J. Fd Hyg. Safety 11(2), 77 - 82(1996)

녹차 카테킨류의 항혈전 효과

윤여표† · 강원식 · 이미애
충북대학교 약학대학

The Antithrombotic Effects of Green Tea Catechins

Yeo-Pyo Yun, Won-Seek Kang and Mi-Yae Lee
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

ABSTRACT — Green tea catechins(GTC) were studied for its inhibitory effect on human platelet aggregation *in vitro*, for its antithrombotic effect in mice *in vivo*, and for bleeding and clotting time in rats. The catechins were isolated and purified from green tea, which were composed of (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate and (-)-epicatechin. GTC produced a potent inhibition of human platelet aggregation in a dose-dependent manner against the stimulants such as ADP, collagen, epinephrine and ristocetin *in vitro*. GTC also prevented death due to the formation of pulmonary thrombosis by platelet aggregates in mice in a dose-dependent manner *in vivo*. GTC increased the bleeding time, whole blood clotting time and plasma clotting time in rats, too. These results suggest that GTC is a promising antithrombotic agent.

Key words □ Green tea catechins (GTC), Platelet aggregation, Antithrombotic effect, Bleeding and clotting time

생체내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있으며 정상적으로 순환하고 있는 동안에는 혈전이 생성되지 않는다. 그러나 여러가지 원인으로 균형이 깨져 혈전이 생성되면 혈관을 막게 되므로 혈액의 순환이 방해되어 조직으로의 영양분 및 산소공급이 중단되게 된다. 뇌혈관이 막히면 뇌혈전증이 일어나 반신불수가 되며, 심장혈관이 막히면 심부전증이나 심장마비가 되어 사망하게 된다. 이 심근경색과 뇌경색처럼 혈전이 혈관을 막아 일어나는 병을 통틀어 혈전증이라 하며, 혈전증의 시작은 나이가 듦으로 진행되는 혈관벽의 죽상경화 이지만, 혈관 중의 혈소판 응집력의 항진에 의한 혈전의 형성이 직접적인 원인이 된다. 이러한 혈관계 질환은 현대인의 사망율에 있어서 암이나 기타 감염을 통한 질병보다 훨씬 높기 때문에 현재 의학적으로 많은 관심과 함께 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이와같은 경우 혈전형성을 방지하기 위해 혈소판 기능을 약간 억제할 필요가 있고 그 역할을 하는 항혈소판제제, 즉 혈소판 활성화 억제제등 항혈전제가 요구된다.

녹차는 비알콜성 음료로서 영양 및 기호식품일 뿐만 아니라 인간의 질병 예방 및 치료는 물론 생리조절과 영양공급의 관점에서 볼 때 신체조절기능을 가진 식품이기도 하다. 현대 생명과학기술의 발전에 따라 녹차의 약리효과가 더욱 분명해지고 있다. 녹차는 차나무(*Theae sinensis L*, 차나무과)의 잎을 말린 것으로 흥분, 강심, 이뇨, 해열, 수렴 등의 약리학적 작용을 가지는데 이는 녹차중의 caffeine 성분에 의한 것이며, 혈관강화작용은 catechin 등의 polyphenol류에 의한 것이다. 최근 녹차의 catechin류에 대해서 다양한 생리활성이 연구되고 있으며, 이중에 catechin에 대한 활성, 즉 혈압강하작용,[1] 항산화작용,[2] 암 발생 억제효과,[3-10] HIV 역전사효소 억제작용,[11,12] cholesterol 재흡수 억제,[13] 충치예방[14] 등 여러가지 약리효과에 대한 보고가 있으며, 혈소판응집 저해활성도 보고된 바 있다.[15,16] 그러나 녹차의 유해성은 보고되어 있지 않으며, 이는 약으로의 개발에 밝은 장래성을 보이는 것이다.

