

緑茶カテキンと抹茶様香気画分による  
ヒト慢性疾患に対する医生物学的研究

2014年3月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）

理工学専攻（主指導教員 菅沼雅美）

高橋 淳

## 【要旨】

日本は世界でも有数の長寿国であり、更に高齢化が進むと予測されている。このような状況において、単なる寿命の延長ではなく、健康で支障なく日常生活を送れる期間、いわゆる「健康寿命」を伸ばすことが強く望まれている。健康寿命を延長するためには、がん、脳卒中、心臓病や認知症などの慢性疾患に対する予防対策が必要である。緑茶 (*Camellia sinensis*) は日本人が日常的に飲用する飲み物であるが、がんやアルツハイマー病などのいろいろな慢性疾患に対する予防効果が認められており、健康寿命の延長に役立つ飲み物として期待されている。緑茶生産に関わる研究者として、緑茶成分の慢性疾患に対する予防効果を科学的に解明することは重要な課題である。本研究では、緑茶カテキンである (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) と緑茶香気成分の 2 つの緑茶成分を用いて、がんとアルツハイマー病を対象とし、下記の 2 つの課題で基礎研究を行った。

### 1. 緑茶カテキンによる肺がん細胞の硬化作用とがん転移抑制機構

緑茶、および、緑茶カテキン (EGCG) のがん予防効果は、基礎研究と臨床第 II 相試験で証明されているが、さらに、がん転移抑制効果を持つことが動物実験で報告されている。EGCG による転移抑制機構を明らかにすることを目的に本研究を行った。最近、がん細胞の弾性はがんの転移に関与する新しい物理学的指標として注目されている。この細胞弾性の解析と分子生物学的アプローチによって、EGCG の転移抑制機構を明らかにできると考えた。肺がんはがんの死因第一位であり、転移率が

高いので本研究では肺がん細胞に対する効果を検討した。

始めに肺がん細胞株 6 種類(腺がん A549, H322、扁平上皮がん H1703, LC-AI、大細胞がん H1299, Lu99) について細胞弾性を原子間力顕微鏡 (AFM) で測定した。細胞弾性を示すヤング率は A549 : 2.71 kPa、H322 : 3.01 kPa、H1703 : 3.18 kPa、LC-AI : 1.44 kPa、H1299 : 1.75 kPa、Lu99 : 1.66 kPa であり、ヤング率が 2.5 kPa 以上の硬い細胞と 1.8 kPa 以下の軟らかい細胞に分類できた。次に、これらの肺がん細胞の運動能を wound healing 法と transwell 法で測定し、小さいヤング率の 3 種の肺がん細胞は、大きいヤング率の 3 種の肺がん細胞に比べ、高い運動能を示すことを見出した。運動能はがん転移能を反映するので、転移能の高い細胞は小さいヤング率、(弱い弾性) を示すことが明らかとなった。次に、EGCG を転移能の高い H1299 と Lu99 細胞に処理し、細胞弾性の変化と運動能の抑制効果を検討した。おもしろいことに、50  $\mu$ M EGCG は 2 つの肺がん細胞のヤング率を約 2 倍増加 (細胞を硬化) し、これに伴って、運動能を抑制した。がん転移において、上皮・間葉転換 (EMT) が生じてがん細胞が高い運動能を獲得することが報告されている。事実、wound healing 法で移動先端にある細胞では、EMT 関連タンパク質である vimentin と Slug の発現が特異的に亢進していた。この時、EGCG 処理はこれらのタンパク質発現を抑制した。次に、作用機構を明らかにするため、細胞膜の構成を変化させる methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) を処理し、同様な効果が得られるか検討した。M $\beta$ CD (10 mM) の処理は細胞を硬化し、wound healing 法における移動先端の細胞での EMT 関連タンパク質の発現と運動能を抑制した。これらの結果から、EGCG が細胞膜を硬く変化させ、その結果シ

グナル伝達を抑制して EMT 関連タンパク質の発現を抑制することにより、運動能を抑制することが明らかとなった。

## 2. 抹茶様香気画分による線虫に対するヒト型アミロイド $\beta_{42}$ 毒性の抑制

アルツハイマー病 (AD) の患者は、日本ではおよそ 200 万人いると推定されており、AD の予防や進行遅延のための新しい方法の開発は緊急の課題である。AD はアミロイド  $\beta$  ペプチド ( $A\beta_{42}$ ) が脳に蓄積し、神経細胞に対して毒性を示し発症すると理解されている。最近、緑茶カテキンが  $A\beta_{42}$  の毒性を抑制することが報告され、現在、ドイツでは緑茶カテキンによるアルツハイマー病の臨床介入試験が行われている。

一方、緑茶カテキン以外の機能性成分として緑茶香気成分が注目されている。これまで緑茶香気成分分析は行われているが、その機能性は明らかではない。本研究では、緑茶特有の香気を示す「抹茶様香気画分」を長谷川准教授らとの共同研究で分画し、ヒト型  $A\beta_{42}$  遺伝子を導入した温度感受性線虫 CL4176 を用い、 $A\beta_{42}$  毒性の抑制効果を検討した。香気画分は次のような手順で得た。茶業研究所で生産した茶葉を hexane で抽出した「ヘキササン抽出物」を得て、更にクーゲルローア蒸留によって「焙じ香気画分」と「抹茶様香気画分」に分画し、シリカゲルカラムで「抹茶様香気画分」を更に分画したフラクションとして得た。 $A\beta_{42}$  の毒性抑制は線虫のパラリシス誘導の抑制と寿命期間の延長で評価した。パラリシスは CL4176 の 3 齢幼虫を非許容温度  $25^{\circ}\text{C}$  に移した後 20 時間後から始まり 28 時間後にはほぼ 100% の線虫で認められる。100  $\mu\text{g/ml}$  の「抹茶様香気画分」は有意にパラリシスの発生を遅延し、発生率を抑

制した。更にシリカゲルカラム精製により得られた抹茶様香気を有するフラクション 10 が特異的にパラリシスを抑制した。次に、CL4176 の young adult を 25℃に移すとパラリシスは生じず、寿命が短縮される。この系で検討した結果、「抹茶様香気画分」のみが、有意な寿命延長効果を示した。

AB<sub>42</sub> 毒性は、AB<sub>42</sub> の凝集によって生じる酸化ストレスが関与することが報告されているので抗酸化能を β - carotene 退色法で検討した。「抹茶様香気画分」が他の画分に比べて強い抗酸化能を示し、AB<sub>42</sub> 毒性の抑制活性と良く一致した。

緑茶特有の香気成分として「抹茶様香気画分」を分画し、これに AB<sub>42</sub> 毒性を抑制する活性があることを始めて見出した。

以上の結果は、緑茶ががんやアルツハイマー病の進展を予防して健康寿命を伸ばす効果的な飲み物であることを支持するものである。

## 【目次】

【要旨】	2
【目次】	6
【序論】	9
第一章 緑茶カテキンによる肺がん細胞の硬化作用と転移抑制機構	14
【緒言】	15
【材料と方法】	18
<細胞>	18
<細胞培養液>	18
<培養条件>	18
<試薬>	18
<方法>	19
Wound healing 法	19
Transwell 法	19
原子間力顕微鏡 (AFM) による細胞弾性測定	20
免疫細胞染色	20
ウエスタンブロット解析	21
Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci) /H1299	
細胞の樹立	22
統計解析	22
【結果】	23
1. 肺がん細胞の細胞弾性と運動能との関連	23

2. EGCG による肺がん細胞の運動能抑制	24
3. EGCG による細胞弾性の硬化作用	24
4. 細胞周期と細胞弾性との関連性	25
5. EGCG による EMT 関連タンパク質の発現抑制	26
6. M8CD による細胞弾性の硬化作用および運動能と EMT 関連タンパク質発現の抑制	27
【考察】	28

第二章 抹茶様香気画分による線虫に対するヒト型アミロイド $\beta_{42}$ 毒性の抑制	31
【緒言】	32
【材料と方法】	35
<線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> >	35
<試薬>	35
<飼育および同調>	35
<方法>	36
緑茶香気成分群の抽出および分画	36
抹茶様香気画分の還元	37
CL4176 におけるヒト型アミロイド $\beta_{42}$ ( $A\beta_{42}$ ) 遺伝子の発現解析	38
化学走性測定	40
パラリシス誘導による $A\beta_{42}$ 毒性試験	41
寿命測定による $A\beta_{42}$ 毒性試験	41
$\beta$ -carotene 退色法による抗酸化能の評価	42
高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるカテキン類および caffeine	

の分析	42
ガスクロマトグラフィー - マススペクトロメトリー (GC-MS) およびガ スクロマトグラフィー - オルファクトメーター (GC-O) 分析による香 気成分の分析	43
核磁気共鳴装置 (NMR) による分析	44
ウエスタンブロットによる AB <sub>42</sub> 凝集解析	44
統計解析	44
<b>【結果】</b>	45
1. 緑茶香气成分群の抽出および分画	45
2. 香气画分による線虫 N2 の化学走性	45
3. CL4176 の AB <sub>42</sub> 発現によるパラリシスの誘導と平均寿命の短縮	45
4. ヘキサン抽出物と抹茶様香气画分による AB <sub>42</sub> 毒性に起因するパラリ シス誘導の抑制	46
5. 抹茶様香气画分による AB <sub>42</sub> 毒性に起因する寿命短縮の抑制	48
6. 香气画分の抗酸化能の比較	48
7. 抹茶様香气画分による AB <sub>42</sub> 凝集抑制	49
8. 抹茶様香气画分とフラクション 10 の含有成分分析	50
<b>【考察】</b>	52
<b>【総括】</b>	55
<b>【謝辞】</b>	56
<b>【参考文献】</b>	58
<b>【図表】</b>	69



## 【序論】

日本人の平均寿命は、2010年の調査で男性が79.55才、女性が86.30才であり、10年前に比較すると男性は1.83才、女性では1.70才伸び、世界有数の長寿国となっている[1]。しかし、健康で支障なく日常生活を送れる期間、いわゆる「健康寿命」は、男性：70.42才、女性：73.62才であり、平均寿命と健康寿命との差、つまり「日常生活に制限のある期間」は男性で9.13年、女性では12.68年にも及んでいる。しかも、10年間で延長した平均寿命は「日常生活に制限のある期間」の延長によるところが大きいのが実際である[2]。今後、更に高齢化が進むことが予想される日本において、単に寿命を延長するだけではなく、生活の質を向上して「健康寿命」を延ばすことが強く望まれている。健康寿命を延長するためには、がん、脳卒中、心臓病や認知症などの慢性疾患に対する予防対策が必要である。

緑茶はがん、脳血管疾患やアルツハイマー病などのいろいろな慢性疾患に対する予防効果をもち、健康寿命の延長に貢献できる飲料として期待されている。日本における緑茶飲用の歴史は長く、鎌倉時代、栄西禅師が喫茶養生記に「茶は養生の仙薬なり」と記したように薬用として飲用されていた。その後、江戸時代になって現代のような煎茶が確立されて、日本人は緑茶を日常の飲み物として親しんできた。1987年、藤木らが、緑茶カテキンである(-)-epigallocatechin gallate (EGCG) によるマウス皮膚発がんプロモーションの抑制結果を発表し、緑茶の薬効が再び注目されるようになった[3]。そのため、緑茶カテキンによるがん予防効果の研究が最も進んでいる。

緑茶に含まれる成分は水溶性成分群と脂溶性成分群に分けられるが、緑茶カテキンは水溶性成分であり、他の成分である *caffeine*、*L-theanine* などと共に緑茶の味にかかわっている。緑茶カテキンは、主に 4 種類のカテキン、(-)-*epicatechin* (EC)、(-)-*epigallocatechin* (EGC)、(-)-*epicatechin gallate* (ECG)、(-)-*epigallocatechin gallate* (EGCG) が存在し、特に EGCG は緑茶に最も多く含まれるカテキンで煎茶葉中に約 15% 含まれる[4]。緑茶を飲用すると、血清中の EGCG の量は 2~3 時間後にピークに達し、その後すみやかに代謝されるが、数時間後でも体内に残存している[5,6]。また、<sup>3</sup>H-EGCG を用いたマウスの体内分布の研究から、経口摂取した EGCG は血液中に吸収され、全身の標的臓器に到達するだけでなく、6 時間間隔の 2 回投与によって <sup>3</sup>H の臓器分布を 4 倍以上亢進した。すなわち、緑茶を頻回飲用することは、血清中の EGCG 量を高いレベルで維持することに役立つ[7]。EGC および ECG も EGCG とほぼ同等の活性をもつが、EC は活性がない。しかし、不活性型の EC は EGCG の細胞内への取り込みを促進して、活性を増強することから[8]、緑茶そのものの飲用が慢性疾患の予防に効果的であると考えられる。

埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所、中地、今井らは、1986 年から埼玉県の地域住民 8,552 名を対象とした前向きコホート研究を開始し、10 年間の追跡調査の結果、1 日に緑茶を 10 杯以上飲用するヒトは 3 杯以下のヒトに比べ、がん罹患年齢が男性で 3.2 才、女性で 6.2 才遅れること、すなわち、緑茶の多量飲用がヒトのがんを予防することを報告した[9]。更に、緑茶の多量飲用は、心疾患や肝臓疾患の予防効果があり、寿命を男性で 3.8 才、女性で 6.0 才延長することを見出している[9]。

この研究結果を基に、埼玉県茶業試験場（現農林総合研究センター茶業研究所）の我々のグループは埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所と共に、埼玉県の新規事業「緑茶によるがん予防」を行った。まず、1日10杯の緑茶を「がん予防有効量」と定め、誰もが容易に「がん予防有効量」を摂取できるよう低カフェイン緑茶エキス粒（G.T.E）を開発した[10]。このG.T.Eを用いて、岐阜大学医学部と共同で大腸ポリープ再発予防の臨床第Ⅱ相介入試験を行った。大腸ポリープを内視鏡切除した患者を、日常の緑茶飲用に加えてG.T.Eを摂取するG.T.E群と、日常の緑茶飲用のみのコントロール群にわけ、1年間観察した。その結果、G.T.E群では、再発率が31%から15%に半減し、緑茶の多量飲用が大腸ポリープの再発を予防することが証明された[11]。更に、イタリアでは、緑茶カテキンカプセルの摂取が前立腺がんの前がん病変である高悪性度前立腺上皮内腫瘍の発がんを30.0%から3.0%に抑制することが報告された[12]。現在では、緑茶のがん予防効果は日本だけでなく、欧米でも認められている。

更に、緑茶カテキンはがん転移を抑制する効果をもつ。1992年谷口らは、EGCGを含む飲料水の投与がマウスの足に移植したマウス悪性黒色腫 B16-BL6 細胞の肺への自然転移を明らかに抑制することを報告した[13]。がん死亡の9割以上はがん転移によるため、緑茶カテキンのがん転移抑制機構を解明し、がん転移予防効果を検証することは重要な課題である。緑茶カテキンの多面的な作用機構を解明するためには、新しい視点からの研究が必要であると考え、新たな物理学的な指標である細胞弾性に注目した。最近、「細胞弾性」が、がん細胞の転移能を反映し、EGCGが転移能の高いB16-F10細胞の細胞弾性を約2倍大きく変化さ

せて、運動能を抑制することを見出した[14]。本研究の第一章では、この研究を更に発展させ、種々のヒト肺がん細胞株を用いて細胞弾性と転移能との関連性、更に、緑茶カテキン EGCG の転移抑制機構を検討した。

最近、アルツハイマー病に対する緑茶カテキン EGCG の予防効果が、ヨーロッパで注目されている。EGCG はアルツハイマー病の原因であるアミロイド B (A $\beta$ ) ペプチドの凝集蓄積を毒性の少ない凝集体に変化させて、A $\beta$  の毒性を抑制することが報告された[15]。この結果を基に、ドイツでは EGCG による臨床介入試験が開始されている[16]。

近年、香気成分については、ローズマリーやラベンダーなどハーブの精油に認知症を改善するアロマセラピー効果が認められている[17]。緑茶の香気成分に同様な活性があるのではないかと考えた。緑茶の香気成分は、主に緑茶の脂溶性成分に含まれ、indole、geraniol、coumarin など、600 種類以上の成分が報告されており[18,19]、今なお精力的に香気成分の探索が行われている。これまで、緑茶の香気成分の生理活性については抗酸化活性[20]以外、ヒト慢性疾患の予防に有用な活性については報告されていない。第二章では、緑茶の香気成分による認知症の一つであるアルツハイマー病に対する予防効果を検討した。この研究に当たって、香気成分が微量であるため、微量で試験が行えるアルツハイマー病のモデル生物としてヒト型 A $\beta$ <sub>42</sub> を遺伝子導入した線虫を用いた。

以上、第一章では、①ヒト肺がん細胞株においても、転移能が高い肺がん細胞ほど軟らかい細胞弾性を示し、細胞弾性は転移能をよく反映すること、②EGCG は肺大細胞がんの細胞弾性を硬くして、上皮・間葉転換 (EMT) 誘導のシグナル伝達を抑制して、運動能を抑制することを明らかにした。第二章では、緑茶香気成分である抹茶様香気画分がヒト型

アミロイド A $\beta$ <sub>42</sub> による線虫のパラリシスと寿命の短縮を抑制することを見出した。この結果は、緑茶の香気成分がアルツハイマー病の予防に役立つ可能性を示すものである。

## 【第一章】

緑茶カテキンによる肺がん細胞の硬化作用と転移抑制機構

## 【緒言】

がん転移のプロセスは複雑で、時には肺がんの脳転移や前立腺がんの骨転移などが原発がんより早くに発見されることがあるなど、がん転移の予防はがん研究において重要な課題である。そのため、がんの転移能を判断できる新しい指標の開発が求められている。最近のナノテクノロジーの進歩によって、原子間力顕微鏡（AFM）をはじめ磁気ピンセット法やマイクロピペット吸引法等が開発され[21,22]、物理学的特性である「細胞弾性」の測定が可能となった。AFMは1986年、Binnigによって開発されたプローブ顕微鏡であり培養液中の生きた細胞の弾性を定量的に測定できる特長をもつ。Gimzewskyらのグループは、肺がん、乳がんあるいは膵臓がん患者の胸水や腹水に含まれる転移性のがん細胞と正常な中皮細胞の「細胞弾性」をAFMで測定し、転移性のがん細胞は正常細胞に比べ明らかに小さい「細胞弾性」を持つことを報告した[23]。この結果は、臨床検体でAFMによる「細胞弾性」測定が可能であり、がんの診断に役立つ可能性を示した。「細胞弾性」は、Paを単位とするヤング率で表され、小さいヤング率は軟らかい弾性を、大きなヤング率は硬い弾性を示す[14,23,24]。

「細胞弾性」ががん転移能の指標となるか検討するため、我々はがん転移において重要な細胞の表現型である運動能と「細胞弾性」との関連を検討した。運動能はwound healing法とtranswell法の2つの測定法を用い、肺腺がん細胞株(A549, H322)、肺扁平上皮がん細胞株(H1703, LC-AI)と肺大細胞がん細胞株(H1299, Lu99)の6種について測定した結果、高い運動能を持つ肺がん細胞は低い運動能の肺がん細胞に比べ、より小さいヤング率（すなわち軟らかい細胞弾性）を持つことを見出し

た。この結果は、「細胞弾性」ががん細胞の運動能、更には転移能を反映することを示唆した。

一方、緑茶カテキン EGCG は、がん細胞の増殖抑制やアポトーシスを誘導するだけではなくがん転移を抑制する[25,26]。マウス悪性黒色腫 B16-BL6 細胞を足に移植した C57BL/6 マウスに、0.05%あるいは 0.1% EGCG を含む飲料水を与えると、飲料水だけのマウスに比べて肺へのがん転移を有意に抑制した[13]。我々は、EGCG 処理が転移能の高い B16-F10 細胞の弾性を約 2 倍大きくし、細胞を硬く変化させることを見出した[14]。がん患者の胸水に含まれる転移性肺がん細胞や乳がん細胞の弾性を緑茶抽出物が硬化させることが Gimzewski らによって報告されており[27]、我々の結果とよく一致している。そこで、我々は、EGCG による細胞弾性の硬化作用と転移抑制の作用機構について、転移性が高く軟らかい細胞弾性を持つヒト肺がん細胞株 H1299 と Lu99 を用いて詳細に検討した。

がん転移の過程において、がん細胞は上皮・間葉転換 (EMT) を誘導して、高い運動能や浸潤能を獲得すると理解されている[28,29]。EMT では、上皮性のマーカータンパク質である E-cadherin の発現が減少し、間葉系のマーカータンパク質である N-cadherin、fibronectin や vimentin、および EMT 関連転写因子 Slug などの発現が亢進される[30]。EMT は、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) や tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの生体内因子だけでなく、腫瘍周辺の微小環境における細胞間接着の崩壊や細胞外マトリックス (ECM) の効果など物理的刺激によっても誘導される[28,29,31,32]。例えば、wound healing で移動している先端の細胞では EMT が生じていることが報告されてい



る。我々は H1299 細胞と Lu99 細胞の運動能を wound healing 法で測定する際、移動先端の細胞では特異的に vimentin および Slug の発現が亢進し、EMT が生じていることを確認した。この系において、EGCG を処理すると vimentin と Slug の発現を抑制して運動能を抑制することを見出した。この結果は、EGCG の細胞硬化作用が、EMT 誘導のシグナル伝達を抑制して運動能を抑制したと考えられる。次に EGCG は細胞膜の構造変化を誘導して細胞弾性を硬化し、EMT を抑制すると仮説を立て、細胞膜からコレステロールを除去する methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MBCD) が、EGCG と同じ作用を誘導するか検討した。本論文では、EGCG による細胞弾性硬化作用と転移抑制機構について討論する。

## 【材料と方法】

### <細胞>

ヒト肺腺がん細胞株 A549 および H322 は、American Type Culture Collection (USA) から購入し、RPMI で維持した。

ヒト肺扁平上皮がん細胞株 H1703 および LC-AI は、American Type Culture Collection (USA) から購入し、RPMI で維持した。

ヒト肺大細胞がん細胞株 H1299 は、佐賀大学医学部、荒金尚子先生より供与いただき、RPMI で維持した。

ヒト肺大細胞がん細胞株 Lu99 は、理研バイオリソースセンターから購入し、RPMI で維持した。

### <細胞培養液>

#### **RPMI**

RPMI1640 (ニッスイ)	500 ml
10% FBS (JRH Bioscience)	55 ml
5,000 units/ml penicillin and streptomycin (GIBCO BRL)	5.7 ml
200 mM L-glutamine (ICN Biomedical Inc.)	5.1 ml
7.5% sodium bicarbonate (GIBCO BRL)	9 ml

### <培養条件>

CO<sub>2</sub> インキュベーター CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37℃

### <試薬>

EGCG は茶葉から精製した[33]。EC および MβCD は和光純薬工業 (Japan) から購入した。抗-vimentin、抗-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体は Santa Cruz Biotechnology (USA) から、抗-N-cadherin および抗-Slug 抗体は Cell Signaling Technology (USA) から購入した。

<方法>

#### ・ Wound healing 法

Wound healing 法は Liang らの方法に従って行った[34]。6種の肺がん細胞 (A549 :  $0.5 \times 10^6$  cells、H322 :  $0.6 \times 10^6$  cells、H1703 :  $0.5 \times 10^6$  cells、LC-AI :  $0.4 \times 10^6$  cells、H1299 :  $0.5 \times 10^6$  cells、Lu99 :  $1.2 \times 10^6$  cells) をそれぞれ 3.5 cm dish に播種した 2 日後、コンフルエントになった細胞に滅菌した 200  $\mu$ l 用ピペットチップで幅約 90  $\mu$ m の傷を十字につけ、PBS で洗浄した後、EGCG または MβCD を含む RPMI 無血清培地に交換した。EGCG または MβCD 処理前 (0 時間) と処理 24 時間後の傷を位相差顕微鏡 (ECLIPSE Ti-S, NIKON, Japan) で観察・撮影し、NIKON Digital Sight で傷幅を計測した。0 時間と 24 時間の傷幅の差を細胞の運動能 ( $\mu$ m/24 h) とした。EGCG または MβCD 処理による運動能の抑制は、無処理の細胞の運動能を 100% として % of control で表した。

#### ・ Transwell 法

Transwell cell culture chamber (Becton-Dickinson, USA) を用いて測定した。ポアサイズが 8  $\mu$ m の内層ウェルに 0.1% BSA 含有無血清培

地に懸濁した肺がん細胞  $1 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ l を加え、外層ウェルに 5  $\mu$ g/ml の fibronectin を含んだ無血清培地を加え、37°C で 24 時間インキュベートした。ポアを通り抜けて内層ウェルフィルターの裏側に移動した細胞を 0.1% トリパンブルー溶液で染色し、200 倍で顕微鏡観察と撮影を行った。異なる 3 視野の細胞数の合計を運動能として比較した。

