緑茶抽出液中の抗菌性物質

丹 野 憲 二*・野々村英夫*

Antibacterial Substances in Green Tea Extract

KENJI TANNO and HIDEO NONOMURA

Antibacterial substances in hot-water extract (110°C, 15 min) of a green tea product was investigated. The experimental results obtained were as follows.

1. Antibacterial effects of the green tea extract appeared to be conspicuous on *Vibrio metschnikovii* and *Alcaligenes faecalis*. These bacteria were found to be about ten-times as sensitive as *Staphylococcus aureus* to the extract.

2. The green tea extract was adsorbed to casein and the tannin fraction, which showed antibacterial effects, was eluted from the adsorbent with 90% aq. acetone. Five catechins were separated from the tannin fraction by paper chromatography and their contents were quantitatively determined. The minimum inhibitory concentrations (mcg/ml) of these catechins on *V. metschnikovii* were: epigallocatechin 20, epigallocatechin gallate 45, epicatechin gallate 45, galocatechin 50, and epicatechin 75.

3. Addition of caffeine at a concentration of approx. 1 mg/ml showed a marked synergetic effect to increase the antibacterial titre of catechins (ca. 4 mg/ml). However, caffeine itself (2 mg/ml) had no antibacterial action.

4. An aqueous solution containing the above five catechins and caffeine at the same concentrations as in the green tea extract showed a similar antibacterial titre to that of the extract.

(Received Apr. 16, 1974)

緑茶の加熱水抽出液を寒天培地として土壌微生物を平板分離すると、糸状菌が選択的に分離される。その原因の一つは抽出物に抗菌性物質が含まれているためである。しかしこの抗菌性物質の詳細については充分解析されていない。

これまで、茶抽出液の抗菌性について、梶本¹⁾²⁾³⁾は、*Micrococcus pyogenes* var. *aureus* (*Staphylococcus aureus*) の生育阻害成分としてエピガロカテキンガレートと没食子酸を推定し、また最近、西山ら⁴⁾は乳酸菌の生育阻害因子を検索し、それはフェノール関連化合物であろうと推測している。なお岡田ら⁵⁾⁶⁾は植物ウイルスの増殖に対する茶抽出液およびカテキン類の効果を報告している。

著者は、緑茶の熱水抽出 (110°C 15 分) 液に対し、特に感受性の高い細菌種を選択して抗菌力価検定用を使用し、この抗菌性を追究したところ、緑茶抽出液の抗菌性力価は、5 種のカテキンの抗菌力の総計と、カフェインの相助作用で構成されていることが明らかになったの

で、その結果を報告する。

試料および実験方法

1. 緑茶抽出液

市販煎茶 (松翠) 5 g を蒸留水 100 ml に加え、110°C で 15 分間加熱しその滷液を遠心分離した透明液を用いた。

2. 標準カテキン及び関連物質

(-) エピカテキン (略 EC), (-) エピカテキンガレート (ECg), (+) ガロカテキン (GC), (-) エピガロカテキン (EGC) および (-) エピガロカテキンガレート (EGCg) は農林省茶業試験場中川氏より分譲された。このうち GC は木麻黄から、その他は茶葉から分離精製されたものである。没食子酸、タンニン酸、カテコール及びカフェインは市販試薬である。

3. 供 試 菌

東京大学応用微生物研究所から、山梨大学工学部生物化学研究室を経て分譲された (Table 1)。

* 山梨大学工学部 (甲府市武田四丁目)

Faculty of Engineering, Yamanashi University, Kofu.