이에 본 연구에서는, 지금까지 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고된 녹차 catechin류가 항혈전 효과를 나타낼 것으로 사료되어, 녹차로 부터 생리활성 물질인 catechin류를 분리, 정제하고, *in vitro*에서 혈소판응집 억제 활성을 검색하였으며, *in vivo*에서 antithrombotic activity를 시험했고, bleeding time과 clotting time에 미치는 효과를 시험하였다. 이를 통하여 항혈전제로의 개발 가능을 검토하고

† Author to whom correspondence should be addressed.

자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 녹차는 전남 보성산으로 경동시장에서 구입하였으며, 혈소판 응집활성측정에 사용한 혈소판 및 platelet poor plasma(PPP), platelet rich plasma(PRP)는 건강한 성인 남성의 혈액으로 부터 얻었다.

실험동물

본 실험에 사용된 Sprague-Dawley(SD) rat 및 ICR mouse는 충북대학교 수의과대학 동물사육장에서 분양받아 1주 이상 본 실험 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. SD rat는 몸무게 180~200 g의 male을 사용하였으며, ICR mouse는 몸무게 20~25 g의 male을 사용하였다.

실험방법

시료의 추출 및 분리 — 녹차 350 g을 취하여 약 80°C의 열수 1.0 L로 20분간 추출한 후, 녹차의 고형성분을 압착하여 제거하고, 추출액을 합하여 200×g에서 5분간 원심분리하여, 고형성분을 완전히 제거한 후 상층을 모아 vacuum rotary evaporator에서 45°C로 유지하면서 약 150 m*l*가 될 때까지 농축하였다. 50 m*l*의 농축액에 대하여, 150 m*l*의 ethyl acetate로 2회 추출하여 얻은 액을 합하여 약 30 m*l*로 농축하여 시료로 하였다.

Sephadex LH-20(30~100 μm size) 60 g을 평취하여, 증류수 600 m*l*에 약 4시간 정도 팽윤시킨후, 내경 30 mm의 내벽을 siliconization한 column에 기포나 불균일한 층이 생기지 않도록 천천히 column 입구에서 들어 부어 360 mm높이까지 packing 하였다. 이 후 증류수 500 m*l* 정도를 흘려 column을 안정화하였다.

농축시료 약 15 m*l*를 loading하고, Yayabe등의 방법[17]을 변형하여, 먼저 100% 증류수 1100 m*l*로 caffeine, 유리 amino acid 및 당류등의 방해물질이 포함된 녹색분획을 용출시키고, 15% acetone 600 m*l*를 흘려 terpenoids류 및 그 외의 착색성분들을 완전히 제거하였다. 이어서 60% acetone 600 m*l*를 흘려 얻어진 fraction을 vacuum rotary evaporator에서 45°C의 온도로 약 20 m*l*가 될 때까지 감압 농축한후 -80°C에서 동결건조시켜 얻은 황색의 결정(11.9 g, yield : 3.4%)에 대하여, 분리 column temperature를 40°C로 하고, 20% methanol용리에서 254 nm에서 HPLC로 확인하였다.

HPLC Apparatus and Conditions

- Pump : L-6200 intelligent pump(Hitachi),
- Detector : L-4200 UV-VIS detector(Hitachi)
- Column oven : 655A-52 column oven(Hitachi)
- Integrator : D-2500 chromato-integrator(Hitachi)
- Mobile phase : MeOH-H_2O(20:80, v/v), isocratic elution
- Flow rate : 1.0 m*l*/min
- Injection volume : 5 μ*l*
- Analytical column : cosmosil packed 5C18 column
- Detection : UV 254 nm
- Chart speed : 2.5 mm/min

혈소판응집 억제능 시험

Platelet Rich Plasma의 조제 — 혈소판의 기능이 정상인 건강한 사람으로 부터 항응고제로 3.8% sod. citrate tube에 1:9의 비율로 채혈하였다. platelet rich plasma(PRP)와 platelet poor plasma(PPP)는 분별원심분리법에 의해 얻는데 200×g에서 10분간 원심분리를 행하여 침전된 적혈구와 백혈구등을 제거한 상등액을 PRP라하고, PRP를 2,000×g에서 10분간 더 원심분리하여 침전을 제거한 상등액을 PPP라 하였다. 혈소판 응집억제능 시험에 사용한 PRP는 cell counter를 이용하여 PRP중의 혈소판 수를 계측하고 PPP로 희석하여 혈소판수가 200,000~400,000개/μm³가 되도록 조절했으며 제조한 PRP는 응집측정시까지 실온중에 보관하였다.

