

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2012 年 3 月 13 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 吉川 雅之
所属機関名： 京都薬科大学
所属部署名： 生薬学 職名： 教授
所 在 地： 京都市山科区御陵四丁野町 1
電 話： 075-595-4633 内線：



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

チャ (*Camellia sinensis*) 花部の生体機能成分の解明と定量分析

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 吉川 雅之

職名： 教授

所属機関名： 京都薬科大学

部署名： 生薬学

中国側研究者氏名： 王 涛

職名： 教授

所属機関名： 天津中医薬大学

部署名： 中医薬研究院

4. 当該研究における発表論文等

Hisashi Matsuda, Makoto Hamao, Seikou Nakamura, Haruka Kon'I, Megumi Murata,

And Masayuki Yoshikawa: Medicinal Flowers. XXXIII Anti-hyperlipidemic and

Anti-hyperglycemic Effects of Chakasaponins I—III and Structure of Chakasaponin IV from Flower

Buds of Chinese Tea Plant (*Camellia sinensis*). *Chem. Pharm. Bull.*, 60 (2010), in press.

5. 成果の概要

種々の中国産茶花を入手しサポニン成分の産地における成分変動を検討した。その結果、各地域によって、成分が大きく異なることが明らかとなった。さらに、福建省産茶花エキスがマウスにおける体重増加抑制や血中の中性脂質上昇抑制および摂食抑制作用があることを見出し、その活性成分がオレアナン型トリテルペン配糖体 *chakasaponin* 類であることを明らかにした。*chakasaponin* の摂餌量の抑制作用は消化管管腔内刺激の迷走神経求心路を介した刺激伝達経路が関与することやこれらの作用には 5-HT、GLP-1 および CCK といった摂食抑制作用を持つ刺激伝達物質が関与していることが推察された。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

共同研究者 天津中医薬大学 王 涛教授が安徽、福建省などの東南部、四川、湖北省などの中部、雲南、広西省などの南部から種々の茶花を入手し、茶花の品質評価を目的に、HPLC を用い茶花に含有されるサポニン成分などの定量分析法を開発し、主要産地における成分変動を検討した。2012 年 2 月に王 涛教授が来日し、共同研究について協議するとともに京都薬科大学で行われた『私立大学戦略的研究基盤形成支援事業生物分子システムに基づく創薬科学フロンティア研究成果発表会』に参加した。

チャ (*Camellia sinensis*) 花部の生体機能成分の解明と定量分析

研究者氏名	教授 吉川 雅之
日本所属機関	京都薬科大学
中国側共同研究代表者	教授 王 涛
中国所属機関	天津中医薬大学

要 旨

中国には、それぞれの地域の環境に適したチャが栽培されており、それらの花の成分組成は大きく異なることが予想される。そこで、安徽、福建省などの東南部、四川、湖北省などの中部、雲南、広西省などの南部から種々の茶花を入手し、茶花の品質評価を目的に、HPLC を用い茶花に含有されるサポニン成分などの定量分析法を開発し、主要産地における成分変動を検討した。また、福建省産茶花エキスをマウスにおける体重増加抑制や血中の中性脂質上昇抑制および摂食抑制作用があることを見出したことから、活性成分の探索を行った。その結果、オレアナン型トリテルペン配糖体 chakasaponin 類に摂食抑制作用があることを見出した。次に、chakasaponin 類の摂食抑制の作用機序について検討を行った結果、chakasaponin は視床下部において食欲亢進に関与する neuropeptide Y (NPY) mRNA の発現を有意に抑制させることが明らかとなった。また、chakasaponin の摂餌量の抑制作用は消化管管腔内刺激の迷走神経求心路を介した刺激伝達経路が関与することが示唆された。これらの作用には 5-HT、GLP-1 および CCK といった摂食抑制作用を持つ刺激伝達物質が関与していることが推察された。また、chakasaponin 類はマウスにおける血中の中性脂質上昇抑制および血糖値吸収抑制作用があることを見出した。

