻するミカン未熟果は、包丁を用いて一つ一つ手作業でスライスした。しかし、この方法では多大な時間と手間を要する。そのため、ミカン未熟果の有する香味成分が損失されやすく、スライス物の大きさも均一ではないことから、最終製品の品質のバラツキが大きくなると考えられる。飲料工場などでは、機械を用いて飲料の原料を調製するのが一般的である。機械でミカン未熟果をスライスすることで、未熟ミカン混合発酵茶葉製造に要する人為的コストが大幅に省略できるとともに、最終製品の品質のバラツキを抑えることができると考えられる。また、未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性や本発酵茶の有する香味特性が損なわれることがなければ、飲料工場との連携や技術移転も可能となる。

第3章において、摘果開始時期におけるミカン未熟果のポリフェノール酸化酵素活性は弱いと考えられ、通常の紅茶葉の製法を適用しても、カテキン類の酸化が進みにくいことから、品質の高い発酵茶を製造することは難しい。ピワ葉混合発酵茶の開発に関する研究では、萎凋工程において、緑茶製茶機械である粗揉機を使って、70°C、80°Cおよび90°Cの熱風を三番茶葉に当てた場合、低い熱風温度で萎凋した茶葉から製造した発酵茶葉でカテキン類の減少率が大きいことが明らかにされている<sup>117)</sup>。これは、熱風温度が低いと茶葉の温度が大きく上昇しないことで、茶葉中のポリフェノール酸化酵素の活性が保たれ、揉捻工程でカテキン類の酸化が効率良く行われたことと推察される。熱風温度70°Cで萎凋した茶葉から製造された発酵茶葉は、熱風温度90°Cで萎凋したものと比べ、総カテキンの減少率が2倍程度高い<sup>117)</sup>。また、茶葉の温度上昇は、水分の蒸散を促進し、茶葉の含水率を減少させる。茶葉に含まれる水分の減少に比例し、ポリフェノール酸化酵素活性も低下することが報告されている<sup>83)</sup>。第2章で、未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性を高める製造条件として、ミカン未熟果と三番茶葉の混合比率、揉捻時間および酸化時間を検討した。その結果、エピガロカテキンガレートや紅茶ポリフェノール類などの水溶性化合物が、ヘスペリジンの溶解性向上に寄与することが示唆された。したがって、未熟ミカン混合発酵茶葉製造において、粗揉機を用いて萎凋工程にお

ける茶葉への熱風温度の違いが、カテキン類の酸化効率を変動させ、ヘスペリジンの溶解性や香味ならびに嗜好性にも影響する可能性がある。

本章では、ミカン未熟果のスライス方法の改良のために、長崎県内の果汁工場が所有するスライス機械を用いて切断した未熟果を、未熟ミカン混合発酵茶製造のための原料とした。また、発酵茶葉製造で最も時間を要する萎凋工程について、茶葉への熱風温度の違いが、カテキン類の酸化効率や溶出するヘスペリジン量ならびに香味特性に及ぼす影響について検討した。

### 材料および方法

#### 1. 材料

ミカン未熟果および三番茶葉は2014年産のものを用いた。供試品種および収穫方法については、第2章と同様である。

#### 2. 製造方法

粗揉機は茶葉に熱風を当て攪拌しながら効率よく乾燥させる製茶機械である。緑茶ではカテキン類の酸化が進まないよう、茶葉を蒸熱処理した後に粗揉機に入れるが、本実験では三番茶葉に含まれるカテキン類の酸化促進を目的とするために、蒸熱処理を施していない茶葉を粗揉機(60k-A, カワサキ機工株式会社)に入れて熱風攪拌した(人工萎凋)。蒸熱処理を行っていない茶葉の容積は、通常の緑茶葉製造で蒸熱処理をした茶葉に比べて大きいことから、効率よく熱風処理をするために粗揉機に入れる茶葉の量を一般の緑茶葉製造の半分程度とした。また、熱風温度は粗揉機に入れる茶葉の量が約半分と少ないことから、通常の緑茶葉製造温度である100°Cより低い75、85あるいは90°Cとし、工程時間は20分とした。次に、各熱風温度で萎凋した茶葉30kgを揉捻機(60k型, カワサキ機工株式会社)に移し、JA全農ながさき大村果汁工場(長崎県大村市富の原)にてサイレントカッター(SC120, 株式会社ヤナギヤ, 山口)を使ってスライスしたミカン未熟果を10kg添加し、20分間揉捻を行った。酸化工程は省略し、最終工程として、透気式乾燥機(50k型, カワサキ機工株式会社)で110°C、30分の熱風処理により、カテキン類の酸化停止と茶葉の乾燥(含水率として5%程度)を行った。

3. 茶葉の温度および茶葉含水率の測定

粗揉機に投入した茶葉の温度および含水率の測定については、2.5分毎に20分間行った。約10gの茶葉を採取し、105°C、3時間加熱乾燥する常圧加熱乾燥法<sup>74)</sup>により含水率を算出した。

4. 色調の測定

第3章に準じて行った。

5. ヘスペリジン、カテキン、pHおよびクエン酸の定量

ヘスペリジンの定量は第2章に、カテキン（エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガラートおよびエピガロカテキンガラートの総和）およびクエン酸含量は第3章に準じて行った。pHは、卓上型pHメーター（F-52、株式会社堀場製作所、京都）で測定した。

6. 味認識装置による渋味推定値の測定

第3章に準じて行った。

7. 香氣成分の測定

第3章に準じて行った。

8. 嗜好性に関するアンケート調査結果

長崎県農林技術開発センターの職員37名を対象に、萎凋時の熱風温度が異なる茶葉から製造した未熟ミカン混合発酵茶の有する香味について、嗜好性に関するアンケート調査を行った。各茶葉をそれぞれ10g採取し、100°Cの熱水1.8Lを加え、4分間放置して得られた抽出液を80°Cに冷ましたものを審査した。なお、アンケートの内容は、図4-1に示す通りである。有効回答数を母数として、回答の比率を算出した。

9. 統計処理

データは、3回測定した結果の平均値 ± 標準偏差で示した。茶葉の温度および茶葉含水率は、1回の測定結果を示した。一連の統計処理には、統計解析アドインソフト（エクセル統計2006、株式会社社会情報サービス）を用いた。平均値の差については、一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer法による多重比較検定を行った。統計的有意水準は、 $p < 0.05$ とした。

結果

1. 萎凋工程における茶葉の温度と茶葉含水率(%)の経時変化

萎凋工程における熱風温度の違いによる茶葉の温度の推移を図4-2に示す。熱風温度95°C処理の場合、粗揉機への茶葉投入7.5分以降から茶葉の温度は上昇し、茶葉投入20分後の取出し時には50°Cを超えた。85°C処理では、12.5分以降上昇を始め、茶葉の取出し時には45°C程度に達し、75°C処理では処理時間中（20分間）40°C未満であった。熱風温度の違いによる茶葉含水率の推移を図4-3に示す。熱風温度が高いほど処理時間中の含水率は低く、茶葉取出し時の含水率は、75°C処理で58.9%、85°C処理で54.5%、95°C処理で51.5%であった。

2. 萎凋時の熱風温度が異なる未熟ミカン混合発酵茶の色調

萎凋時の茶葉への熱風温度が異なる未熟ミカン混合発酵茶のL\*値、a\*値およびb\*値を表4-1に示す。L\*値に熱風温度による影響は認められなかった。a\*値について、75°Cと85°C処理で差はなかったが、95°C処理で有意に低値を示した。b\*値

いずれかに○をつけて回答してください

1. 評価者情報

性別	女性	男性			
年齢	20代	30代	40代	50代	60代

2. 飲む前に評価してください

①のサンプルの香りは?	好き	やや好き	どちらとも目えない	やや嫌い	嫌い
②のサンプルの香りは?	好き	やや好き	どちらとも目えない	やや嫌い	嫌い
③のサンプルの香りは?	好き	やや好き	どちらとも目えない	やや嫌い	嫌い

3. 飲んだ後に評価してください

①のサンプルの風味は?	好き	やや好き	どちらとも目えない	やや嫌い	嫌い
②のサンプルの風味は?	好き	やや好き	どちらとも目えない	やや嫌い	嫌い
③のサンプルの風味は?	好き	やや好き	どちらとも目えない	やや嫌い	嫌い

ご協力ありがとうございました。

図4-1 萎凋時の熱風温度が異なる未熟ミカン混合発酵茶の嗜好性に関する質問事項（アンケート用紙）

- ①：萎凋工程において、75°Cの熱風を20分間三番茶葉に当てて製造した未熟ミカン混合発酵茶
- ②：萎凋工程において、85°Cの熱風を20分間三番茶葉に当てて製造した未熟ミカン混合発酵茶
- ③：萎凋工程において、95°Cの熱風を20分間三番茶葉に当てて製造した未熟ミカン混合発酵茶

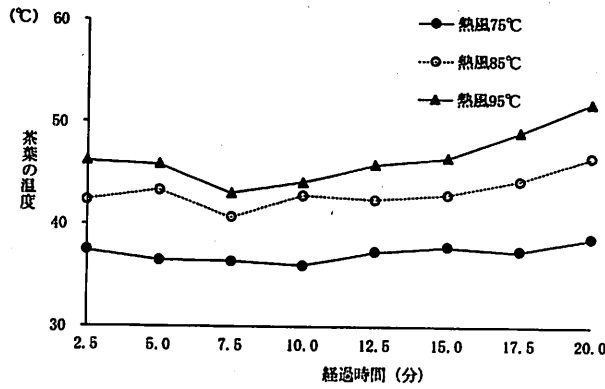


図 4-3 熱風温度の違いによる萎凋工程での茶葉温度の推移 (°C)

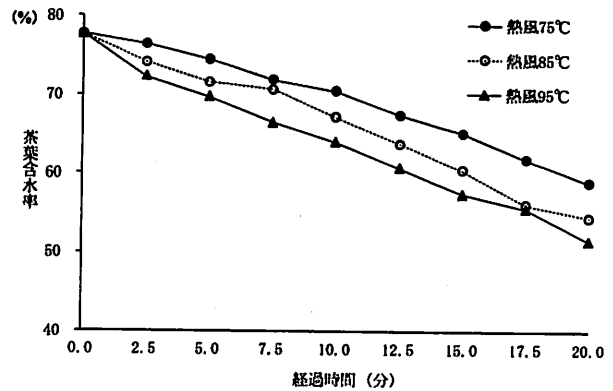


図 4-3 熱風温度の違いによる萎凋工程での茶葉含水率の推移 (%)

表 4-1 萎凋時の熱風温度が異なる未熟ミカン混合発酵茶の色調

	熱風温度		
	75°C	85°C	95°C
L*	37.7 ± 3.6	39.4 ± 0.8	37.1 ± 3.5
a*	11.61 ± 1.02 <sup>b</sup>	11.15 ± 0.43 <sup>b</sup>	5.81 ± 1.46 <sup>a</sup>
b*	46.3 ± 7.4	46.3 ± 1.9	34.9 ± 8.2

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

L\* : 明るさの指標。数値が大きいほど、色が明るいことを示す。

a\* : プラスの数値が大きいほど赤みが強く、マイナスの数値が大きいほど緑みが強い。

b\* : プラスの数値が大きいほど黄色みが強く、マイナスの数値が大きいほど青みが強い。

<sup>ab</sup> 異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

は、95°C 処理で低い傾向にあったが、温度の違いによる明確な影響は認められなかった。

### 3. 萎凋時の熱風温度が異なる未熟ミカン混合発酵茶のカテキン含量減少率、渋味推定値およびヘスペリジンの溶出率

萎凋時の茶葉への熱風温度が異なる未熟ミカン混合発酵茶のカテキン含量の減少率を図 4-4 に示す。また、渋味推定値およびヘスペリジンの溶出率をそれぞれ図 4-5 および図 4-6 に示す。カテキン含量の減少率は、75°C と 85°C 処理で、95°C 処理よりも有意に高かった。味認識装置による渋味推定値は、熱風温度に比例する傾向にあり、75°C および 85°C 処理で、95°C 処理に比べて有意に低値であった。ヘスペリジンの溶出率に熱風温度による影響は認められなかった。

### 4. 萎凋時の熱風温度やミカン未熟果のスライス方法が異なる未熟ミカン混合発酵茶に含まれる主要な香気成分

萎凋時の茶葉への熱風温度やミカン未熟果のスライス方法が異なる未熟ミカン混合発酵茶に含まれる主要な香気成分の、内部標準に対する相対ピーク面積を図 4-7 に示す。d-リモネン、2-ヘキセナール、オシメン異性体およびリナロール含量は、高い熱風温度ほど少ない傾向を示した。一方、機械でスライスしたミカン未熟果を素材とした 2014 年製造の未熟ミカン混合発酵茶を、未熟果を包丁でスライスした 2013 年産 (素材とした三番茶葉は、温度 26°C、湿度 55% で 24 時間静置して自然萎凋を行ったもの) と比較した場合、主要香気含量は 2014 年産で増加する傾向にあった。特に熱風温度 75°C で製造した 2014 年産の未熟ミカン混合発酵茶は、2013 年産に比べ、d-リモネン、2-ヘキセナールおよびオシメン異性体の香気含量は有意に高かった。リナロール含量に、スライス方法の違いによる顕著な影響は観察されなかった。

### 5. 萎凋時の熱風温度やミカン未熟果のスライス方法が異なる未熟ミカン混合発酵茶の pH およびクエン酸量



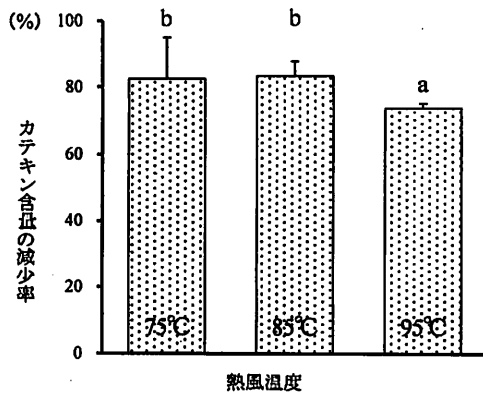


図 4-4 萎凋時の熱風温度が異なる未熟ミカン混合発酵茶のカテキン減少率  
 平均値 ± 標準偏差 (n=3)  
<sup>ab</sup>異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

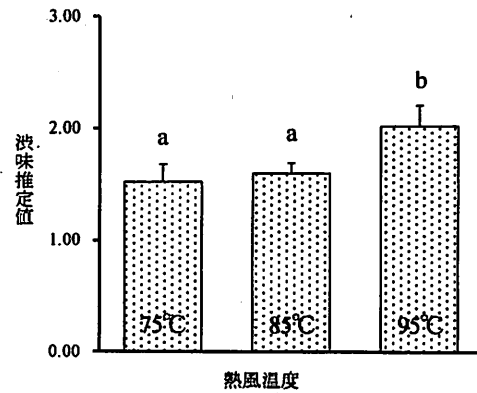


図 4-5 萎凋時の熱風温度が異なる未熟ミカン混合発酵茶の味認識装置による渋味推定値  
 平均値 ± 標準偏差 (n=3)  
<sup>ab</sup>異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

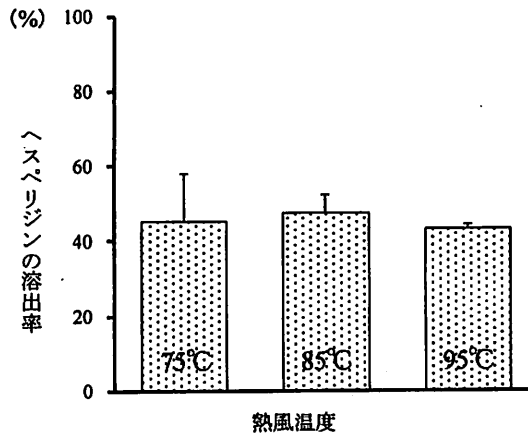


図 4-6 萎凋時の熱風温度が異なる未熟ミカン混合発酵茶のヘスペリジン溶出率  
 平均値 ± 標準偏差 (n=3)

萎凋時の熱風温度やミカン未熟果のスライス方法が異なる未熟ミカン混合発酵茶の pH およびクエン酸含量を図 4-8 に示す。pH およびクエン酸含量に、萎凋時の熱風温度による影響は認められなかった。ミカン未熟果のスライス方法が異なる 2013 年産と 2014 年産の未熟ミカン混合発酵茶を比較したとき、2014 年産のクエン酸含量は、2013 年産よりも多かった。75°C あるいは 85°C の熱風温度で製造した 2014 年産の発酵茶の pH は、2013 年産と比べ、有意に低値を示したが、大きな違いは認められなかった。

#### 6. 嗜好性に関するアンケート調査

萎凋時の茶葉への熱風温度が異なる未熟ミカン混合発酵茶の香味の嗜好性に関するアンケート調査結果を表 4-2 に示す。香りの嗜好性につい

て、熱風温度の違いによる明確な影響は観察されなかった。一方、風味について、50%以上の被験者が、95°C の熱風温度で製造した未熟ミカン混合発酵茶を、「嫌い」あるいは「やや嫌い」と回答した。「嫌い」あるいは「やや嫌い」と回答した被験者の割合は、85°C 処理で、30%程度にまで減少し、75°C 処理では 20%未満になった。そのため、萎凋時の茶葉への熱風温度が低いほど、嗜好性は高い傾向が観察された。

#### 考察

発酵茶の製造において重要なことは、茶葉に含まれるカテキン類を効率よく酸化させることである。発酵茶製造の場合、まず、茶葉の萎凋を行う。萎凋は、茶葉を萎れさせて柔らかくする

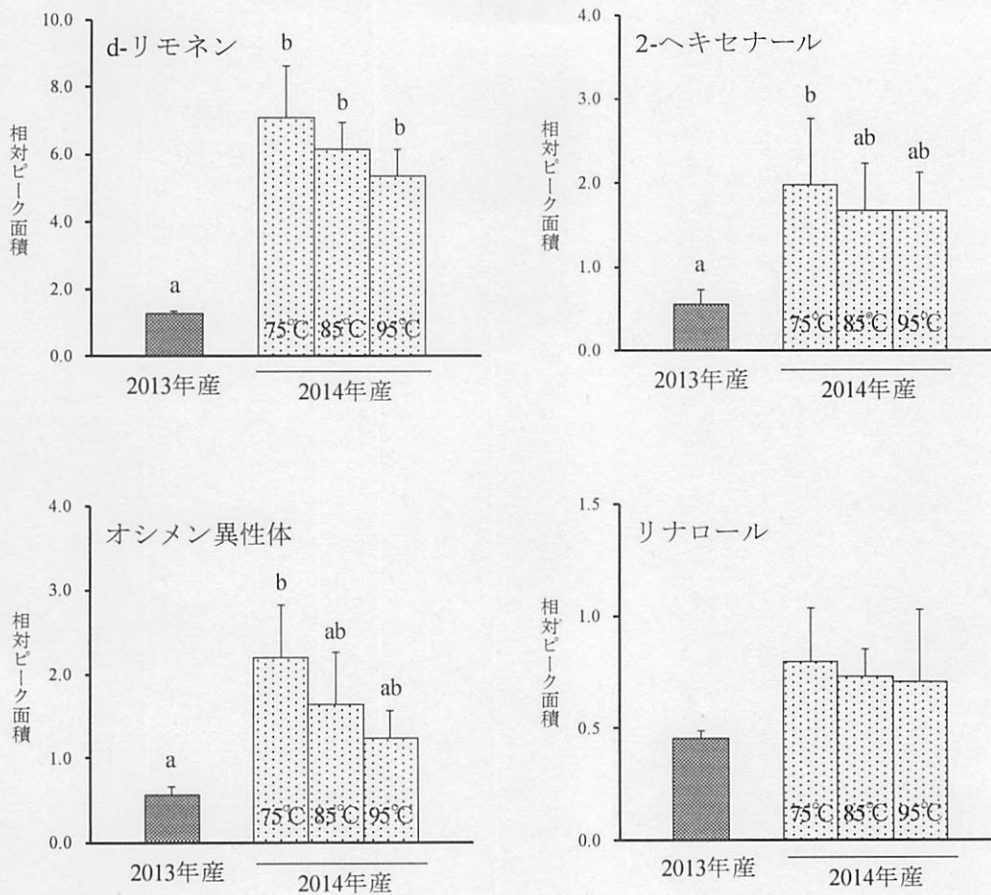


図 4-7 萎凋時の熱風温度やミカン未熟果のスライス方法が異なる未熟ミカン混合発酵茶に含まれる主要な香気成分

左上 (d-リモネン) 右上 (2-ヘキセナル) 左下 (オシメン異性体) 右下 (リナロール)

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

<sup>a,b</sup> Tukey-Kramer の検定により, 異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

2013年産: 萎凋工程において, 茶葉を温度 26°C, 湿度 55%で 24 時間静置して, 包丁でスライスしたミカン未熟果を混合して製造した未熟ミカン混合発酵茶

2014年産: 萎凋工程において, 茶葉に 75, 85 あるいは 95°C の熱風を 20 分間あて, 機械でスライスしたミカン未熟果を混合して製造した未熟ミカン混合発酵茶

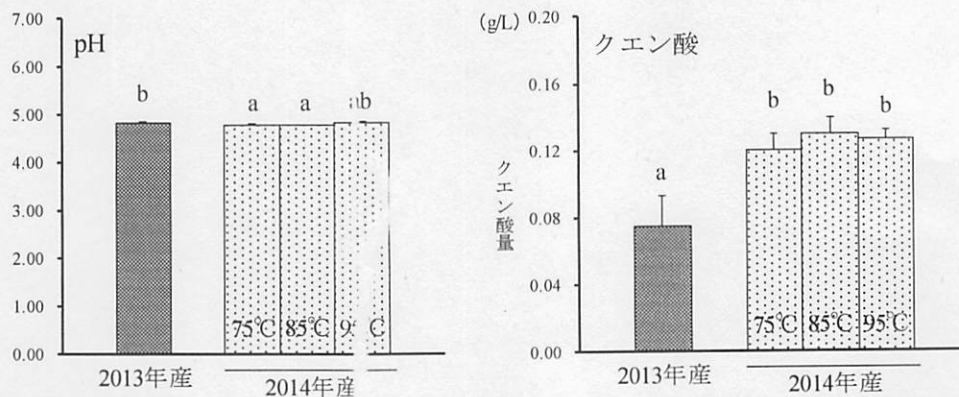


図 4-8 萎凋時の熱風温度やミカン未熟果のスライス方法が異なる未熟ミカン混合発酵茶の pH (左) およびクエン酸量 (右)

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

<sup>a,b</sup> Tukey-Kramer の検定により, 異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

2013年産: 萎凋工程において, 茶葉を温度 26°C, 湿度 55%で 24 時間静置して, 包丁でスライスしたミカン未熟果を混合して製造した未熟ミカン混合発酵茶

