緑茶冷水（4℃）浸出液のカテキン浸出特性及び茶期・品種の異なる 緑茶冷水浸出液がマクロファージ様細胞の貪食能へ与える影響

（独）農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所*

物部真奈美・池田麻衣・江間かおり・徳田佳子

山本（前田）万里

（平成24年11月8日受理）

Effect of Cold Green Tea (*Camellia sinensis* L.) Extract Derived from Different Cropping Periods or Cultivars on Phagocytic Activity of Macrophage-like Cells

Manami Monobe, Mai Ikeda, Kaori Ema, Yoshiko Tokuda and Mari Maeda-Yamamoto
NARO Institute of Vegetable and Tea Science

Summary

The activation of mucosal immunity by drinking of green tea extraction with a high EGC ratio was positively correlated with the activation of macrophage phagocytosis by the green tea extract. Therefore, we estimated the effect of green tea extract derived from different cropping periods or cultivars using phagocytic activity of macrophage-like cells, so that the necessary condition to activate the macrophage phagocytosis was over 2 ratio of EGC to EGCG. The tea leaves harvested in late seasons include many catechins; therefore, the use of the late season leaves is effective way to get many catechins. Moreover, catechins content in tea leaves differs among cultivars. In this study, “Yutakamidori” was high EGC content cultivar.

Key Words : green tea (*Camellia sinensis* L.), cold extract, macrophage-like cells, phagocytic activity

キーワード：緑茶 (*Camellia sinensis* L.), 冷水浸出, マクロファージ様細胞, 貪食活性

* 〒428-8501 静岡県島田市金谷猪土居2769

1 緒 言

免疫能の低下は感染症リスクの増加につながり、特に高齢者においては重大な問題となる。このような問題に対して、予防医学の観点からのアプローチは重要な対策の1つになると考えられている。食を通した感染症予防対策として、メカブのフコイダン¹⁾や乳酸菌飲料による自然免疫系の改善²⁾等が報告されているが、緑茶においても冷水浸出液の連続飲用により、粘膜免疫系の改善効果が見出されている^{3,4)}。

緑茶冷水浸出液を飲用することによる粘膜免疫系の活性効果は、マクロファージの活性上昇と正の相関が認められること³⁾から、本報では、緑茶冷水浸出液のカテキンの浸出特性及びマクロファージ様細胞の貪食能を指標に、緑茶冷水浸出液による自然免疫系の活性化について、摘採時期（以下茶期と表す）及び品種による違いを明らかにした。

2 実験方法

2. 1 緑茶浸出材料

（独）農研機構 野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点の圃場（静岡県島田市）で慣行施肥栽培の‘やぶきた’、‘ゆたかみどり’、‘おくみどり’、‘さえみどり’、‘かなやみどり’、‘さやまかおり’を適期で手摘みし（芽から4葉まで）、1回あたり約100-200 gの生葉を、マイクロ波（RE-6300, 1900W, シャープ製）を用いて数分間蒸熱・乾燥させ、粉碎（マルチビーズショッカー, 安井機械製）したもの、及び機械摘みした‘やぶきた’を製茶したものを供試材料とした。茶葉0.75gに30mLの蒸留水を添加し、100℃で5分間または4℃で1時間静置して浸出した。

2. 2 カテキン測定

浸出液のカテキン含量は、以下の条件による高速液体クロマトグラフ法で分析した⁵⁾。

カラムはWakopak Navi C18-5（和光純薬製, i.d. 4.6×150mm, 粒子径 5 µm）、ガードカラムはWakopak Navi C18-5（和光純薬製, i.d. 4.6×10mm, 粒子径 5 µm）、カラム温度は40℃、検出波長は272 nm、注入量は20µL（アドバンテック社製, DISMIC-13-HPPTFE, 0.45µmろ過液）、流速は1 mL/minで、移動層Aは蒸留水：アセトニトリル：リン酸（H₃PO₄）=400：10：1（v/v）、移動層Bは、メタノール：移動層A=1：2（v/v）。溶出は、0-2分はA：B=8：2で、2-27分はA：B=2：8でリニアグラジエントして、27-37分はA：B=2：8で行った。