#### ・原子間力顕微鏡 (AFM) による細胞弾性測定

6 種の肺がん細胞 (A549 :  $2.0 \times 10^5$  cells、H322 :  $2.5 \times 10^5$  cells、H1703 :  $2.5 \times 10^5$  cells、LC-AI :  $1.0 \times 10^5$  cells、H1299 :  $2.0 \times 10^5$  cells、Lu99 :  $3.0 \times 10^5$  cells) および H1299/Fucci 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells) をそれぞれ 6 cm dish に播種し 2 日間培養した。EGCG または M $\beta$ CD を含む RPMI 無血清培地に交換して 4 時間培養し、AFM (MFP-3D-Bio-J AFM、Asylum Research, USA) で細胞弾性を測定した。測定する細胞数は、原則 25 ヶ以上とした。AFM 測定は、silicon nitride のカンチレバー (TR400PSA, Olympus, Japan、バネ定数 2 nN/nm) を用い、細胞の核上の 3  $\mu$ m 角を 4 x 4 の 16 点でフォースカーブを測定した。カンチレバーのバネ定数は thermal fluctuation method で求め[35]、カンチレバーの半角度は 17.5°、ポアソン比は 0.5 とし[36]、ヘルツモデルによってヤング率 *E*-value を求めた。ヤング率の平均値は、ヤング率のヒストグラムを対数正規分布あるいはガウス関数でフィッティングして求めた。

#### ・免疫細胞染色

コラーゲンコートのカバーガラス上に H1299 あるいは Lu99 細胞を播

種し、上記と同様に wound healing 法による測定を行った。その後、固定液（4% paraformaldehyde / 2% Triton X-100 を含む PBS）で 10 分間固定した後、室温で 20 分間 Image-it Fix signal (Invitrogen, USA) でブロッキングした。Vimentin は、1 次抗体として抗-vimentin 抗体、2 次抗体として Alexa-Fluor594-conjugated 抗-mouse IgG (Invitrogen, USA) を用いて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000, KEYENCE, Japan) で観察した [14,37]。同様に Slug は、抗-slug 抗体と Alexa-Fluor488-conjugated 抗-rabbit IgG (Invitrogen, USA) 抗体を用い染色した [37]。

#### ・ウエスタンブロット解析

H1299 あるいは Lu99 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/10 cm dish で播種した翌日、各濃度の EGCG で処理し、24 時間後にタンパク質を抽出した。タンパク質は 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1% Triton X-100、0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、1% sodium deoxycholate、5  $\mu$ g/ml leupeptin、10  $\mu$ g/ml aprotinin および 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride を含んだ strong lysis buffer で抽出した [38]。タンパク質量 10  $\mu$ g を 12% polyacrylamide ゲルに apply し、125 V 定電圧条件で泳動した後、ニトロセルロース膜に 30 V、200 mA で 1 時間ブロッキングした。ニトロセルロース膜は 3% スキムミルク / TBS-T でブロッキングした後、抗-vimentin、抗-slug、抗-N-cadherin あるいは抗-GAPDH 抗体、続いて 2 次抗体 (horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat 抗-mouse IgG 抗体) (Invitrogen, USA) で反応させた後、enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham

Bioscience, UK) を用いて検出した。

#### ・Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci)/H1299

##### 細胞の樹立

pFucci-G<sub>1</sub> orange と pFucci-S/G<sub>2</sub>/M Green (N+C)-Hyg の expression vector は MBL ライフサイエンス社 (Japan) から購入した。H1299 細胞 2.5 x 10<sup>5</sup> cells を 6 cm dish に播種し、翌日、Effectene Transfection Reagent (QIAGEN, Japan) を用いて、2 つの expression vector を導入した。2 日後、段階希釈によって 96-well plate に 1 cell/well となるように細胞を播種し、G418 (300 µg/ml) と hygromycin (50 µg/ml) を含む RPMI で培養して、2 つの vector が共導入された細胞 (pFucci/H1299) をクローニングした。Fucci-G<sub>1</sub> orange と Fucci-S/G<sub>2</sub>/M Green の発現は AFM に付属する蛍光顕微鏡で観察した。

##### ・統計解析

統計処理は、Wilcoxon-Mann-Whitney のノンパラメトリック解析および *Student's t* 検定を用い  $p < 0.05$  を有意とした。

## 【結果】

### 1. 肺がん細胞の細胞弾性と運動能との関連

腺がん細胞株 A549、H322、扁平上皮がん細胞株 H1703、LC-AI および大細胞がん細胞株 H1299、Lu99 の細胞弾性を AFM で測定し、得られたヤング率のヒストグラムを図 1 に示す。A549、H322 および H1703 細胞は幅広い分布を示し、ヤング率の平均値は、A549 細胞： $2.71 \pm 0.14$  kPa、H322 細胞： $3.01 \pm 0.31$  kPa、H1703 細胞： $3.18 \pm 0.38$  kPa であった。これに対し、LC-AI、H1299 および Lu99 細胞は狭いシャープな分布を示し、それぞれの細胞のヤング率の平均値は、LC-AI： $1.44 \pm 0.06$  kPa、H1299： $1.75 \pm 0.04$  kPa、Lu99： $1.66 \pm 0.08$  kPa であった。すなわち、ヤング率が 2.5 kPa 以上の硬い細胞と 1.8 kPa 以下の軟らかい細胞に分類できることがわかった（図 1、表 1）。

次に、6 種の肺がん細胞の運動能を wound healing 法と transwell 法で測定した（図 2）。Wound healing 法で測定した運動能は、A549： $10.8 \pm 3.1$   $\mu\text{m}$ 、H322： $9.5 \pm 5.3$   $\mu\text{m}$ 、H1703： $13.0 \pm 2.8$   $\mu\text{m}$  と 10  $\mu\text{m}$  程度であったのに対し、LC-AI、H1299 および Lu99 はそれぞれ  $43.2 \pm 8.8$   $\mu\text{m}$ 、 $33.0 \pm 2.1$   $\mu\text{m}$ 、 $37.8 \pm 8.4$   $\mu\text{m}$  であった。すなわち、軟らかい細胞弾性を持つ LC-AI、H1299 および Lu99 は、硬い細胞弾性を示した 3 種の肺がん細胞に比べ約 3-4 倍高い運動能を示した（図 2、表 1）。Transwell 法において、fibronectin を遊走因子として 24 時間に移動した細胞数は、A549： $83.5 \pm 24.3$  cells、H322： $10.5 \pm 4.4$  cells、H1703： $85.3 \pm 25.3$  cells と 100 個以下であったのに対し、LC-AI： $312.8 \pm 111.6$  cells、H1299： $229.6 \pm 70.9$  cells、Lu99： $257.9 \pm 71.2$  cells であった（表 1）。

Wound healing 法の結果と一致し、LC-AI、H1299 および Lu99 細胞は transwell 法においても A549、H322 および H1703 細胞の約 3 倍の運動能を示した。

肺大細胞がんは臨床において最も転移率が高い肺がんであるが、2 つの大細胞がん細胞株は共に高い運動能を示し、小さいヤング率、すなわち軟らかい細胞弾性を示した。

これらの結果から、小さいヤング率、すなわち軟らかい細胞弾性は、高い運動能、更には高い転移能を反映することが明らかとなった。

## 2. EGCG による肺がん細胞の運動能抑制

運動能が高く、ヤング率が小さい大細胞がん細胞株 H1299 細胞および Lu99 細胞に対する EGCG の運動能抑制効果を wound healing 法で検討した。EGCG は H1299 細胞と Lu99 細胞の運動能を濃度依存性に抑制した (図 3A)。未処理の H1299 細胞は  $32.5 \pm 6.0 \mu\text{m}$  移動したが、これを 100%として、EGCG の抑制を比較した (図 3B)。50 と 100  $\mu\text{M}$  の EGCG は 67.5 と 43.7%に運動能を抑制した ( $p < 0.01$ )。同様に、Lu99 細胞においても 10、50、100  $\mu\text{M}$  の EGCG は、 $31.4 \pm 1.9 \mu\text{m}$  (100%) を 81.3、71.7、31.5%に抑制した ( $p < 0.01$ )。一方、不活性型の 50  $\mu\text{M}$  EC は H1299 細胞で 113.0%、Lu99 細胞で 98.4%となり運動能を抑制しなかった (図 3B)。この結果は、EGCG が肺大細胞がん細胞の転移を抑制する可能性を示す。

## 3. EGCG による細胞弾性の硬化作用

EGCG 処理 4 時間後に H1299 細胞および Lu99 細胞の細胞弾性を



AFM で測定した。H1299 の細胞弾性（ヤング率： $1.24 \pm 0.05$  kPa）は、 $5 \mu\text{M}$  EGCG 処理で  $2.30 \pm 0.07$  kPa、 $50 \mu\text{M}$  EGCG 処理で  $2.25 \pm 0.11$  kPa となり、無処理の細胞弾性と比較して約 1.8 倍増加した。一方、Lu99 細胞においてもヤング率は  $1.29 \pm 0.11$  kPa から  $5 \mu\text{M}$  EGCG： $1.63 \pm 0.08$  kPa、 $50 \mu\text{M}$ ： $2.28 \pm 0.09$  kPa と濃度依存的に増加し、 $50 \mu\text{M}$  EGCG では無処理の約 1.8 倍となった（図 4）。すなわち、EGCG は 2 種のヒト肺大細胞がんの弾性を約 2 倍硬く変化させた。EGCG は細胞硬化作用によって運動能を抑制したと考えられる。

#### 4. 細胞周期と細胞弾性との関連性

細胞弾性のヒストグラム（図 1）が示すように、1 つの細胞株においてもヤング率の異なる細胞が混在している。この際、細胞周期を同調して測定しておらず、また、細胞周期による細胞弾性の違いについては全く報告がない。更に、EGCG は細胞周期を  $G_1$  期あるいは  $G_2/M$  期で休止させる作用が報告されているので[25]、EGCG による硬化作用が、その二次的な影響である可能性も考えられた。そこで、細胞周期と細胞弾性の関連性を fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) を導入した Fucci/H1299 細胞を用いて検討した。図 5 に示すように、赤色に呈色した細胞は  $G_1$  期、黄色に呈色した細胞は  $G_1 \rightarrow S$  期、緑色に呈色した細胞は  $S/G_2$  期、無色の細胞は  $M \rightarrow G_1$  期として分類し、それぞれの細胞弾性を比較した。細胞弾性は、 $G_1$  期： $1.8 \pm 0.09$  kPa、 $G_1 \rightarrow S$  期： $1.4 \pm 0.06$  kPa、 $S/G_2$  期： $1.3 \pm 0.05$  kPa、 $M \rightarrow G_1$  期： $1.6 \pm 0.27$  kPa と細胞周期に伴い、細胞弾性が変化することを見出した（図 5）。しかし、その変動は  $G_1$  期と  $S/G_2$  期との間で 1.4 倍程度であり、しかも、

同じ細胞周期にある細胞においても図 5 のヒストグラムが示すようにヤング率が異なる細胞が混在していた。この結果から、細胞の弾性はがん細胞の運動能や転移能を反映し、がん細胞株における多様性を示していると考えられる。更に、EGCG 処理は細胞弾性を 1.24 kPa から 2.25 kPa と約 2 倍増加し、細胞周期 G<sub>1</sub> 期の 1.8 kPa に比べ有意に大きい値を示した。また、EGCG 処理は、H1299 細胞と Lu99 細胞において、G<sub>1</sub> 休止を誘導しなかった。したがって、EGCG の細胞硬化作用は細胞周期の休止作用によるものではないと結論した。

## 5. EGCG による EMT 関連タンパク質の発現抑制

Wound healing の際、傷先端の細胞では EMT が生じて高い運動能を獲得することが報告されている [29]。H1299 細胞に傷をつけた 24 時間後、免疫染色法により EMT 関連タンパク質である vimentin と Slug の発現が傷先端の細胞で亢進していることを確認した。すなわち、傷先端の移動している細胞では、移動していない内部の細胞に比べ、vimentin および Slug の蛍光強度は約 2 倍強くなった (図 6A、B)。50  $\mu$ M EGCG の処理によって移動を抑制された細胞では、傷先端の細胞における vimentin および Slug の蛍光強度は移動していない細胞と同程度であり、EGCG は vimentin と Slug の発現亢進を明らかに抑制した (図 6A、B)。Lu99 細胞においても、H1299 細胞と同様に傷先端の細胞における vimentin と Slug の発現亢進が EGCG 処理によって抑制された (図 7A、B)。すなわち、EGCG は EMT を抑制して細胞運動を阻害したと考えられる。一方、 $1 \times 10^6$  cells/10 cm dish で播種した H1299 あるいは Lu99 に EGCG を処理しても vimentin、Slug および N-cadherin のタンパク

質の発現レベルは変化しなかった（図 8）。この結果は、傷によって誘導された EMT 関連タンパク質の発現亢進のシグナルを EGCG が抑制して、細胞の運動能を抑制したことを示唆する。

## 6. MBCD による細胞弾性の硬化作用および運動能と EMT 関連タンパク質発現の抑制

EGCG は細胞弾性を硬化し、EMT のシグナルを阻害して運動能を抑制する結果を基に、EGCG は細胞膜の構造変化を誘導して細胞弾性を硬化すると考えた。これを検討するため、cholesterol 除去により膜構造を変化させる代表的な試薬である MBCD を用いて検討した。MBCD は H1299 細胞の細胞弾性を  $1.26 \pm 0.19$  kPa から 5 mM:  $2.03 \pm 0.39$  kPa、10 mM:  $2.81 \pm 0.17$  kPa と約 2.2 倍にヤング率を増加させ、細胞弾性を硬く変化させた（図 9）。これに一致して運動能を 5 mM では 71.6%、10 mM では 44.3%に抑制した ( $p < 0.01$ )（図 10A、B）。更に、MBCD は、wound healing 法による傷先端の細胞における vimentin の発現を明らかに減少した（図 11）。結果は示していないが、Lu99 細胞においても、MBCD は同様の効果を示した。このように MBCD が、EGCG と同様の効果を示したことから、細胞弾性の硬化は膜構造変化によって誘導されることが示唆された。

## 【考察】

本研究では、肺がん細胞の細胞弾性がそれぞれの運動能をよく反映することを明らかにした。特に臨床で転移率の高い肺大細胞がんの細胞株 H1299 と Lu99 が高い運動能と小さい細胞弾性（軟らかい）を示したことから、軟らかい細胞弾性は高い転移能を反映すると考えられる。この結果は、マウス悪性黒色腫 B16 細胞から由来する転移能の異なる亜株においても、転移性の高い B16-F10 細胞が、転移性の低い B16-F1 細胞よりも軟らかい弾性を示した結果と一致した[14]。これまで、がん細胞の弾性は正常細胞に比べて軟らかい弾性を持つことは Gimzewsky らによる肺がん、乳がん、および膵臓がんの臨床検体や乳がん細胞株や膀胱がん細胞株を用いた研究から明らかにされていたが[23]、我々の結果はさらに、細胞弾性ががん細胞の転移能を反映することを示唆した。

EGCG が *in vitro* で肺がん細胞株 H1299 と Lu99 の運動能を抑制することを明らかにしたが、我々の B16-F10 細胞の運動能も濃度依存的に抑制する報告とよく一致した[14]。この際、不活性型の EC はほとんど抑制を示さなかった。これらの結果から、活性型の緑茶カテキンは、いろいろながん細胞の運動能を抑制して転移を予防すると考えられる。また、Gimzewski らは、肺がん、乳がん、卵巣がん患者から採取した転移性がん細胞と正常細胞の細胞弾性が、それぞれ  $0.41 \pm 0.18$  kPa と  $2.53 \pm 1.23$  kPa とがん細胞は正常細胞に比べ約 6 倍細胞弾性が小さいこと、がん細胞を緑茶抽出物で処理すると、がん細胞の弾性は正常細胞とほぼ同等の値となることを報告している。この際、緑茶抽出物は正常細胞の細胞弾性には影響を及ぼさなかった[27]。最近、細胞弾性が転移能をよく

反映するという結果が我々以外の研究グループからも報告されている。例えば、卵巣がん細胞株にがん抑制遺伝子である *type III TGF- $\beta$*  遺伝子を導入すると転移能が抑制されて細胞弾性が硬くなること [21]、また、乳がん細胞株で *breast cancer metastasis suppressor 1* 遺伝子の発現を阻害すると転移が抑制され、細胞弾性が硬く変化することが報告されている [39]。これらの結果は、EGCG による細胞硬化作用が一つの転移抑制機構であることを支持する。

EGCG は、がん細胞に対し、増殖抑制やアポトーシスの誘導の他に、細胞周期の休止、遺伝子発現変化による EMT の抑制、シーリング効果による膜構造変化などの多面的効果が報告されている [40,41,42]。しかし、細胞周期による細胞弾性の変化は EGCG 処理による細胞弾性の変化よりも小さく、EGCG の細胞硬化作用による運動能抑制は細胞周期とは関連性がないと考えられた。

EGCG は、損傷によって誘導された vimentin、および Slug の発現を抑制し EMT を抑制した [43]。EMT 関連タンパク質の発現レベルと細胞弾性との関連を検討すると、6 種の肺がん細胞株の中で、E-cadherin を発現していた A549, H322, H1703 細胞は、発現していなかった細胞株に比べて硬い弾性を示した。更に、ヘリコバクターピロリ菌の EMT 誘導因子である TNF- $\alpha$ -inducing protein (Tipa) の処理は胃がん細胞株の細胞弾性を軟らかく変化させた [44]。したがって、EMT の進んだがん細胞は軟らかい細胞弾性をもつと考えられる。

EGCG による細胞硬化作用について Gimzewsky らはアクチンフィラメントの再重合によると報告しているが [27]、AF488-phalloidin で EGCG 処理した H1299 細胞のアクチンフィラメントを観察したが、未

処理の細胞との違いは認められなかったため、アクチンフィラメントの重合によるものではないと考えている。我々は、EGCGの多面的効果は、「シーリング効果」によるものであると報告している[40]。EGCGのシーリング効果は、発がんプロモーターである12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) と okadaic acid のそれぞれのレセプター結合阻害、エストロゲンとエストロゲンレセプターとの結合阻害として観察された。Weinsteinらは、EGCG処理により、細胞膜の lipid raft 構造が崩壊され、EGF レセプターのシグナル伝達が阻害されることを報告している[45]。おもしろいことに、MBCDによっても同様の効果が誘導される。MBCDはU-251 MGグリオーマ細胞において、CD44のsheddingを阻害して運動能を抑制することが報告されている[46]。EGCGはMBCDとは異なり、細胞膜からcholesterolを除去する作用はない。どのようにして、細胞膜の構造変化をもたらしているか、今後明らかにする必要がある。最近、ノーベル賞受賞者である田中耕一博士が開発した high-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (MALDI/IMS) を用いた解析から、がん組織で浸潤先端の細胞では phosphatidylinositol の脂質の組成が異なることが報告されている[47]。EGCGが細胞膜の脂質組成に変化を及ぼしている可能性も考えられる。

がん転移はがんの死亡原因であり、肺がんは転移率が高く世界のがん死亡第一位である。本研究は、緑茶カテキンが、肺がん細胞の弾性を正常細胞と同等の細胞弾性に硬く変化して、肺がんの転移を抑制することを示した。さらに、新しいナノテクノロジーAFMを用いた細胞弾性の解析はがん転移の複雑な作用機構の解明に貢献できると考える。

## 【第二章】

抹茶様香気画分による線虫に対する  
ヒト型アミロイド  $\beta_{42}$  毒性の抑制

## 【緒言】

アルツハイマー病（AD）は、脳血管障害と合わせて認知症の2大原因の一つであり、加齢に伴って増加する。例えば、60歳の1%、85歳の30%がADに罹患している[48]。日本にはおよそ200万人、アメリカでは450万人のAD患者がいると推測され[49,50]、ADは長寿社会の問題となっている。

ADの発症機構はまだ全てが明らかになっていないが、大脳皮質へのアミロイドβペプチド（Aβ）の蓄積・沈着による神経細胞への毒性が原因であると考えられている[51,52]。Aβはアミロイド前駆体タンパク質（APP）がセクレターゼによって切断されて産生される。APPはN末端を細胞外にもつ膜貫通型タンパク質であるが、C末端から99残基の細胞外の部位でβ-セクレターゼにより切断され、その後、膜に結合した断片の細胞膜内の40あるいは42残基の部位でγ-セクレターゼにより切断される。この際、γ-セクレターゼの切断部位の違いにより40アミノ酸からなるAβ<sub>40</sub>と42アミノ酸からなるAβ<sub>42</sub>が産生される。Aβ<sub>42</sub>は、Aβ<sub>40</sub>よりも凝集しやすいため、Aβ<sub>42</sub>は脳に蓄積し[51]、老人斑形成の主成分と考えられている。一方、APPがα-セクレターゼによりAPP内部でβ-セクレターゼと異なる部位で切断されるとAβの産生は抑制される。Aβは産生と消失を繰り返しているが、この不均衡によりAβが蓄積・沈着して、神経細胞の障害をもたらす[52]。

緑茶飲用が認知症を改善に導くことは、高齢者の総合機能評価から明らかとなり[53]、有効成分や作用機構の研究が盛んに行われている。Wankerらは、EGCGが繊維化したAβ<sub>42</sub>をモノマーに戻し、更にEGCGがAβ<sub>42</sub>に直接結合して毒性の低いオリゴマー構造に変化させることを



報告した[15,54]。この結果に基づき、ドイツでは EGCG による AD 予防の臨床介入研究が現在行われている[16]。

最近では、緑茶の香気成分が、アロマセラピーやリラクゼーションに応用できる成分として注目されている。これまでに、緑茶の脂溶性香気成分は 600 以上見つかっており[19,55]、geraniol や linalool などフローラルな香気に寄与するテルペン類だけでなく[55,56]、青臭さに寄与する (*Z*)-3-hexanol や (*2Z*)-hexanal、あるいは、新鮮香に寄与する (*Z*)-3-hexenyl-(*Z*)-3-hexanoate や (*Z*)-3-hexenyl-(*E*)-hexanoate などの含有が報告されている[57]。しかし、単独の化合物で緑茶の香気を示すものはないことから、緑茶の香気はこれら種々の香気成分が組み合わさって特徴づけられていると考えられる。そこで、本研究では緑茶香気の特徴づける成分群を分画することを試みた。まず、緑茶葉を hexane、methanol あるいは chloroform で抽出して香気を比較したところ、ヘキサン抽出物が最も緑茶に近い香気を有していた[58]。次に、ヘキサン抽出物をクーゲルローア蒸留により分画し[59]、150℃以下で留出した留出物と、150℃以上でも蒸発しない蒸留残渣を得た。留出物は花やハーブにも存在するテルペン類を含む香ばしい香気を有していたので“焙じ香気画分”と、また、蒸留残渣は緑茶特有の抹茶様香気を有していたので“抹茶様香気画分”とした。抹茶様香気画分は、緑茶の他にも紅茶と焙じ茶からも得られるので[58]、茶の基本的かつ特異的な香気画分であると考えている。緑茶香気画分の認知症への予防効果を検討するにあたって、Aβ<sub>42</sub> 毒性に対する抑制効果を検討することにした。

Aβ 毒性の研究に、ヒト型 Aβ<sub>42</sub> 遺伝子を導入した線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は微量な試料で検定でき、短時間で検定できるこ

とから、モデル生物として用いられている。更に、*C. elegans* は嗅覚細胞を持っており、香気や味などの多くの揮発成分に反応して、誘引または忌避反応の応答を示す[60]。種々のヒト型 A $\beta$  遺伝子導入変異体 *C. elegans* の中で、CL4176 を用いて EGCG が A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性によって生じるパラリシスを抑制することが報告されている[61]。本研究では、CL4176 のパラリシス誘導の抑制を香気画分で検討した。

CL4176 は、3'非翻訳領域 (UTR) に異常がある温度感受性 *smg-1* 変異遺伝子に A $\beta$ <sub>42</sub> *minigene* (*myo-3* のプロモーターと異常な 3'UTR を含むヒト A $\beta$ <sub>42</sub>) を含むプラスミド pAF29 と *rol-6* (表現型として虫体がローリングする) を含むプラスミド pRF4 を gonad microinjection により遺伝子導入して開発された[62]。CL4176 は、3 齢幼虫 (L3) 期に許容温度 16°C から非許容温度 25°C に移すと A $\beta$ <sub>42</sub> 遺伝子が発現して A $\beta$ <sub>42</sub> が筋肉に蓄積し、パラリシスを誘導する[62]。更に、young adult 期に非許容温度に移すとパラリシスは生じないが A $\beta$ <sub>42</sub> は産生されるため寿命が短縮される。本研究では、CL4176 を用いて A $\beta$ <sub>42</sub> によるパラリシス誘導と寿命短縮に対する抑制効果をヘキササン抽出物、焙じ香気画分、抹茶様香気画分で検討した。その結果、抹茶様香気画分と更に精製したフラクション 10 に A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性の抑制効果があることを始めて見出した。

