

《研究ノート》

栽培方法，抽出条件の異なる緑茶抽出液による *in vitro* でのビフィズス菌の増殖への影響

Effects of liquid extracted with different methods from green tea leaves grown under two different cultivations on the growth of *Bifidobacterium bifidum in vitro*.

川崎 祐子 藤田 真由* 平川 朋代*
(Yuko KAWASAKI) (Mayu FUJITA) (Tomoyo HIRAKAWA)

坂尾 佳菜子* 三島 晴奈*
(Kanakano SAKAO) (Haruna MISHIMA)

Abstract: In this study green tea leaves harvested in Kyoto (June 2014) and grown with or without shading were extracted with boiled or 80°C water, examining for their effects *in vitro* on the growth of *Bifidobacterium bifidum*. In addition, catechins and other components included in each sample were assayed by the HPLC method. The results demonstrated that all of the extracts increased the growth of the strain. Compared with water (control), the growth-promoting effects on the strain were 517 times higher than those with the boiled-water extract from the leaves grown without shading, 322 times than those with the boiled-water extract from the leaves grown with shading, and 308 times than those with the 80°C extract from the leaves grown with shading. The total amount of catechins in the extracts was 343.29 mg/100 ml, 240.57 mg/100 ml, and 128.87 mg/100 ml, respectively. Thus, the green tea extracts used in this experiment may have promoted an increase in strain growth *in vitro*, but the degree of the effects was not necessarily proportional to catechin content.

Key words: 緑茶, カテキン, ビフィズス菌

緒 言

茶成分には幅広い生体調節機能があることが知られている¹⁻³⁾。抗菌性・殺菌性に限ってもいろいろ報告があるが、個々に見ると、試験方法や被検菌、試供された緑茶試料は様々である。例えば *in vitro* では、茶ポリフェノールのうちガレートカテキン類およびテアフラビン類がボツリヌス菌を含む数種類の耐熱性有芽胞細菌の芽胞

ないし栄養細胞に対して顕著な抗菌活性を示し⁴⁾、茶ポリフェノール類が黄色ブドウ球菌やウェルシュ菌、セレウス菌などの食中毒細菌において抗菌活性を示した⁵⁾。また、日本茶（玉露、煎茶、番茶、焙じ茶、抹茶）が多くの腸管感染症起因菌に対して抗菌・殺菌作用を⁶⁾、(-)-エピガロカテキンガレートが黄色ブドウ球菌に対して殺菌作用を⁷⁾、緑茶およびカテキン含有飲料が病原性大腸菌 O 157 に対して増殖抑制効果を⁸⁾、カテキン粉末緑茶が口腔内細菌に対して抗菌効果を⁹⁾示したなどである。

ところが、腸内細菌で善玉菌とされる乳酸桿菌やビフ

同志社女子大学生生活科学部

*同志社女子大学生生活科学部 2015 年度卒業生

イズス菌などに対しては、緑茶水抽出物で各種乳酸菌の生育が阻止された¹⁰⁾との報告がある一方で、緑茶メタノール抽出物が乳酸桿菌やビフィズス菌の増殖を促進した¹¹⁾、緑茶熱湯抽出物はこれら2菌に対し殺菌作用を示さなかった¹²⁾、緑茶抽出物の乳酸桿菌に対する抗菌活性は低かった¹³⁾などの報告がある。著者らは前報において、*in vitro* で緑茶熱湯抽出液の液体培地への添加により *Lactobacillus acidophilus* の増殖は抑制され、*Bifidobacterium bifidum* の増殖は促進されたことを報告した¹⁴⁾。結果がばらつく原因の一つとして、菌数の測定方法が異なることが考えられ、実際に生菌数そのものを測定している研究はあまり見当たらない。少なくとも *in vitro* においては、茶カテキン類が腸内細菌の増殖に与える影響について全容が解明されているとは言えないのが現状である。