2014年産: 萎凋工程において, 茶葉に 75, 85 あるいは 95°C の熱風を 20 分間あて, 機械でスライスしたミカン未熟果を混合して製造した未熟ミカン混合発酵茶

表4-2 萎凋時の熱風温度が異なるサンプルの嗜好性官能結果

①のサンプルの香りは?	好き：5.7%， やや好き：25.7%， どちらとも言えない：60.0%， やや嫌い：8.6%， 嫌い：0.0%
②のサンプルの香りは?	好き：14.3%， やや好き：22.9%， どちらとも言えない：54.3%， やや嫌い：8.6%， 嫌い：0.0%
③のサンプルの香りは?	好き：5.7%， やや好き：22.9%， どちらとも言えない：60.0%， やや嫌い：11.4%， 嫌い：0.0%
①のサンプルの風味は?	好き：11.4%， やや好き：28.6%， どちらとも言えない：42.9%， やや嫌い：17.1%， 嫌い：0.0%
②のサンプルの風味は?	好き：2.9%， やや好き：17.1%， どちらとも言えない：51.4%， やや嫌い：17.1%， 嫌い：11.4%
③のサンプルの風味は?	好き：0.0%， やや好き：14.3%， どちらとも言えない：31.4%， やや嫌い：42.9%， 嫌い：11.4%

①：萎凋工程において、75°Cの熱風を20分間三番茶葉に当てて製造した未熟ミカン混合発酵茶

②：萎凋工程において、85°Cの熱風を20分間三番茶葉に当てて製造した未熟ミカン混合発酵茶

③：萎凋工程において、95°Cの熱風を20分間三番茶葉に当てて製造した未熟ミカン混合発酵茶

ことで、次の揉捻工程で茶葉を揉みやすくするとともに、茶葉に含まれるポリフェノール酸化酵素を活性化させる。萎凋には萎凋機を使用する人工萎凋と萎凋機を使用しない自然萎凋があり、紅茶の製造が盛んな国の主流は人工萎凋である。一方、紅茶製造がそれほど盛んでないわが国では、萎凋機の普及は十分でない。人工萎凋の場合、その工程時間は6から8時間であるが、自然萎凋には24時間程度を要するため、従来の紅茶製造と同様の方法で品質の高い未熟ミカン混合発酵茶を製造すると、長い工程時間を必要とする。そこで、粗揉機を利用する方法を検討した。本来粗揉機は、蒸した茶葉に熱風を当て、攪拌させながら効率よく乾燥させる緑茶の製茶機械である。ピワ葉混合発酵茶の開発に関する研究では、粗揉機を用いて茶葉の温度を40°C程度に保ちながら、三番茶葉に70°Cの熱風を当てて茶葉を萎凋させると、カテキン類の酸化が促進され、味、香りなどの品質の優れた発酵茶葉が製造できることが明らかにされている<sup>11)</sup>。そこで、短時間で品質の高い未熟ミカン混合発酵茶葉の製造が可能な技術を確立することを目的に、粗揉機を用いる萎凋法を検討した。

まず、三番茶葉に含まれるポリフェノール酸化酵素が失活しないように、蒸熱処理を施していない三番茶葉について、萎凋時の熱風温度の違いと茶葉の温度との関連について検討した。熱風温度75°Cの場合、20分間の処理で、茶葉の温度は40°C未満に保持された(図4-2)。また、85°Cの熱風温度で処理した場合、12.5分頃まで茶葉の温度は大きく上昇せず、40°C程度の温度を保っていた。

一方で、熱風温度が95°Cの場合、粗揉機への茶葉投入7.5分以降から茶葉の温度は上昇を続けた。萎凋工程の開始時は、茶葉に含まれる水分が蒸散することで、茶葉の温度上昇が抑制されるが、萎凋が進むことで蒸散量が次第に少なくなり、蒸散による冷却効率も低下するため、熱風温度が高いほど茶葉の温度が早く上昇しやすくなると推察される。熱風温度95°Cの場合、20分後の茶葉の温度は50°C以上となった。通常の紅茶葉製造において、萎凋を行う場合の茶葉の温度が40°Cを超えるとポリフェノール酸化酵素の活性が低下し、カテキン類の酸化も抑制されることが報告されている<sup>83) 89)</sup>。しかし、熱風温度が85°Cの場合、20分後の茶葉の温度は45°C以上となるが、カテキン類の減少率は、75°C処理と同程度であった。茶葉の温度が40°Cを超えても、ポリフェノール酸化酵素活性が保持された要因について明らかでないが、萎凋工程において、75°Cから95°Cの範囲で三番茶葉に熱風を当てた場合、熱風温度が85°C以下であれば、茶葉の温度が大きく上昇しないことで、ポリフェノール酸化酵素の活性が保たれ、次の揉捻工程でカテキン類の酸化が効率よく行われたと推察される。熱風温度75°Cおよび85°Cで20分間萎凋した三番茶葉から製造した未熟ミカン混合発酵茶は、熱風温度95°Cで萎凋したものと比較し、総カテキンの減少率が1割程度大きい(図4-4)。そのため、味認識装置による渋味推定値は、75°Cあるいは85°C処理と比較し、95°C処理で高値を示した(図4-5)。それにとまって、味の嗜好性も熱風温度が95°Cの場合、低下する傾向にあった(表4-2)。

また、熱風温度 75°C と 85°C 処理で抽出液の色調に差はなかったが、95°C で萎凋した茶葉を用いて製造すると、赤みは弱くなった（表 4-1）。したがって、熱風温度 75°C あるいは 85°C の萎凋処理は、95°C 処理と比較し、カテキン類の酸化を大きく促進し、紅茶ポリフェノール類の生成量が多いことが示唆された。

未熟ミカン混合発酵茶の香気含量に、萎凋時の熱風温度は顕著な影響を及ぼさず、嗜好性と温度による関連も明確ではなかったが、熱風温度が高いほど、香気含量は減少する傾向にあった（図 4-7）。これは、熱風温度が高いほど、香気成分が多く揮散したためと考えられる。一方、機械でスライスしたミカン未熟果を素材として未熟ミカン混合発酵茶を製造すると、未熟果を包丁でスライスした発酵茶と比べ、d-リモネン、2-ヘキセナールおよびオシメン異性体の香気含量は増加した（図 4-7）。カンキツ類の香りの大部分は、果皮の油胞に含まれているが、スライスすることで、油胞が破壊され香気成分が増加することが推察される。比較した 2013 年産の未熟ミカン混合発酵茶は、スライス方法のみならず、萎凋工程も異なるが、萎凋方法の違いで香気成分が顕著に増加するとは考えにくい。そのため、機械を用いてより細かくスライスすることで、これら香気成分が増加したと考えられる。また、未熟ミカン混合発酵茶に含まれるクエン酸含量も、機械の使用で増加し、それに反比例して pH が下がっていることから（図 4-8）、ミカン未熟果由来の酸味成分も溶出しやすくなるといえる。今回、ミカン未熟果のスライスに要する時間やコスト分析は行っていないが、機器による処理は、人為的コストを大幅に省略できるとともに、最終製品の品質のバラツキを抑え、企業との連携や技術移転も可能となる。これらのことから、三番茶葉を粗揉機により萎凋する場合、カテキン類の減少率が高く、また、主要香気含量が最も多く、味の嗜好性も高い 75°C の熱風処理が最適と考えられた。また、機械を用いてスライスしたミカン未熟果を、熱風温度 75°C で萎凋した茶葉と混合揉捻することで、製造した未熟ミカン混合発酵茶に含まれる主要な香気成分が増加することが示された。

粗揉機、揉捻機およびスライス機械を用いた未熟ミカン混合発酵茶の製造法は、萎凋時間や揉捻時間の短縮を可能とし、また、ミカン未熟果のスライスに要する時間や手間を大幅に省略できることで、国内で製造する紅茶葉製造と比較し、製造コストの削減に繋がると考えられる。

## 第5章

## 異なる食餌条件が未熟ミカン混合発酵茶のラット脂質代謝に及ぼす影響

## 緒言

第2章で、ミカン未熟果と三番茶葉を混合して製造した新規発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性を高める製造条件を決定し、第3章において、その香味特性を明らかにした。また、前章において、カテキン類の酸化効率を高め、未熟ミカン混合発酵茶の香りを向上させるための製造条件を追究した。

近年、我が国の肥満者の割合が増加している。肥満は主に過食や運動不足によって起こり、多くの疾病の原因になる。肥満が原因で起こる疾病の代表的なものに、動脈硬化による脳血管疾患、心疾患などがあり、日本人の死因の上位を占める<sup>85)</sup>。これらの疾病やその発端となる肥満の予防のために、健全な食生活や定期的な運動が必要であるものの、時間的制約の大きい現代社会において、これらを継続することは容易でない。世界で最も早く超高齢社会に突入したわが国において、医療費の増大による国民の社会的負担は非常に大きい。そのため、直接的な治療よりもその予防に重点を置いた施策への転換および醸成が重要になっており、食品に含まれる栄養・機能性成分に対する国民の興味は増加している。最近、消費者庁において現行の機能性表示制度が見直され、特定保健用食品や栄養機能食品以外の一般食品についても、機能性のエビデンスが確立されているものは、企業体の責任において、新たな機能性表示が可能となっている。そのため、機能性を有する食品素材に対する需要は、これからますます増えるものと予想される。

これまでに開発されたピワ葉混合発酵茶やツバキ葉混合発酵茶は、ヒトにおいて、米飯と同時に摂取することで、緑茶摂取よりも、食後の血糖値上昇が抑制されることが観察されている<sup>79) 120)</sup>。さらに、これら混合発酵茶の摂取で、体脂肪の減少や中性脂肪低下作用を有することが動物実験やヒトで観察されている<sup>40) 61) 120)</sup>。このような作用は、混合発酵茶に含まれる紅茶ポリフェノール類により一部惹起されることが示唆されている<sup>40) 61)</sup>。Miyataら<sup>40)</sup>は、ピワ葉混合発酵茶から分離したテアフラビン類、テアシネンシン類およびテアルビジン類をそれぞれSDラットの飼料内に直接投入し、その直後に油脂を投与して、血清トリグリセリド濃度の経時変化を測定したところ、テアフラビン類、テアシネンシン A およびテアルビジン類は、油脂投与後の血中トリグリセリド濃度の上昇を効果的に抑制することを明らかにしている。また、0.2%のテアフラビン類、テアシネ

ンシン A あるいはテアルビジン類を含む 25% の高脂肪食を SD ラットに 4 週間自由摂食させると、テアシネンシン A が肝臓トリグリセリド濃度を有意に低下させることを観察しており、これは糞中への脂肪酸排泄の増加と肝臓での脂肪合成抑制により発揮される可能性を示唆した<sup>40)</sup>。さらに、肝臓コレステロール濃度は、これら紅茶ポリフェノール摂取で有意に低下し、この効果は糞中へのステロイド排泄の増加により一部誘導されると推察している<sup>39)</sup>。このように、テアフラビン類、テアシネンシン A およびテアルビジン類は、脂質代謝改善作用を有することが報告されている。未熟ミカン混合発酵茶は、これら紅茶ポリフェノール類を含んでおり、カテキン類やミカン未熟果由来のヘスペリジンも本発酵茶に含まれる。そのため、未熟ミカン混合発酵茶は、ピワ葉混合発酵茶やツバキ葉混合発酵茶同様に、脂質代謝改善効果をはじめとする機能性を有する可能性がある。そこで、栄養学的観点から、未熟ミカン混合発酵茶の食品としての有用性を更に見出すことを目的として研究を進めた。

本章では、未熟ミカン混合発酵茶の摂取期間、基本食組成ならびに食餌への添加量の違いが、ラットの脂質代謝に及ぼす影響を検討することを目的として、実験を行った。

## 材料および方法

## 1. 実験飼料

未熟ミカン混合発酵茶葉は、ミカン未熟果と三番茶葉を 1:3 の比率で混合し、揉捻時間 20 分、酸化時間 0 時間で製造したものをを用いた。茶葉 20 g に 1 L の熱水を加えて得られた抽出物を、棚式真空凍結乾燥機 (FD-550R, 東京理化学器械株式会社, 東京) を用いて 4 日間、凍結乾燥し、粉末にしたものを飼料とした。

## 2. 実験動物および飼料

動物は 4 週齢の SD 雄ラット (日本クレア株式会社, 東京) をを用いた。ラットを温度  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクル (明期: 8 時から 20 時) に設定した長崎県立大学シーボルト校 (長崎県長与町) の動物飼育室内で飼育した。ラットを馴化させるために、MF 固形飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) および蒸留水を自由摂食させ、7 日間の予備飼育を行った。予備飼育終了後、ラットの体重に群間で差がないように、8 群に群分けした。群分けしたラットに、AIN-76 組成コントロール群、未熟ミカン混合発

酵茶添加群 (0.50%, 0.75%, 1.0%) および AIN-93G 組成コントロール群, 未熟ミカン混合発酵茶添加群 (0.50%, 0.75%, 1.0%) の各試験食および蒸留水を自由に 28 日間摂取させた。食餌は, AIN-76 あるいは AIN-93G 組成に基づく純化食をそれぞれコントロール食とした。AIN-76 組成のコントロール食 (g/kg) は, カゼイン 200, コーン油 50, コーンスターチ 150, セルロース 50, ミネラル混合 35, ビタミン混合 10, DL-メチオニン 3, 重酒石酸コリン 2 およびショ糖 500 を含む。コントロール食に, 未熟ミカン混合発酵茶葉熱水抽出物の凍結乾燥粉末を, 食餌総重量の 0.50%, 0.75%, 1.0% になるように添加した食餌を発酵茶添加食とし, 全量をショ糖で調整した。AIN-93G 組成のコントロール食 (g/kg) は, カゼイン 200, 大豆油 70,  $\alpha$ -コーンスターチ 132, ショ糖 100, セルロース 50, ミネラル混合 35, ビタミン混合 10,  $\mu$ -ブチルヒドロキノン 0.014, 重酒石酸コリン 5, L-シスチン 6 および  $\beta$ -コーンスターチ 397.49 を含む。AIN-76 組成に基づく食餌同様, コントロール食に凍結乾燥粉末を食餌総重量の 0.50%, 0.75%, 1.0% になるように添加した食餌を発酵茶添加食とし, 全量を  $\beta$ -コーンスターチで調整した。各群あたりのラットの数は 3 匹とした。

飼育期間中, 体重および摂食量を測定し, 摂食開始後 1, 2 および 3 週間目に非絶食下で尾静脈から血液を採取した。1 および 2 週間目は 13 時頃, 3 週目は 10 時頃に採血を行った。4 週間の飼育終了後, 6 時間絶食し, 断頭屠殺後, 血液を採取した。採取した血液は, 室温にて放置後, 4°C, 1,200 × g (3,000 rpm) で 20 分間遠心し, 上清を採取した。血清は, 各分析に供するまで -20°C で保存した。肝臓, 白色脂肪組織 (腎臓, 睪丸および腸間膜周辺脂肪組織) および褐色脂肪組織を摘出し, それぞれの重量を測定した。肝臓は, 液体窒素で瞬間凍結後, 分析に供するまで -80°C で保存した。なお, 本研究は, 「長崎県立大学動物実験指針」ならびに「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月総理府告示第 6 号) に則って実施した。

### 3. 血清トリグリセリドおよびコレステロール濃度の測定

血清トリグリセリド濃度の測定は, トリグリセライド E-テストワコー (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた。血清コレステロール濃度は, コレステロール E-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。

### 4. 肝臓トリグリセリド, コレステロールおよびリン脂質濃度の測定

肝臓の総脂質は, Folch ら<sup>9)</sup>の方法により抽出純化した後, 一定量のヘキサンに溶解させた。こ

の脂質抽出液について, イソプロピルアルコールに再溶解させ, トリグリセリドおよびコレステロール濃度を上述のキットを用いて測定した。肝臓リン脂質濃度は, リン脂質 C テストワコー (和光純薬工業株式会社) で測定した。

### 5. 統計処理

本実験は, ラット脂質代謝に及ぼす未熟ミカン混合発酵茶の食餌条件を検討するための予備的実験であり, ラットの数は, 各群それぞれ 3 匹であることから, 統計処理は行わなかった。

## 結果

### 1. 体重, 摂食量および臓器重量

AIN-76 組成に基づく食餌を 4 週間摂取したラットの体重, 摂食量, 肝臓重量, 白色脂肪組織重量および褐色脂肪組織重量を表 5-1 に示す。終体重は, コントロール群と比較し, 0.75 および 1.0% 発酵茶添加群で低い傾向にあった。摂食量に各群間で差はなかった。肝臓重量は, 発酵茶添加群において濃度依存的に低かった。白色脂肪組織重量は, コントロール群よりも, 発酵茶添加群で低く, 0.75% 発酵茶添加群で最も低値を示した。発酵茶添加量の違いは, 褐色脂肪組織重量に影響しなかった。

AIN-93G 組成に基づく食餌を 4 週間摂取したラットの体重, 摂食量, 肝臓重量, 白色脂肪組織重量および褐色脂肪組織重量を表 5-2 に示す。終体重は, コントロール群と比べ, 0.50% 発酵茶添加群で増加する傾向にあったが, 0.75% および 1.0% 添加群ではやや低下した。摂食量は, コントロール群よりも, 0.75 および 1.0% 発酵茶添加群でやや低い傾向にあった。肝臓重量は, コントロール群と比較し, 発酵茶添加群で低い傾向を示した。白色脂肪組織重量は, コントロール群と比較して 0.75% および 1.0% 発酵茶添加群で低値を示した。褐色脂肪組織重量に, 発酵茶添加量の違いによる影響は認められなかった。

### 2. 血清トリグリセリド濃度の推移

AIN-76 組成に基づいた食餌を, 4 週間にわたって摂取したラットの血清トリグリセリド濃度の推移を図 5-1 (左) に示す。摂食開始 1 週間目で, 発酵茶添加群のトリグリセリド濃度は, コントロール群よりも低い傾向を示し, 特に 0.75% 添加群で, コントロール群の 3 分の 1 以下であった。摂食開始 1 から 2 週間目にかけて, すべての群でトリグリセリド濃度の増加が観察された。2 週間目において, トリグリセリド濃度はコントロール群よりも, 0.75 および 1.0% 発酵茶添加群で低い傾向を示し, コントロール群と 0.50% 発酵茶添加群に大きな差はなかった。3 週間目のトリグリセリド濃度は, すべての群において, 前週よりも低下

表5-1 AIN-76組成を基本食とした場合の体重, 摂食量, 肝臓重量および脂肪組織重量 (摂食4週間後)

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群		
		0.50%	0.75%	1.0%
初体重 (g)	147 ± 4	146 ± 3	147 ± 3	145 ± 4
終体重 (g)	381 ± 16	372 ± 9	355 ± 25	362 ± 8
摂食量 (g/日)	24.4 ± 1.5	24.4 ± 0.5	24.5 ± 0.2	24.1 ± 0.1
肝臓重量 (g/100 g体重)	5.27 ± 0.09	5.19 ± 0.23	4.94 ± 0.25	4.61 ± 0.08
白色脂肪組織重量(g/100 g体重)				
腎周辺	1.80 ± 0.22	1.74 ± 0.25	1.31 ± 0.44	1.45 ± 0.18
辜丸周辺	1.34 ± 0.15	1.18 ± 0.13	0.95 ± 0.17	1.11 ± 0.01
腸間膜周辺	0.82 ± 0.11	0.85 ± 0.07	0.62 ± 0.08	0.85 ± 0.03
合計	3.95 ± 0.46	3.77 ± 0.38	2.88 ± 0.69	3.41 ± 0.16
褐色脂肪組織重量 (g/100 g体重)	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.02

平均値 ± 標準誤差 (n=3)

表5-2 AIN-93G組成を基本食とした場合の体重, 摂食量, 肝臓重量および脂肪組織重量 (摂食4週間後)

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群		
		0.50%	0.75%	1.0%
初体重 (g)	146 ± 4	146 ± 4	146 ± 3	146 ± 3
終体重 (g)	377 ± 16	385 ± 26	368 ± 8	364 ± 12
摂食量 (g/日)	26.3 ± 0.5	26.5 ± 1.1	24.9 ± 0.4	24.1 ± 1.1
肝臓重量 (g/100 g体重)	5.00 ± 0.13	4.68 ± 0.36	4.75 ± 0.05	4.31 ± 0.11
白色脂肪組織重量 (g/100 g体重)				
腎周辺	1.74 ± 0.56	1.81 ± 0.29	1.06 ± 0.21	1.10 ± 0.18
辜丸周辺	1.14 ± 0.31	1.16 ± 0.16	0.94 ± 0.03	0.96 ± 0.02
腸間膜周辺	0.82 ± 0.13	1.07 ± 0.19	0.70 ± 0.12	0.80 ± 0.15
合計	3.70 ± 1.00	4.05 ± 0.63	2.70 ± 0.36	2.86 ± 0.33
褐色脂肪組織重量 (g/100 g体重)	0.18 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.01

平均値 ± 標準誤差 (n=3)

する傾向にあった。3週間目の0.50および0.75%発酵茶添加群のトリグリセリド濃度は、コントロール群よりも低値を示したが、コントロール群と1.0%発酵茶添加群に差は観察されなかった。絶食下で採血した4週間目のトリグリセリド濃度は、発酵茶の添加量が多いほど、低値を示した。

AIN-93G組成に基づいた食餌を、4週間にわたって摂取したラットの血清トリグリセリド濃度の推移を図5-1(右)に示す。摂食開始1週間目で、発酵茶添加群のトリグリセリド濃度は、コントロール群よりも濃度依存的に低い傾向にあり、特に1.0%添加群で、コントロール群の3分の1以下であった。摂食開始1から2週間目にかけて、すべての群でトリグリセリド濃度の増加が観察された。2週間目のトリグリセリド濃度は、コントロール群よりも、発酵茶添加群で濃度依存的に低い傾向にあったが、0.75%添加群と1.0%添加群の差は明確でなかった。3週間目のトリグリセリド濃度は、すべての群において、前週よりも低下する傾向にあった。3週間目の発酵茶添加群のト

リグリセリド濃度は、コントロール群よりも高値を示した。絶食下で採血した4週間目のトリグリセリド濃度は、発酵茶添加量に依存して低値だった。

### 3. 血清コレステロール濃度の推移

AIN-76組成に基づいた食餌を、4週間にわたって摂取したラットの血清コレステロール濃度の推移を図5-2(左)に示す。摂食開始1週間目の発酵茶添加群のコレステロール濃度は、コントロール群よりも、濃度依存的に高い傾向にあった。摂食開始1から2週間目にかけて、すべての群で、コレステロール濃度は増加したが、2週間目以降、コレステロール濃度に大きな変動は観察されなかった。2週間目のコレステロール濃度は、コントロール群よりも、1.0%発酵茶添加群で高い傾向にあり、0.50および0.75%発酵茶添加群で低い傾向を示した。3週間目のコレステロール濃度は、コントロール群よりも、0.50%発酵茶添加群で高く、0.75および1.0%発酵茶添加群で低かった。絶食下で採血した4週間目のコレステロール



