

# 茶ポリフェノールの多機能生理作用

岩井信市

昭和大学薬学部社会健康薬学講座医薬品評価薬学部門

## 要 旨

茶には、様々な生理活性物質が含まれている。その中で特に多機能生理活性物質とされるものは、ポリフェノールであるカテキン類である。緑茶に含まれるカテキンは、エピガロカテキンガレート (EGCG) が多く含まれており、作用も強いとされている。また、紅茶にはEGCGが重合したテアフラビンジガレート (TFDG) が含まれている。茶ポリフェノールには、がん抑制効果、アレルギー緩和効果、生活習慣病予防効果、抗菌・抗ウイルス効果等がよく知られている。我々は、EGCGおよびTFDGのマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) に関連する様々な作用について研究を行ってきた。MMPは、細胞外基質を分解する酵素であり、血管新生、細胞の遊走能、組織のリモデリング等に関わっている。EGCGやTFDGの茶ポリフェノールは、MMPの活性阻害および産生阻害効果を持っているので、血管新生、がん細胞の遊走能等の阻害によりがん抑制効果がある。EGCGは、骨髄細胞から破骨細胞への分化、成熟を低濃度で抑制することが解り、骨粗鬆症予防効果が期待できる。鼻炎アレルギーモデルラットにおいてもメチル化カテキン含有「べにふうき茶」により症状が緩和された。メチル化カテキンおよび「べにふうき茶」による新たな効果が、注目されている。我々が関わってきたことを中心に、茶ポリフェノールのがん抑制効果、アレルギー緩和効果、生活習慣病予防効果、骨粗鬆症予防効果について述べたい。

キーワード：エピガロカテキンガレート (EGCG)、テアフラビンジガレート (TFDG)、べにふうき茶、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、破骨細胞

## はじめに

現在、我々が常飲している日本茶・紅茶・ウーロン茶等のお茶は、ツバキ科に属する常緑の低木である茶樹(学名: *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze)の葉を加工したものである<sup>1)</sup>。

お茶の発見は、中国の「神農」の逸話の中で、野草とお茶の葉を食べていたと伝えられていることから紀元前2700年頃と考えられている。紀元前1世紀の漢の医学書『神農本草経』には、「茶味苦、飲之使人益思、少臥、輕身、明目」の記述があり、薬としての作用が認められる。

日本でのお茶は、奈良・平安時代に、最澄、空海、永忠などの留学僧が、唐よりお茶の種子を持

ち帰ったことにより始まったとされる。鎌倉時代に榮西により、お茶の飲用が広まった。榮西は、1214年にお茶の効用からお茶の製法などについて著した『喫茶養生記』を記している。その上巻には茶の作法・製法・身体を壮健にするなどの効用、下巻には飲水(糖尿病)・中風・不食・瘡(切傷やできもの)・脚気などの五病に対する茶の効用等を下記のように述べている。

- ・ 身体衰弱、意志消沈のときは、心臓が悪くなったと見て、頻繁に茶を喫すれば、氣力が強く盛んになる。
- ・ 茶を飲めば、人を愉快的な気持ちにさせ、酒の酔いを醒まし、睡気を起こしめない。
- ・ 茶を服用すれば、小便の通じが良く、喉の渇

きをとりさり，消化不良をなくす。

- ・ 茶を喫すると身を軽くし，脚気によい。
- ・ 茶は精神を整え，内臓を和らげ，身体の疲労をやすらかに除く。
- ・ 酒を飲んで喉が乾いたときは，ただ茶を喫すればよい。

茶における効能の主要な役割を担っているのは，ポリフェノールであり，中でもカテキンは生理作用が多く報告されている。緑茶に含まれるカテキンは，主にエピカテキン(EC)，エピガロカテキン(EGC)，エピカテキンガレート(ECG)，エピガロカテキンガレート(EGCG)の4種類が大半を占めている(図1 A, C)。緑茶には，乾燥重量で10～20%のカテキン類が含まれているが，その約半分をEGCGが占めている。生理作用が強いとされるEGCGは，茶以外の植物には，見い出されていない<sup>1, 2)</sup>。

茶には，製法的な違いによって，不発酵茶(緑茶)，半発酵茶(ウーロン茶)，発酵茶(紅茶)等がある。茶の加工工程においてカテキン類は，ポリフェノールオキシダーゼなどの酵素作用により酸化重合しテアフラビン類やテアルビジン類などへ変化する。テアフラビン類は，ガレート基の数と場所で主に4種類に分類される(図1 B, C)。ガレート基が2個ついているテアフラビン-3, 3'-ジ

ガレート(TFDG, TF3)は，生理作用が強いとされる<sup>1, 2)</sup>。茶ポリフェノールには，下記のような生理作用が知られている。

- ・ がん抑制効果<sup>3, 4)</sup>
- ・ アレルギー緩和効果<sup>5, 6)</sup>
- ・ 生活習慣病予防効果<sup>7, 8)</sup>
- ・ 骨粗鬆症予防効果<sup>2, 9)</sup>
- ・ 抗菌<sup>10)</sup>，抗ウイルス効果<sup>11)</sup>
- ・ 老化抑制効果<sup>12, 13)</sup>
- ・ 肝機能保護効果<sup>14, 15)</sup>
- ・ その他<sup>16)</sup>

以上のように，様々な生理作用が知られているが，今回は，我々が関わってきた，がん抑制効果，アレルギー緩和効果，生活習慣病予防効果，骨粗鬆症予防効果について述べたい。

## 1. がん抑制効果

### (1) 発がん抑制効果

古くから様々なお茶の効能が知られていたが，科学的検証が始まったのは，ここ30年のことである。1989年，小國らが，人口動態統計をもとに静岡県内の行政区毎のがん死亡率を比較検討し，茶産地では死亡率が低いことを初めて報告した<sup>17)</sup>。このころより，茶の研究が活発化し，最近の10年間では，毎年200件以上の研究成果が公表され<sup>18)</sup>，

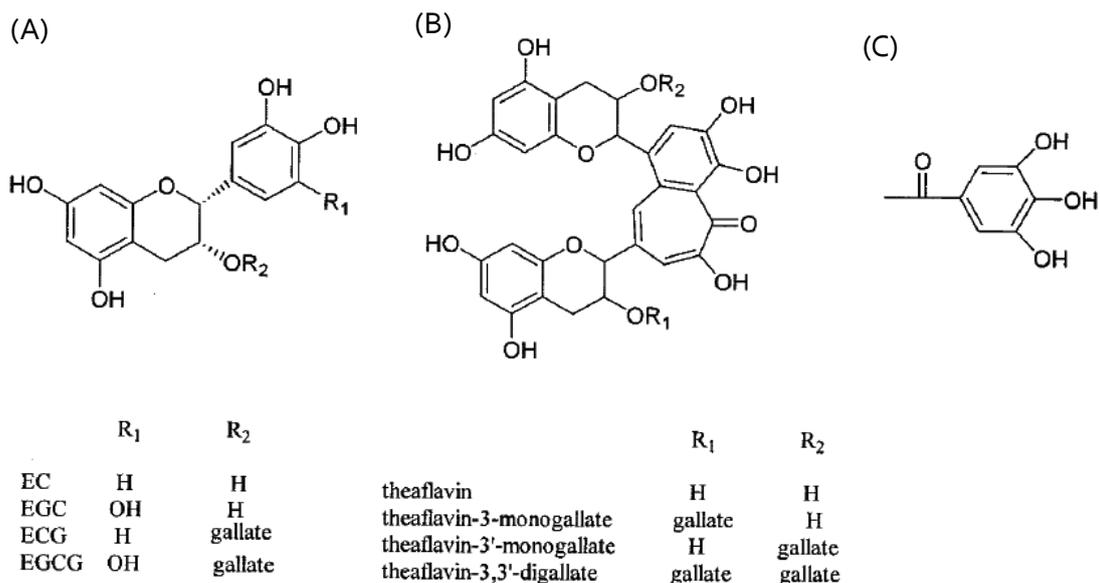


図1 茶ポリフェノールの構造 (文献2)より引用

A)カテキン類, B)テアフラビン類, C)ガレート基. EC: エピカテキン, EGC: エピガロカテキン, ECG: エピカテキンガレート, EGCG: エピガロカテキンガレート

日本カテキン学会, 日本フードファクター学会, 日本ポリフェノール学会の活動も盛んである。大腸がんに対する前向きコホート研究では, 40-74歳の中国人男性60,567人を対象とした5年間で243人の大腸がんの発症が見られたが, このうち, 非喫煙者で6ヶ月以上の間, 週3回以上緑茶を飲用した場合は, 全然飲まない場合に比べて約半分であり, 2gの緑茶を飲む毎に, 12%のリスク軽減があった。しかしながら, 喫煙者にはこうした効果は認められなかった<sup>19)</sup>。胃がんに対する緑茶の予防効果も同様の報告がなされている<sup>20)</sup>。さらに, 臨床介入試験に関して, 前立腺がんの前がん病変を持つ患者60人を2群に分け, 一方に1日600mgの緑茶カテキンを経口投与した結果, 1年後の前立腺がん発症率は3.3%で, プラセボ群の30%に対して約90%の抑制率であり, この傾向は2年後も維持されていた<sup>21)</sup>。これらのお茶の発がん抑制効果は, 主にカテキン類の研究から, 発がん開始段階(突然変異)の抑制, 発がん促進・進展段階の抑制, がん細胞のアポトーシス(自己死滅)促進, がん組織での血管新生抑制, がん細胞の転移抑制など多岐に渡ることが明らかにされてきた<sup>18, 22)</sup>。

