

茶カテキンの抗酸化作用に関する研究

芳野恭士*、渭原 寛、木村志帆、杉浦由佳

沼津工業高等専門学校 物質工学科 (〒410-8501 沼津市大岡 3600)

*k-yoshino@numazu-ct.ac.jp

Antioxidant Effects of Tea Catechins

Kyoji YOSHINO, Hiroshi IHARA, Shiho KIMURA, Yuka SUGIURA

Numazu College of Technology (3600 Ooka, Numazu, Shizuoka 410-8501, Japan)

(Received April 28, 2006; Accepted May 17, 2006)

Abstract

The antioxidant activities of green tea catechins, (-)-epicatechin (EC) and (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), were compared in vitro and in the plasma of mice. In the peroxidations of mouse plasma in vitro, the scavenging ability of EGCG against alkoxy radicals generated by *t*-butyl hydroperoxide were stronger than that of EC, though the ability of EC against peroxy radicals generated by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride was similar to that of EGCG. Oral administration of EC and EGCG at a dose of 100 mg/kg body weight increased antioxidant activities based on the scavenging abilities against both kinds of radicals as well as the chelating ability against iron in the plasma of 5 week-old male ICR mice 1 hr after treatment. The antioxidant activities based on the scavenging ability against peroxy radicals in the plasma of mice administered EC tended to be higher than those administered EGCG, while the activities based on the chelating ability against iron in the plasma of mice administered with EGCG tended to be higher than those administered EC. The antioxidant activities based on the scavenging ability against alkoxy radicals in the plasma of mice administered EC and EGCG were almost the same. These results suggest that the antioxidant activities associated with the administration of catechins in mice do not necessarily accurately reflect the process in vitro and that activities may be influenced by the absorption, stability, and metabolism of catechin in mice.

Keywords: Tea, Catechin, Antioxidant, Mouse

1. 緒言

茶 (*Camellia sinensis* L.) は世界的に摂取されている飲料であり、その抗酸化成分であるカテキンは、抗癌作用や抗動脈硬化作用、抗炎症作用などの様々な保健作用を示すことが報告されている

[1]。緑茶に含まれるカテキンは、主に(-)-エピカテキン(EC)、(-)-エピカテキンガレート(ECG)、(-)-エピガロカテキン(EGC)及び(-)-エピガロカテキンガレート(EGCG)の4種であり、代表的な緑茶栽培品種であるヤブキタでの乾燥茶葉含量は、それ

ぞれ約 1, 4, 2 及び 8%と、その合計は約 15%に達する[2]。

茶カテキンはフェノール性水酸基を多く含んでおり、ラジカル分子に電子を供給することでフェノキシラジカルを生じ、共鳴構造による安定化または二量体への重合化を起こすことなどにより、ラジカルを消去するものと考えられている。また、フェノール性水酸基は、鉄をキレートすることでも抗酸化作用を示す[3, 4]。

ところで、4 種の茶カテキンの *in vitro* での抗酸化力は、同モル濃度で比較した場合、EC < ECG < EGC < EGCG の順であるとする報告が多い[5, 6]。これは、ガリル基やガロイル基のように隣り合う 3 つのフェノール性水酸基（トリオール構造）を持つものが、より強い抗酸化力を発揮することを示唆する。しかし、*in vitro* における実験の中にも、2,2'-アゾビス（2-アミジノプロパン）二塩酸塩（AAPH）から生成するペルオキシラジカルによる、ヒト低比重リポタンパク質の酸化反応の抑制作用については、EGC < ECG < EGCG < EC の順に活性が強いという報告をはじめ、EC の抗酸化力が EGCG よりも強い、あるいは両者に差がないとする報告がいくつか見られる[7-9]。このことは、捕捉するラジカルの種類や用いる評価系によっては、カテキンの抗酸化力が変化することを示唆しているものと考えられる。

本研究では、茶カテキンのうち EC と EGCG について、マウス血漿を AAPH または *t*-ブチルヒドロペルオキシド(BHP)で酸化する系における *in vitro* での抗酸化力を比較するとともに、これらのカテキンを経口投与したマウスの血漿の抗酸化力について種々の過酸化反応系を用いて比較し、若干の知見を得たので報告する。

