

報 文

緑茶飲料中カテキン類の CYP3A4 による代謝系への阻害効果
の解析中村 拓己¹, 浅田 絵美¹, 永田 佳子¹, 金澤 秀子^{®1}Effect of metabolic inhibition against CYP3A4 by catechins in
bottled green tea drinksTakumi NAKAMURA¹, Emi ASADA¹, Yoshiko NAGATA¹ and Hideko KANAZAWA¹¹ Kyoritsu College of Pharmacy, 1-5-30, Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512

(Received 12 May 2003, Accepted 12 July 2003)

Catechins, major polyphenol constituents of green tea, are well known because of their antioxidant activity and chemopreventive effects against cancers. We determined catechins (catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG) and gallic catechin gallate (GCG)) in bottled green tea drinks. The effects of temperature on the conversion of EGCG to GCG by a heat treatment were examined. The epimerization reaction seemed to proceed slowly around 80°C, and was observed to occur rapidly at 98°C. In this study, we also investigated the effect of metabolic inhibition against CYP3A4 by individual catechins. The inhibition effects of the gallate catechins were greater than those of non-gallate catechins.

Keywords : catechins; epimerization; CYP3A4; green tea.

1 緒 言

近年、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つつある。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、抗しゅよう作用、突然変異抑制作用、活性酸素の消去、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^{1)~3)}多岐にわたり、その機能が注目されている。現在、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、多方面で利用されている。

カテキン類はフラバン-3-オール骨格をもち、ヘテロ環(C環)の *C₂, *C₃ 位に2個の不斉炭素をもつ光学活性な化合物である。フラバン-3-オール骨格には理論的には、4種の異性体が存在するが、茶葉中に存在するカテキン類は(-)-epi体と(+)-体及び(-)-epi体のガレートが報告されているのみで、(-)-体や(+)-epi体は検出されておら

ず、茶葉から分離されたという報告は、製茶の工程又は殺菌工程^{4)~6)}における熱異性化によって生じたものであるとされている¹⁾。緑茶中最も多く含まれているカテキン類はエピガロカテキンガレート(EGCG)であり、本研究では、市販の茶飲料中のEGCG及びその熱異性化体であるガロカテキンガレート(GCG)、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(EGG)、カテキン(C)及びカフェイン(CAF)の定量を行った(Fig. 1)。

また、カテキン類の機能の一つとして、薬物代謝酵素シトクローム P450 (cytochrome P450, CYP) による代謝活性化の阻害が挙げられ⁷⁾、この作用はカテキン類の抗がん作用メカニズムの一つであると考えられている。薬物代謝には多くの酵素がかかわっているが、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CYPである。CYPは遺伝子スーパーファミリーを形成しており、人における薬物代謝型は約20種あるが、中でもCYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1,

