総 説

緑茶の抗アレルギー作用とがん転移阻害効果

(平成 14 年度日本食品科学工学会奨励賞)

山本 (前田) 万里

Anti-Allergic and Anti-Cancer Metastatic Actions of Green Tea

Mari Maeda-Yamamoto

National Institute of Vegetable and Tea Science, National Agricultural Research Organization,
2769 Kanaya, Shizuoka 428-8501

緒 言

茶 (*Camellia sinensis* L.) は、数多くの生理機能性をもつことから、近年、注目されてきた嗜好飲料である。茶はツバキ科の植物で、製法的な違いから、不発酵茶 (緑茶; 蒸したり炒ったりして酸化酵素を失活させてから揉む茶)、発酵茶 (紅茶; 熱をかけずに十分酸化させた茶、ウーロン茶や包種茶; 少し酸化萎凋 (しおれさせること) させてから熱をかけて酸化を止める半発酵茶、黒茶や阿波番茶; 熱処理した茶葉を微生物で発酵させた後発酵茶) に分けられる。茶葉には、カテキン類 (渋み)、カフェイン (苦み)、各種ビタミン (C, B, A, E)、テアニン等のアミノ酸 (旨み)、フラボノイド、微量金属類、食物繊維、サポニンなどが含有されている。このうち、これまでにポリフェノール類のカテキン (catechin) について数多くの生理機能性が報告されている。緑茶に含まれているカテキン類は 10~20% で、その主要なものは、カテキン類の約半量を占めるエピガロカテキンガレート (EGCG)、その他エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECG)、エピカテキン (EC) である。紅茶にはそれらの重合したテアフラビン (TF1)、テアフラビン-3-ガレート (TF2A)、テアフラビン-3'-ガレート (TF2B)、テアフラビン-3-3'-ジガレート (TF3)、テアシネンシン類等が含まれている。特に EGCG

は、茶以外の植物では見いだされていない特殊な成分である。また、筆者らは、生理機能性の高いエピガロカテキン-3-O- (4-O-メチル) ガレート (EGCG⁴ Me) という新規なカテキンも茶葉中に見いだしている¹⁾。

茶の伝承効用として、眠気覚まし、熱冷まし、はやり目治癒、食あたり治癒、咳止め、利尿、脱臭、酔い覚まし等が知られており、近年では科学的な解析から抗酸化作用、抗腫瘍作用、発ガン抑制作用、血圧上昇抑制作用、抗菌作用、抗ウイルス作用、抗う蝕性、抗アレルギー作用、消臭作用、脂質代謝改善作用等の生理機能性²⁾³⁾ が数多く解明され注目を集めている。

アレルギーは近年、急激に患者数が増えてきた過度の免疫疾患で、潜在的患者数が全国で 1300 万人いるとも、新生児の発症率が 1/3 であるとも言われている。抗アレルギー薬の副作用への危惧などからもアレルギー予防食品が強く求められている現状にある。現在まで、抗アレルギー作用をもつ茶成分として、エステル型カテキン^{4)~6)}、カフェイン⁷⁾、サポニン⁸⁾ が報告されている。

また、がんの治療においては、転移の阻止ががん制圧の鍵になるといわれている。そのため、日常摂取している茶により、がん転移を阻止することができれば、がん治療に光明を与えられられる。

本報では、それらをふまえ、新たに見出した緑茶の抗アレルギー作用、がん転移阻害作用について概説する。

独立行政法人農業技術研究機構野菜茶業研究所 (〒428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷 2769)
連絡先 (Corresponding author), marimy@affrc.go.jp

1. 茶の抗アレルギー作用

アレルギーは、生体に侵入した異物を攻撃する抗体などが過剰に産生され、正常組織も巻き込んで起こる過剰な免疫反応である。アレルギーにはいくつかのタイプがあるが、IgE 抗体による過剰反応ではある特定のアレルゲン（タンパク質、ダニ、ハウスダスト等）に反応するIgE 抗体が過剰に産生され、マスト細胞の表面に付着し、そこへ再びアレルゲンが到達し抗体に架橋すると、

