

1. 委託事業名： 緑茶成分の動脈硬化症予防効果に関する研究

2. 委託事業者名： 委託先団体:株式会社喜作園

連携大学:国立大学法人静岡大学農学部応用生物化学科 茶山和敏准教授

3. 研究成果概要:

<緒論>

動脈硬化症は近年社会問題にもなっているメタボリックシンドロームの疾病の一つであり、その予防に寄与する緑茶成分、特に、カテキンおよびエピガロカテキンガレート(以下、EGCG と略す)とカフェインの最適配合比率を解明できれば、新たな緑茶の機能性として緑茶産業の活性化に繋がる。

そこで、緑茶の新たな機能性を解明して静岡発の新しい機能性緑茶飲料を開発することを目的として、本事業では、メタボリックシンドロームの重篤な疾病の一つである動脈硬化症を最も強く抑制するカテキンおよびEGCGとカフェインの最適配合比率を検討した。

<材料および方法>

実験動物は、動脈硬化症発症モデルマウスである C57BL/6.KOR/Stm-*ApoE*^{sh1} メスマウスを用いた。EGCG とカフェインの投与実験には、EGCG (DSM Nutritional ProductsCo.、純度 90%)とカフェイン(和光純薬工業株式会社、純度 98.5%)を使用した。以前の研究で脂肪蓄積抑制作用が報告されている 0.3%カテキンと0.05%カフェインの濃度を基本にして、0.3%カテキンに含有する濃度に準じて、0.1%EGCGと0.05%カフェインを単独あるいは組み合わせて、市販のマウス飼育用粉末飼料に添加した。

また、カテキンとカフェインの投与実験には、カテキン(ポリフェノン 70S、三井農林株式会社)とカフェイン(和光純薬工業株式会社、純度 98.5%)を用いた。前述と同様に、0.3%カテキンと 0.05%カフェインの濃度を基本にして、それぞれを2倍あるいは1/2倍にした濃度を組み合わせてマウス飼育用粉末飼料に添加し、0.6%カテキン+0.1%カフェイン、0.6%カテキン+0.05%カフェイン、0.6%カテキン+0.025%カフェイン、0.3%カテキン+0.1%カフェイン、0.3%カテキン+0.05%カフェイン、0.3%カテキン+0.025%カフェイン、0.15%カテキン+0.025%カフェインおよびコントロール群の計8群を作成した。そして、これらの各組み合わせ飼料をマウスに 12 週間自由摂取させた。

各投与実験終了時にマウスを 12 時間絶食させた後、屠殺し、血清を採取した。その後、PBS で虚血還流し、実体顕微鏡下で大動脈を摘出した。大動脈は切開し、内皮組織が表になるようにシリコン樹脂上に針で固定した後、4%パラホルムアルデヒドで固定処理を行った。固定処理した大動脈はナイルレットで脂質染色し、蛍光実体顕微鏡で観察するとともに、写真撮影して、動脈硬化部位の画像解析を行った。

また、EGCG とカフェインの投与群については、各マウスの血清中のトリグリセリド(TG)量、総コレステロール(TC)量、LDL-コレステロール(LDL-C)、HDL-コレステロール(HDL-C)の濃度および肝臓中の TG、TC およびリン脂質(PL)の濃度を測定した。

<結果および考察>

(1)EGCG とカフェインの投与実験

各投与群の体重増加量および摂食量を調べた結果、いずれも各投与群で有意な差は見られなかった(図1)。臓器重量は、カフェイン投与群と EGCG+カフェイン投与群の腹腔内脂肪重量が顕著に低下していた(図2)。

動脈硬化部位の数はいずれの投与群もコントロール群と比較して有意な差は見られなかった(図3)。しかし、動脈硬化部位の面積は、EGCG 投与群 2 と EGCG+カフェイン投与群で、コントロール群と比較して動脈硬化部位の有意な減少が見られた(図3)。