これに対して *in vivo* においては、ヒトや家畜動物の糞便中に存在する乳酸桿菌やビフィズス菌の数や割合が増加するという報告が蓄積されつつある。ニワトリ¹⁵⁾やブタ¹⁶⁾に茶ポリフェノール粉末を給餌したところ腸内細菌叢のうち乳酸桿菌が増加し悪臭菌の減少傾向がみられた。ウシに対しては、緑茶抽出物の給与により乳酸桿菌とビフィズス菌が増加した¹⁷⁾。ヒトでは、寝たきり高齢者において茶ポリフェノール粉末を栄養液に溶解したものを供与した期間中に糞便中の乳酸桿菌、ビフィズス菌が増加し¹²⁾、健常なボランティアにおいて緑茶飲料の摂取により糞便中に占める *Bifidobacterium* 属の割合が増加した¹⁸⁾などの報告がある。ただし、これらの研究に用いられる試料もまた、緑茶抽出液、茶ポリフェノール粉末、市販緑茶飲料など様々である。

試料に含まれるカテキン類は緑茶の渋み成分の主体であり、含有量が多いのは、(-)-エピガロカテキンガレート (EGCg)、(-)-エピガロカテキン (EGC)、(-)-エピカテキンガレート (ECg)、(-)-エピカテキン (EC) の4種類である。このうち EGCg が全カテキンの約50%を占める。その他に (+)-カテキン (C)、(-)-ガロカテキン (GC)、(-)-ガロカテキンガレート (GCg)、(-)-カテキンガレート (Cg) など微量に存在する。緑茶はツバキ科の *Camellia sinensis* L. の新芽や茎を原料にして製造されるが、春に収穫、製造された一番茶よりも夏に製造された二番茶、三番茶のほうがカテキン類の含有量が多い。日本では収穫前に茶樹を一定期間遮光して栽培(被覆栽培)する場合があるが、遮光によりカテキン類の含有量は低くなる¹⁾。

著者らは前報で腸内細菌の代表的な5菌種を用い、京

都府産やぶきたおよびべにふうき品種の緑茶熱湯抽出液を液体培地に添加して、菌の増殖に及ぼす影響を検討した¹⁴⁾。その結果、*B. bifidum* で増殖が促進され、その効果はやぶきたのほうが高かったが、その他の菌では増殖は抑制された。そこで、本実験ではやぶきた品種を用いて、茶葉の栽培方法と抽出条件により *B. bifidum* に対する増殖促進効果に違いがあるかどうかを検討した。京都府下で栽培される碾茶(石臼で曳く抹茶の前段階の茶葉)のほとんどは収穫前の約20日間被覆栽培されるが、本実験では同じ茶園で収穫された非被覆栽培の碾茶と比較するため、熱湯抽出した試料を用いて被検菌の増殖に与える影響を調べた。さらに、日常的に緑茶を飲用するときの状態に近い条件、すなわち、被覆栽培した碾茶を80℃で抽出した場合の被検菌の増殖に及ぼす影響を調べた。

また、緑茶中の成分は品種や収穫時期などによっても大きく異なる。そこで、抽出液中の8種類のカテキン類とL-アスコルビン酸(AsA)、ストレクチニンおよびカフェインの含有量をHPLCで測定した。

実験方法

1. 使用茶葉と茶粉末の調製

本研究では、京都府相楽郡和束町の同じ茶園で収穫前約20日間被覆して栽培、または被覆しないで栽培し、2014年6月に収穫したやぶきた品種の二番茶を約30秒蒸熱後に乾燥した碾茶の葉を実験に使用した。4~6℃で保管した茶葉を、ラボミルサーで10秒間粉砕し、ふるいにかけて250~710μmの間のものを茶粉末とした。

2. 緑茶抽出液の調製

茶粉末4gを沸騰(約98℃)または80℃の蒸留水200mlに入れて10分間煮沸または3分間抽出したものを、それぞれ熱湯抽出液、80℃抽出液とした。それぞれNo.2ろ紙でろ過したろ液を25℃、10,620gで10分間遠心分離し、上清を0.45μm滅菌済みフィルターでろ過滅菌して実験に用いた。