혈소판응집 억제능의 측정 — 혈소판응집 억제능은 platelet aggregometer(AGGRECODER™ PA 3210)를 이용한 탁도측정방법[18]으로 측정하였다. PRP를 400 μ*l* 취하여 먼저 37°C에서 3분간 incubation 시킨 후 녹차 catechin류를 0.1, 0.5, 1.0 mg/m*l*의 농도로 50 μ*l*를 가하고 2분 후 혈소판 응집촉진물질 50 μ*l*로 자극하여 응집을 유도하였으며, 5분간 측정한 후, 최대 응집점을 잡아 억제되는 정도를 계산하였다. 응집이 측정되는 동안 반응액의 교반은 1,000 rpm 으로 유지하였다. 혈소판 응집촉진물질로는 ADP(20 μ*M*), collagen(200 μg/m*l*), epinephrine(10 μ*M*), ristocetin(1.5 mg/m*l*)을 사용하였으며, inhibition %는 다음의 식과같이 구했다.

$$\text{Inhibition \%} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A : control의 aggregation %

B : 약물처치시의 aggregation %

항혈전능 시험 — 실험적 혈전 유도는 Dimino 등의 실험방법[19]에 준하여 실시하였다. 이때 사용된 동물은 몸무게 약 20~25 g 정도의 숫컷 ICR mouse였다. 혈전의 유발은 혈소판 응집시약(collagen, epinephrine)을 꼬리정맥에 주사하여 미소혈관내에 혈전이 생성되도록 하였으며, 사용된 응집시

약은 15 μg의 collagen과 400 μM의 epinephrine이 생리식염수 100 μl에 함유되도록 조제하고, mouse 몸무게 20 g당 100 μl의 용량으로 꼬리정맥에 주사하였다. 녹차 catechin류의 항혈전효과를 알아 보기 위하여 혈소판 응집시약을 정맥주사 하기전 1시간전에 녹차 catechin류 10, 100 mg/kg 용량으로 mouse에 경구 투여했고, 대조군으로는 증류수를 동일 용량을 투여했고, 양성 대조약물로는 aspirin 100 mg/kg을 경구투여하였다. 항혈전효과는 혈소판 응집시약의 주사로 인하여 발생하는 mouse 뒷다리의 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물의 숫자의 백분율로 계산하였으며, 여기서 마비는 15분이상 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림상태가 지속될 때를 기준으로 하였다.

출혈시간의 측정 — 출혈시간은 Hornstra법[20]에 따라서 측정하였다. SD rat(male, 180~200 g)에 1일 1회 연속 10일간 녹차 catechin류를 10, 100, 300 mg/kg의 용량으로 경구투여했다. 다음날 sodium pentobarbital(400 mg/kg)을 복강내에 주사하여 마취시키고, 꼬리의 끝부분에서 5 mm되는 곳을 잘라 꼬리의 5 cm 되는 곳까지 37.5°C의 saline 용액에 담그어 지혈될 때까지의 시간(sec)을 측정했다(loose and temporary platelet plug가 형성될 때까지의 시간).

전혈응고시간의 측정 — Rat를 에테르 마취시키고 3.13% sodium citrate용액 0.5 ml를 미리 넣은 플라스틱 주사기로 혈액을 심장으로 부터 5 ml되도록 취했다. 채취한 혈액을 혼합한 후 플라스틱 주사기에 모으고, 혈액 1 ml을 유리 시험관에 넣고 1.7% $CaCl_2.2H_2O$ 200 μl를 가하여 실온에서 흔들어 주면서 혈응괴(red thrombus)가 생길때까지의 시간(sec)을 측정했다.