## (2) 血管新生抑制効果

がん細胞が増殖するためには, 栄養血管の存在が不可欠である。従って, がんの発生に伴って生じる血管新生を抑制することにより, がん細胞を死滅させたり, 増殖を抑制できると考えられている。小林らは, 正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)と皮膚線維芽細胞の共培養系モデルを用いて, TFDGとEGCGの管腔形成抑制効果を明らかにした(図2, 3)<sup>3)</sup>。TFDG 10  $\mu$ M およびEGCG 10  $\mu$ Mでも管腔面積および管腔長の抑制を認めた。これらは, 濃度依存的に抑制効果が増強した。さらに, TFDGは, EGCGと比べ同等以上の抑制効果を示した。マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)は, 活性中心に亜鉛を持ち細胞外基質を分解する酵素である<sup>23)</sup>。MMPのなかでも, 血管新生には, MMP-2, 9が重要とされている<sup>24, 25)</sup>。MMP活性を測定する方法にザイモグラフィ法がある。特にMMP-2, 9活性を測定す

るためには, ゼラチンザイモグラフィ法が有用である<sup>26)</sup>。この管腔形成共培養系モデルの培地を用いて, ゼラチンザイモグラフィを行ったものが, 図3Aである。画像を数値化しコントロールを1とし比で示したものが図3Bである。これらによりTFDGとEGCGによりMMP-9活性が阻害されたことが示された。培地中のMMP-2蛋白をone-step sandwich enzyme immunoassay (EIA) kitにて測定するとTFDGとEGCGは, 培地中のMMP-2蛋白を減少させた。従って, TFDGとEGCGは, MMP-2, 9の抑制を介して血管新生を抑制することが示唆された<sup>3)</sup>。

アミノ酸の1種であるテアニンは, 茶の根で合成されて葉に移動し, 日光により分解してエチルアミンをつくり, エチルアミンがカテキンに変化する<sup>27)</sup>。山田らは, 小林らと同様の共培養系モデルを用いて, EGCGとテアニンの相乗効果を明らかにした<sup>4)</sup>。テアニン単独では, 管腔形成抑制効果がないが, EGCGにテアニンを加えると管腔形成抑制効果が増強した。テアニンによりMMP内因性阻害物質である組織性メタロプロテアーゼ阻害因子(TIMP)が増加したことから, EGCGとテアニンの相乗効果は, テアニンによるTIMP-1の増加が1因であることが示唆された。

## (3) がん転移抑制効果

がん転移の有無は, 患者の予後を左右する重要な因子である<sup>28)</sup>。xCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA; ロッシュ)は, 細胞接着面におけるインピーダンスを即時的に測定し細胞の遊走能および浸潤能を定量的に可視化する<sup>28, 29)</sup>。未分化ヒト舌扁平上皮癌細胞由来SCC-4 (JCRB9118; JCRB細胞バンク)を用いて, EGCGの細胞遊走および浸潤能に対する効果を検討した。遊走能は, SCC-4を播種しフィブロネクチンでコートしたCIM-plate 16<sup>®</sup>で定量を行うと, EGCGの添加により濃度依存的に遊走能の抑制が認められた<sup>30)</sup>。また, 浸潤能は, マトリジェルとフィブロネクチンでコートしたCIM-plate 16<sup>®</sup>で定量を行った。EGCGの添加により浸潤能は, 濃度依存的に遊走能より強い抑制が認められた<sup>30)</sup>。

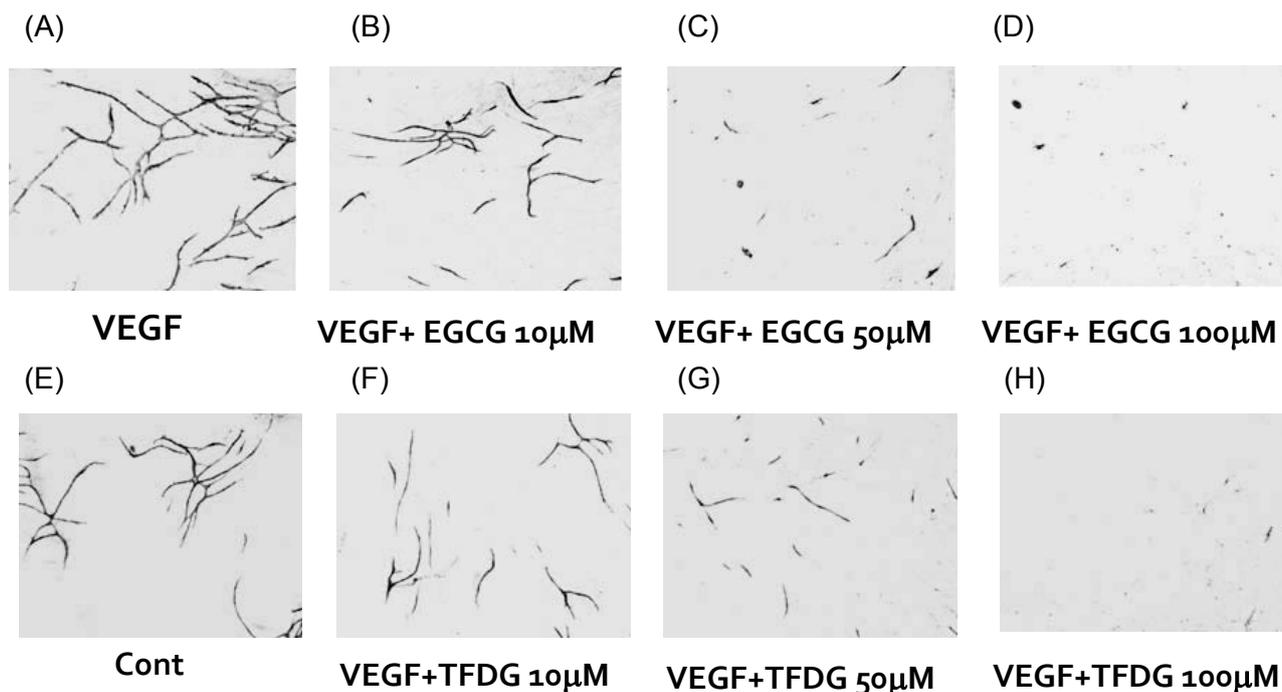


図2 HUVECによる管腔形成 (文献3)より引用

HUVECと皮膚繊維芽細胞にVEGFを添加し共培養を行った。11日間の共培養後に抗CD31抗体にて染色を行った。A: 陽性対照群(VEGF添加)。B～D: 10, 50, 100 μMのEGCGおよびVEGF添加。E: VEGF無添加。F～H: 10, 50, 100 μMのTFDGおよびVEGF添加。

さらに、SCC-4にEGCGを添加しmRNA発現をみると、MMP-2, 9発現が抑制された(結果略)。これらのことから、EGCGがMMPの抑制を介してがん細胞の遊走能および浸潤能を抑制することが示唆された。

生体内での研究でも、マウスにメラノーマ細胞を移植したモデルにおいて茶カテキンによる転移の抑制が確認されている<sup>31, 32)</sup>。

## 2. アレルギー緩和効果

茶カテキンのうちアレルギー緩和作用を持つとして近年注目されているものに、メチル化カテキンがある。メチル化カテキンは、EGCGやECG等のガレート基の一部がメチルエーテル化されたカテキン(エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート; EGCG<sup>3</sup> Me, エピカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート; ECG<sup>3</sup> Me)で、「べにふうき」, 「べにほまれ」などの紅茶系の品種の茶葉に多く含まれているが、一般的に広く飲用されている「やぶきた」には含まれていない<sup>33)</sup>。メチル化カテキンは、肥満細胞や好塩基球でのヒスタミン放出を阻害することで、アレルギー緩和効果を発

揮する<sup>34, 35)</sup>。勝野らは、toluene 2, 4-diisocyanate (TDI) 誘発鼻炎アレルギーモデルラットを用いて「べにふうき茶」の効果と作用機序の解明を行った<sup>5)</sup>。1%および2%粉末べにふうき茶(BGT)含有食を摂取したTDI誘発鼻炎アレルギーモデルラットは、鼻汁、流涙、浮腫等において改善が認められた(図4)。また、くしゃみの回数はBGT群において明らかな改善効果が認められた(図5A)。さらに鼻中隔粘膜のmRNA発現より、BGT群ではhistidine decarboxylase (HDC; 図5B))およびMMP-9発現が、抑制された(結果略)。べにふうき茶によるアレルギー緩和作用は、ヒスタミンシグナル伝達およびMMPを介していることが示唆された。

べにふうき茶の臨床試験では、メチル化カテキンを乾燥重量で1.5～2.5%含んでいる「べにふうき」緑茶を、1日あたりメチル化カテキン量が34 mg以上になるように飲用したスギ花粉症の症状を持つ被験者は、メチル化カテキンを含んでいない「やぶきた」緑茶を飲んだ人と比べると、花粉飛散後の鼻かみ回数や目のかゆみの項目において、症状の軽減が認められた<sup>36)</sup>。さらに、花粉飛散