3. 緑茶抽出液を添加した液体培地での菌の増殖

被検菌には基準株である *B. bifidum* JCM 1255 を使用した。

前培養用培地、本培養用培地および生菌数測定用培地には GAM プイヨン(ニッスイ(株))を使用し、生菌数測定用培地にはさらに寒天を1.5%となるように添加して平板用培地とした。いずれもオートクレーブ滅菌直

後の培地を急冷して用い、植菌後 Anero Pack 嫌気 (三菱ガス化学 (株)) にて 37℃ で嫌気培養した。

本培養用培地では、オートクレーブ滅菌した 2 倍濃度の培地 2.5 ml にフィルター滅菌した熱湯抽出液または 80℃ 抽出液 2.5 ml (対照は滅菌水 2.5 ml) を添加して 2 時間嫌気状態で保管して調製した。この培地に、48 時間嫌気培養した前培養菌液 (O.D. 660 nm = 0.68 付近) を 50 μ l 接種し、48 時間嫌氣的に静置培養した。培養菌液を滅菌生理食塩水で段階希釈し、適当な希釈濃度の菌液 1 ml を平板用培地に混釈したのち、48 時間嫌気培養して生じたコロニー数を計測した。シャーレ 3 枚のコロニー数の平均値から、本培養後の菌原液 1 ml あたりの生菌数を算出した。

4. 茶カテキン類などの定量分析

緑茶抽出液中に含まれるカテキン類などの定量は、野菜茶業研究所のカテキン類同時分析法に基づき HPLC 法にて行った¹⁹⁾。定量用標準物質として、EC, ECg, EGC, EGCg, GC, C, GCg, Cg およびストレクチニン²⁰⁾は長良サイエンス (株) 製のものを、AsA およびカフェインは和光純薬工業 (株) 製のものを使用した。測定条件の詳細は前報に示した¹⁴⁾。

その他一般の試薬はナカライテスク (株)、和光純薬 (株) 製のものを使用した。

結果および考察

1. 緑茶抽出液が被検菌の増殖に与える影響

(1) 茶葉の栽培方法による比較

非被覆・被覆栽培の茶葉を用いて、それぞれ熱湯抽出液を調製し、液体培地に添加して被検菌の増殖に与える影響を生菌数計測法により測定した。実験は複数回行い、各回で測定した生菌数 (CFU/ml) について対照である滅菌水を添加して培養した場合の生菌数を 100 とした相対値 (%) を求め、それらの平均値を算出した。非被覆栽培茶葉の熱湯抽出液を添加したものは 7 回、被覆栽培茶葉の熱湯抽出液を添加したものは 11 回の平均値を比較した。

結果は図 1 に示した。非被覆栽培茶葉の熱湯抽出液添加では対照の生菌数の平均値 (1.50×10^7 CFU/ml) の 517 倍、被覆栽培茶葉の熱湯抽出液添加では対照の生菌数の平均値 (2.93×10^7 CFU/ml) の 322 倍と、両抽出液添加の場合とも生菌数は対照に比べて増加し、増加の程度は非被覆栽培茶葉の熱湯抽出液添加のほうがより顕著であった。前報でも非被覆栽培したやぶきた品種茶葉の

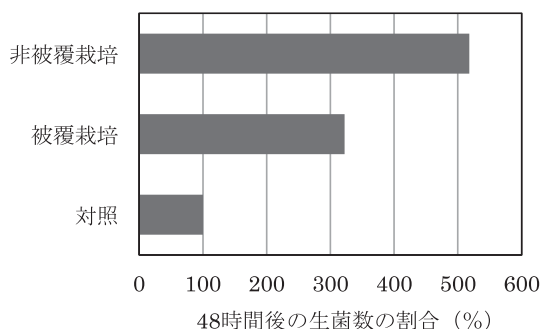


図 1 非被覆・被覆栽培した緑茶の熱湯抽出液が *B. bifidum* の増殖に及ぼす影響

実験は複数回行い、各回で測定した生菌数 (CFU/ml) について、対照 (滅菌水添加) の生菌数を 100 としたときの各熱湯抽出液添加での生菌数の割合 (%) を求め、それらの平均値を算出した (詳細は結果および考察の項参照)。