2. 3 貪食賦活活性評価

免疫賦活活性の評価には、マクロファージ様細胞の貪食活性を測定する方法を用いた⁶⁾。120nMカルシトリオール（和光純薬製）を含有するRPMI1640培地（ライフテクノロジーズジャパン社製）で7日間培養したHL60細胞（ATCC CCL-240）を、48ウェルマイクロプレート（BDバイオサイエンス社製）に 2.5×10^5 cells/well/250µLで播種し、蛍光ミクロスフェア（2 µm, YG；ポリサイエンス社製）25µLと緑茶浸出液（無処理）25µLを添加し、プレートシェイカーにて混和後、37℃、5% CO₂環境下で16時間培養した。培養終了後、2%ホルムアルデヒド-PBS溶液にて細胞を固定し、フローサイトメーター（Cell Lab Quanta；ベックマンコールター社製）にて蛍光ビーズを貪食した細胞数を測定した。活性評価結果は、総細胞数に対する蛍光ビーズ貪食細胞数の比を、被検液を添加しないコントロールを100%とする相対値で表した。

3 結果と考察

3. 1 茶期の異なる緑茶浸出液中のエピガロカテキンガレート（EGCG）とエピガロカテキン（EGC）含量変化

EGCGとEGCは緑茶浸出液中の総カテキンの約70%を占めており³⁾、主にこの2種のカテキンがマクロファージ様細胞の活性化に寄与している。図1 A, Bは、‘やぶきた’ (2009年4月, 粉末) 茶葉 0.75gに30mLの蒸留水を添加し、冷水(4℃, 1時間)または熱水(100℃, 5分)浸出した浸出液中のEGCGとEGCの含量変化を示す。冷水・熱水浸出液ともに一番茶期(4月下旬)に比べて、二番茶期以降(6月中旬, 8月上旬)でEGCGとEGC濃度が高くなる傾向にあった。表1にも示す通り、これは、茶葉中のEGCとEGCG含量が一番茶に比べて二番茶以降の方が高くなるためである⁷⁾。しかしながら、EGCとEGCGの含有比率は浸出液の温度によって異なる。熱

水浸出した場合、図1 Bに示すように、EGCがわずかに少ないものの、EGCとEGCGはほぼ同程度の濃度で浸出されている。一方、冷水浸出した場合は、図1 Aに示すように、EGCG濃度は熱水浸出した場合の約半分となる。これらの結果は、以前にも報告されている通り、EGCGが低温で浸出されにくいものである^{3,8)}。図1 C, Dは、‘やぶきた’ (2008年, リーフ及び粉末) 茶葉0.75gに30mLの蒸留水を添加し、冷水(4℃)浸出時間を変えた時の浸出液中のEGCGとEGCの含量変化を示す。両カテキンともに浸出時間の経過に従って浸出量が増加した。粘膜免疫系の活性化に有効であったEGC量は、1日あたり50mg(25mg×2回)以上である³⁾。本条件で、1

図1 茶期 (A, B) 及び浸出時間 (C, D) の異なる冷水 (4℃) または熱水 (100℃) 浸出液中のEGCGとEGC含量の変化 (○ EGC, □ EGCG)

A及びBはマイクロ波乾燥後に粉末化した‘やぶきた’ (2009年) を使用。サンプルが少量のため、それぞれ1回の測定。C及びDは‘やぶきた’ (2008, 4月) 仕上げ茶を使用 (リーフ及び粉末)。結果は3回抽出した平均値±SDを示す。

表1 茶期及び品種の異なる茶葉中EGC, EGCG含量（g/100g乾物重）とその含有比率

	4～5月			6月			8月		
	EGC	EGCG	EGC/EGCG	EGC	EGCG	EGC/EGCG	EGC	EGCG	EGC/EGCG
やぶきた	3.53±0.84	6.37±0.24	0.55	4.41±0.32	9.13±0.93	0.48	5.63	8.64	0.65
さえみどり	3.32±0.47	5.03±0.93	0.66	5.21±0.84	8.76±1.19	0.60	5.52	8.17	0.67
ゆたかみどり	4.55±0.59	6.61±0.85	0.69	5.88±0.58	8.29±0.75	0.71	6.81	8.03	0.84
おくみどり	2.68±0.48	6.08±0.81	0.44	4.13±0.46	7.87±1.02	0.52	4.49	7.72	0.58
かなやみどり	4.29±0.92	7.06±0.61	0.61	5.07±0.83	7.18±2.48	0.71	5.58	8.87	0.63
さやまかおり	2.81±0.34	6.25±0.49	0.45	4.58±0.57	8.28±1.11	0.55	5.78	8.46	0.68

* 4～6月及び6月は2006, 2007, 2009, 2010, 2011年の平均±SD

* 8月は2007年単年の値

回分量のEGC 25mgを得るためには、リーフ茶の場合、少なくとも30分以上の浸出時間が必要である（図1C）。リーフ茶を粉末にして静置浸出を行った場合、約30分でリーフ茶60分浸出とほぼ同程度のEGC量が得られるが（図1C）、EGCの活性を阻害するEGCGも増える（図1D）。そのため、浸出時間は粉末茶よりも長くなるが、リーフ茶を用いた方が、より高EGC比率の浸出液を得やすい。