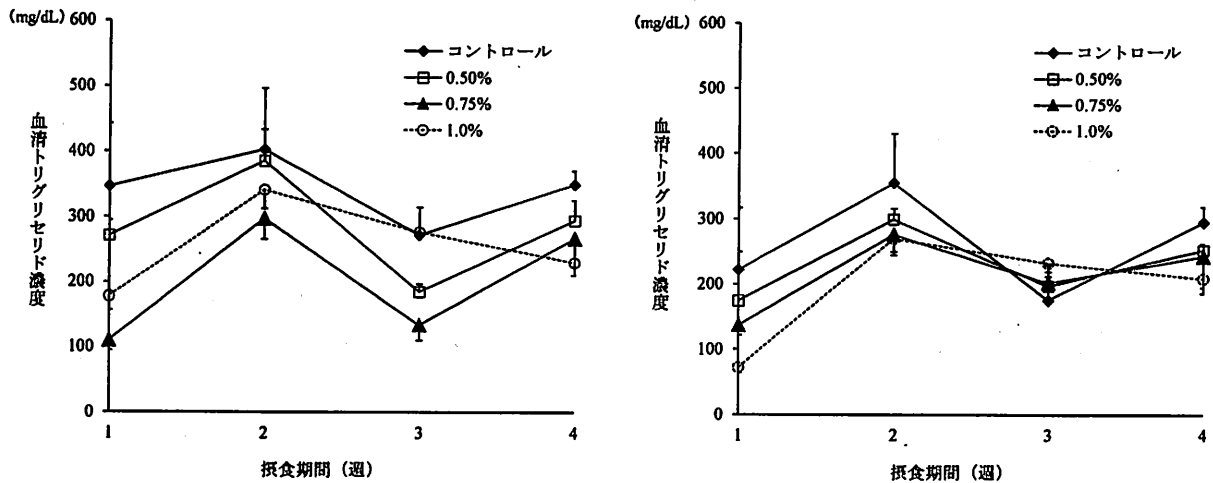


図 5-1 AIN-76 組成 (左) あるいは AIN-93G 組成 (右) を基本食とした場合の血清トリグリセリド濃度の推移 (mg/dL)

平均値 ± 標準誤差 (n=3)

0.50% : 0.50%未熟ミカン混合発酵茶添加群

0.75% : 0.75%未熟ミカン混合発酵茶添加群

1.0% : 1.0%未熟ミカン混合発酵茶添加群

濃度は、コントロール群と比べ、0.50 および 1.0% 発酵茶添加群で高値を示したが、コントロール群と 0.75% 発酵茶添加群の間に、差は観察されなかった。

AIN-93G 組成に基づいた食餌を、4 週間にわたって摂取したラットの血清コレステロール濃度の推移を図 5-2 (右) に示す。摂食開始 1 週間目のコレステロール濃度は、コントロール群と比較し、1.0% 発酵茶添加群で低値を示したが、コントロール群と 0.50 および 0.75% 発酵茶添加群の差は明確でなかった。摂食開始 1 から 2 週間目にかけて、すべての群で、コレステロール濃度は増加したが、2 週間目以降、コレステロール濃度に大きな変動は観察されなかった。2 週間目のコレステロール濃度は、コントロール群よりも、0.75 および 1.0% 発酵茶添加群で高い傾向にあり、0.50% 発酵茶添加群で低い傾向を示した。3 週間目のコレステロール濃度に、各群間で明確な差は観察されなかった。絶食下で採血した 4 週間目のコレステロール濃度は、コントロール群と比べ、0.50 および 0.75% 発酵茶添加群で高値を示したが、コントロール群と 1.0% 発酵茶添加群の間に差はほとんど観察されなかった。

#### 4. 肝臓トリグリセリド、コレステロールおよびリン脂質濃度

4 週間摂食後の肝臓脂質濃度を表 5-3 に示す。AIN-76 組成食において、トリグリセリド濃度は、発酵茶添加群で濃度依存的に低く、0.75% 以上の添加量で、コントロール群の 2 分の 1 以下であった。コレステロール濃度は、コントロール群と比

較し、発酵茶添加群で低値を示した。リン脂質濃度に、各群間で差は認められなかった。AIN-93G 組成食において、トリグリセリド濃度は、発酵茶添加群で濃度依存的に低値だった。コレステロール濃度は、コントロール群よりも、発酵茶添加群でやや低い傾向にあった。リン脂質濃度は、発酵茶添加群でやや高い傾向を示した。

#### 考察

開発した未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンの、水やエタノールへの溶解性が向上することを第 2 章で明らかにした。その結果、生体内において、発酵茶に含まれるヘスペリジンの腸管からの吸収性が高まり、通常のヘスペリジンよりも、有する機能性がより発揮されやすくなることが期待できる。しかし、未熟ミカン混合発酵茶はヘスペリジン以外にも、カテキン類や紅茶ポリフェノール類などの脂質代謝改善作用を有する成分を含んでいる。仮に未熟ミカン混合発酵茶の摂取で機能が発揮されたとしても、それがヘスペリジンの効果であるか、ヘスペリジンの吸収性が向上したことによるものなのかを証明することは不可能であると考えられる。したがって、発酵茶そのものの作用として機能評価を行うこととした。本章では、未熟ミカン混合発酵茶の摂取によって、脂質代謝改善効果を発現する飼育条件を設定することを目的に、基本食の組成や添加量、摂取期間の違いが、発酵茶の機能発現にどのように影響するかを検討した。本実験は、脂質代謝改善作用を検討する予備的実験であるため、ラット



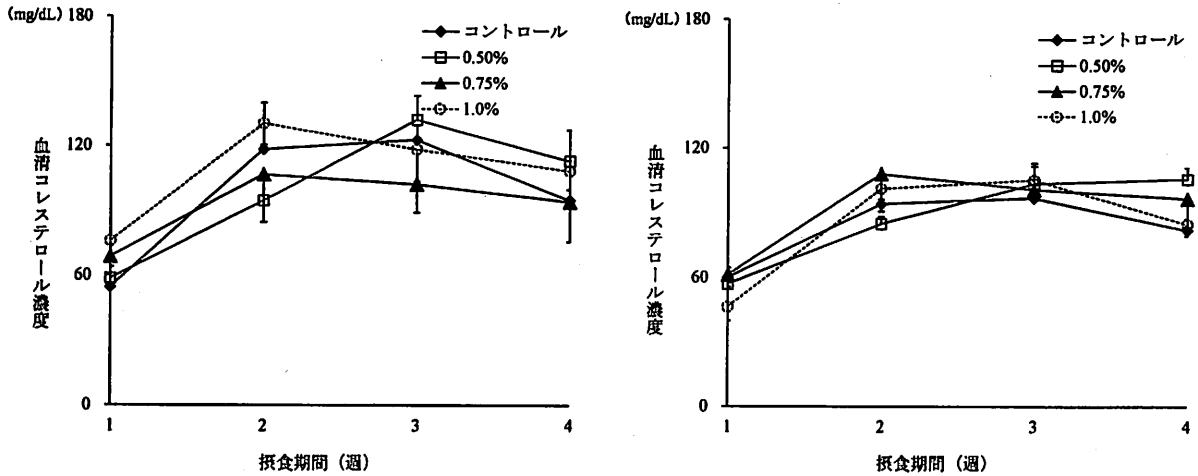


図 5-2 AIN-76 組成 (左) あるいは AIN-93G 組成 (右) を基本食とした場合の血清コレステロール濃度の推移 (mg/dL)

平均値 ± 標準誤差 (n=3)

0.50% : 0.50%未熟ミカン混合発酵茶添加群

0.75% : 0.75%未熟ミカン混合発酵茶添加群

1.0% : 1.0%未熟ミカン混合発酵茶添加群

表5-3 AIN-76組成あるいはAIN-93G組成を基本食とした場合の肝臓脂質濃度 (mg/g liver) (摂食4週間後)

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群		
		0.50%	0.75%	1.0%
<b>AIN-76</b>				
トリグリセリド	71.6 ± 35.1	36.3 ± 7.5	28.7 ± 6.0	24.0 ± 1.8
コレステロール	4.39 ± 1.61	2.76 ± 0.38	3.04 ± 0.35	2.55 ± 0.08
リン脂質	14.5 ± 1.4	14.5 ± 0.4	14.7 ± 0.5	17.3 ± 1.1
<b>AIN-93G</b>				
トリグリセリド	35.9 ± 9.1	31.4 ± 6.2	29.0 ± 7.0	26.0 ± 6.7
コレステロール	3.47 ± 0.39	2.94 ± 0.23	3.26 ± 0.40	2.92 ± 0.36
リン脂質	14.9 ± 1.7	15.2 ± 1.3	16.4 ± 0.5	16.6 ± 1.3

平均値 ± 標準誤差 (n=3)

の数は各群 3 匹とし、統計処理は行わなかった。

実験動物は、成長期の Sprague-Dawley 雄ラットを用いた。成長期のマウスやラットの摂食実験は主に、米国国立栄養研究所 (American Institute of Nutrition, AIN) が発表した AIN-76 組成あるいは AIN-93G 組成に基づいた飼料組成で多くの実験が行われている。AIN-76 組成はスクロース主体の食餌であるのに対し、AIN-93G 組成は AIN-76 組成を改良したもので、β コーンスターチが主体である。本研究においても、世界的なコンセンサスが得られている AIN 組成を用いることとした。これまでに製造されたピロ葉混合発酵茶やツバキ葉混合発酵茶のラット摂食実験において、飼

料への添加量は 1.0% を中心に、0.50 から 1.5% で実施している<sup>60) 61)</sup>。本実験においても、未熟ミカン混合発酵茶の添加量は 0.50 から 1.0% として評価を行った。

AIN-76 組成において、飼育 4 週間の摂食量に、添加量の違いで大きな差はなかったが、0.75 および 1.0% 発酵茶添加で、体重増加が抑えられる傾向にあり、白色脂肪組織重量も発酵茶添加で、コントロール群よりも低い傾向にあった (表 5-1)。したがって、白色脂肪組織重量の低下が体重増加抑制に一部起因したと推察される。しかし、0.75% 発酵茶添加で最も強い低下効果が観察されたため、必ずしも添加量依存的ではなかった。肝臓ト

リグリセリドおよびコレステロール濃度は、発酵茶添加で低値を示したことから(表 5-3), AIN-76 組成において、未熟ミカン混合発酵茶は脂質代謝改善作用を有する可能性が示唆された。肝臓トリグリセリド濃度は、発酵茶の添加量依存的に低い傾向にあったが、0.75 および 1.0%発酵茶添加群の間に、大きな差はなかった(表 5-3)。したがって、肝臓脂質濃度低下作用は、0.75%以上の未熟ミカン混合発酵茶添加で発揮されるようである。

AIN-93G 組成において、0.75 および 1.0%の発酵茶添加で、摂食量がやや低下する傾向にあった(表 5-2)。体重増加は、発酵茶 0.75%以上の添加で抑えられる傾向が観察され、白色脂肪組織重量も 0.75 および 1.0%発酵茶添加により低値を示した(表 5-2)。このことから、発酵茶摂取による体重増加の抑制は、AIN-76 組成の食餌摂取同様、白色脂肪組織重量増加を抑制することにより一部発揮されると考えられる。0.50%の発酵茶添加で、白色脂肪組織重量に対する影響は観察されず、効果を発揮する発酵茶添加量は 0.75%以上であるとみなされた。肝臓トリグリセリドおよびコレステロール濃度は、未熟ミカン混合発酵茶摂取により低値を示し、特に肝臓トリグリセリド濃度は発酵茶の添加量依存的に低い値であった。そのため、AIN-93G 組成においても、未熟ミカン混合発酵茶は脂質代謝改善作用を発揮すると考えられる。

AIN-76 組成、AIN-93G 組成ともに、1 から 4 週間にわたって、未熟ミカン混合発酵茶摂取ラットは、コントロール食餌摂取ラットよりも、血清トリグリセリド濃度の増加を抑制する傾向が観察された(図 5-1)。一方で血清コレステロール濃度に対する未熟ミカン混合発酵茶摂取の影響は判然としなかった(図 5-2)。血清トリグリセリド濃度低下作用は、摂食開始 1 週間目から発揮されたが、AIN-76 組成の場合、血清トリグリセリド濃度と発酵茶の添加量の関係は、4 週間目を除き、明確でなかった。一方、AIN-93G 組成において、摂食 3 週間目を除き、発酵茶の添加量依存的にトリグリセリド濃度は低値であった。いずれの組成においても、摂食開始 3 週目のみ、すべての群で血清トリグリセリド濃度は前週よりも低下したが、これは 1 週目および 2 週目と異なり、3 週目の採血時間が午前中であったことによるかもしれない。絶食下で屠殺・採血した 4 週目においても、未熟ミカン混合発酵茶の摂取で、コントロール群よりも、血清トリグリセリド濃度の低下が観察されることから、少なくとも摂食開始 1 週間目から 1 ヶ月の間は、血清脂質濃度低下作用が発現すると考えられる。

本実験より、未熟ミカン混合発酵茶は、いずれの食餌組成においても、体重増加を抑制し、血清および肝臓脂質濃度低下作用を有する可能性が示唆された。血清トリグリセリド濃度は、摂食開

始 1 週間目から、発酵茶摂取によって低下する傾向を示したことから、発酵茶の短期摂食でも、血清脂質濃度低下効果が発現する可能性がある。4 週間の摂取期間は、Tanaka ら<sup>61)</sup> や Miyata ら<sup>40)</sup> の行ったビワ葉混合発酵茶による脂質代謝改善作用との比較を行いやすい。また、4 週間よりも短い摂取期間で脂質代謝改善作用が発現すれば、栄養学的観点より、未熟ミカン混合発酵茶の訴求力を更に高めることができる。しかし、摂食開始直後のラットの摂食量は安定しないため、1 週間の摂取期間はやや短すぎる可能性がある。そのため、血清脂質濃度以外に及ぼす効果をみるために、1 週間より長く摂取期間を設定する必要があると考えられる。

本章の結果より、脂質代謝改善効果を観察するためには、未熟ミカン混合発酵茶の基本食への添加量を 0.75%以上にする必要があると考えられた。しかし、AIN-93G 組成において、0.75 および 1.0%の発酵茶添加により、摂食量がやや低下する傾向が観察された(表 5-2)。ラットの摂食量が少なければ、食餌が代謝へ及ぼす影響を必ずしも正しく評価できない。特に、未熟ミカン混合発酵茶の添加量が 1.0%の場合、摂食量が特に低くなるようである。そこで、未熟ミカン混合発酵茶のラットへの摂食実験において、添加量の上限値を 0.75%に設定することとした。また、AIN 組成の違いによる脂質代謝への影響に大きな違いは認められなかった。AIN-76 組成はスクロース主体とし、中性脂肪濃度を著しく上昇させる、やや特殊な食餌組成であることから、 $\beta$ -コーンスターチを主体とする AIN-93G 組成でラット実験を行うこととした。

## 第6章

## 未熟ミカン混合発酵茶の摂取がラット脂質代謝に及ぼす影響

## 緒言

第5章の実験により、未熟ミカン混合発酵茶の脂質代謝に及ぼす影響を検討するための食餌条件は、飼料組成をAIN-93Gに基づく純化食にし、発酵茶添加量の上限値を0.75%に設定することにした。未熟ミカン混合発酵茶の摂取により、血清トリグリセリド、肝臓トリグリセリドおよびコレステロール濃度は低値を示し、白色脂肪組織重量も低い傾向が観察された。しかし、前章において供試したラットの数は、脂質代謝へ及ぼす影響を評価するための食餌条件を見出す予備の実験であったことから、各群3匹であり、統計処理を行わず、メカニズムの詳細な検討も行っていない。

未熟ミカン混合発酵茶は、エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレートおよびエピガロカテキンガレートなどのカテキン類を含んでおり、これらカテキン類は、動物実験において、抗酸化作用や血糖上昇抑制作用などの生理機能を有することが報告されている<sup>14) 17)</sup>。また、体脂肪低減や血清および肝臓トリグリセリド濃度ならびに肝臓コレステロール濃度低下など、脂質代謝改善作用も有する<sup>8) 16) 18) 26) 57) 70)</sup>。さらに、ピロ葉混合発酵茶に含まれるテアシネンシン類やテアフラビン類などの紅茶ポリフェノール類も、血清および肝臓脂質濃度を低下させることが明らかとなっている<sup>39) 40)</sup>。紅茶ポリフェノール類は、ラット肝細胞を用いた実験において、カテキン類よりも、コレステロール合成抑制効果が強いことが報告されている<sup>54)</sup>。ヘスペリジンははじめとするフラボノイド類も、高トリグリセリド血症改善、高コレステロール血症改善、肝臓トリグリセリドおよびコレステロール濃度低下等の作用を有することが明らかにされている<sup>4)</sup>。したがって、未熟ミカン混合発酵茶の脂質代謝改善作用は、同じ三番茶葉から製造した緑茶やミカン未熟果単独よりも強い可能性がある。ただし、未熟ミカン混合発酵茶摂取による脂質代謝改善作用が、生成した紅茶ポリフェノール類によるものか、ヘスペリジンそのものの効果であるか、あるいは水溶性の向上したヘスペリジンによるものかを証明することは不可能である。未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンは、水溶液中で、カテキン類や紅茶ポリフェノール類と複合体を形成することで、溶解性を向上させていると推察される。したがって、未熟ミカン混合発酵茶に含まれる全ての成分の作用としての評価を行う必要があることから、発酵茶や緑茶およびミカン未熟果に含まれる各機能性成分の定量が重要となる。

前章において、経時的に血清脂質濃度の分析を行ったところ、摂食開始後1週間目で血清トリグリセリド濃度がコントロール群よりも低く、摂食1週間目から1ヶ月の間、未熟ミカン混合発酵茶による血清脂質濃度低下作用が発揮される可能性が示唆された。これまで、ピロ葉混合発酵茶摂取によるラット実験では、摂食後4週間で血清および肝臓脂質濃度を評価している<sup>39) 40) 61)</sup>。したがって、未熟ミカン混合発酵茶の摂食試験においても、ラットの飼育期間を4週間に設定することで、TanakaらやMiyataらの研究との比較を行うことができる。また、4週間よりも短い摂取期間でも脂質濃度低下効果が発現すれば、栄養学的観点より、未熟ミカン混合発酵茶の訴求力を高めることになる。さらに、脂質濃度低下効果が発揮される投与期間を実験動物で見出すことは、摂取期間の目安をヒトに適用する際の一助となると考えられる。

第5章において観察された脂質濃度低下効果は、素材である緑茶葉やミカン未熟果の有する機能が単に作用した可能性があり、未熟ミカン混合発酵茶そのものの作用かどうかは不明である。しかし、カテキン類の酸化重合によって生成した紅茶ポリフェノール類が、脂質濃度低下作用に大きな役割を担っていると推察される。また、未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶媒への溶解性がミカン未熟果単独よりも向上することを既に第2章で明らかにした。そこで、未熟ミカン混合発酵茶の有する特徴的な機能性を追究するために、ラットの摂取期間を2週間と4週間に設定し、素材であるミカン未熟果および緑茶と、脂質濃度に及ぼす影響について比較・追究した。

## 材料および方法

## 1. 実験飼料

未熟ミカン混合発酵茶は、第5章と同様に処理し、実験に供試した。緑茶葉は、未熟ミカン混合発酵茶葉の素材である「やぶきた」茶葉を蒸気で蒸した後、恒温乾燥機を用いて、50°C、12時間の通風乾燥により製造した。ミカン未熟果は、未熟ミカン混合発酵茶葉の素材と同様、直径1.5 cm程度の「原口早生」を使用した。緑茶葉および包丁でスライスしたミカン未熟果20 gに1 Lの熱水を加えて得られた抽出物を、棚式真空凍結乾燥機(FD-550R、東京理化工業株式会社)を用いて4日間凍結乾燥し、粉末にしたものを飼料として用いた。

## 2. ポリフェノール類の定量

凍結乾燥粉末 500 mg に 0.1% トリフルオロ酢酸含有 60% エタノールを 15 mL 添加し、バイアル中で 24 時間常温振盪しながら抽出した。その後、0.45  $\mu\text{m}$  孔径のメンブランフィルターでろ過したものについて、日本分光株式会社の高速度液体クロマトグラフ (HPLC) システムを用いてポリフェノール成分を測定した。カラムは Cosmosil 5C18AR II (内径 4.6 mm  $\times$  長さ 250 mm) (ナカライテスク株式会社) を使用し、移動相 A 液に 50 mM リン酸、移動相 B 液にアセトニトリルを用いた。グラジエントは、移動相 B 液を 39 分間で 4% から 30% にし、その後 15 分間で 75% にした。流速は 0.8 mL/分、カラム温度は 35°C とし、検出にはフォトダイオードアレイ (MD-910, 日本分光株式会社) を使用した。カフェインと没食子酸はナカライテスク株式会社から購入し、カテキンおよびヘスペリジンは、東京化学株式会社 (東京) から入手した。カテキン-3-O-ガラクト、ガロカテキン-3-O-ガラクトおよびナリルチンは、エピカテキンガラクト、エピガロカテキンガラクトおよびナリンギン (東京化学株式会社) の検量線よりそれぞれ求めた。エピカテキン、エピカテキンガラクト、エピガロカテキンおよびエピカテキンガラクトは、市販緑茶葉を用いて、Nonaka ら<sup>44)</sup>の方法に準じ、精製した。ガロカテキン<sup>37)</sup>、テアフラビン類<sup>64)</sup>、テアシネンシン A, B<sup>52) 65)</sup> およびポリメリックポリフェノール<sup>66)</sup> は、それぞれの報告に従って調製した。

## 3. 腓リパーゼ阻害活性の測定

腓リパーゼ阻害活性の測定は、玉屋ら<sup>96)</sup>の方法に準じた。水に溶解させたサンプル 25  $\mu\text{L}$  をマイクロプレートに添加し、緩衝液 (13 mM トリス塩酸含有 0.15 M 塩化カリウムおよび 1.3 mM 塩化カルシウム, pH 8.0) に溶解した腓リパーゼの疑似基質 (0.1 mM 4-methylumbelliferone) を 50  $\mu\text{L}$  添加した後、25°C で 5 分間プレインキュベートした。緩衝液に溶解したブタ膵臓由来リパーゼ (Type VI-S) 酵素液 (50 U/mL) を 25  $\mu\text{L}$  添加し、酵素反応を開始した。25°C で 30 分間反応させた後に、0.1 M クエン酸ナトリウム (pH 4.2) 溶液を 1 mL 添加し、反応を停止させた。リパーゼにより遊離した 4-methylumbelliferone 量を蛍光光度法 (励起波長 355 nm, 蛍光波長 460 nm) により測定した。