## 【材料と方法】

### <線虫 *Caenorhabditis elegans*>

野生株 N2 は東海大学医学部石井直明教授から供与いただいた。

ヒト型 A $\beta$ <sub>42</sub> 遺伝子導入変異体 CL4176 (smg-1(cc546) I ; dvls27 X. dvls27 [pAF29 (myo-3/A $\beta$ <sub>42</sub>/let UTR) + pRF4 (rol-6 (su1006))]) と CL4176 の A $\beta$ <sub>42</sub> を含まないコントロール CL802 (smg-1(cc546) I ; rol-6 (su1006) II.) は *Caenorhabditis* Genetics Center (USA) から購入した。

線虫は、直径 9 cm の滅菌プラスチックシャーレの Nematode Growth Medium (NGM) 寒天培地上で増殖させ、凍結保存液 (1 x M9 緩衝液) に懸濁して -80°C で保存した。

### <試薬>

Human A $\beta$ <sub>42</sub> は GenScript (USA) から購入し、dimethylsulfoxide (DMSO) で 1 mM に調製して -20°C で保存した。EGCG は茶葉から精製した[33]。Curcumin と 4-4'-diaminophenylsulfone (DDS)、ethanol は和光純薬工業から購入した。Isoamyl alcohol は Extra Synthese (France) から購入した。緑茶は、2012 年に埼玉県農林総合研究センター茶業研究所の茶園で採取した一番茶葉から普通煎茶として製造した。

### <飼育および同調>

#### NGM 寒天培地

NGM 寒天培地は、NaCl 0.9 g、agar 7.5 g および bacto peptone 0.75 g を 300 ml の D.W. に溶解し、オートクレーブで滅菌した後、5 mg/ml cholesterol 300  $\mu$ l、1 M MgSO<sub>4</sub> 300  $\mu$ l、1 M CaCl<sub>2</sub> 300  $\mu$ l および 1 M potassium dihydrogen phosphate 緩衝液 (pH 6.0) 7.5 ml を加え調製した。

### 継代飼育

線虫は、9 cm NGM 寒天培地上に餌となるウラシル要求性の大腸菌 OP50 株を  $1 \times 10^8$  個を撒いたプレートに 16°C で飼育した。OP50 株は東海大学医学部石井直明教授から供与いただいた。線虫は 7 日間隔で飼育中の寒天培地から小片を切り取り、新しいプレートに置き継代した。

### 線虫の同調

継代飼育した線虫を S-basal (0.1 M NaCl - 0.05 M potassium dihydrogen phosphate 緩衝液、pH 6.0) に回収し、洗浄した後、新たに S-basal を 4.5 ml、sodium hypochlorite を 500  $\mu$ l、10 N NaOH 100  $\mu$ l を加え、約 10 分間転倒混和して線虫を溶解し遠心 (3,000 rpm、数秒) して卵を回収した。卵は N2 の場合は 20°C、CL4176 の場合は 16°C で一晩培養して孵化させ、同調した 1 齢幼虫 (L1) を得た。

### <方法>

#### ・緑茶香気成分群の抽出および分画

緑茶 (普通煎茶) 100 g を 1 L の hexane で 24 時間抽出した後、減圧下で hexane を留去し、ヘキサン抽出物を得た。更に、ヘキサン抽出物

は、クーゲルローア蒸留法により 0.2 Torr の減圧条件下で 50°C から 10 分ごとに 10°C ずつ、150°C まで昇温し、冷却トラップした留出物（後に“焙じ香気画分”とした）の揮発成分と揮発しなかった蒸留残渣（後に“抹茶様香気画分”とした）とに分画した。

抹茶様香気画分の一部は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（直径 30 mm、高さ 100 mm、担体 SiO<sub>2</sub>、展開溶媒 hexane : isopropanol = 96 : 4）で 10~30 ml ずつ 22 に分画し、薄層クロマトグラフィー（TLC）で展開後、ヨウ素反応の呈色反応によって類似した成分が含まれると推定される画分をまとめ、10 画分（フラクション 1~10）を得た。更に、最後に展開溶媒として chloroform を流し、4 つに分画し、TLC およびヨウ素反応の呈色反応により 1 画分（フラクション 11）にまとめ、合計で 11 画分を得た（図 12）。

各香気画分は有機溶媒を完全に除去した後、DMSO に溶解し -20°C で保存した。

#### ・抹茶様香気画分の還元

抹茶様香気画分（約 30 mg）の還元は次のように行った。Lithium aluminum hydride (LiAlH<sub>4</sub>) 約 40 mg と diethyl ether（超無水）2 ml を入れた二口ナス型フラスコに、1 ml の diethyl ether に溶解した蒸留残渣を加え、浴温 25°C のオイルバスに浸して約 3 時間攪拌した。得られた反応混合物に diethyl ether を 2 ml 加えた後、氷水 0.4 ml、15% NaOH 0.4 ml、氷水 1.2 ml の順で加え 20 分間攪拌し、水層とエーテル層を分け、反応によって生じた沈殿をろ別した。得られたエーテル溶液を分液ロートに移し、ここへ飽和 ammonium chloride 水 1 ml を加えてよく攪

拌した後、有機層を分離した。得られた反応液に無水 magnesium sulfate を加え乾燥後、ろ過により magnesium sulfate を取り除いた。減圧下溶媒を留去することにより、黄褐色の油状物質として還元物を得た。

#### ・ CL4176 におけるヒト型アミロイド $\beta_{42}$ (A $\beta_{42}$ ) 遺伝子の発現解析

同調した CL4176 の L1 線虫を 9 cm NGM 寒天培地に約 1,000 頭を放飼し、16°C で 4 日間飼育した。25°C に移す前の young adult と 25°C に移して 24 時間後の young adult を S-basal で回収した。S-basal で洗浄後、液体窒素で凍結した後、破砕して ISOGEN (Nippon Gene, Japan) で total RNA を抽出した。Total RNA は超純水に溶解した後、分光光度計を用い吸光度から濃度を算出した。

RNA の cDNA 化は、GeneAmp RNA PCR (Applied Biosystems, USA) を用いて行った。

Total RNA	1 $\mu$ g/2 $\mu$ l
Oligo d(T) <sub>16</sub>	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ l

上記の反応溶液を 65°C で 10 分間インキュベートした後、氷上で 3 分間冷却した。RT mix を 16  $\mu$ l 添加し、37°C で 1 時間インキュベートした後、92°C で 10 分間処理し、cDNA を調製した。

#### < RT mix >

10 x PCR buffer II	2 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ l
2.5 mM dNTP mix	8 $\mu$ l
RNase inhibitor	1 $\mu$ l
MuLV reverse transcriptase	1 $\mu$ l

Aβ<sub>42</sub> 遺伝子の発現は半定量的 PCR 法により測定した。cDNA を鋳型としてサーマルサイクラー (Applied Biosystem, Geneamp PCR system 9700) を使い、下記の条件で Aβ<sub>42</sub> 遺伝子を増幅し、PCR 産物を 5% acrylamide ゲルで電気泳動し、ゲルを ethidium bromide で染色後、UV イルミネーター (Epi-Light UV FA2000, Aisin Cosmos R&D, Japan) で検出した。一方、内在性コントロールとして *C. elegans act-1* を用いた。

1) Human amyloid β<sub>42</sub>

Primer F: 5'-CCGACATGACTCAGGATATGAAGT

Primer R: 5'-CACCATGAGTCCAATGATTGCA

< PCR >

21 cycles			
94°C	55°C	72°C	4°C
30 sec	30 sec	1 min	∞

< 反応液 >

10 x PCR buffer II	1 μl
2.5 mM dNTP mix	1 μl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 μl
cDNA	1 μl
1 M Primer F	1 μl
1 M Primer R	1 μl
Taq polymerase	0.1 μl
H <sub>2</sub> O	3.9 μl

II) *C. elegans* act-1

Primer F: 5'-GTCGGTATGGGACAGAAGGA

Primer R: 5'-GCTTCAGTGAGGAGGACTGG

<PCR>

	21 cycles				
95°C	94°C	55°C	72°C	4°C	
9 min	30 sec	30 sec	1 min	∞	

<反応液>

10 x PCR buffer II	1 μl
2.5 mM dNTP mix	1 μl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 μl
cDNA	1 μl
1 M Primer F	1 μl
1 M Primer R	1 μl
Gold Taq polymerase	0.1 μl
H <sub>2</sub> O	3.9 μl

・化学走性試験

化学走性試験は Bargmann らの方法に準じて行った[60]。図 13 に示したように、直径 9 cm の NGM 寒天培地の縁に直径 1 cm の領域 A と反対側に領域 B を設定した。領域 A の中央には試料 1 μl を滴下し、領域 B の中央には対照として ethanol 1 μl を滴下した。試料および ethanol を寒天培地に染み込ませた後、各領域の中央に 1 M sodium azide 1 μl を滴下した。次に、young adult に同調した 50-100 頭の線虫 (N2) を寒天培地中央に放飼し、20°C で 1 時間自由に這わせた。実験終了時に



100  $\mu$ l chloroform を滴下したアルミホイルの上にシャーレを伏せて 5 分間静置し、実体顕微鏡で各領域にいる線虫の数を計数した。Chemotaxis Index (CI) は次の式で求めた。CI=(A 領域の線虫数)-(B 領域の線虫数)/総線虫数(A+B+C)。CI が+の場合は誘引、-の場合は忌避反応を示すと判定した。

#### ・パラリシス誘導による A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性試験

パラリシス誘導による A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性試験は Florez-McClure らの方法に準じて行った[63,64]。同調した 50 頭の線虫 (CL4176) を 9 cm の NGM 寒天培地に移し替え、16°C 条件下で産卵させ、2 時間後 young adult 線虫を取り除き、更に 16°C で 7 日間、young adult に成長するまで飼育した。試料 1  $\mu$ l を OP50 と混和して 1 ml とし、100  $\mu$ l を新しい 4 cm の寒天培地に塗布した後、10 頭の young adult 線虫を移し替え、16°C 条件下で産卵させ、2 時間後 young adult を取り除いた。48 時間後に L3 線虫に成長した 20-25 頭の線虫を新しい NGM 寒天培地に移し替え 25°C に up-shift した。Up-shift 20 時間後から 2 時間ごとに 30 時間まで線虫にパラリシスが生じているか確認した。尾部が動かない線虫をパラリシスと判定した。パラリシスを起こした線虫は寒天培地から取り除いた。

#### ・寿命測定による A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性試験

寿命測定による A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性試験は Wood らの方法に準じて行った[65]。試料を加えた OP50 を塗布した 9 cm NGM 寒天培地に、同調した L1 線虫 (CL4176, CL802) を約 1,000 頭放飼し、6 日間 16°C で young adult まで成長させた。Young adult 線虫は、試料を加えた OP50 を塗布した

4 cm NGM 寒天培地に移し替え、25°Cに up-shift して、この日を寿命の第 1 日目とした。2-3 日おきに、試料を混合した OP50 を塗布した新しい寒天培地に移し替えた。第 5 日までは 2 日に 1 回、次世代発生抑制のために 0.5 mg/ml 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR) 80  $\mu$ l を滴下した。線虫は 1-2 日おきに生死を確認した。白金のワームピックで軽く虫体に触れ動かない線虫を死虫とし、シャーレから逃亡した線虫や腹が破裂した線虫は除外した。

#### ・ $\beta$ -carotene 退色法による抗酸化能の評価

$\beta$ -carotene 退色法は、津志田らの方法に準じて行った[66,67]。Linoleic acid 555  $\mu$ l、 $\beta$ -carotene 4 mg、Tween-40 1 g をそれぞれ別々の褐色メスフラスコに入れ 5 ml chloroform 溶液とした。これらの溶液をそれぞれ、100  $\mu$ l、250  $\mu$ l、500  $\mu$ l 加え、窒素ガスを吹き込み、chloroform を完全に除去した。45 ml の蒸留水と 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を加え、linoleic acid -  $\beta$ -carotene 溶液を作成した。ディスポーザブルセルに試料 20  $\mu$ l と linoleic acid -  $\beta$ -carotene 溶液 980  $\mu$ l を加え、470 nm の吸光度を測定し、50°C 恒温浴槽内に入れた。10 分おきに 70 分まで吸光度を測定した。

#### ・ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるカテキン類および caffeine の分析

試料に含まれるカテキン類および caffeine の含有量は、後藤らの方法に準じて HPLC で分析した[68]。HPLC は島津 LC-10A を用いた。分析試料は、100 mg/ml のヘキサン抽出物 100  $\mu$ l に 50% acetonitrile を 50 ml

加え、0.45  $\mu\text{m}$  ディスポーザブルフィルター (ADVANTEC DISMIC 13HP045AN) に通した試料を用いた。HPLC の分析条件は、移動相 A 液 ( $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_3\text{PO}_4 : \text{H}_2\text{O} = 4.5 : 0.05 : 95.45$ ) と B 液 ( $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_3\text{PO}_4 : \text{H}_2\text{O} = 50 : 0.05 : 49.95$ ) を 2 液グラジエントで流量 1 ml/min で流した。カラムは CAPCELL PAK C18 (4.6 mm x 100 mm、資生堂) を用い、カラムオープン温度は 40°C とした。検出には UV 検出器を用い、カテキン類は 231 nm、caffeine は 274 nm の波長を用いた。試料注入量は 10  $\mu\text{l}$  とした。標準品にはカテキン含有率が既知であるポリフェノン 60 (三井農林) と caffeine (和光純薬工業) を用いた。

#### ・ガスクロマトグラフィー - マススペクトロメトリー (GC-MS) および ガスクロマトグラフィー - オルファクトメーター (GC-O) 分析による 香気成分の分析

GC-MS 分析は、埼玉大学大学院理工学研究科 長谷川登志夫 准教授と藤原隆司 准教授に依頼した。GC は HP 6890 GC System (Hewlett Packard, USA)、MS は electronic ionization (EI) が 70 eV で JMS-700 AM spectrometer (JEOL, Japan) を用いた。分析条件は、固層シリカカラムは Inter-Cap Pure-WAX (GL Science, Japan) (30 m x 0.25 mm I.D.;  $df = 0.25 \mu\text{m}$ ) を用い、カラム温度 40°C (5 min) から 4°C/min で 250°C まで上昇させた。スプリットは 50 : 1 で注入温度は 250°C とした。試料は dichloromethane で溶解希釈し、1  $\mu\text{l}$  注入した。

GC-O 解析は、GC-353 (GL Science, Japan) を用いた。分析は GC-MS と同様の条件で行った。

#### ・核磁気共鳴装置 (NMR) による分析

抹茶様香気画分の還元生成物の確認には NMR (AVANCE 500, Bruker, USA) を用いた。抹茶様香気画分を  $\text{CDCl}_3$  に溶解希釈し測定した。

#### ・ウエスタンブロットによる $\text{A}\beta_{42}$ 凝集解析

Human  $\text{A}\beta_{42}$  (GenScript, USA) は DMSO で希釈し 20  $\mu\text{M}$  に調製した。 $\text{A}\beta$  25  $\mu\text{l}$  と PBS 24  $\mu\text{l}$ 、試料 1  $\mu\text{l}$  を加え、37°C で 24 時間インキュベートした。試料 20  $\mu\text{l}$  に等量の 2 x サンプルバッファー (200 mM Tris, 2% SDS, 40% glycerol, 0.04% CBB G-250 (pH 6.8)) を加え、タンパク質量 100 ng (4.55  $\mu\text{l}$ ) を Tricine ゲル (10-20%) (Novex) に apply し、125V 定電圧条件で泳動した。ブロッティングは、30 V、200 mA で 1 時間行い、3% スキムミルクでブロッキング後、1 次抗体  $\text{A}\beta_{1-16}$  (6E10) (COVANCE, USA) モノクローナル抗体、2 次抗体 HRP conjugated goat 抗-mouse IgG 抗体で反応し、ECL を用いて検出した。

#### ・統計解析

統計処理は JMP 6.0 を使用して ANOVA 解析した後、Dunnnett の多重比較検定、または *Student's t* 検定によって行った。

## 【結果】

### 1. 緑茶香気成分群の抽出および分画

緑茶 100 g からヘキサン抽出物 480 mg が得られた。これをクーゲルローア蒸留により 150℃以下で揮発した留出物 (5 mg) と蒸留残渣に (349 mg) に分画し、それぞれその香気の特徴から留出物を焙じ香気画分、蒸留残渣を抹茶様香気画分とした (図 14)。抹茶様香気画分を更にシリカゲルカラムクロマトグラフィーで 11 画分に分画した結果、フラクション 9~11 の 3 画分に抹茶様香気が認められた (表 2)

### 2. 香気画分による線虫 N2 の化学走性

線虫 N2 がヘキサン抽出物、抹茶様香気画分および焙じ香気画分を認識できるか確認するために化学走性試験を行った。ヘキサン抽出物と抹茶様香気画分の 100 µg/ml は、それぞれ CI が 0.092、0.120 を示し、N2 を有意に誘引した (表 3)。一方、焙じ香気画分 2 µg/ml は、CI は -0.026 と有意な応答は認められなかった。ヘキサン抽出物および抹茶様香気画分は、いずれも抹茶様香気を有しており、抹茶様香気に対し、線虫が応答したと推測している。また、緑茶の香気成分である indole (不快臭) および coumarin (甘い香気) に対しては、100 µM でそれぞれ CI は 0.008、0.014 であり N2 は応答しなかった (表 3)。線虫に対する誘引効果が知られている isoamyl alcohol は、CI は 0.508 であり有意に誘引した (表 3)。

### 3. CL4176 の AB<sub>42</sub> 発現によるパラリシスの誘導と平均寿命の短縮

Young adult の CL4176 を非許容温度である 25℃に up-shift すると 24 時間後の Aβ<sub>42</sub> の mRNA 発現は許容温度で飼育した CL4176 に比べ、約 2 倍増加した。一方で、Aβ<sub>42</sub> を含まない CL802 では Aβ<sub>42</sub> の発現は認められなかった (図 15A)。CL4176 は L3 線虫を 25℃に up-shift し、20 時間後からパラリシスが誘導され、30 時間程度でほぼ 100%の線虫がパラリシスを誘導する。Up-shift 後、例えば、CL4176 は 24 時間後で 51.7%の線虫でパラリシスが誘導され、CL802 では 28 時間後でも全くパラリシスを起こさなかった (図 15B)。

Young adult の CL4176 を 25℃に up-shift した場合は、パラリシスを起こさないが、Aβ<sub>42</sub> の発現は徐々に誘導された (図 15A)。Young adult を 25℃に up-shift した日を第 1 日目として寿命を測定し、CL4176 の平均寿命を 50%の線虫が生存している期間として求めた。CL4176 の平均寿命は 9.9 ± 1.3 日であり、CL802 の 10.7 ± 1.6 日より 0.8 日短縮されていた。また、最長寿命は CL417 が 12 日に対し、CL802 が 14 日で CL4176 が 2 日短かった (図 15C)。CL4176 の young adult を 25℃に up-shift すると Aβ<sub>42</sub> を筋肉に徐々に蓄積させ寿命が短縮したと考えられた。CL4176 を用いて Aβ<sub>42</sub> 毒性をパラリシス誘導と寿命短縮で測定できることを確認した。

#### 4. ヘキササン抽出物と抹茶様香気画分による Aβ<sub>42</sub> 毒性に起因するパラリシス誘導の抑制

香気成分の活性は、50%の CL4176 がパラリシスを起こす時間 (PT50) と 25℃に up-shift してから 28 時間後のパラリシスを起こした CL4176 の割合 (%) で比較した。

ヘキサン抽出物 100  $\mu\text{g/ml}$  の PT50 は  $26.5 \pm 1.5$  時間で、コントロールとの PT50 の差 (delayed time) が 1.8 時間と有意に遅くなった (図 16A、表 4)。CL4176 のパラリシス開始を遅延することが報告されている curcumin 100  $\mu\text{M}$  は、PT50 は  $26.7 \pm 1.4$  時間であり、2.0 時間の遅延を示した。ヘキサン抽出物 100  $\mu\text{g/ml}$  は curcumin 36.8  $\mu\text{g/ml}$  (100  $\mu\text{M}$ ) と同等であった。

次に、焙じ香気画分 2  $\mu\text{g/ml}$  では PT50 :  $27.7 \pm 0.5$  時間、delayed time: 1.4 時間であった (図 16B、表 4)。一方、抹茶様香気画分は 10  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$  の PT50 はそれぞれ  $27.7 \pm 0.4$  時間と  $28.7 \pm 0.8$  時間で、コントロールに対しそれぞれ 1.4 時間、2.4 時間と有意に遅延した (図 16C、表 4)。また、100  $\mu\text{g/ml}$  抹茶様香気画分は 28 時間でも  $24.4 \pm 22.0\%$  しかパラリシスを誘導せず、コントロールの  $75.6 \pm 6.1\%$  と比較して著しい抑制効果を示した (表 4)。焙じ香気画分は少量しか得られなかったため、抹茶様香気画分と同じ濃度での検討は行えなかった。抹茶様香気画分はヘキサン抽出物よりも強い AB 毒性の抑制効果を示した。

次に、抹茶様香気画分をカラムクロマトグラフィーによって分画した 11 画分の内、十分量の試料を確保できたフラクション 3 および 10 の画分についてパラリシス誘導の抑制を検討した。青臭さを有しているフラクション 3 は 10、100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度においても全くパラリシス誘導を遅くしなかった (図 17、表 5)。しかし、抹茶様香気を有しているフラクション 10 は 20  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で PT50 :  $26.9 \pm 0.9$  時間、delayed time : 1.1 時間と遅延した (図 17、表 5)。抹茶様香気と AB<sub>42</sub> 毒性の抑制活性が同じ画分にあることから、抹茶様香気に関わる成分が AB<sub>42</sub> 毒性の抑制活性を持つことが示唆された。

## 5. 抹茶様香気画分による A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性に起因する寿命短縮の抑制

香気成分の活性は、50%の CL4176 が生存している日数（平均寿命）と最も長い生存日数（最長寿命）で比較した。

ヘキサン抽出物を 10 あるいは 100  $\mu\text{g/ml}$  処理した CL4176 の平均寿命は  $9.8 \pm 0.8$  日、 $10.3 \pm 0.6$  日であり、コントロールの  $9.9 \pm 0.3$  日と比較し、寿命の延長は認められなかった（図 18A、表 6）。寿命延長効果が報告されている 2 mM DDS は平均寿命を  $11.3 \pm 0.5$  日と 1.4 日寿命を延長し、最長寿命も 16 日で 2 日長かった[69]。

また、焙じ香気画分は実験が行えた 2  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では、平均寿命： $10.8 \pm 0.4$  日、最長寿命：13.7 日で寿命延長は認められなかった。一方、抹茶様香気画分 10  $\mu\text{g/ml}$  の処理は、平均寿命が  $10.7 \pm 0.8$  日であったが、100  $\mu\text{g/ml}$  の処理で平均寿命が  $12.0 \pm 0.5$  日と 1.3 日、最長寿命も 2.3 日延長した（図 18A、表 6）。一方、A $\beta$ <sub>42</sub> を発現しない CL802 は、抹茶様香気画分による寿命の延長効果は認められなかった（図 18B）。抹茶様香気画分は A $\beta$ <sub>42</sub> による寿命短縮を抑制することを見出した。

## 6. 香気画分の抗酸化能の比較

A $\beta$ <sub>42</sub> の毒性には、A $\beta$ <sub>42</sub> の凝集によって産生される活性酸素種（ROS）が関与し[70]、抗酸化能をもつ化合物、例えばオリーブに含まれる oleuropein が A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性を抑制することが報告されている[71]。そこで、香気画分の抗酸化能について  $\beta$ -carotene 退色法により検討した。 $\beta$ -carotene 退色法は、自動酸化で生じたリノール酸過酸化物が  $\beta$ -carotene と反応して  $\beta$ -carotene を退色する原理を利用し、470 nm の



吸収で  $\beta$ -carotene の減少から酸化の割合を測定する方法である。強い抗酸化能をもつ 2  $\mu$ M EGCG は、 $\beta$ -carotene の退色を 85.3% 抑制した。一方、抹茶様香気画分 2  $\mu$ g/ml は、退色を 64.4% 抑制し、EGCG と同様に強い抗酸化能を示した。一方、ヘキササン抽出物 2  $\mu$ g/ml と焙じ香気画分 2  $\mu$ g/ml は、抹茶様香気画分より弱い抗酸化能を示した (図 19A)。この結果は、A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性の抑制活性と良く一致した。抹茶様香気画分から精製したフラクション 10 は、20  $\mu$ g/ml で抹茶様香気画分 2  $\mu$ g/ml と同等の抗酸化能を示したが (図 19B)、抹茶様香気が弱いフラクション 11 では 20  $\mu$ g/ml の濃度でも抗酸化能を示さなかった (図 19C)。抹茶様香気を持つ画分に抗酸化能が認められた。