3. 2 貪食刺激活性の茶期による変動

図2は、茶期の異なる‘やぶきた’茶葉の冷水及び熱水浸出液がマクロファージ様細胞の貪食能へ与える効果を示す。各浸出液は、1/100濃度になるように細胞浮遊液へ添加した。冷水浸出液では、茶期が進むに従い貪食刺激活性の上昇が認められたが、6月に摘採した茶と8月に摘採した茶では活性に有意な差はなかった。ここには示していないが、他

図2 茶期の異なる冷水（4℃）及び熱水（100℃）浸出液がマクロファージ様細胞の貪食能へ与える効果
茶期の異なる‘やぶきた’粉末（2009年）の浸出液の活性を、コントロールの活性を100%とした時の値として示している。 $n=3$ 、エラーバーは標準偏差。

*は統計的に有意な差があることを示す（Bonferroni/Dunn post-hoc test, $p<0.05$ ）。

の茶品種で調べた結果においても、6月及び8月に摘採した茶で活性に差がない結果を得ている。一方、熱水浸出液では、いずれの茶期においても活性は認められなかった。EGCとEGCGは、単独でマクロファージ様細胞の貪食能を活性化させることが可能であり⁹⁾、さらに、EGCは生体においてIgA産生能を改善するが^{3,4)}、EGCとEGCGの等量混合液ではその効果が減弱されることが報告されている³⁾。効果が減弱されてしまうメカニズムは未だ不明ではあるが、EGCとEGCGが同比率で含まれていることが、熱水浸出液で活性が認められなかった原因であると推察される。一方、冷水浸出液は、EGCとEGCGの浸出効率の違いにより、EGC比率の高い浸出液となっており、一番茶期の茶に比べて、EGC濃度が高くなる二番茶以降の茶で活性に有意な差を示したと考えられる。さらに、EGC量が終濃度約8 µg/mL以上では活性に有意な差

が認められないことから、一定濃度を超えると、それ以上の効果は得られないことがわかる。本結果では、茶浸出液中のEGC/EGCGが約2を超えれば、EGCGによる阻害を上回る効果を十分に得られており、EGC含量の高い二番茶以降の茶では、1回あたりの茶葉量が一番茶よりも少ない量で効果が期待できる。

3. 3 貪食刺激活性の摘採年度による変動

図3は、摘採年度の異なる‘やぶきた’茶葉の冷水浸出液が、マクロファージ様細胞の貪食能へ与える効果を示す。本試験期間中に摘採された‘やぶきた’の冷水浸出液の活性は、年次間差もなく、コントロールに対してほぼ同程度の活性上昇を示した。また、熱水浸出液では、2011年と2010年で有意な差が認められたものの、いずれの年のサンプルもコントロールに対して有意な活性上昇は認めら

図3 摘採年度の異なる冷水（4℃）及び熱水（100℃）浸出液がマクロファージ様細胞の貪食能へ与える効果

摘採年度の異なる‘やぶきた’浸出液の活性を、コントロールの活性を100%とした時の値として示している。 $n=3$ 、エラーバーは標準偏差。異なるアルファベットは、統計的に有意な差があることを示す（Bonferroni/Dunn post-hoc test, $p<0.05$ ）。

れなかった。このことから、EGCを十分量含む冷水浸出液であれば、大きな年次間差もなく、安定した効果が得られるものと考えられる。

3. 4 貪食刺激活性の品種による変動

図4は品種の異なる二番茶期（2011年6月下旬）の‘やぶきた’，‘ゆたかみどり’，‘お

くみどり’，‘さえみどり’，‘さやまかおり’，‘かなやみどり’の冷水浸出液が，マクロファージ様細胞の貪食能へ与える効果を示す。この6品種は，平成20年の都府県における緑茶の優良品種別栽培面積¹⁰⁾の上位品種（‘やぶきた’ 75.6%，‘ゆたかみどり’ 5.3%，‘おくみどり’ 2.0% ‘さえみどり’ 1.9%，‘さやまかおり’ 1.6%，‘かなやみどり’，1.4%）で

図4 品種の異なる冷水（4℃）浸出液がマクロファージ様細胞の貪食能へ与える効果

コントロールの活性を100%とした時の各種緑茶冷水（4℃）浸出液の活性を示している。上段と下段で分析日が異なるが、‘やぶきた’は同じサンプルを用いている。 $n=3$ 、エラーバーは標準偏差。異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示す（Bonferroni/Dunn post-hoc test, $p<0.01$ ）。