Key Words 茶花、サポニン、chakasaponin、中性脂質上昇抑制作用、摂食抑制作用

緒 言

チャはツバキ科 (Camelliaceae) に属する常緑樹で、中国の雲南省や四川省からミャンマーの北部にかけての地域が原産地とされており、樹高 3 m 程度のかん木で耐寒性のある中国種 (*Camellia sinensis* L. var. *sinensis*) と、葉が大きく高木のアッサム種 (*Camellia sinensis* L. var. *assamica*) に大別される。中国種は、江蘇、浙江省などの中国東部から安徽、福建省などの東南部および日本の暖地などで栽培されており、北インドへも移植されている。一方、アッサム種は、四川、雲南省などの中国西南部、インドやスリランカ、インドネシアなどの熱帯、亜熱帯地域で栽培されている。また、インドシナ半島には両種の交雑種と考えられる種が存在すると言われている。

チャの葉部 (茶葉) を用いた喫茶の歴史は、少なくとも 2000 年以前にさかのぼり、当初は薬用が中心であったと考えられている。茶葉は薬物として多数の本草書に記載されており、中国明時代の「本草綱目」や江戸時代の「本草食鑑」などにその薬効が記載されている。例えば、『頭と目を清める、煩渴を除く、痰を化す、食を消す、利尿する、解毒する』などの効能があり、頭痛や目くらみ、多眠、激しい口渴を治し、去痰、消化、利尿効果があり、解毒作用があって下痢や二日酔いを治療するなど記載されている。また、種子 (茶子) には、鎮咳、去痰作用、頭痛や呼吸器不全の治療効果が伝承されている。チャの葉部や種子にサポニンが含有されていることは古くから知られており、また、アルコール吸収抑制作用、抗菌作用および抗炎症作用、降圧作用などの生物活性が報告されている。

このような背景のもと、我々は種々の中国産茶花を入手しサポニン成分の産地における成分変動を検討した。さらに、福建省産茶花エキスをマウスにおける体重増加抑制や血中の中性脂質上昇抑制および摂食抑制作用があることを見出したことから活性成分の探索を行うとともに摂食抑制の作用機序について検討を行った。

結果と考察

1) 茶花サポニン成分の産地における成分比較

中国には、それぞれの地域の環境に適したチャが栽培されており、それらの花の成分組成は大きく異なることが予想される。そこで、安徽、福建省などの東南部、四川、湖北省などの中部、雲南、広西省などの南部から種々の茶花を入手し、茶花の品質評価を目的に、HPLC を用い茶花に含有されるサポニン成分などの定量分析法を開発し、主要産地における成分変動を検討した。その結果、特に安徽省産には主サポニンとして *floratheasaponin* 類が含まれており、福建省には主サポニンとして *chakasaponin* 類が含まれていた。また、四川省には *floratheasaponin* 類、*chakasaponin* 類が含有されていることが明らかとなった。茶花には茶の原産地と言われるメコン川上流地域から中国四川省地域、福建省等の中国南部地域、安徽省から日本の地域、台湾の各地域において特徴あるサポニン組成パターンが存在することが明らかとなった。これらの知見は、チャのケモタキソミーの観点から興味深いものであり、また、チャの伝播を考える上でも重要な知見と思われる。

2) 茶花エキスおよびサポニン成分の抗肥満作用

茶花の抗肥満作用を検討する目的で、高脂肪食飼育マウスに福建省産茶花 MeOH 抽出エキスを 14 日間経口投与したところ、体重増加抑制作用、肝重量、肝中性脂質および血中総コレステロール濃度の減少および内臓脂肪量の減少が観察された。以上の結果から、茶花 MeOH 抽出エキスには、反復投与における体重および内臓脂肪増加抑制作用を有することが明らかとなった。次に、メタボリックシンドロームのモデルマウスである TSOD マウスを用い、抗肥満作用のさらなる検討を行った。福建省産茶花 MeOH 抽出エキスを 4 週間経口投与したところ、有意な体重増加抑制作用、肝重量、血中中性脂質、総コレステロールの有意な減少および内臓脂肪量の有意な減少が認められた。また、MeOH 抽出エキスの投与開始からそれぞれ 21 日目に行った *glucose tolerance test (GTT)* の結果、有意な血糖値上昇抑制作用が観察され耐糖能の回復が認められた。以上の結果から、茶花 MeOH 抽出エキスはメタボリックシンドロームの進行を抑制することが明らかとなった。次に、茶花 MeOH 抽出エキスによって認められた体重増加抑制作用は、投与開始後、短期間であらわれたことから摂取カロリーの変化による影響が大きいのではないかと推察した。そこで各実験における摂餌量の変化を比較検討した。その結果、高脂肪食飼育マウスおよび TSOD マウスのいずれの場合においても体重増加抑制作用と同様の用量依存的な摂餌量の減少が観察された。以上の結果から、茶花の抗肥満作用は摂餌量の抑制により引き起こされていると推察された。