次に、抹茶様香気画分を LiAlH<sub>4</sub> で還元すると、<sup>1</sup>H-NMR により 9-10 ppm 付近のホルミル基特有の吸収が消失し (図 20)、抹茶様香気画分に含まれるアルデヒド類がアルコール体に還元されたものと推定される。抹茶様香気画分には (3Z, 6Z)-nonadienal および 1-decanal など多数のアルデヒド類が含有することがわかっている [72]。還元物では抹茶様香気消失し、メロン様香気に変化し (表 2)、これに伴って、抗酸化活性が減少した (図 21)。

## 7. 抹茶様香気画分による A $\beta$ <sub>42</sub> 凝集抑制

抹茶様香気画分および抹茶様香気フラクション 10 が A $\beta$ <sub>42</sub> の凝集を抑制するかウエスタンブロットで検討した。A $\beta$ <sub>42</sub> は約 4 kDa のペプチドで、サンプルバッファーに溶解直後 (0 時間) は SDS-PAGE でモノマー (約 4 kDa) およびダイマー (約 8 kDa) の 2 つのバンドが観察された。37°C で 4 時間、1 日、3 日の時間経過に伴って、徐々にダイマーのバンドが

薄くなり、およそ 30~120 kDa 付近のオリゴマーのシグナルが強くなり (図 22A)、AB<sub>42</sub> の凝集を示した。この系に抹茶様香気画分とフラクション 10 (それぞれ 10 および 20 µg/ml) を加え、37°C で 24 時間インキュベートすると、モノマーおよびダイマーが減少し、34 kDa 以上のオリゴマーのバンドが認められた (図 22B、C)。Curcumin は凝集された AB のオリゴマーを解いてモノマーに戻すことが報告されているが [73]、この系でもダイマーとオリゴマーのバンドが減少し、モノマーのバンドが増加した。一方、EGCG はオリゴマーをモノマーに戻した後、毒性が少ない構造のオリゴマーに再凝集させる [15]。抹茶様香気画分とフラクション 10 の処理は、EGCG 処理の場合と類似しているので、curcumin のように AB<sub>42</sub> 凝集を解く作用ではなく、AB<sub>42</sub> の凝集構造を毒性の少ないものに変化させた可能性があると考えられる。

## 8. 抹茶様香気画分とフラクション 10 の含有成分分析

ヘキサン抽出物にはカテキン類はほとんど含まれていないこと、また、caffeine は 1.76% 含有していることが HPLC 分析により判明した (図 23)。

抹茶様香気画分は GC-MS 分析により 37 成分が検出された (図 24、表 7)。37 成分の分子量は 142 から 592 で、揮発性が高い低分子量の成分はほとんど含まれていなかった。37 成分の多くは鎖状の炭化水素類であったが、香気成分として知られる anethole がヘキサン抽出物にも含まれていた (表 7)。また、分離後のフラクションの香りを直接鼻で嗅ぐことができる GC-O を用いた香気確認では、抹茶様香気画分のガスクロマトグラフィーで分離した各フラクションで抹茶様の香気は検出され

なかった。45.4 分付近に桜葉様香気が検出され、このピークは coumarin のピークと一致したことから、抹茶様香気画分は coumarin を含有していることがわかった。

フラクション 10 は GC-MS 分析により 25 成分が検出された(図 25)。25 成分の分子量は 136 から 422 でほとんどが鎖状の炭化水素で、3-eicosyne、9-eicosyne、squalene など 5 成分が抹茶様香気画分に含まれる成分と一致したが、anethole や caffeine などの成分は含有していなかった(表 8)。

## 【考察】

線虫は、嗅覚細胞を介して化学物質を見極めることができる[60]。線虫 N2 が化学走性試験において、ヘキサン抽出物と抹茶様香気画分に誘引されたことは、N2 はヘキサン抽出物と抹茶様香気画分に共通した緑茶香気成分に反応したと考えられる。香気成分として coumarin や indole が推測される[74,75]。本研究でも GC-O 分析で 45.4 分に甘い桜葉様の香気を持つ coumarin が含まれていることが示された。一方、indole はそれ自身高濃度では不快臭を有しているが低濃度では緑茶全体の香気を強める作用を持つ。おもしろいことに、N2 は coumarin と indole に対し全く反応しなかったことから、N2 はこれら単独成分ではなく、抹茶様香気画分に含まれる他の成分、あるいは複数の成分を組み合わせた成分群に反応したと考えられる。本研究では N2 がヘキサン抽出物および抹茶様香気画分に誘引することを示したが、Aβ<sub>42</sub> を遺伝子導入した線虫 CL4176 でも同様にこれらの画分に誘引すると考えられる。

CL4176 に対し、Aβ<sub>42</sub> によるパラリシス誘導を抑制し寿命短縮を回復させた抹茶様香気画分は、クーゲルローア蒸留の残渣であることから、そのほとんどは高分子量の比較的大きい化合物を含んでおり、一方、微量な留出物の焙じ香気画分は低分子量で揮発性の高い化合物が含まれていると考えられる。GC-MS 分析により、抹茶様香気画分には分子量 142 から 592 の炭化水素化合物が多く含まれる他、anethole や caffeine が含まれていた。Caffeine は 6.27 mM (約 1217 μg/ml) で CL4176 のパラリシスを遅延させることが報告されているが[64]、ヘキサン抽出物に含まれる caffeine は 1.76% であり、また、抹茶様香気画分中にも数%

しか含まれていないことから、caffeine が抹茶様香気画分の A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性抑制活性物質とは考えにくい。事実、結果は示していないが 100  $\mu$ g/ml の anethole あるいは 100  $\mu$ g/ml の caffeine 処理では CL4176 のパラリシス誘導を抑制しなかった。

更に、精製を進めたフラクション 10 では anethole や caffeine は検出されず、ほとんどが鎖状の炭化水素類であった。構造から推定される性質からこれらに含まれている鎖状の炭化水素類は香気への寄与が小さいと考えられる。また、GC-O 分析で抹茶様の香気を有した単一の成分が認められなかった。しかし、GC-O 分析と GC-MS の詳細な検討により推定された微量の多様な成分が組み合わさって抹茶様香気を形成していることを突き止めた[72]。これらの香気成分が A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性の抑制を示したと考えられる。したがって、抹茶様香気を構成する微量な複数の成分が複合的に A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性の抑制に寄与していると考えられる。

A $\beta$ <sub>42</sub> の毒性抑制には様々な作用機構が報告されている。例えば、EGCG は抗酸化活性以外に、① $\beta$ -セクレターゼと切断部位の異なる  $\alpha$ -セクレターゼの活性化による A $\beta$  産生抑制[76]、② $\gamma$ -セクレターゼ活性を抑制するキレート作用[77]、③off-pathway による A $\beta$ <sub>42</sub> 凝集体の構造変化を介した A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性の減少[15]、などが報告されている。このような多様な作用機構は EGCG のケミカルシャペロンとして作用する特性によるものと考えられる[78]。抹茶様香気画分は EGCG と異なり脂溶性成分であるが、EGCG と同様な抗酸化能と off-pathway 様の A $\beta$ <sub>42</sub> 凝集構造の変化を誘導した。抹茶様香気成分が香気として作用したのか経口摂取によって作用したのかは線虫を用いた本研究では明らかではないが、緑茶を煎じて得られる香気なので、緑茶を飲用する場合、カテキン類と共

に摂取していると考えられる。カテキン類と抹茶様香気成分との併用によってより強い AB<sub>42</sub> 毒性の抑制効果が得られるか興味あるところである。

本研究では、緑茶の有効成分として良く知られていたカテキン(EGCG)とは異なる脂溶性成分で緑茶の香気を形成する成分に AB<sub>42</sub> 毒性を抑制する活性を始めて見出した。

## 【総括】

がんの転移能の新しい指標として注目されている「細胞弾性」を AFM で測定し、ヒト肺がん細胞株においても、軟らかい細胞弾性が、高い運動能（転移能）を反映することを見出した。この結果を基に、緑茶カテキン EGCG の転移抑制機構を検討した結果、EGCG は細胞膜の構造を変化させて細胞弾性を硬化し、それによって、EMT 誘導のシグナルを抑制して肺がん細胞の運動能を抑制することを見出した。この結果は、細胞弾性の硬化作用は新しい転移抑制機構であること、また、緑茶カテキンは副作用のない化合物であるので、転移予防薬として役立つ可能性を示唆した。

次に、緑茶香気成分として分画した抹茶様香気画分に、A $\beta$ <sub>42</sub> の毒性を抑制する活性があることを、ヒト型 A $\beta$ <sub>42</sub> 遺伝子を導入した線虫を用いて証明した。有効成分を突き止めることはできなかったが、緑茶カテキンだけでなく、脂溶性の香気成分にもアルツハイマー病の予防に効果的な成分があることを初めて示すことができた。緑茶には、カテキンだけでなく、L-theanine や caffeine が含まれているが、これらにも A $\beta$ <sub>42</sub> 毒性を抑制する活性や認知症の予防効果があることが報告されている [79,80]。

すなわち、緑茶飲用でみられる慢性疾患の予防効果は、緑茶に含まれる性質の異なる様々な成分が、がんの発症・転移や認知症を予防することでもたらされ、緑茶飲用が健康寿命の延長に有用であることを示した。

## 【謝辞】

本稿を終えるにあたり、研究の開始以来、長きにわたり直接ご指導いただきました埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所、菅沼雅美先生に謹んで感謝申し上げます。また、本研究遂行にあたり懇切丁寧にご助言いただいた埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所、渡邊達郎博士、アヌボン・モンダル博士に心から感謝申し上げます。学会や論文作成などでご助言賜りました藤木博太先生に深く感謝申し上げます。本研究の遂行においてご助言をいただきました埼玉大学大学院理工学研究科、坂井貴文教授、小林哲也教授、森安裕二教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、緑茶脂溶性成分の分画および GC-MS 解析をご指導いただきました埼玉大学大学院理工学研究科、長谷川登志夫准教授、藤原隆司准教授、藤田孝氏をはじめ長谷川研究室の学生の方々に心から感謝申し上げます。AFM のデータ解析を手伝ってくださった埼玉大学大学院、山崎喬氏に感謝申し上げます。統計解析をご指導いただきました今井一枝先生に感謝申し上げます。また、線虫の実験方法をご指導いただきました東海大学医学部、石井直明教授、安田佳代先生に感謝申し上げます。

更に、様々な面でお世話になり、常に暖かくご支援くださいました埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所、鈴木香氏、菅野美樹氏、塩谷郁子氏、李正皓氏に深く感謝申し上げます。社会人学生として研究するにあたり、多大なるご理解をいただきました埼玉県農林総合研究センター茶業研究所、齊藤倫夫研究所長はじめ、中村幸二元研究所長、清水賢一元研究所長、松本達夫元研究所長、佐野悟郎元研究所長、中島健太栽培担



当部長、小川英之主任研究員、職員の方々に心から感謝いたします。

最後に、社会人学生として研究生活を送るにあたり、理解し応援してくれた両親、高橋満男、高橋敬子、妻、高橋庸子、子供たち、高橋日向子、高橋旭、高橋巽巳に感謝いたします。父のこの6年間を見ていた子供たちには、未来に向けて強く、大きく、羽ばたいていくことを期待しています。

## 【参考文献】

- [1] 厚生労働省, 平成 23 年簡易生命表の概況 参考資料 2 平均余命の年次推移,  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life11/dl/life11-09.pdf>.
- [2] 厚生労働省, 健康日本 21 (第二次) の推進に関する参考資料,  
[http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/kenkounippon21\\_02.pdf](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/kenkounippon21_02.pdf) 24-31.
- [3] S. Yoshizawa, T. Horiuchi, H. Fujiki, T. Yoshida, T. Okuda, T. Sugimura,  
Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main  
constituent of "Tannin" in green tea, *Phytotherapy Res* 1 (1987) 44-47.
- [4] A. Takahashi, K. Nakajima, Y. Kishi, H. Ogawa, Improvement in quality of  
crude tea by using plucking-bag made from breathing cloth during the  
harvest, *Bulletin of the Saitama Pref Agriculture and Forestry Research  
Center* 11 (2011) 17-22.
- [5] M. Maeda-Yamamoto, K. Ema, I. Shibuichi, *In vitro* and *in vivo* anti-allergic  
effects of 'benifuuki' green tea containing O-methylated catechin and  
ginger extract enhancement, *Cytotechnology* 55 (2007) 135-142.
- [6] K. Umegaki, A. Sugisawa, K. Yamada, M. Higuchi, Analytical method of  
measuring tea catechins in human plasma by solid-phase extraction and  
HPLC with electrochemical detection, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47  
(2001) 402-408.
- [7] M. Sukanuma, S. Okabe, M. Oniyama, Y. Tada, H. Ito, H. Fujiki, Wide  
distribution of [<sup>3</sup>H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea  
polyphenol, in mouse tissue, *Carcinogenesis* 19 (1998) 1771-1776.
- [8] M. Sukanuma, S. Okabe, N. Sueoka, E. Sueoka, S. Matsuyama, K. Imai, K.

- Nakachi, H. Fujiki, Green tea and cancer chemoprevention, *Mutat Res* 428 (1999) 339-344.
- [9] K. Nakachi, S. Matsuyama, S. Miyake, M. Suganuma, K. Imai, Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention, *Biofactors* 13 (2000) 49-54.
- [10] H. Fujiki, M. Suganuma, S. Matsuyama, K. Miyazaki, Cancer prevention with green tea polyphenols for the general population, and for patients following cancer treatment, *Current Cancer Therapy Reviews* 1 (2005) 109-114.
- [11] M. Shimizu, Y. Fukutomi, M. Ninomiya, K. Nagura, T. Kato, H. Araki, M. Suganuma, H. Fujiki, H. Moriwaki, Green tea extracts for the prevention of metachronous colorectal adenomas: a pilot study, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17 (2008) 3020-3025.
- [12] S. Bettuzzi, M. Brausi, F. Rizzi, G. Castagnetti, A. Corti, Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study, *Cancer Res* 66 (2006) 1234-1240.
- [13] S. Taniguchi, H. Fujiki, H. Kobayashi, H. Go, K. Miyado, H. Sadano, R. Shimokawa, Effect of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea, on lung metastasis with mouse B16 melanoma cell lines, *Cancer Lett* 65 (1992) 51-54.
- [14] T. Watanabe, H. Kuramochi, A. Takahashi, K. Imai, N. Katsuta, T. Nakayama,

- H. Fujiki, M. Suganuma, Higher cell stiffness indicating lower metastatic potential in B16 melanoma cell variants and in (-)-epigallocatechin gallate-treated cells, *J Cancer Res Clin Oncol* 138 (2012) 859-866.
- [15] D.E. Ehrnhoefer, J. Bieschke, A. Boeddrich, M. Herbst, L. Masino, R. Lurz, S. Engemann, A. Pastore, E.E. Wanker, EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers, *Nat Struct Mol Biol* 15 (2008) 558-566.
- [16] P. Friedmann, Clinical trials with EGCG in neurodegenerative diseases, In the abstract of the 4th world congress on tea & health, recent clinical advances & applications, 27-28 October 2011, Berlin 2011 (2011) 14.
- [17] D. Jimbo, Y. Kimura, M. Taniguchi, M. Inoue, K. Urakami, Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease, *Psychogeriatrics* 9 (2009) 173-179.
- [18] S. Hattori, Study of new approach for evaluation of Japanese green tea using OASIS method, *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University (in Japanese)* 28 (2006) 85-120.
- [19] T. Yamanishi, Flavor of tea, *Food Rev Int* 11 (1995) 477-525.
- [20] K. Yanagimoto, H. Ochi, K.G. Lee, T. Shibamoto, Antioxidative activities of volatile extracts from green tea, oolong tea, and black tea, *J Agric Food Chem* 51 (2003) 7396-7401.
- [21] V. Swaminathan, K. Mythreye, E.T. O'Brien, A. Berchuck, G.C. Blobe, R. Superfine, Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines, *Cancer Res* 71 (2011) 5075-5080.
- [22] M.J. Oh, F. Kuhr, F. Byfield, I. Levitan, Micropipette aspiration of

- substrate-attached cells to estimate cell stiffness, *J Vis Exp* (2012).
- [23] S.E. Cross, Y.S. Jin, J. Rao, J.K. Gimzewski, Nanomechanical analysis of cells from cancer patients, *Nat Nanotechnol* 2 (2007) 780-783.
- [24] M. Lekka, P. Laidler, D. Gil, J. Lekki, Z. Stachura, A.Z. Hryniewicz, Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy, *Eur Biophys J* 28 (1999) 312-316.
- [25] S. Okabe, M. Suganuma, M. Hayashi, E. Sueoka, A. Komori, F. Fujiki, Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, PC-9, by tea polyphenols, *Jpn J Cancer Res* 88 (1997) 639-643.
- [26] S. Hazqui, A. Bonnomet, B. Nawrocki-Raby, M. Milliot, C. Terryn, J. Cutrona, M. Polette, P. Birembaut, J.M. Zahm, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits the migratory behavior of tumor bronchial epithelial cells, *Respir Res* 9 (2008).
- [27] S.E. Cross, Y.S. Jin, Q.Y. Lu, J. Rao, J.K. Gimzewski, Green tea extract selectively targets nanomechanics of live metastatic cancer cells, *Nanotechnology* 22 (2011) 215101.
- [28] R. Kalluri, R.A. Weinberg, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J Clin Invest* 119 (2009) 1420-1428.
- [29] R.A. Weinberg, Moving out invasion and metastasis. In: Weinberg RA, *The biology of CANCER* (2007) 587-654.
- [30] M. Suganuma, Cell stiffness as a new indicator of diagnosis for human lung cancer cells and their metastasis, Annual Meeting of American Assoc for Cancer Res 2640A (2013).
- [31] S. Menon, K.A. Beningo, Cancer cell invasion is enhanced by applied

- mechanical stimulation, PLoS One 6 (2011) e17277.
- [32] C. Gilles, M. Polette, J.M. Zahm, J.M. Tournier, L. Volders, J.M. Foidart, P. Birembaut, Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration, J Cell Sci 112 ( Pt 24) (1999) 4615-4625.
- [33] H. Fujiki, T. Okuda, (-)-Epigallocatechin gallate, Drugs Future 17 (1992) 462-464.
- [34] C.C. Liang, A.Y. Park, J.L. Guan, *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*, Nat Protoc 2 (2007) 329-333.
- [35] R.M. Levy, M., Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: Thermal fluctuations and other methods, Nanotechnology 13 (2002) 33-37.
- [36] W.R. Trickey, F.P. Baaijens, T.A. Laursen, L.G. Alexopoulos, F. Guilak, Determination of the Poisson's ratio of the cell: recovery properties of chondrocytes after release from complete micropipette aspiration, J Biomech 39 (2006) 78-87.
- [37] A. Takahashi, T. Watanabe, A. Mondal, K. Suzuki, M. Kurusu-Kanno, Z. Li, T. Yamazaki, H. Fujiki, M. Suganuma, Mechanism-based inhibition of cancer metastasis with (-)-epigallocatechin gallate, Biochem Biophys Res Commun 443 (2014) 1-6.
- [38] E. Sueoka, Y. Goto, N. Sueoka, Y. Kai, T. Kozu, H. Fujiki, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new marker of early detection for human lung cancers, Cancer Res 59 (1999) 1404-1407.
- [39] Y. Wu, G.D. McEwen, S. Harihar, S.M. Baker, D.B. DeWald, A. Zhou, BRMS1

- expression alters the ultrastructural, biomechanical and biochemical properties of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells: an AFM and Raman microspectroscopy study, *Cancer Lett* 293 (2010) 82-91.
- [40] H. Fujiki, M. Suganuma, S. Okabe, E. Sueoka, K. Suga, K. Imai, K. Nakachi, S. Kimura, Mechanistic findings of green tea as cancer preventive for humans, *Proc Soc Exp Biol Med* 220 (1999) 225-228.
- [41] N. Ahmad, P. Cheng, H. Mukhtar, Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate, *Biochem Biophys Res Commun* 275 (2000) 328-334.
- [42] H. Ko, Y. So, H. Jeon, M.H. Jeong, H.K. Choi, S.H. Ryu, S.W. Lee, H.G. Yoon, K.C. Choi, TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition and acetylation of Smad2 and Smad3 are negatively regulated by EGCG in human A549 lung cancer cells, *Cancer Lett* 335 (2013) 205-213.
- [43] M. Zeisberg, E.G. Neilson, Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions, *J Clin Invest* 119 (2009) 1429-1437.
- [44] T. Watanabe, A. Takahashi, K. Suzuki, M. Kurusu-Kanno, K. Yamaguchi, H. Fujiki, M. Suganuma, Epithelial-mesenchymal transition in human gastric cancer cell lines induced by TNF- $\alpha$ -inducing protein of *Helicobacter pylori*, *Int J Cancer* 6 (2013) doi: 10.1002/ijc.28582.
- [45] S. Adachi, T. Nagao, H.I. Ingolfsson, F.R. Maxfield, O.S. Andersen, L. Kopelovich, I.B. Weinstein, The inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on activation of the epidermal growth factor receptor is associated with altered lipid order in HT29 colon cancer cells, *Cancer Res* 67 (2007) 6493-6501.

- [46] T. Murai, Y. Maruyama, K. Mio, H. Nishiyama, M. Suga, C. Sato, Low cholesterol triggers membrane microdomain-dependent CD44 shedding and suppresses tumor cell migration, *J Biol Chem* 286 (2011) 1999-2007.
- [47] M. Kawashima, N. Iwamoto, N. Kawaguchi-Sakita, M. Sugimoto, T. Ueno, Y. Mikami, K. Terasawa, T.A. Sato, K. Tanaka, K. Shimizu, M. Toi, High-resolution imaging mass spectrometry reveals detailed spatial distribution of phosphatidylinositols in human breast cancer, *Cancer Sci* 104 (2013) 1372-1379.
- [48] J.L. Cummings, Alzheimer's Disease, *The New England Journal of Medicine* 351 (2004) 56-67.
- [49] 厚生労働省, みんなのメンタルヘルス 認知症, [http://www.mhlw.go.jp/kokoro/speciality/detail\\_recog.html](http://www.mhlw.go.jp/kokoro/speciality/detail_recog.html).
- [50] 国際アルツハイマー病協会, 世界アルツハイマーレポート概要版, <http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport-Japanese.pdf> (2009) 7-8.
- [51] J. Hardy, M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, Alzheimer disease: the new agenda, *Am J Hum Genet* 50 (1992) 648-651.
- [52] J. Hardy, D.J. Selkoe, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science* 297 (2002) 353-356.
- [53] S. Kuriyama, A. Hozawa, K. Ohmori, T. Shimazu, T. Matsui, S. Ebihara, S. Awata, R. Nagatomi, H. Arai, I. Tsuji, Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1, *Am J Clin Nutr* 83 (2006) 355-361.



