

カテキンの抗腫瘍活性と緑茶の教材としての可能性について

細川 友秀¹⁾・濱岡 美紀¹⁾・坂東 忠司¹⁾

Studies on the Anti-tumor Activity of Catechin and the Potential of Green Tea as a Teaching Material

Tomohide HOSOKAWA, Miki HAMAOKA and Tadashi BANDO

抄 録：京都日本の茶の文化の中心地であるとともに伝統的なお茶の産地でもある。それゆえ京都ではお茶をテーマとして生徒が生活する地域に結びつけて「日本の伝統文化」、「地元の産業」、「日常生活環境と健康」といったように身近で総合的な学習を設定することができる。そこで本研究では、「日常生活環境と健康」の面からお茶をとりあげ、緑茶の薬効を実験的に示す実験教材を開発するための基礎的検討をおこなった。緑茶に含まれるポリフェノール類の主要成分であり、いくつかの薬効をもつと考えられているカテキン類のうち、茶葉とお湯で入れた緑茶に最も多く含まれるエピガロカテキンガレート (EGCg) を選びその抗腫瘍活性と正常の細胞への影響を調べた。お湯で入れた緑茶の中に含まれる濃度の 1/100 程度の濃度で EGCg をマウスの T リンフォーマ癌細胞の培養に添加すると、癌細胞の増殖は顕著に抑制された。それと同じ濃度で EGCg を癌細胞に作用させ、トリパンブルー色素で死細胞を染色する方法を用い、4, 8, 24 時間と時間をおいて癌細胞の生細胞と死細胞を顕微鏡下で数えたところ、死細胞の割合が直線的に増加し 24 時間で約 90 % になった。正常の胸腺細胞に対してはこのような EGCg の効果は認められなかった。このような EGCg の抗腫瘍活性は EGCg を水溶液の状態に置くと速やかに失活することが分かった。

本研究でおこなった実験を実験教材として使用することを考えると：1) EGCg は市販されていて比較的安く入手できる、2) 癌細胞を低濃度の EGCg を含む培養液に入れて培養すると 24 時間以内にほとんどの細胞が死亡するので、2 日連続で同じ時間帯に実験の時間を組むことができれば効果的な実験になる、3) EGCg の殺癌細胞活性はお湯で入れた緑茶に含まれる濃度の 1/100 程度の濃度で観察されるので、日常生活で飲んでいる緑茶のほんの少量を癌細胞の培養に入れてその殺癌細胞効果を観察できる、など教材としての長所と特色をあげることができる。

キーワード：緑茶、カテキン、抗腫瘍活性、総合学習

I. はじめに

お茶は世界各国で多くの人々に愛飲されている。我が国でも、日常的な飲用から日本独自の

1) 京都教育大学

茶の文化の形成にいたるまで、お茶はさまざまな形で飲用されてきた。特に、緑茶は特有の香りと甘み・渋みを楽しむことができるだけでなく、昔からさまざまな薬効が経験的に知られ健康保持によい飲料として親しまれてきた。近年、緑茶の主産地である静岡県では癌による死亡率が他府県に比べて低いことが示され、緑茶のもつ癌の予防効果が注目されるようになり、緑茶の効能についてさまざまな研究がおこなわれるようになった。

茶の主要成分として豊富なビタミン類、カフェイン、そしてカテキン類があげられる。茶に含まれるカテキン類は主にエピガロカテキンガレート (EGCg), エピカテキンガレート (ECg), エピガロカテキン (EGC), エピカテキン (EC) の 4 種類である。そのなかでも緑茶の主成分である EGCg は、乾燥茶葉中に約 8 % (重量), お湯でいれた緑茶中には約 400 $\mu\text{g/ml}$ 程度含まれるといわれる。カテキンはポリフェノールに分類され、強い抗酸化作用がある^{1), 2)}。このようなカテキンの抗酸化作用は、緑茶が紅茶やウーロン茶と異なり茶葉を発酵させずにつくられるので、紅茶・ウーロン茶のようにカテキン類が酸化されることがなく保持されている。その他、緑茶のカテキン類のもつ抗癌作用^{3), 4)}、抗菌作用^{5), 6)}などが報告されてきている。