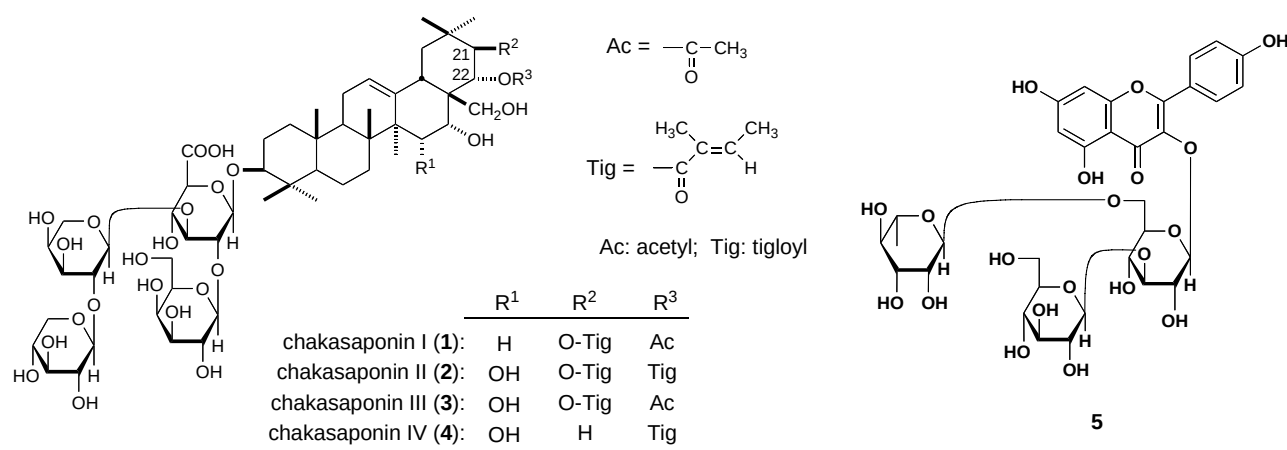


図1 福建省産茶花の含有成分

摂餌量の減少を引き起こす物質を明らかにする目的で、福建省産茶花 MeOH 抽出エキスを活性成分の探索を行った。福建省産チャ (*Camellia sinensis*) の乾燥花部を MeOH で熱時抽出後、溶媒を減圧留去し、MeOH 抽出エキス (収率 31.1%) を得た。その MeOH 抽出エキスを酢酸エチルと水で分配抽出、次いで水移行部を 1-ブタノールで分配抽出し、

酢酸エチル移行部 (3.2%)、1-ブタノール移行部 (16.4%)、水移行部 (12.1%) を得た。酢酸エチル移行部、1-ブタノール移行部、水移行部について正常食飼育マウスでの摂餌量の検討を行った。その結果、1-ブタノール移行部に強い摂餌量の減少作用が認められた。活性が認められた 1-ブタノール移行部について含有成分の探索を行った。すなわち、1-ブタノール移行部を順相シリカゲル、逆相 ODS カラムクロマトグラフィーおよび順相、逆相 HPLC で繰り返し分離精製し、3 種の既知オレアナン型トリテルペン配糖体 chakasaponin I (1, 0.49%)、II (2, 0.67%)、III (3, 0.013%) および 1 種の新規オレアナン型トリテルペン配糖体 chakasaponin IV (4, 0.0017%) を単離、構造決定するとともに、1 種の既知フラボノイド配糖体 kaempferol 3-O- β -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (5, 0.36%)、3 種のカテキン (–)-epicatechin (0.000077%)、(–)-epicatechin 3-O-gallate (0.067%)、(–)-epigallocatechin 3-O-gallate (0.21%)、2 種の既知芳香族化合物 benzyl β -D-glucopyranoside (0.00012%)、(S)-1-phenylethyl β -D-glucopyranoside (0.094%) および caffeine (0.067%) を単離した (図 1)。そこで、1-ブタノール移行部の主要成分である chakasaponin I–III (1–3) および 5 について正常食飼育マウスでの摂餌量の検討を行ったところ、chakasaponin I–III (1–3) に強い摂餌量の減少が観察された。これらの結果より、摂餌量の減少は chakasaponin I–III (1–3) によって引き起こされたことが明らかとなった。