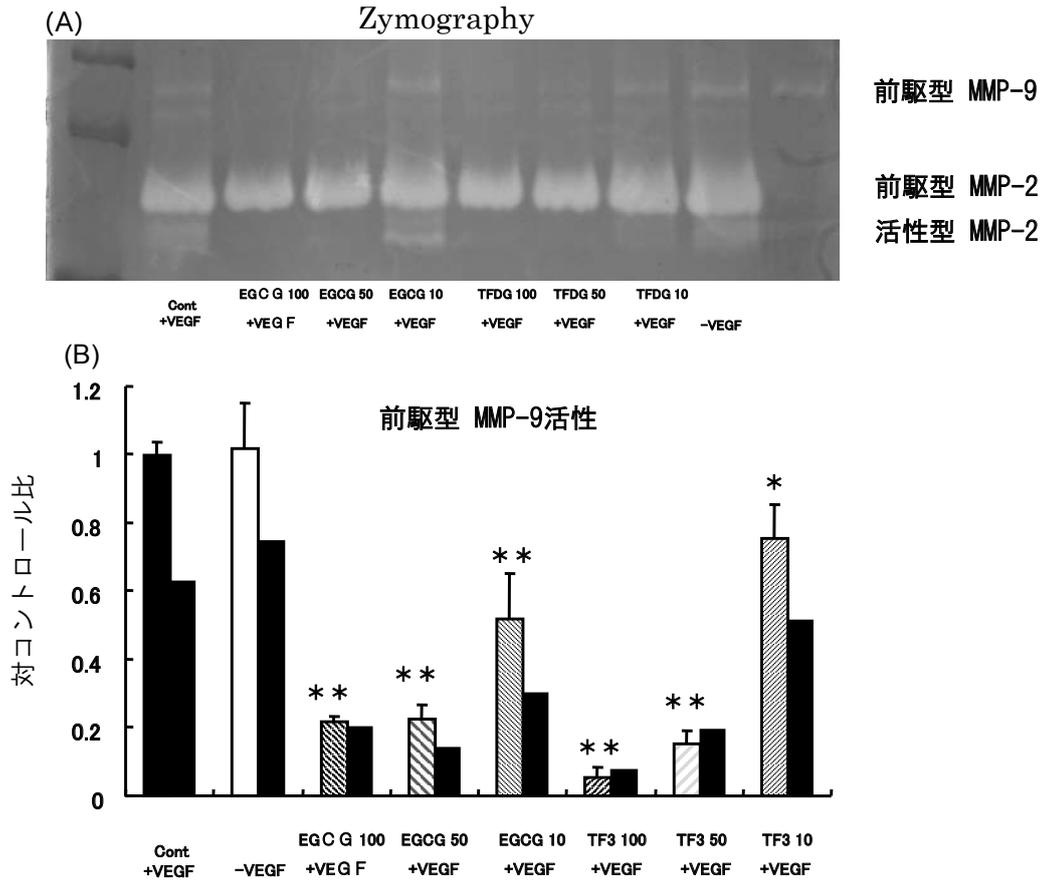


図3 MMP活性(文献3)より引用

- A) 11日間の共培養後の培地を試料としてgelatin zymogramを行った。ゼラチン分解活性は、暗色の背景に対して明色帯として示される。右端のレーンは、前駆型MMP-2と前駆型MMP-9基準酵素を示す。活性型MMP-2, 前駆型MMP-2, 前駆型MMP-9は、62, 72, 92 kDaの位置で認識される。活性型MMP-9 (83 kDa)は、ほとんど認識されなかった。
- B) グラフは、陽性対照群(VEGF添加)の前駆型MMP-9活性を100%として%表示をした。それぞれの棒の右側は、培養前の培地の前駆型MMP-9活性値を示し、左側は、共培養後の培地の前駆型MMP-9活性値を示す。縦軸の値は、平均値+標準誤差で示した。Cont: n=8 EGCG 10, 100およびTF3 10, 100および +VEGF: n=6 EGCG 50, TF3 50: n=4. vs control; \*: P<0.05, \*\*: P<0.01

1.5ヶ月前から「べにふうき」緑茶を飲んでいた人は、花粉飛散後から飲み始めた人と比べると、鼻かみ回数、涙量、鼻、咽頭痛などの項目で症状の軽減が見られた<sup>37)</sup>。べにふうき茶は、すでに健康食品として市場に数多く出回っている。抗アレルギー対策物質として非常に有望な可能性を秘めている。

### 3. 生活習慣病予防効果

#### (1) 動脈硬化予防効果

低比重リポタンパク質(LDL)は、コレステロールを肝臓から血管を通り末梢組織へ運ぶ重要な役割をしている。末梢組織における必要以上のコレステロールの存在が血液中のLDL濃度を上昇さ

せる。LDLが酸化された酸化LDLが、血管の一番内側にある内皮細胞を傷害し、血小板の凝集を促進し、血栓ができやすい状態にする。単球が酸化LDLを見つけるとそこへ集まり、マクロファージに分化し酸化LDLを貪食する。マクロファージは酸化LDLがなくなるまで貪食し泡沫化細胞となる。また、中膜平滑筋細胞も内膜に遊走してきて酸化LDLを貪食し、これらも泡沫化細胞となる。泡沫化細胞が血管内皮下に浸潤し動脈硬化巣を形成する。動脈硬化巣が大きくなり破裂すると内皮細胞が傷害され、そこに血小板が凝集し血栓ができる。これらにより、狭心症や心筋梗塞、脳梗塞等が発症する<sup>38, 39)</sup>。

健康成人男女集団検診受検者を対象とし、血漿

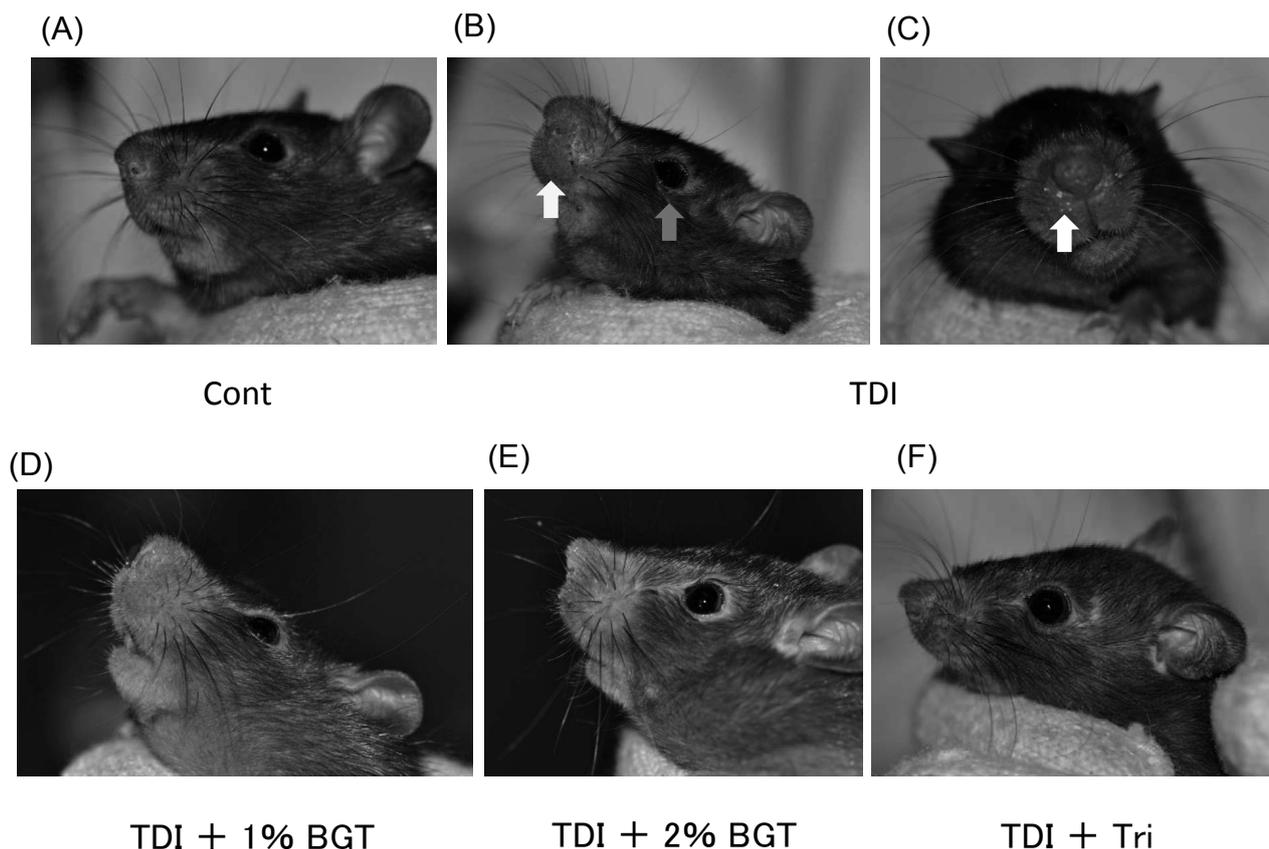


図4 TDI誘発鼻炎アレルギーモデルラット発作誘発後 (文献5)より引用

発作誘発15分後のTDI誘発鼻炎アレルギーモデルラットの写真を示す。A: Control, B および C: TDI, D: TDI + 1% BGT, E: TDI + 2% BGT, F: TDI + Tri. 黄矢印は、鼻浮腫、青矢印は、流涙、白矢印は、鼻汁を示す。