一方、京都は日本の茶の文化の中心地であるとともに伝統的なお茶の産地でもある。それゆえ京都ではお茶をテーマとして生徒が生活する地域に結びつけて「日本の伝統文化」, 「地元の産業」, 「日常の生活環境と健康」といったように身近で総合的な学習を設定することができる。そこで、本研究では、「日常生活環境と健康」の面からお茶をとりあげ、お茶の薬効を実験的に示す実験教材を開発するための基礎的検討をおこなった。

Ⅱ. 材料と方法

(1) マウス

東京大学医科学研究所から供与され、私たちの研究室で維持している C57BL/6-bm12 マウスを用いた。

(2) 腫瘍細胞

5 % 牛胎仔血清 (FCS) を含む RPMI1640 完全培地で 2 日ごとに継代した EL-4 細胞 (マウス T リンホーマ細胞) を使用した。

(3) 培養液と緩衝液

RPMI1640 完全培地: RPMI1640 粉末培地 (日水製薬, 東京) 5.1 g を再蒸留水 500 ml に溶かし, 120 °C で 20 分間オートクレーブして常温まで冷却した後, 7 % 炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて pH 7.2 に調整し, 牛胎仔血清 (FCS, Flow Laboratories, Nowth Ryde, Australia) を 7.5 %, L-グルタミンを 2 mM, 2-mercaptoethanol を 5×10^{-5} M の濃度になるようにそれぞれ加えて完全培地とした。

イーグル MEM 培養液: イーグル MEM 粉末培地 (日水製薬) 4.7 g を再蒸留水 500 ml に溶かし, 120 °C で 20 分間オートクレーブして常温まで冷却した後, 7 % 炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて pH 7.2 に調整した。

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.2): NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KCl 0.2

g を再蒸留水 1 l に溶かし、高圧蒸気滅菌した。

Coating buffer (pH 9.6) : Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g, NaN_3 0.2 g を再蒸留水 1 l に溶かしてオートクレーブした。

Diethanolamine buffer : Diethanolamine 97 ml, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, NaN_3 0.2 g を再蒸留水 800 ml に溶かして 4 N HCl で pH9.8 に調整し、再蒸留水を加えて全量を 1 l にした後、オートクレーブした。

MTT 溶 液 : MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) 粉末を PBS で 5 mg/ml の濃度に溶かして 4 °C で遮光保存し、使用する直前に PBS で 1 mg/ml の濃度に調整した。

PBS Tween 液 : Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) (ナカライテスク) 0.5 ml と NaN_3 0.2 g を PBS 1 l に溶解した。

(4) エピガロカテキンガレート (EGCg)

EGCg (epigallocatechin gallate, Sigma Chemical Co.) を 5.0 mg 測り、95 % エタノール 0.05 ml に溶かし、イーグル MEM 培養液を加えて 1 ml とし、それを原液として使用した。

(5) EL-4 細胞の準備

対数増殖期にある細胞を用いて実験するために、実験の 48 時間前に培養用 dish (Falcon 353003, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) に、細胞を 1.0×10^6 cells/dish 入れ、前培養した。実験当日、dish にイーグル MEM 培養液を加えて懸濁し、50 ml 遠心チューブに回収した。1000 rpm, 4 °C で 10 分間遠心分離した後、上清を静かに捨て、イーグル MEM 培養液を加え再び遠心した。この操作を 2 回繰り返して細胞を洗浄した後、RPMI1640 培養液を加えて懸濁し、細胞濃度を調整して実験に用いた。

(6) 胸腺細胞懸濁液の準備

すべて無菌条件下で細胞懸濁液の調整操作を行った。マウスを脱血死させた後、胸部切開しピンセットで胸腺を摘出した。イーグル MEM 培養液の中で、胸腺に切り込みを数カ所入れ、ピンセットで挟み、ステンレスメッシュにこすりつけて胸腺細胞をほぐし出し、得られた細胞浮遊液を脱脂綿で濾過し組織片などを取り除いた。1000 rpm で 10 分間の遠心操作を 3 回繰り返して細胞を洗い、最後の遠心後上清を静かに捨てて RPMI1640 完全培地を加えて胸腺細胞懸濁液をつくり、細胞濃度を調整して実験に用いた。