¹ 共立薬科大学薬学部: 105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30

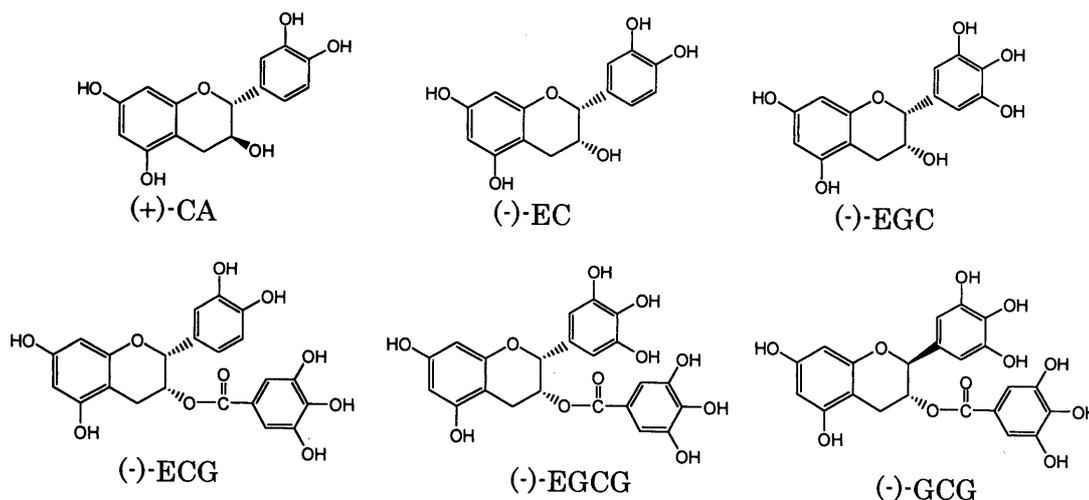


Fig. 1 Structures of catechins

(+)-C: (+)-catechin, (-)-EC: epicatechin, (-)-EGC: epigallocatechin, (-)-EGCG: epicatechin gal-
late, (-)-EGCG: epigallocatechin gallate, (-)-GCG: gallocatechin gallate

CYP3A4 の 7 種類がヒト肝の薬物代謝に関与する主な CYP 分子種である⁸⁾。また、今まで緑茶に含まれるカテキン類の生体機能に関する研究は数多く行われてきたが、その熱異性化体の活性についての報告は少ない。よって本研究では、EGCG の熱異性化体である GCG も含めたカテキン類の CYP3A4 代謝系に対する阻害効果の解析を行った。

2 実 験

2.1 装 置

カテキン類の定量においては、送液ポンプ: HITACHI L-6320, 検出器: HITACHI L-4250 UV-VIS Detector, データ処理: HITACHI D-7500 を用いた。また、CYP3A4 代謝系に対するカテキン類の阻害効果の解析においては、送液ポンプ: HITACHI L-7100, 検出器: HITACHI L-7400, データ処理: HITACHI D-7500, オートサンプラー: HITACHI-L7200 を用いた。また、pH メーターは HORIBA D-22, 遠心分離には EF-1300 (TOMY 製) を使用した。

2.2 試 薬

(+)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-EGCG, (-)-EGCG, (-)-GCG は sigma 製を使用した。テストステロン, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), リン酸二水素カリウム, CAF, アセトニトリルは和光純薬製を, CYP3A4, NADPH Regenerating System は GENTEST 製を使用した。6 β -ヒドロキシテストステロンは住友化学製を用いた。

2.3 実 験

2.3.1 内標準法を用いたカテキン類の検量線 内標準物質として、 β -ヒドロキシエチルテオフィリン (1 mg ml⁻¹) を用いた。溶離液は、A 液; 50 mM リン酸二水素カ

Table 1 Linearity of calibration curve and recovery of solid phase extraction

	Equation	r^2	Recovery, %
EGC	$Y = 0.713X - 2.91$	0.9996	94.8
C	$Y = 3.46X - 4.01$	0.9994	96.1
CAF	$Y = 1.31X - 22.4$	0.9993	96.8
EC	$Y = 3.39X + 9.64$	0.9976	98.1
EGCG	$Y = 7.37X - 5.42$	0.9998	93.7
GCG	$Y = 8.11X - 5.25$	0.9999	91.8
ECG	$Y = 11.3X - 1.50$	0.9996	90.6

Y = peak area of standard catechins/peak area of I.S; X = concentration of catechins ($\mu\text{g ml}^{-1}$); r = correlation coefficient

リウム水溶液 (pH 3) : CH₃CN = 94 : 6 と B 液; 50 mM リン酸二水素カリウム水溶液 (pH 3) : CH₃CN = 80 : 20 を用いた。linear gradient 法により C, EC, EGC は 12.5 ~ 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, EGC, EGCG, GCG, CAF は 25 ~ 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の範囲で検量線を作成した (Table 1)。紫外の測定波長は 280 nm⁹⁾, カラムは Inertsil[®] ODS-3 (100 \times 4.6 mm I.D, GL Sciences 製) を使用した。また、緑茶試料についても同様の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の条件を用いて測定した。