中の活性酸素・フリーラジカルによるダメージの副産物(ヒドロペルオキシド)を間接的に分析測定し、数値化したもの(Diacron-Reactive Oxygen Metabolites (d-ROMs)テスト(ウイスマー)を酸化ストレス度として用いた。また、酸化LDLの指標として、脂質過酸化反応のよい指標と考えられている4-Hydroxy-2-nonenal修飾(4HNE)-LDLを、ELISA法にて測定を行った。血漿酸化ストレス度と血漿酸化LDLの間には、有意な相関関係が認められた<sup>40)</sup>。生活習慣病モデルとして高血圧高脂血症自然発症ラット(SHHR)に高脂肪およびシヨ糖負荷(-HFDS)したものをを用いて血漿d-ROMs値の測定を行った。その結果、SHHR, SDラット血漿の酸化ストレス度と大動脈における脂質沈着の程度が相関した<sup>41)</sup>。このSHHR-HFDSに低カフェインのべにふうき茶(BeG: 赤堀商店)を自由摂取させると血漿酸化ストレス度の低下を認めた(図6)。ブタの血液より分離したLDLを酸化する実験を行った結果、EGCGやECG

がLDLの酸化を強く抑制した<sup>42, 43)</sup>。また、アポリポrotein E欠損マウスにカテキン類水溶液を14週間飲ませると、大動脈の動脈硬化巣の面積が小さくなり、動脈硬化の進展が抑制された。この時、動脈硬化に関連する大動脈中のコレステロール含量や脂肪含量も低下することが認められ、緑茶カテキン摂取が動脈硬化進展予防に有効であることが示された<sup>44)</sup>。

## (2) 糖尿病予防効果

お茶は、榮西による『喫茶養生記』にも飲水にも効果あると記されているとおり、古くから糖尿病に対する薬物としても用いられていたと考えられる。実際に茶が $\alpha$ -アミラーゼや $\alpha$ -グルコシダーゼなどの酵素活性を抑制することが示されている<sup>45, 46)</sup>。さらにECGは、小腸においてグルコースの吸収阻害を行い血糖の上昇を抑制する<sup>47)</sup>。福原らは、カテキンを平面化すると更に強い $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を持つことを明らかにした<sup>48, 49)</sup>。

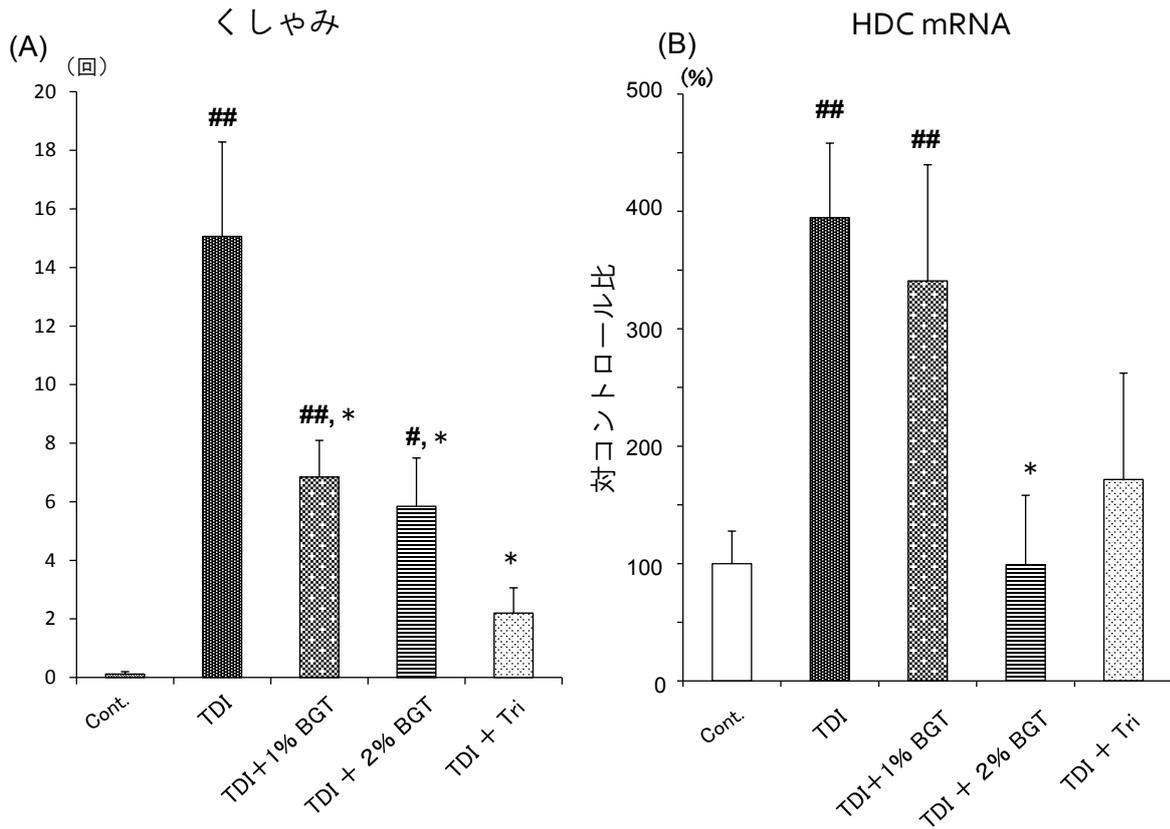


図5 TDI誘発鼻炎アレルギーモデルラット発作誘発後(文献5)より引用

- A) グラフは、TDI誘発鼻炎アレルギーモデルラット発作誘発後3分から10分間のくしゃみの回数変化を示す。縦軸の値は、平均値+標準誤差で示した。Control (n = 16) ; TDI (n = 16) ; TDI + 1% BGT (n = 13) ; TDI + 2% BGT (n = 14) ; TDI + Tri (n = 5) . #:  $P < 0.05$  vs. Cont, ##:  $P < 0.01$  vs. Cont, \*:  $P < 0.05$  vs. TDI
- B) TDI誘発鼻炎アレルギーモデルラット発作誘発3時間後の鼻粘膜を採取し試料とした。グラフは、リアルタイムPCRによるHDC mRNA 発現を示した。対照群のmRNA発現を100%として%表示をした。縦軸の値は、平均値+標準誤差で示した。Control (n = 12) ; TDI (n = 11) ; TDI + 1% BGT (n = 7) ; TDI + 2% BGT (n = 7) ; TDI + Tri (n = 3) . ##:  $P < 0.01$  vs. Control, \*:  $P < 0.05$  vs. TDI

### 酸化ストレス度

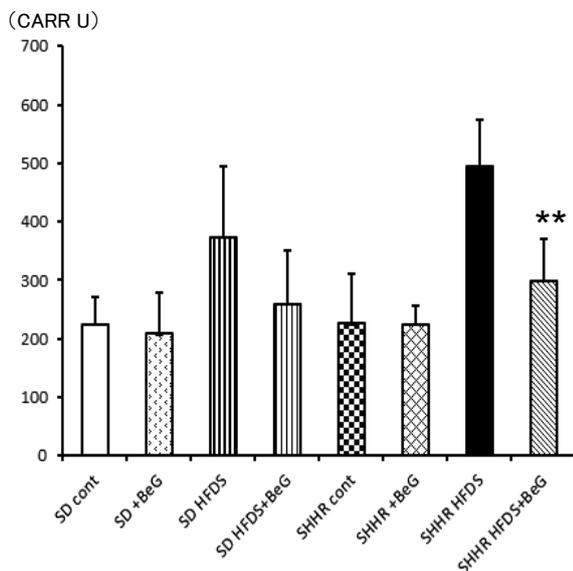


図6 生活習慣病モデルラットの酸化ストレス度  
 グラフは、生活習慣病モデルラットに低カフェインのべにふうき茶を4ヶ月間、自由摂取させた酸化ストレス度(d-ROMs値)を示す。縦軸の値は、平均値+標準誤差で示した。SD cont (n=6) ; SD+BeG (n=2) ; SD HFDS (n=5) ; SD HFDS+BeG (n=3) ; SHHR cont (n=5) ; SHHR+BeG (n=3) ; SHHR HFDS (n=5) ; SHHR HFDS+BeG (n=5) . \*\*:  $P < 0.01$  vs SHHR HFDS.

神谷らは、ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病モデルラットを用いて緑茶5%含有食を与えるとHbA1cおよび飲水量の低下を認めた<sup>50)</sup>。

ヒトを対象とした日本での疫学研究において、緑茶を1日6杯以上飲むヒトは、1杯以下のヒトに比べて5年間の2型糖尿病の発症数が抑制された<sup>51)</sup>。また、緑茶抽出粉末(カテキン456 mg含有)を2ヶ月服用するとHbA1cの低下を認めた<sup>52)</sup>。黄色人種は、インスリンの分泌量が他人種と比べ少ない。特に日本人は、糖分が多い食生活を送っていると耐糖能異常から糖尿病になりやすく、食後の高血糖を防ぐことが重要である<sup>53, 54)</sup>。従って、食後に緑茶を愛飲する日本人の食習慣は、食後の急激な高血糖を防ぐためにも理にかなっていると考えられる。

#### 4. 骨粗鬆症予防効果

破骨細胞は、骨髄細胞から破骨前駆細胞となり、この破骨前駆細胞が融合することにより巨大な多核の破骨細胞となる(図7A)。巨大になった破骨細胞は、MMPを発現し、活性化されると骨吸収が起こる<sup>2, 55)</sup>。破骨細胞が骨を溶かす骨吸収と骨芽細胞が新しい骨をつくる骨形成のバランスが崩れると、骨吸収が多くなり骨密度が低下し骨粗鬆症となる。従って、破骨細胞による骨吸収を抑制することが、骨粗鬆症の予防につながると考えられ、骨粗鬆症の治療薬には、破骨細胞をアポトーシスさせるビスフォスフォネートなどの薬が使用される<sup>56)</sup>。お茶の摂取と骨密度の関係について閉経後の高齢の女性を対象として調べた症例対照研究では、お茶が骨密度を上昇させる報告が散見される<sup>57, 58)</sup>。日本人女性を対象とした症例対照研究でも、緑茶飲用が骨密度を高めるという報告がある<sup>59)</sup>。