EGCG 単独および EGCG+カフェインの投与によって動脈硬化症が抑制されたことから、このメカニズムをより詳細に検討するために各投与群の血中および肝臓中の脂質量を調べた。その結果、EGCG 単独および EGCG+カフェイン投与群の血中の HDL-C 量がコントロール群と比較して有意に増加していた。しかし、TG、TC および LDL-C 量には、EGCG とカフェインの投与による変化は見られなかった。また、肝臓中の脂質量を調べた結果、総コレステロール量が EGCG 単独および EGCG+カフェインの投与によって有意に増加し、トリグリセリド(TG)量、総コレステロール(TC)量、リン脂質(PL)はコントロール群と差が見られなかった。

以上の結果で、EGCG 単独および EGCG+カフェイン投与群で動脈硬化部位の個数に差が見られなかったことから、EGCG は動脈硬化症の発症開始に対する抑制効果がないと考えられた。しかし、動脈硬化部位の面積は EGCG 単独および組み合わせ投与によって減少したことから、EGCG は動脈硬化発症後の悪性進展抑制効果を有し、この効果にカフェインは関係しないことが示唆された。また、この抑制作用には HDL-C の増加が関与している可能性が考えられた。さらに、カテキンとカフェインの組み合わせ投与による発症開始抑制は、EGCG 以外あるいは EGCG を含めた種々のカテキンとカフェインの相乗効果によるものと考えられた。

(2)カテキンとカフェインの投与実験

各投与群の体重増加量を調べた結果、すべての投与群の体重増加がコントロール群と比べて抑制されている傾向がみられ、特に、0.6%カテキン+0.1%カフェイン、0.6%カテキン+0.05%カフェインおよび 0.15%カテキン+0.025%カフェイン群の体重増加量はコントロール群に対して有意に低下していた(図4)。摂食量は、各投与群で有意な差は見られなかった(図4)。臓器重量は、すべての投与群で腹腔内脂肪重量が顕著に減少していた(図5)。

動脈硬化部位の面積は0.6%カテキン+0.1%カフェイン、0.6%カテキン+0.05%および0.15%カテキン+0.025%カフェイン投与群でコントロール群と比較して有意に減少していた(図6)。一方、動脈硬化部位の数は、0.6%カテキン+0.05%カフェインおよび 0.3%カテキン+0.05%投与群で、コントロール群と比較して有意な減少が見られた(図6)。

以上の結果から、動脈硬化症を強く抑制するカテキンとカフェインの混合比率は高肥満作用が報告されている基準のカテキンとカフェインの混合比率の組み合わせである 0.3%カテキン+0.05%カフェイン、あるいは 2 倍量のカテキンと通常のカフェイン量の混合比率である 0.6%カテキン+0.05%カフェインが最適であることが明らかになった。さらに、0.6%カテキン+0.05%カフェイン混合飼料の投与によって体重増加が抑制されていることから、本研究で得られた 2 倍のカテキンと通常のカフェインの比率で両者を混合することで、肥満と動脈硬化症の両方をより強く抑制できる可能性が示唆された。