혈장응고시간의 측정 — 위에서 얻은 혈액 일부를 200×g에서 원심분리하여 혈장을 얻었다. 혈장 100 μl, saline 100 μl 및 50 mM $CaCl_2$ 50 μl를 유리 시험관에 넣고 37°C에서 흔들어 주면서 clot가 생길 때까지의 시간(sec)을 측정했다.

결과 및 고찰

녹차로 부터 생리활성물질인 catechin류를 추출, 정제하였다. 이들의 화합물을 HPLC로 확인한 결과 (-)-epigallocatechin gallate(EGCG), (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epicatechin gallate(ECG), (-)-epicatechin(EC)등 4가지 화합물로 구성되어 있었으며 EGCG가 60% 정도로 주요 화합물 이었다(data not shown).

Platelet aggregometer를 이용하여 혈소판응집 억제능을 측정한 결과, 녹차 catechin류 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml 농도에서, 다양한 혈소판 응집촉진물질(ADP, epinephrine, collagen, ristocetin)에서 용량 의존적으로 혈소판 응집억제 효과가 있었다(Table 1). 녹차 catechin류 1.0 mg/ml 농도에서, ADP에서 79.6%, collagen에서 86.7%, epinephrine의 경우 97.5%, ristocetin에서 36.5%의 혈소판응집 억제효과가 있었다. 반면에 대조약물인 aspirin의 경우에는 collagen과 epinephrine에서는 효과가 있었지만 ADP와 ristocetin의 경우에는 효과가 없었다. 이로서 본 녹차 catechin류가 aspirin보다 광범위한 혈소판응집제에 대해서 억제 효과가 있었고, 혈소판응집 억제 기전이 상이함을 알 수 있었다. 이때 IC_{50} 값은 ADP에서 539.2 μg/ml, collagen에서 523.2 μg/ml으로 나타났다(Table 2).

*In vitro*에서 혈소판응집억제 작용이 있음을 확인하고 *in vivo*에서의 항혈전효과를 알아보기 위해서 antithrombotic activity 실험을 행하였다. 혈전유발 시험 결과, 우선 collagen과 epinephrine의 적정한 혈전유발 용량을 확인하는 실험으로서 15 μg collagen과 400 μM epinephrine이 100 μl의 생리 식염수에 포함되도록 하여 정맥내 주사한 결과, 90%의 혈전을 유발시킬 수 있었다. 녹차 catechin류의 antithrombotic effect 시험 결과, 녹차 catechin류 투여용량 10, 100 mg/kg에서 용량의존적으로 antithrombotic effect가 나타났다(Table 3). Catechin류 10 mg투여군에서 46%의 혈전

Table 1. Inhibitory effects of green tea catechins on human platelets aggregation induced by various aggregating agents

	ADP		Collagen		Epinephrine		Ristocetin	
	Aggregation (%)	Inhibition (%)	Aggregation (%)	Inhibition (%)	Aggregation (%)	Inhibition (%)	Aggregation (%)	Inhibition (%)
Control	90.5	0.0	86.5	0.0	99.0	0.0	96.0	0.0
Green tea catechins								
0.25 mg/ml	81.8	9.6	78.8	8.9	95.0	4.0	102.0	0.0
0.50 mg/ml	62.5	30.9	64.5	25.4	–	–	–	–
1.00 mg/ml	18.5	79.6	11.5	86.7	2.5	97.5	61.0	36.5
Aspirin 0.1 mM	78.3	13.5	23.7	72.6	19.5	80.3	96.5	0.0

Table 2. Amount of green tea catechins required to produce a 50% inhibition(IC_{50}) of human platelet aggregation induced by ADP and collagen

Aggregating agents (Concentration)	IC_{50}(μg/ml)	*b*	*r*
ADP(20 μM)	539.2	29.0	0.92
Collagen(200 μg/ml)	523.2	31.4	0.87

IC_{50}(μg/ml) values were calculated from regression lines where x was the log of the tested concentration of the compound and y was the percent inhibition of platelet aggregation; *b*=slope of the regression line; *r*=correlation coefficient.