マスト細胞は刺激（活性化）を受け、ヒスタミン、ロイコトリエンなどの炎症物質を出して、喘息、花粉症などを起こす（図 1）。

そこで抗アレルギー物質を探索するため、初期アレルギーの中心的役割を果たすマスト細胞（マウスマスト細胞株 MC/9 及び PT-18）を用いた実験系を作って、アレルゲン特異的 IgE 及びアレルゲン刺激時（脱顆粒時）のヒスタミン遊離量を指標に、抗アレルギー作用を持つ茶品種の探索を行った。

図 1 マスト細胞をめぐってアレルギー発症機序

図 2 マスト細胞ヒスタミン遊離に及ぼす茶品種の影響
英数字の不一致はその間に有意差のあることを示す。

1) メチルカテキン類

その結果、普通煎茶のほとんどを占める品種である「やぶきた」ではなく、紅茶系品種「べにはまれ (茶農林 1 号)」や台湾系統に強いヒスタミン遊離抑制作用を見出した (図 2)⁹⁾。茶種 (製造法) では弱発酵茶である包種茶 (烏龍茶より軽く発酵させた茶) により強い作用が認められた。マスト細胞内チロシンキナーゼの活性を調べたところ、PVPP (ポリビニルポリピロリドン) でポリフェ

ノール除去処理すると、その効果が弱くなることから、それらの茶に含有されるポリフェノール類が関与すると考えられた (図 3)。さらに、抗アレルギー因子の単離・精製を進めたところ、台湾産ウーロン茶や「べにはまれ」緑茶に含まれる抗アレルギー物質は、カテキン類のエピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート (EGCG3'' Me) およびエピガロカテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレート (EGCG4'' Me) (図 4) であることがわかった¹⁾。

EGCG3'' Me および EGCG4'' Me は、多様な機能が報告されている EGCG のガレート基がメチルエーテル

図 3 マスト細胞内タンパク質チロシンリン酸化に及ぼす PVPP 処理の影響

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
ECG	H	H	H	H
EGCG	OH	H	H	H
EGCG3''Me	OH	H	CH ₃	H
EGCG4''Me	OH	H	H	CH ₃

図 4 カテキン類の化学構造式

図 5 マウスの I 型アレルギーに及ぼすカテキン類の影響

カテキン類は OVA により能動感作されたマウスに経口投与した。* 対応する濃度の EGCG の効果に対する有意差 ($p < 0.01$) を表す。

Dose, ▨, 5 ▤, 10 ■, 50 □, 100 (mg/kg 体重, p.o.) a, 効果なし

図 6 マウスのIV型アレルギー（オキサゾロン誘導耳介浮腫）に及ぼすカテキン類の影響

カテキン類はオキサゾロンとともに各薬量を耳介に塗布した。

Hydrocortizone（ポジティブコントロール）

* control 群に対する有意差を示す ($p < 0.05$)。

Dose ■, 0.05 ; □, 0.13 (mg/耳介塗布)

図 7 EGCG3''Me 含量の品種間差

化された物質である。これらのカテキン類は、マスト細胞内の情報伝達系を阻害することでマスト細胞の活性化を抑え、ヒスタミンの遊離を抑制する。さらに、EGCG 3'' Me はヒト好塩基球株 KU812 のカルシウムイオノフォア刺激時のヒスタミン遊離も抑制することがわかった¹⁰⁾。

図 8 EGCG3''Me 含量の茶期別変動

マウスを使った I 型アレルギー反応実験 (ovalbumin (OVA) と不完全アジュバントで感作したマウスにサンプルを経口投与後、OVA により惹起される血管透過性の亢進をマウスの腹壁を用いて測定する方法でアナフィラキシー反応に対する *in vivo* の効果を反映した系 (AW 法)) においても EGCG に比べ強い抗アレルギー作用を示した (図 5)¹⁾。さらに IV 型アレルギー反応実験である、オキサゾロン誘発皮膚炎検定法により、メチルカテキン類を含む各カテキンの効果を検討した。図 6 に

図 9 ストリクチニンのヒト B 細胞における IL-4 誘導 IgE 重鎖胚型転写物発現抑制効果

示すように, I 型アレルギーに対して抑制効果を示した EGCG3rd Me と EGCG4th Me は 0.13 mg の耳介への塗布において, 耳介浮腫に対する効果 (厚さ, 重量でそれぞれ評価) は, ステロイド系抗炎症剤のヒドロコルチゾンよりやや弱い程度の効果が認められる。また, 4 種の主要カテキン (EC, ECG, EGC, EGCG) が効果を示さない 0.05 mg の塗布において, 有意な抑制効果を示した¹¹⁾。