2.3.2 前処理における回収率の決定 緑茶試料を測定する際、Sep-Pak[®] Plus C₁₈ (Waters 製) を用いた前処理を行うため、標準品を用いて固相抽出法による回収率を求めた (Table 1)。回収率の算出は、固相抽出を行う前のカテキン類標準品濃度と固相抽出後のカテキン類標準品濃度の比から求めた。緑茶試料の前処理法は Fig. 2 に示した。

2.3.3 緑茶試料の測定 数種の緑茶飲料 (ペットボトルの市販品) を 2.3.2 の固相抽出と同様に前処理し、内標準物質を加えた後に、前述の HPLC 条件で分析した。

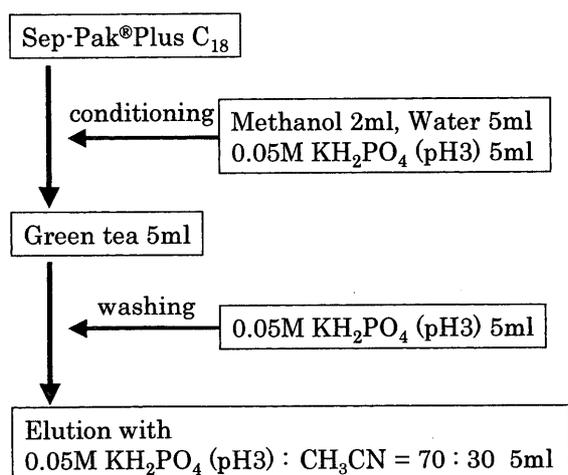


Fig. 2 The scheme of solid phase extraction

また、緑茶の抽出温度を変化させた際 (45, 80, 98°C) のカテキン類についても同様に定量した (抽出時間は 30 分で、茶葉 0.2 g を 100 ml の水で抽出)¹⁰⁾¹¹⁾。

2.3.4 CYP3A4 による代謝系へのカテキン類の阻害効果の解析 CYP3A4 の基質にはテストステロンを用い、その代謝物である 6β-ヒドロキシテストステロンの生成におけるカテキン類の影響について検討した。反応は全量 0.5 ml, 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) の条件下で行った。リン酸緩衝液中で CYP3A4 (30 pmol), 基質 (200 μM), 阻害物質として用いたカテキン類, 50 μM EDTA に NADPH Regenerating System (1.3 mM NADP⁺, 3.3 mM グルコース-6-リン酸, 0.4 U ml⁻¹ グルコース-6-リン酸脱水素酵素, 3.3 mM MgCl₂) を加えることで反応を開始した。反応時間は 50 分間とし、アセトニトリル 0.5 ml で反応を停止させた。その後、遠心分離 (13000 rpm, 15 分) を行い、上澄みに内標準物質 (デキサメタゾン, 100 μM) を加え、HPLC により測定した。本研究では、基質濃度を一定 (200 μM) とし、カテキン類濃度を変化 (200, 100, 50, 25, 12.5 μM) させたときに生じる代謝物量を測定し、カテキン類を加えていないときの代謝物量を 100% とし、その活性を示した。また、HPLC の溶離液には 20 mM 酢酸アンモニウム水溶液とアセトニトリルの混液を用い、紫外の測定波長は 254 nm, カラムは Mightysil RP-18 GP (150 × 4.6 mm I.D, 関東化学製) を使用した。

3 結果及び考察

3.1 ペットボトル飲料 (緑茶) 中カテキン類の定量

Table 2 にペットボトル中の緑茶カテキン類定量の結果を示し、Fig. 3 には、sample E のクロマトグラムを示した。どの飲料でも、EGCG と GCG と EGC の含有量が高かった。EGCG と GCG の総量は、本研究で測定したペットボトル中の緑茶中総カテキン類量の約 40~50% であ