Table 3. Preventive effects of green tea catechins on the experimental thrombosis induced by the mixture of platelet agonist in mice

	Thrombosis Dead/Test	Protection (%)
Control	13/13	0.0
Green tea catechins		
10 mg/kg	6/11	45.5
100 mg/kg	5/15	66.7
Aspirin 100 mg/kg	7/13	46.2

* Thrombosis was induced by the mixture of platelet agonist. (15 μg of collagen plus 400 M epinephrine in saline)

예방효과를 나타내었고, 100 mg/kg 투여시에는 67% 예방효과를 보였다. 반면에 대조약물인 aspirin의 경우 100 mg/kg투여시에 46.2%의 혈전예방 효과가 있었다. 본 실험결과, 녹차 catechin류가 대조약물인 aspirin보다 훨씬 뛰어난 항혈전효과가 있음을 알 수 있었다.

또한, 녹차 catechin류 투여용량 10, 100 mg/kg에서 bleeding time, whole blood clotting time, plasma clotting time이 용량의존적으로 증가되었다.

Fig. 1에서 보는 바와같이 출혈시간이 대조군에서 65.00±12.92초인데 반해서, 10 mg/kg 시료투여군에서 113.17±19.68초, 100 mg/kg 시료투여군에서 230.71±117.32초, 300 mg/kg에서 509.78±71.60초로서, 녹차 catechin류 투여군에서 bleeding time이 용량의존적으로 증가되었다. 반면에 대조약물인 aspirin(100 mg/kg)에서는 165.14±34.31로, 녹차 catechin류가 대조약물인 aspirin보다 우수한 것으로 나타났다.

전혈응고시간에 미치는 영향에 대한 시험 결과, 대조군에서 전혈응고시간이 109.38±14.02초인데 반해서, 10 mg/kg 시료투여군에서 130.13±20.53초, 100 mg/kg 시료투여군에서 134.88±14.24초, 300 mg/kg에서 143.63±19.36초로서 용량의존적으로 증가되었다. 반면에 대조약물인 aspirin(100 mg/kg)에서는 137.19 19.36초로, 녹차 catechin류가 대조약물인 aspirin보다 우수한 것으로 나타났다(Fig. 2).

그리고, 혈장응고시간에 미치는 효과에 대한 시험 결과,

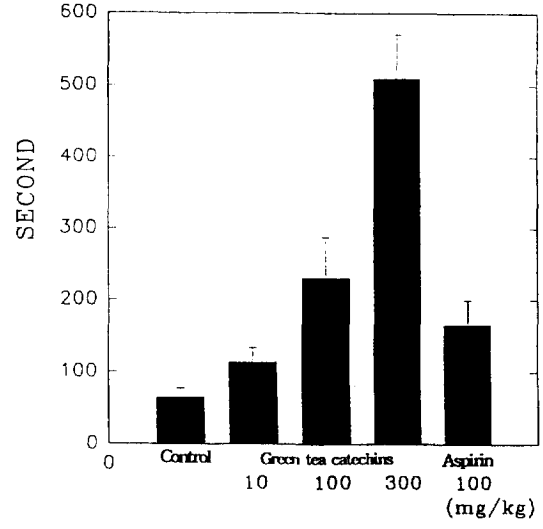

Fig. 1. Effects of green tea catechins on bleeding time in rats.

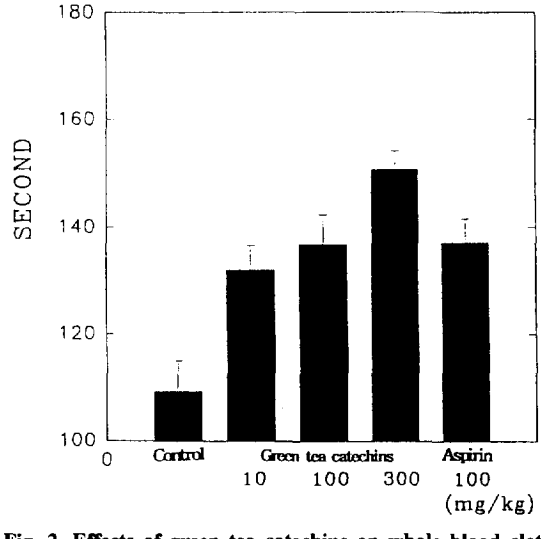

Fig. 2. Effects of green tea catechins on whole blood clotting time in rats.