4. 抗菌力の測定

(1) 生育阻害最低濃度 (MIC)

試験管でブイヨン培地 (peptone 10 g, beef extract 5 g, NaCl 3 g, dist. water 1000 ml, pH 7.0) または加糖 (glucose 10 g) ブイヨン培地に供試物を添加し、これに新鮮な供試菌培養を約 3×10^4 Cells/ml 接種し各菌種の適温に1週間培養して対照と生育を比較した。培地の pH に変化をきたす供試物の場合は磷酸緩衝液を加えた。

(2) バルブディスク法

ブイヨン寒天培地 (寒天 1.5%) 10 ml を径 9 cm のペトリ皿に注入固化する。*Vibrio metschnikovii* をブイヨン培地で 35°C 20 時間前培養したものを、溶解したブイヨン寒天培地 (寒天 1.0%) に 1% 接種し、前記平板上に 5 ml 重層し固化させる。供試物溶液に浸したバルブディスク (東洋汙紙, 径 8 mm, 厚手) をとり出して平板上におき、35°C で 20 時間培養後生育阻止円の直径を測定する (Fig. 3)。ディスク 5 枚の平均値をとる。同時に緑茶抽出液を各濃度に薄めて同様に測定し、その濃度と直径の関係から供試物溶液の抗菌比較力価を算出した。

5. 緑茶抽出液の分画

抽出物中の抗菌性物質はメルク製 カゼイン (Casein nach Hammersten) で吸着させ、10% 含水アセトンで溶離できたので、Fig. 1 に示したとおりに抽出液を分画してそれぞれの区分を分析した。

6. カテキン類の簡便定量

Fig. 1. Separation method of the antibacterial substances (catechins) in green tea extract

中川ら⁷⁾の方法に従い一次元ペーパークロマトで各スポットを浸出し呈色させ 420 nm の吸光度を測定した。回分浸出で水は 5 ml とした。また標準品も同様に処理して、10 mcg/ml 附近の検量線を作成して、これにより各カテキン量を算出した。なお本法では没食子酸および (+) カテキンのスポットは ECg. のそれに重なるが、その含量は微量に過ぎないので考慮しなかった。

7. カフェインの半定量

茶抽出液をクロロホルムで充分抽出し、塩化カルシウムで乾燥したのち蛍光性シリカゲル薄層にスポットし、0.2% アンモニウム水飽和 *n*-ブタノールで約 9 cm 展開し、蛍光下で標準量カフェインのスポットの大きさと比較判定した。

結果および考察

1. 緑茶抽出液の抗菌性に対する各種細菌の感受性

緑茶抽出液 寒天に種々の細菌を接種したところ、Table 1 のように大多数の細菌は生育できなかった。参考のため糸状菌や酵母も数種ずつ試験したが、これらはいずれもよく生育した。細菌が生育できない原因の一つには、抽出液が抗細菌物質を含むことが挙げられる。従って次に茶抽出液をブイヨン培地および加糖ブイヨン培地に添加して、細菌を接種し、その MIC (添加 %) を測定した。その結果は Table 1 に示すとおり、*Vibrio metschnikovii* 及び *Alcaligenes faecalis* が特に著しく阻害されることがわかった。これらは *Staphylococcus aureus* よりも約 10 倍の感受性があり、抽出物 1% の添加でも生育阻害がみられた。

この結果により、以下の抗菌性検定菌には *V. metschnikovii* を使用した。またその感受性が高いために、バルブディスク法でも抗菌力測定が可能であった。

2. 緑茶抽出液中のカテキン

緑茶抽出液を Fig. 1 に示した方法により分画し、各区分の乾固物量、カテキン量、抗菌力価の定量を行なった結果を Table 2 および 3 に示した。カゼインによる吸着と、10% 含水アセトンによる溶離を 2 回行なうと、乾固物量とカテキン重量はほぼ一致した。

なお 1 回目の吸着及び溶解率は、それぞれ約 90% であったが、特にエステル型カテキンの吸着および溶解率は高いものであった。

Table 1. Tea extract sensitivity of various bacteria

Test organism	Growth* on tea extract agar	MIC**, % in	
		Bouillon	Glucose-bouillon
<i>Vibrio metschnikovii</i> IAM*** 1039	—	1.0	3.8
<i>Alcaligenes faecalis</i> IAM 1015	—	2.5	2.5
<i>Staphylococcus aureus</i> IAM 1011	—	15	20
<i>Bacillus cereus</i> IAM 1072	—	30	30
<i>Proteus vulgaris</i> IAM 1025	—	30	>40
<i>Flavobacterium sewanense</i> IAM 1014	—	40	>40
<i>Micrococcus varians</i> IAM 1314	—	>40	>40
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 1069	—	>40	>40
<i>Sarcina lutea</i> IAM 1099	—	>40	>40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM 1007	±	>40	>40
<i>Escherichia coli</i> IAM 1101	±	>40	>40
<i>Aerobacter uerogenes</i> IAM 1063	+	>40	>40

* —, ±, +: No, scanty, and moderate, respectively.