マウスの骨髄細胞を用いた破骨細胞への分化誘導に対して、EGCGの阻害効果の検討を行った。1  $\mu$ MのEGCGをマウス骨髄細胞の培地に添加し培養すると、Tartrate-resisted acid phosphatase (TRAP) 染色陽性にて核が3個以上の多核破骨細胞への分化誘導が阻害された(図7A～C)<sup>60)</sup>。さらに、EGCGによる破骨細胞活性をpit forma-

tion assayにて検討すると抑制効果が認められた(図7D, E)。ラットの破骨前駆細胞を用いて、EGCGとTFDGによる破骨細胞への融合阻害効果を検討した(図8A～D)<sup>2)</sup>。破骨前駆細胞から破骨細胞への融合では、EGCGよりややTFDGのほうが強く抑制した(図8E)。MMP-9 mRNA発現は、EGCGとTFDGにより強く抑制された(図8F)。ザイモグラフィーで調べた培地中のMMP-9活性は、EGCGとTFDGにより抑制された(図8D)。従って、破骨細胞の融合には、MMPが強く関わっていることが示唆されるが、MMP阻害剤を投与しても融合の抑制がほとんど認められなかった(結果略)、破骨細胞に分化することにより、MMP発現に関与していることが示唆された。新生児ラットの頸骨および大腿骨から破骨細胞を分離し、成熟化に対するEGCGとTFDGによる効果を検討した<sup>2)</sup>。Rhodamine phalloidin染色とTRAP染色を比較して比べるとEGCGとTFDGは、対照群と比べ破骨細胞成熟化に伴い出現するアクチンリングの形成を抑制した(図9)。

インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )で刺激したマウス軟骨細胞を用いて、EGCGとTFDGによる抗炎症の効果を検討した<sup>9)</sup>。IL-1 $\beta$ 刺激によるMMP-3, 9 mRNA発現亢進をEGCGとTFDGは抑制した(図10)。このことから、EGCGとTFDGは、骨関節等の炎症も抑える可能性が示唆された。実際に動物モデルを使用した報告でも関節炎等に対する有効な効果も報告されている<sup>61)</sup>。

EGCGは、骨髄細胞～破骨前駆細胞～破骨細胞～破骨細胞成熟化・活性化に至る過程のすべてにおいて抑制することが示された。EGCGの濃度が1 $\mu$ Mでも破骨細胞に対する効果が認められたため、緑茶1杯(カテキン含有400 mg)の飲用により、血漿中の最高濃度が2 $\mu$ M程度になるという報告<sup>62)</sup>も考えると、骨粗鬆症予防効果が有ることが強く示唆される。

#### まとめ

茶は、多機能生理作用を持っているにもかかわらず、薬としての効能は忘れられていた感がある。これは、茶があまりにも身近な存在である証拠か

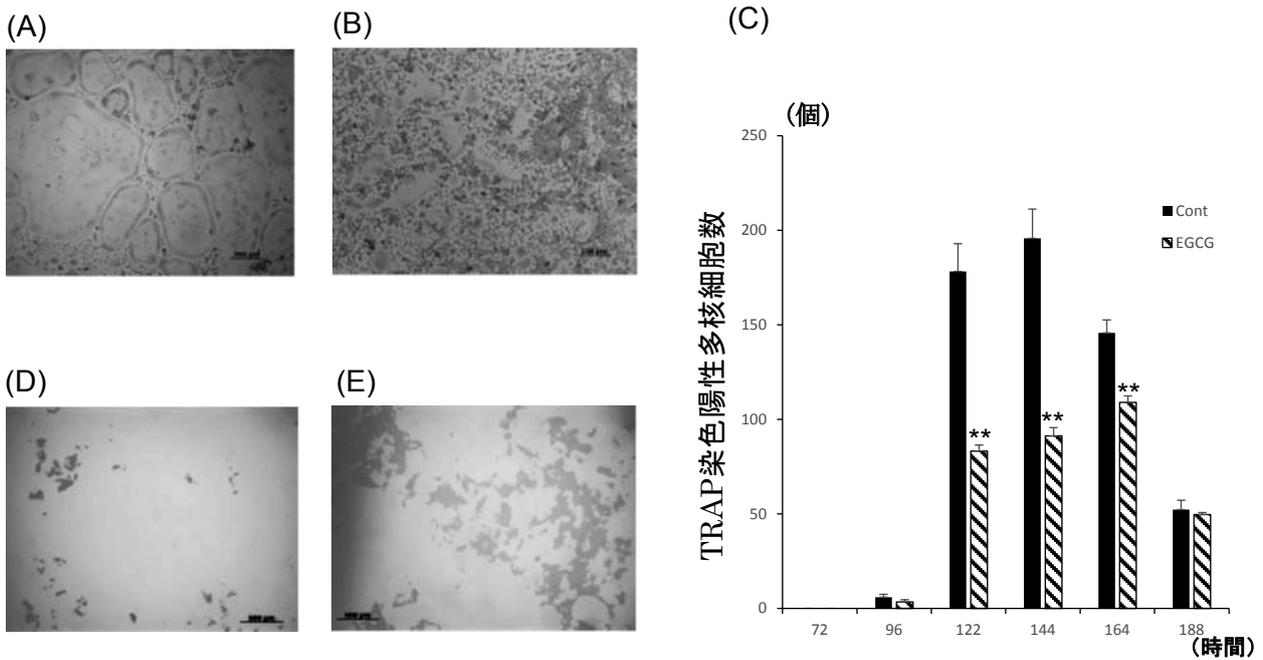


図7 マウス破骨細胞(文献60)より引用

(A)マウス骨髄細胞を6日間培養し、破骨細胞への分化誘導。(B)マウス骨髄細胞のEGCG 1 μM添加による6日間培養し、破骨細胞への分化誘導抑制効果。(C)グラフは、TRAP染色陽性にて核が3個以上の多核破骨細胞数のEGCG 1 μM添加による変化を示す。縦軸の値は、平均値±標準誤差で示した。n=4。\*\*: P < 0.01 vs Cont.

マウス破骨細胞のpit formation assayを示す。(D)マウス骨髄細胞を8日間培養し、破骨細胞活性を示す。(E)マウス骨髄細胞のEGCG 1 μM添加による8日間培養し、破骨細胞活性の抑制効果を示す

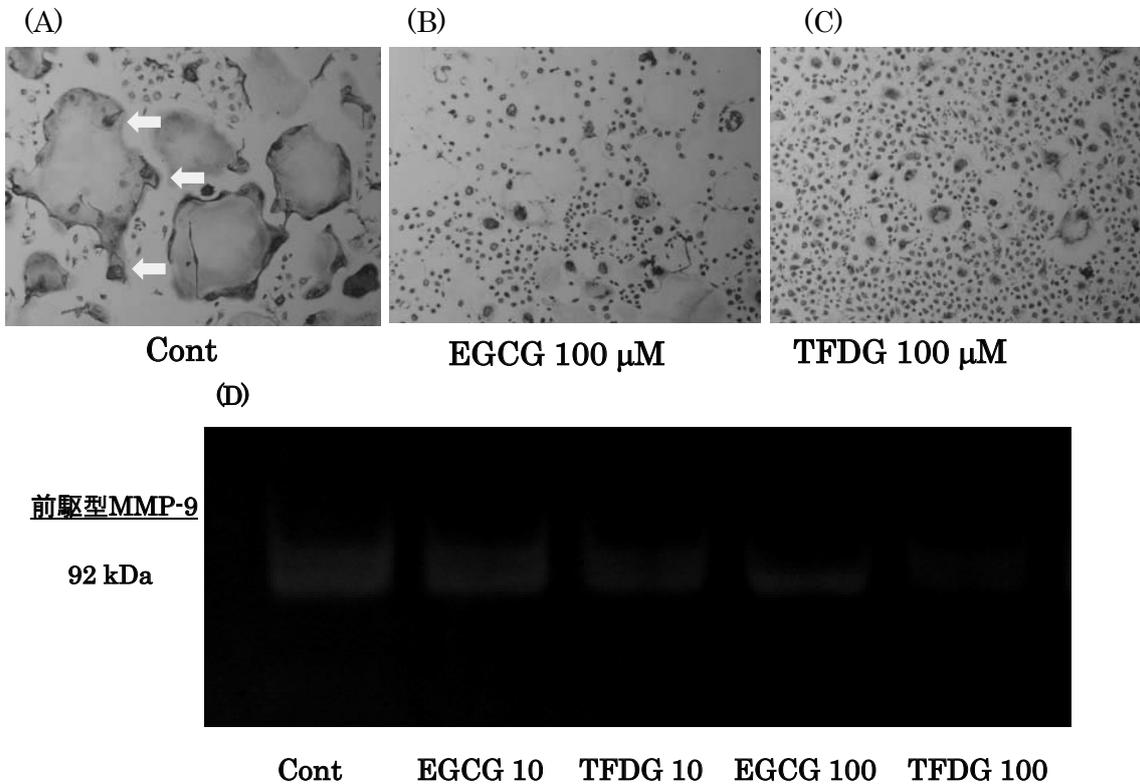


図8 ラット破骨細胞 (文献2)より引用

7日間培養したラットの破骨前駆細胞を用いて、EGCGとTFDGによる、破骨細胞への融合阻害効果への効果を示す。矢印は、核を示す。A: Cont, B: EGCG 100 μM, C: TFDG 100 μM.