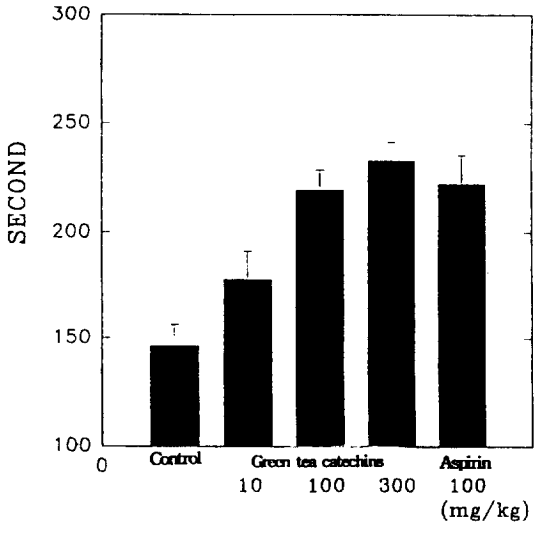

Fig. 3. Effects of green tea catechins on plasma clotting time in rats.

대조군에서 혈장응고시간이 146.25±26.55초인데 반해서, 10 mg/kg 시료투여군에서 177.50±37.58초, 100 mg/kg 시료투여군에서 220.75±57.96초, 300 mg/kg에서 233.13±83.25초로서 용량의존적으로 증가되었다. 반면에 대조약물인 aspirin(100 mg/kg)에서는 222.50±40.23초로 시료와 유사한 정도의 효과가 나타났다(Fig. 3).

이상의 결과를 요약하면, 녹차 catechin류 투여용량 10, 100 mg/kg에서 bleeding time, whole blood clotting time, plasma clotting time 등이 용량의존적으로 증가되는데, 이로써 녹차 catechin류가 혈액의 점도를 떨어뜨리어 혈액순환을 원활하게 해주는 것으로 추측된다.

결론적으로, 녹차 catechin류는 *in vitro*에서 다양한 혈소판 응집촉진제에 의한 혈소판 응집을 억제시키고, *in vivo*에서 혈전형성을 방지하며, 출혈시간의 연장 및 응고시간의 지연등의 효과가 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때, 녹차 catechin류는 혈소판 응집을 억제 시킴으로서 항혈전효과가 있음을 알 수 있었고, 항혈전제으로서의 가능성을 기대할 수 있었다. 그러나 구체적인 항혈전, 혈소판응집 억제 기전에 대해서는 앞으로 연구가 더 진행되어야 밝혀지리라 사료되며, 이에 대한 연구가 계속 진행중에 있다.

감사의 말씀

이 연구는 95년 보건복지부 신약개발 지원연구사업의 지원에 의해 수행된 것으로 깊이 감사드립니다.

국문요약

녹차의 항혈전 효과 및 그 작용물질을 검색하기 위해서 녹차에서 catechin류를 분리, 정제하였고 그 구성성분은 EGCG, EGC, ECG, EC이었다. Platelet aggregation 시험결과, 녹차 catechin류가 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml 농도에서, 4가지 혈소판 응집촉진물질(ADP, collagen, epinephrine, ristocetin)에서 용량의존적으로 혈소판 응집억제 효과를 나타냈다. Antithrombosis 시험 결과, 녹차 catechin류 10, 100 mg/kg 투여군에서 용량의존적으로 antithrombotic effect를 나타냈다. 또한, 녹차 catechin류의 투여용량 10, 100 mg/kg 투여군에서 bleeding time과 whole blood clotting time, plasma clotting time이 용량의존적으로 증가되었다. 본 연구결과를 통해서 녹차 카레킨류가 항혈전제로의 개발 가능성이 있음을 알수 있었다.

