機能性食品開発の展望

A View of Functional Foods Development

三島 敏

アピ(株) 長良川リサーチセンター
〒502-0071 岐阜市長良山先 692-3

Satoshi MISHIMA

Api Co., Nagaragawa Research Center,
692-3 Yamasaki, Nagara, Gifu-city, Gifu 502-0071,
JAPAN

論文要旨：高齢者が加速度的に増加するわが国では、病気予防により健康寿命を延伸することが重要である。長い高齢期を元気な人生とするため、トクホを含む機能性食品への期待が高まっている。酵素技術や、有用成分の創製あるいは製剤設計により食品機能を高めることは、種々の疾患に対しより有効に働くと考えられる。

Abstract: It is important to extend healthy life time by preventing diseases under the greatelder population increasing in Japan. The functional foods are confident to meet the requirement making people vivid during their lives. Several ways enabling food functions more effective against diseases are proposed; by enzyme processing, preparation of bio-active ingredients, and drug formulation design.

Key words: functional foods, peptides, ACEI, prenylated compounds, microsphere

1 はじめに

高齢化の進行や生活習慣病罹患率およびその予備軍の増加に伴い、健康寿命の延伸が課題となっており、このためには治療以上に予防が重要であることは間違いない。予防の基本は生活習慣の改善にあり、とくにその中でも食事は大きな役割を担っている。わが国の食生活の変化や環境、ストレス社会は多くの未病者を生み出している。こうした背景のもと、食事や運動以外に特定保健用食品をはじめとする機能性食品にも大きな期待がかけられている。

機能性食品とは、食品の三次機能、すなわち生体調節機能を持ち、かつその科学的根拠を有する食品である。なかでも特定保健用食品（トクホ）は、臨床試験により実証された科学的根拠の明らかな食品として、厚生労働大臣が認可するものである。したがって、消費者が安心して直接あるいは医療分野で保健指導において利用しやすい。保健機能食品を除く他の機能性食品は、トクホ

と一部重複するが制度上は一般食品に分類されるため、「機能」の表示は認められていない。機能性食品は、トクホと比較すると概して臨床知見に乏しく、有用性・安全性について懐疑的な見方をされる場合がある。しかしながら、機能に関しては、用途が限定されているトクホよりも多彩で、たとえば抗腫瘍、免疫、抗酸化、老化防止等々消費者のニーズに応える機能性食品には多くの需要があり、健康生活に果たす役割は大きい。

本稿では、機能性食品の開発として、トクホ製品の開発、酵素を用いた機能性素材の創製、製剤化技術による機能性の向上についての事例を紹介させていただく。

2 機能性食品開発事例

2-1 ローヤルゼリーペプチドを関与成分とするトクホ製品の開発

2-1-1 背景

高血圧症は脳血管障害、虚血性心疾患などさまざまな疾患のリスク要因であり、とくに高齢者でその比率が高く、今後さらに増加すると考えられている。高血圧症の9割を占める本態性高血圧の発症には、さまざまな原因

が複雑に関与している。この中で、レニン-アンジオテンシン系およびアルドステロンは、生体内における血圧の調節に重要な役割を果たしている。アンジオテンシン変換酵素 (ACE) は、アンジオテンシノーゲンより生成するアンジオテンシン I をアンジオテンシン II に変換する。このアンジオテンシン II は、主に細動脈平滑筋を収縮させて血圧を上昇させる血管収縮作用と、副腎球状層に作用してアルドステロンの合成と遊離を促進させることによる昇圧活性を有する。ACE 阻害剤はアンジオテンシン II の産生を抑制し、アルドステロン量を減少させるため、高血圧症の治療に広く用いられている^{1,2)}。しかしながら、薬物療法には少なからず副作用を伴い、また医療費の負担も考慮した場合、正常高値血圧者や軽症高血圧者については、食による生活習慣の改善こそが望まれる。こうした背景のもと、近年、さまざまな食品由来のタンパク質³⁻⁵⁾ から ACE 活性阻害ペプチドが単離され、高血圧を予防・改善する特定保健用食品が開発されている。