- [54] J. Bieschke, J. Russ, R.P. Friedrich, D.E. Ehrnhoefer, H. Wobst, K. Neugebauer, E.E. Wanker, EGCG remodels mature  $\alpha$ -synuclein and amyloid- $\beta$  fibrils and reduces cellular toxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 7710-7715.
- [55] V.S. Prakash Chaturvedula, I. Prakash, The aroma, taste, color and bioactive, *J Medicinal Plant Res* 5 (2011) 2110-2124.
- [56] K. Jumtee, H. Komura, T. Bamba, E. Fukusaki, Predication of Japanese green tea (Sen-cha) ranking by volatile profiling using gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis, *J Biosci Bioeng* 112 (2011) 252-255.
- [57] A. Takahashi, T. Hasegawa, 緑茶の香気の特徴をどう捉えるか, *茶* 65 (2012) 6-9.
- [58] T. Hasegawa, Y. Kishi, Y. Kato, K. Akutsu, D. Jingu, A. Takahashi, E. Tanaka, K. Nakajima, T. Matsumoto, Comparison between aroma profiles of green tea leaves and black tea leaves derived from 'Sayamakaori', In proceedings of the 4th international conference on O-CHA (Tea) culture and science, 26-28 October 2010, Shizuoka 2011 (2011) 1-2.
- [59] T. Hasegawa, Separation of odor constituents by microscale fractional bulb-to-bulb distillation, In distillation-advances from modeling to applications, Chapter 9, Edited by Sina Zereshki, Croatia, In Tech (2012) 199-210.
- [60] C.I. Bargmann, E. Hartweg, H.R. Horvitz, Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*, *Cell* 74 (1993) 515-527.
- [61] M.K. Brown, J.L. Evans, Y. Luo, Beneficial effects of natural antioxidants

- EGCG and  $\alpha$ -lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*, *Pharmacol Biochem Behav* 85 (2006) 620-628.
- [62] C.D. Link, A. Taft, V. Kapulkin, K. Duke, S. Kim, Q. Fei, D.E. Wood, B.G. Sahagan, Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model, *Neurobiol Aging* 24 (2003) 397-413.
- [63] M.L. Florez-McClure, L.A. Hohsfield, G. Fonte, M.T. Bealor, C.D. Link, Decreased insulin-receptor signaling promotes the autophagic degradation of  $\beta$ -amyloid peptide in *C. elegans*, *Autophagy* 3 (2007) 569-580.
- [64] V. Dostal, C.D. Link, Assaying  $\beta$ -amyloid toxicity using a transgenic *C. elegans* model, *J Vis Exp* (2010).
- [65] J.G. Wood, B. Rogina, S. Lavu, K. Howitz, S.L. Helfand, M. Tatar, D. Sinclair, Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans, *Nature* 430 (2004) 686-689.
- [66] T. Tsushida, M. Suzuki, M. Kurogi, Evaluation of antioxidant activity of vegetable extracts and determination of some active compounds, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* (in Japanese) 41 (1994) 611-618.
- [67] K. Kohata, S. Mine, T. Ujihara, H. Horie, Change in anti-oxidative activities during the development of tea shoots, *Tea Research Journal* 96 (2003) 63-68.
- [68] T. Goto, Y. Yoshida, M. Kiso, H. Nagashima, Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea, *J Chromatogr A* 749 (1996) 295-299.
- [69] S.C. Cho, M.C. Park, B. Keam, J.M. Choi, Y. Cho, S. Hyun, S.C. Park, J. Lee, DDS, 4,4'-diaminodiphenylsulfone, extends organismic lifespan, *Proc Natl*

- Acad Sci U S A 107 (2010) 19326-19331.
- [70] Y. He, J. Cui, J.C. Lee, S. Ding, M. Chalimoniuk, A. Simonyi, A.Y. Sun, Z. Gu, G.A. Weisman, W.G. Wood, G.Y. Sun, Prolonged exposure of cortical neurons to oligomeric amyloid- $\beta$  impairs NMDA receptor function via NADPH oxidase-mediated ROS production: protective effect of green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate, *ASN Neuro* 3 (2011) e00050.
- [71] M. Kostomoiri, A. Fraqkouli, M. Saqnou, L.A. Skaltsounis, M. Pelecanou, E.C. Tsilibary, A.K. Tzinia, Oleuropein, an anti-oxidant polyphenol constituent of olive promotes  $\alpha$ -secretase cleavage of the amyloid precursor protein (A $\beta$ PP), *Cell Mol Neurobiol* 33 (2013) 147-154.
- [72] T. Hasegawa, T. Fujita, Y. Tsukumo, T. Fujihara, D. Jingu, A. Takahashi, K. Nakajima, Investigation of the aroma profile of green tea leaves using organic synthesis and conventional analytical techniques, *J Food Sci Eng* (2014) in press.
- [73] F. Yang, G.P. Lim, A.N. Begum, O.J. Ubeda, M.R. Simmons, S.S. Ambegaokar, P.P. Chen, R. Kaye, C.G. Glabe, S.A. Frautschy, G.M. Cole, Curcumin inhibits formation of amyloid  $\beta$  oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo*, *J Biol Chem* 280 (2005) 5892-5901.
- [74] Y. Mizukami, A. Nesumi, A. Takahashi, K. Nakajima, H. Yoshidome, Key odorants in the green tea cultivar 'Saitama42' having characteristic aromas, *Tea Research Journal* 115 (2013) 33-36.
- [75] Y. Mizukami, Y. Yamaguchi, Identification of key odorants in withering-flavored green tea by aroma extract dilution analysis, *Tea Research Journal* 107 (2009) 81-84.

- [76] D.F. Obregon, K. Rezai-Zadeh, Y. Bai, N. Sun, H. Hou, J. Ehrhart, J. Zeng, T. Mori, G.W. Arendash, D. Shytle, T. Town, J. Tan, ADAM10 activation is required for green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced  $\alpha$ -secretase cleavage of amyloid precursor protein, *J Biol Chem* 281 (2006) 16419-16427.
- [77] L. Reznichenko, T. Amit, H. Zheng, Y. Avramovich-Tirosh, M.B. Youdim, O. Weinreb, S. Mandel, Reduction of iron-regulated amyloid precursor protein and  $\beta$ -amyloid peptide by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cell cultures: implications for iron chelation in Alzheimer's disease, *J Neurochem* 97 (2006) 527-536.
- [78] T. Kuzuhara, M. Suganuma, H. Fujiki, Green tea catechin as a chemical chaperone in cancer prevention, *Cancer Lett* 261 (2008) 12-20.
- [79] G.W. Arendash, T. Mori, C. Cao, M. Mamcarz, M. Runfeldt, A. Dickson, K. Rezai-Zadeh, J. Tane, B.A. Citron, X. Lin, V. Echeverria, H. Potter, Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid- $\beta$  levels in aged Alzheimer's disease mice, *J Alzheimers Dis* 17 (2009) 661-680.
- [80] T.I. Kim, Y.K. Lee, S.G. Park, I.S. Choi, J.O. Ban, H.K. Park, S.Y. Nam, Y.W. Yun, S.B. Han, K.W. Oh, J.T. Hong, l-Theanine, an amino acid in green tea, attenuates  $\beta$ -amyloid-induced cognitive dysfunction and neurotoxicity: reduction in oxidative damage and inactivation of ERK/p38 kinase and NF- $\kappa$ B pathways, *Free Radic Biol Med* 47 (2009) 1601-1610.

【図表】

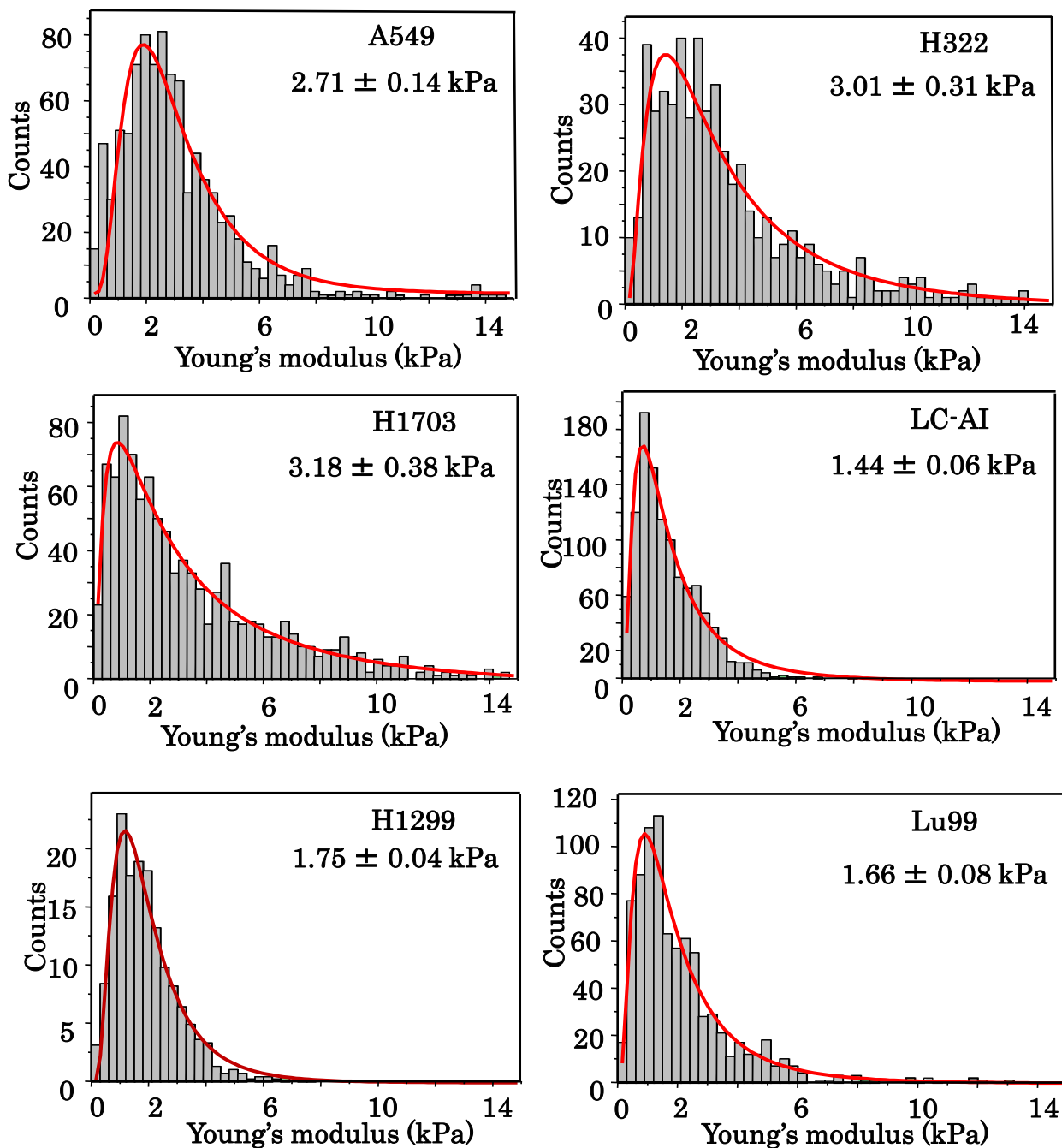


図1 6種の肺がん細胞株の細胞弾性

細胞弾性はAFMを用いフォースカーブを測定した。A549細胞: 947カーブ/73細胞、H322細胞: 535カーブ/67細胞、H1703細胞: 983カーブ/78細胞、LC-AI細胞: 1107カーブ/72細胞、H1299細胞: 1029カーブ/88細胞、Lu99細胞: 835カーブ/60細胞から得られたヤング率のヒストグラムを示した。

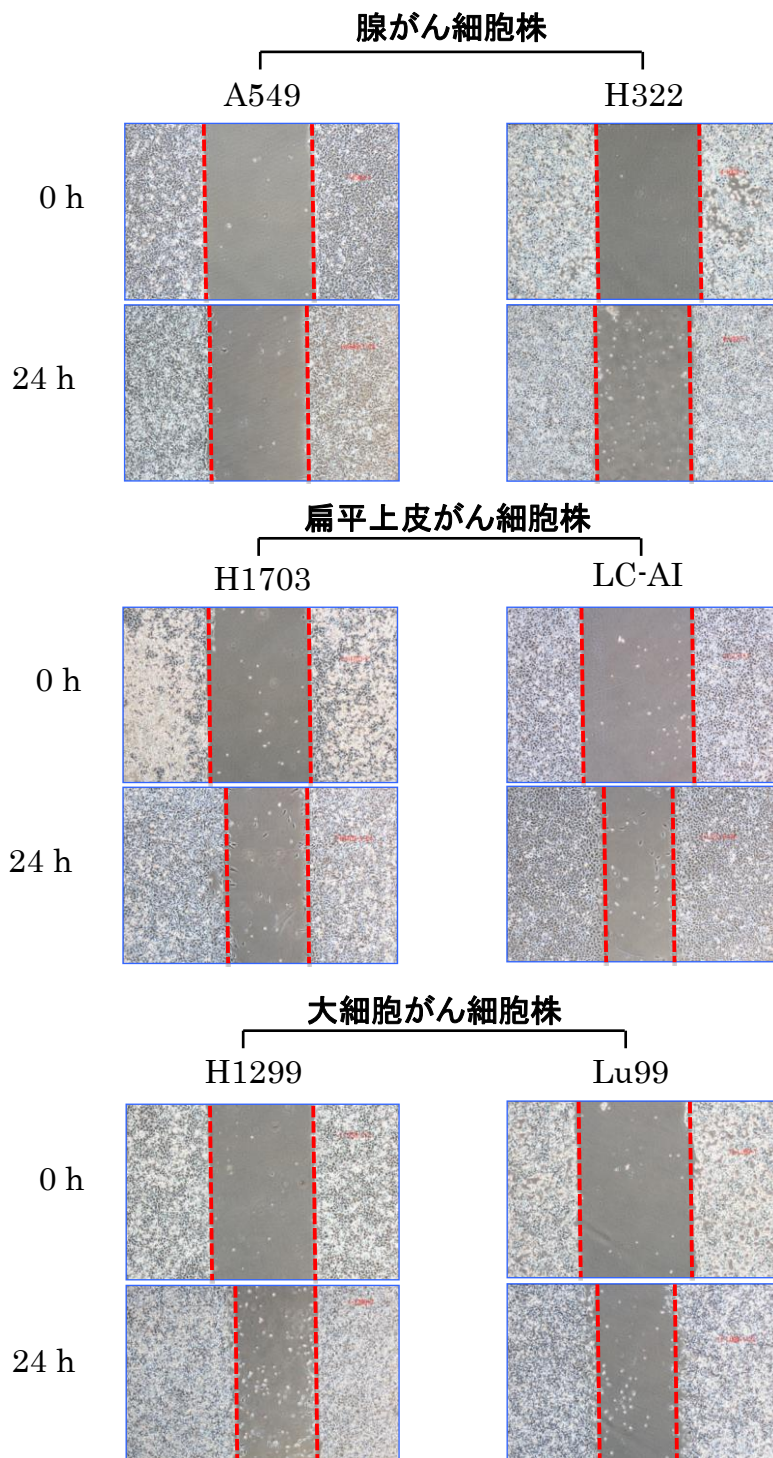


図2 6種肺がん細胞株の運動能(Wound healing 法)

コンフルエントになった細胞に傷をつけ、直後(0 h)と24時間後(24 h)の写真を示す。点線は傷の先端を示す。24時間での移動距離((24 hの傷幅) - (0 hの傷幅))を運動能とした。A549細胞は10.8  $\mu\text{m}$ 、H322細胞は9.5  $\mu\text{m}$ 、H1703細胞は13.0  $\mu\text{m}$ 、LC-AI細胞は43.2  $\mu\text{m}$ 、H1299細胞は33.0  $\mu\text{m}$ 、Lu99細胞は37.8  $\mu\text{m}$ であった。

表1 6種の肺がん細胞株の細胞弾性と運動能

	ヤング率 (E: kPa)	Wound healing assay ( $\mu\text{m}/24\text{ h}$ )	Transwell assay (No. of migrated cells)
腺がん細胞			
A549	$2.71 \pm 0.14$	$10.8 \pm 3.1$	$83.5 \pm 24.3$
H322	$3.01 \pm 0.31$	$9.5 \pm 5.3$	$10.5 \pm 4.4$
扁平上皮がん細胞			
H1703	$3.18 \pm 0.38$	$13.0 \pm 2.8$	$85.3 \pm 25.3$
LC-AI	$1.44 \pm 0.06$	$43.2 \pm 8.8$	$312.8 \pm 111.6$
大細胞がん細胞			
H1299	$1.75 \pm 0.04$	$33.0 \pm 2.1$	$229.6 \pm 70.9$
Lu99	$1.66 \pm 0.08$	$37.8 \pm 8.4$	$257.9 \pm 71.2$

\*:  $p < 0.01$

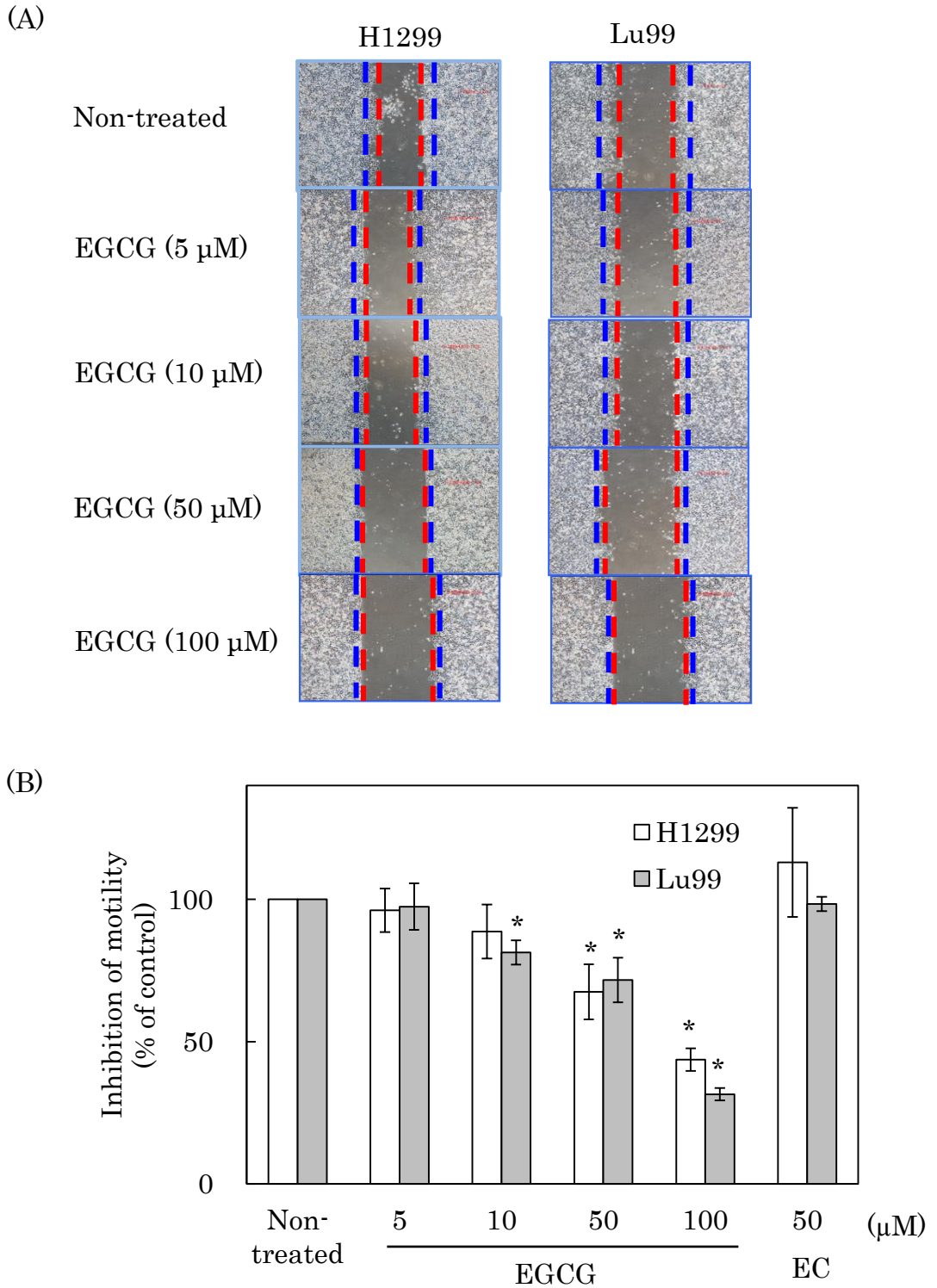


図3 EGCGによるH1299細胞およびLu99細胞の運動能抑制(Wound healing 法)  
 (A)EGCG処理直後の傷先端(青点線)と24時間後の傷先端(赤点線)を示した。(B)未処理の運動能(H1299:32.5  $\mu\text{m}$ 、Lu99:31.4  $\mu\text{m}$ )を100%として、EGCGによる運動能抑制効果を示した。\*: $p<0.01$ 、□:H1299、■:Lu99を示す。



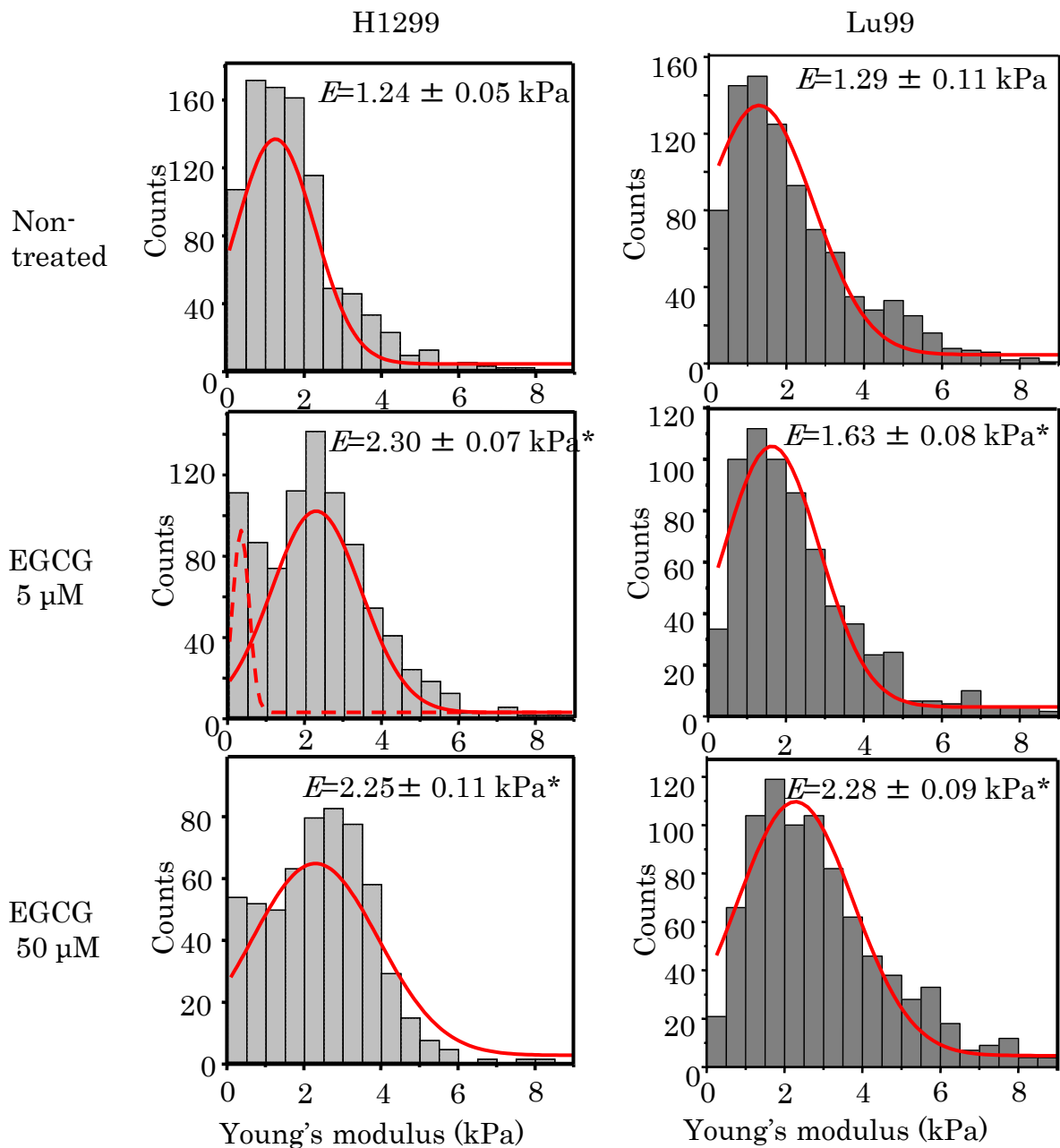


図4 EGCGによるH1299細胞およびLu99細胞の細胞弾性

細胞弾性はAFMを用いフォースカーブを測定した。H1299 細胞では、non-treated: 861カーブ/70細胞、5  $\mu$ M EGCG: 896カーブ/79細胞、50  $\mu$ M EGCG: 555カーブ/35細胞、Lu99 細胞では、non-treated: 895カーブ/62細胞、5  $\mu$ M EGCG: 687カーブ/57細胞、50  $\mu$ M EGCG: 885カーブ/44細胞から得られたヤング率のヒストグラムを示した。