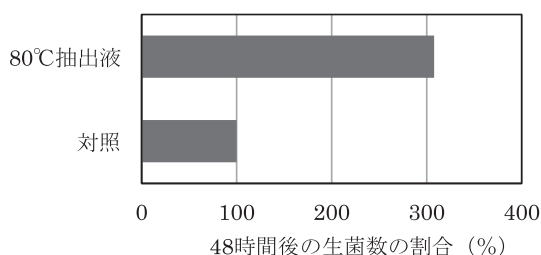


図 2 被覆栽培した緑茶の 80℃ 抽出液が *B. bifidum* の増殖に及ぼす影響

実験は複数回行い、各回で測定した生菌数 (CFU/ml) について、対照 (滅菌水添加) の生菌数を 100 としたときの 80℃ 抽出液添加での生菌数の割合 (%) を求め、それらの平均値を算出した (詳細は結果および考察の項参照)。

熱湯抽出液を添加した条件で *B. bifidum* の増殖が促進されており、今回もほぼ同様の結果が得られた。被覆栽培の目的は、日光を遮り茶葉中のテアニンの開裂とそれに続くカテキン類の生成を少なくすることで甘み (旨み) を多くし、渋みを抑えることである²¹⁾。被覆栽培の有無によりカテキン類の含有量に違いが生じ、被検菌の増殖促進効果に影響する可能性が考えられた。

(2) 抽出温度による比較

被覆栽培した茶葉を用いて 80℃ 抽出液を調製し、被検菌の増殖への影響について試験した。前項と同様に、4 回の結果の平均値を求めて、滅菌水を添加した対照の生菌数の平均値 (7.78×10^6 CFU/ml) と比較した (図 2)。その結果、80℃ 抽出液を添加した場合でも培養後の生菌数は増加し、対照の 308 倍となった。また、その

栽培方法、抽出条件の異なる緑茶抽出液による *in vitro* でのピフィズス菌の増殖への影響

増殖促進効果は、被覆栽培した茶葉からの熱湯抽出液を添加した場合とほぼ同等であった。すなわち、80℃という日常緑茶として飲用する状態に近い条件でも、*B. bifidum* の増殖促進効果は十分期待できると考えられた。

渋み成分であるカテキン類は高温のほうが多く抽出されるため、玉露や高級煎茶では抽出温度を低くして茶を淹れる。本実験で調製した80℃、3分間抽出の試料は前述の熱湯抽出液に比べて濁りも着色も少なく、抽出成分中のカテキン類の含有量が少ないことが予想された。にもかかわらず80℃抽出液での被検菌に対する増殖効果が熱湯抽出液とほぼ変わらなかったことから、増殖効果に関わる原因物質がカテキン類とは限らないことが示唆された。

2. 各抽出液のカテキン類などの定量

非被覆栽培した茶葉を用いた熱湯抽出液、被覆栽培した茶葉を用いた熱湯抽出液および80℃抽出液について、各試料に含まれるカテキン類などの主要成分をHPLC法により定量した。参考として、茶葉中の含有量が多いAsAおよびカフェインと、インフルエンザウイルスの増殖阻害作用が注目される緑茶ポリフェノールの一つであるストレクチニン²⁰も同時に測定した。非被覆栽培した茶葉から調製した熱湯抽出液は3回、被覆栽培した茶葉から調製した熱湯抽出液は5回、被覆栽培した茶葉から調製した80℃抽出液は4回測定して平均値を求めた。結果は抽出液100 mlあたりのmgとして示した(表1)。Cは緑茶でごく微量含まれるカテキンであるが、本実験ではすべての試料で検出されなかった。