(7) 血球計算盤による細胞数の測定

細胞液 25 μl を 0.2 % トリパンブルー溶液 75 μl にて 4 倍希釈し懸濁した後、Fuchs 計算盤 (EL-4 細胞用), または, Thoma 計算盤 (胸腺細胞用) に流し込み、トリパンブルー溶液に染まった細胞を死細胞と判断し、染まらない細胞を生細胞として数えて細胞濃度を決定した。

(8) MTT 染色法による細胞数の定量

96-well マイクロプレート (Falcon 353072, Becton Dickinson and Company) に EL-4 細胞または胸腺細胞を 80000 cells/well ~ 125 cells/well の密度で分注し、RPMI1640 培養液のみ添加を control とし、種々の濃度で培養液に EGCg を添加した培養を実験群として、37 °C, 5 % CO_2 のインキュベーター内で 0 ~ 70 時間培養した。各時間培養後、96-well マイクロプレートを室温, 1000 rpm, 10 分間遠心して、各 well から 150 μl の培養上清を捨てて 1 mg/ml の濃度の

MTT 溶液を 50 μ l 入れ, 2 時間インキュベートした。その後, 各 well から反応液を吸い取り, 生成した MTT formazan の結晶を溶出させるために dimethyl sulfoxide (和光純薬, 大阪) を各 well あたり 100 μ l ずつ入れ, マイクロプレートリーダー (model 3550, Bio Rad Laboratories, Hercules, California, USA) のオートミックスモードで 8 秒間攪拌した。さらに, 595 nm と 655 nm の 2 波長で各 well の吸光度を測定し, 2 波長の吸光度の差を各 well の吸光度とした。培養 0 時間の well あたりの細胞数に対応する吸光度をプロットして得られた曲線を検量線として各 well 中の生細胞数を定量した。

(9) 有意差検定

任意の 2 群間の有意差検定は Student's t-test を用い, $p < 0.05$ のとき有意差があると判定した。

Ⅲ. 結 果

(1) EL-4 細胞の培養条件と MTT 染色法による EL-4 細胞数の測定条件の検討

96-well マイクロ培養プレートの well に, well あたり 250 ~ 32000 個まで, 様々な数の EL-4 細胞を分注して 0 ~ 70 時間培養した。それぞれの培養時間ごとに MTT 染色法によって各 well の細胞を染色し, 吸光度を測定した。結果を図 1 に示す。

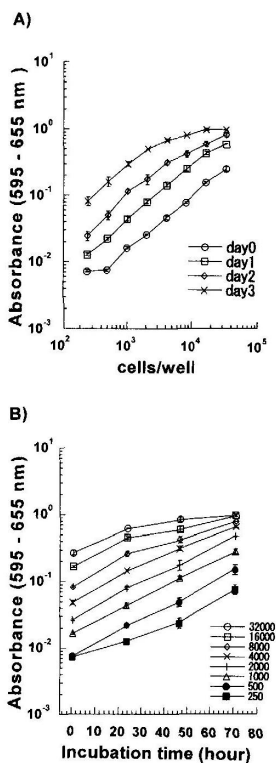


図 1 EL-4 細胞の定量と増殖曲線

B) の凡例は well 当りの培養細胞数を示す。

図 1A の day 0 の折れ線グラフから、EL-4 細胞は well あたりの細胞数が 500 個から 32000 個の間は吸光度と細胞数の間に直線関係があり、少なくともこの範囲で well あたりの細胞数を定量できることがわかった。また、図 1B のグラフから、EL-4 細胞は well あたりの細胞数が 250 個～8000 個の培養密度条件で、培養時間 0～70 時間の間は一定の倍化時間で対数増殖することが分かった。

これらの結果をもとに、以後の EL-4 細胞の培養実験は、well あたり 250～2000 個の培養密度で 0～70 時間培養してカテキン EGCg の細胞増殖に及ぼす影響を調べることにした。

(2) EL-4 細胞の増殖に対する EGCg の抑制効果

種々の濃度の EGCg を添加した培養液で EL-4 細胞を培養した。結果を図 2 に示す。EGCg 濃度が 2.5 $\mu\text{g/ml}$ では、培養時間が 22 時間では well あたりの細胞数が 250, 500, 1000, 2000 個のどの条件においても EL-4 細胞の増殖を抑制した。しかし well あたりの細胞数 2000 個の培養条件では、培養時間が 46 時間、70 時間と経過するにつれて増殖抑制効果はみられなくなった。