## 4. 実験動物および動物飼料

動物は 4 週齢の SD 雄ラット (日本クレア株式会社) を用いた。ラットの飼育条件、血津、各組織の保存条件は第 5 章と同様である。予備飼育終了後、SD ラットの体重に群間で差がないように、コントロール群、ミカン未熟果群、緑茶葉および未熟ミカン混合発酵茶群に群分けし、1 日 1 回 1 食お

よび蒸留水を 14 日間あるいは 28 日間、自由に摂取させた。食餌は、AIN-93G 組成に準じた。コントロール食に未熟ミカン混合発酵茶乾燥粉末を 0.75% 添加した食餌を未熟ミカン混合発酵茶添加食とし、全量を  $\beta$ -コーンスターチで調整した。未熟ミカン混合発酵茶葉は、ミカン未熟果と茶葉 (重量比 1:3) で構成されているため、ミカン未熟果および緑茶の食餌への添加量は、発酵茶添加量のそれぞれ 4 分の 1 および 4 分の 3 量 (それぞれ 0.19% および 0.56%) とし、全量を  $\beta$ -コーンスターチで調整した。各群あたりのラットの数は 6 匹 (28 日間のコントロール群のみ 7 匹) とした。

## 5. 血清脂質濃度、血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度の測定

血清トリグリセリドおよびコレステロール濃度の測定は、第 5 章に準じて定量した。血清リン脂質濃度は、リン脂質 C テストワコー (和光純薬工業株式会社) で測定した。血清遊離脂肪酸濃度の測定は、Non-esterified fatty acid (NEFA) C-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いた。グルコース C II-テストワコー (和光純薬工業株式会社) で、血清グルコース濃度を測定した。血清インスリン濃度、血清レプチンおよびアディポネクチン濃度の定量は、それぞれ、インスリン測定キットハイレンジ Speedy (森永生科学研究所株式会社, 神奈川)、レプチン測定キット (森永生科学研究所株式会社) およびマウス/ラットアディポネクチン ELISA キット (大塚製薬株式会社, 東京) により行った。

## 6. 肝臓脂質濃度の測定

肝臓トリグリセリド濃度、肝臓コレステロールおよびリン脂質濃度の測定は、第 5 章に準じて定量した。

## 7. 肝臓および褐色脂肪組織における脂肪酸代謝関連酵素活性の測定

肝臓約 2 g に緩衝液 (0.25 M スクロース, 10 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタンおよび 1 mM EDTA, pH 7.4) を 12 mL 加えてホモジナイズした。ホモジネートの核や残渣を取り除くために、4°C, 700  $\times$  g (3,000 rpm) で 10 分間遠心し、上清を 4°C, 10,000  $\times$  g (11,000 rpm) で 10 分間遠心後、沈殿物に緩衝液を加えたものをミトコンドリア画分とした。上清を 4°C, 125,000  $\times$  g (40,000 rpm) で 60 分間遠心後、上清をサイトソーム画分とし、沈殿物に緩衝液を加えたものをミクロソーム画分とした。ミトコンドリア画分、サイトソーム画分およびミクロソーム画分は、各分析に供するまで -80°C で冷凍保存した。

サイトソーム画分の脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase) 活性、マリックエンザイム (Malic enzyme) 活性およびグルコース 6-リン酸デヒドロゲナー

ゼ (Glucose 6-phosphate dehydrogenase) 活性は、それぞれ Kelly ら<sup>22)</sup>, Ochoa<sup>45)</sup> および Kelly と Kletzein<sup>21)</sup> の方法に準じて測定した。ミクロソーム画分のホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ (Phosphatidate phosphohydrolase) 活性およびミトコンドリア画分のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (Carnitine palmitoyltransferase) 活性の測定は、それぞれ Walton と Possmayer<sup>67)</sup> および Markwell ら<sup>34)</sup> の方法で行った。各画分のタンパク質量は、100 倍希釈したものを Lowry 法<sup>33)</sup> の方法により定量した。

褐色脂肪組織におけるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は、褐色脂肪組織をホモジネートバッファーでホモジナイズしたものを 4°C, 1,200 × g (3,000 rpm) で 10 分間遠心後、中間の水層をミトコンドリア画分とした。活性およびタンパク質量の測定は、肝臓と同様の方法で行った。

## 8. 統計処理

ポリフェノールの定量結果は、3 回測定した結果の平均値 ± 標準偏差で示した。ラットのデータは平均値 ± 標準誤差で示した。統計処理は、一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer 法による多重比較検定で行った。統計ソフトには SPSS Statistics 20 (日本アイ・ビー・エム株式会社, 東京) を用い、統計的有意水準は、 $p < 0.05$  とした。

## 結果

### 1. 各サンプルに含まれるポリフェノール類の含量

ミカン未熟果、緑茶葉および未熟ミカン混合発酵茶葉熱水抽出物の凍結乾燥粉末に含まれるポリフェノール類の含量を表 6-1 に示す。ミカン未熟果は、ナリルチンおよびヘスペリジンを含んでいた。緑茶から、紅茶ポリフェノール類、ナリルチンおよびヘスペリジンは検出されず、カフェイン、没食子酸およびカテキン類が含まれていた。未熟ミカン混合発酵茶で、カフェイン、没食子酸、カテキン類、紅茶ポリフェノール類 (テアシネンシン類、ポリメリックポリフェノールおよびテアフラビン類)、ナリルチンおよびヘスペリジンが検出された。カテキン、カテキン-3-O-ガラートおよびガロカテキンは、未熟ミカン混合発酵茶に含まれず、発酵茶に含まれるガロカテキン-3-O-ガラートおよびエピガロカテキン含量は、緑茶よりも少なかった。未熟ミカン混合発酵茶に含まれるカフェイン含量は、緑茶と比べ 1.9 倍高値で、発酵茶中のナリルチンおよびヘスペリジンは、ミカン未熟果よりもそれぞれ 7.0 倍および 8.1 倍多く含まれていた。

### 2. *In vitro*における腓リパーゼ活性阻害性

ミカン未熟果、緑茶および未熟ミカン混合発酵茶の腓リパーゼ活性の阻害性を、玉屋ら<sup>96)</sup>の方法により測定したところ、未熟ミカン混合発酵茶 (IC50 = 64.6 ± 9.9 μg/mL, n = 3) は、緑茶 (IC50 = 76.2 ± 23.4 μg/mL, n = 3) と同程度の阻害性を示し、ミカン未熟果 (IC50 = 637 ± 6 μg/mL, n = 3) よりも強く腓リパーゼ活性が阻害された。

### 3. 未熟ミカン混合発酵茶の 2 週間摂食における脂質代謝パラメーター

#### 3-1. 成長、摂食量および臓器重量

ラットの体重、摂食量、肝臓重量、白色脂肪組織重量および褐色脂肪組織重量を表 6-2 に示す。摂食量に有意差はなかった。終体重および肝臓重量に、食餌による明確な影響は観察されなかったが、発酵茶群で、他の 3 群と比較し、終体重が低い傾向にあった。緑茶群の腎周辺脂肪重量および総白色脂肪組織重量は、未熟果群と比較して、有意に低値を示した。しかし、発酵茶およびコントロール群と比較すると、白色脂肪組織重量に差は認められなかった。褐色脂肪組織重量も食餌の影響を受けなかった。

#### 3-2. 血清脂質濃度、血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度

表 6-3 に血清脂質濃度、血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度を示す。トリグリセリド濃度は、コントロール群に比べ、顕著な差でないものの、未熟果、緑茶および発酵茶群で低い傾向を示した。コレステロール濃度およびリン脂質濃度は、コントロール群と比較し、未熟果、緑茶および発酵茶群で有意に低かったが、3 群間の差はなかった。遊離脂肪酸濃度は、コントロール群に対し、未熟果および発酵茶群で低い傾向を示し、緑茶群で有意に低値を示した。発酵茶群のグルコース濃度は、他の 3 群よりも低値であったが、明確な差でなかった。レプチン濃度は、緑茶および発酵茶群で低い傾向を示したが、有意な差でなかった。アディポネクチン濃度に食餌による影響は認められなかった。

#### 3-3. 肝臓脂質濃度

肝臓脂質濃度を表 6-4 に示す。トリグリセリド濃度は、コントロール群と比較し、未熟果群で低い傾向を示し、緑茶および発酵茶群で有意に低値を示したが、発酵茶群と緑茶群に差はなかった。コレステロール濃度は、緑茶および発酵茶群でわずかに低かったが、有意差は認められなかった。リン脂質濃度は、いずれの試験食群においても高い傾向を示したが、顕著な差でなかった。

#### 3-4. 肝臓における脂肪合成酵素活性ならびに肝臓および褐色脂肪組織の脂肪酸分解酵素活性

肝臓における脂肪合成酵素ならびに肝臓およ

表6-1 ミカン未熟果, 緑茶および未熟ミカン混合発酵茶熱水抽出物の凍結乾燥粉末に含まれるポリフェノール含量 (mg/100 g)

ポリフェノール成分	ミカン未熟果	緑茶	未熟ミカン混合発酵茶
カフェイン	ND	25.5 ± 2.3	47.4 ± 1.6
没食子酸	ND	1.46 ± 0.11	6.55 ± 0.15
カテキン類			
カテキン	ND	6.08 ± 0.60	ND
カテキン-3-O-ガラート	ND	5.04 ± 0.43	ND
ガロカテキン	ND	34.1 ± 2.8	ND
ガロカテキン-3-O-ガラート	ND	26.8 ± 2.3	2.56 ± 0.04
エピカテキン	ND	8.30 ± 0.59	7.19 ± 0.14
エピカテキンガラート	ND	6.33 ± 0.53	13.7 ± 0.3
エピガロカテキン	ND	28.4 ± 2.3	15.9 ± 0.4
エピガロカテキンガラート	ND	32.7 ± 2.8	48.4 ± 1.1
紅茶ポリフェノール類			
テアシネンシン A	ND	ND	5.94 ± 0.12
テアシネンシン B	ND	ND	8.45 ± 0.41
テアフラビン類	ND	ND	5.10 ± 0.09
ポリメリックポリフェノール	ND	ND	31.9 ± 1.4
ナリルチン	1.52 ± 0.11	ND	10.6 ± 0.2
ヘスペリジン	1.03 ± 0.06	ND	8.33 ± 0.20

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

ND: 検出限界以下

表6-2 2週間摂食後の体重, 摂食量, 肝臓重量および脂肪組織重量

	コントロール群	ミカン未熟果群	緑茶群	未熟ミカン混合発酵茶群
初体重(g)	166 ± 3	166 ± 2	167 ± 2	167 ± 2
終体重 (g)	295 ± 7	295 ± 2	297 ± 5	288 ± 4
摂食量 (g/日)	25.0 ± 0.3	25.4 ± 0.6	25.0 ± 0.7	24.7 ± 0.4
肝臓重量 (g/100 g体重)	4.38 ± 0.09	4.22 ± 0.04	4.40 ± 0.20	4.23 ± 0.11
白色脂肪組織重量 (g/100 g体重)				
腎周辺	1.20 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.22 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.07 <sup>ab</sup>
睪丸周辺	0.95 ± 0.05	1.03 ± 0.11	0.84 ± 0.03	1.00 ± 0.04
腸間膜周辺	0.91 ± 0.03	0.99 ± 0.06	0.90 ± 0.04	0.99 ± 0.06
合計	3.06 ± 0.10 <sup>ab</sup>	3.24 ± 0.23 <sup>b</sup>	2.60 ± 0.11 <sup>a</sup>	3.05 ± 0.08 <sup>ab</sup>
褐色脂肪組織重量 (g/100 g体重)	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.01

平均値 ± 標準偏差 (n=6)

表6-3 2週間摂食後の血清脂質濃度, 血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度

	コントロール群	ミカン未熟果群	緑茶群	未熟ミカン混合発酵茶群
脂質				
トリグリセリド (mg/dL)	127 ± 20	109 ± 13	110 ± 8	104 ± 16
コレステロール (mg/dL)	113.3 ± 5.7 <sup>b</sup>	92.6 ± 2.7 <sup>a</sup>	93.8 ± 5.4 <sup>a</sup>	92.9 ± 4.5 <sup>a</sup>
リン脂質 (mg/dL)	214 ± 8 <sup>b</sup>	178 ± 3 <sup>a</sup>	172 ± 9 <sup>a</sup>	175 ± 12 <sup>a</sup>
遊離脂肪酸 (mEq/L)	2.62 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.13 ± 0.17 <sup>ab</sup>	1.99 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.15 <sup>ab</sup>
グルコース (mg/dL)	135 ± 6	133 ± 4	131 ± 6	118 ± 5
ホルモン				
レプチン (ng/mL)	5.70 ± 0.59	5.57 ± 0.68	3.55 ± 0.60	3.80 ± 0.53
アディポネクチン (μg/mL)	2.27 ± 0.26	1.92 ± 0.16	1.79 ± 0.17	2.12 ± 0.45

平均値 ± 標準偏差 (n=6)

<sup>ab</sup>異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

び褐色脂肪組織の脂肪酸分解酵素活性を表 6-5 に示す。脂肪酸合成酵素およびマリックエンザイム活性に有意差は認められないものの、ミカン未熟果、緑茶および発酵茶群で低く、特に発酵茶群でコントロール群の約 2 分の 1 であった。グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性は、コントロール群に比べ、未熟果および緑茶群で低く、発酵茶群で有意に低かった。ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ活性に、食餌による明確な影響は認められなかったが、試験食群でわずかに低い傾向を示した。肝臓および褐色脂肪組織のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は、コントロール群に比べ、発酵茶群で低い傾向を示したが、顕著な差でなかった。

#### 4. 未熟ミカン混合発酵茶の 4 週間摂食における脂質代謝パラメーター

##### 4-1. 成長、摂食量および臓器重量

ラットの体重、摂食量、肝臓重量、白色脂肪組織重量および褐色脂肪組織重量を表 6-6 に示す。摂食量に有意差はなかった。終体重は、コントロール群と比較し、未熟果群で高い傾向にあり、緑茶および発酵茶群で低い傾向を示し、結果として、未熟果群と緑茶群の間に有意な差が認められた。肝臓重量に食餌による影響は観察されなかった。腸管膜周辺脂肪重量および総白色脂肪組織重量は、コントロール群に対し、未熟果群で高い傾向にあり、緑茶および発酵茶群で低い傾向を示した結果、未熟果群と比べ、緑茶および発酵茶群で有意に低値を示した。発酵茶群の白色脂肪組織重量は、緑茶と同程度だった。褐色脂肪組織重量は食餌による影響が認められなかった。

##### 4-2. 血清脂質濃度、血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度

血清脂質濃度、血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度を表 6-7 に示す。トリグリセリド濃度は、コントロール群に比べ、緑茶および発酵茶群で低い傾向を示し、発酵茶群と緑茶群は同程度であった。コレステロールおよびリン脂質濃度は、コントロール群と比較し、未熟果群でやや高く、緑茶群でわずかに低かったため、両者の間に有意差が認められた。発酵茶群のコレステロールおよびリン脂質濃度に、他の 3 群と顕著な差はなかった。遊離脂肪酸濃度は、コントロール群に対し、緑茶および発酵茶群で低い傾向にあったが、有意差はなかった。グルコース濃度には、食餌による影響が認められなかった。インスリン濃度は、コントロール群よりも、緑茶および発酵茶群で低かったが、有意差は認められなかった。発酵茶のレプチン濃度は、コントロール群よりもわずかに低かったが、顕著な差はなく、未熟果群で他の 3 群よりも有意に高かった。アディポネクチン濃度

による影響は観察されなかった。

##### 4-3. 肝臓脂質濃度

肝臓脂質濃度を表 6-8 に示す。トリグリセリド濃度は、コントロール群に対し、緑茶および発酵茶群で低値を示した。緑茶群とコントロール群の間に有意差は認められなかったが、発酵茶群のトリグリセリド濃度は、コントロール群よりも有意に低かった。コレステロール濃度は、コントロールと比べ、緑茶および発酵茶群で低い傾向を示し、未熟果は他の 3 群よりも有意に高値を示した。リン脂質濃度は、いずれの試験食群においても有意差は認められなかった。

##### 4-4. 肝臓における脂肪合成酵素活性ならびに肝臓および褐色脂肪組織の脂肪酸分解酵素活性

肝臓における脂肪合成酵素ならびに肝臓および褐色脂肪組織の脂肪酸分解酵素活性を表 6-9 に示す。脂肪酸合成酵素活性は、コントロール群に比べ、未熟果で高く、緑茶、発酵茶群でわずかに低い傾向を示したが、4 群間で有意差は認められなかった。マリックエンザイム活性は、コントロール群に対し、未熟果および発酵茶群でやや高い傾向にあったが、顕著な差でなかった。グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性は、コントロール群よりも、緑茶および発酵茶群で低い傾向にあった。ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ活性に食餌による明確な影響は認められなかった。肝臓のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は、コントロール群に対し、未熟果および発酵茶群において高い傾向を示したが、有意な差でなかった。褐色脂肪組織のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は、緑茶群で低い傾向にあったが、発酵茶摂取による影響は認められなかった。

#### 考察

本章では、未熟ミカン混合発酵茶のラット脂質代謝に及ぼす影響を検討するために、素材であるミカン未熟果および同じ茶葉から製造した緑茶と比較・追究した。また、摂取期間の違いが脂質濃度に及ぼす影響を検討するため、ラットの飼育期間を 2 週間と 4 週間に設定した。

2 週間の摂取による摂食量、終体重および肝臓重量に、いずれの食餌においても差は観察されなかった (表 6-2)。一方で、未熟ミカン混合発酵茶の 4 週間摂取においても、摂食量に差がないにも関わらず、白色脂肪組織重量が、ミカン未熟果摂取よりも顕著に低い値を示した。コントロール群との明確な差はないものの、2 週間よりも 4 週間の未熟ミカン混合発酵茶摂取で、コントロール群との差が大きいことから、摂取期間をさらに延長することで、白色脂肪組織重量の増加を効果的に

表6-4 2週間摂食後の肝臓脂質濃度 (mg/g liver)

	コントロール群	ミカン未熟果群	緑茶群	未熟ミカン混合発酵茶群
トリグリセリド	32.1 ± 4.1 <sup>b</sup>	22.3 ± 2.0 <sup>ab</sup>	18.8 ± 2.3 <sup>a</sup>	18.0 ± 1.0 <sup>a</sup>
コレステロール	2.21 ± 0.30	2.25 ± 0.26	1.99 ± 0.12	2.13 ± 0.09
リン脂質	19.7 ± 0.7	23.3 ± 1.5	22.0 ± 1.6	24.0 ± 1.8

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

<sup>ab</sup>異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

表6-5 2週間摂食後の肝臓、褐色脂肪組織における脂肪酸合成酵素活性および脂肪酸分解酵素活性 (nmol/min/mg protein)

	コントロール群	ミカン未熟果群	緑茶群	未熟ミカン混合発酵茶群
脂肪酸合成酵素活性				
脂肪酸合成酵素	11.3 ± 2.0	8.2 ± 1.7	6.4 ± 0.9	5.8 ± 0.6
マリックエンザイム	23.1 ± 3.8	15.6 ± 3.6	13.5 ± 2.8	11.2 ± 2.1
グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ	45.5 ± 6.6 <sup>b</sup>	41.5 ± 4.6 <sup>ab</sup>	28.2 ± 3.2 <sup>ab</sup>	23.6 ± 4.4 <sup>a</sup>
ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ	6.57 ± 1.23	5.23 ± 0.50	4.66 ± 0.31	5.41 ± 0.66
脂肪酸分解酵素活性				
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ				
肝臓	1.72 ± 0.14	1.56 ± 0.23	1.50 ± 0.29	1.43 ± 0.21
褐色脂肪組織	9.18 ± 0.81	9.14 ± 1.28	8.87 ± 1.75	6.93 ± 0.49

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

<sup>ab</sup>異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

表6-6 4週間摂食後の体重, 摂食量, 肝臓重量および脂肪組織重量

	コントロール群	ミカン未熟果群	緑茶群	未熟ミカン混合発酵茶群
初体重 (g)	153 ± 2	154 ± 2	154 ± 2	154 ± 2
終体重 (g)	420 ± 11 <sup>ab</sup>	432 ± 13 <sup>b</sup>	390 ± 5 <sup>a</sup>	399 ± 9 <sup>ab</sup>
摂食量 (g/日)	26.1 ± 0.8	27.8 ± 1.0	25.1 ± 0.6	25.4 ± 0.8
肝臓重量 (g/100g体重)	3.64 ± 0.11	3.78 ± 0.17	3.64 ± 0.13	3.58 ± 0.11
白色脂肪組織重量 (g/100g体重)				
腎周辺	2.16 ± 0.22	2.43 ± 0.17	1.80 ± 0.08	1.80 ± 0.21
睪丸周辺	1.39 ± 0.09	1.45 ± 0.12	1.14 ± 0.05	1.15 ± 0.06
腸間膜周辺	1.35 ± 0.11 <sup>ab</sup>	1.63 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.15 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.06 <sup>a</sup>
合計	4.91 ± 0.38 <sup>ab</sup>	5.51 ± 0.43 <sup>b</sup>	4.09 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.03 ± 0.31 <sup>a</sup>
褐色脂肪組織重量 (g/100g体重)	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01

平均値 ± 標準誤差 (n=6-7)

<sup>ab</sup>異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

表6-7 4週間摂食後の血清脂質濃度, 血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度

	コントロール群	ミカン未熟果群	緑茶群	未熟ミカン混合発酵茶群
脂質				
トリグリセリド (mg/dL)	152 ± 23	167 ± 24	111 ± 13	114 ± 16
コレステロール (mg/dL)	84.3 ± 5.3 <sup>a</sup>	102.9 ± 5.5 <sup>b</sup>	81.6 ± 4.0 <sup>a</sup>	90.9 ± 4.3 <sup>ab</sup>
リン脂質 (mg/dL)	187 ± 8 <sup>ab</sup>	215 ± 10 <sup>b</sup>	169 ± 4 <sup>a</sup>	190 ± 7 <sup>ab</sup>
遊離脂肪酸 (mEq/L)	1.33 ± 0.2	1.33 ± 0.16	1.07 ± 0.19	1.06 ± 0.14
グルコース (mg/dL)	110 ± 4	114 ± 5	119 ± 4	116 ± 5
ホルモン				
インスリン (ng/mL)	0.70 ± 0.16	0.75 ± 0.18	0.41 ± 0.12	0.42 ± 0.07
レプチン (ng/mL)	4.66 ± 0.29 <sup>a</sup>	6.58 ± 0.73 <sup>b</sup>	4.48 ± 0.43 <sup>a</sup>	3.72 ± 0.35 <sup>a</sup>
アディポネクチン (μg/mL)	2.68 ± 0.20	2.94 ± 0.32	2.50 ± 0.05	2.88 ± 0.15

平均値 ± 標準誤差 (n=6-7)

<sup>ab</sup>異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)



表6-8 4週間摂食後の肝臓脂質濃度 (mg/g liver)