測定したカテキン類の総量は、非被覆栽培茶葉の熱湯抽出液では343.29 mgとなり、このうちEGCgの占める割合は41.5%であった。また、被覆栽培茶葉の熱湯抽出液では総量240.57 mgとなり、EGCgの占める割合は47.0%であった。抽出方法が同一の場合、成分含有量の違いは使用した茶葉に由来すると推測される。検出できたすべてのカテキンで非被覆栽培茶葉の熱湯抽出液のほうが含有量は多かったが、特にEGCの含有量の差が大きかった。これは遮光により茶葉そのもののEGC含有量が大きく低下するため²¹⁾と考えられる。AsAは非被覆栽培した茶葉の熱湯抽出液のほうが3倍以上多かったが、カフェインは逆に少なかった。非被覆栽培では収穫直前まで茶葉に日光が当たるので、紫外線防御のためカテキン類やAsAが多く生成されたものと推察された。また、カフェインの生成は日光を必要とせず、遮光による茶葉の乾燥重量の減少により含有量が増加するとされており²¹⁾、本実験でも被覆栽培した茶葉の熱湯抽出液のほうが多く検出された。

被覆栽培した茶葉から調製した80℃抽出液のカテキン総量は128.87 mgとなり、同じ茶葉を熱湯抽出したものに比べ53.6%に減少した。カテキン総量に占めるEGCgの割合は52.6%であった。80℃抽出液においては、温度だけでなく抽出時間も短い条件で試料を調製しており、すべての測定物質の抽出量が熱湯抽出液より少なくなった。カテキンにより溶出度合いが異なり、中でもGC、GCgがそれぞれ熱湯抽出の場合の12.4%、6.2%と大幅に減少した。AsAなどカテキン類以外の3つの成分は熱湯抽出液の70~80%程度であり、カテキン類

表1 緑茶各抽出液100 ml中のカテキン類、AsA、カフェインおよびストレクチニン含量

a) カテキン類

| 緑茶抽出液 | | 成分 (mg/100 ml) | | | | | | | | 総カテキン量** (mg/100 ml) |
|-------|-----------|----------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|------|-------------------------|
| 栽培方法 | 抽出条件 | GC | EGC | C | EGCg | EC | GCg | ECg | Cg | |
| 非被覆 | 98℃, 10分間 | 33.48 | 96.22 | N.D.* | 142.36 | 19.39 | 23.91 | 24.93 | 3.00 | 343.29 |
| 被覆 | 98℃, 10分間 | 21.66 | 48.63 | N.D.* | 113.17 | 12.06 | 23.09 | 19.44 | 2.52 | 240.57 |
| 被覆 | 80℃, 3分間 | 2.69 | 37.96 | N.D.* | 67.78 | 7.68 | 1.42 | 10.53 | 0.81 | 128.87 |

*N.D.: 検出限界以下。

**総カテキン量: 測定したカテキン類の合計。

b) AsA, カフェインおよびストレクチニン

| 緑茶抽出液 | | 成分 (mg/100 ml) | | |
|-------|-----------|----------------|-------|---------|
| 栽培方法 | 抽出条件 | AsA | カフェイン | ストレクチニン |
| 非被覆 | 98℃, 10分間 | 12.56 | 54.27 | 2.13 |
| 被覆 | 98℃, 10分間 | 3.86 | 66.13 | 2.43 |
| 被覆 | 80℃, 3分間 | 3.20 | 47.34 | 1.72 |

に比べると抽出量の差異は小さかった。

これら各抽出液中のカテキン類の測定結果を基に、5 ml の液体培地に添加されたカテキン総量の平均的な濃度を算出したところ、非被覆栽培した茶葉の熱湯抽出液で 1.72 mg/ml、被覆栽培した茶葉の熱湯抽出液で 1.20 mg/ml、被覆栽培した茶葉の 80℃ 抽出液で 0.644 mg/ml であった。序論で述べた *in vitro* での様々な研究で用いられている試料の濃度は、単位換算すると 1~2 mg/ml 程度のもが多く、本実験と大きな違いはみられなかった。

