

茶葉サポニンの抗菌作用及び抗炎症作用

堤坂裕子 (旧姓 三種), ^{*,a} 植村照美, ^a 鈴木裕子, ^a 杉浦友美, ^a
吉田益美, ^b 山口和政, ^b 久木浩平^b
(株) 伊藤園中央研究所, ^a (株) 日本バイオリサーチセンター羽島研究所^b

Antimicrobial and Anti-inflammatory Actions of Tea-Leaf Saponin

Yuko M. SAGESAKA, ^{*,a} Terumi UEMURA, ^a Yuko SUZUKI, ^a Tomomi SUGIURA, ^a
Masumi YOSHIDA, ^b Kazumasa YAMAGUCHI, ^b
and Kohei KYUKI^b

Central Research Institute, Ito-en Co. Ltd., ^a 21, Mekami, Sagara-cho,
Haibara-gun, Shizuoka 421-05, Japan and Hashima Laboratory,
Nihon Bioresearch Center Inc., ^b 6-104, Fukujyu-cho,
Majima, Hashima-shi, Gifu 501-62, Japan

(Received November 7, 1995)

Antimicrobial and anti-inflammatory actions of tea-leaf saponin, which was a mixture of saponin separated from leaves of *Camellia sinensis* var. *sinensis*, were investigated. Tea-leaf saponin showed relatively high antimicrobial activity against pathogenic dermal fungi and its MIC value for *Microsporum audouinii* was 10 µg/ml. On the other hand, tea-leaf saponin inhibited rat paw edema induced by carrageenin in a dose dependent manner. Activation of hyaluronidase, one of the enzymes involved in inflammatory reactions, was inhibited by tea-leaf saponin. It was also found that tea-leaf saponin antagonized the action of leukotrien D₄, one of the chemical mediators of inflammatory reactions. Any symptom of toxic reaction was not observed when tea-leaf saponin was administered orally to mice at a dose of 2000 mg/kg.

Key words—saponin; tea; anti-inflammatory; antimicrobial action; *Camellia sinensis*; hyaluronidase; leukotrien D₄

茶葉サポニン (*Camellia sinensis* var. *sinensis* の葉より分離したサポニン混合物) の抗菌及び抗炎症作用について検討した。茶葉サポニンは病原性皮膚糸状菌に対して比較的高い抗菌活性を示し, *Microsporum audouinii* に対する MIC は 10 µg/ml であった。一方, 茶葉サポニン (50, 100, 200 mg/kg, p.o.) はカラゲニンによるラットの足浮腫を用量依存的に抑制した。炎症作用に関与する酵素の1つであるヒアルロニダーゼの活性は茶葉サポニンにより阻害された。また炎症作用におけるケミカルメディエーターの1つであるロイコトリエン D₄ に対し, 茶葉サポニンが拮抗作用をもつことも見いだされた。マウスに 2000 mg/kg の用量で経口投与したところ, 毒性を示す兆候は観察されなかった。

緒 言

茶 (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) の種子に含まれるサポニンは, 古くから乳化剤として利用されてきた。また, 茶種子サポニンがアルコールの吸収を抑制することが報告されている。¹⁾

一方、茶葉に含まれるサポニン、茶種子サポニンとは構造が異なることが示唆されていたが、²⁾ 最近その内の主要なサポニンである teasaponin B₁ の構造が明らかにされ (Chart 1), ³⁾ ついで、teasaponin B₂—B₄ の構造が発表された。⁴⁾ しかし茶葉サポニンの薬理作用については、好中球活性化に関する最近の報告⁵⁾ 以外ほとんど報告されていない。

我々は teasaponin B₁ を含む茶葉サポニン混合物を分離し、まずサポニンの一般的な性質である抗菌作用と抗炎症作用について検討した。さらに炎症作用と関連のあるヒアルロニダーゼとロイコトリエン D₄ に対する作用についても検討を行った。