これらメチルカテキン類は, 薬物動態解析の結果から, 茶の主要なカテキンである EGCG に比べ, マウス血漿中での安定性が高く, 吸収後の血中からの消失が EGCG に比較して緩やかであり, 経口投与による吸収率も有意に高値を示す (60 分での血中濃度は EGCG3rd Me 遊離体で EGCG の 9 倍と高い)¹²⁾。このような安定性の高さや吸収率の良さも *in vivo* での強い抗アレルギー作用に関わっていると考えている。

EGCG3rd Me 含量の品種別および「べにほまれ」等における茶期別, 茶種別変化を調べると, 「べにほまれ」とその後代 (「べにふじ (茶農林 22 号)」, 「べにふうき (茶農林 44 号)」) に多く含まれ (図 7), 二番茶以降の茶葉を (図 8), 緑茶か包種茶に製造した茶に多く含まれ, 紅茶に製造すると消失することがわかった¹³⁾。

2) ストリクチニン

初期アレルギー反応において, マスト細胞にアレルギー特異的 IgE 抗体が結合することが引き金になることは前述の通りである。そこで, ヒト B 細胞株 DND39 を用いて IgE 産生を抑制する物質の検索を行い, 緑茶中のストリクチニンという加水分解型タンニンが B 細胞の IgE クラススイッチ (IgE 重鎖胚型転写物) を抑制する

図 10 転移性がん細胞の血管内転移の過程

こと (図 9) を明らかにした¹⁴⁾。ストリクチニンの作用は STAT6 のチロシンリン酸化を抑制することによる IL-4 誘導クラススイッチ阻害と考えている。

これらの物質を多く含む「べにふうき」などの茶の日常摂取することで初期アレルギー症状は軽くなると期待される。現在, 「べにふうき」の臨床試験を行いながら, 抗アレルギー効果をもつ茶飲料やさまざまな食品への応用を図り, 消費者にアレルギー予防食品を提供すべく検討している。

2. 茶ポリフェノール類のがん転移阻害作用

がん転移 (血管内転移) では, 浸潤の過程 (図 10) が最も重要とされている。そこで, ヒト血管内皮細胞と高転移性ヒト繊維腫 HT-1080 を用いたアッセイ系 (図 11)¹⁵⁾ 及び HT-1080 の分泌する基底膜破壊酵素であるゼラチナーゼ/マトリクスメタロプロテイナーゼ (MMPs) の活性測定により茶ポリフェノールの効果を評価した¹⁶⁾。

HT-1080 を用いたがん浸潤阻害物質検定系を使用して, マウスがん転移実験で阻害効果の認められた茶カテキン類の効果について検討したところ, 図 12 左に示すように, 4 種の緑茶中主要カテキンのうち, エステル型カテキンである ECG, EGCG は, 濃度依存的にがん細胞の浸潤を強く阻害した (ECG の $IC_{50}=80 \mu\text{g/ml}$)¹⁸⁾。しかし, 遊離型カテキンである EC 及び EGC はがん細胞浸潤阻害作用を示さなかった。この結果は, 動物実験やマトリゲルを用いた浸潤実験¹⁶⁾¹⁷⁾ と一致した。また, 図 12 右に EGCG と ECG の HT-1080 に対する細胞毒性 (試料添加時の HT-1080 生存率) を示した。EGCG 及び