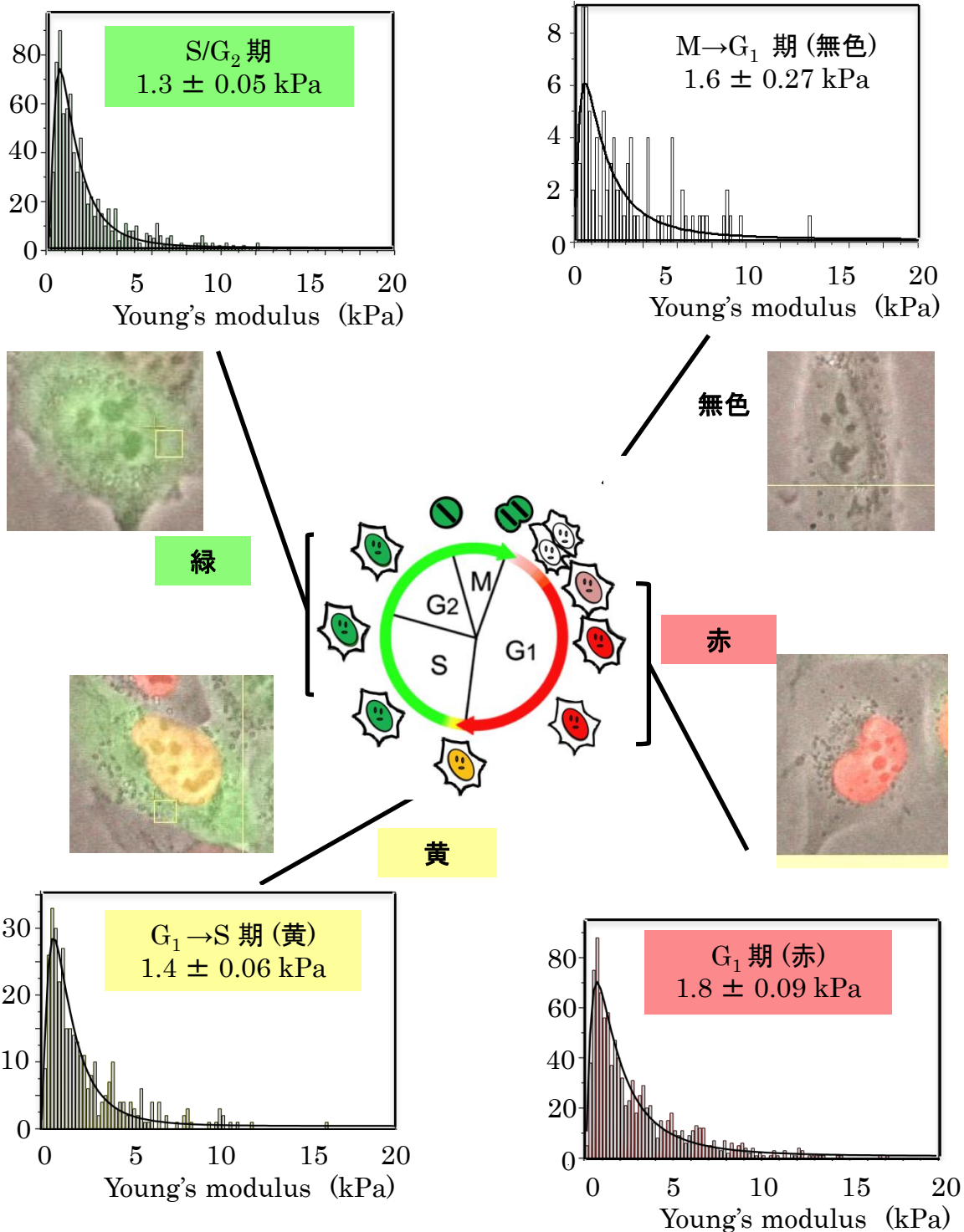


図5 Fucci/H1299細胞における細胞周期と細胞弾性との関連性

Fucci/H1299細胞の細胞弾性をAFMで測定した後、赤色をG<sub>1</sub>期、黄色をG<sub>1</sub>→S期、緑色をS/G<sub>2</sub>期、無色をM→G<sub>1</sub>期として分けた。赤色:1004カーブ/73細胞、黄色:336カーブ/25細胞、緑色:829カーブ/64細胞、無色:86カーブ/6細胞から得られたヤング率をヒストグラムで示した。

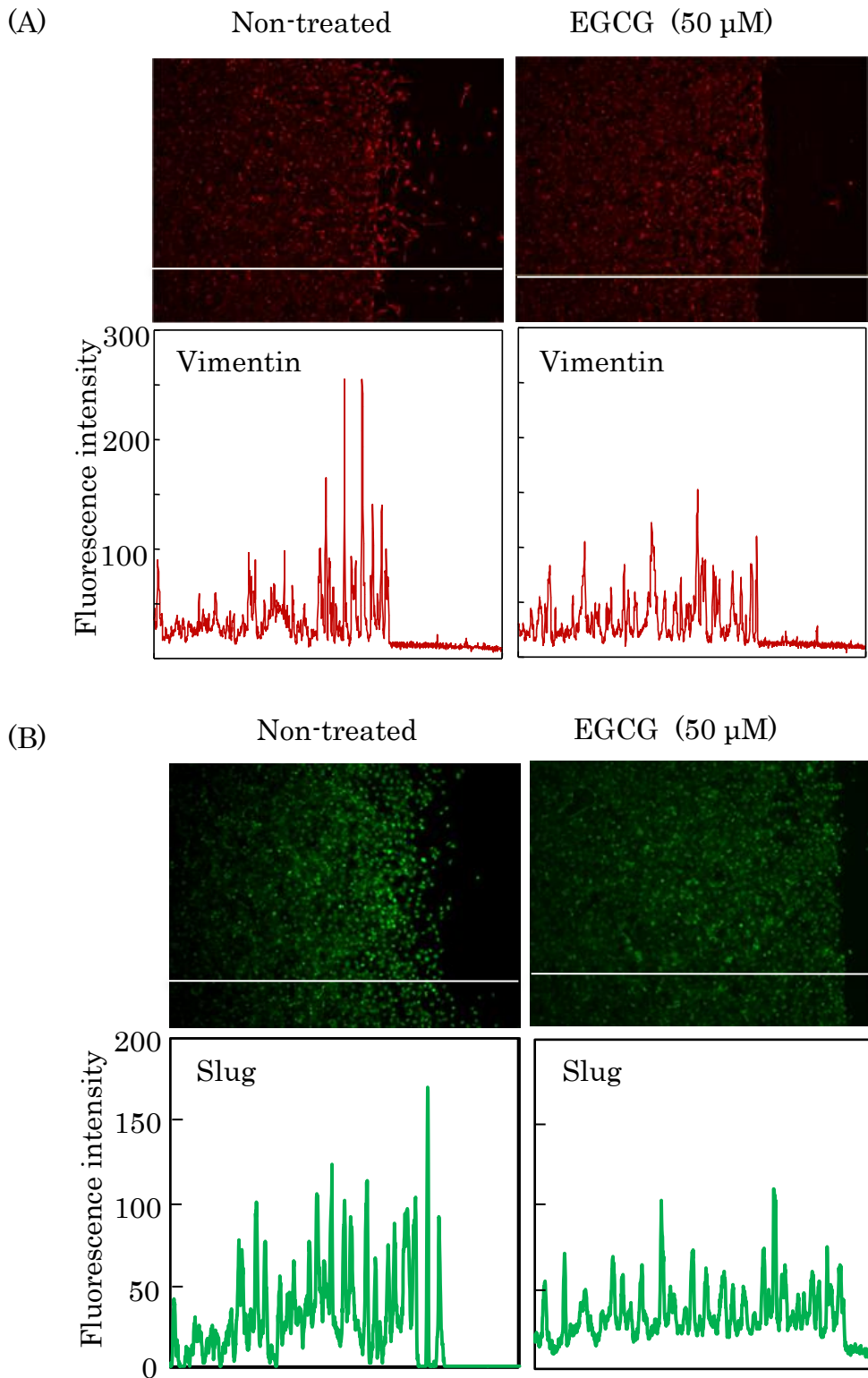


図6 EGCGによるH1299細胞の傷先端におけるvimentinおよびSlug発現の抑制

H1299細胞を傷つけた24時間後、細胞を固定し、蛍光免疫染色を行った。(A)未処理と50  $\mu$ M EGCG処理の細胞におけるvimentinの発現、(B)Slugの発現。下のグラフは写真上の線の蛍光強度(Fluorescence Intensity)を示す。

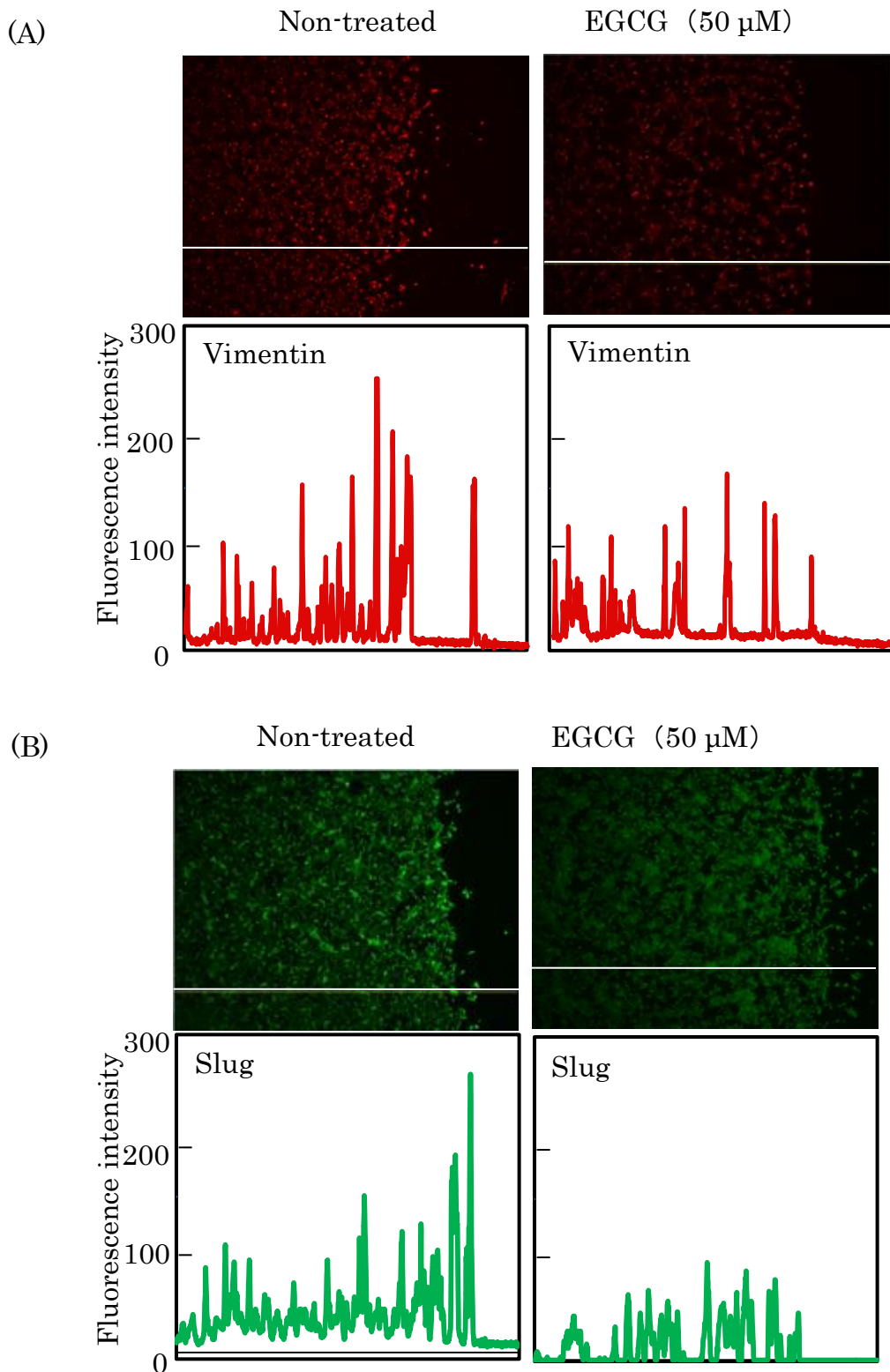


図7 EGCGによるLu99細胞の傷先端におけるvimentinおよびSlug発現の抑制

Lu99細胞を傷つけた24時間後、細胞を固定し、蛍光免疫染色を行った。(A)未処理とEGCG 50  $\mu$ M処理の細胞におけるvimentinの発現、(B)Slugの発現。下のグラフは写真上の線の蛍光強度(Fluorescence intensity)を示す。

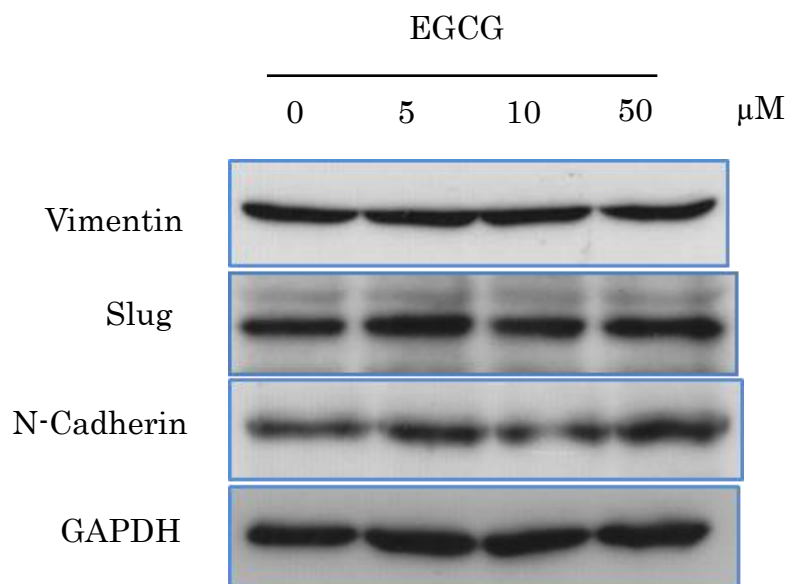


図8 H1299細胞におけるEGCGのvimentin、SlugおよびN-cadherinタンパク発現に及ぼす影響

EGCG処理24時間後、H1299細胞からタンパク質抽出を行い、ウエスタンブロッティングを行った。内部標準としてGAPDHを用いた。

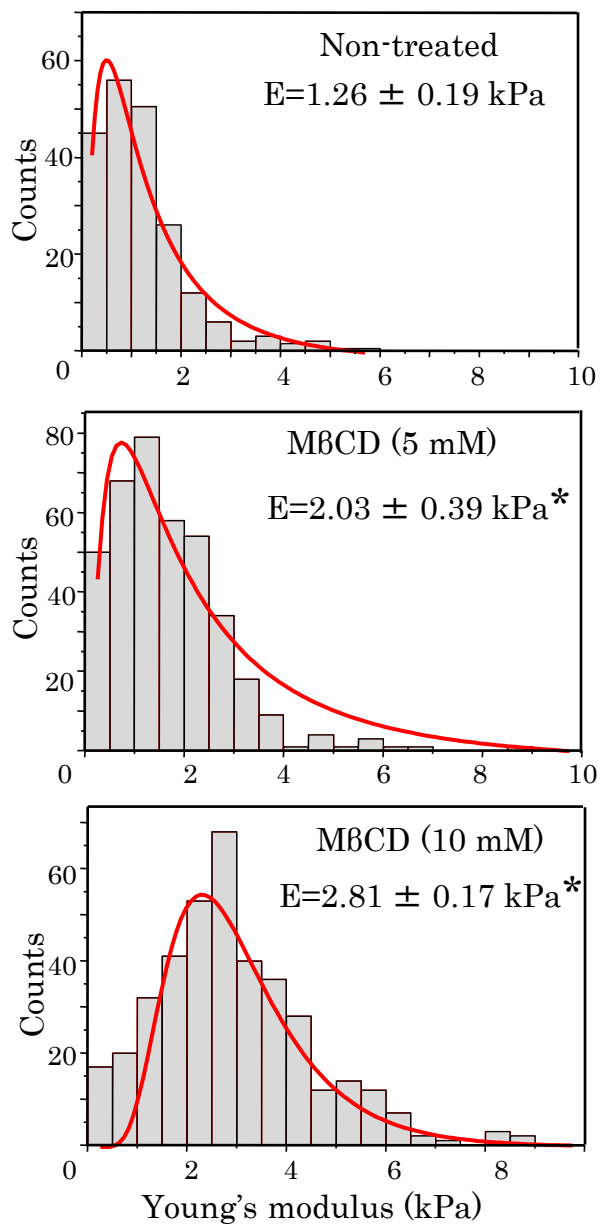
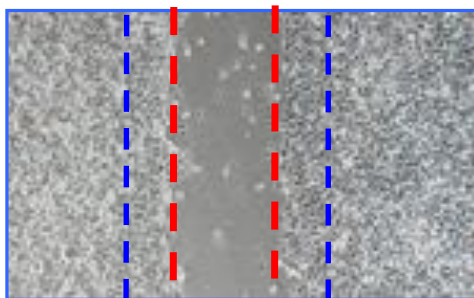


図9 M8CDによるH1299細胞の硬化作用

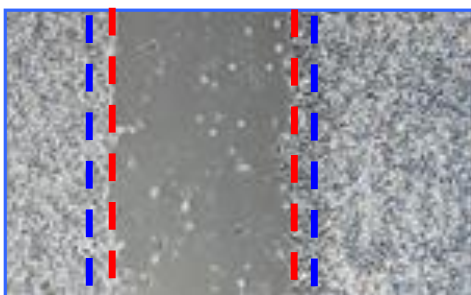
H1299細胞の細胞弾性はAFMを用いフォースカーブを測定した。Non-treated: 861カーブ/70細胞、M8CD(5 mM): 392カーブ/26細胞、M8CD(10 mM): 382カーブ/35細胞から得られたヤング率のヒストグラムを示した。

(A)

Non-treated



MBCD(10 mM)



(B)

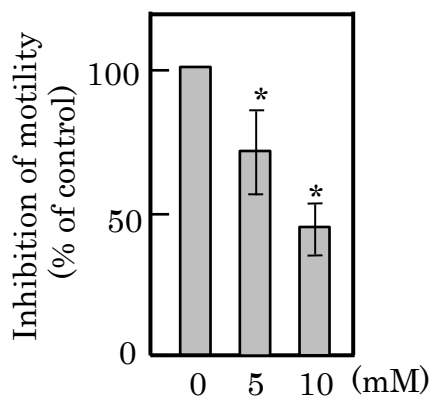


図10 MBCDによるH1299細胞の運動能抑制(Wound healing 法)

(A)MBCD処理直後の傷先端(青点線)と24時間後の傷先端(赤点線)を示した。(B)未処理の運動能(34.0  $\mu\text{m}$ )を100%として、MBCDによる運動能抑制効果を示した。

\*:  $p < 0.0001$

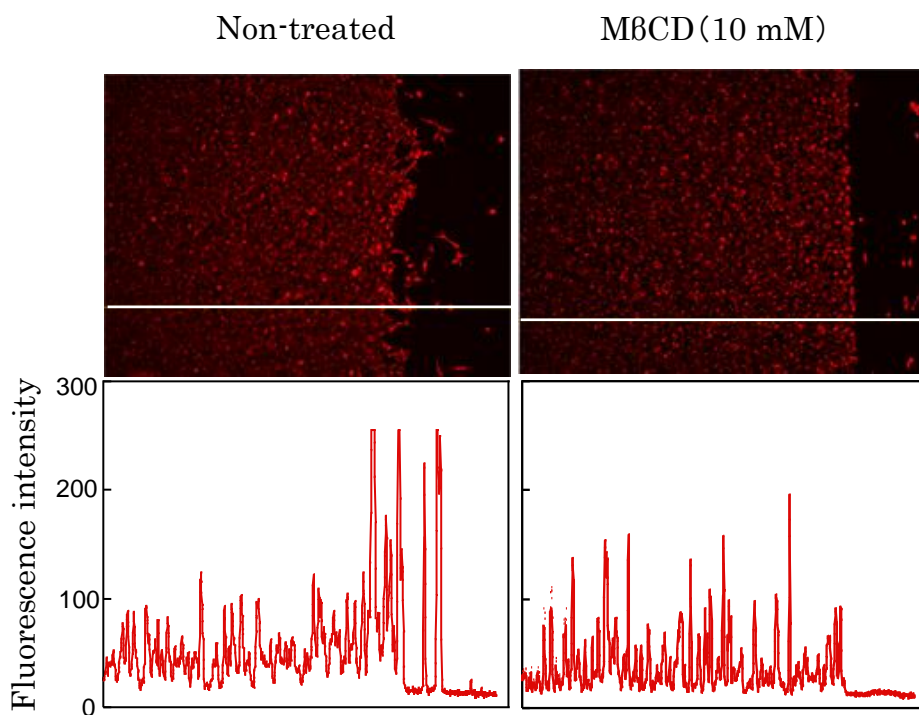


図11 MβCDによるH1299細胞の傷先端におけるvimentin発現の抑制

H1299細胞を傷つけた24時間後、細胞を固定し、蛍光免疫染色を行った。未処理とMβCD 10 mM処理の細胞におけるvimentinの発現。下のグラフは写真上の線の蛍光強度 (Fluorescence intensity)を示す。



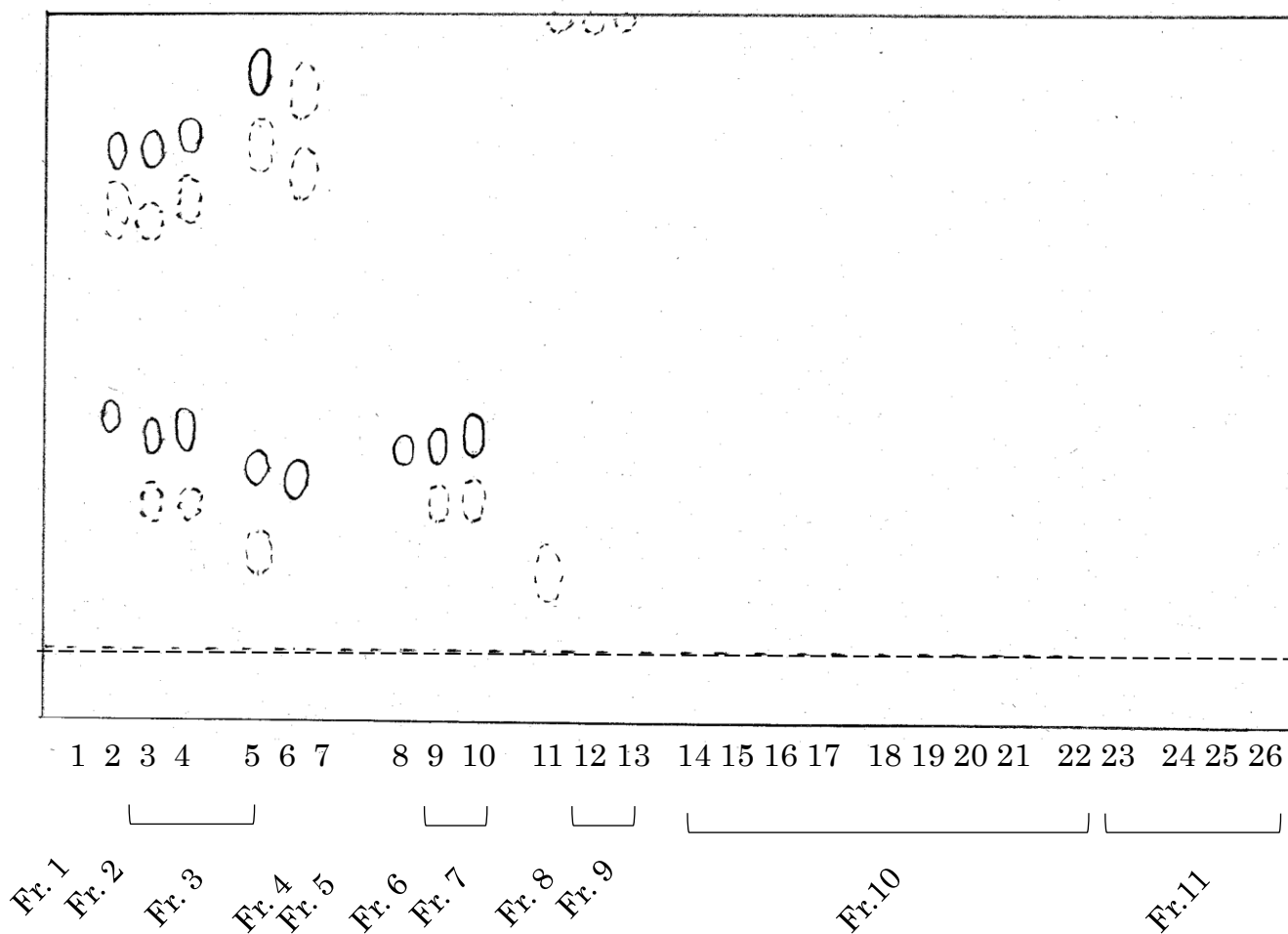


図12 シリカクロマトグラフィーで分画した画分のTLCおよびヨウ素反応定性による解析

シリカクロマトグラフィーで分画した26画分について、TLCによる色素分離(実線)およびヨウ素反応(破線)で定性し、類似の画分をまとめ11画分を得た。

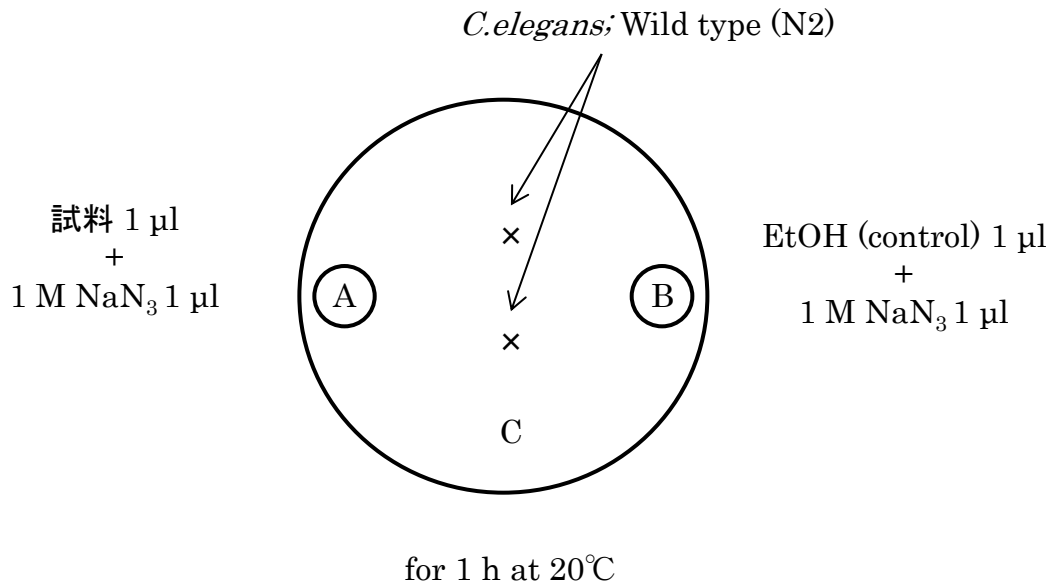


図13 化学走性測定法

25-100頭のN2を9 cm NGMプレート上で1時間自由に行動させた。  
 $CI = \frac{(A \text{領域の線虫数}) - (B \text{領域の線虫数})}{\text{総線虫数}(A+B+C)}$ で算出し、  
 +は誘引、-は忌避と判断した。