2. 実験

2.1 試料及び実験動物

カテキンは、シグマ社製の EC 及び EGCG（純

度 95%以上）を使用した。これらの化合物の化学構造を Figure 1 に示す。マウスは、日本 SLC 社より購入した 5 週齢の雄性 ICR 系マウスを用いた。

2.2 マウス血漿の AAPH または BHP 誘発脂質過酸化反応に対する EC 及び EGCG の抗酸化力の測定

マウスより調製した血漿 50 μ L に、ペルオキシラジカル発生剤として 4 mM AAPH 溶液を 25 μ L 加え、水で全量 100 μ L とし、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートすることで過酸化反応を行った。このとき、4.0 ~ 250 μ M となるように EC または EGCG 溶液 25 μ L を加えた。対照には、水 25 μ L を加えた。空試験としては、AAPH 溶液を加えない反応系を用いた。反応後、各反応液中の過酸化脂質レベルを、チオバルビツール酸(TBA) 吸光分析法[10]を用いて測定した。EC と EGCG の過酸化反応抑制率を次式から算出し、作成した濃度-作用曲線からそれぞれの IC₅₀ 値を求めた。

$$\text{過酸化反応抑制率(\%)} = \frac{(A - B)_{\text{カテキン無}} - (A - B)_{\text{カテキン有}}}{(A - B)_{\text{カテキン無}}} \times 100$$

A : AAPH を添加しインキュベートしたものの過酸化脂質レベル

B : インキュベートのみの過酸化脂質レベル

また、AAPH 溶液の代わりにアルコキシラジカル発生剤として 1%BHP 溶液を用いて、同様の測定を行った。

2.3 TBA 吸光分析法による過酸化脂質レベルの測定

脂質過酸化反応液 100 μ L に、3%ドデシル硫酸ナトリウム溶液 0.5 mL を加えて 10 秒間攪拌した後、0.1 N 塩酸溶液 2.0 mL を加えて 5 秒間攪拌し、10%リンタングステン酸溶液 0.3 mL、0.7%TBA 溶液 1.0 mL を加え、100 $^{\circ}$ C で 45 分間加熱した。その後、氷中で 10 分間冷却し、生成した赤色色素を 1-ブタノール 5 mL で抽出した。4,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上層について波長 532 nm における吸光度を測定して、これを過酸化脂質レベルとした。

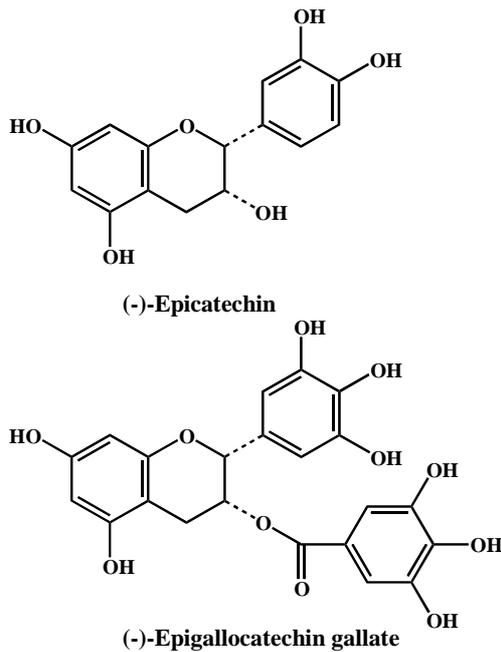


Figure 1 Chemical structures of green tea catechins.