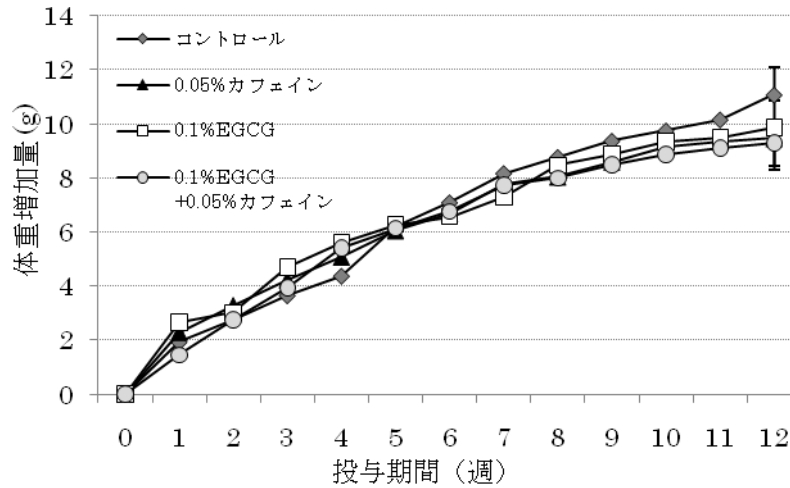


図1 マウスの体重増加に対するEGCGおよびカフェイン投与の影響

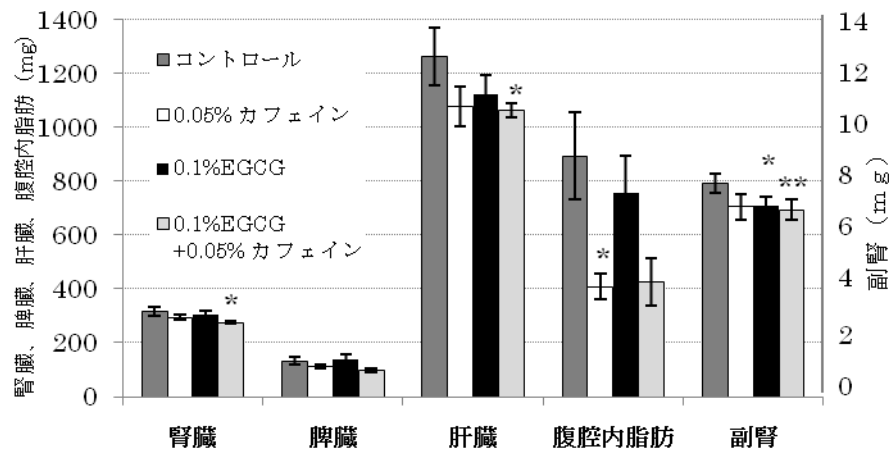


図2 各種臓器重量に対するEGCGおよびカフェイン投与の影響
*,** : コントロール群に対して有意差あり (* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)

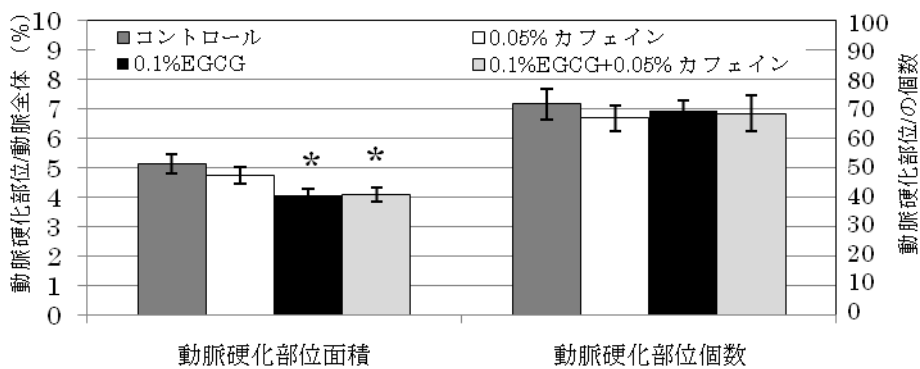


図3 マウスの動脈硬化部位の面積および個数に対するEGCGおよびカフェイン投与の影響
* : コントロール群に対して有意差あり ($P < 0.05$)