D) 7日間破骨細胞培養後の培地を試料としてgelatin zymogramを行った。ゼラチン分解活性は、暗色の背景に対して明色帯として示される。EGCGおよびTFDGによる前駆型MMP-9活性の抑制が示された。

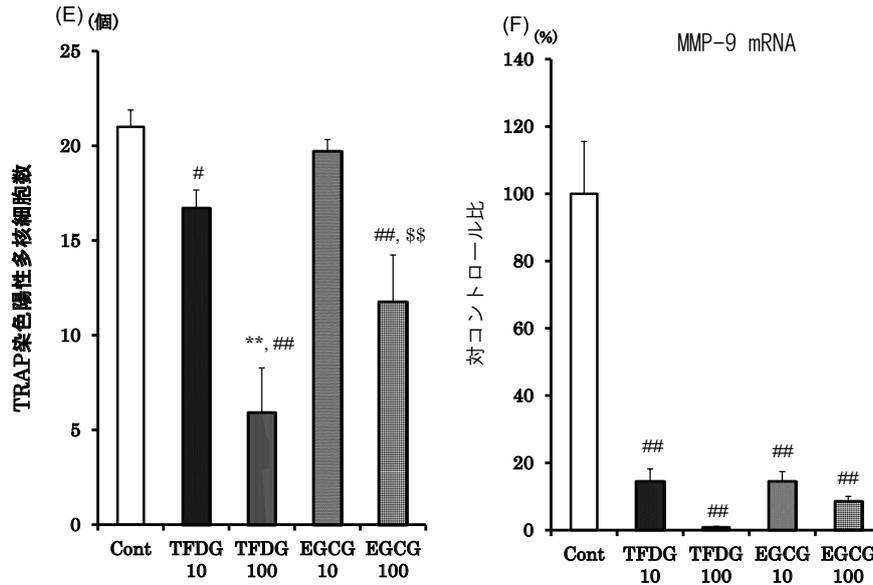


図8 ラット破骨細胞 (文献2)より引用

- E) グラフは、TRAP染色陽性にて多核破骨細胞数のEGCGおよびTFDG添加による変化を示す。縦軸の値は、平均値+標準誤差で示した。n=5。\*:  $P < 0.01$  vs TFDG 10  $\mu\text{M}$ , #:  $P < 0.05$ , ##:  $P < 0.01$  vs Cont, \$\$:  $P < 0.01$  vs EGCG 10  $\mu\text{M}$ 。
- F) グラフは、リアルタイムPCRによるMMP-9 mRNA 発現を示した。対照群のmRNA発現を100%として%表示をした。縦軸の値は、平均値+標準誤差で示した。Control (n = 13) ; TFDG 10 (n = 5) ; TFDG 100 (n = 11) ; EGCG 10 (n = 9) ; EGCG 100 (n = 3) . ##:  $P < 0.01$  vs. Control.

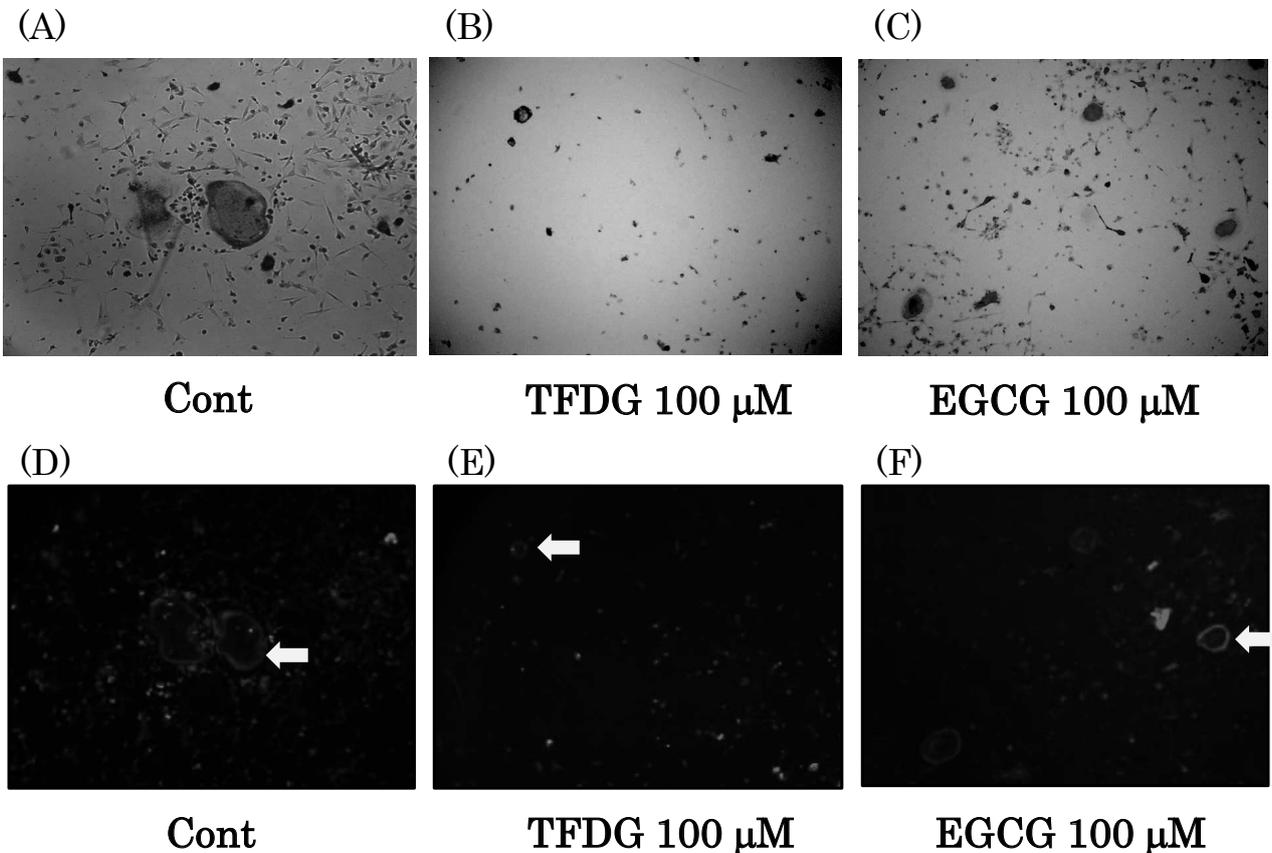


図9 破骨細胞成熟化 (文献2)より引用

新生児ラットの頸骨および大腿骨から破骨細胞を分離し48時間後に成熟化に対する、EGCGとTFDGによる効果をTRAP (A~C)染色とRhodamine phalloidin染色(D~F)にて検討した。矢印は、破骨細胞成熟化の指標であるアクチンリングを示す。A, D: Cont, B, E: TFDG 100  $\mu\text{M}$ , C, F: EGCG 100  $\mu\text{M}$ 。