2. 4 EC または EGCG のマウスへの経口投与

1 群 5 匹のマウスを 16 時間絶食させた後、EC または EGCG 溶液を 100 mg/kg 体重の投与量となるよう経口投与した。本投与量は、これまでのカテキン投与実験の報告を参考に設定した[11]。コントロール群には、溶媒のみを投与した。これまでに、カテキンを投与した動物の血中では、約 30 分～2 時間後にカテキン濃度が高まるという報告が多い[12]。そこで、カテキンを投与して 1 時間後、エーテル麻酔下にマウスの心臓から採血し、血漿を調製した。

2. 5 EC または EGCG を経口投与したマウスの血漿抗酸化力の測定

カテキン投与群及びコントロール群のマウスの血漿について、2. 2 と同様の方法で、AAPH 誘発脂質過酸化反応を行った。ただし、反応液へのカテキンの添加は行わなかった。反応液中の過酸化脂質レベルを TBA 吸光分析法で測定し、マロンジアルデヒド(MDA)による検量線を用いて MDA 相当量を算出した。また、同様の測定を、4

mM AAPH 溶液の代わりに 1% BHP 溶液を用いて行った。

これとは別に、マウス脳自動酸化反応による過酸化反応に対するマウス血漿の抑制力を、次の手順で測定した。マウス脳自動酸化反応は、健常マウスより摘出した脳の 10% ホモジネート上清 250 μ L に 0.04M リン酸緩衝液(pH7.4)を 250 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートすることで行った。この際、反応液にカテキン投与群及びコントロール群のマウスの血漿 3 μ L を加えた。対照には、同量の水を加えた。空試験としては、インキュベートをしない反応系を用いた。各反応液中の過酸化脂質レベルを、TBA 吸光分析法を用いて測定し、マウス血漿の過酸化反応抑制率を次式から算出した。

$$\text{過酸化反応抑制率(\%)} = \frac{(A - B)_{\text{コントロール群}} - (A - B)_{\text{カテキン群}}}{(A - B)_{\text{コントロール群}}} \times 100$$

A : インキュベートしたものの過酸化脂質レベル

B : インキュベートしないものの過酸化脂質レベル

2. 6 統計処理

データは、平均値 + 標準誤差で表した。2 群間の平均値の差の検定にはスチューデントの t 検定を用い、危険率 5% 未満 ($P < 0.05$) の場合を統計学的に有意であるとした。

3. 結果及び考察

3. 1 in vitro での脂質過酸化反応に対する EC 及び EGCG の抗酸化力

EC と EGCG の in vitro における抗酸化力を 2 種類の方法で測定し、作成した濃度-作用曲線の直線部分から求めた 50% 阻害濃度 (IC_{50} 値) を Table 1 に示す。AAPH から生じるペルオキシラジカルで誘発されるマウス血漿の過酸化反応では、EC の IC_{50} 値は EGCG の約 0.85 倍で、EC の抗酸化力は EGCG とほぼ同程度であった。これに対し、BHP から生じるアルコキシラジカルで誘発されるマウス血漿の過酸化反応では、EC の IC_{50} 値は EGCG

Table 1 Antioxidative activities of EC and EGCG in in vitro experiments.

Oxidation	Catechins	Concentration-response curves	Correlation coefficient	IC ₅₀ (μM)
Mouse plasma + AAPH	EC	$y = 55.1x - 12.8$	0.99	13.8
	EGCG	$y = 76.9x - 43.2$	0.99	16.3
Mouse plasma + BHP	EC	$y = 73.4x - 87.0$	1.00	73.4
	EGCG	$y = 149x - 134$	0.99	17.3

Concentration-response curves: x; logarithm of concentration (μM), y; inhibition rate on peroxidation (%).

