13-143-9 ペットボトル緑茶飲料中のカテキン類の機能性評価についての基礎的検討

The study on functional evaluation of the catechin in bottled green tea drinks

○石橋悠希子、中村拓己、金澤秀子

共立薬科大学 薬学部

Yukiko Ishibashi, Takumi Nakamura, Hideko Kanazawa,

Kyoritsu University of Pharmacy

1. はじめに

緑茶の主要成分であるカテキン類の効果・効能は、発がん抑制作用、抗酸化作用、血中コレステロール低下作用、血圧上昇抑制作用など多岐にわたり、その機能が注目されている。一方近年の健康志向の高まり、ペットボトルの導入などで、緑茶はその消費量を急速に伸ばし、特にこれまで緑茶摂取量の少なかった若年まで消費者層が拡大している。さらにカテキン類はお茶からの摂取のみならず、様々な製品に添加されるなど多方面で利用され、その摂取量が急激に増加していることから、改めてその機能を見直す必要がある。一方、市販されている緑茶飲料には、茶葉由来のカテキン類のほかに、その製造工程などで生じるカテキン類の異性化体が含まれていることが知られており、本研究では、異性化体も含めたカテキン類について高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析を行った。薬物代謝には多くの酵素が関わっているが、第 I 相の薬物代謝反応の約 80% に関与するといわれているのが薬物代謝酵素チトクローム P450 (cytochrome p450 ; CYP) である。カテキン類の機能解析として、抗突然変異作用の中でも特に発がん物質や変異原物質の CYP による代謝活性化の阻害作用に注目した。ヒト肝の薬物代謝に関与する主な CYP 分子種のうち特に、CYP1A2 は芳香族アミン、アフラトキシン B₁、CYP3A4 は多環式芳香族炭化水素、アフラトキシン B₁ などのがん原物質の代謝活性化に関与することが知られている。よって、CYP 代謝系に対するカテキン類の阻害効果を測定し、その阻害メカニズムについても考察した。さらにポリフェノール類であるカテキンの抗酸化作用についても検討した。

2. 実験方法

〔装置及び測定条件〕 Pump : D-7100, UV Detector : D-7400, Integrator : D-7500, Fluorescence Detector :

F-1050, Autosampler : D-7200 (HITACHI), Column : Mightysil RP18 GP 150-4.6 (5 μ m), Flow Rate : 1.0mL/min, UV : 244nm for CYP1A2, 254nm for CYP3A4, Fluorescence : Ex 280nm, Em300nm for CYP2D6, Eluent : 20mM CH₃COONH₄ / CH₃CN

〔方法〕 基質、CYP をブレインキュベーションした後、NADPH generating system を加え、インキュベーションした。反応は、氷冷した CH₃CN を加えることで停止させ、遠心分離を行った。上清を上記の HPLC 条件によって分析した。カテキン類による阻害実験を行う際は、NADPH generating system を加える前に、各濃度に希釈したカテキン類を加え、反応させた。

3. 結果・考察

3.1 ペットボトル緑茶飲料中のカテキン類の定量

内標準物質として 4-hydroxybenzoic acid を用い、市販されているペットボトル緑茶飲料中の異性化体を含めたカテキン類 (8 種) およびカフェインの定量を行った。その結果、EGCG (エピカテキンガレート) とその異性化体の GCG (ガロカテキンガレート) (Fig.1) は約 1 : 1、EGC (エピガロカテキン) とその異性化体の GC (ガロカテキン) は約 1 : 2 の割合で存在しており、緑茶飲料中にはカテキン類の異性化体が高濃度で含まれていることを確認した。また、茶葉中のカテキン類の約 50% は EGCG であるが、緑茶飲料中では EGC およびその異性化体である GC が最も多く含まれており、茶葉と緑茶飲料中に含まれるカテキン類の割合が異なっていた。そこで、抽出温度によるカテキン類の抽出率の検討を行った。茶葉を水で 30 分間抽出したところ、親水性の高いカテキン類 (EGC) は抽出温度に関係なく抽出率が高く、逆に疎水性の高いカテキン類 (EGCG) は抽出温度の影響を受けやすく、温度の上昇とともに抽出率も上昇した。よって、茶葉中と緑茶飲料中のカテキン類の割合が異なる原因の 1 つは抽出温度であることが推測さ

れた。

3.2 薬物代謝系に対するカテキン類の阻害効果

薬物代謝酵素の基質として CYP1A2 にはフェナセチンおよびアセトアニリド, CYP3A4 にはテストステロン, CYP2D6 にはデキストロメトルファンを用いた。代謝反応はリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中、37℃、全量 0.5mL の条件で行った。各基質、CYP、カテキン類に NADPH generating system を加え、反応を開始した。反応は、氷冷したアセトニトリルを加えることで停止させ、遠心分離を行い、上清の代謝物濃度を HPLC により測定した。カテキン類の CYP 代謝系に対する阻害効果は、カテキン類を加えていないときの代謝物量を 100% として、その活性を示した。阻害実験では、カテキン類は茶葉中に主として含まれる EC (エピカテキン), EGC, ECG (エピカテキンガレート), EGCG の 4 種と EGCG の異性化体の GCG を用いた。CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6 代謝系に対するカテキン類の阻害効果は、カテキン類の種類によって異なり、EGCG や GCG, ECG などガレート構造をもつカテキン類では大きく、その構造をもたないカテキン類では小さかった。ガレート構造が CYP 阻害効果に大きく影響を与えていると推測されたことから、ガレート構造のみからなる没食子酸の CYP 阻害効果を測定した。その結果、没食子酸はガレート構造をもたないカテキン類と同程度あるいはそれ以下の CYP 阻害活性を示した。このことから、カテキン中のガレート構造が CYP 阻害効果に大きく影響するが、ガレート構造単独ではその効果を示さないことが示唆された。

Fig.1 Structures of catechins

Fig.2 Chromatogram of catechins in bottled green tea

3.3 カテキン類の抗酸化作用

カテキン類の抗酸化作用の測定のためにラジカル消去能について検討した。カテキン類の DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去能を測定した。50μM および 100μM カテキン類溶液 (エタノール溶液) 0.1mL、0.1M Tris 緩衝液 (pH 7.4) 0.4mL、500μM DPPH 溶液 (エタノール溶液) 0.5mL を暗所 (20℃) で 20 分間反応させ、517nm の吸光度 (A_x) を測定した。また、対照はカテキン類溶液の代わりにエタノール溶液を加えたときの吸光度 (A_0) を測定し、ラジカル消去能は、 $E = (A_0 - A_x) / A_0 \times 100$ で算出した。その結果、ガレート構造をもつカテキン類、B 環に水酸基を多くもつカテキン類ほどラジカル消去能が増大した。

4. 結論

本研究により緑茶飲料中には抗酸化活性の高いカテキンとして知られている EGCG の他、その熱異性化体である GCG も多く含まれることが明らかとなった。GCG の薬物代謝系に対する活性については、これまでほとんど報告がなかったが、本研究により GCG は、EGCG と同程度の抗酸化活性及び CYP 阻害活性があることが明らかとなった。

発表論文

- (1) 中村拓己, 浅田絵美, 永田佳子, 金澤秀子, 緑茶飲料中カテキン類の CYP3A4 による代謝系への阻害効果の解析. 分析化学, 2003; 52(9): 769-773.