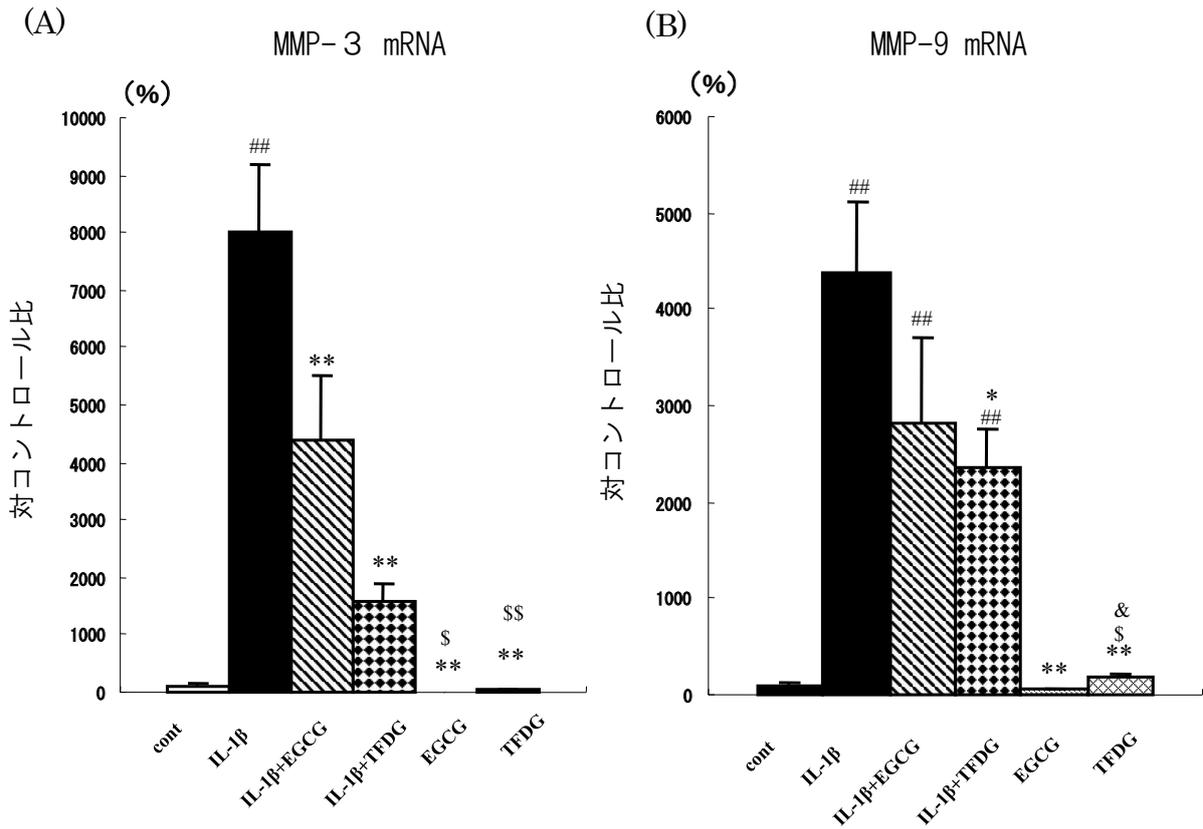


図10 マウス軟骨細胞のmRNA発現 (文献9)より引用

インターロイキン1β (IL-1β)で刺激したマウス軟骨細胞を用いた, EGCGとTFDGによるmRNA発現抑制効果を示す. グラフは, リアルタイムPCRによるMMP-3 (A)およびMMP-9 (B) mRNA 発現を示した. 対照群のmRNA発現を100%として%表示をした. 縦軸の値は平均値+標準誤差で示した. Control (n = 19); 10 μg/L IL-1β (n = 18); 10 μg/L IL-1β + 100 μM EGCG (n = 9); 10 μg/L IL-1β + 100 μM TFDG (n = 18); 100 μM EGCG (n = 5); 100 μM TFDG (n = 13). #: P < 0.05, ##: P < 0.01 vs Control, \*: P < 0.05, \*\*: P < 0.01 vs IL-1β, \$: P < 0.05, \$\$: P < 0.01 vs IL-1β + EGCG, &: P < 0.05 vs IL-1β + TFDG.

もしれない. また, カテキンは, これだけ様々な生理作用を持っている一方で有害作用の報告もされている. 疫学研究において, がんの発症率を下げる報告も数多くあるが, 逆に男性, 喫煙者, 閉経前といった条件によって上昇する場合もある<sup>63-66</sup>. また, 欧米での緑茶サプリメントの服用による肝障害も報告されている<sup>67-69</sup>. 緑茶(EGCG)は, 抗アレルギー効果を持つにもかかわらず, 喘息を発症する例も報告されている<sup>70,71</sup>.

カテキンは, 様々な生理作用を持っていることが明らかになりつつあるが, ベにふうき茶に含まれるメチル化カテキンの作用は, 従来のEGCGに比べ強く, 今後の抗アレルギー作用以外の臨床研究が待たれることである. また, リード化合物としても平面化カテキン等をはじめとして, 種々の取り組みが始まっているので今後の成果に期待できる. 従って, カテキン学は, これから花が開くも

のであると考える.

## 謝 辞

私の関わった研究は, 昭和大学医学部薬理学講座医科薬理学部門を中心として行われ, 小口勝司教授には, 多大なご指導とご助言を賜りましたことを深く感謝申し上げます. 医学部臨床薬理学部門の小林真一教授, 聖マリアンナ医科大学大学院遺伝子多型・機能解析学分野の熊井俊夫教授, 歯学部歯科薬理学講座の天野均准教授, 医学部生体制御学部門の中西孝子准教授のご協力がなければ, これらの研究を成し遂げることが出来ませんでした. また, これまで研究に協力していただきました教員と大学院生の皆様に深く感謝いたします.

## 引用文献

- 1) 立花宏文：茶カテキン，西川研次郎，藤田哲，大澤俊彦他 編，食品機能性の科学，pp 323-327，産業技術サービスセンター，東京，2008
- 2) Oka, Y., Iwai, S., Amano, H., et al.: Tea polyphenols inhibit rat osteoclast formation and differentiation., *J. Pharmacol. Sci.*, 118, 55-64 (2012)
- 3) Kobayashi, S., Iwai, S., Tsujiyama, K., et al.: Theaflavin-3,3'-digallate inhibits tube formation in cocultured endothelial cells with fibroblasts., *Showa Univ. J. Med. Sciences*, 19, 59-72 (2007)
- 4) Yamada, Y., Iwai, S., Tsuboi, A., et al.: Theanine potentiates the inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on matrix metalloprotease activity in Langerhans-like cells and on tube formation., *Showa Univ. J. Med. Sciences*, 21, 117-129 (2009)
- 5) Katsuno, M., Iwai, S., Tsuboi, A., et al.: Benifuuki Tea Suppresses Histamine Signaling and Matrix Metalloproteinase-9 Expression in TDI-Sensitized Nasal Allergy Model Rats., *Jpn. Pharmacol. Ther.*, 41, 577-585 (2013)
- 6) Maeda-Yamamoto, M., Ema, K., Monobe, M., et al.: The efficacy of early treatment of seasonal allergic rhinitis with benifuuki green tea containing O-methylated catechin before pollen exposure: an open randomized study., *Allergol. Int.*, 58, 437-444 (2009)
- 7) Kamiya, Y., Iwai, S., Nara, K., et al.: Effects of green tea on matrix metalloproteinases in streptozotocin-induced diabetic rats., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 37, 77-85 (2005)
- 8) Ikeda, I., Imasato, Y., Sasaki, E., et al.: Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1127, 141-146 (1992)
- 9) Yamaguchi, M., Iwai, S., Tsujiyama, K., et al.: Effect of theaflavin-3,3'-digallate on matrix metalloproteinases in mouse chondrocytes., *Showa Univ. J. Med. Sciences*, 20, 97-107 (2008)
- 10) Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., et al.: The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1., *Microbiol. Immunol.*, 36, 999-1001 (1992)
- 11) Suzuki, T., Takahashi, T., Guo, CT., et al.: Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication., *J. Virol.*, 79, 11705-11715 (2005)
- 12) Unno, K., Takabayashi, F., Yoshida H., et al.: Daily consumption of green tea catechin delays memory regression in aged mice., *Biogerontology*, 8, 89-95 (2007)
- 13) Unno, K., Ishikawa, Y., Takabayashi, F., et al.: Daily ingestion of green tea catechins from adulthood suppressed brain dysfunction in aged mice., *Biofactors*, 34, 263-271 (2008)
- 14) Sugiyama, K., He, P., Wada, S., et al.: Green tea suppresses D-galactosamine-induced liver injury in rats., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 62, 609-611 (1998)
- 15) Ciesek, S., von Hahn, T., Colpitts, CC., et al.: The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry., *Hepatology*, 54, 1947-1955 (2011)
- 16) Yellapu, RK., Mittal, V., Grewal, P., et al.: Acute liver failure caused by 'fat burners' and dietary supplements: a case report and literature review., *Can. J. Gastroenterol.*, 25, 157-160 (2011)
- 17) Oguni, I., Nasu, K., Kanaya, S., et al.: Inhibitory effect of tannins on direct-acting mutagens., *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 3755-3758

- (1984)
- 18) Nakamura, Y.: The past and future of studies on tea and cancer prevention., *Genes Environ.*, 32, 67-74 (2010)
  - 19) Yang, G., Zheng, W., Xiang, YB., et al.: Green tea consumption and colorectal cancer risk: a report from the Shanghai Men's Health Study., *Carcinogenesis*, 32, 1684-1688 (2011)
  - 20) Sasazuki, S., Inoue, M., Miura, T., et al.: Plasma tea polyphenols and gastric cancer risk: a case-control study nested in a large population-based prospective study in Japan., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17, 343-351 (2008)
  - 21) Davalli, P., Rizzi, F., Caporali, A., et al.: Davalli P, et al. Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland., *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2012, 984219 (2012)
  - 22) Yang, CS., Lambert, JD., Sang, S.: Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols., *Arch. Toxicol.*, 83, 11-21 (2009)
  - 23) Nagase, H., Woessner, JF.: Matrix metalloproteinases., *J. Biol. Chem.*, 274, 21491-21494 (1999)
  - 24) Vu, TH., Shipley, JM., Bergers, G., et al.: MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes., *Cell*, 93, 411-422 (1998)
  - 25) Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., et al.: Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis., *Nat. Cell Biol.*, 2, 737-744 (2000)
  - 26) Iwai, S., Nakanishi-Ueda, T., Armstrong, D., et al.: Zymographical techniques for detection of matrix metalloproteinases. In: *Advanced protocols in oxidative stress I.* Armstrong D (ed), *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup> Volume 477. Totowa: Humana Press; pp 113-121 (2008)
  - 27) Juneja, LR., Chu, D., Okubo, T., et al.: L-theanine – a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans., *Food Sci. Tech.*, 10, 199-204 (1999)
  - 28) Ono, T., Iwai, S., Egawa, S., et al.: Quantification of migration and invasion and the association with matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinomas using a real-time cell analyzer., *Showa Univ. J. Med. Sciences*, 25, in press (2013)
  - 29) Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., et al.: Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays., *PLoS. One*, 7, e46536 (2012)
  - 30) Egawa, S., Iwai, S., Hayashi, T., et al.: The inhibition for cell migration and invasion in oral cavity cancers by (-)-epigallocatechin-3-gallate., *J. Pharmacol. Sci.*, 121 (Suppl. I), 172P (2013)
  - 31) Taniguchi, S., Fujiki, H., Kobayashi, H., et al.: Effect of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea, on lung metastasis with mouse B16 melanoma cell lines., *Cancer Lett.*, 65, 51-54 (1992)
  - 32) Shimizu, K., Kinouchi Shimizu, N., Hakamata, W., et al.: Preventive effect of green tea catechins on experimental tumor metastasis in senescence-accelerated mice., *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 117-121 (2010)
  - 33) 山本(前田)万里, 佐野満昭, 松田奈帆美, 他: 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*, 48, 64-68, 2001
  - 34) Maeda-Yamamoto, M., Inagaki, N., Kitaura, J., et al.: O-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells., *J. Immunology*, 172, 4486-4492 (2004)