	コントロール群	ミカン未熟果群	緑茶群	未熟ミカン混合発酵茶群
トリグリセリド	41.5 ± 2.8 <sup>c</sup>	46.1 ± 3.4 <sup>cd</sup>	31.4 ± 1.6 <sup>bc</sup>	30.8 ± 2.4 <sup>ab</sup>
コレステロール	4.24 ± 0.25 <sup>a</sup>	5.32 ± 0.22 <sup>b</sup>	3.68 ± 0.32 <sup>a</sup>	3.68 ± 0.19 <sup>a</sup>
リン脂質	17.9 ± 1.0	18.2 ± 1.2	19.3 ± 1.0	17.7 ± 0.8

平均値 ± 標準誤差 (n=6-7)

<sup>abcd</sup>異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

表6-9 4週間摂食後の肝臓、褐色脂肪組織における脂肪酸合成酵素活性および脂肪酸分解酵素活性 (nmol/min/mg protein)

	コントロール群	ミカン未熟果群	緑茶群	未熟ミカン混合発酵茶群
脂肪酸合成酵素活性				
脂肪酸合成酵素	13.0 ± 1.9	18.0 ± 1.8	11.7 ± 2.6	11.7 ± 1.7
マリックエンザイム	24.0 ± 2.9	34.0 ± 7.1	26.7 ± 2.5	32.4 ± 4.4
グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ	63.1 ± 17.9	63.8 ± 12.9	42.1 ± 5.8	45.8 ± 3.9
ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ	7.32 ± 1.00	8.61 ± 1.42	7.00 ± 0.69	7.42 ± 0.72
脂肪酸分解酵素活性				
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ				
肝臓	3.82 ± 0.72	4.24 ± 0.43	3.52 ± 0.47	4.58 ± 0.52
褐色脂肪組織	7.61 ± 0.82	6.99 ± 0.60	6.09 ± 0.84	7.28 ± 0.87

平均値 ± 標準誤差 (n=6-7)

抑制できる可能性が示唆された。カテキン類の摂取は、体脂肪を効果的に減少させることが報告されていることから<sup>16) 18)</sup>、未熟ミカン混合発酵茶に含まれるカテキン類が、白色脂肪組織蓄積の抑制に一部影響を及ぼしたと考えられる。

ミカン未熟果、緑茶および未熟ミカン混合発酵茶ともに、摂取期間2週間で、血清コレステロールおよびリン脂質濃度は有意に低値を示した(表6-3)。しかし、4週間摂取の場合、いずれの試験食群も、これら血清脂質濃度に、コントロール群との差はなく、未熟ミカン混合発酵茶群の濃度は、コントロールよりも高値であった(表6-7)。第5章において、1から4週間かけて未熟ミカン混合発酵茶摂取ラットの血清脂質濃度を測定したが、摂食開始2および4週間目での、血清コレステロール濃度に及ぼす影響は明確でなかった。前章では、非絶食下で、尾静脈から2週間目の血液を採取したため、本実験と結果が異なったかもしれない。血清トリグリセリド濃度は、いずれの摂取期間においても、未熟ミカン混合発酵茶摂取によって、コントロール群よりも低い傾向にあった。未熟ミカン混合発酵茶群の血清トリグリセリド濃度に、コントロール群との有意差は認められなかったが、2週間から4週間にかけて、コントロール群のトリグリセリド濃度の増加率は、発酵茶群よりも2.5倍大きい。一方、2週間の摂取で血清コレステロールおよびリン脂質濃度低下作用が発揮されても、摂取期間の延長によって本作用が完全に相殺されるならば、未熟ミカン混合発酵茶

が血清コレステロールおよびリン脂質濃度に及ぼす影響は少ないといえる。

いずれの摂取期間においても、未熟ミカン混合発酵茶摂取で、肝臓コレステロール濃度は低い傾向を示し、特に肝臓トリグリセリド濃度は、発酵茶群で最も低値であった(表6-4および表6-8)。肝臓トリグリセリドの低下は、肝臓での脂肪合成抑制やβ酸化亢進、あるいは腸管での脂肪の吸収抑制によって惹起される。肝臓における脂肪合成に関して、特に脂肪酸合成酵素は、サイトソルにおいて、クエン酸から代謝されるマロニル-CoAをアシル-CoA(活性脂肪酸)へ転換する脂肪酸生合成に属する酵素で、脂肪生合成の律速酵素である。いずれの摂取期間においても、未熟ミカン混合発酵茶群の脂肪酸合成酵素活性は、有意でないものの、コントロール群よりも低値を示した(表6-5および表6-9)。未熟ミカン混合発酵茶群の脂肪酸合成酵素活性は、緑茶群と同等かそれ以上に低い。また、脂肪生合成に関与する酵素の補酵素として働くNADPHを供給する経路の律速酵素であるグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性は、2週間の未熟ミカン混合発酵茶摂取でコントロール群よりも顕著に低く、4週間摂取においても、低い傾向を示した。そのため、肝臓での脂肪合成抑制が一部、肝臓トリグリセリド濃度低下に影響を及ぼした可能性がある。

脂肪酸分解酵素であるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼの活性は、未熟ミカン混合発酵茶摂取において、いずれの摂取期間でも大き

な変動を示さなかった(表6-5および表6-9)。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼはミトコンドリア膜に存在し、脂肪酸アシル-CoAが $\beta$ -酸化のために、ミトコンドリアに移行する際に働く酵素である。Tanakaら<sup>61)</sup>は、緑茶の摂取により、ラット肝臓でのカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性が上昇し、そのことが、緑茶による脂質濃度低下に影響した可能性を示唆している。しかし、本実験では、いずれの摂取期間においても、緑茶摂取による肝臓のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性に影響は認められなかった。Tanakaらの研究では、基本食をAIN-76組成としており、また本実験よりも2倍程度多く食餌へ添加していることが、今回の実験と異なる結果になったと考えられる。

試験管レベルにおいて、未熟ミカン混合発酵茶は、緑茶と同程度の腓リパーゼ阻害活性を示した。食餌から摂取されるトリグリセリドは、膵臓より分泌される腓リパーゼの作用により、モノグリセリドと脂肪酸に分解され、小腸で吸収される。そのため、腓リパーゼの働きを阻害することで、脂肪の吸収が抑制され、糞中への排泄が促進される。Hanら<sup>11)</sup>やIkedaら<sup>16)</sup>は、腓リパーゼ活性の阻害によって、肝臓でのトリグリセリド蓄積の低下が起こることを報告している。したがって、肝臓における脂肪合成抑制と腸管での脂質の吸収抑制が相加的に作用し、肝臓トリグリセリド濃度の低下に影響した可能性がある。

未熟ミカン混合発酵茶に含まれる茶葉の量は、緑茶よりも少ないにも関わらず、含まれるカフェイン含量は、緑茶よりも2倍程度多かった(表6-1)。李ら<sup>124)</sup>は、茶の発酵促進により、カフェイン含量も増加することを報告している。このメカニズムについて、詳細は不明であるが、未熟ミカン混合発酵茶においても、茶の発酵により、緑茶よりもカフェイン含量が増加したと推察される。多くの研究で、カフェインは、肝臓脂質濃度低下作用を有することが示唆されており<sup>27) 29) 30)</sup>、マウスにおいて、0.05%のカフェインを含む飼料摂取で、脂肪の吸収抑制効果が認められることから(Shimodaら、2006)、カフェインが、腸管での脂肪の吸収を阻害し、その結果として肝臓トリグリセリド濃度の低下が起こった可能性は十分に考えられる。

緑茶と異なり、未熟ミカン混合発酵茶は、テアフラビン類やテアシネンシン類などのポリフェノール類を含むことが大きな特徴である(表6-1)。Tanakaら<sup>61)</sup>やMiyataら<sup>40)</sup>は、紅茶ポリフェノール類が、体重増加抑制、肝臓トリグリセリド濃度低下作用を有することを明らかにしている。テアフラビン類は、培養系や*in vitro*において、脂肪酸合成酵素の活性を抑制することが報告されている<sup>7) 31) 32)</sup>。また、Kusanoら<sup>29)</sup>によ

て、テアフラビン類がエピガロカテキンガレートよりも、強い腓リパーゼ阻害活性を有することが示されている。さらに、テアシネンシン類も、腓リパーゼ活性を強く阻害し<sup>42)</sup>、Ikedaら<sup>16)</sup>によって、ガロイル基をもつカテキン類が、腓リパーゼ活性を抑制することで、小腸からの脂肪の吸収を抑制することが明らかにされている。そのため、未熟ミカン混合発酵茶による腓リパーゼ阻害活性は、カテキン類や紅茶ポリフェノール類により一部引き起こされたと考えられる。

ヘスペリジンは、血清および肝臓のトリグリセリド濃度低下作用を有する<sup>1) 10) 20)</sup>。本実験において、ミカン未熟果はヘスペリジンを含んでいるにも関わらず、いずれの摂取期間でも、血清および肝臓トリグリセリド濃度に未熟果摂取による影響は認められなかった(表6-4、表6-5、表6-7および表6-8)。奥島<sup>80)</sup>は、ミカン未熟果を丸ごと凍結乾燥し、飼料に2、5および10%添加して、ラット脂質代謝に及ぼす影響を検討しているが、2および5%の添加量の場合、血清および肝臓トリグリセリド濃度への影響は少ないが、10%添加すると脂質濃度低下効果が発現することを明らかにしている。本研究において、ミカン未熟果の食餌への添加量は0.19%であり、未熟果の熱水抽出物を凍結乾燥して添加していることから、奥島<sup>80)</sup>の報告よりもヘスペリジンははじめとする有効成分含量は圧倒的に少ない。本実験では、100g飼料あたり1mg程度しかヘスペリジンが含まれていないことになる。一方で、未熟ミカン混合発酵茶に、100g飼料あたり10mg程度のヘスペリジンが含まれており、これは第2章で明らかにしたように、ヘスペリジンの溶解性が向上することに起因すると考えられる。脂質代謝改善作用を発揮するヘスペリジンの最低濃度は明らかでないが、ラットでは、100g飼料あたり20mgのヘスペリジン摂取で肝臓トリグリセリド濃度の低下が観察されている<sup>23)</sup>。そのため、未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンが、その溶解性の向上によって、肝臓トリグリセリド濃度低下に一部影響した可能性がある。

カテキン類、紅茶ポリフェノール類およびヘスペリジンは、コレステロール低減作用も有している<sup>1) 3) 15) 35) 36)</sup>。Leeら<sup>30)</sup>は、HepG2細胞を用いて、エピカテキンおよびエピガロカテキンガレートが、肝臓でのCYP7A1の遺伝子発現を高めることにより、肝臓コレステロール濃度を低下させることを明らかにしている。また、Miyataら<sup>39)</sup>は、テアフラビン類、テアシネンシン類およびテアルピジン類が、糞中へのステロイド排泄を促進することで、肝臓コレステロール濃度を効果的に低下させることを示している。ヘスペリジンは、apoBの分泌抑制やACAT2およびMTP活性抑制作用を有することが報告されていることから<sup>68)</sup>、今

後、未熟ミカン混合発酵茶に含まれる成分が、コレステロール代謝に及ぼす影響を詳しく検証する必要がある。

4週間の摂取において、ミカン未熟果を摂取させたラットの肝臓トリグリセリド濃度は高く、緑茶摂取で低い傾向を示した(表6-8)。単純にこれらの凍結乾燥粉末をまぜたものであれば、相加効果で打ち消し合い、緑茶と同等以上の肝臓トリグリセリド濃度低下作用は認められないはずである。しかし、未熟ミカン混合発酵茶を摂取させたラットにおいて、緑茶摂取よりも強い肝臓トリグリセリド濃度低下が観察された。したがって、紅茶ポリフェノール類や可溶化ヘスペリジンなどの、ミカン未熟果あるいは緑茶に含まれない未熟ミカン混合発酵茶の成分が、肝臓トリグリセリド濃度の低下を一部引き起こしたと推察される。つまり、肝臓トリグリセリド濃度低下作用は、未熟ミカン混合発酵茶独自の効果であるといえる。

以上の結果より、未熟ミカン混合発酵茶は、ミカン未熟果や同じ茶葉から製造した緑茶よりも、強い肝臓トリグリセリド濃度低下作用を有することが示唆され、この作用は、2週間および4週間のいずれの摂取期間でも誘導されることが明らかとなった。また、未熟ミカン混合発酵茶による肝臓トリグリセリド濃度低減作用は、本発酵茶自身の機能性であることが示された。

## 第7章

未熟ミカン混合発酵茶の食餌への添加量の違いが  
ラット肝臓脂質濃度に及ぼす影響と脂質濃度低下メカニズムの検討

## 緒言

2000年に厚生労働省が実施した第5次循環器疾患基礎調査結果によると、血中トリグリセリドやコレステロール濃度が基準値よりも高いもしくは境界線上のヒトを合計すると2200万人に及ぶ。それから12年後の国民健康・栄養調査において、これら脂質異常症のヒトの割合は男女ともに増加していることが明らかとなっている<sup>84)</sup>。血清脂質濃度が基準値よりも高いと、血管に脂質が沈着することによる脳血管疾患、心疾患などの日本人の死因の上位を占める疾病を発症するリスクが高まる。そのため、脂質濃度低下機能を有する食品に対する国民の関心は高い。脂質代謝は数多くの酵素や転写因子、受容体によって制御、調節されており、その中心的な役割を肝臓や小腸が担っている。特に肝臓は、脂肪酸の合成・分解、トリグリセリドの合成、コレステロールの異化・合成など、脂質代謝に深く関わる機能を多く有している。

第6章において、2および4週間の摂取における未熟ミカン混合発酵茶の脂質代謝に及ぼす影響を、素材であるミカン未熟果および緑茶と比較・追究した。いずれの摂取期間においても、未熟ミカン混合発酵茶は、肝臓トリグリセリド濃度を効果的に低下させることが明らかになった。すなわち、短期間の摂取でも、未熟ミカン混合発酵茶は脂質代謝改善作用を示した。未熟ミカン混合発酵茶による肝臓トリグリセリド濃度低下効果は、素材であるミカン未熟果や緑茶よりも強く、その有効成分は、カテキン類、カフェイン、紅茶ポリフェノール類およびヘスペリジンと推察され、本発酵茶自身の有する機能性であることが示唆された。

未熟ミカン混合発酵茶による肝臓トリグリセリド濃度低下は、肝臓での脂肪合成抑制と小腸からの脂肪吸収抑制が相加的に作用して達成されると考えられるが、詳細なメカニズムは不明である。ヘスペリジンをラットに摂取させた場合、体内での局在性に差異が生じ、ヘスペリジンは特に肝臓に最も蓄積することが報告されている<sup>59)</sup>。すなわち、ヘスペリジンが肝臓を中心に機能を発揮していると推察される。そのため、肝臓での脂肪合成ならびに脂肪分解に関わる酵素活性以外のパラメーターや糞中への脂肪酸およびステロイド排泄などの小腸機能を分析し、作用機序を詳細に追究する必要がある。

第6章では、発酵茶の食餌への添加量を0.75%として、脂質代謝への影響を評価した。また、第5章において、未熟ミカン混合発酵茶の食餌への添加量を0.50%にすると、白色脂肪組織重量に対する影響は観察されなかったが、血清および肝臓トリグリセリド濃度は、コントロール群よりも低値を示した。そのため、0.50%の未熟ミカン混合発酵茶の添加でも、血清や肝臓トリグリセリド濃度が低下する可能性がある。脂質代謝改善作用を発揮する最低添加量（有意差が観察される濃度）を明らかにすることで、未熟ミカン混合発酵茶の摂取量と脂質濃度低下の関連について、より詳細な知見を得ることが可能となる。

そこで本研究では、ラット食餌への未熟ミカン混合発酵茶添加量を0.50あるいは0.75%に設定し、添加量と脂質代謝の関連について検討を行った。また、第6章と同様、2および4週間の摂取で、脂質代謝関連の生体指標への影響を検討し、肝臓脂質濃度低下メカニズムの解明を行った。

## 材料および方法

## 1. 実験飼料

未熟ミカン混合発酵茶は、第5章と同様に処理し、実験に供試した。

## 2. 実験動物および動物飼料

実験動物、ラットの飼育条件、血清、各組織の保存条件は第5章と同様である。予備飼育終了後、ラットを6群に分け、AIN-93G組成を基本食とした飼料無添加のコントロール食、 $\beta$ -コーンスターチを重量代替とし、未熟ミカン混合発酵茶葉熱水抽出物の凍結乾燥粉末を0.50あるいは0.75%添加した試験食および蒸留水を14日間あるいは28日間、自由に摂取させた。また、屠殺前2日間糞を回収し、分析に供するまで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。各群あたりのラットの数は6匹とした。

## 3. 血清脂質濃度、血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度の測定

血清トリグリセリド濃度、血清コレステロール濃度、血清リン脂質濃度、血清遊離脂肪酸濃度、血清グルコース濃度、血清インスリン濃度、血清レプチンおよびアディポネクチン濃度は、第5章および第6章に準じて定量した。

## 4. 肝臓脂質濃度の測定

肝臓トリグリセリド濃度、肝臓コレステロール

およびリン脂質濃度の測定は、第5章に準じて行った。

### 5. 肝臓および褐色脂肪組織における脂肪酸代謝関連酵素活性の測定

肝臓サイトソーム画分の脂肪酸合成酵素活性、マリックエンザイムおよびグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性、肝臓ミクロソーム画分のホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ活性、肝臓ミトコンドリア画分および褐色脂肪組織のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は、第6章に準じて測定した。

### 6. 肝臓における脂質代謝関連 mRNA 発現量の測定

肝臓約 100 mg に対して、RNAiso Plus (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いて全 RNA を抽出した後、TE 緩衝液 (ナカライテスク株式会社) に溶解させ、一定濃度に調整した。溶液中の RNA を鋳型として、Prime Script® RT Master Mix (タカラバイオ株式会社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。cDNA を鋳型とし、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (東洋紡株式会社, 大阪) を用いてリアルタイム PCR を行うための反応液を調製した。使用したプライマー溶液は、グライナージャパン株式会社 (東京) より購入した。測定した遺伝子のプライマー塩基配列は表 7-1 の通りである。リアルタイム PCR は、Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (ライフテクノロジーズジャパン株式会社, 東京) を用いて、SYBR® Green I 検出系により行った。PCR 条件は、95°C にて 10 秒間初期熱変性を行った後、変性 5 秒、アニーリング/伸長反応を 60°C で 34 秒間行い、変性とアニーリング/伸長反応のサイクル数は 40 回とした。データの解析は、7300 system software (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いて行った。2 倍ずつ濃度が異なる希釈系列の cDNA サンプルを用いて検量線を作成し、Acidic ribosomal protein P0 (36F14) をリファレンス遺伝子として、目的遺伝子の目的発現量を算出した。

### 7. 糞中脂肪酸量の測定

糞中脂肪酸量の測定は、Jeejeebhoy ら<sup>19)</sup>の方法に従って行った。糞中中性ステロイドおよび胆汁酸量は、Sugano ら<sup>56)</sup>の方法に従って測定した。中性ステロイドおよび胆汁酸量の内部標準には、5 $\alpha$ -コレスタンと 23-ノルデオキシコール酸をそれぞれ用い、シグマアルドリッチジャパン株式会社製の Supelcowax (SPB™-1) カラム (30 m × 0.25 mm, 膜厚 0.25  $\mu$ m) を装着したガスクロマトグラフ (GC-2010Plus, 株式会社島津製作所) により定量した。検出器には水素イオン化検出器 (FID) を使用した。インジェクターおよびディテクター温度を 300°C とし、カラム温度は、中性ステロ

ルおよび胆汁酸それぞれ 250°C および 280°C とした。データの解析は GC solution (株式会社島津製作所) を用いた。

### 8. 統計処理

データの表現および統計処理は、第6章と同様である。

## 結果

### 1. 未熟ミカン混合発酵茶の 2 週間摂食における脂質代謝パラメーター

#### 1-1. 成長、摂食量および臓器重量

未熟ミカン混合発酵茶の 2 週間摂食におけるラットの体重、摂食量、肝臓重量、白色脂肪組織重量および褐色脂肪組織重量を表 7-2 に示す。摂食量は、コントロール群よりも、0.50%発酵茶添加群でやや少なかったが、明確な差は認められなかった。終体重に有意差はないものの、コントロール群と比べ、発酵茶添加群で低い傾向にあった。肝臓重量は、コントロール群と比較し、発酵茶添加群で低値を示したが、0.50%発酵茶添加群で有意であった。0.50%発酵茶添加群の睾丸周辺脂肪重量は、コントロール群に対し、顕著に低かったが、0.75%添加群との差はなかった。総白色脂肪組織重量は、コントロール群に比べ、有意差は認められなかったが、発酵茶添加群で少ない傾向にあった。褐色脂肪組織重量は、食餌による影響を受けなかった。

#### 1-2. 血清脂質濃度、血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度

血清脂質濃度、血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度を表 7-3 に示す。血清トリグリセリド濃度は、コントロール群と比較し、有意でないが、発酵茶添加群で低い傾向を示した。コントロール群と比較して、0.50%発酵茶添加群の血清コレステロールおよびリン脂質濃度が有意に低値を示したが、0.75%添加群の値は、コントロール群と 0.50%添加群の間であった。血清遊離脂肪酸濃度は、発酵茶添加量に依存して低かったが、有意差はなかった。血清グルコース濃度に、食餌の影響は観察されなかった。血清インスリンおよびレプチン濃度は、発酵茶添加群で、コントロール群よりも低い傾向にあったが、有意差は認められなかった。食餌の違いは、アディポネクチン濃度に明確な影響を及ぼさなかった。

#### 1-3. 肝臓脂質濃度

肝臓脂質濃度を表 7-4 に示す。肝臓トリグリセリド濃度は、発酵茶添加群で添加量依存的に低い傾向を示し、0.75%発酵茶添加群の肝臓トリグリセリド濃度は、有意でないが、コントロール群の

表7-1 肝臓におけるmRNA発現量測定に用いた遺伝子のプライマー塩基配列

遺伝子	Forward primer	Reverse primer
<i>36B4</i>	5'-GGTGTTTGACAATGGCAGCAT-3'	5'-ATTGCGGACACCCTCTAGGA3'
<i>FAS</i>	5'-TGCTCCCAGCTGCAGGC-3'	5'-GCCCGGTAGCTCTGGGTGTA-3'
<i>SREBP-1c</i>	5'-CATCGACTACATCCGCTTCTTACA-3'	5'-GTCCTTCAGTGATTGCTTTTGTGA-3'
<i>MTP</i>	5'-CGACGGTGACGATGATCAACT-3'	5'-TGACCCGCATTTTCGACATT-3'
<i>PPARα</i>	5'-AAGAGAATCCACGAAGCCTACCT-3'	5'-TGACAAAAGCGGATTGTTG-3'
<i>HMGCR</i>	5'-TGCAGAGAAAGGTGCGAAGTT-3'	5'-CGTCTCCATGAGGGTTTCCA-3'
<i>CYP7A1</i>	5'-TACTTCTGCGAAGGCATTTGG-3'	5'-ATCTCCCTGGAGGGTTTGG-3'
<i>LDLR</i>	5'-GATCCCCAACCTGAAGAATGTG-3'	5'-CACGGCGCTGTAGATCTTCTC-3'