そこで、この原因を調べるため、EGCg を添加した培養液を EL-4 細胞無添加で CO_2 インキュベーター内に入れ、通常

の培養条件で種々の時間インキュベートした。その後、EL-4 細胞を well あたり 2000 個加えて 0～70 時間培養を行い、細胞なしでのインキュベーション時間の長さによって EGCg の増殖抑制効果がどのように変化するか調べた。結果を図 3 に示す。細胞なしでのインキュベーションをしないで直ちに細胞を培養した場合は、調べたどの濃度でも EGCg は EL-4 細胞の増殖を抑制した (図 3A)。しかし、EGCg のみのインキュベーションを 22 時間あるいは 46 時間おこなうと、0.625 $\mu\text{g/ml}$ と 1.25 $\mu\text{g/ml}$ の濃

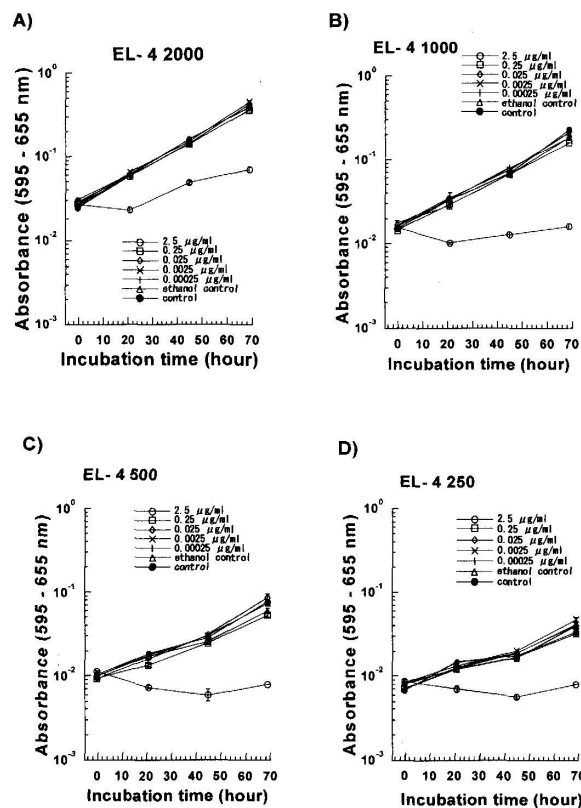


図 2 EL-4 細胞の増殖に対する EGCg の抑制効果

well 当りの培養細胞数は、A) 2000 個、B) 1000 個、C) 500 個、D) 250 個。

度の EGCg は抑制効果を完全に失っていた (図 3B, C)。さらにインキュベーションを 70 時間にすると 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の抑制効果も部分的に失われた (図 3D)。