図 11 ヒト細胞共生培養法によるがん浸潤阻害物質検定系

図 12 緑茶カテキン類のヒトがん細胞浸潤への影響

ECG は高濃度添加すると細胞毒性を示すが、ECG は毒性が発現する以前の濃度で、がん浸潤阻害活性を示した¹⁸⁾。

これにより、ECG のがん浸潤阻害効果は細胞毒性 ($IC_{50}=1 \text{ mg/ml}$) の結果ではないことが明らかになった。以上のように、ガレート基をもったカテキンに強いがん浸潤阻害活性が認められたので、没食子酸とその誘導体であるメチルガレート、ラウリルガレートのがん浸潤への影響を調べた。いずれもがん浸潤阻害効果はなく、がん浸潤阻害には、エステル型カテキンのような構造が必要であると考えられた。また、緑茶以外のポリフェノール類であるテアフラビン、テアシネンシンでは、テアフラビン (TF1) ががん浸潤抑制を示し、がん細胞への毒性試験からも、毒性なく使用しうると考えられた。また、茶に含まれているフラボノール類 (ケンフェロール、ケルセチン、ミリセチン)、フラボン類 (ケンフェロール、ケルセチン、ミリセチン) を検討したが、

茶フラボノール類もフラボン類もがん浸潤阻害効果を持たなかった。

がん浸潤阻害物質には、がん細胞が基底膜を破壊する基底膜破壊酵素であるマトリクスメタロプロテナーゼ (MMPs) 活性を阻害するものが多い。そこで、HT-1080 の産生する MMPs 活性に及ぼすポリフェノール類の影響を調べた。強いがん浸潤抑制効果を示した ECG、EGCG、TF1 は濃度依存的に MMP-9 (92 k), MMP-2 (72 k, 68 k) のがん細胞からの分泌を阻害した¹⁸⁾。阻害活性の認められなかった EC、EGC は細胞毒性が示された 500 μg/ml 添加でも MMPs のバンドを発現していた。また、ECG、EGCG、TF1 は MMPs を介した基底膜分解をも強く阻害した。このことにより、エステル型カテキン類及びテアフラビンのがん浸潤阻害作用は、転移性がん細胞の基底膜破壊酵素の活性化を阻害することが 1 つの作用機作と考えられた。現在、さらに MMP-9 の遺伝子発現に与える影響についても検討し、エステル型

カテキンがMMP-9のプロモータ活性を抑制することを見出している。

1998年に登録されたMAKURA1号という中間母本は、一般的な煎茶の品種「やぶきた」の1.5~2倍のカテキン含量を有している。このような母本を利用して新たな品種を作出することで、よりがん浸潤阻害効果の高い茶を生み出すことも夢ではないと考えている。

3. おわりに

動物細胞を用いて、茶の新規機能性について検討を行い、抗アレルギー作用やがん転移阻害作用をもつポリフェノール成分を見いだした。特定の品種に含まれるEGCG3" Me, EGCG4" Meはマスト細胞の活性化を抑制し、ストリクテニンはIgEクラススイッチを抑制することで抗アレルギー作用が発揮された。また、ECGは細胞毒性なく、がん浸潤阻害作用をもつ物質であることが判明した。

茶はカテキン類だけでなく、フラボノイドを含め、様々なポリフェノールを数十種類含有している。また、発酵茶、半発酵茶、不発酵茶によってもその含量、組成に違いがある。未知の機能性物質も含有されていることも予想されるので、カテキン類だけでなく、様々なポリフェノール類や多糖類、サポニンなどを検索し、その作用機作の解明、食品や医薬部外品、化粧品への応用などの研究に取り組んでいく必要がある。今後、医学関係の研究機関や病院との連携を進めながら、新たな機能性をもった品種のお茶などの食品、医薬部外品などを実際に提供していきたいと考えている。

本研究を行うにあたり、終始ご協力いただいた共同研究者の静岡県立大学薬学部佐野満昭講師、宮瀬敏男助教授、九州大学大学院農学研究院立花宏文助教授に深甚なる感謝の意を表します。また、懇切な助言を与えて頂いた野菜茶業研究所袴田勝弘茶業研究官、山下市二機能解析部長、静岡県立大学食品栄養科学部伊勢村護教授、実験で多大なご協力を頂いた研究室の方々に心より感謝いたします。さらに、本研究を奨励賞にご推薦いただきました先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究は、生物系特定産業技術研究推進機構の助成を受けて行いました。