Table 2 Concentration of catechins in bottled green tea drinks

Sample	Catechins/μg ml ⁻¹						
	EGC	C	CAF	EC	EGCG	GCG	ECG
A	79.2	26.0	95.0	31.5	52.1	50.6	16.7
B	92.1	27.3	113.3	39.0	74.2	79.8	22.6
C	64.5	19.0	82.1	16.1	47.3	53.4	13.6
D	75.0	27.0	114.2	20.9	72.4	88.3	22.9
E	79.5	28.7	111.0	35.0	73.4	80.4	22.4
F	49.3	18.6	124.0	14.4	78.7	73.4	24.0
G	62.4	25.8	88.2	36.7	68.4	77.8	23.7

Sample A~E; Japanese green tea; Sample F~G: Chinese green tea

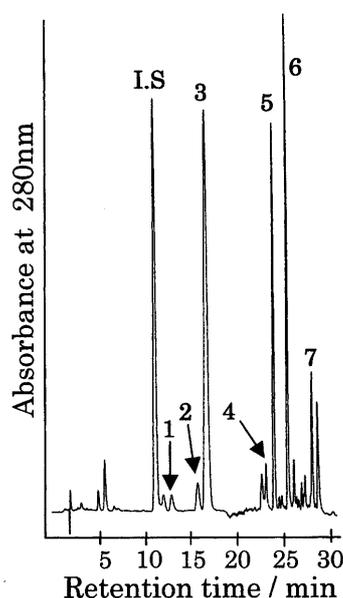


Fig. 3 Chromatogram of sample E

1: EGC, 2: C, 3: CAF, 4: EC, 5: EGCG, 6: GCG, 7: ECG, I.S: β-hydroxyethyltheophylline

り、その比は約 1:1 であった。それは、EGCG が殺菌工程などで熱異性化し、GCG に構造変化するという過去の文献¹²⁾と一致する。

本研究では、緑茶 (日本) と中国緑茶の 2 種について検討した。中国緑茶のほうが日本の緑茶より、EGCG, EGC 含量については多いとの報告があるが²⁾、測定した緑茶飲料において、日本の緑茶と中国緑茶に優位な差は認められなかった。これについては、使用した茶葉の量、抽出条件などメーカーによる差にその原因があることが考えられた。