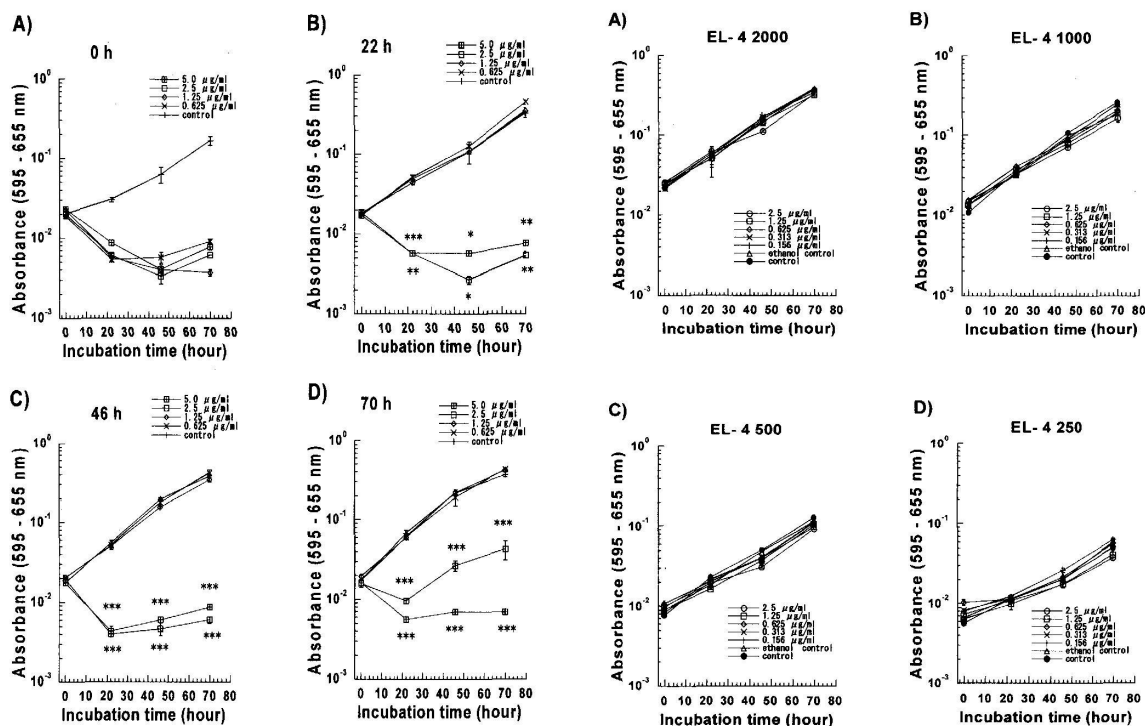


図 3 培養液に溶解後の EGCg の細胞増殖抑制活性

凡例に示す濃度で培養液に溶解した EGCg を 96-well プレートに分注して、CO₂ インキュベーター内で、0 時間 (A)、22 時間 (B)、46 時間 (C)、または 70 時間 (D) インキュベート後、各 well に EL-4 細胞 2000 個を分注して横軸に示す時間培養した。* : PC0.05, ** : PC0.01, *** : PC0.001。

図 4 培養液に溶解し、4℃で 1 ヶ月冷蔵保存した EGCg の細胞増殖抑制活性

well 当りの培養細胞数は、A) 2000 個、B) 1000 個、C) 500 個、D) 250 個。

そこで、実験に用いる EGCg の高濃度原液を冷蔵庫で長期間保存可能かどうかを検討した。EGCg の濃度を 5.0 mg/ml に調整したイーグル MEM 培養液を 4℃で 1 ヶ月保存し、その原液を用いて各濃度の EGCg を添加した培養液を調製し、EL-4 細胞を 250 ~ 2000 cells/well, EGCg 濃度 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ~ 0.156 $\mu\text{g/ml}$ の条件で培養を行った。結果を図 4 に示す。調べたどの濃度の EGCg 添加群も control と同様の増加を示し、EGCg は失活していることがわかった。

(3) EGCg による EL-4 細胞の増殖抑制のしくみ

上に述べた実験結果から、EGCg が水溶液の状態であると、たとえ高濃度の溶液で遮光し冷蔵保存しても EGCg の EL-4 細胞増殖抑制効果は比較的短時間で失われることがわかった。細胞増殖抑制効果は、1) EGCg の作用によって EL-4 細胞が細胞死を起し増殖できる細胞がなくなるか極端に減少することによる、2) EGCg の作用によって EL-4 細胞が死ぬことはないが細胞の増殖につながる細胞周期の進行が止まることによる、という 2 つの仕組みが考えられる。もし、2) の可能性が真実であれば、どの濃度の EGCg を添加した培養でも EGCg が失活する時間が経過すれば細胞増殖は再開すると考えられるので、上の実験結果は細胞増殖抑制効果が

EL-4 細胞の細胞死によることを示唆する。

この点を調べるため、EGCg 濃度 $2.5 \mu\text{g/ml}$ で、well あたり EL-4 細胞が 2000 個となるように 96-well プレートに分注して、4, 8, または 24 時間培養した。各培養時間経過後、各 well に含まれる EL-4 細胞をトリパンブルー溶液で染色し、顕微鏡によって生細胞数と死細胞数を区別してカウントした。結果を図 5 に示す。対照の培養では死細胞はほとんど増加しなかった(図 5B)。しかし、EGCg を添加した培養では、培養時間が 8 時間経過すると死細胞は 50 % を超え、24 時間で 90 % 近くになった (図 5A)。