** Minimum inhibitory concentration of the tea extract used.

*** Institute for Applied Microbiology, Tokyo University.

Table 2. Catechin contents and antibacterial titres of tea extract and its fractions

Fraction shown in Fig. 1	Dry matter* (mg)	Total catechins		Antibacterial titre**	
		(mg)	(%)	C	M
Tea extract 50 ml	670	187	100	100	100
Fraction Ia	170	148	79	80	86
Ib	406	17	9	11	18
Fraction IIa	105	101	54	53	51
IIb	51	11	6	6	9

* Subtracted the blank test value.

** Relative titre compared with the tea extract: C=calculated from Tables 3 and 4. M=measured by pulp disc method.

Table 3. Catechin compositions of tea extract and its fractions

Fraction shown in Fig. 1	Catechin* (mg)				
	EC	ECg	EGC	EGCg	GC
Tea extract 50 ml	20.0	15.0	30.0	71.5	50.0
Fraction Ia	14.7	13.2	25.1	59.5	35.5
Ib	2.1	0.5	5.4	3.2	5.7
Fraction IIa	13.3	10.1	14.5	40.0	23.2
IIb	1.7	0.4	3.1	1.9	4.3

* EC=epicatechin, EGC=epigallocatechin, GC=gallocatechin, -g=gallate. Of free gallic acid, only a trace.

茶葉が含有するカテキン量^{7,8)}(溶媒抽出)に比較すると、供試した加熱抽出液中のカテキン量は茶葉に換算してもはるかに少ないものであったが、ただガロカテキン

が比較的多いという特徴がみられた。

3. カテキン定量値と抗菌力価の関係

Fig. 1 で分画した各区分中に含まれるカテキン量と、

Table 4. MIC of tea catechins and related compounds for *Vibrio metschnikovii*

Test compound	MIC (mcg/ml)*	Test compound	MIC (mcg/ml)
Epigallocatechin	20	Tannic acid	125
Epigallocatechin gallate	45	Catechol	500
Epicatechin gallate	45	Gallic acid	500~1000
Galocatechin	50	Caffeine	>2000
Epicatechin	75		

* By tube dilution method in Bouillon broth.

Table 5. Antibacterial synergism between catechins and caffeine

Solution	Catechin* (mg/ml)					Caffeine** (mg/ml)	Antibact. titre***
	EC	ECg	EGC	EGCg	GC		
Mixture of pure substances { A	0.4	0.3	0.6	1.4	1.0	0.0	93
	0.4	0.3	0.6	1.4	1.0	1.0	114
Control tea extract	0.4	0.3	0.6	1.4	1.0	0.5~0.8	100

* For abbreviation, see foot note of Table 3.

** Not inhibitory in the single use.

*** For *V. metschnikovii*, by pulp disc method.

* Compared with the original tea extract titre (100)

Fig. 2. Increase in antibacterial titre of caffeine free (chloroform-washed) tea extract by addition of caffeine

その区分の抗菌力価にはほぼ比例的関係がみられたが、Table 4 に示したとおり、カテキンは種類によって抗菌力価に差がみられたので、各カテキンに抗菌力価の重みをつけると Table 2 の計算値 (C) となる。これは抗菌力の実測値 (M) と比較的近似していることがわかる。しかしなお両者の相異は不純物を多量に含む区分 (特に Ib) では大きく、抗菌力価がカテキンのみから推算できないことが示唆される。

4. カテキンとカフェインの抗菌性相助作用

検定菌 *V. metschnikovii* に対するカテキンの MIC は 20~75 mcg/ml で、カフェインは 2000 mcg/ml でも生育は阻害しなかった (Table 4)。他方抽出液中のカ