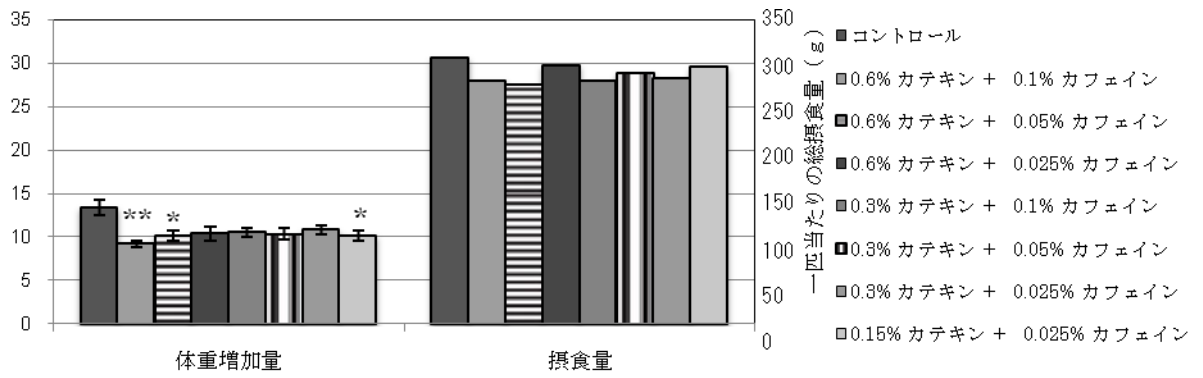


図4 マウスの体重および摂食量に対するカテキンおよびカフェイン投与の影響

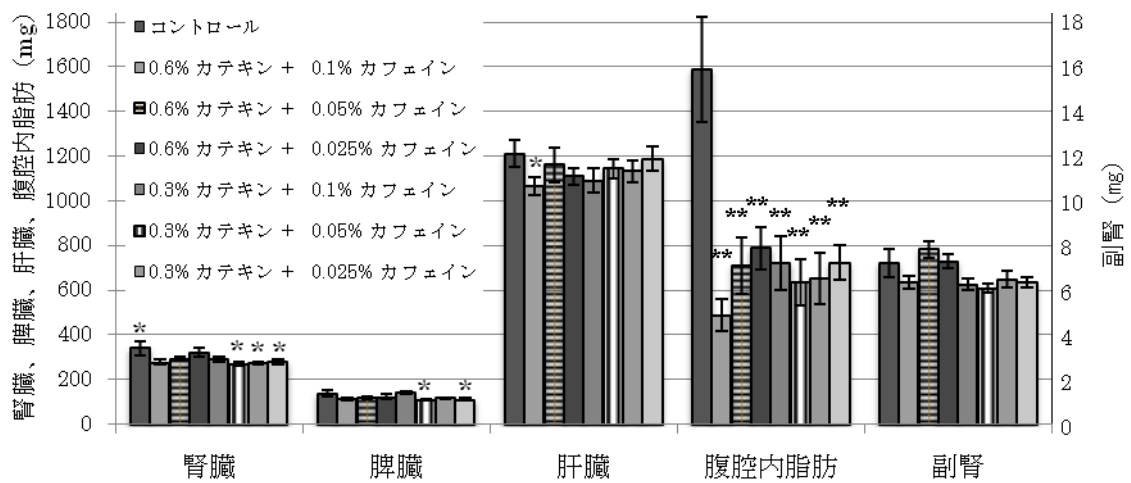


図5 マウスの各種臓器重量に対するカテキンおよびカフェイン投与の影響

*, **: コントロール群に対して有意差あり (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)

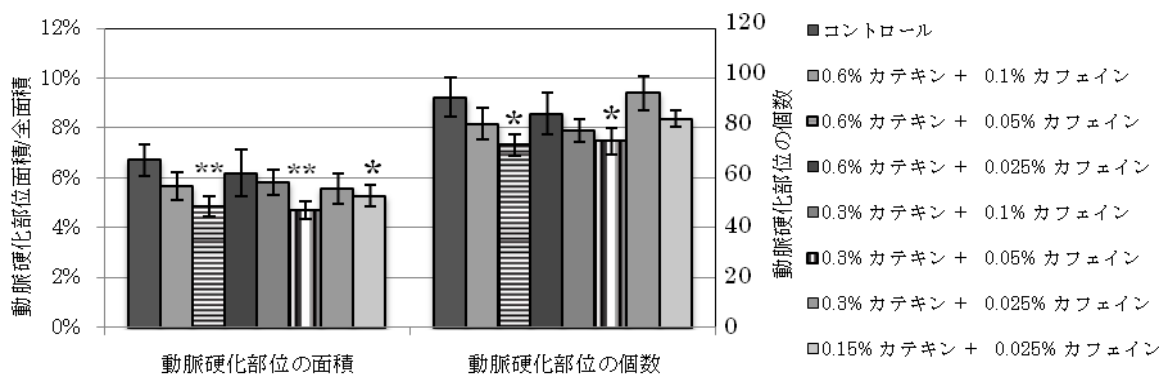


図6 マウスの動脈硬化部位の面積および個数に対するカテキンおよびカフェイン投与の影響

*, **: コントロール群に対して有意差あり (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)