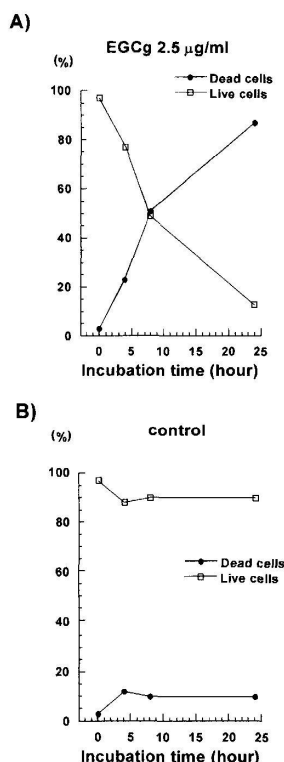


図 5 EGCg による EL-4 細胞への傷害効果

濃度 $2.5 \mu\text{g/ml}$ の EGCg を含む培養液に EL-4 細胞を懸濁して、96-well プレートの各 well に 2000 個分注し、横軸に示す時間培養した。各時点での死細胞（黒丸）と生細胞（白丸）の割合を示す。A) EGCg $2.5 \mu\text{g/ml}$ 含む培養、B) EGCg 無添加の培養

(4) の正常胸腺細胞に対する EGCg の作用効果

EGCg が EL-4 細胞に細胞死を引き起こすことが分かった。そして、EL-4 細胞は胸腺細胞が癌化した細胞であるので、同じ濃度の EGCg によって正常の胸腺細胞も細胞死を起こすのかどうかを調べた。EGCg 濃度 $2.5 \mu\text{g/ml}$ で、well あたりの胸腺細胞が 4000 個となるように 96-well プレートに分注して、4, 8, または 24 時間培養した。各培養時間経過後、各 well に含まれる胸腺細胞をトリパンブルー溶液で染色し、顕微鏡によって生細胞数と死細胞数を区別してカウントした。結果を図 6 に示す。EGCg の添加、無添加にかかわらず、どちらの培養でも、培養時間が 4 時間、8 時間と経過すると死細胞の割合が 50 % 近くまで直線的に増加した。その後、24 時間までどちらの培養でも死細胞の割合は増加せず一定の割合に保たれた (図 6A, B)。

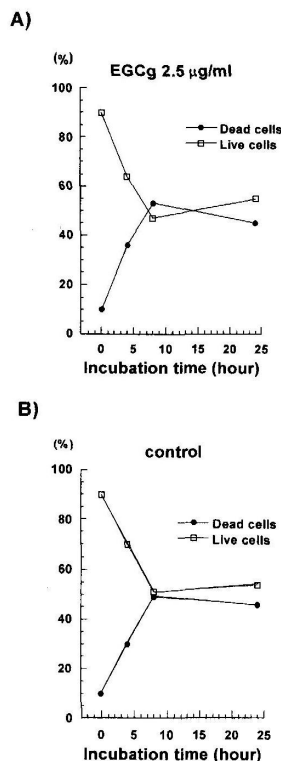


図 5 EGCg による胸腺細胞への傷害効果

各 well に分注した胸腺細胞数は 4000 個。その他は図 5 と同じ。

IV. 考 察

(1) EGCg の抗腫瘍活性について

EGCg の濃度を 2.5 µg/ml にして、96-well プレートで well あたり 200 µl の培養液に EL-4 細胞を分注して培養したが、well あたりの細胞数が 2000 個の場合と 1000 個以下の場合で結果が異なった。図 2 に示すように、細胞数が 2000 個の場合は培養 22 時間から 46 時間にかけて細胞増殖が始まったが 1000 個以下の条件では細胞増殖が起こらなかった。同じ EGCg 濃度と EL-4 細胞の密度条件で分注して、4 ~ 24 時間培養して各培養時間経過後、顕微鏡によって生細胞数と死細胞数を区別してカウントした実験結果（図 5）から判断すると、well あたり 2000 個の細胞密度条件では 10 % 以下の細胞が EGCg の失活後まで生き残り増殖すると考えられる。一部の細胞が生き残るかどうかは EGCg 濃度と EL-4 細胞の密度条件の関係によって決まると考えられる。

