



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | カテキン、プロアントシアニジンの抗酸化および抗アレルギー作用機構に関する研究                                                                                                                                                                                                                                              |
| Author(s)    | 近藤, 一成                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Citation     | 大阪大学, 2001, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/42789">https://hdl.handle.net/11094/42789</a>                                                                                                                                                                                                 |
| rights       |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a>&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 <sup>こん</sup>近 <sup>どう</sup>藤 <sup>かず</sup>一 <sup>なり</sup>成

博士の専攻分野の名称 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 1 6 3 7 5 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 13 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 カテキン、プロアントシアニジンの抗酸化および抗アレルギー作用機構に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査)  
教 授 小 林 資 正

(副査)  
教 授 北 泰 行 教 授 大 森 秀 信 教 授 松 田 敏 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

カテキン (catechin) は flavan-3-ol を基本骨格とするフラボノイドの一種で、epicatechin (EC)、epigallocatechin (EGC)、epicatechin gallate (ECG)、epigallocatechin gallate (EGCG) の4つが主成分で緑茶に多く含まれている。一方、プロアントシアニジン (proanthocyanidin) は flavan-3-ol を繰り返し単位とする重合体で、ぶどう、りんご等の種子や果皮に含まれ植物ごとに異なる重合度や結合様式を持つ複雑な化合物である。これらは慣用的にポリフェノールと称され、最近、その一つ EGCG が発ガン抑制や抗アレルギーに有効であると報告されたことからポリフェノールは注目されている。発ガン抑制作用は活性酸素消去作用 (抗酸化作用) による DNA 酸化的損傷抑制の結果と考えられており、この抗酸化作用は flavan-3-ol の B 環上の OH 基からラジカルへの 1 電子供与によるラジカル消去活性に起因しているために、B 環上に多くの隣接 OH 基を有し酸化電位の低い化合物が抗酸化活性には有利と考えられてきた。しかし、EC の抗酸化作用が類似の構造を持ちより低い酸化電位を持つフラボノイド quercetin よりも強いこと、カテキンの一部や quercetin は逆に酸化を促進し細胞毒性を示すと報告されていることから、ポリフェノールの抗酸化作用には不明な点も多く酸化促進作用と表裏一体で複雑な作用の結果であると推察できるが、その実体は明らかではなく詳細な検討が求められている。

一方、花粉症などアレルギー疾患の有病率は近年先進国で著しく上昇し、総人口の約 1/3 と言われている。そのため、アレルギー疾患予防に対する精力的な研究が求められている。ポリフェノールなど食品成分によりアレルギー疾患が軽減されることが報告されている。そこで、I 型アレルギーに対する抗アレルギー作用を、肥満細胞を用いて食品成分を探索すると抗酸化性ポリフェノールであることが多い。アレルギー、炎症反応には活性酸素も関与していることから抗酸化性物質が抗アレルギー作用を示すことは推察できるが、カテキンおよびプロアントシアニジンの抗酸化作用と抗アレルギー作用との関連性やその作用機序はこれまで全く明らかになっていない。

そこで、抗酸化作用機構については、カテキンおよびプロアントシアニジンの抗酸化作用について大豆リボソームを用いた系と水溶液中で行い、その結果から速度論的考察を行って抗酸化作用特性を明らかにした。すなわち、カテキンの B 環カテコール構造の EC および ECG は長時間抗酸化作用を示した。一方、カテキンの B 環カテコール構造の EGC および EGCG はラジカルを EC および ECG よりも早く消去できるが、分子状酸素への 1 電子供与によりスーパーオキシドアニオンラジカルを生成させることにより酸化促進的に働くことを明らかにした。次に、カテキンおよびプロアントシアニジンの複雑な抗酸化作用メカニズムを解明するために、従来用いられてきた ESR での検討では