ローヤルゼリー (RJ) は働き蜂の下咽頭腺から分泌される乳白色のクリーム様物質であり、タンパク質、糖質、脂質、アミノ酸、ビタミン、ミネラルを豊富に含んでいる。RJ は滋養強壮や更年期障害、貧血の改善、および抗腫瘍作用、血流増加作用などさまざまな生理活性を有し、医薬品、食品として広く利用されている。ここでは、RJ を酵素分解して得られるペプチドに関与成分とするトクホ製品の開発について紹介する。

2.1.2 ACE 阻害ペプチドの同定

ミツバチ *Apis mellifera* より得られた中国産生 RJ を各種プロテアーゼで処理し、得られた RJ ペプチドの ACE 阻害活性を測定した。その結果、*Bacillus subtilis* 由来のプロテアーゼ処理で得られた RJ ペプチドが良好な値を示した⁶⁾。これらペプチドは、消化管プロテアー

ゼであるペプシン、トリプシン、キモトリプシン等でさらに処理しても、ACE 阻害活性の変化はほとんど認められなかった。したがって、このペプチドは経口摂取しても消化管プロテアーゼによる消化を受けることなく、ACE 阻害活性を示すことが示唆された。

そこで、高血圧自然発症ラット (SHR) を用い収縮期血圧 (SBP) が 185 mmHg 以上を示す雄性 SHR に、RJ および RJ ペプチドを 1 回 5 mg/kg の投与量で 1 日 2 回、28 日間反復経口投与した。1 回目の投与前および 2 回目の投与後 2 h 間の SBP を測定したところ、対照群と比較して、とくに RJ ペプチド群は低値を示した (Fig. 1)⁷⁾。

この RJ ペプチドから 6 種類の ACE 阻害活性を有するペプチドを単離し、中でも Ile-Tyr (IY) が最も強い阻害活性 ($IC_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$) を示し、Ile-Val-Tyr (IVY) ($18 \mu\text{g/mL}$)、Val-Tyr (VY) ($20 \mu\text{g/mL}$) の順であった⁸⁾。これら 3 種ペプチド IY, VY, IVY を単独または混合して SHR に単回経口投与し投与前と投与 1 時間後の SBP 値を測定したところ、いずれにおいても 1 mg/kg の投与量で SBP 値の顕著な低下が認められた⁹⁾。

2.1.3 作用機序

RJ ペプチド 2 g/kg を単回経口投与し、6 h 後に腹部大動脈、心臓、肺、肝臓、腎臓および脳を摘出した。各臓器可溶性画分の ACE 活性を測定したところ、対照群と比較して、RJ ペプチド投与群の腹部大動脈、肺において ACE 活性の低下が認められた。一方、心臓、肝臓、腎臓および脳においては ACE 活性の低下はみられなかった (Fig. 2)¹⁰⁾。

また、各臓器の ACE 阻害ペプチドを定量したところ、ACE 活性の低下がみられた腹部大動脈、肺および血漿では、投与群において対照群よりも多量の IY, VY, IVY が検出された。一方、ACE 活性の低下がみられな

Fig. 1 SHR における RJ, RJ ペプチドの経口投与前(A)および投与 2 時間後(B)の収縮期血圧の推移
** $p < 0.01$ vs. Control

Fig. 2 RJ ペプチド投与 6 h 後の SHR の血漿(A)および臓器(B)の ACE 活性

* $p < 0.05$ vs. Control

かった臓器においては、これらペプチドは検出されなかった。以上の結果から、RJ ペプチドが消化管から吸収されて血中に移行し、前記特定臓器において ACE 活性を阻害することにより、血圧降下作用を発現することが示唆された。

同時に、投与前後 1~8 h 後に採血および SBP 値の測定を行い、投与後 8 h まで血圧低下状態の持続を確認した。また血漿アルドステロン量は、投与後 1 h で有意に減少し、この状態が 4 h 後まで持続していた。したがって、RJ ペプチドはレニン-アンジオテンシンならびにアルドステロン系に作用して、血圧降下を誘導することが示唆された。

2.1.4 非臨床（動物）安全性試験

ラットを用いた単回経口投与毒性試験（4 g/kg）、および 90 日間経口投与毒性試験（~1.2 g/kg）では、RJ ペプチドによる異常はみられなかった。また、哺乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験（~5 mg/mL）、および細菌を用いた復帰突然変異試験（~5 mg/plate）においても、RJ ペプチドはともに陰性を示し、その安全性が確認された。