また、図 5 に示す実験結果は、EGCg の作用による EL-4 細胞の細胞死が培養開始の一定時間後に一斉に引き起こされるのではなく、細胞死に至るまでの時間が数時間から 24 時間まで細胞ごとに異なり、細胞死に至るまでの時間の長さに関して細胞が一様に分布していることを示す。実験に用いた EL-4 細胞集団が細胞周期に関してランダムに一様に分布しているので、図 5 の実験結果は EL-4 細胞の細胞周期の特定の段階に達するとはじめて EGCg が作用して細

胞死に至る一連の反応が開始されることを示唆する。

(2) 実験教材としての可能性について

EGCg は市販されていて比較的安く入手できる。

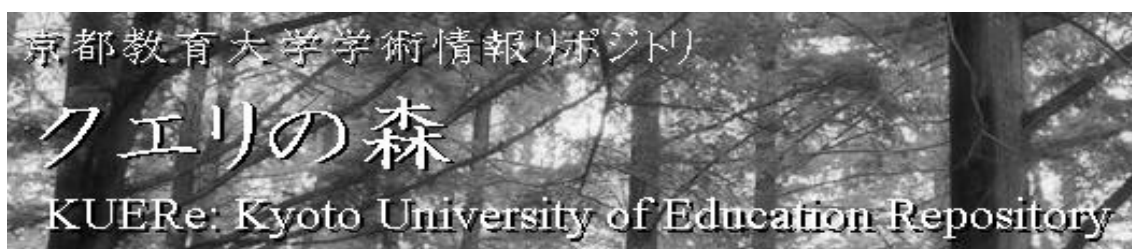
96-well プレートによる EL-4 細胞の培養は、炭酸ガス培養器で行うことが推奨されるが、1 日程度の培養であればプレートをセロハンテープで封じてサランラップなどで包めば通常の孵卵器などでも培養できると思われる。

癌細胞を低濃度の EGCg を含む培養液に入れて培養すると 24 時間以内にほとんどの細胞が死亡するので、2 日連続で同じ時間帯に実験の時間を組むことができれば効果的な実験になる。また、EGCg の殺癌細胞活性はお湯で入れた緑茶に含まれる濃度の 1/100 程度の濃度で観察されるので、日常生活で飲んでいる緑茶のほんの少量を癌細胞の培養に入れてその殺癌細胞効果を観察できる。

お茶をテーマとした総合的な学習を考える場合、「日常生活環境と健康」の面からお茶をとりあげ、緑茶の薬効を実験的に示す実験教材があれば教育効果が期待できる。ここに示した実験をそのような教材候補とするなら、上記の諸点は教材としての長所と特色としてあげることができる。

文 献

- 1) Nanjo, F., Mori, M., Goto, K. and Hara, Y. (1999) Radical scavenging activity of tea catechins and their related compound. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63: 1621-1623.
- 2) Kawase, M., Wang, R., Shiomi, T., Sijo, R. and Yagi, K. (2000) Antioxidative activity of (-)-epigallocatechin-3-(3'-O-methyl) gallate isolated from fresh tea leaf and preliminary results on its biological activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 2218-2220.
- 3) Kumagai, A., Nagaoka, Y., Obayashi, T., Terashima, Y., Tokuda, H., Hara, Y., Mukainaka, T., Nishino, H., Kuwajima, H. and Uesato, S. (2003) Tumor chemopreventive activity of 3-O-acylated (--) -epigallocatechins. *Bioorg. Med. Chem.*, 11: 5143-5148.
- 4) Kundu, J.K., Na, H.K., Chun, K.S., Kim, Y.K., Lee, S.S., Lee, O.S., Sim, Y.C. and Surh, Y.J. (2003) Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells. *J. Nutr.*, 133: 3805S-3810S.
- 5) Ikegai, H., Nakae, T., Hara, Y. and Shimamura, T. (1993) Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1147: 132-136.
- 6) Isogai, E., Isogai, H., Takeshi, K. and Nishikawa, T. (1998) Protective effect of Japanese green tea extract on gnotobiotic mice infected with *Escherichia coli* O157:H7 strain. *Microbiol. Immunol.*, 42: 125-128.



この文献は、国立情報学研究所において電子化されたものを、本学でテキスト加工したものです。