困難と考へて、生成物を単離することなく多くの構造情報が得られるソフトイオン化を用いる高速液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC/MS) に着目し、さらに電気化学的、計算化学的解析と合わせて検討を行った。その結果、従来カテキンとペルオキシラジカルなどの酸素ラジカルとの反応は、カテキンのB環状の水酸基と反応すると考えられてきたが、それ以外にC環上のプロトン、いわゆるC-2位のプロトンも反応に関与する事が示唆された。また、サイクリックボルタメトリー (CV) での検討より2電子以上の酸化が容易に起こることから、B環状の水酸基ともう一つC-2位のプロトンが反応に関与することが強く示唆された。さらに、ラジカルとカテキンとの反応にC-2位のプロトンが関与することを実験的に証明するために、プロシアニジンB-1およびB-2 (カテキン2量体) を用いて、ラジカル反応によりC-2位のプロトンが引き抜かれた結果できるプロシアニジンA-1およびA-2 (環状カテキン2量体) が生成するかを確かめた。その結果、プロシアニジンB-1およびB-2からは、反応直後からそれぞれプロシアニジンA-1およびA-2が生成し、ラジカルとカテキンとの反応にC-2位のプロトンが関与することが示された。

次に、カテキンおよびプロアントシアニジンの抗アレルギー作用について、まず、ラット好塩基球系白血病細胞RBL-2H3を用いてヒスタミンなど炎症起因物質の遊離抑制、すなわち脱顆粒抑制効果について検討した。その結果、ブドウ種子プロアントシアニジンから分子量分画した、平均重合度10の高分子画分GSP-Hが強い脱顆粒抑制作用 ( $IC_{50} \sim 8 \mu M$ ) を示すことが判った。そこで、その作用機構を明らかにするため細胞内  $Ca^{2+}$  に与える影響を検討したところ、GSP-Hは細胞外からの容量性  $Ca^{2+}$  チャンネルを介した  $Ca^{2+}$  イオンの取り込みを抑制することを示した。また、GSP-Hは細胞内NO生成を誘起し、容量性  $Ca^{2+}$  チャンネルに抑制的に働くことが示唆された。さらに、GSP-Hの細胞膜流動性に与える影響についても検討した。肥満細胞は、抗原刺激により細胞膜流動性が更新し、脱顆粒にも影響する。検討の結果、GSP-Hは抗原刺激に伴う細胞膜流動性更新を抑制する事によっても脱顆粒を抑制することを示した。GSP-Hで肥満細胞を直接刺激すると、細胞内  $Ca^{2+}$  storeからの  $Ca^{2+}$  遊離が起こることから、IgE受容体に作用することが考えられた。プロアントシアニジンの抗酸化作用と抗アレルギー作用との関連については、抗酸化作用に重要な多くのフェノール性水酸基が細胞膜表面やIgE受容体に作用するのに重要であることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

カテキンは、フラボノイドの一種で、主成分としてB環上に2つの水酸基を有するEC、ECGと、3つの水酸基を有するEGC、EGCGがあり、緑茶に多く含まれている。また、プロアントシアニジンとはGSPなどカテキンの重合体で、ブドウの種子や果皮に含まれている。近年、カテキンやプロアントシアニジンなどのポリフェノールが、抗酸化作用、発ガン抑制効果や抗アレルギー作用を示すことで注目されている。しかしながら、これらの化合物の抗酸化作用および抗アレルギー作用の詳細な機構はこれまで明らかにされていなかった。そこで、申請者はこれらのポリフェノールの作用機構を解明するための研究を行った。

まず、カテキンとプロアントシアニジンの抗酸化作用について、リボソーム中およびバッファー中で解析した結果、カテキンのB環がカテコール構造のEC、ECGが長時間抗酸化作用を示したのに対し、B環がトリオール構造のEGC、EGCGは、分子状酸素への1電子供与によりスーパーオキシドアニオンラジカルを生成させることにより、酸化促進的にも働くことを見出した。さらに、LC-MS、サイクリックボルタムメトリー、計算化学による解析と併せて検討した結果、従来、カテキンと酸素ラジカルとの反応は、カテキンのB環上の水酸基が反応すると考えられていたが、C環上の2位のプロトンも反応に関与することを明らかにした。

つぎに、カテキンとプロアントシアニジンの抗アレルギー作用について検討した結果、ブドウ種子プロアントシアニジンGSP-Hが強い脱顆粒抑制作用を示すことを見いだした。さらに、細胞内カルシウムに与える影響を検討したところ、GSP-Hは細胞内NO生成を誘起して、形質膜カルシウムチャンネルに抑制的に働き、その結果、細胞外からのカルシウムイオンの取り込みを抑制することを明らかにした。また、GSP-Hは酸化刺激に伴う細胞膜流動性亢進を抑制することによっても、脱顆粒を抑制することを明らかにした。

以上の成果は博士(薬学)の学位論文として充分価値あるものと認められる。