3) 茶花サポニン成分の抗肥満作用における作用機序の検討

Chakasaponin I–III (1–3) に強い摂餌量の減少が観察されたことから、1-ブタノール移行部および主成分である chakasaponin II (2) を中心にその作用メカニズムの検討を行った。まず、chakasaponin 投与マウスにおいて、摂食に関する視床下部 mRNA 量について検討を行った。その結果、1-ブタノール移行部および 2 は、投与マウスの視床下部において食欲亢進を支配するペプチドである neuropeptide Y の mRNA 発現量を有意に減少させた。以上のことから、これらの作用が、neuropeptide Y の発現抑制つまり食欲亢進シグナルの抑制による、摂食抑制作用であることが明らかとなった。次に、大量のカプサイシン前処置により、化学的に迷走神経を脱感作させたマウスを用いて、摂食抑制作用を検討した。その結果、1-ブタノール移行部および 2 による摂食抑制作用は、カプサイシン前処置マウスで明らかな減弱が認められた。このことから 2 の摂食抑制作用は、迷走神経を介した末梢性の作用機序が関与していることが推察された。Chakasaponin II (2) について、消化管内に高濃度で存在するか確認するため、投与一時間後の血中濃度および小腸内残存量について LC-MS/MS 法により測定したところ、2 は投与 1 時間後においては、血中からは低濃度でしか検出されなかった。しかし小腸においては、投与後 1 時間後においても投与量の約 1/3 に相当する量が回収でき、小腸内に比較的高濃度で存在することが明らかとなった。以上の結果から、chakasaponin II (2) の作用は、消化管管腔内刺激の迷走神経求心路を介した刺激伝達経路が関与することが示唆された。

一方、chakasaponin 類の摂食抑制作用について、胃排出能の影響を確認するため、chakasaponin I (1)、II (2) を用いてフェノールレッド法による胃排出能の抑制作用の検討を行った。その結果、1 および 2 に強い抑制作用が認められた。この作用は、カプサイシンの前処置により減弱傾向が認められ、chakasaponin 類の作用機序の一部は迷走神経を介した作用であることが示唆された。この結果が摂食抑制作用と一部相関したため、chakasaponin 類の摂食抑制作用には、胃排出能を抑制する摂食抑制物質が関与していると推察された。

表 1. Chakasaponin II (2) のマウス摘出回腸におけるセロトニン分泌亢進作用

Treatment	Dose (μ M)	n	5-HT release into the medium	5-HT remained in the tissue	
			(ng/g tissue)	(ng/mg protein)	(ng/g tissue)
Control	-	8	11.2 $\pm$ 1.3	0.861 $\pm$ 0.164	68.8 $\pm$ 12.4
Chakasaponin II (2)	100	8	15.6 $\pm$ 1.9	0.659 $\pm$ 0.115	50.8 $\pm$ 7.6
	1000	8	28.3 $\pm$ 2.8**	0.396 $\pm$ 0.084*	31.6 $\pm$ 6.9*

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. Significantly different from the control group, * p <0.05 ** p <0.01.