の約 4.2 倍で、EC の抗酸化力は EGCG に比較して弱かった。

我々は、以前に、BHP で誘発されるマウス肝臓の過酸化反応では EC の IC₅₀ 値は EGCG の約 6.8 倍、また、マウス脳自動酸化反応では EC の IC₅₀ 値は EGCG の約 350 倍と、いずれの場合にも EC の抗酸化力が EGCG に比較して弱いことを報告している[5, 6]。このうち、脳自動酸化反応は、脳に内在する鉄イオンによって過酸化反応が起こり、鉄キレート力の強いものほど反応を強く抑制すると考えられている[13]。これらの結果から、マウスの血漿や肝臓、脳を過酸化する反応系では、アルコキシラジカルの捕捉力や鉄キレート力に基づく抗酸化力は EC より EGCG の方が強く、ペルオキシラジカルの捕捉力に基づく抗酸化力は EC と EGCG でほぼ差が無いことが示唆された。しかし、一方で我々は、マウス組織中の脂質ではなく、ヨウ素イオンを基質として AAPH による酸化を行った場合には、EGCG の抗酸化力の方が EC より約 2.8 倍強いことを見出している[14]。従って、ペルオキシラジカルの捕捉力に基づく抗酸化力については、EGCG の方が EC より強いもののその活性の差が小さいために、マウス血漿のような生体試料を含む反応条件下では、両者に差が見られない場合があるものと考えられる。

EGCG は、抗酸化力だけでなく他の多くの生物活性についても強い作用を示すことが知られているが、このことは、EGCG がそれだけ他の分子との相互作用が強い分子であることを示唆して

いる。血漿などの生体試料中には、一般に多量のタンパク質が存在する。カテキン類は、タンパク質と強い疎水結合をすることが知られており[15]、実際に、茶カテキンをヒトが摂取した場合、血中のカテキンの 60% はタンパク質の多い画分に存在するという報告がある [16]。in vitro の実験ではあるが、EC の牛血清アルブミンとの結合性は、EGCG に比較して低いこともわかっている[17]。従って、タンパク質等の生体分子との反応性がより低いと考えられる EC の方が、生体試料中では遊離の状態で残存し易く、ペルオキシラジカルの捕捉力については、EGCG と同程度の抗酸化作用を示した可能性がある。

3.2 EC または EGCG を経口投与したマウスの血漿抗酸化力

100 mg/kg 体重の EC または EGCG を経口投与して 1 時間後の、AAPH 及び BHP 誘発脂質過酸化反応に対するマウス血漿の抗酸化力を測定した結果を Figure 2 に示す。AAPH による脂質過酸化反応の場合、EC と EGCG を投与した群のマウスの血漿はいずれもコントロール群のマウスと比較して過酸化脂質レベルの上昇を抑制し、その抗酸化力が高まる傾向が見られ、特に EC 投与群のマウスでその差は有意であった。

BHP による脂質過酸化反応の場合にも、EC と EGCG を投与した群のマウスの血漿は、コントロール群のマウスと比較して過酸化脂質レベルの上昇を抑制し、その抗酸化力が高まる傾向が見られた。しかし、両者ともコントロール群との差は

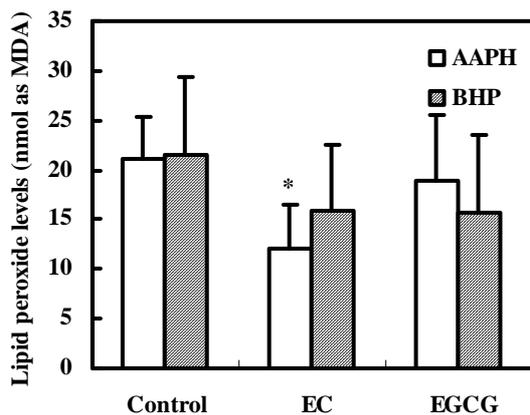


Figure 2 Antioxidant activities based on radical scavenging ability in the plasma of mice administered with catechins.

* P<0.01, Significantly different from control value.

有意ではなかった。Chen ら[18]は、EC と EGCG が 1:3 の量で含まれるカテキン混合物をマウスに経口投与すると、1 時間後の EC と EGCG の血中濃度は逆に 40:1 になることを報告している。そのため、in vivo の実験では、より吸収性と安定性のよい EC の抗酸化力が、in vitro の場合よりも強く現れたものと考えられる。

Figure 3 には、100 mg/kg 体重の EC または EGCG を経口投与して 1 時間後の、マウス脳自動酸化反応に対するマウス血漿の抗酸化力を測定した結果を示す。脳自動酸化反応の場合にも、EC と EGCG を投与した群のマウス血漿の抗酸化力はコントロール群のマウスに比較して高まる傾向が見られ、特に EGCG 投与群のマウスでその差は有意であった。マウス脳自動酸化反応に対する in vitro における EC の IC₅₀ 値は、EGCG の約 350 倍と極めて高く、その抗酸化力が弱かったために、in vivo においても EC は EGCG ほどの抗酸化力を発揮しなかったものと考えられる。