참고문헌

1. Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T.: Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components., *Nippon Nogeikagaku Kaishi,* **61**, 803 (1987).
2. Matsuzaki, T. and Hara, Y.: Antioxidative activity of tea leaf catechins., *Nippon Nogeikagaku Kaishi,* **59**, 129 (1985).
3. Xu, Y., Ho, C.T., Amin, S.G., Han, C. and Chung, F.L.: Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenisis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants., *Cancer Res.,* **52**, 3875 (1992).
4. Hayatsu, H., Inada, N., Kakutani, T., Arimoto, S., Negishi, T., Mori, K., Okuta, T. and Sakata, I.: Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate., *Prev. Med.,* **21**, 370 (1992).

5. Sakagami, H., Asano, K., Hara, Y. and Shimamura, T.: Stimulation of human monocyte and polymorphonuclear cell iodination and interleukin-1 production by epigallocatechin gallate., *J. Leukoc. Biol.*, **51**, 478 (1992).
6. Huang, M.T., Ho, C.T., Wang, G.Y., Ferraro, T., Finnegen-Olive, T., Lou, Y.R., Mitchell, J.M., Laskin, J.D., Newmark, H. and Yang, C.S.: Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin., *Carcinogenesis*, **13**, 947 (1992).
7. Austin, C.A., Patel, S., Ono, K., Nakane, H. and Fisher, L.M.: Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives., *Biochem. J.*, **282**, 883 (1992).
8. Agarwal, R., Katiyar, S.K., Zaidi, S.I.A. and Mukhtar, H.: Inhibition of skin tumor promoter-caused induction of epidermal ornithine decarboxylase in SENCAR mice by polyphenolic fraction isolated from green tea and its individual epicatechin derivatives., *Cancer Res.*, **52**, 3582 (1992).
9. Conney, A.H., Wang, Z.Y., Huang, M.T., Ho, C.T. and Yang, C.S.: Inhibitory effect of green tea on tumorigenesis by chemicals and ultraviolet light., *Prev. Med.*, **21**, 361, (1992).
10. Mukhta', H., Wang, Z.Y., Katiyar, S.K. and Agarwal, R.: Tea components: Antimutagenic and anticarcinogenic effects., *Prev. Med.*, **21**, 351 (1992).
11. Nakane, H. and Ono, K.: Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases., *Biochemistry*, **29**, 2841 (1990).
12. Kakiuchi, N., Kusumoto, I.T., Hattoro, M., Namba, T., Hatano, T. and Okuda, T.: Effect of condensed tannins and related compounds on reverse transcriptase., *Phytother. Res.*, **5**, 271 (1991).
13. Ikeda, I., Imasato, Y., Sasaki, E., Nakayama, M., Nagao, H., Takeo, T., Yayabe, F. and Sugano, M.: Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats., *Biochem. Biophys. Acta.*, **1127**, 141 (1992).
14. Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y. and Hirasawa, M.: Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea., *Caries Res.*, **25**, 438 (1991).
15. Yamanaka M.: Antiplatelet aggregation effects of tea extracts and catechins., *Proceedings of Annual Conference of Nippon Nogeikagaku* **62**, 627 (1988).
16. Sagesaka-Mitane, Y., Miwa, M. and Okada, S.: Platelet aggregation inhibitors in hot water extract of green tea., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 790, (1990).
17. Yayabe, F., Kinugasa, H. and Takeo, T.: A simple preparative chromatographic separation of green tea catechins., *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **63**, 845 (1989).
18. Nunez, D. and Levy-Toledano, S. Further characterization of human platelet activation in the absence of aggregation : phosphorylation of specific and relationship with platelet secretion., *Thromb. Haemostas.* **51**, 198 (1984).
19. Dimino, G. and Silver, M.J. Mouse antithrombotic assay: A simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity by ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**, 57 (1983).
20. Hornstra, G., Christ-Hazelhof, E., Haddeman, E., Hoor, F.T. and Nugteren, D.H.: Fish oil feeding lowers thromboxane-and prostacyclin production by rat platelets and aorta and does not result in the formation of prostaglandin I_3: *Prostaglandins.* **21**, 727(1981).