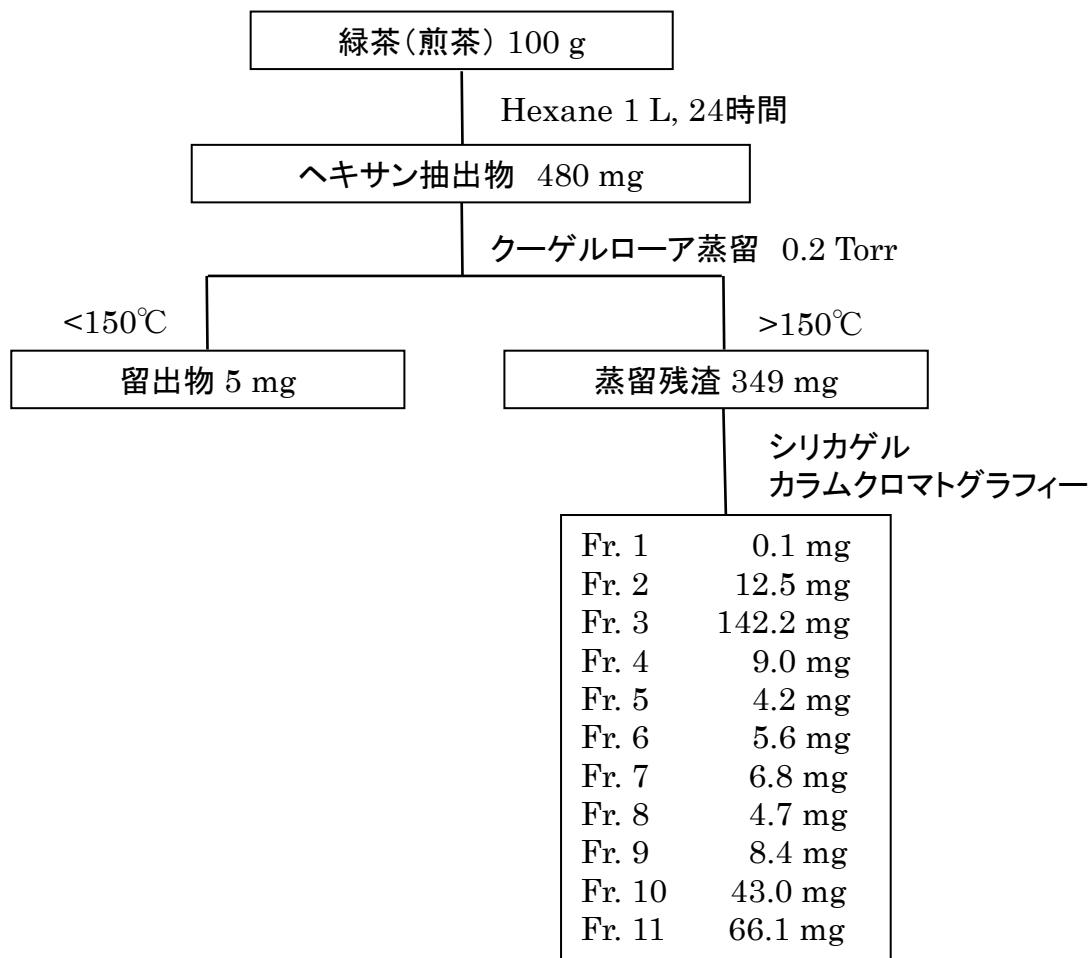


図14 緑茶香気画分の分画

緑茶葉100 gからヘキサン抽出、クーゲルローア蒸留、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画された画分の重量を示す。

表2 各画分の香気評価

	香り
ヘキサン抽出物	素材に近い香り
焙じ香気画分	香ばしい、刺激臭
抹茶様香気画分	抹茶様、甘い、こもった青臭さ
還元物	メロン様
フラクション1	
フラクション2	干し草様
フラクション3	青臭さ
フラクション4	青臭さ
フラクション5	香ばしい茶
フラクション6	青臭さ
フラクション7	青臭さ
フラクション8	青臭さ
フラクション9	抹茶様、青臭さ
フラクション10	抹茶様、青臭さ
フラクション11	抹茶様(弱)、青臭さ

表3 化学走性測定による緑茶香气成分群に対する線虫の応答

		CI
コントロール		-0.011
ヘキサン抽出物	10 µg/µl	0.004
	100 µg/µl	0.092*
焙じ香气画分	0.2 µg/µl	-0.084
	2.0 µg/µl	-0.026
抹茶様香气画分	10 µg/µl	-0.018
	100 µg/µl	0.120**
Indole	100 µM	0.008
Coumarin	100 µM	0.014
Isoamyl alcohol	1 %	0.508**

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

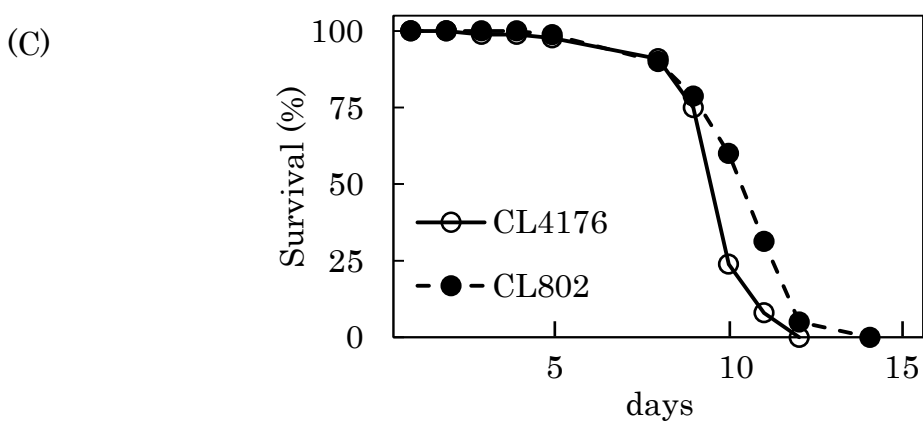
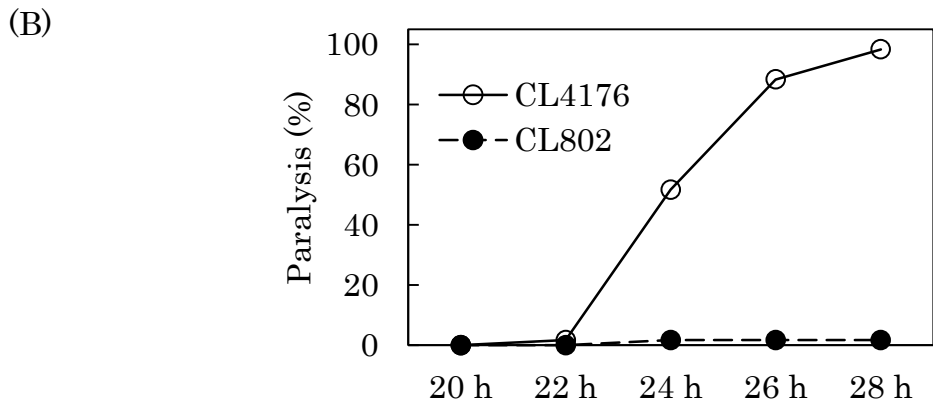
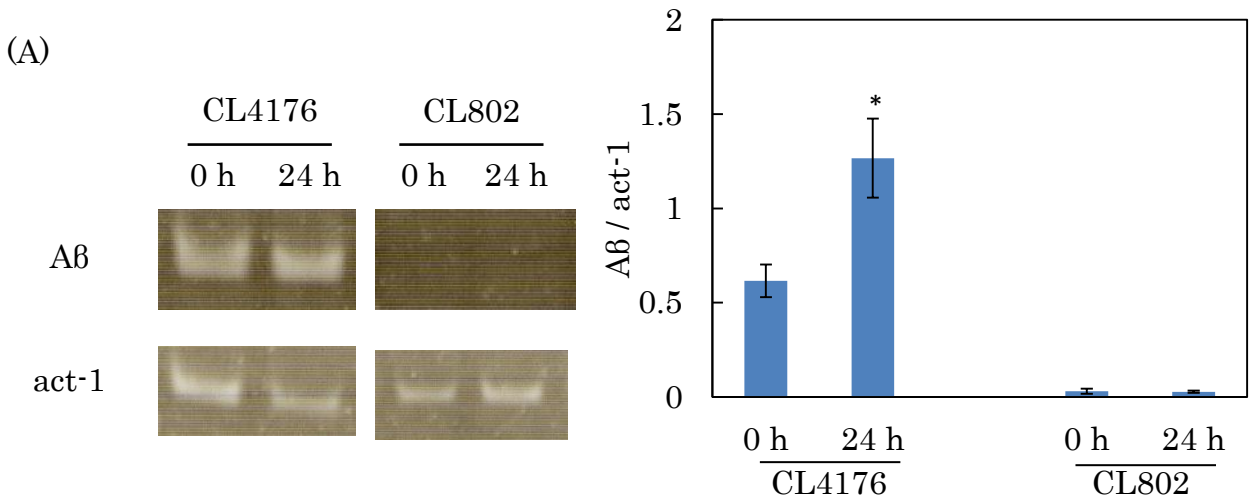


図15 CL4176におけるAβ<sub>42</sub>発現によるパラリシス誘導と寿命短縮

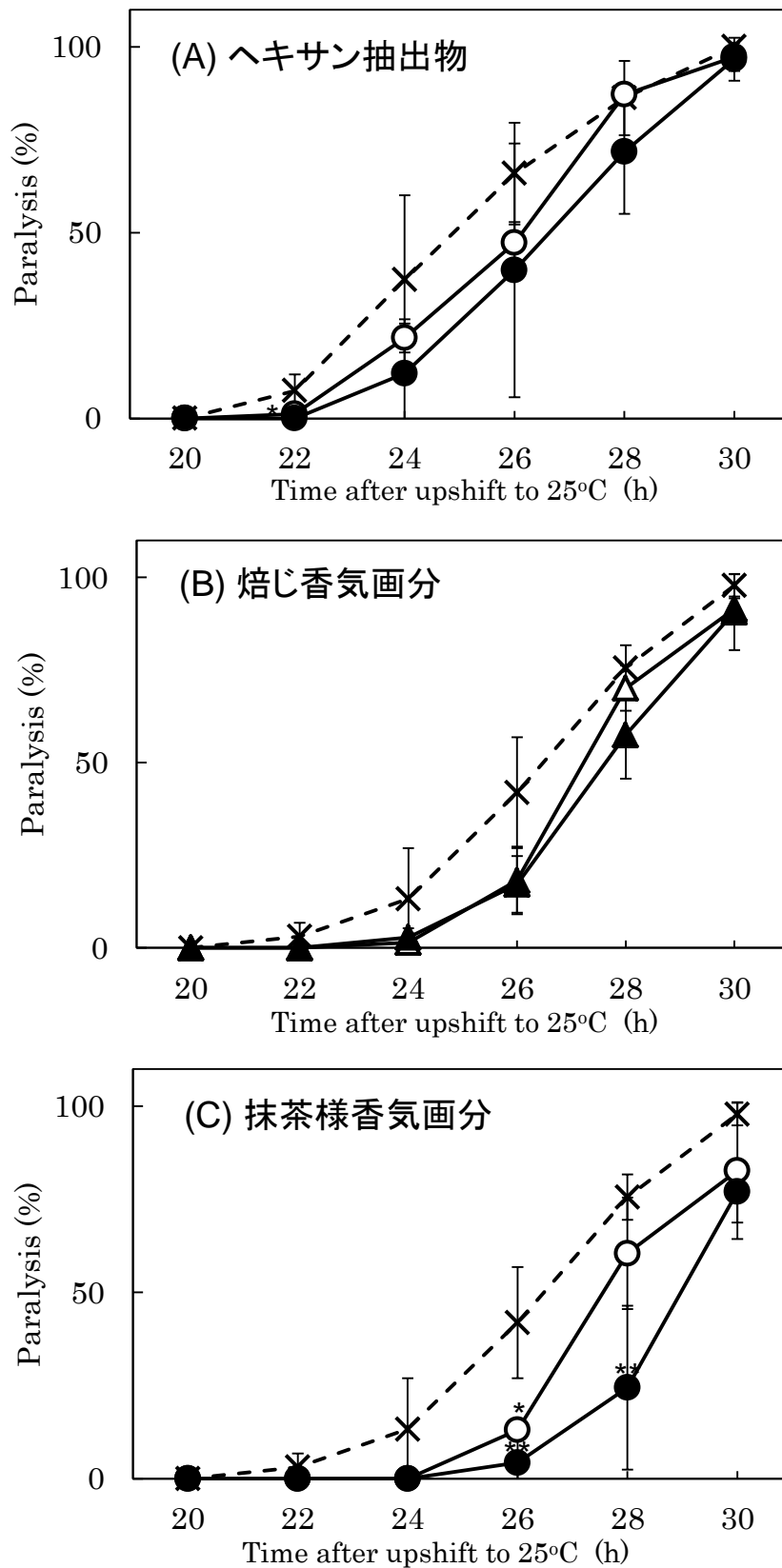


図16 ヘキサン抽出物・焙じ香气画分・抹茶様香气画分の $A\beta_{42}$ によるパラリシス抑制  
 L3期のCL4176を25°Cにup-shiftし、20時間後からパラリシスを測定した。  
 ×(コントロール), ○(10 μg/ml), ●(100 μg/ml), Δ(0.2 μg/ml), ▲(2 μg/ml)  
 \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

表4 ヘキサン抽出物、焙じ香気画分および抹茶様香気画分のAβ<sub>42</sub>誘導によるパラリシス抑制

		No. of nematodes	PT50 (h)	Delayed time (h)	28 h paralysis ratio (%)
コントロール	0 µg/ml	115	24.7 ± 1.1	-	86.2 ± 8.1
ヘキサン抽出物	10 µg/ml	78	26.1 ± 0.3	1.4	87.1 ± 0.7
	100 µg/ml	112	26.5 ± 1.5	1.8**	75.4 ± 17.0
Curcumin	100 µM	96	26.7 ± 1.4	2.0**	72.1 ± 26.0
コントロール	0 µg/ml	71	26.3 ± 0.8	-	75.6 ± 6.1
抹茶様香気画分	10 µg/ml	88	27.7 ± 0.4	1.4*	60.5 ± 15.0
	100 µg/ml	80	28.7 ± 0.8**	2.4**	24.4 ± 22.0**
焙じ香気画分	0.2 µg/ml	84	27.2 ± 0.0	0.9	70.1 ± 6.1
	2.0 µg/ml	84	27.7 ± 0.5	1.4	57.5 ± 11.9

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

PT50: 50%の線虫がパラリシスを起こした時間。

Delayed time: コントロールとのPT50の差。



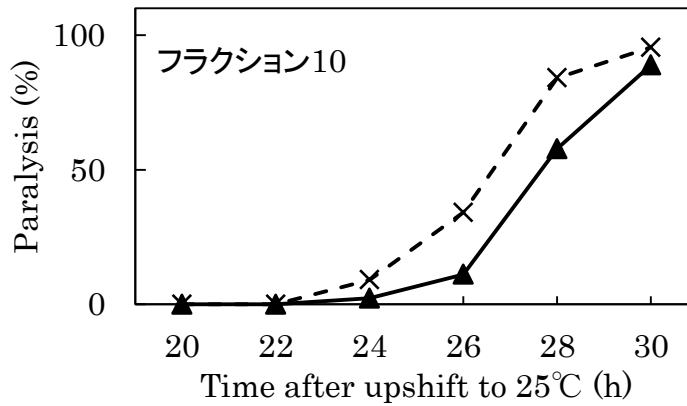
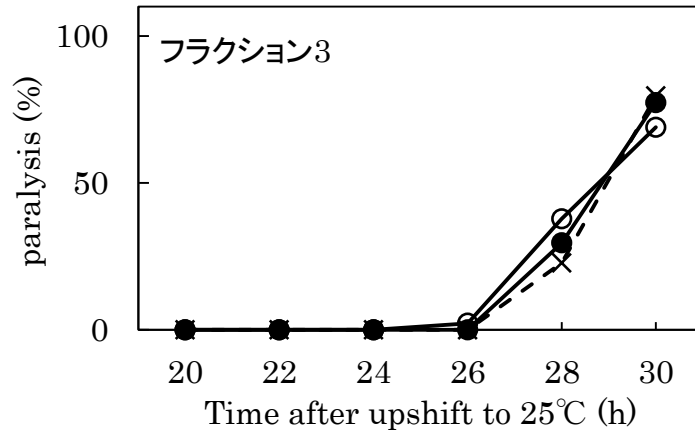


図17 フラクシオン3、10のAβ<sub>42</sub>誘導によるパラリシス抑制

CL4176のL3期から25°Cにup-shiftし、20時間後からパラリシスを測定した。代表的な1回の試験の図を示した。×(コントロール), ○(10 μg/ml), ●(100 μg/ml), ▲(20 μg/ml)

表5 分画フラクションのAβ<sub>42</sub>誘導によるパラリシス抑制

	n	PT50 (h)	Delayed time (h)	28 h paralysis ratio (%)
コントロール	44	29.0	-	22.7
Fr.3 10 μg/ml	45	28.8	-0.2	37.8
100 μg/ml	44	28.9	-0.1	29.5
コントロール	133	25.8 ± 1.3	-	85.8 ± 2.3
Fr.10 20 μg/ml	134	26.9 ± 0.9	1.1	74.4 ± 19.4

Fr.3は1回、Fr. 10は3回の試験。

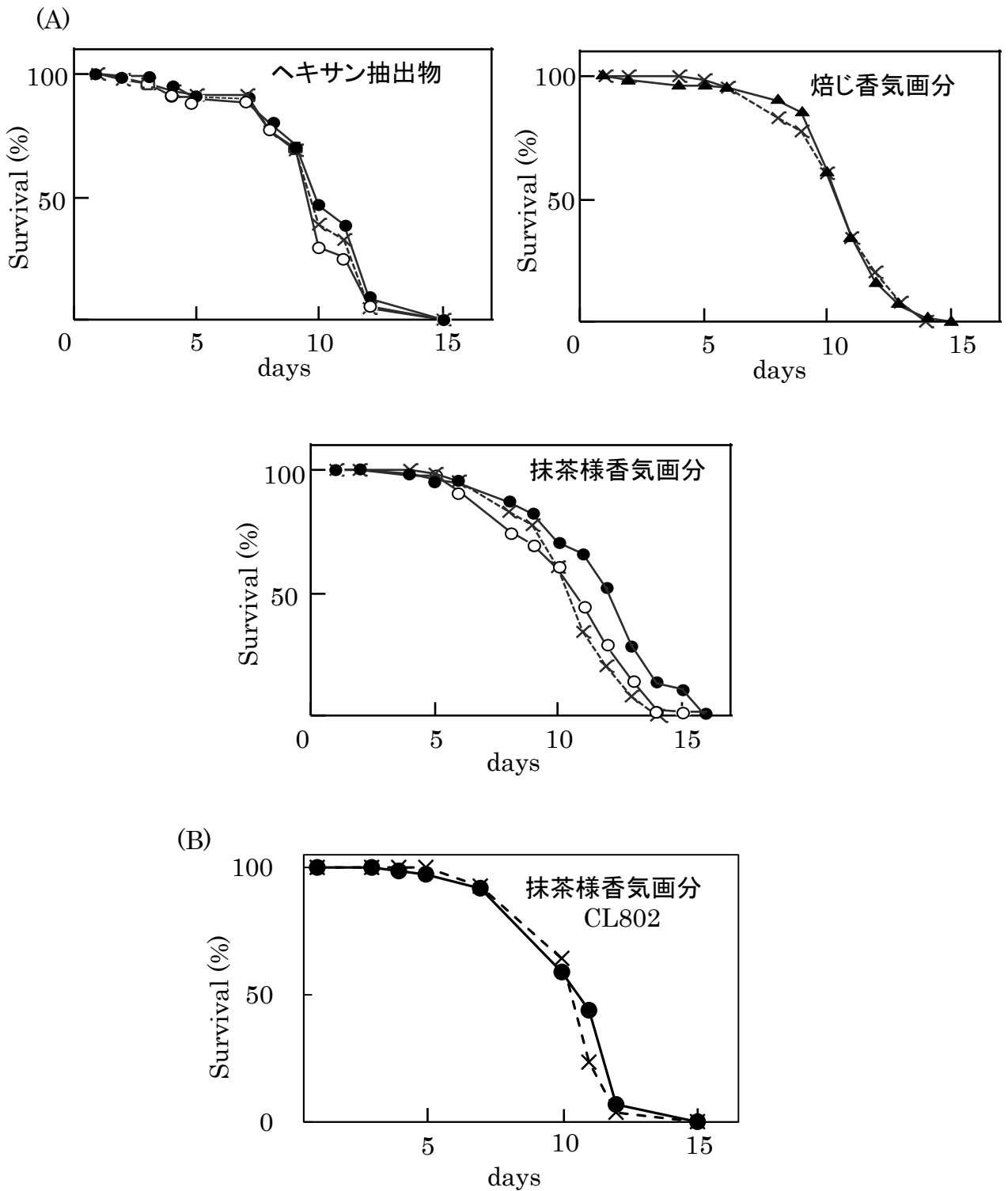


図18 ヘキサン抽出物・焙じ香氣画分・抹茶様香氣画分の $AB_{42}$ 毒性による寿命短縮の抑制  
 CL4176(A)とCL802(B)をyoung adult期の25°Cに昇温した日を、寿命の第1日目とした。  
 ×(コントロール), ○(10 µg/ml), ●(100 µg/ml), Δ(0.2 µg/ml), ▲(2 µg/ml)の結果を示す。

表6 ヘキサン抽出物、焙じ香気画分および抹茶様香気画分のA $\beta$ <sub>42</sub>毒性による寿命短縮抑制

		No. of nematodes	Mean lifespan (days)	Maximal lifespan (days)
コントロール	0 $\mu$ g/ml	130	9.9 $\pm$ 0.3	14.0
ヘキサン抽出物	10 $\mu$ g/ml	130	9.8 $\pm$ 0.8	13.0
	100 $\mu$ g/ml	130	10.3 $\pm$ 0.6	15.0
DDS	2 mM	131	11.3 $\pm$ 0.5*	16.0
コントロール	0 $\mu$ g/ml	132	10.7 $\pm$ 0.6	13.7
抹茶様香気画分	10 $\mu$ g/ml	80	10.7 $\pm$ 0.8	16.0
	100 $\mu$ g/ml	130	12.0 $\pm$ 0.5*	16.0
焙じ香気画分	2.0 $\mu$ g/ml	130	10.8 $\pm$ 0.4	13.7