ある。品種間による大きな活性の差はなく、いずれの品種もマクロファージ様細胞の食食能を有意に活性化した(図4)。このことから、煎茶を冷水浸出して飲用する場合、冷水浸出液中に十分量のEGCが含まれていれば、少なくともこの6品種間では、活性に大きな差はないといえる。

3. 5 茶葉中のEGC, EGCG含量とその含有比率

冷水浸出液中に十分量のEGCを得ようとする場合、茶葉中の含量が大きく影響する。表1に、各種茶品種の茶葉中EGC及びEGCG含量とその含有比率を示す。ここに示した全ての品種で、4~5月茶にくらべて6月以降の茶で茶葉中のEGC含量が増加しており、効率良くEGCが得られることがわかる。ここに示した金谷茶業研究拠点において本試験期間中に摘採された6品種の中では、'ゆたかみどり'は全ての茶期を通して茶葉中のEGC含量が高いだけでなく、EGCGに対するEGC含有比率が高く、浸出する際に高EGC比を得やすい品種であった。

4 摘 要

緑茶冷水(4℃)浸出液を飲用することによる粘膜免疫系の活性効果は、マクロファージの活性上昇と正の相関が認められている。そこで、本報では、マクロファージ様細胞の食食能を指標に、緑茶冷水浸出液による自然免疫系の活性化について、茶期及び品種による違いを調べた。その結果、緑茶冷水浸出液のEGC/EGCGが約2を超えていることが必要条件であり、かつEGC量が十分量含まれていれば、茶品種・年度に関わらず活性を得られることが示唆された。さらに、茶期が進むに従いカテキン含量が上昇するため、茶期の進んだ茶葉を利用すると効率良く成分を得ることが可能である。また、品種によっても茶葉中EGC含量に違いがあり、本報告の環境

条件下で調べた茶品種の中では「ゆたかみどり」が全ての茶期でEGC含量比が高く、効率良く高EGC浸出液を得られる品種であった。

5 謝 辞

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「食品・農産物の表示の信頼性確保と機能性解析のための基盤技術の開発(タンニン類に着目したリンゴ・茶の生体調節作用の医学的検証と高含有品種育成など活用に関する研究開発)」により推進された。

6 引 用 文 献

- 1) Maruyama H, H Tamauchi, M Iizuka, T Nakano (2006): The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls (Mekabu). *Planta. Med.* 72, 1415-1417.
- 2) Nanno M. (2005): Immunomodulation by *Lactobacillus casei* strain Shirota, *BIO Clinica.*, 20, 60-64.
- 3) Monobe, M., K. Ema, Y. Tokuda and M. Maeda-Yamamoto (2010): Effect on the epigallocatechin gallate/epigallocatechin ratio in a green tea (*Camellia sinensis* L.) extract of different extraction temperatures and its effect on IgA production in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2501-2503.
- 4) 物部真奈美・江間かおり・徳田佳子・山本(前田)万里(2012): 冷水浸出緑茶の飲用が緑茶常飲者の唾液中分泌型IgA量に与える効果に関する予備的検討(予報). 茶研報, No.113, 71-76.
- 5) Maeda-Yamamoto, M., H. Nagai, Y. Suzuki, K. Ema, E. Kanda and H. Mitsuda (2005): Changes in O-methylated Catechin and Chemical Component Contents of 'Benifuuki'

- Green Tea (*Camellia sinensis* L.) Beverage under Various Extraction Conditions. Food Sci. Tech. Res., 11, 248-253.
- 6) Monobe M, K Ema, F Kato, H Hirokane, M Maeda-Yamamoto (2007): Technique for screening immune-enhancing polysaccharides in food using 1,25-dihydroxyvitamin D3-differentiated HL60 cells. J. Agric. Food Chem., 55, 2543-2547.
- 7) 三輪悦夫・高柳博次・中川致之(1978): 葉位別にみた茶葉の化学成分含量. 茶研報, No.47, 48-52.
- 8) 坂本彬・中川致之・杉山弘成・堀江秀樹(2003): 煎茶の1煎, 2煎, 3煎液の成分組成に基づく溶出特性. 茶研報, No.94, 45-55.
- 9) Monobe, M., K. Ema, Y. Tokuda and M. Maeda-Yamamoto (2010): Enhancement of phagocytic activity of macrophage-like cells by pyrogallol-type green tea polyphenols through caspase signaling pathways. Cytotechnology, 62, 201-203.
- 10) 平成24年版茶関係資料, 社団法人日本茶業中央会, 平成24年6月, p23-25.