Fig. 3. Pulp disc method

- 1: Control tea extract
- 2: 50% soln. of tea extract
- 4: Soln. A noted in Table 5
- 5: Soln. B noted in Table 5
- 3: Soln. omitted EGC from Soln. A

テキンは約 4 mg/ml、カフェインは 0.5~0.8 mg/ml であった。従ってカフェイン単独では抽出液の抗菌性力価に何ら寄与していないと考えられる。

しかし、緑茶抽出液をクロロホルムで充分洗滌してカフェインを除去すると (このときカテキンも約 5% 減少した) 抗菌力価は低下し、これにカフェインを加えると上昇し、カフェイン 1~2 mg/ml 附近で最高となった (Fig. 2)。このことはそれ自体抗菌性を示さない量のカフェインがカテキンの抗菌性を明らかに増加させているものと考えられる。

5. 純物質混合液の抗菌力価

供試した緑茶抽出液のカテキン及びカフェイン量を参考に、各標準物質を混合した液A及びBと緑茶抽出液の抗菌性力価を比較した。その結果を Table 5 および Fig. 3 に示した。予想されたように、カテキンのみの混合液(A)は対照より抗菌力価は低く、それにカフェインを 1mg/ml 加えた混合液(B)は、対照より抗菌力価が高く現われた。

また緑茶抽出液の示す抗菌性力価は、それに含まれるカテキン及びカフェインから生ずる抗菌力価にほぼ等しいことが明らかとなったので、これら以外の茶抽出物成分は、抗菌性に対して重要でないと考えられた。なお没食子酸はカテキンに比してはるかに微量しか検出されず、またその MIC も大きいので緑茶の加熱水抽出液中で占める抗菌力価は無視すべきものであった。

要 旨

緑茶の加熱水抽出 (110°C, 15 分) 液に含まれる抗細菌性物質について研究し次の結果を得た。

(1) 茶抽出液の抗菌性に対して *Vibrio metschnikovii* および *Alcaligenes faecalis* は特に敏感な感受性を示すことがわかった。それは *Staphylococcus aureus* の示す感受性の約 10 倍であった。

(2) 茶抽出液をカゼインで吸着し、10% 含水アセトンで溶離させたタンニン区分に抗菌性物質が分離された。このタンニンはペーパークロマトで 5 種のカテキンに分

離され、それぞれ定量された。これらカテキンの *V. metschnikovii* に対する最少阻害濃度 (mcg/ml) はそれぞれエピガロカテキン: 20, エピガロカテキンガレート: 45, エピカテキンガレート: 45, ガロカテキン: 50 およびエピカテキン: 75 であった。

(3) カフェインは濃度約 1mg/ml で、カテキン (約 4mg/ml) の抗菌性力価を著しく強める相助作用があった。なおカフェインの単独使用 (2mg/ml) では抗菌性はみられなかった。

(4) 茶抽出液中の上記 5 種のカテキンおよびカフェインの濃度と同濃度にした純品カテキン類・カフェインの混合水溶液は、茶抽出液と同等の抗菌性力価を示した。

終りに御指導を得た当教室小原蔵教授、並びに貴重な純カテキン類を試料として賜った農林省茶業試験場中川致之氏に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 梶本五郎: 食品工誌, 10, 1 (1963).
 - 2) 梶本五郎: 食品工誌, 10, 3 (1963).
 - 3) 梶本五郎: 食品工誌, 10, 9 (1963).
 - 4) 西山隆造・小崎道雄: 農化誌, 48, 83 (1974).
 - 5) 岡田文雄: 植物病理会報, 37, 29 (1971).
 - 6) 岡田文雄・古谷弘三: 茶技研報, No. 42, 39 (1971).
 - 7) 中川致之: 茶技研報, No. 29, 67 (1964).
 - 8) 阿南豊正・中川致之: 農化誌, 48, 91 (1974).
- (昭和 49 年 4 月 16 日受理)