\*:  $p < 0.05$

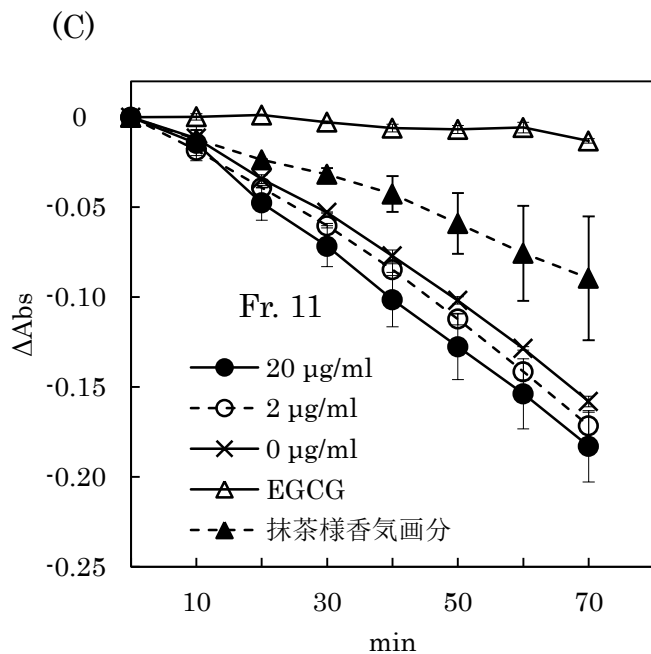
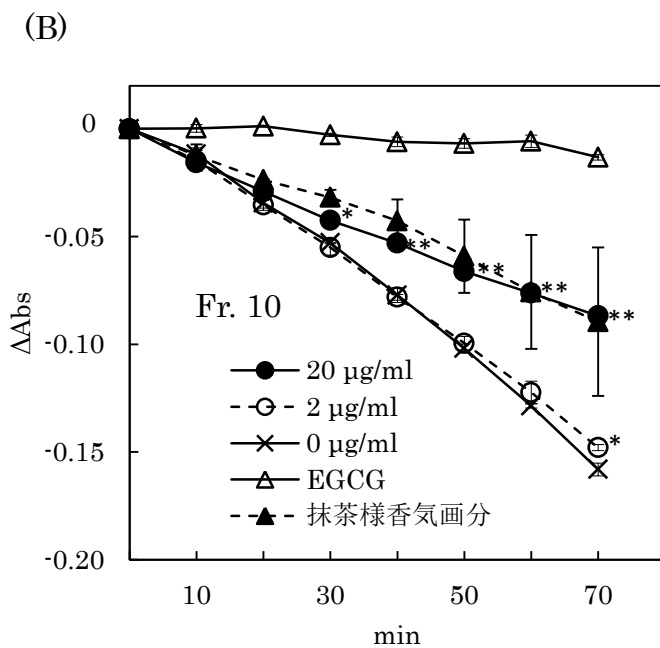
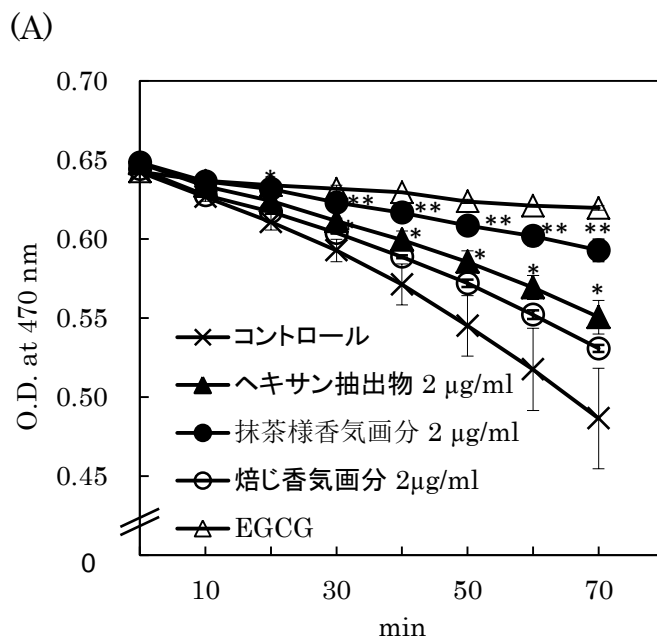


図19 各香り画分の抗酸化能

(A)各画分は吸光度の経時変化。(B)Fr. 10、(C)Fr. 11は吸光度の減少を $\Delta$ Absで示した。EGCGはポジティブコントロールとして2  $\mu$ M処理した。抹茶様香り画分は2  $\mu$ g/ml処理した。  
\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

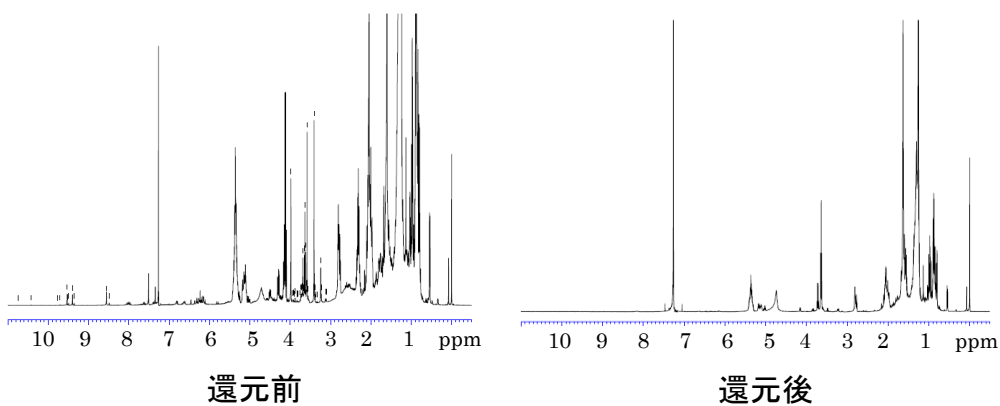


図20 抹茶様香気画分の還元によるNMR吸収の変化

抹茶様香気画分還元前と還元後のNMRチャート。

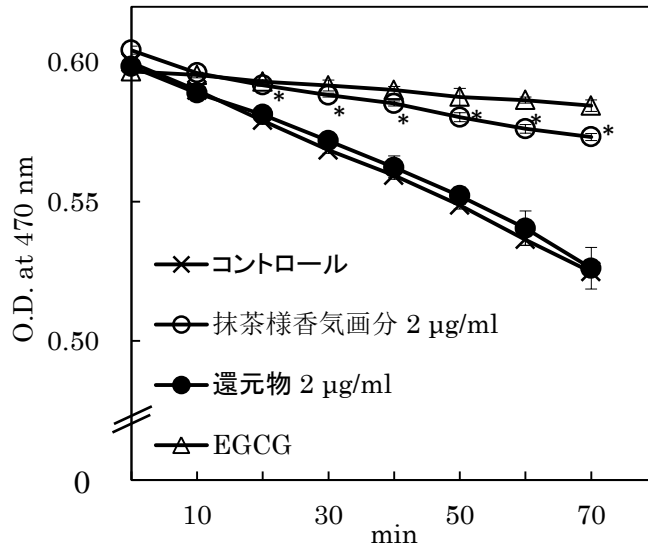


図21 各香気画分の抗酸化能

還元物の吸光度の経時変化。EGCGはポジティブコントロールとして2 µM処理した。

\*:  $p < 0.05$

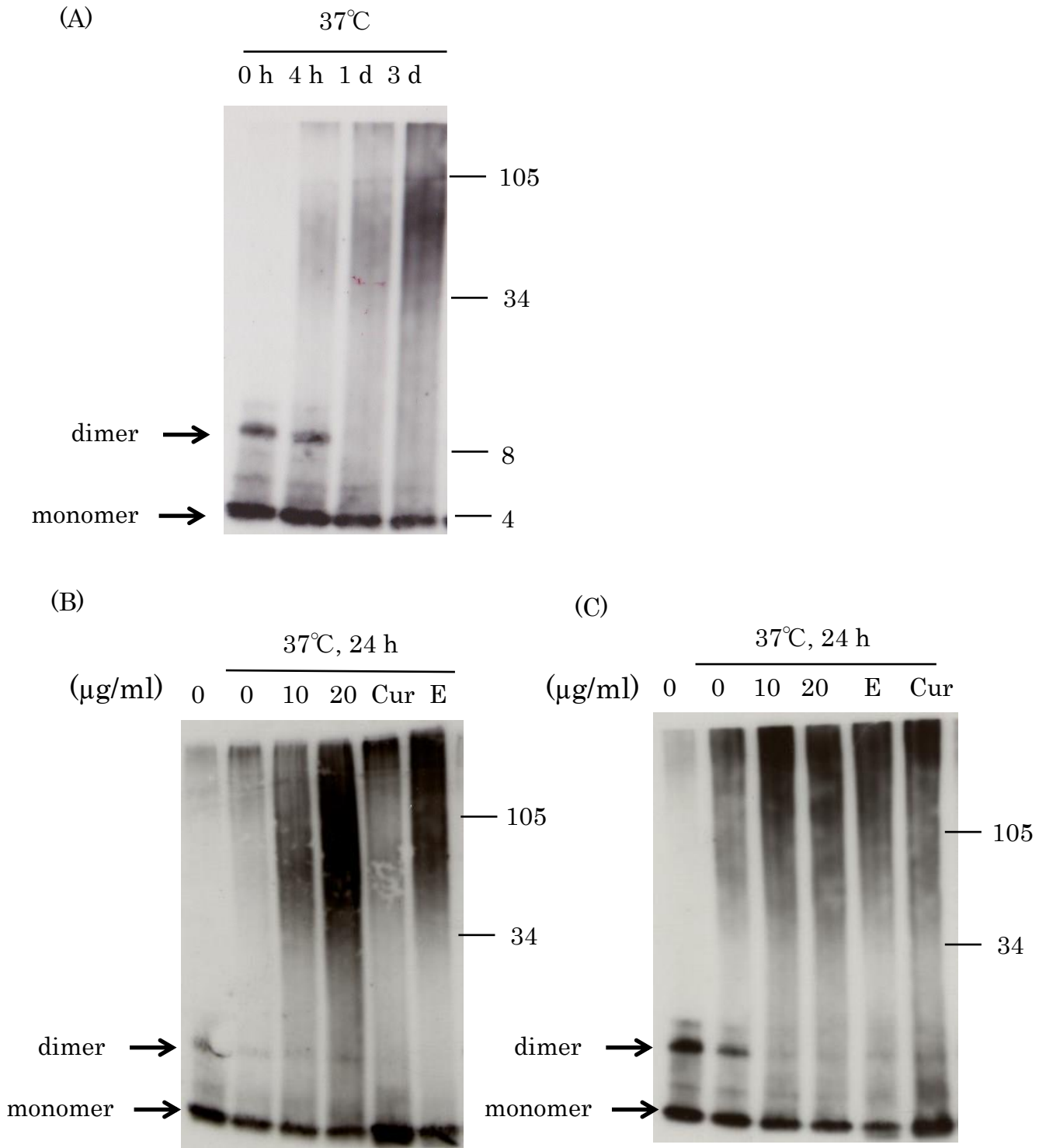


図22 各画分のA $\beta_{42}$ 凝集抑制効果

(A)A $\beta_{42}$ の凝集の経時変化、(B)抹茶様香気画分、(C) Fr. 10、curcumin(Cur, 128  $\mu$ M)とEGCG(E, 100  $\mu$ M)はポジティブコントロールとして用いた。



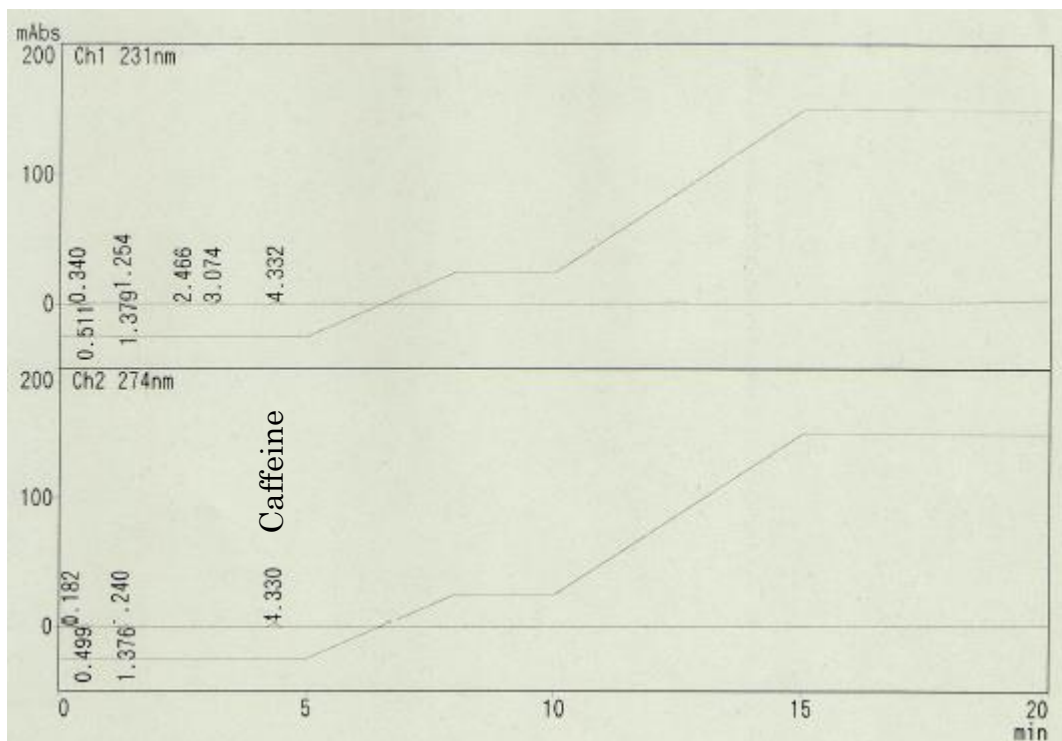


図23 HPLCによるヘキササン抽出物中のカテキン類およびcaffeine分析

上段:カテキン類の検出(231 nm)。ピークは認められなかった。  
 下段:caffeineの検出(274 nm)。4.33 minにピークを認めた。

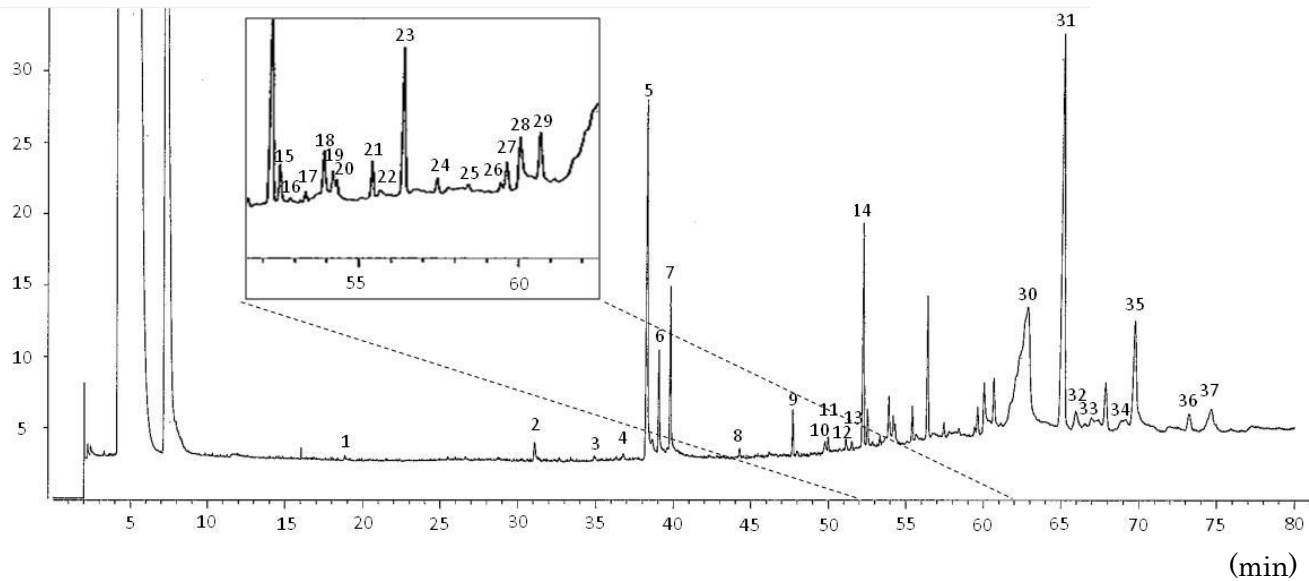


図24 抹茶様香気画分のGC-MSクロマトグラム

37成分が検出された。

表7 GC分析により検出された抹茶様香気画分の成分

Peak	Compound(s)	Retention time	Retention index
1	2,6-Dimethyl-3-heptanone, 2,3-Octanedione, 2-Methyl-3-octanone	18.85	1470
2	1,2,3,4-Tetrahydro-1,5,8-(or -1,6,8- or -1,1,6-) trymethyl-naphthalene, 2,3-Dihydro-1,1,5,6-(or -1,1,4,7- or -1,1,4,5- or -1,1,4,6-) tetramethyl-1H-indene	31.09	1909
3	<u>Anethole</u>	34.94	2075
4	3,7,11,15-Tetramethyl-1-hexadecanol, ( <i>E</i> )-9-Eicosene, 3,7,11,15-Tetramethyl-R·R,R·( <i>E</i> )-2-hexadecene	36.78	2144
5	Octadecanal, ( <i>Z</i> )-9-Octadecen-1-ol, Hexadecanal	38.31	2200
6	3-Eicosyne	39.05	2228
7	9-Eicosyne	39.80	2256
8	( <i>E,E</i> )-7,11,15-Trimethyl-3-methylene-hexadeca-1,6,10,14-tetrane	44.26	2423
9	Tricosane	47.72	2552
10	Unknown	49.77	2629
11	2-Methyl-tricosane	49.97	2636
12	1-Heneicosyl formate	51.14	2680
13	( <i>Z</i> )-9-Octadecenoic acid ethyl ester	51.52	2694
14	Pentacosane	52.27	2722
15	Linoleic acid ethyl ester	52.52	2732
16	Unknown	52.83	2743
17	1-Heptacosanol	53.32	2762
18	( <i>Z,Z,Z</i> )-9,12,15-Octadecatrienoic acid ethyl ester	53.90	2783
19	R·R, R·( <i>E</i> )-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	54.18	2793
20	11-Pentyl-heneicosane	54.32	2798
21	1-Hexacosene	55.41	2840
22	10-Methyl-dodecanoic acid metyl ester, Ttetradecanoic acid	55.68	2850
23	Unknown	56.40	2877
24	Nonacosanol	57.45	2916
25	2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-tetracosane	58.41	2952
26	Unknown	59.41	2989
27	Nonacosanol	59.59	2996
28	Hexadecanoic acid	60.04	3013
29	2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-tetracosane	60.68	3037
30	1-Hexacosane	62.91	3120
31	Squalene	65.19	3205
32	Caffeine	65.97	3234
33	3-Hydroxypropyl oleic acid ester, ( <i>E</i> )-8-Octadecenoic acid methyl ester, ( <i>Z</i> )-2-(or -2,3-) Hydroxyethyl-9-octadecenoic acid ester	66.94	3271
34	( <i>Z, Z</i> )-9,12-Octadecadienoic acid	68.90	3344
35	Unknown	69.77	3376
36	Unknown	73.21	3505
37	1-Hentetracontanol, 1-Dotryacontanol	74.65	3559

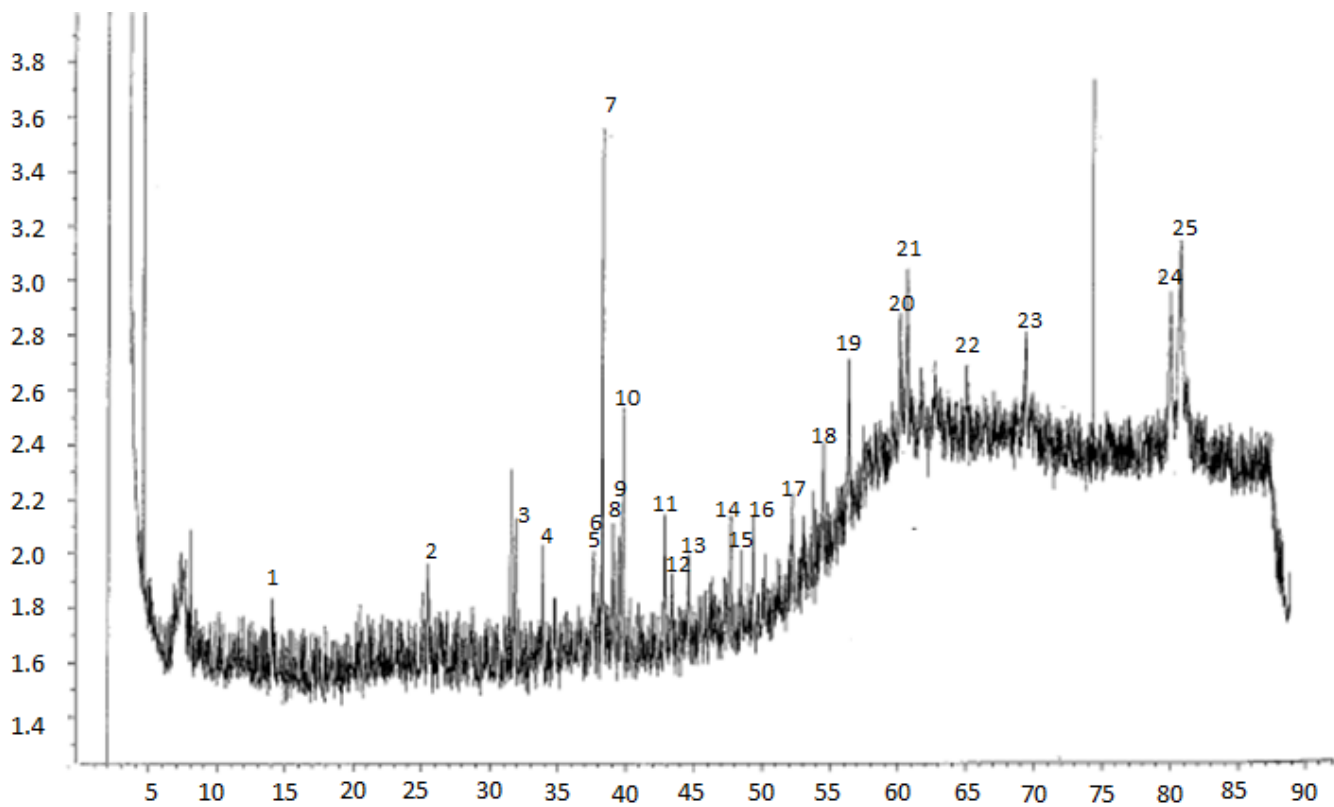


図25 フラクション10のGC-MSクロマトグラム

25成分が検出された。

表8 GC分析により検出されたフラクション10の成分

Peak	Compound(s)	Retention time	Retention index
1	(S)-or (R)-1-Methyl-4-(1-methylethenyl)-cyclohexene (R)-1-Methyl-5-(1-methylethenyl)-cyclohexene	13.99	1292
2	2,3-Dihydro-2-(1propenyl)-naphtho 1,2-b furan	25.49	1706
3	3-Methyl-octadecane	31.84	1917
4	2-Methyl-octadecane 3-Methyl-heptadecane	33.80	2032
5	3-Methyl-eicosane	37.60	2174
6	(E)-9-Eicosene	37.90	2185
7	1-Eicosyne	38.25	2198
8	3-Eicosyne	39.05	2228
9	2,3-Dimethyl-nonadecane 3-Methyl-nonadecane	39.45	2243
10	9-Eicosyne	39.78	2256
11	2-Methyl-eicosane	42.84	2370
12	1-Eicosene	43.41	2391
13	Docosane 3-Methyl-heneicosane	44.58	2435
14	2,4-Dimethyl-docosane	47.66	2550
15	1-Docosene	48.45	2579
16	Docosane	49.30	2611
17	11-(2,2-Dimethylpropyl)-heneicosane	52.17	2718
18	5-Ethyl-5-methyl-tetracosane	54.50	2805
19	Unknown	56.36	2875
20	Hexadecanoic acid	60.11	3015
21	2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-tetracosane	60.63	3035
22	Squalene	64.97	3197
23	13-Hexacosyne 11-Hexacosyne	69.27	3358
24	Unknown	79.97	3758
25	1-Hexacosene	80.67	3784