2.1.5 臨床試験

RJ ペプチドを正常高値血圧者と軽症高血圧者に対し、プラセボを対照とした 2 重盲検試験を実施した。87 名の被験者を RJ ペプチド 1200~7200 mg/日摂取群およびプラセボ摂取群に分け、試験飲料を 4 週間摂取させた。その結果、RJ ペプチド 2400 mg/日摂取群または 7200 mg/日摂取群で、収縮期血圧は摂取 4 週間後に摂取前と比較して有意な低値を示した。また拡張期血圧は 7200 mg/日摂取群で摂取前と比較して有意な低値を示した¹¹⁾。

次に、85 名の被験者を RJ ペプチド 2400 mg/日摂取群とプラセボ摂取群に分け、試験飲料を 12 週間摂取させた長期試験を実施した。その結果、RJ ペプチド摂取群では収縮期血圧および拡張期血圧ともに、摂取 8 週間後および 12 週間後にプラセボ群と比較して有意な低値を示した（Fig. 3：図は層別解析の結果）¹²⁾。いずれの試験および正常血圧者による過剰摂取試験（7200 mg/日 × 8 週間）においても、有害事象は認められなかった。以上より、RJ ペプチドは正常高値血圧者と軽症高血圧者に対して適度な血圧降下作用を示し、安全性の高い食品であると判定した。

2006 年 8 月末、この RJ ペプチドを関与成分とする飲料は、「血圧が高めの方に適した」特定保健用食品として認可された。

2.2 プレニル化合物の酵素的創製

2.2.1 背景

ブラジル産プロポリスに含まれる抗がん、抗菌活性物質を探索したところ、桂皮酸誘導体であるバックカリン（3-プレニル-4-(2,3-ジヒドロキシシナモイロキシ)桂皮酸）、ドルパニン（3-プレニル p-クマル酸）が見出

Fig. 3 正常高値血圧者(A)および軽症高血圧者(B)の血圧値の推移
プラセボ摂取群との比較；# $p < 0.05$ (t-test)
摂取直前との比較；* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Bonferroni test)

された。これらは各種癌細胞に対し、アポトーシス誘導や増殖抑制作用を示した。また Sarcoma S-180 移植マウスにおいて、腫瘍重量の増加が有意に抑制された¹³⁾。ブラジル産プロポリスに含まれるアルテピリン C (3,5-ジプレニル-4-ヒドロキシ桂皮酸) もがん細胞の増殖を抑制することがすでに報告されている¹⁴⁾。これら3種の化合物はいずれも、プレニル基を持つフェニルプロパノイド構造である。

プレニル化された芳香族化合物は植物に広く分布しており、これらは植物の耐虫性や耐病性などの作用に寄与している。プレニルフラボノイドには、抗菌、抗酸化、抗腫瘍、抗チロシナーゼ活性、エストロゲン活性等、さまざまな生理活性を有するものが報告されている。このようなプレニル芳香族化合物の生理活性は、プレニル基を持たない母核化合物ではみられない場合もあり^{15,16)}、その活性にプレニル基が重要であることが指摘されている。

ここでは、放線菌の芳香族基質プレニル基転移酵素を利用し、プロポリスに含まれるフラボノイドやフェニルプロパノイドにプレニル基の導入した例、およびその反応産物の機能性について紹介する。これらのうち、食経験ある化合物は強化食品として応用ができる。

2.2.2 プレニルフラボノイドの創製

プロポリスに含まれる主要なフラボノイドであるガランギンおよびイソサクラネチンを基質とし、放線菌由来のプレニル基転移酵素 (Orf2, HypSc) を用いてプレニル基、ゲラニル基の導入を試みた。ガランギンをゲラニル基受容体, GPP を供与体とし, Orf2 を添加して反応させたところ, 6-ゲラニルガランギンを得た。同様にイソサクラネチンをゲラニル基受容体とした場合には, 6-ゲラニルイソサクラネチンおよび7-O-ゲラニルイソサクラネチンを得た。また, ジメチルアリル基受容体, DMAPP を供与体とし, HypSc を用いて反応させたところ, 6-プレニルイソサクラネチンを得た。