*36B4*, Acidic ribosomal protein P0; *FAS*, Fatty acid synthase; *SREBP-1c*, Sterol regulatory element-binding protein-1c; *MTP*, Microsomal triglyceride transfer protein; *PPARα*, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *HMGCR*, HMG-CoA reductase; *CYP7A1*, Cholesterol 7α-hydroxylase; *LDLR*, Low density lipoprotein receptor

表7-2 2週間摂食後の体重, 摂食量, 肝臓重量および脂肪組織重量

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
初体重 (g)	149 ± 3	149 ± 3	149 ± 3
終体重 (g)	260 ± 3	249 ± 10	252 ± 8
摂食量 (g/日)	19.6 ± 0.7	18.3 ± 1.0	19.8 ± 0.8
肝臓重量 (g/100 g体重)	4.26 ± 0.09 <sup>b</sup>	3.88 ± 0.11 <sup>a</sup>	3.96 ± 0.07 <sup>ab</sup>
白色脂肪組織重量 (g/100 g体重)			
腎周辺	1.11 ± 0.12	0.93 ± 0.07	0.95 ± 0.17
辜丸周辺	1.01 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.07 <sup>ab</sup>
腸間膜周辺	0.87 ± 0.03	0.75 ± 0.06	0.79 ± 0.09
合計	2.98 ± 0.15	2.50 ± 0.15	2.63 ± 0.31
褐色脂肪組織重量 (g/100 g体重)	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.02

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

<sup>ab</sup>異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

表7-3 2週間摂食後の血清脂質濃度, 血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度

脂質	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
トリグリセリド (mg/dL)	210 ± 35	147 ± 27	159 ± 40
コレステロール (mg/dL)	79.7 ± 3.5 <sup>b</sup>	64.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	70.5 ± 3.3 <sup>ab</sup>
リン脂質 (mg/dL)	166 ± 10 <sup>b</sup>	125 ± 7 <sup>a</sup>	133 ± 11 <sup>ab</sup>
遊離脂肪酸 (mEq/L)	1.29 ± 0.21	1.05 ± 0.12	0.98 ± 0.13
グルコース (mg/dL)	104 ± 6	100 ± 9	104 ± 9
ホルモン			
インスリン (ng/mL)	0.35 ± 0.11	0.27 ± 0.05	0.29 ± 0.07
レプチン (ng/mL)	3.64 ± 0.82	1.67 ± 0.64	2.81 ± 1.13
アディポネクチン (μg/mL)	5.71 ± 0.36	5.30 ± 0.31	5.78 ± 0.21

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

<sup>ab</sup>異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

表7-4 2週間摂食後の肝臓脂質濃度 (mg/g liver)

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
トリグリセリド	32.9 ± 8.3	18.4 ± 3.8	17.0 ± 3.9
コレステロール	3.69 ± 0.28 <sup>b</sup>	2.88 ± 0.21 <sup>ab</sup>	2.56 ± 0.17 <sup>a</sup>
リン脂質	15.3 ± 0.5	15.7 ± 0.6	15.0 ± 0.5

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

<sup>ab</sup>異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

約 2 分の 1 であった。肝臓コレステロール濃度は、発酵茶の添加量依存的に低く、コントロール群に対し、0.75%発酵茶添加群で有意に低値を示したが、0.50%添加群とコントロール群に有意差はなかった。肝臓リン脂質濃度に、群間で明確な差はなかった。

#### 1-4. 肝臓における脂肪合成酵素活性ならびに肝臓および褐色脂肪組織の脂肪酸分解酵素活性

肝臓における脂肪合成酵素活性ならびに肝臓および褐色脂肪組織の脂肪酸分解酵素活性を表 7-5 に示す。脂肪酸合成酵素活性は、有意でないが、発酵茶添加群で添加量依存的に低い傾向を示した。マリックエンザイムおよびグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性は、発酵茶添加群で低値を示したが、有意差は認められなかった。ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ活性は、食餌による影響を受けなかった。肝臓のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は、コントロール群と比べ、0.50%発酵茶添加群で高い傾向を示したが、0.75%添加群とコントロール群の間に差はなかった。褐色脂肪組織におけるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は、コントロール群と比較し、0.50%発酵茶添加群で低い傾向にあったが、0.75%添加群とコントロール群は、ほぼ同値であった。

#### 1-5. 肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現量

表 7-6 に肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現量を示す。有意差は認められなかったが、脂肪酸合成酵素である *FAS* ならびに転写調節因子である *SREBP-1c* の遺伝子発現量は、コントロール群と比べ、0.50%発酵茶添加群で低い傾向を示し、0.75%添加群はコントロール群とほぼ同値であった。リポタンパク質分泌に関与する膜タンパク質の *MTP* 遺伝子発現量は、発酵茶の添加量依存的に高く、0.50 および 0.75%発酵茶添加群ともにコントロール群の 2 倍以上であったが、有意差はなかった。核内受容体である *PPARα* 遺伝子発現量は、発酵茶添加群で、コントロール群の 2 倍程度

高い傾向を示したが、有意差は認められなかった。コレステロール合成系の酵素である *HMGCR* 遺伝子発現量に各群間で顕著な差はなかったが、発酵茶の添加量依存的に高い傾向にあり、特に 0.75%発酵茶添加群の発現量は、コントロール群の 2.4 倍であった。代謝系酵素である *CYP7A1* 遺伝子発現量も、発酵茶の添加量に依存して高い傾向にあり、0.50 および 0.75%発酵茶添加群の発現量は、コントロール群の 2 倍以上であったが、有意差はなかった。リポタンパク質受容体である *LDLR* 遺伝子発現量は、発酵茶添加群で低い傾向を示したが、明確な差は認められなかった。

#### 1-6. 糞重量、糞中脂肪酸およびステロイド排泄量

糞重量、糞中の脂肪酸およびステロイド排泄量を表 7-7 に示す。糞重量に群間で差は観察されなかった。脂肪酸排泄量は、発酵茶添加群で添加量依存的に少ない傾向を示したが、明確な影響でなかった。中性ステロイド、酸性ステロイドおよび総ステロイド量は、コントロール群に比べ、発酵茶添加群でわずかに低値であったが、有意差は認められなかった。

### 2. 未熟ミカン混合発酵茶の 4 週間摂食における脂質代謝パラメーター

#### 2-1. 成長、摂食量および臓器重量

未熟ミカン混合発酵茶の 4 週間摂食におけるラットの体重、摂食量、肝臓重量、白色脂肪組織重量および褐色脂肪組織重量を表 7-8 に示す。摂食量は、コントロール群よりも、0.50%発酵茶添加群でやや少なかったものの、有意差はなかった。終体重は、コントロール群に比べて、発酵茶添加群で有意に低値を示したが、0.50%発酵茶添加群と 0.75%添加群の差はなかった。肝臓重量に食餌の影響は認められなかった。白色脂肪組織重量は、発酵茶添加群で濃度依存的に低い傾向を示したが、コントロール群との有意差はなかった。褐色脂肪組織重量に食餌による影響は認められなかった。

表7-5 2週間摂食後の肝臓、褐色脂肪組織における脂肪酸合成酵素活性および脂肪酸分解酵素活性 (nmol/min/mg protein)

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
<b>脂肪酸合成酵素活性</b>			
脂肪酸合成酵素	4.83 ± 1.00	3.00 ± 0.58	2.79 ± 0.54
マリックエンザイム	50.3 ± 8.6	43.2 ± 4.0	44.3 ± 3.8
グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ	47.7 ± 11.0	34.7 ± 3.8	35.0 ± 4.2
ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ	33.2 ± 2.8	32.9 ± 3.2	39.8 ± 2.8
<b>脂肪酸分解酵素活性</b>			
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ			
肝臓	4.68 ± 0.37	5.70 ± 1.31	4.51 ± 0.45
褐色脂肪組織	10.56 ± 1.13	8.39 ± 0.69	10.76 ± 0.40

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

表7-6 2週間摂食後の肝臓における脂肪酸およびコレステロール合成、分解に関する酵素の相対的遺伝子発現量

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
relative expression			
<i>FAS</i>	1.00 ± 0.22	0.62 ± 0.26	1.22 ± 0.43
<i>SREBP-1c</i>	1.00 ± 0.12	0.76 ± 0.28	1.09 ± 0.40
<i>MTP</i>	1.00 ± 0.77	2.10 ± 0.77	2.30 ± 0.98
<i>PPARα</i>	1.00 ± 0.33	2.08 ± 0.68	1.94 ± 0.84
<i>HMGCR</i>	1.00 ± 0.09	1.41 ± 0.38	2.40 ± 0.71
<i>CYP7A1</i>	1.00 ± 0.47	2.04 ± 0.72	2.27 ± 1.45
<i>LDLR</i>	1.00 ± 0.35	0.58 ± 0.11	0.81 ± 0.20

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

表7-7 2週間摂食後の糞重量および糞中の脂肪酸、中性ステロイド、酸性ステロイド排泄量

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
乾燥糞重量 (g/日)	1.53 ± 0.08	1.57 ± 0.09	1.83 ± 0.08
脂肪酸排泄量 (mg/日)	69.6 ± 12.7	50.5 ± 11.9	49.9 ± 6.6
<b>ステロイド排泄量</b>			
中性ステロイド (mg/日)	5.65 ± 0.6	4.44 ± 0.32	4.86 ± 0.58
酸性ステロイド (mg/日)	19.2 ± 3.4	15.9 ± 3.4	17.3 ± 3.7
総ステロイド (mg/日)	24.9 ± 2.1	20.4 ± 3.5	22.5 ± 4.1

平均値 ± 標準誤差 (n=6)



表7-8 4週間摂食後の体重, 摂取量, 肝臓重量および脂肪組織重量

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
初体重 (g)	149 ± 3	149 ± 3	149 ± 2
終体重 (g)	389 ± 7 <sup>b</sup>	340 ± 9 <sup>a</sup>	357 ± 10 <sup>a</sup>
摂取量 (g/日)	22.0 ± 0.6	20.2 ± 0.6	21.3 ± 0.7
肝臓重量 (g/100 g体重)	3.77 ± 0.12	3.90 ± 0.15	3.81 ± 0.08
白色脂肪組織重量 (g/100 g体重)			
腎周辺	1.67 ± 0.21	1.19 ± 0.08	1.20 ± 0.21
辜丸周辺	1.34 ± 0.12	1.18 ± 0.06	1.15 ± 0.07
腸間膜周辺	1.04 ± 0.05	0.97 ± 0.05	0.95 ± 0.12
合計	4.05 ± 0.29	3.34 ± 0.15	3.30 ± 0.39
褐色脂肪組織重量 (g/100 g体重)	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.02

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

<sup>ab</sup>異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

## 2-2. 血清脂質濃度, 血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度

血清脂質濃度, 血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度を表 7-9 に示す。血清トリグリセリド, コレステロールおよびリン脂質濃度は, 有意でないものの, コントロール群に比べ, 発酵茶添加群で低値を示した。発酵茶添加群の血清遊離脂肪酸濃度は, コントロール群よりも有意に低値で, 0.50%発酵茶添加群と 0.75%添加群は同値であった。血清グルコース濃度に, 群間で差は認められなかった。血清インスリンおよびレプチン濃度は, 発酵茶の添加量依存的に低い傾向を示したが, 有意差は観察されなかった。0.50%発酵茶添加群のアディポネクチン濃度は, コントロール群よりも高い傾向にあったが, 0.75%添加群はコントロール群とほぼ同値を示した。

## 2-3. 肝臓脂質濃度

肝臓脂質濃度を表 7-10 に示す。肝臓トリグリセリドおよびコレステロール濃度は, 発酵茶の添加量依存的に低く, コントロール群に対し, 0.75%発酵茶添加群で有意に低値を示したが, 0.50%添加群とコントロール群の間に有意差はなかった。肝臓リン脂質濃度も発酵茶の添加量に依存して低い傾向にあったが, 群間で明確な差は認められなかった。

## 2-4. 肝臓における脂肪合成酵素活性並びに肝臓および褐色脂肪組織の脂肪酸分解酵素活性

肝臓における脂肪合成酵素活性ならびに肝臓および褐色脂肪組織の脂肪酸分解酵素活性を表 7-11 に示す。脂肪酸合成酵素活性に群間で差は認

められなかったが, 発酵茶の添加量依存的に低い傾向を示した。マリックエンザイムおよびグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性は, コントロール群に比べ, 発酵茶添加群でわずかに高かったが, 明確な差でなかった。ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ活性は, コントロール群よりも 0.50%発酵茶添加群で高い傾向を示し, 0.75%添加群はコントロール群とほぼ同値を示した。肝臓のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は, コントロール群よりも発酵茶添加群でわずかに高い傾向を示したが, 明確な差はなかった。褐色脂肪組織のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は, 0.50%発酵茶添加群で高い傾向を示し, 0.75%添加群では低値を示したが, いずれも有意差は認められなかった。

## 2-5. 肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現量

表 7-12 に肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現量を示す。発酵茶添加群の *FAS* 遺伝子発現量は, コントロール群の 2 倍以上であったが, 有意差は観察されなかった。*SREBP-1c* 遺伝子発現量も, 発酵茶添加群で高値を示し, 0.50%添加群の発現量はコントロール群の 2 倍以上であったが, 有意差は認められなかった。*MTP* および *PPARα* 遺伝子発現量は, コントロール群と比較し, 発酵茶添加群で低かったが, 有意差はなかった。発酵茶添加群の *HMGCR* 遺伝子発現量に顕著な差はみられなかったが, コントロール群の 2 倍高値であった。*CYP7A1* 遺伝子発現量は, 0.50%発酵茶添加群でコントロール群の 4.4 倍, 0.75%添加群で 3 倍高値であったが, いずれも有意差は認められなかった。*LDLR* 遺伝子発現量は, 発酵茶の添加

表7-9 4週間摂食後の血清脂質濃度, 血清グルコース濃度および血清ホルモン濃度

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
<b>脂質</b>			
トリグリセリド (mg/dL)	267 ± 22	207 ± 18	230 ± 18
コレステロール (mg/dL)	94.2 ± 5.4	79.2 ± 4.2	83.9 ± 7.7
リン脂質 (mg/dL)	145 ± 7	123 ± 6	131 ± 8
遊離脂肪酸 (mEq/L)	1.15 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.06 <sup>a</sup>
グルコース (mg/dL)	105 ± 8	113 ± 2	106 ± 4
<b>ホルモン</b>			
インスリン (ng/mL)	0.79 ± 0.12	0.61 ± 0.10	0.41 ± 0.70
レプチン (ng/mL)	6.19 ± 1.11	4.70 ± 0.43	4.01 ± 0.70
アディポネクチン (μg/mL)	4.85 ± 0.40	5.38 ± 0.53	4.83 ± 0.52

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

<sup>ab</sup> 異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

表7-10 4週間摂食後の肝臓脂質濃度 (mg/g liver)

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
トリグリセリド	33.5 ± 6.9 <sup>b</sup>	20.1 ± 2.6 <sup>ab</sup>	13.8 ± 2.2 <sup>a</sup>
コレステロール	4.14 ± 0.50 <sup>b</sup>	3.01 ± 0.19 <sup>ab</sup>	2.49 ± 0.13 <sup>a</sup>
リン脂質	15.5 ± 0.4	14.1 ± 0.8	13.3 ± 0.4

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

<sup>ab</sup> 異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

表7-11 4週間摂食後の肝臓, 褐色脂肪組織における脂肪酸合成酵素活性および脂肪酸分解酵素活性 (nmol/min/mg protein)

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
<b>脂肪酸合成酵素活性</b>			
脂肪酸合成酵素	3.51 ± 0.60	3.01 ± 0.93	2.83 ± 0.47
マリックエンザイム	36.9 ± 5.7	48.5 ± 9.4	42.2 ± 5.1
グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ	39.3 ± 5.8	42.6 ± 8.9	46.2 ± 7.2
ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ	38.5 ± 3.0	47.6 ± 7.6	35.8 ± 3.0
<b>脂肪酸分解酵素活性</b>			
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ			
肝臓	4.51 ± 0.48	5.24 ± 0.63	4.73 ± 0.97
褐色脂肪組織	9.94 ± 0.37	11.85 ± 1.50	8.79 ± 0.96

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

表7-12 4週間摂食後の肝臓における脂肪酸およびコレステロール合成、分解に関する酵素の相対的遺伝子発現量

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
		relative expression	
<i>FAS</i>	1.00 ± 0.28	2.94 ± 1.60	2.28 ± 1.00
<i>SREBP-1c</i>	1.00 ± 0.21	2.19 ± 0.65	1.65 ± 0.53
<i>MTP</i>	1.00 ± 0.17	0.31 ± 0.09	0.60 ± 0.29
<i>PPARα</i>	1.00 ± 0.29	0.41 ± 0.12	0.54 ± 0.25
<i>HMGCR</i>	1.00 ± 0.21	1.95 ± 0.64	1.99 ± 0.51
<i>CYP7A1</i>	1.00 ± 0.20	4.40 ± 1.68	2.95 ± 0.52
<i>LDLR</i>	1.00 ± 0.19	1.15 ± 0.28	1.50 ± 0.36

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

量に依存して、高い傾向を示したが、明確な差でなかった。

#### 2-6. 糞重量、糞中脂肪酸およびステロイド排泄量

糞重量、糞中の脂肪酸およびステロイド排泄量を表7-13に示す。0.50%発酵茶添加群の糞重量は、コントロール群よりも少ない傾向にあったが、有意差は認められず、0.75%添加群はコントロール群とほぼ同値であった。脂肪酸排泄量は、コントロール群に比べて、発酵茶の添加量依存的に低く、添加量 0.75%で有意に低値を示したが、0.50%発酵茶添加群にコントロール群との有意差は認められなかった。中性ステロイド排泄量は、発酵茶の添加量依存的に低値であったが、顕著な差でなかった。酸性ステロイド排泄量は、有意でないものの、コントロール群と比較し、0.50%発酵茶添加群で多かった。総ステロイド量に有意差はなかったが、0.50%発酵茶添加群で多く、0.75%添加群とコントロール群の値は同レベルであった。

#### 考察

前章において、未熟ミカン混合発酵茶は、素材であるミカン未熟果や緑茶よりも強い肝臓トリグリセリド濃度低下作用を有することが明らかになったことから、本章では、未熟ミカン混合発酵茶の添加量の違いが、脂質濃度低下作用に及ぼす影響を明らかにするとともに、脂質濃度低下のメカニズムを検討することを目的として実験を行った。

未熟ミカン混合発酵茶の2週間摂取で、肝臓重量、睾丸周辺脂肪重量、血清コレステロールおよびリン脂質濃度は、コントロール群よりも低値を示したが、このときの発酵茶の食餌への添加量は0.50%であり、添加量 0.75%では有意な差でな

かった(表7-2および7-3)。4週間試験では、0.50あるいは0.75%の未熟ミカン混合発酵茶添加群いずれも、肝臓および脂肪重量や血清脂質濃度に、コントロール群との差は認められなかった(表7-8および7-9)。0.50%の未熟ミカン混合発酵茶添加群で、肝臓および脂肪重量や血清脂質濃度に対する効果が不安定であったのは、コントロール群よりも、0.50%発酵茶添加群で摂食量がやや少ない傾向にあったためと推察される。未熟ミカン混合発酵茶の4週間摂取で、終体重や血清遊離脂肪酸濃度は、コントロール群よりも有意に低値であったが(表7-8および7-9)、2週間試験の場合、その差は明確でなかった(表7-2および7-3)。ただし、0.50%の未熟ミカン混合発酵茶添加群の摂食量はやや少ないため、このことが終体重や血清遊離脂肪酸濃度低下に影響を及ぼした可能性は否定できない。少なくとも、0.75%の未熟ミカン混合発酵茶を含む飼料を、2週間より長い期間、ラットに摂取させることにより、体重増加抑制や血清脂質濃度低下作用が発現すると推察できる。しかし、0.50%の未熟ミカン混合発酵茶添加群で摂食量がやや少なかった要因については明らかでなく、今後、再現性の実験が必要である。

これまでに、三番茶葉とピワ葉を混ぜて作った混合発酵茶は、4週間の摂取期間で効果的にラットの肝臓トリグリセリド濃度を低下させることが明らかにされており、その作用機序は、肝臓における脂肪合成抑制と小腸からの脂肪吸収抑制により発揮されることが示唆されている<sup>61)</sup>。第6章の結果より、未熟ミカン混合発酵茶摂取においても、同様のメカニズムで肝臓脂質濃度の低下が起こっていると推察した。

本実験において、未熟ミカン混合発酵茶添加群の肝臓トリグリセリド濃度は、いずれの摂取期間でも、発酵茶の添加量依存的に低値を示し、4週

表7-13 4週間摂食後の糞重量および糞中の脂肪酸, 中性ステロイド, 酸性ステロイド排泄量

	コントロール群	未熟ミカン混合発酵茶添加群	
		0.50%	0.75%
乾燥糞重量 (g/日)	1.85 ± 0.1	1.42 ± 0.16	1.82 ± 0.22
脂肪酸排泄量 (mg/日)	54.3 ± 5.6 <sup>b</sup>	43.0 ± 8.6 <sup>ab</sup>	29.9 ± 4.1 <sup>a</sup>
ステロイド排泄量			
中性ステロイド (mg/日)	5.36 ± 0.44	4.63 ± 0.58	4.11 ± 0.45
酸性ステロイド (mg/日)	21.9 ± 2.9	37.5 ± 10.5	24.8 ± 9.0
総ステロイド (mg/日)	27.2 ± 2.7	42.1 ± 10.0	28.9 ± 9.3

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

<sup>ab</sup>異なる文字間に有意差あり (p < 0.05)

間試験での 0.75% 添加群で有意差が認められた (表 7-4 および 7-10). しかし, 未熟ミカン混合発酵茶の添加量を 0.50% にすると, 明確な効果は発揮されなかったことから, 肝臓トリグリセリド濃度低下作用を発揮する発酵茶の食餌への添加量は 0.50% よりも多くする必要があることが明らかとなった. 肝臓での脂肪酸合成酵素活性は, 未熟ミカン混合発酵茶の添加量に依存して低い傾向を示すのに対し, 脂肪酸分解酵素であるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼの活性に, 未熟ミカン混合発酵茶摂取による明確な影響は観察されなかった (表 7-5 および 7-11). また, 糞中への脂肪酸排泄量は, 未熟ミカン混合発酵茶の添加量に依存して少ない (表 7-7 および 7-13). Han ら<sup>11)</sup> や Ikeda ら<sup>16)</sup> は, 小腸からの脂肪の吸収遅延が起こることで, 内臓への脂質沈着が抑制されることを報告している. ピワ葉混合発酵茶や緑茶を, 油脂とともに胃内に投与したラットにおいて, 油脂投与後 1 時間から 2 時間の血清トリグリセリド濃度の上昇が抑制され, この作用は, 小腸からの脂肪の吸収阻害や吸収遅延によって惹起される可能性が高いことが Tanaka ら<sup>61)</sup> によって示唆されている. 未熟ミカン混合発酵茶摂取ラットの糞中への脂肪酸排泄量は増加しなかったものの, 混合発酵茶は, 緑茶と同程度のリパーゼ阻害活性を有するため, 小腸からの脂肪の吸収遅延が起こった可能性は大いに考えられる. そのため, 未熟ミカン混合発酵茶摂取による体重増加の抑制や肝臓トリグリセリド濃度の低下は, 脂肪酸の  $\beta$  酸化亢進によるものではなく, 肝臓での脂肪合成抑制および小腸における脂肪吸収の阻害 (遅延) によって一部発揮されたと考えられる. 肝臓のトリグリセリドが VLDL として血中へ分泌され, リポ蛋白リパーゼの作用により外組織に取り込まれてエネルギー源として使われた可能性もあるが, 未熟ミカン混合発酵茶の与する肝

臓トリグリセリド濃度低下作用の詳細なメカニズムについては, 今後更なる検証を行う必要がある.