動物体内における茶や茶カテキンの抗酸化作用が、in vitro における抗酸化作用と必ずしも一致しないことは、これまでも報告されている例がある。Serafini ら[19]は、紅茶の抗酸化力は in vitro では緑茶の 1/6 と低いのに、in vivo では緑茶と同

程度の血漿抗酸化活性の上昇作用を示すとしている。また、Zhang ら[20]も、赤血球の酸化的溶血を抑制する効果は、in vitro では EGCG と ECG が強いのにに対し、in vivo では EC と EGCG が強いとしている。これらの結果は、茶カテキンの動物体内での抗酸化作用が、その吸収性や安定性などに影響されるために起こるものと考えられる。

4. まとめ

茶カテキンである EC 及び EGCG について、in vitro の実験でその抗酸化力を比較するとともに、これらを経口投与したマウスの血漿抗酸化力の変動について検討した。

その結果、マウス血漿や脳を用いた in vitro の過酸化反応系においては、アルコキシラジカルの捕捉力や活性酸素発生の引き金になる鉄のキレート力に基づく抗酸化力は、EC に比較して EGCG の方が強く、脂質過酸化反応の比較的初期に生成するペルオキシラジカルの捕捉力に基づく抗酸化力は、EC と EGCG でほぼ同程度であることがわかった。

これらのカテキンをマウスに経口投与して 1 時間後の、ラジカル捕捉作用に基づくマウス血漿の抗酸化力を高める効果は、EC と EGCG でほぼ同

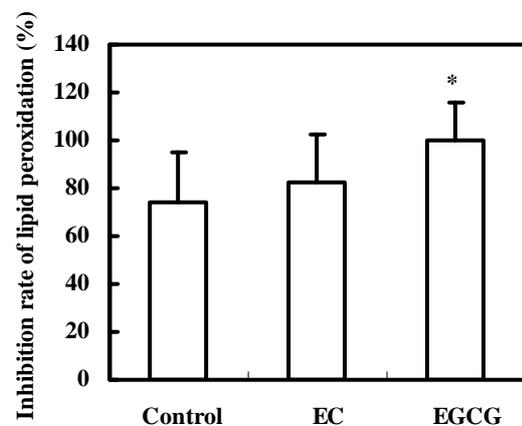


Figure 3 Antioxidant activities based on iron chelating ability in the plasma of mice administered with catechins.

* P<0.01, Significantly different from control value.

程度かまたは EGCG より EC の方が強く、逆に、鉄キレート作用に基づくマウス血漿の抗酸化力を高める効果は、EC より EGCG の方が強いことがわかった。ただし、これは両カテキンについて同重量を投与した場合の結果であり、茶葉中の EGCG 含量は EC の約 8 倍であるため、茶を飲む場合に期待される抗酸化作用に対する EGCG の寄与は大きいものと考えられる。

以上の結果から、カテキンが動物試料中あるいは動物体内で抗酸化作用を発揮する場合には、その吸収性や安定性などの影響を受けるものと考えられる。さらには、EC 経口投与ラットの血漿の抗酸化力に EC の代謝物が寄与しているという報告[21]や、カテキンの代謝物であるグルクロン酸抱合体やメチル化物に強い抗酸化作用が認められるという報告もあり[14, 22]、動物体内での茶カテキンの抗酸化作用の発現のメカニズムは複雑であるものと考えられる。