2.2.3 プレニルフェニルプロパノイドの創製

上記と同様に、プロポリスに含まれる主要なフェニルプロパノイドである p-クマル酸およびカフェ酸を基質とし、放線菌由来のプレニル基転移酵素 (NovQ) を用いてプレニル基の導入を試みた。p-クマル酸をプレニル基受容体, DMAPP を供与体とし, NovQ を添加し反応させたところ, 3-プレニル-p-クマル酸 (ドルパニン) および 4-O-プレニル-p-クマル酸を得た。同様にカフェ酸をプレニル基受容体とした場合には, 3-O-プレニルカフェ酸, 4-O-プレニルカフェ酸および 3-O,4-O-ジプレニルカフェ酸を得た。

2.2.4 プレニル化合物の生理活性評価

2.2.4.1 細胞増殖試験

ヒト胃癌細胞 Kato III およびヒト大腸がん細胞 SW 480 の各細胞を培養後, 1 日後に試料を添加, 2 日後に MTT アッセイにより生細胞数を測定した。その結果, プレニル基をもっていないガランギンおよびイソサクラネチンは, 特定の濃度で細胞増殖を促進することはあっても, 増殖抑制活性はみられなかった。これに対し, プレニル化された 6-ゲラニルガランギンや 6-ゲラニルイソサクラネチンでは, 細胞増殖の抑制が認められた。また, p-クマル酸およびカフェ酸には, 増殖抑制活性はみられなかったが, これらのプレニル化物は, 細胞種により影響は異なるものの, がん細胞に対し概ね弱い増殖抑制活性が認められた。

2.2.4.2 MRSA に対する抗生剤との併用効果

作用機序の異なる3種類の抗生剤 Oxacillin, Tetracyclin, Chrolamphenicol の多剤耐性黄色ブドウ球菌 MRSA (ATCC 33591) 増殖を阻止する最小濃度 (MIC) を確認した。次に, 感受性測定ブイヨンにて2種類の被検物質を互いに濃度を変えて併用した培地に試験菌液を接種し, 一晚培養後, 目視にて増殖判定を行った。抗生剤と試料の組み合わせによる併用効果を判定するため, FIC index (fractional inhibiting concentration index,

Table 1 MRSA に対する抗生剤との併用効果

	MRSA (MIC ug/mL)	併用効果 (FIC index)		
		オキサシリン	テトラサイクリン	クロラムフェニコール
p-クマル酸	800	0.75 (相加)	1 (相加)	1 (相加)
ドルパニン	400	0.5 (相乗)	0.5 (相乗)	0.5 (相乗)
4-O-プレニル-p-クマル酸	400	0.25 (相乗)	0.5 (相乗)	0.38 (相乗)
カフェ酸	1600	2 (無関係)	2 (無関係)	2 (無関係)
3-O-プレニルカフェ酸	800	2 (無関係)	2 (無関係)	1 (相加)
4-O-プレニルカフェ酸	400	1 (相加)	1 (相加)	0.75 (相加)
3-O,4-O-ジプレニルカフェ酸	400	2 (無関係)	0.75 (相加)	0.38 (相乗)

併用時の抗生剤 MIC/単独の抗生剤 MIC + 併用時の試料 MIC/単独の試料 MIC) を求めた。FIC index が 0.5 以下の場合には抗生剤と試料の相乗効果、また、0.5 より大きく 2 より小さい場合には相加効果と判定した。

その結果、p-クマル酸やカフェ酸のプレニル化合物は、抗生剤と併用することによって、例外はあるものの概ね併用効果が認められた (Table 1)。とくに、ドルパニンや 4-O-プレニル-p-クマル酸では、相乗的に抗菌活性が上昇しており、MRSA に対して抗生剤の使用量を顕著に減らすことができると考えられる。

またプレニル基をもっていないガラングインおよびイソサクラネチンには、MRSA に対する抗菌活性はほとんど認められないが、6-ゲラニルガラングインは MIC が $12.5 \mu\text{g/mL}$ とオキサシリンに相当する抗菌活性が認められた。p-クマル酸、カフェ酸にも抗菌活性はほとんど認められないが、これらのプレニル化合物には MRSA, MSSA (黄色ブドウ球菌), *Bacillus* (枯草菌) に対する抗菌活性の上昇が認められた。