近年、消化管からの迷走神経求心路を介した食欲シグナルが解明されている。食欲を抑制させる代表的なシグナルとし

ては、セロトニン (5-HT)、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、コレシストキニン (CCK)、およびレプチンといったものが挙げられる。chakasaponin 類による食欲抑制にはこのようなシグナルが関与しているのではないかと考え、食欲を抑制するとされるシグナル伝達物質の中でも胃排出能抑制作用を併せ持つ 5-HT、GLP-1 および CCK について、chakasaponin II (2) が分泌に与える影響について確認した。その結果、2 はマウス摘出回腸において、5-HT の分泌を有意に亢進した (表 1)。また、GLP-1 および CCK 分泌作用についても検討したところ、2 は有意に摂食を抑制し、摂食抑制に伴う有意な血中 GLP-1 および血中 CCK 濃度の上昇が認められた。以上の結果から、chakasaponin II (2) は小腸から 5-HT、GLP-1 および CCK といった摂食抑制物質を分泌させ、それらが迷走神経を介した経路を経て摂食抑制を引き起こすと考えられた。

また、抗肥満作用に関連する作用について、得られた主要成分である chakasaponin I-III (1-3)、および 5 について、単回投与時における血中中性脂質上昇抑制作用の検討を行った。すなわち、オリーブオイル負荷マウスにおける血中中性脂質上昇抑制作用について検討を行った結果、1-3 は血中中性脂質の上昇抑制作用が認められた。この作用は、フラボノイド配糖体である 5 については認められなかった (表 2)。一方、単回投与における血糖値の吸収抑制作用が認められたため糖質の吸収抑制も、抗肥満作用の発現に関与すると推察された。

表 2. オリーブオイル負荷マウスにおける chakasaponins I—III (1—3) および 5 の血中中性脂質上昇抑制作用

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	n	Plasma TG (mg / 100 ml)		
			2.0 h	4.0 h	6.0 h
Normal	-	6	115.5 ± 12.4**	126.7 ± 9.0**	122.9 ± 10.4**
Control	-	8	440.5 ± 45.2	359.4 ± 43.2	267.8 ± 37.8
Chakasaponin I (1)	25	6	435.7 ± 67.4	296.8 ± 45.2	197.7 ± 26.6
	50	6	284.2 ± 9.6**	347.5 ± 27.2	257.7 ± 34.4
Normal	-	6	152.4 ± 13.5**	149.8 ± 15.0**	118.5 ± 14.7*
Control	-	8	553.8 ± 49.8	522.7 ± 44.0	259.8 ± 50.3
Chakasaponin II (2)	25	6	431.8 ± 49.8**	436.9 ± 63.3	240.2 ± 24.1
	50	6	249.5 ± 31.1**	416.7 ± 71.2	390.0 ± 73.9
Normal	-	6	124.0 ± 8.4**	94.7 ± 8.3**	87.0 ± 11.3**
Control	-	8	407.2 ± 73.0	385.1 ± 71.4	207.8 ± 36.1
Chakasaponin III (3)	25	6	394.1 ± 81.4	300.5 ± 67.2	184.8 ± 36.8
	50	6	214.4 ± 62.7*	314.3 ± 88.2	255.5 ± 60.0
Normal	-	6	164.8 ± 20.1**	128.0 ± 13.5**	103.2 ± 12.0*
Control	-	8	418.1 ± 54.5	398.6 ± 42.1	231.6 ± 44.0
5	25	6	469.5 ± 86.6	395.5 ± 114.9	213.6 ± 64.1
	50	6	383.9 ± 41.8	444.6 ± 46.7	191.4 ± 33.3
Normal	-	7	91.9 ± 9.4**	97.3 ± 7.4**	90.6 ± 9.4**
Control	-	9	440.3 ± 60.2	393.2 ± 60.1	263.3 ± 45.0
Orlistat (positive control)	5	7	371.3 ± 41.5	297.0 ± 67.4	171.9 ± 24.9
	10	7	203.8 ± 52.1**	160.4 ± 47.7**	129.1 ± 16.6**

Values represent the mean ± S.E.M. Significantly different from the control group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

注：本研究は、2012 年 2 月 18 日『私立大学戦略的研究基盤形成支援事業生物分子システムに基づく創薬科学フロンティア研究成果発表会』にてポスター発表、『Chemical Pharmaceutical Bulltin』誌 (2012 年, in press) に掲載予定

作成日 2012 年 3 月 1 日