参考文献

- 1) 富田 勲, 茶機能の多面性とその応用開発, 化学と工業, vol.50, pp.834-835 (1997).
- 2) 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, 日本食品科学工学会誌, vol.48, pp.64-68 (2001).
- 3) M. J. Hynes, M. O. Coinceanainn, The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin, J. Inorg. Biochem., vol.85, pp.131-142 (2001).
- 4) Q. Guo, B. Zhao, M. Li, S. Shen, W. Xin, Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes, Biochim. Biophys. Acta, vol.1304, pp.210-222 (1996).
- 5) K. Yoshino, Y. Hara, M. Sano, I. Tomita, Antioxidative effects of black tea theaflavins and thearubigin on lipid peroxidation of rat liver homogenates induced by *t*-butyl hydroperoxide, Biol. Pharm. Bull., vol.17, pp.146-149 (1994).
- 6) 芳野恭士, 杉浦由佳, 篠原千恵, 廣田雅恵, フェノール化合物の抗酸化作用の測定と定量法に関する研究, 技術・教育研究論文誌, vol.11, pp.59-70 (2004).
- 7) Z.-Q. Liu, L.-P. Ma, B. Zhou, L. Yang, Z.-L. Liu, Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein, Chem. Phys. Lipids, vol.106, pp.53-63 (2000).
- 8) N. Salah, N. J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg, G. P. Bolwell, C. Rice-Evans, Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants, Arch. Biochem. Biophys., vol.322, pp.339-346 (1995).
- 9) Y. Matsuoka, H. Hasegawa, S. Okuda, T. Muraki, T. Uruno, K. Kubota, Ameliorative effects of tea catechins on active oxygen-related nerve cell injuries, J. Pharmacol. Exp. Therap., vol.274, pp.602-608 (1995).
- 10) 真杉文紀, 中村哲也, Sodium dodecyl sulfate 可溶性による肝チオバルビツール酸値とビタミン E, ビタミン, vol.51, pp.21-29 (1977).
- 11) I. Tomita, M. Sano, K. Sasaki, T. Miyase, Tea Catechin (EGCG) and its metabolites as bioantioxidants, ACS Sympo. Series, vol.701, pp.209-216 (1998).
- 12) C. S. Yang, L. Chen, M.-J. Lee, D. Balentine, M. C. Kuo, S. P. Schantz, Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers, Cancer Epidemiol. Biomark. Prev., vol.7, pp.351-354 (1998).

- 13) J. Stocks, J. M. C. Gutteridge, R. J. Sharp, T. L. Dormandy, Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids, *Clin. Sci. Mol. Med.*, vol.47, pp.215-222 (1974).
- 14) M. Sano, R. Yoshida, M. Degawa, T. Miyase, K. Yoshino, Determination of peroxy radical scavenging activity of flavonoids and plant extracts using an automatic potentiometric titrator, *J. Agric. Food Chem.*, vol.51, pp.2912-2916 (2003).
- 15) T. Hatano, R. W. Hemingway, Association of (+)-catechin and catechin-(4 α 8)-catechin with oligopeptides, *Chem. Commun.*, pp.2537-2538 (1996).
- 16) K. H. van het Hof, S. A. Wiseman, C. S. Yang, L. B. Tijburg, Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol.220, pp.203-209 (1999).
- 17) 芳野恭士, 茶ポリフェノールのタンパク質に対する影響, 沼津高専研究報告, vol.34, pp.141-146 (2000).
- 18) L. Chen, M.-J. Lee, H. Li, C. S. Yang, Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats, *Drug Metab. Dispos.*, vol.25, pp.1045-1050 (1997).
- 19) M. Serafini, A. Ghiselli, A. Ferro-Luzzi, In vivo antioxidant effect of green and black tea in man, *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol.50, pp.28-32 (1996).
- 20) A. Zhang, Q. Y. Zhu, Y. S. Luk, K. Y. Ho, K. P. Fung, Z.-Y. Chen, Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells, *Life Sci.*, vol.61, pp.383-394 (1997).
- 21) E. L. Da Silva, M. Piskula, J. Terao, Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin, *Free Radic. Biol. Med.*, vol.24, pp.1209-1216 (1998).
- 22) M. Harada, Y. Kan, H. Naoki, Y. Fukui, N. Kageyama, M. Nakai, W. Miki, Y. Kiso, Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin, *Biosci. Biotech. Biochem.*, vol.63, pp.973-977 (1999).