- 35) Fujimura, Y., Umeda, D., Yano, S., et al.: The 67kDa laminin receptor as a primary determinant of anti-allergic effects of O-methylated EGCG., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 364, 79-85 (2007)
- 36) Maeda-Yamamoto, M., Ema, K., Shibuichi, I.: In vitro and in vivo anti-allergic effects of 'benifuuki' green tea containing O-methylated catechin and ginger extract enhancement., *Cytotechnology*, 55, 135-142 (2007)
- 37) Maeda-Yamamoto, M., Ema, K., Monobe, M., et al.: The efficacy of early treatment of seasonal allergic rhinitis with benifuuki green tea containing O-methylated catechin before pollen exposure: an open randomized study., *Allergol. Int.*, 58, 437-444 (2009)
- 38) Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, TE., et al.: Beyond Cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity., *N Engl. J. Med.*, 320, 915-924 (1989)
- 39) Lusis, AJ.: Atherosclerosis., *Nature*, 14, 233-241 (2000)
- 40) 川上知子, 岩井信市, 由良明彦, 他: d-ROMsテストによる酸化ストレス度は酸化LDLを反映する, *臨床薬理*, 42 Suppl., S315, 2011.
- 41) Yuri, T., Shinichi, I., Toshio, K., et al.: Visceral fat accumulation is associated with oxidative stress and increased matrix metalloproteinase-9 expression in atherogenic factor-overlapped model rats., *Showa Univ. J. Med. Sciences*, 22, 27-40 (2010)
- 42) Miura, S., Watanabe, J., Tomita, T., et al.: The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidative modification of low density lipoprotein., *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1567-1572 (1994)
- 43) Miura, S., Watanabe, J., Sano, M., et al.: Effects of various natural antioxidants on the Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidative modification of low density lipoprotein., *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 1-4 (1995)
- 44) Miura, Y., Chiba, T., Tomita, I., et al.: Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice., *J. Nutr.*, 131, 27-32 (2001)
- 45) Kwon, Y., Apostolidis, E., Shetty, K.: Inhibitory potential of wine and tea against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes., *J. Food Biochem.*, 32, 15-31 (2008)
- 46) Wang, Y., Huang, S., Shao, S., et al.: Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase in vitro., *Industrial Crops Products*, 37, 520-526 (2012)
- 47) Shimizu, M., Kobayashi, Y., Suzuki, M., et al.: Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins., *Biofactors*, 13, 61-65 (2000)
- 48) Hakamata, W., Nakanishi, I., Masuda, Y., et al.: Planar catechin analogues with alkyl side chains, as a potent antioxidant and an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor., *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 6524-6525 (2006)
- 49) 福原潔: フェノール性抗酸化物質をシーズとした高機能性分子の開発, *ビタミン*, 84, 22~25, 2010
- 50) Kamiya, Y., Iwai, S., Nara, K., et al.: Effects of green tea on matrix metalloproteinases in streptozotocin-induced diabetic rats., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 37, 77-85 (2005)
- 51) Iso, H., Date, C., Wakai, K., et al.: The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Ann. Intern. Med.*, 144, 554-562 (2006)

- 52) Fukino, Y., Ikeda, A., Maruyama, K., et al.: Randomized controlled trial for an effect of green tea-extract powder supplementation on glucose abnormalities., *Eur. J. Clin. Nutr.*, 62, 953-960 (2008)
- 53) Lorenzo, C., Hanley, AJ., Wagenknecht, LE., et al.: Relationship of insulin sensitivity, insulin secretion, and adiposity with insulin clearance in a multiethnic population: the insulin Resistance Atherosclerosis study., *Diabetes Care*, 36, 101-103 (2013)
- 54) 大門眞：食後高血糖とは, *Foods Food Ingredients J. Jpn*, 210 (12), 4J, 2005
- 55) Nakamura, I., Takahashi, N., Jimi, E., et al.: Regulation of osteoclast function., *Mod Rheumatol*, 22, 167-177 (2012)
- 56) Hampson, G., Fogelman, I.: Clinical role of bisphosphonate therapy., *Int. J. Womens Health*, 4, 455-469 (2012)
- 57) Devine, A., Hodgson, JM., Dick, IM., et al.: Tea drinking is associated with benefits on bone density in older women., *Am. J. Clin. Nutr.*, 86, 1243-1247 (2007)
- 58) Shen, CL., Yeh, JK., Cao, JJ., et al.: Green Tea and Bone metabolism., *Nutr. Res.*, 29, 437-456 (2009)
- 59) Muraki, S., Yamamoto, S., Ishibashi, H., et al.: Diet and lifestyle associated with increased bone mineral density: cross-sectional study of Japanese elderly women at an osteoporosis outpatient clinic., *J. Orthop. Sci.*, 12, 317-320 (2007)
- 60) Emori, H., Iwai, S., Amano, H., et al.: Decreased in electrical impedance of osteoclast differentiation by (-)-epigallocatechin-3-gallate., *J. Pharmacol. Sci*, 121 (Suppl. I), 249P (2013)
- 61) Ahmed, S.: Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate in arthritis: progress and promise., *Arthritis Res. Ther.*, 12, 208 (2010)
- 62) Pietta, PG., Simonetti, P., Gardana, C., et al.: Catechin metabolites after intake of green tea infusions., *Biofactors*, 8, 111-118 (1998)
- 63) Tsubono, Y., Nishino, Y., Komatsu, S., et al.: Green tea and the risk of gastric cancer in Japan., *N. Engl. J. Med.*, 344, 632-436 (2001)
- 64) Michikawa, T., Inoue, M., Shimazu, T., et al.: Green tea and coffee consumption and its association with thyroidcancer risk: a population-based cohort study in Japan., *Cancer Causes Control*, 22, 985-993 (2011)
- 65) Chen, Z., Chen, Q., Xia, H., et al.: Green tea drinking habits and esophageal cancer in southern China: a case-control study., *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 12, 229-233 (2011)
- 66) Yang, G., Zheng, W., Xiang, YB., et al.: Green tea consumption and colorectal cancer risk: a report from the Shanghai Men's Health Study., *Carcinogenesis*, 32, 1684-1688 (2011)
- 67) Mazzanti, G., Menniti-Ippolito, F., Moro, PA., et al.: Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 65, 331-41 (2009)
- 68) Verhelst, X., Burvenich, P., Van Sassenbroeck, D., et al.: Acute hepatitis after treatment for hair loss with oral green tea extracts (*Camellia Sinensis*) ., *Acta. Gastroenterol. Belg.*, 72, 262-264 (2009)
- 69) Yellapu, RK., Mittal, V., Grewal, P., et al.: Acute liver failure caused by 'fat burners' and dietary supplements: a case report and literature review., *Can. J. Gastroenterol.*, 25, 157-160 (2011)
- 70) Shirai, T., Sato, A., Hara, Y.: Epigallocatechin gallate. The major causative agent of green tea-induced asthma., *Chest*, 106, 1801-1805 (1994)
- 71) Shirai, T., Sato, A., Chida, K., et al.: Epigallocatechin gallate-induced histamine release in patients with green tea-induced asthma., *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 79, 65-69 (1997)

## Variety of physiological functions in the tea polyphenols

Shinichi Iwai

Division of Pharmaceutical Regulatory Pharmacy, Department of Healthcare and Regulatory Sciences, Showa University School of Pharmacy

### Abstract

Various bioactive substances are included in tea. In particular, catechin family, which are polyphenols, are multifunctional bioactive substances. A lot of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is included in the catechin of the green tea, and the effects are strong. The theaflavin-3,3'-digallate (TFDG) which is formed by polymerization of EGCG included in black tea. Cancer inhibitory effects, an antiallergic effect, life-style related diseases protective effect, and antibacterial and antiviral effects are well known for tea polyphenols. We studied various effects on the matrix metalloprotease (MMP) of EGCG and TFDG. MMP is an enzyme degrading the extracellular matrix and is associated with neovascularization, the cells migration ability and remodeling of the tissue. The tea polyphenols, EGCG and TFDG, have abilities of inhibition of MMP activity and MMPs' production. The low concentration of EGCG was found to inhibit differentiation and maturation of bone marrow cells to osteoclasts, and an osteoporosis prophylaxis effect can be expected. Allergy symptoms were relieved in the nasal allergy model rat by "Benifuuki tea" which contains O-methylated catechin. In fact, O-methylated catechin and "Benifuuki tea" attract attention. I want to describe the cancer inhibitory effect, an antiallergic effect, life-style related diseases protective efficacy and an osteoporosis prophylaxis effect that we participated in our studies.

Key words : epigallocatechin-3-gallate (EGCG) , theaflavin-3,3' -digallate (TFDG) , Benifuuki tea, matrix metalloprotease (MMP) , osteoclast

Received 16 May. 2013 ; accepted 28 Oct. 2013