酵素は, 機能発現に至る過程で, DNA の転写, 翻訳, リン酸化等の修飾を受ける. 未熟ミカン混合発酵茶の摂取による, 肝臓の脂肪酸合成酵素活性の変動の一因として, 修飾の過程での酵素活性が影響している可能性がある. そこで, 未熟ミカン混合発酵茶摂取における脂質代謝関連酵素の転写段階への影響を検討した. しかし, 2 および 4 週間の試験ともに, *FAS* 遺伝子発現と *FAS* の転写調節因子である *SREBP-1c* 遺伝子発現の変動はおおむね一致したものの, これら遺伝子発現量は未熟ミカン混合発酵茶摂取で亢進する傾向にあり, 酵素活性とは一致しなかった (表 7-5, 7-6, 7-11 および 7-12). これまでに, 柑橘系フラボノイド類は, カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性および *PPAR $\alpha$*  の遺伝子発現を亢進させることが報告されている<sup>4)</sup>. *PPAR $\alpha$*  は主に, 脂肪酸の  $\beta$  酸化亢進に関連する核内受容体であるが, 本研究においては, *PPAR $\alpha$*  遺伝子発現とカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性の変動も一致しなかった (表 7-5, 7-6, 7-11 および 7-12). これら遺伝子が転写された後に, 翻訳やリン酸化時にも何らかの修飾が起こり, 酵素活性が調節されたため, 遺伝子発現と酵素活性が異なる変動を示した可能性がある.

いずれの摂取期間においても, 未熟ミカン混合発酵茶の摂取で, 肝臓コレステロール濃度は添加量依存的に低値を示した (表 7-4 および 7-10). 肝臓コレステロール濃度は, 0.75% の未熟ミカン混合発酵茶添加量で, コントロール群よりも有意に低かったが, 添加量 0.50% の場合, 有意差は認められなかった. 紅茶ポリフェノールの摂取は, ラットの肝臓コレステロール濃度を有意に低下させ, この効果が糞中へのステロイド排泄量の増加により一部誘導されていることを, Miyata ら<sup>39)</sup>

は明らかにしている。コレステロールの異化に関わる *CYP7A1* 遺伝子発現量は、未熟ミカン混合発酵茶添加群で高い傾向にあった (表 7-6 および 7-12)。しかし、胆汁酸 (酸性ステロイド) 排泄量は、4 週間摂取後の 0.50% 未熟ミカン混合発酵茶添加群において、わずかに多い傾向にあったものの、顕著な影響は認められなかった (表 7-7 および 7-13)。このことから、未熟ミカン混合発酵茶による肝臓コレステロール濃度低下作用は、ステロイド排泄の増加によって引き起こされたものでないことが明らかとなった。ヘスペリジンはコレステロール生合成の律速酵素である *HMGCR* 活性を阻害することが報告されているが<sup>11)</sup>、本実験において、肝臓における *HMGCR* 遺伝子発現量は、いずれの摂取期間でも、未熟ミカン混合発酵茶摂取で高い傾向にあった (表 7-7 および 7-13)。未熟ミカン混合発酵茶群で肝臓コレステロール濃度が低いことで、コレステロール生合成遺伝子発現量を亢進させた可能性も考えられるが、未熟ミカン混合発酵茶による肝臓コレステロール濃度低下作用が、コレステロール合成の抑制により誘導されたものかどうかを本実験の結果から推察することはできない。MTP は肝臓で生成したコレステロールやトリグリセリドを VLDL として肝外へ放出させる膜タンパク質であるが、摂取期間 2 週間で、未熟ミカン混合発酵茶の添加量に依存して、遺伝子発現量は高まる傾向が観察された (表 7-7)。しかし、4 週間摂取の場合、未熟ミカン混合発酵茶添加群の *MTP* 遺伝子発現量は、コントロール群よりも低い傾向にあった (表 7-13)。また、血中 LDL コレステロールを細胞内に取り込む役割を担う *LDLR* 遺伝子の発現量は、未熟ミカン混合発酵茶の 4 週間摂取において、添加量依存的に高い傾向を示したが (表 7-13)、摂取 2 週間では、発酵茶添加群で低い傾向にあった (表 7-7)。したがって、2 週間と 4 週間の摂取で、未熟ミカン混合発酵茶による肝臓コレステロール濃度低下メカニズムが異なる可能性もあるが、詳細なメカニズムは不明である。

未熟ミカン混合発酵茶は、茶葉由来のカテキン類、カテキン類の酸化によって生成した紅茶ポリフェノール類およびミカン未熟果由来のヘスペリジンを含んでいる。これら成分が肝臓脂質濃度低下作用を発揮するためには、体内へ吸収される必要があるが、吸収に関する知見は比較的少ない。茶カテキン類を経口摂取すると、大部分はそのまま消化管を通過して排泄されるが、一部が小腸から吸収される<sup>116)</sup>。吸収されたカテキン類は、一部が粘膜上皮細胞で抱合を受け、肝臓において、さらにその一部が抱合された後、抱合型カテキン類は、肝臓から胆汁に分泌され、腸管循環し、最終的に尿中に排出される。一方、紅茶ポリフェノール類の吸収や排泄に関する研究は非常に少な

い。また、ヘスペリジンは、腸内細菌が産生する  $\beta$ -グルコシダーゼの作用で、ヘスペレチンと糖に加水分解されてから吸収されることが報告されている<sup>69)</sup>。血中では、ヘスペレチン抱合体として検出され、ヘスペレチン抱合体の血中濃度はヘスペリジン摂取後 4 から 6 時間目に最大となり、24 時間後には消失する<sup>69)</sup>。ヘスペリジンにグルコースを転移した糖転移ヘスペリジンは、ヘスペリジンよりも血中のヘスペリジン抱合体量が 4 倍程度増加することが報告されている<sup>69)</sup>。したがって、未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンも、その溶解性の向上によって、腸管からの吸収性が増加する可能性があるが、本研究においては検証できていない。また、成分同士の相互作用によって、それぞれの吸収性に変動が生じる可能性もあるため、未熟ミカン混合発酵茶摂取による腸管からの成分吸収動態と生体に及ぼす影響を評価しなければならない。

第 6 章および本章の結果より、未熟ミカン混合発酵茶は、特に肝臓脂質濃度を効果的に減少させる作用を有することが明らかとなり、本作用が発揮されるために、発酵茶の食餌への添加量を 0.50% よりも多くする必要があることが示された。今後、未熟ミカン混合発酵茶摂取による肝臓脂質濃度低下の詳細なメカニズムを明らかにする必要がある。

## 第8章

## 総括

カテキン類の含量が多いため、渋みの強さなどから有効利用されていない緑茶三番茶葉と、摘果後に廃棄されるウンシュウミカン未熟果を混合揉捻することで新たな発酵茶を製造し、発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性を追究し、発酵茶の有する香味特性やカテキン類の酸化効率を向上させる製造条件の解明およびラット脂質代謝に及ぼす影響について検討した。

萎凋した三番茶葉とミカン未熟果を3:1の割合で混合し、20分間揉捻して製造した発酵茶に含まれるヘスペリジンの水、熱水およびエタノールへの溶解性が、ミカン未熟果単独よりも、4から5倍程度向上することを明らかにした。ヘスペリジンは多くの生体調節機能を有しているが、難溶性であることから、吸収されにくく、生体利用率は低い。未熟ミカン混合発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性が向上した理由として、カテキンや紅茶ポリフェノールなどの水溶性ポリフェノール類が、ヘスペリジンと疎水会合することにより、ヘスペリジン同士の結晶化を切り崩すことが一部要因として考えられた。この未熟ミカン混合発酵茶は、既存の緑茶製茶機械を用いて製造できることから、新たな設備投資が不要な上、短時間低コストでヘスペリジンの溶解性を向上できる利点がある。

次に本発酵茶の有する香味特性を、同じ三番茶葉から製造した紅茶と比較・追究した。未熟ミカン混合発酵茶の色調は、紅茶よりも弱い赤橙色で、ミカンのフルーティーな香りに関与するd-リモネンやオシメン異性体が、紅茶よりも多く検出された。また、茶葉の発酵に由来し、紅茶様の香りに関与するリナロールは紅茶と同程度含まれていた。したがって、未熟ミカン混合発酵茶は、ミカン由来のフルーティーな香りと茶葉の発酵に由来する紅茶様の香りが混合した独特の香り特性を呈することが示唆された。味認識装置による分析において、未熟ミカン混合発酵茶の渋味推定値は紅茶よりも低値を示し、官能検査においても、本発酵茶の渋味は弱く、飲み口や後味に対する嗜好性は高かった。また、ミカン未熟果に由来する酸味を有しており、未熟ミカン混合発酵茶は、従来の紅茶と異なる優れた香味特性を有することが示された。

発酵茶を製造するうえで最も時間を要する工程は茶葉の萎凋であるが、紅茶の製造があまり盛んでないわが国においては、自然萎凋が主流である。しかし、自然萎凋は、専用の萎凋機械で処理

する方法と比較し、4倍程度の長い工程時間を必要とする。そこで、製茶機械である粗揉機を用いて、三番茶葉に75°Cの熱風を当て攪拌することで、従来の紅茶製造であれば24時間要する茶葉の萎凋を20分で完了させることを可能にした。また、果汁工場の所有するスライス機械でスライスしたミカン未熟果と萎凋した三番茶葉を混合揉捻することで、手作業による未熟果のスライス物を使用した未熟ミカン混合発酵茶と比べ、d-リモネンをはじめとする主要な香り成分が増加することを見出した。その結果、品質の高い未熟ミカン混合発酵茶を、短時間、低コストで製造することが可能となり、企業との連携や技術移転も容易になると考えられる。

未熟ミカン混合発酵茶は、可溶性ヘスペリジン、茶葉由来のカテキン類およびカテキン類の酸化によって生成した紅茶ポリフェノール類を含むことから、ラット脂質代謝に及ぼす影響について追究した。

はじめに、未熟ミカン混合発酵茶が、脂質代謝改善効果を発現するラットの食餌条件を設定することを目的に、基本食の組成や摂取期間の違いが、ラットの脂質代謝にどのように影響するかを検討した。AIN-93G組成を基本食として、未熟ミカン混合発酵茶葉熱水抽出物の凍結乾燥粉末を0.50から1.0%添加した食餌をラットに摂取させると、体重増加の抑制、血清および肝臓トリグリセリド濃度の低下が観察された。しかし、未熟ミカン混合発酵茶の添加量が1.0%の場合、摂取量が低下することから、食餌への添加量を0.75%に設定した。また、短期間の未熟ミカン混合発酵茶摂取でも、血清トリグリセリド濃度低下作用が発揮される可能性があることが示された。そこで、摂取期間を2あるいは4週間として、未熟ミカン混合発酵茶が脂質濃度に及ぼす影響を、素材であるミカン未熟果および三番茶葉から製造した緑茶と比較・追究した。未熟ミカン混合発酵茶は、ミカン未熟果や緑茶よりも強い肝臓トリグリセリド濃度低下作用が観察され、この作用は2および4週間のいずれの期間でも発現した。肝臓トリグリセリド濃度は、未熟ミカン混合発酵茶の添加量に依存して低値を示したが、発酵茶の添加レベルが0.50%になると、顕著な効果は発揮されなかった。未熟ミカン混合発酵茶の添加量に依存して、肝臓での脂肪酸合成酵素活性は低い傾向を示した。また、未熟ミカン混合発酵茶を摂取させたラットにおいて、糞中への脂肪酸排泄は促進されな

かったが、混合発酵茶は、緑茶と同程度の膵リパーゼ阻害活性を示した。未熟ミカン混合発酵茶による肝臓トリグリセリド濃度低下作用は、肝臓での脂肪酸合成の抑制および小腸における脂肪吸収の阻害（遅延）によって一部発揮されると推察された。さらに、未熟ミカン混合発酵茶の摂取で、肝臓コレステロール濃度も発酵茶の添加量に依存して顕著に低下した。このような肝臓脂質濃度低下効果は、本発酵茶に含まれるヘスペリジン、カテキン類および紅茶ポリフェノール類が複合的に作用することで、惹起されると考えられる。

本研究は、低・未利用資源の三番茶葉とミカン未熟果を有効活用して、香味の優れる発酵茶の製造法を確立したもので、発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性が高まり、脂質代謝改善作用を有することが明らかになった。廃棄される地域資源を素材に、既存の製茶機械で美味しく機能性の高い発酵茶を製造することで、素材の高付加価値化や地域産業の振興ならびに国民の健康増進の一助になることを願うものである。

## 第9章

## 摘要

有効利用されていない緑茶三番茶葉とウンシュウミカン未熟果を混合揉捻することで新たな発酵茶を製造し、発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性を追究後、発酵茶の有する香味特性やカテキン類の酸化効率を向上させる製造条件の解明およびラット脂質代謝に及ぼす影響について検討した。

1. 三番茶葉とミカン未熟果を3:1の割合で混合し、20分間揉捻して製造した発酵茶に含まれるヘスペリジンの溶解性が向上することを明らかにした。
2. 未熟ミカン混合発酵茶は、フルーティーな香りと紅茶様の香りが混合した香気特性を呈した。また、本発酵茶の渋味は弱く、ミカン未熟果に由来する酸味を有しており、従来の紅茶と異なる優れた香味特性を有することが示された。
3. 粗揉機とスライス機械を用いて調整した三番茶葉とミカン未熟果を混合揉捻することにより、品質の高い未熟ミカン混合発酵茶を製造することを可能とした。
4. AIN-93G組成を基本食として、未熟ミカン混合発酵茶葉熱水抽出物の凍結乾燥粉末を添加した食餌をラットに摂取させると、血清および肝臓トリグリセリド濃度の低下が観察された。
5. ラットにおいて、未熟ミカン混合発酵茶は、ミカン未熟果や緑茶よりも強い肝臓トリグリセリド濃度低下作用が観察され、この作用は2および4週間のいずれの摂食期間でも発現した。
6. ラットの肝臓トリグリセリド濃度は、未熟ミカン混合発酵茶の添加量に依存して低値を示し、肝臓での脂肪酸合成酵素活性は低い傾向を示した。未熟ミカン混合発酵茶による肝臓トリグリセリド濃度低下作用は、肝臓での脂肪酸合成の抑制および小腸における脂肪吸収の阻害(遅延)によって一部発揮されると推察された。



## 引用文献

- 1) Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutr.*, **129**, 1182-1185 (1999)
- 2) Borradaile NM, Carroll KK, Kurowska EM. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids.*, **34**, 591-598 (1999)
- 3) Chan PT, Fong WP, Cheung YL, Huang Y, Ho WK, Chen ZY. Jasmine green tea epicatechins are hypolipidemic in hamsters (*Mesocricetus auratus*) fed a high fat diet. *J. Nutr.*, **129**, 1094-1101 (1999)
- 4) Chanet A, Milenkovic D, Manach C, Mazur A, Morand C. Citrus flavanones: What is their role in cardiovascular protection? *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 8809-8822 (2012)
- 5) Charlton AJ, Davis AL, Jones DP, Lewis JR, Davies AP, Haslam E, Williamson MP. The self-association of the black tea polyphenol theaflavin and its complexation with caffeine. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**, 317-322 (2000)
- 6) Choi HS. Volatile constituents of satsuma mandarins growing in Korea. *Flav. Fragr. J.*, **19**, 406-412 (2004)
- 7) Du YT, Wang X, Wu XD, Tian WX. Keemun black tea extract contains potent fatty acid synthase inhibitors and reduces food intake and body weight of rats via oral administration. *J. Enzyme Inhib. Med. chem.*, **20**, 349-356 (2005)
- 8) Fallon E, Zhong L, Furane JK, Levitt MD. A mixture of extracts of black and green tea and mulberry leaf did not reduce weight gain in rats fed a high-fat diet. *Altern. Med. Rev.*, **13**, 43-49 (2008)
- 9) Folch L, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-506 (1957)
- 10) Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother. Res.*, **15**, 655-669 (2001)
- 11) Han LK, Kimura Y, Kawashima M, Takaku T, Taniyama T, Hayashi T, Zheng YN, Okuda H. Anti-obesity effects in rodents of dietary teasiponin, a lipase inhibitor. *Int. J. Obes.*, **25**, 1459-1464 (2001)
- 12) Hayashi N, Chen R, Ikezaki H, Ujihara T. Evaluation of the umami taste intensity of green tea by a taste sensor. *J. Agric. Food. Chem.*, **6**, 7384-7387 (2008)
- 13) Hayashi N, Ujihara T, Chen R, Irie K, Ikezaki H. Objective evaluation methods for the bitter and astringent taste intensities of black and oolong teas by a taste sensor. *Food Res. Technol. Res.*, **53**, 816-821 (2013)
- 14) Huang SW, Frankel EN. Antioxidant activity of tea catechins in different lipid system. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3033-3038 (1997)
- 15) Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim. Biophys. Acta.*, **29**, 141-146 (1992)
- 16) Ikeda I, Hamamoto R, Uzu K, Imaizumi K, Nagao K, Yanagita T, Suzuki Y, Kobayashi M, Kakuda T. Dietary gallate esters of tea catechins reduce deposition of visceral fat, hepatic triacylglycerol, and activities of hepatic enzymes related to fatty acid synthesis in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1049-1053 (2005)
- 17) Islam S, Choi H. Green tea, anti-diabetic or diabetogenic: A dose response study. *Biofactors.*, **29**, 45-53 (2007)
- 18) Ito Y, Ichikawa T, Morohoshi Y, Nakamura T, Saegusa Y, Ishihara K. Effect of tea catechins on body fat accumulation in rats fed a normal diet. *Biomed Res.*, **29**, 27-32 (2008)
- 19) Jeejeebhoy KN, Ahmad S, Kozak G. Determination of fecal fats containing both medium and long chain triglycerides and fatty acids. *Clin. Biochem.*, **3**, 157-163 (1970)
- 20) Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **38**, 1400-1403 (2006)
- 21) Kelly DS, Kletzien RF. Ethanol modulation of the hormonal and nutritional regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.*, **217**, 543-549 (1984)
- 22) Kelly DS, Nelson GJ, Hunt JE. Effect of prior nutritional status on the activity of lipogenic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.*, **235**, 87-90 (1986)
- 23) Kim HK, Jeong TS, Lee MK, Park YB, Choi MS. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin. Chim. Acta.*, **327**, 129-137 (2003)
- 24) Kishimoto K, Yagi M, Onozaki T, Yamaguchi H, Nakayama M, Naomi Oyama-Okubo. Analysis of scents emitted from flowers of interspecific hybrids between carnation and fragrant wild dianthus species. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **82**, 145-153 (2013)
- 25) Kobayashi A, Uchida A, Kawashima Y. Studies on the flavor of part. *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 1102-1105 (1966)
- 26) Kobayashi M, Unno T, Suzuki Y, Nozawa A, Sagesaka Y, Kakuda T, Ikeda I. Heat-epimerized tea catechins have the same cholesterol-lowering activity as green tea catechins in cholesterol-fed

- rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2455-2458 (2005)
- 27) Kobayashi-Hattori K, Mogi A, Matsumoto Y, Takita T. Effect of caffeine on the body fat and lipid metabolism of rats fed on a high-fat diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2219-2223 (2005)
- 28) Korthuis RJ, Gute DC. Adhesion molecule expression in postischemic microvascular dysfunction: activity of a micronized purified flavonoid fraction. *J. Vasc. Res.*, **36**, 15-23 (1999)
- 29) Kusano R, Andou H, Fujieda M, Tanaka T, Matsuo Y, Kouno I. Polymer-like polyphenols of black tea and their lipase and amylase inhibitory activities. *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 266-272 (2008)
- 30) Lee MS, Park JY, Freake H, Kwun IS, Kim Y. Green tea catechin enhances cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene expression in HepG2 cells. *Br. J. Nutr.*, **99**, 1182-1185 (2008)
- 31) Lin CL, Huang HC, Lin JK. Theaflavins attenuate hepatic accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells. *J. Lipid Res.*, **48**, 2334-2343 (2007)
- 32) Lin JK, Lin-Shiau SY. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**, 211-217 (2006)
- 33) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 34) Markwell MAK, McGroarty EJ, Bieber LL, Tolber NE. The subcellular distribution of carnitine acyltransferase in mammalian liver and kidney: a new peroxisomal enzyme. *J. Biol. Chem.*, **248**, 3426-3432 (1973)
- 35) Maron DJ, Lu GP, Cai NS, Wu ZG, Li YH, Chen H, Zhu JQ, Jin XJ, Wouters BC, Zhao J. Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract: a randomized controlled trial. *Arch. Intern. Med.*, **163**, 1448-1453 (2003)
- 36) Matsumoto N, Okushio K, Hara Y. Effect of black tea polyphenols on plasma lipids in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **44**, 337-342 (1998)
- 37) Matsuo Y, Yamada Y, Tanaka T, Kouno I. Enzymatic oxidation of gallicocatechin and epigallocatechin: Effects of C-ring configuration on the reaction products. *Phytochemistry.*, **69**, 3054-3061 (2008)
- 38) Miwa Y, Mitsuzumi H, Yamada M, Arai N, Tanabe F, Okada K, Kubota M, Chaen H, Sawayama T, Kibata M. Suppression of apolipoprotein B secretion from HepG2 cells by glucosylhesperidin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **52**, 223-231 (2006)
- 39) Miyata Y, Tanaka T, Tamaya K, Matsui T, Tamaru S, Tanaka K. Cholesterol-lowering effect of black tea polyphenols, theasinensin A and thearubigin, in rats fed high fat diet. *Food Sci. Technol. Res.*, **17**, 585-588 (2011)
- 40) Miyata Y, Tamaru S, Tanaka T, Tamaya K, Matsui T, Nagata Y, Tanaka K. Theaflavins and theasinensin A derived from fermented tea have antihyperglycemic and hypotriacylglycerolemic effects in KK-Ay mice and Sprague-Dawley rats. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 9366-9372 (2013)
- 41) Murray NJ, Williamson MP, Lilley TH, Haslam E. Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by 1H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **219**, 923-935 (1994)
- 42) Nakai M, Fukui Y, Asami S, Toyoda-Ono Y, Iwashita T, Shibata H and Mitsunaga T. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4593-4598 (2005)
- 43) Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian. J. Pharmacol.*, **33**, 2-16 (2001)
- 44) Nonaka G, Kawahara O, Nishioka I. Tannins and related compounds. XV. A new class of dimeric flavan-3-ol gallates, theasinensins A and B, and proanthocyanidin gallates from green tea leaf (1). *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3906-3914 (1983)
- 45) Ochoa S. Malic enzyme: malic enzymes from pigeon and wheat germ. In methods in Enzymology; Colowick, S. P., Kaplan, N. O., Eds. Academic Press, New York, pp.323-326 (1955)
- 46) Ohtsuki K, Abe A, Mitsuzumi H, Kondo M, Uemura K, Iwasaki Y, Kondo Y. Effects of long-term administration of hesperidin and glucosyl hesperidin to spontaneously hypertensive rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **49**, 447-450 (2002)
- 47) Oyama-Okubo N, Nakayama M, Ichimura K. Control of floral scent emission by inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase in cut flower of Lillium cv. 'Casa Blanca'. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **80**, 190-199 (2011)
- 48) Oyama-Okubo N, Tsuji T. Analysis of floral scent compounds and classification by scent quality in tulip cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **82**, 344-353 (2013)
- 49) Quan HY, Kim do Y, Chung SH. Caffeine attenuates lipid accumulation via activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway in HepG2 cells. *BMB Rep.*, **46**, 207-212 (2013)
- 50) Saito Y, Okuda H, Fujii S. Studies on lipolysis in lipid micelles isolated from adipose tissue. *J. Biochem.*, **75**, 1327-1330 (1974)
- 51) Scarborough H. Observations on the nature of vitamin P and the vitamin P potency of certain foodstuffs. *Biochem. J.*, **39**, 271-278 (1945)
- 52) Shii T, Miyamoto M, Matsuo Y, Tanaka T, Kouno I. Biomimetic one-pot preparation of a black tea polyphenol theasinensin A from epigallocatechin gallate by treatment with copper (II) chloride and ascorbic acid. *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 1183-1185 (2011)
- 53) Shimoda H, Seki E, Aitani M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complement Altern Med.*, **6**, 1-9 (2006)