以上のように、放線菌由来プレニルトランスフェラーゼを用いてフラボノイドやフェニルプロパノイドなどにプレニル基を導入することができる。これにより、抗癌性、抗菌性に優れた新規な化合物を創製できることが示唆された。

2.3 粘膜付着性製剤プロポリス SAM (Stomach Adsorptive Material)

2.3.1 背景

プロポリスには、抗酸化、抗炎症、抗菌、抗潰瘍、抗腫瘍、免疫賦活などのさまざまな生理活性が報告されている¹⁷⁾。関与する主な成分は、フラボノイド類、フェノール性有機酸類およびそのエステル等であり、その多くは水に対する溶解度が小さく、消化管内を容易に流下してしまう。このため、これら有効成分の消化管内における滞留時間が短く、薬効が一時的にしか発揮されない場合がある。また、その滞留時間の短さゆえに、十分なバイオアベイラビリティが得られないことも問題である。このような問題点を解決する手段のひとつとして、プロポリス製剤に消化管粘膜付着性機能を持たせることが考えられる。そこで、粘膜付着性機能の付加によって、吸収部位上部におけるプロポリス成分の滞留時間を延長させ、生体内で持続的に薬効を発揮し、かつ有効成分の吸収率を向上させることを目的とした。

ここではキトサンを用いてプロポリスを含むマイクロスフェアを調製し、その消化管粘膜付着性および種々の生理作用について検討した。

2.3.2 マイクロスフェアの調製方法

油中溶媒拡散法によりプロポリス・キトサンマイクロ

Fig. 4 油中溶媒拡散法で調製した SAM-M (A; 上, 200 倍, 下, 1,500 倍) および水中溶媒拡散法で調製した SAM-N (B; 上, 15,000 倍, 下, 35,000 倍) の SEM 写真

スフェアを調製した。すなわち、界面活性剤 (サンソフト Q81F) にキトサン (FL80) 溶液を加えて攪拌した後、EEP (プロポリスエタノールエキス) を加えて攪拌し、キトサン・プロポリス溶液を調製した。次に、液状油 (トリエスター F810) を加熱しながら攪拌し、そこに前記キトサン・プロポリス溶液を添加した。これを減圧下、加温下 6 h 攪拌し、微粒子が油相に分散した懸濁液を溶媒除去後乾燥して、プロポリス・キトサンマイクロスフェア (SAM-M) を得た (Fig. 4A)。また、水中溶媒拡散法を用いてプロポリス・キトサンナノスフェアを調製した。2 種の異なるキトサン (SK2, FL80) 混合物に EEP を添加し、凍結乾燥してプロポリス・キトサンナノスフェア (SAM-N) を得た (Fig. 4B)。

2.3.3 胃粘膜付着性の評価

Wistar 系雄性ラットを 24 h 絶食後、プロポリス従来品およびプロポリス SAM-M, SAM-N を精製水に懸濁し、 600 mg/kg ずつ経口投与した。投与 4 h 後に胃を摘出し、エタノール、KCl を含む溶液 (pH 1.9) で胃に付着したプロポリスを抽出した。抽出液のプロポリス含量を測定したところ、従来品が 1 mg 以下の残存量であったのに対し、プロポリス SAM-M, SAM-N では 2 mg 以上の残存量を示した。これは、キトサンにプロポリスを内包することによって、粘膜付着性が付与されたためと考えられる。

2.3.4 吸収率の評価

Wistar 系雄性ラットから小腸全体を摘出し、断片を切り出して反転腸管を作成した。この反転腸管内にリンガー液を注入し、両端を木綿糸で結紮した。これをプロポリス従来品および SAM-M を含むリンガー液中に挿入し、酸素を通気後、インキュベーションした。反転腸管内の液を経時的にサンプリングして、各液中に含まれる総フラボノイド量を測定した。その結果、従来品では 30 min を経過した後、吸収率は漸減するが、SAM-M で

Table 2 投与1 h 後(A)および3 h 後(B)における塩酸-エタノール潰瘍抑制活性

A

投与1時間後 (即時性)	n	潰瘍係数 (mm) 平均値±S.D.	潰瘍抑制率 (%)
Control	5	28.8±9.0	—
Propolis	5	14.2±2.3	50.7
SAM-M	5	7.4±1.6*	74.3
SAM-N	5	5.9±2.1*	79.6