文 献

- 1) Sano, M., Suzuki, M., Miyase, T., Yoshino, K. and Maeda-Yamamoto, M., Novel anti-allergic catechin derivatives isolated from oolong tea, *J. Agric. Food Chem.*, **47** (5), 1906-1910 (1999).
- 2) 山本(前田)万里, 茶の体調節機能, *日食工誌*, **43** (6), 653-662 (1996).
- 3) 山本(前田)万里, 茶ポリフェノール類のがん転移抑制効果, *日食工誌*, **47** (8), 567-572 (2000).
- 4) Ohmori, Y., Ito, M., Kishi, M., Mizutani, H., Katada, T. and Konishi, H., Antiallergic constituents from oolong tea stem, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 683-685 (1995).
- 5) 山田耕路, 免疫調節食品と抗アレルギー食品, *日食工誌*, **42** (11), 952-958 (1995).
- 6) Matsuo, N., Yamada, K., Shoji, K., Mori, M. and Sugano, M., Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells; structure-inhibitory activity relationship, *Allergy*, **52**, 58-64 (1997).
- 7) 上田浩史, 鈴木裕子, 堤坂裕子, 山崎正利, 緑茶の抗炎症・抗アレルギー活性-カフェインの作用検討一, *農化誌*, **71** 臨増, 176 (1997).
- 8) Akagi, M., Fukuishi, N., Kan, T., Sagesaka, Y. M., Anti-allergic effect of tea-leaf saponin (TLS) from tea leaves (*Camellia sinensis* var. *sinensis*), *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 565-567 (1997).
- 9) Maeda-Yamamoto, M., Kawahara, H., Matsuda, N., Nesumi, K., Sano, M., Tsuji, K., Kawakami, Y. and Kawakami, T., Effects of tea infusions of varieties or different manufacturing types on inhibition of mouse mast cell activation, *Biosci. Biotech. Biochem.* **62** (11), 2277-2279 (1998).
- 10) Tachibana, H., Sunada, Y., Miyase, T., Sano, M., Maeda-Yamamoto, M. and Yamada, K., Identification of a methylated tea catechin as an inhibitor of degranulation in human basophilic KU812 cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64** (2), 452-454 (2000).
- 11) Suzuki, M., Yoshino, K., Maeda-Yamamoto, M., Miyase, T. and Sano, M., Inhibitory effects of tea catechins and O-methylated derivatives of (-)epigallocatechin-3-O-gallate on mouse type IV allergy, *J. Agric. Food Chem.*, **48** (11), 5649-5653 (2000).
- 12) 佐野満昭, 宮瀬敏男, 立花宏文, 山本万里, 茶成分の抗アレルギー作用, *Fragrance J.*, **28** (4), 46-52 (2000).
- 13) 山本(前田)万里, 佐野満昭, 松田奈帆美, 宮瀬敏男, 川本恵子, 鈴木直子, 吉村昌恭, 立花宏文, 袴田勝弘, 茶の品種, 摘採期と製造法によるエピガロカテキン3-O-(3-O-メチル)ガレート含量の変動, *日食工誌*, **48** (1), 64-68 (2001).

1) Sano, M., Suzuki, M., Miyase, T., Yoshino, K. and Maeda-Yamamoto, M., Novel anti-allergic

- 14) Tachibana, H., Kubo, T., Miyase, T., Tanino, S., Yoshimoto, M., Sano, M., Maeda-Yamamoto, M., and Yamada, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 53-60 (2001)
- 15) 山本(前田)万里, 川原浩治, 長田和浩, 山口優一, 辻 顕光, ヒト細胞株を使ったがん浸潤阻害物質検索法の開発と茶カテキン類への応用, 茶業研究報告, **86** (3), 31-35 (1998).
- 16) Sazuka, M., Murakami, S., Isemura, M., Satoh, K. and Nukiwa, T., Inhibitory effects of green tea infusion on in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse lung carcinoma cells, *Cancer Lett.*, **98**, 27-31 (1995).
- 17) Sazuka, T., Imazawa, H., Shoji, Y., Mita, T., Hara, Y. and Isemura, M., Inhibition of collagenases from lung carcinoma cells by green tea catechins and black tea theaflavins, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1504-1506 (1997).
- 18) Maeda-Yamamoto, M., Kawahara, H., Tahara, N., Tsuji, K., Hara, Y. and Isemura, M., Effects of tea polyphenols on the invasion and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells, *J. Agric. Food Chem.*, **47** (6), 2350-2354 (1999).

(平成 14 年 4 月 17 日受理)