被覆栽培した茶葉において、80℃ 抽出液のカテキン総量は熱湯抽出液のカテキン総量に比べて半減していたにもかかわらず、被検菌である *B. bifidum* に対する増殖促進効果はほぼ同程度であったことから、増殖の促進には今回定量したカテキン類以外の何らかの水溶性の物質が関与している可能性が考えられる。

要 約

2014 年に非被覆栽培または被覆栽培された京都府産やぶきた品種の緑茶(碾茶)を用いて、熱湯抽出(約 98℃, 10 分間)または 80℃ 抽出(80℃, 3 分間)した試料を調製し、*in vitro* における *B. bifidum* の増殖に及ぼす影響を検討した。また、各試料に含まれるカテキン類などを HPLC 法にて定量した。

栽培方法の異なる緑茶を用いて被検菌の増殖への影響を比較したところ、非被覆栽培した茶葉の熱湯抽出液では対照(滅菌水)の 517 倍、被覆栽培した茶葉の熱湯抽出液では 322 倍と、いずれも増殖は顕著に促進された。また、その効果は非被覆栽培した茶葉の熱湯抽出液のほうが大きかった。各抽出液に含まれるカテキン総量は、非被覆栽培した茶葉の熱湯抽出液で 343.29 mg/100 ml、被覆栽培した茶葉の熱湯抽出液で 240.57 mg/100 ml であった。

被覆栽培した茶葉の 80℃ 抽出液では、被検菌の増殖は対照の 308 倍となった。この抽出液に含まれるカテキン総量は 128.87 mg/100 ml であった。

以上のことから、いずれの緑茶抽出液も *in vitro* において *B. bifidum* の増殖を促進する効果がみられたが、効果の程度はカテキン類の含有量には必ずしも比例しなかった。

緑茶には様々な生理作用が報告されており、作用の主体として緑茶特有のポリフェノールであるカテキン類、なかでも含有率の高い EGCg の生理活性が強いと言われている。しかし、本実験の結果からはカテキン類以外

の何らかの水溶性物質が被検菌の増殖促進に関与している可能性が示唆され、さらなる検討が必要である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、栽培方法の異なる茶葉をご提供いただきました北碾茶工場に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 伊奈和夫, 坂田完三:『新版 緑茶・中国茶・紅茶の化学と機能』, 株式会社アイ・ケイコーポレーション (2007).
- 2) 衛籐英男, 富田勲, 榛村純一, 伊勢村護, 原征彦, 横越英彦, 山本(前田)万里:『新版 茶の機能-ヒト試験から分かった新たな役割』, 一般社団法人農山漁村文化協会 (2013).
- 3) U. Etxeberria, A. Fernández-Quintela, F. I. Milagro, L. Aguirre, J. A. Martínez and M. P. Portillo: Impact of Polyphenols and Polyphenol-Rich Dietary Sources on Gut Microbiota Composition, *J. Agric. Food Chem.*, Vol.61, pp.9517-9533 (2013).
- 4) 原征彦, 渡辺真由美:茶ポリフェノール類のボツリヌス菌に対する抗菌作用, 日本食品工業学会誌, Vol.36 (No.12), pp.951-955 (1989).
- 5) 原征彦, 石上正:茶ポリフェノール類の食中毒菌に対する抗菌活性, 日本食品工業学会誌, Vol.36 (No.12), pp.996-999 (1989).
- 6) 戸田真佐子, 大久保幸枝, 大西玲子, 島村忠勝:日本茶の抗菌作用および殺菌作用について, 日本細菌学会誌, Vol.44 (No.4), pp.669-672 (1989).
- 7) 伊藤勇, 大久保幸枝, 福地邦彦, 原征彦, 島村忠勝: *Streptococcus pneumoniae* に対する epigallocatechin gallate の殺菌作用, 日本化学療法学会雑誌, Vol.50 (No.2), pp.118-125 (2002).
- 8) 西川武志, 小林葉津美, 岡安多香子, 山田玲子, 磯貝恵美子, 磯貝浩, 山下利春:茶およびカテキン含有飲料の病原性大腸菌に対する増殖抑制効果の検討, 腸内細菌学雑誌, Vol.20, pp.321-327 (2006).
- 9) 日下部修介, 田村大輔, 小竹宏朋, 作誠太郎, 本間文将, 村松泰徳, 堀田正人:カテキン粉末緑茶の口腔内細菌に及ぼす影響, 日本歯科保存学雑誌, Vol.56 (No.4), pp.353-359 (2013).
- 10) 西山隆造, 小崎道雄:乳酸菌の生育におよぼす緑