3.2 抽出温度によるカテキン類量の影響

緑茶抽出温度を変化させた際 (45, 80, 98°C) のカテキン類の濃度を Fig. 4 に示した。抽出温度により、抽出

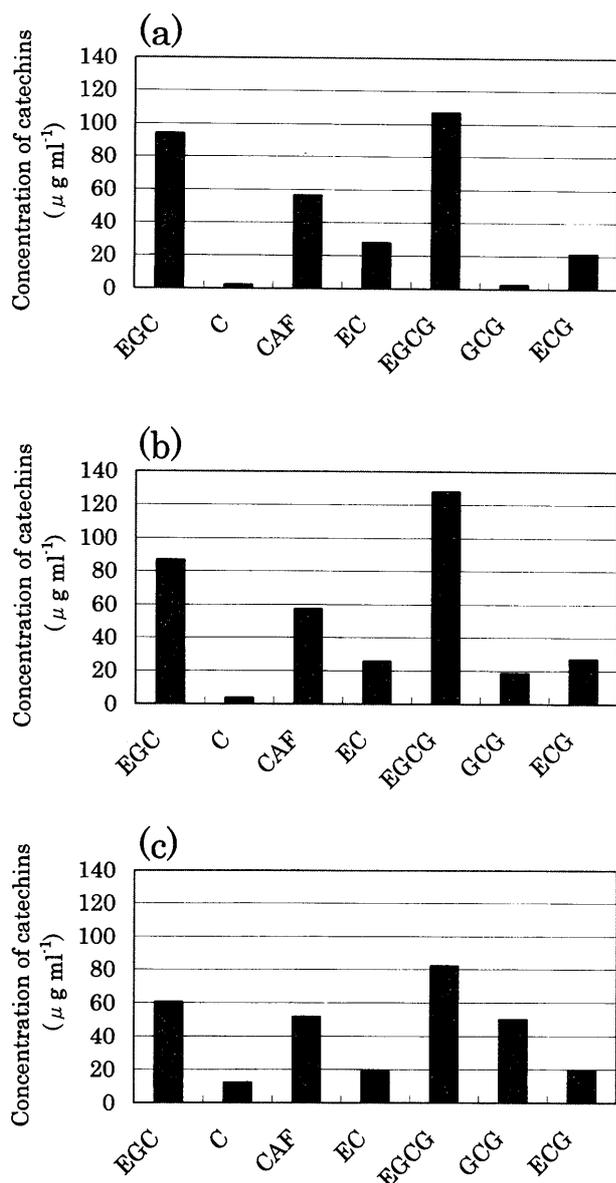


Fig. 4 Concentration of catechins in extracted green tea at different temperature [(a) 45°C, (b) 80°C, (c) 98°C]

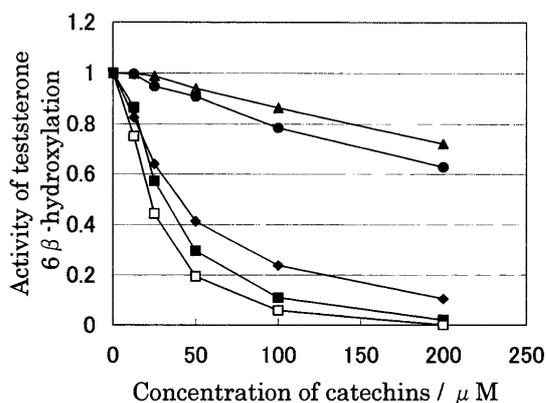


Fig. 5 Inhibitory effect of catechins against CYP3A4
▲: EGC, ●: EC, ◆: ECG, ■: EGCG, □: GCG

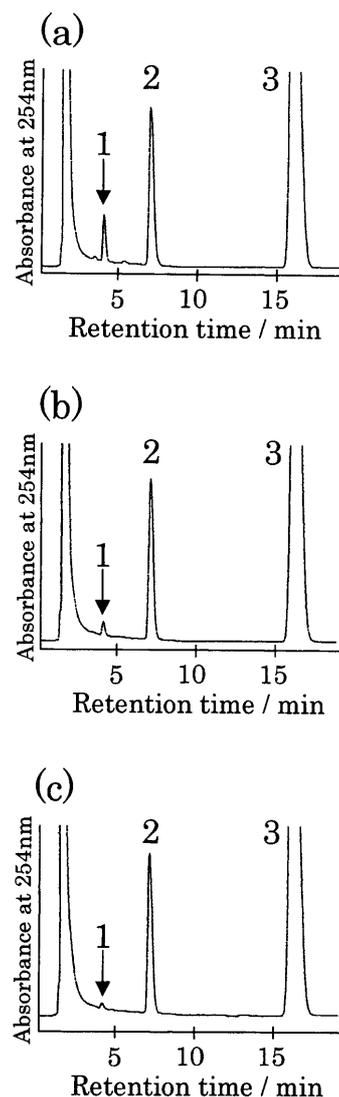


Fig. 6 Chromatograms of metabolic inhibition against CYP3A4 by catechins (1: 6 β -hydroxytestosterone, 2: dexamethasone (I.S), 3: testosterone)

An incubation mixture consisted of 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), 50 μM EDTA, CYP3A4 (30 pmol), catechins (0~200 μM), 0.2 mM testosterone, and NADPH Regenerating system in a final volume 0.5 ml. (a) EGCG 0 μM , (b) EGCG 50 μM , (c) EGCG 100 μM