- 54) Singh DK, Banerjee S, Porter TD. Green and black tea extracts inhibit HMG-CoA reductase and activate AMP kinase to decrease cholesterol synthesis in hepatoma cells. *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 816-822 (2009)
- 55) Struckmann JR, Nicolaidis AN. Flavonoids. A review of the pharmacology and therapeutic efficacy of Daflon 500 mg in patients with chronic venous insufficiency and related disorders. *Angiology.*, **45**, 419-428 (1994)
- 56) Sugano M, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T, Kimoto M. The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis* **172**, 115-122 (1988)
- 57) Suzuki Y, Unno T, Kobayashi M, Nozawa A, Sagesaka Y, Kakuda T. Dose-dependent suppression of tea catechins with a galloyl moiety on postprandial hypertriglyceridemia in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1288-1291 (2005)
- 58) Takei Y, Ishiwata K, Yamanishi T. Aroma components characteristic of spring green tea. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2151-2157 (1976)
- 59) Takumi H, Mukai R, Ishiduka S, Kometani T, Terao J. Tissue distribution of hesperetin in rats after a dietary intake. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1608-1610 (2011)
- 60) Tamaru S, Ohmachi K, Miyata Y, Tanaka T, Kubayashi T, Nagata Y, Tanaka K. Hypotriglyceridemic potential of fermented mixed tea made with third-crop green tea leaves and camellia (*Camellia japonica*) leaves in Sprague-Dawley rats. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 5817-5823 (2013)
- 61) Tanaka K, Tamaru S, Nishizono S, Miyata Y, Tamaya K, Matsui T, Tanaka T, Echizen Y, Ikeda I. Hypotriacylglycerolemic and antiobesity properties of a new fermented tea product obtained by tea-rolling processing of third-crop tea (*Camellia sinensis*) leaves and loquat (*Eriobotrya japonica*) leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1606-1612 (2010)
- 62) Tanaka T, Zhang H, Jiang Z, Kouno I. Relationship between hydrophobicity and structure of hydrolysable tannins, and association of tannins with crude drug constituents in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1891-1897 (1997)
- 63) Tanaka T, Kataoka M, Tsuboi N, Kouno I. New monoterpene glycoside esters and phenolic constituents of paeoniae Radix, and increase of water solubility of proanthocyanidins in the presence of paeoniflorin. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 201-207 (2002a)
- 64) Tanaka T, Mine C, Inoue K, Matsuda M, Kouno I. Synthesis of theaflavin from epicatechin and epigallocatechin by plant homogenates and role of epicatechinquinone in the synthesis and degradation of theaflavin. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2142-2128 (2002b)
- 65) Tanaka T, Watarumi S, Matsuo Y, Kamei M, Kouno I. Production of theasinensins A and D, epigallocatechin gallate dimers of black tea, by oxidation-reduction dismutation of dehydrotheasinensin A. *Tetrahedron.*, **59**, 7939-7947 (2003)
- 66) Tanaka T, Miyata Y, Tamaya K, Kusano R, Matsuo Y, Tamaru S, Tanaka K, Matsui T, Maeda M, Kouno I. Increase of theaflavin gallates and thearubigins by acceleration of catechin oxidation in a new fermented tea product obtained by the tea-rolling processing of loquat (*Eriobotrya japonica*) and green tea leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 5816-5822 (2009)
- 67) Walton PA, Possmayer F. Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatidate phosphohydrolase of rat lung: development of an assay employing a defined chemical substrate which reflects the phosphohydrolase activity measured using membrane-bound substrate. *Anal. Biochem.*, **151**, 479-486 (1985)
- 68) Wilcox LJ, Borradaile NM, de Dreu LE, Huff MW. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J. Lipid Res.*, **42**, 725-734 (2001)
- 69) Yamada M, Tanabe F, Arai N, Mitsuzumi H, Miwa Y, Kubota M, Chaen H, Kibata M. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1386-1394 (2006)
- 70) Yoshino K, Tomita I, Sano M, Oguni I, Hara Y, Nakano M. Effect of long term dietary supplement of tea polyphenols on lipid peroxide levels in rats. *Age.*, **17**, 79-85 (1994)
- 71) Zhang YJ, Tanaka T, Betsumiya Y, Kusano R, Matsuo A, Ueda T, Kouno I. Association of tannins and related polyphenols with the cyclic peptide gramicidin S. *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 258-262 (2002)
- 72) 安藤浩毅, 古川郁子, 西本研了, 中島孝子. 青切り桜島小みかんを利用した新商品の開発 - フラボノイドの成分分析 -. 鹿児島県工業技術センター報告 **23**, 35-38 (2011)
- 73) 池ヶ谷賢次郎. 新茶業全書第8版: 茶の品質・保健性と化学成分 (社団法人静岡県茶業会議所編), 社団法人静岡県茶業会議所, p471-509 (1988)
- 74) 池ヶ谷賢次郎, 高柳博次, 阿南豊正. 茶の分析法. 茶業研究報告 **71**, 43-74 (1990)
- 75) 石原朗子, 吉田節也, 土佐政二, 中澤裕之, 富松利明. Citrus 属に含まれるフラボノイドに関する研究 (第3報): 高速液体クロマトグラフィによる陳皮, 枳実を含有する漢方製剤中のフラバノン配糖体の分析. 生薬学雑誌 **45**, 52-56 (1991)
- 76) 岩浅潔. 茶の科学: 茶の化学 (村松敬一郎編), 朝倉書店, p52-64 (1991)
- 77) 岩本裕, 飯田純久. 水溶性フラボノイド組成物およびその製造方法, ならびに水溶性フラボノイド組成物を含む食品等. 特開 2008-

- 271839 (1991)
- 78)大野一仁, 笹山新生. 柑橘のヘスペリジン. 四国食品中の健康機能性成分分析法マニュアル集 (2010)
- 79)大町一磨, 宮田優, 岩永真児, 宮田裕次, 久林高市, 田中隆, 田丸静香, 田中一成. ツバキ葉と三番茶葉による混合発酵茶の血糖上昇抑制作用. 日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 65, 134 (2011)
- 80)奥島綾夏. 未利用資源「摘果ミカン」の機能性に関する研究. 長崎県立大学大学院人間健康科学研究科修士論文 (2014)
- 81)川上美智子. 茶の香り研究ノート: 被覆茶の香氣, 光生館, p49-66 (2000)
- 82)熊沢賢二, 和田善行, 増田秀樹. カンキツ果汁の香氣成分と加熱による香氣変化. 日本食品科学工学会誌 54, 266-273 (2004)
- 83)桑原穆夫, 竹尾忠一, 古畑哲, 西条了康. 紅茶の製造操作と品質に関する研究 (第2報). 茶業試験場研究報告 1, 228-260 (1962)
- 84)厚生労働省. 国民健康・栄養調査 (2012)
- 85)厚生労働省. 人口動態調査 (2013)
- 86)紺野昭, 宮脇勝, 三崎勝, 安松亮治. モデルシロップ中での  $\beta$ -シクロデキストリンとヘスペリジンの相互作用について. 日本食品工業学会誌 29, 255-258 (1982)
- 87)重松洋子, 下田満哉, 箴島豊. 紅茶香氣成分の比較分析. 日本食品工業学会誌 41, 768-777 (1994)
- 88)左右田健次. 茶の科学と文化史. 海洋化学研究 27, 36-43 (2014)
- 89)竹尾忠一. 紅茶製造に中心を置いた茶葉ポリフェノールオキシダーゼの研究. 茶業試験場研究報告 5, 2-73 (1967)
- 90)竹尾忠一. 日本紅茶製造の研究史. 茶業研究報告 42, 1-13 (1975)
- 91)竹尾忠一. 香氣成分組成から見た半発酵茶と紅茶の香氣特性の解析. 日本農芸化学会誌 57, 457-459 (1983)
- 92)竹尾忠一. 新茶業全書第8版: 茶の審査法 (社団法人静岡県茶業会議所編), 社団法人静岡県茶業会議所, p393-412 (1988)
- 93)竹尾忠一. 茶の栽培と利用加工: 発酵の化学 (岩浅潔編), 養賢堂, p375-383 (1994)
- 94)立藤智基, 西崎泰司, 花谷利春, 新井成之, 池田雅夫, 栗本雅司.  $\alpha$ -Glucosyl-Hesperidin ( $\alpha$ -G-Hesperidin) の温浴効果について. フレグランスジャーナル 25, 91-97 (1997)
- 95)田中 隆. 植物ポリフェノールに関する化学的研究とその紅茶色素生成機構解明への展開. 薬学雑誌 128, 1119-1131 (2008)
- 96)玉屋圭, 前田正道, 宮田裕次. 茶葉とびわ葉を原料とした高機能性発酵茶の新機能解明と実用化に向けた研究. 長崎県工業技術センター研究報告 3, 7-10 (2010)
- 97)津志田藤二郎. 食品機能研究法: ポリフェノールの分析法, 光琳, p318-322 (2000)
- 98)中川致之. 緑茶の味と化学成分. 茶業研究報告 40, 1-9 (1957)
- 99)中川致之. 茶のカテキン. 茶業研究報告 2, 81-101 (1970)
- 100)中川致之. 緑茶の構成味要素に対する成分の貢献度. 日本食品工業学会誌 22, 59-64 (1975)
- 101)中川致之, 阿南豊正, 岩浅潔. 夏茶と春茶の香味特性と化学成分の相違. 茶業研究報告 53, 74-81 (1977)
- 102)中川致之, 阿南豊正, 高柳博次. 夏茶香味の劣性要因と化学成分の関係. 茶業研究報告 55, 71-77 (1978)
- 103)西崎泰司, 立藤智基, 赤松佐知子, 花谷利春, 新井成之, 池田雅夫, 栗本雅司.  $\alpha$ -グルコシルヘスペリジンの抗アレルギー作用. 医学と生物 135, 199-204 (1997)
- 104)農林水産省. 統計情報, 品目別経営統計 (2007)
- 105)農林水産省. 統計情報, 生産農業所得統計 (2012)
- 106)農林水産省. お茶の基本情報, お茶をめぐる情勢 (2013a)
- 107)農林水産省. 統計情報, 作物統計 (2013b)
- 108)橋永文男, 伊藤三郎. キンカンとポンカン果実の成熟及び貯蔵中の揮発性成分とエセホン処理の影響. 鹿大農学術報告 40, 43-48 (1990)
- 109)原利男, 久保田悦郎. 緑茶と紅茶の香氣成分の比較. 茶業研究報告 50, 68-73 (1976)
- 110)樋口雅彦, 佐藤昭一, 濱崎正樹, 眞正清司. 固相マイクロ抽出 (SPME) 法による茶の加熱香氣成分の分析法. 茶業研究報告 98, 33-42 (2004)
- 111)福与真弓, 原征彦, 村松敬一郎. 茶葉カテキンの構成成分である(-)エピガロカテキンガレートの中コレステロール低下作用. 日本栄養・食糧学会誌 39, 495-500 (1986)
- 112)前田久夫, 高橋保男, 三宅正起, 伊福靖. 温州ミカン搾汁工程中のヘスペリジンの挙動について. 日本食品工業学会誌 32, 202-207 (1985)
- 113)松崎妙子, 原征彦. 茶葉カテキン類の抗酸化作用について. 日本食品科学工学会誌 59, 129-134 (1985)
- 114)三鼓仁志, 安田(山下)亜希子, 新井紀恵, 定清剛, 久保田倫夫. 糖転移ヘスペリジンは肝臓のトリグリセライドとコレステロールエステルの低減を介して高脂肪食負荷ラットの血清トリグリセライド濃度を低下させる. 薬理と治療 39, 272-240 (2011)
- 115)三橋富子, 戸田貞子, 畑江敬子. 高齢者の味覚感受性と食品嗜好. 日本調理科学会誌 41, 241-247 (2008)

- 116)宮澤陽夫. ポリフェノールの経口摂取と生体内抗酸化作用. 日本農芸化学会誌 73, 532-534 (1999)
- 117)宮田裕次, 野田政之, 玉屋圭, 林田誠剛, 徳嶋知則, 西園祥子, 松井利郎, 田中隆, 田丸静香, 田中一成. 三番茶葉とビワ葉を混合揉捻した新たな発酵茶の開発. 日本食品科学工学会誌 56, 647-654 (2009)
- 118)宮田裕次, 田中隆, 野田政之, 玉屋圭, 松井利郎, 西園祥子, 田丸静香, 田中一成. 茶葉とビワ葉の混合発酵茶に含まれる香气成分の特性. 日本食品科学工学会誌 57, 171-174 (2010)
- 119)宮田裕次, 野田政之, 田丸静香, 田中一成. ツバキ葉と茶葉を利用し香味と機能性に優れたツバキ混合発酵茶の製造. 長崎県農林技術開発センター「ながさき普及技術情報」第31号 (2011)
- 120)宮田裕次, 田中一成, 田丸静香. ビワ混合発酵茶(ワンダーリーフ) 飲用による食後の血糖上昇抑制および血清中性脂肪濃度・肥満度低減効果. 長崎県農林技術開発センター「ながさき普及技術情報」第32号 (2012)
- 121)山田未佳, 三鼓仁志, 津崎ゆかり, 三輪尚克, 茶園博人, 山本格. 糖転移ビタミンPの抗酸化作用と高脂血症マウスにおける酸化ストレス抑制効果. 日本栄養・食糧学会誌 56, 355-363 (2003)
- 122)山本(前田)万里. 「農水産物機能性活用推進事業」報告書: 機能性成分・活用性等調査, p7-29.
- 123)吉富均. 茶のサイエンス: 茶の加工 (武田義行編), 筑波書房, p132-165 (2004)
- 124)李家華, 周紅傑, 清水圭一, 坂田裕介, 橋本文雄. 雲南熟プーアル茶の発酵過程におけるポリフェノールおよびカフェインの変化. 農業生産技術管理学会誌 15, 73-79 (2008)

## 謝辞

長崎県立大学人間健康科学研究科の田中一成教授には指導教員として、本研究の機会を賜り、終始懇切丁寧な御指導ならびに論文の度重なる詳細なご校閲を賜りました。ここに深厚なる感謝の意を表します。本研究の計画からラットの飼育、実験、考察まで昼夜を問わず、懇切な御指導および御協力を賜りました長崎県立大学看護栄養学部栄養健康学科の田丸静香助教（現、福岡工業大学工学部准教授）に心より感謝いたします。本研究の遂行に際し、長崎大学産学官連携推進本部の永田保夫教授には、数多くの知見と多大なる御指導、御支援を賜りました。ここに感謝の意を表し厚く御礼申し上げます。

長崎県農林技術開発センター茶業研究室の宮田裕次主任研究員は、本研究の端緒となる発酵茶葉の製造技術を確立し、実験サンプルの作出や機能性に関する数多くの知見を提供していただきました。多大なる御支援をいただいたことに深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の田中隆教授ならびに齋藤義紀准教授、九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門の松井利郎教授、長崎県立大学人間健康科学研究科の富永美穂子准教授、長崎県工業技術センター食品・環境科の玉屋圭主任研究員には様々な分析等で度重なる御協力をいただきました。皆様の存在なくして本論文を執筆することはできませんでした。ここに深甚の謝意を表します。

ミカンの栽培から供与まで、数多くの御協力をいただいた長崎県農林技術開発センターカンキツ研究室の荒牧貞幸主任研究員（現、長崎県庁農林部係長）、実験サンプルの作出に御支援いただいた全農ながさき果汁食品部の西村正広氏ならびに長尾文雄氏に厚く御礼申し上げます。

長崎県立大学シーボルト校栄養健康学科栄養化学研究室の由比藤菜穂氏、奥島綾夏氏、宮田優氏、野口洋平氏、金崎茜氏、鳥巢雄洋氏、鈴木太士氏には実験の遂行にあたり、多大なる御協力と御支援を頂きました。また、諸氏とともに楽しく貴重な時間を過ごせたことに感謝の意を表します。

本研究の遂行と論文の作成に際して、御理解と多くの御協力を賜りました佐賀大学農学部付属アグリ創生教育センター福田伸二講師、長崎県農林技術開発センタービワ落葉果樹研究部の稗圃直史主任研究員（現、長崎県県央振興局農林部係長）ならびに石本慶一郎主任研究員に深く感謝申し上げます。

本研究の大部分は、長崎県立大学大学院人間健康科学研究科博士後期課程において取り組みま

した。本学への就学に際し、御理解と御支援を賜りました長崎県農林技術開発センターの濱口壽幸副所長、西幸子室長（現、長崎県県央振興局農林部主任技師）をはじめとする多くの関係者の方々へ厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、犠牲となった多くのラットに心から追悼と感謝の意を表します。

## Summary

In this study, the author developed of the new fermented tea by tea-rolling processing of third crop green tea (*Camellia sinensis*) leaves and unripe satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) fruits which are not effectively utilized, evaluated flavor properties of the tea and production condition to raise an oxidation rate of catechin, and investigated the effects of feeding the tea extract on lipid metabolism in rats.

The taste of third crop green tea leaves harvested in the summer season is inferior to first crop green tea leaves; thus they are not effectively utilized and in part discarded. In addition, large amounts of unripe satsuma mandarin fruits are thinned out to improve the quality of the remaining fruits and are discarded as waste. The author developed a fermented tea made from third crop green tea leaves and unripe satsuma mandarin fruits by using a green tea processing machine. Kneading of third crop green tea leaves and unripe satsuma mandarin fruits increased solubility of hesperidin to water, hot water and ethanol. Under the condition where green tea leaves and unripe fruits were mixed at the ratio of 3 to 1 and kneaded with a tea roller for 20 min, the elution rate of hesperidin was the highest. This fermented tea contained narirutin, hesperidin, catechins and black tea polyphenols. The elution rate of hesperidin to water was increased by adding black tea extract fraction composed primarily of epigallocatechin-gallate and black tea polyphenols.

To clarify the flavor characteristic of the fermented tea by mixed kneading of the third crop of green leaves and unripe satsuma mandarin fruits, the author measured aroma/taste components in the tea. The hot water extract of the tea was less reddish orange color than that of black tea. Aroma of the fermented tea consisted of d-limonene and ocimene isomer derived from unripe satsuma mandarin fruits mainly, and 2-hexenal and linalool produced mainly by fermentation of the green tea leaves, providing fruity fragrance and sweet scent like black tea. The amount of d-limonene and ocimene isomer were higher in this tea than in black tea. The estimated astringent intensity of the tea by taste sensor system was lower than that of black tea, and the estimated acid taste intensity was higher than that of black tea. In taste sensory test, astringent of this tea was to some degree weak. Thus, it was suggested that this tea made from third crop green tea and unripe satsuma mandarin fruits is a new type of fermented tea.

The author tried to the improvement of the manufacturing method of this fermented tea. The third crop green tea leaves were withered by blowing air (75°C) for 20 minutes in a primary tea-rolling dryer. Then, withered tea leaves were mixed with unripe satsuma mandarin fruits which were sliced finely by slice machine and kneaded with a tea roller. The amount of the catechins in the green tea leaves were decreased by this process, and found that the hot-water extract of mixed tea leaves had a good taste, an aroma and a bright red color. The author established the production method of new fermented tea by mixed kneading of third crop of green tea leaves and unripe satsuma mandarin fruits using a primary tea rolling dryer, slice machine and tea roller. Thus, the good quality of fermented tea was manufactured because it may have superior flavor to green tea.

Hesperidin, catechins and black tea polyphenols have been recognized as important components that induce physiological activities. To elucidate the function of a new fermented tea produced by mixing third crop green tea leaves and unripe satsuma mandarin fruits, the author investigated the effects of feeding the tea extract on lipid metabolism in rats. When rats were fed diets supplemented with the tea extract at a level of 0.50% or 0.75% for 4 weeks, hepatic triglyceride concentration was reduced in a dose-dependent manner, and the reduction was significant in rats fed diet composed of 0.75% tea extract compared to those fed the control diet. This effect tended to be more potent than that of unripe mandarin fruits or green tea alone. The fermented tea diet reduced hepatic fatty acid synthase activity in a dose-dependent manner, although not significant. The hepatic cholesterol concentrations decreased in a dose-dependent manner with the fermented tea diet for 2 weeks or 4 weeks. The fermented tea inhibited pancreatic lipase activity *in vitro*. These results suggest that the tea produced by mixing third crop green tea leaves and unripe satsuma mandarin fruits induces a hypolipidemic property through suppression of hepatic lipogenesis and inhibition of intestinal fat absorption. New fermented tea made from unripe satsuma mandarin fruits and third crop green tea leaves may serve as the new functional food material.