栽培方法、抽出条件の異なる緑茶抽出液による *in vitro* でのビフィズス菌の増殖への影響

- 茶抽出液の阻害作用について (その1), 日本農芸化学会誌, Vol.48 (No.2), pp.83-89 (1974).
- 11) Y.-J. Ahn, S. Sakanaka, M.-J. Kim, T. Kawamura, T. Fujisawa and T. Mitsuoka : Effect of Green Tea Extract on Growth of Intestinal Bacteria, *Microbial Ecology in Health and Disease*, Vol.3, pp.335-338 (1990).
 - 12) 原征彦: 茶カテキン類の機能性とそれらの応用例, 日本食品保蔵学会誌, Vol.26 (No.1), pp.47-54 (2000).
 - 13) 中山素一, 重宗尚文, 徳田一, 古田可菜子, 松下知世, 吉澤千尋, 宮本敬久: 緑茶抽出物の抗菌活性と pH の影響, 防菌防黴, Vol.36 (No.7), pp.439-448 (2008).
 - 14) 川崎祐子, 北紀子, 中嶋尚子, 眞鍋翠: 京都府和束町産「べにふうき」のメチル化カテキン含有量と *in vitro* における腸内細菌の増殖への影響, 同志社女子大学生生活科学, Vol.46, pp.58-64 (2012).
 - 15) A. Terada, H. Hara, S. Nakajyo, H. Ichikawa, Y. Hara, K. Fukai, Y. Kobayashi and T. Mitsuoka : Effect of Supplements of Tea Polyphenols on the Caecal Flora and Caecal Metabolites of Chicks, *Microbial Ecology in Health and Disease*, Vol.6, pp.3-9 (1993).
 - 16) H. Hara, N. Orita, S. Hatano, H. Ichikawa, Y. Hara, N. Matsumoto, Y. Kimura, A. Terada and T. Mitsuoka : Effect of Tea Polyphenols on Fecal Flora and Fecal Metabolic Products of Pigs, *J. Vet. Med. Sci.*, Vol.57 (No.1), pp.45-49 (1995).
 - 17) N. Ishihara, D.-C. Chu, S. Akachi and L. R. Juneja : Improvement of Intestinal Microflora Balance and Prevention of Digestive and Respiratory Organ Disease in Calves by Green Tea Extracts, *Livestock Production Science*, Vol.68, pp.217-229 (2001).
 - 18) J.-S. Jin, M. Touyama, T. Hisada and Y. Benno : Effects of Green Tea Consumption on Human Fecal Microbiota with Special Reference to *Bifidobacterium* species, *Microbiol. Immunol.*, Vol.56 (No.11), pp.729-739 (2012).
 - 19) 堀江秀樹, 山本(前田)万里, 氏原ともみ, 木幡勝則: 茶葉中カテキン類分析のための抽出方法の検討, 茶業研究報告, Vol.94, pp.60-64 (2002).
 - 20) R. K. Saha, T. Takahashi, Y. Kurebayashi, K. Fukushima, A. Minami, N. Kinbara, M. Ichitani, Y. M. Sagesaka and T. Suzuki : Antiviral Effect of Strictinin on Influenza Virus Replication, *Antiviral Res.*, Vol.88 (No.1), pp.10-18 (2010).
 - 21) 西條了康, 大沢キミコ: しゃ光によるカテキン類ならびに窒素成分の生成制御, 茶業研究報告, Vol.54, pp.40-46 (1981).

(2016年11月14日受理)