B

投与3時間後 (持続性)	n	潰瘍係数 (mm) 平均値±S.D.	潰瘍抑制率 (%)
Control	7	57.7±11.7	—
Propolis	6	43.2±7.7	25.1
SAM-M	6	29.5±7.1*	48.9
SAM-N	6	24.7±3.5*	57.2

*p<0.05 vs. control

は120 minの時点でも吸収率の低下は認められなかった。すなわち、プロポリスSAMでは小腸におけるフラボノイドの吸収が長時間にわたって持続することが示唆された。

2・3・5 胃潰瘍抑制活性の評価

Wistar系雄性ラットを24 h絶食後、プロポリス固形分に換算して30 mg/kgとなるようにプロポリス従来品およびSAM-M, SAM-Nをラットに経口投与した。投与1 h後(即時性評価), または3 h後(持続性評価)にHCl・エタノール溶液を, 経口投与して潰瘍を誘導した。1 h後に胃を摘出して, 胃体部に生じた損傷の長さを測定し, その総和を潰瘍係数とした。その結果, 試料投与1, 3 h後ともに, プロポリスSAMは従来品と比較して高い潰瘍形成抑制率を示した(Table 2)。この効果は, プロポリスSAMが胃の粘膜に付着することにより, 滞留時間が延長し, 薬効が持続したためと考えられる。

以上のように, プロポリスSAMは消化管の粘膜に対して高い付着性を有し, 滞留時間が延長することが示唆された。これにより, プロポリス製剤に含まれる有効成分のバイオアベイラビリティが向上し, その薬理作用を

持続的に発揮させることが可能になったと考えられる。

3 終わりに

科学的に機能を有する食品は, トクホや栄養機能食品も含まれるが, そのレベルに達していなくても客観的に評価に値するものであればそれも機能性食品と定義することができる。本稿では, 一部の機能性向上法につき紹介したが, これら加工物は機能のみならず安全性担保の必要性はいうまでもない。さらに, 摂取量においても十分検討を重ね, 最終的には臨床による評価が好ましい。

文 献

- 1) 尾前照雄ら, 治療, 71, 1101-4 (1998).
- 2) Cheung, B., *Hong Kong Med. J.*, 8, 185-91 (2002).
- 3) Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 922-5 (1993).
- 4) Yokoyama, K., Chiba, H. & Yoshikawa, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 1541-5 (1992).
- 5) Yamamoto, N. & Takano, T., *Nahrung.*, 43, 159-64 (1999).
- 6) 鈴木和道, 吉田千絵, 三島 敏ら, 日本食品科学工学会誌, 50, 286-8 (2003).
- 7) 徳永勝彦, 鈴木和道, 三島 敏ら, 日本食品科学工学会誌, 50, 457-62 (2003).
- 8) 丸山広恵, 徳永勝彦, 三島 敏ら, 日本食品科学工学会誌, 50, 310-5 (2003).
- 9) Tokunaga, K.H., Yoshida, C., Suzuki, K.M. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 189-92 (2004).
- 10) 徳永勝彦, 鈴木和道, 三島 敏ら, 日本食品科学工学会誌, 51, 34-7 (2004).
- 11) 梶本修身, 丸山広恵, 三島 敏ら, 健康・栄養食品研究, 7, 53-71 (2004).
- 12) 梶本修身, 丸山広恵, 三島 敏ら, *Health Sci.*, 21, 229-45 (2005).
- 13) Mishima, S., Ono, Y., Araki, Y. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 1025-30 (2005).
- 14) Kimoto, T., Arai, S., Kohguchi, M. *et al.*, *Cancer Detect. Prev.*, 22, 506-15 (1998).
- 15) Wang, B.H., Ternai, B. & Polya, G., *Phytochem.*, 44, 787-96 (1997).
- 16) Murakami, A., Gao, G., Omura, M. *et al.*, *Bioorg Med. Chem. Lett.*, 10, 59-62 (2000).
- 17) Arjun, B., Yasuhiro, T. & Shigetoshi, K., *Phytother. Res.*, 15, 561-71 (2001).