されたカテキン類量は異なった。抽出温度 45°C では、ほとんど EGCG は熱異性化していないのに対して、80°C では少量、98°C では大量の EGCG が GCG に熱異性化していることが分かった。このことから、水で緑茶を抽出する際、ほぼ 80°C 付近から熱異性化が起こることが推測できる。また、EGC 量は、45°C で抽出した際に一番多くなった。これは、EGCG や ECG など疎水性が高いカテキン類に比べ、EGC は親水性が高いので、抽出温度にかかわらず抽出されたことが推測される。抽出温度 80°C 以上では、EGC 量は減少したが、これは熱異性化した可能性が考えられる。

3・3 CYP3A4 代謝系に対するカテキン類の阻害効果の解析

CYP3A4 代謝系に対するカテキン類の阻害効果を示すグラフを Fig. 5 に, EGCG の CYP3A4 代謝系への活性を測定した際のクロマトグラムを Fig. 6 に示した. CYP3A4 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った. EGCG や GCG, ECG などガレート構造をもつカテキン類ではその阻害効果は大きく, その構造をもたないカテキン類においては, 阻害効果は小さかった. 3・1 の結果より, 緑茶飲料中には EGCG 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が, 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. 本研究により GCG は, EGCG と同程度の CYP3A4 阻害活性があることが明らかとなった. 他の CYP 分子種を用いた代謝系への効果についても現在検討中である.

文 献

- 1) 伊奈和夫, 坂田完三, 富田 勲, 伊勢村護: “茶の

- 化学成分と機能”, 初版 (2002), (弘学出版).
- 2) 村松敬一郎, 小國伊太郎, 伊勢村護, 杉山公男, 山本 (前田) 万理: “茶の機能—生体の新たな可能性”, 初版 (2002), (学会出版センター).
- 3) 角田隆巳: *ファルマシア*, **38**, 1062 (2002).
- 4) 渡部伸夫, 寺田久屋, 一色賢司: *日本食品工業学会誌*, **39**, 907 (1992).
- 5) 末松伸一, 久延義弘, 西郷英昭, 松田良子, 原京子, 小松美博: *日本食品工業学会誌*, **39**, 178 (1992).
- 6) R. Seto, H. Nakamura, F. Nanjo, Y. Hara: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1434 (1997).
- 7) S. Muto, K. Fujita, Y. Yamazaki, T. Kamataki: *Mutat. Res.*, **479**, 197 (2001).
- 8) 加藤隆一, 鎌滝哲也: “薬物代謝学—医療薬学・毒性学の基礎として”, 第 2 版 (2000), (東京化学同人).
- 9) M. Kumamoto, T. Sonda, K. Takedomi, M. Tabata: *Anal. Sci.*, **16**, 139 (2000).
- 10) Y. Yoshida, M. Kiso, T. Goto: *Food Chemistry*, **67**, 429 (1999).
- 11) 末松伸一, 久延義弘, 西郷英昭, 松田良子, 小松美博: *日本食品科学工学会誌*, **42**, 419 (1995).
- 12) 小林千種, 中里光男, 山嶋裕季子, 川合由華, 立石恭也, 安田和男: *東京衛研年報*, **49**, 135 (1998).

要 旨

市販品の緑茶中の主要成分であるカテキン類は, その製茶工程あるいは殺菌工程で熱異性化が起こることが知られており, 緑茶カテキン類のうち含有量の最も多いとされているエピガロカテキンガレート (EGCG) は, ペットボトル飲料においては, その熱異性化体であるガロカテキンガレート (GCG) とほぼ 1 : 1 の割合で存在していた. また, 抽出温度を変化させた実験から, 緑茶はおよそ 80°C 付近から, 熱異性化が起こり, 抽出温度が 98°C となると EGCG の熱異性化は更に進むことが確認された. 更に, これらカテキン類のシトクローム P450 (CYP) 3A4 代謝系に対する活性について検討した結果, 構造中にガレートを有するカテキン類である EGCG, GCG, エピカテキンガレート (ECG) のほうがガレート構造を持たないカテキン類と比較して阻害効果が大きいことが明らかとなった. したがって, CYP3A4 代謝系に対するカテキン類の阻害効果は, ガレート構造の有無により大きく影響されることが示唆された.