実 験 の 部

茶葉サポニンの分離 既報⁵⁾ の方法を若干修正して行った。すなわち、静岡産やぶきた種の茶葉 (摘採後、直ちに蒸熱し、 -40°C にて保存) 6 kg (湿重量) を 4 倍量 (w/v) の 97% エタノールに浸漬し、室温にて一晚抽出した。抽出液を減圧濃縮後、水 (31) に懸濁し、等量のシクロヘキサンにて脂溶成分を抽出除去した。水層を不溶性ポリビニルピロリドン (ポリクラー AT[®], 五協産業) で処理し、ポリフェノールを除去した。次に水/水飽和ブタノールで分配し、ブタノール層を減圧乾固して残渣を水に溶解した。これを浸水型逆相系充填剤 (Cosmosil 75C₁₈-opn, ナカライテスク (株)) を充填したカラムに導入し、40—100% メタノールで順次溶出した。80% メタノール溶出画分を集め、減圧濃縮後、凍結乾燥し、茶葉サポニン 4.04 g を得た。得られたサポニンは淡黄—淡褐色の粉末で、TLC (展開: ブタノール/酢酸/水 (4:1:1.5, v/v), 検出: 1% 硫酸セリウム/10% 硫酸を噴霧後加熱) では青紫色の単一バンドを示した。茶葉サポニンの HPLC パターンを Fig. 1 に示す。なお茶葉サポニンは茶種子サポニンと異なり、ケイヒ酸が結合していることが特徴的で、そのため 280 nm 付近に紫外吸収を示す。

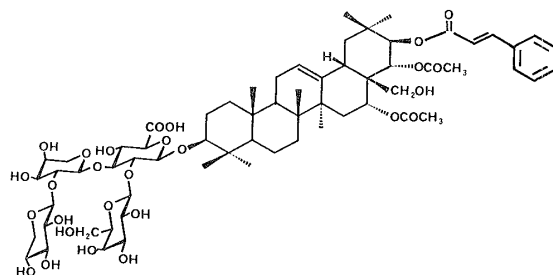


Chart 1. Structure of Teasaponin B₁^{3b)}

茶種子、大豆、サイコ、ニンジンサポニンの分離 既報⁵⁾ に従って調製した。

皮膚病原性真菌に対する抗菌活性 検体及び陽性対照として用いたアムフォテリシン (Sigma) 及びグリセオフルビン (Sigma) を DMSO に溶解し、50—5000 $\mu\text{g/ml}$ の希釈液を作成した。糸状菌に対する抗菌性試験では、24 穴プレート (1 穴 2 ml) に Sabouraud 液体培地、検体及び分生子懸濁液を分注し、 28°C で 11 日間培養し、各穴中の菌の生育を肉眼で観察し、最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。酵母に対しては、MY 液体培地を用い、検体と共に 24°C で 5 日間培養後、同様にして MIC を求めた。

カラゲニン誘発足浮腫に対する抗炎症作用 18 時間絶食した体重 113—144 g の Wistar 系雄

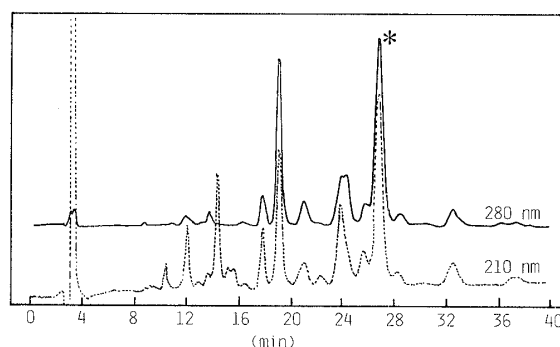


Fig. 1. HPLC Chromatogram of Tea-leaf Saponin

Tea-leaf saponin was analyzed by HPLC under the following conditions: column, Capcell Pack C₁₈ (Shiseido Co.); mobile phase, MeCN/0.05 M sodium acetate buffer (pH 6)=35:65; detection, UV 280 nm. * indicates the peak of teasaponin B₁.

性ラット（1群10匹）を用い、披検葉（0.25% メチルセルロースに懸濁）を経口投与して1時間後に1% カラゲニン水溶液 0.1 ml を右側後足蹠皮下へ投与した。その後5時間後まで1時間ごとに足蹠容積測定装置（TK-101, ユニコム社製）を用いて右後肢の足蹠容積を測定した。カラゲニン処置前の値から浮腫率を算出した。

ヒアルロニダーゼ活性阻害作用 前田らの方法⁶⁾に従い、compound 48/90 による、不活性型ヒアルロニダーゼの活性化に対する阻害率を求めた。

ロイコトリエン D₄ に対する拮抗作用 モルモットを放血致死させ回腸を摘出し、95% O₂+5% CO₂ 混合ガス通気下で、0.5 g の張力を負荷し、マグヌス管（20 ml 容, Tyrode 液, 30°C）に懸垂した。回腸標本の収縮性の有無を 6.8×10^{-7} M のアセチルコリンを添加して確認し、一定の収縮を示す標本を用いた。検体は蒸留水に溶解して回腸標本に添加し、10 分後にロイコトリエン D₄（最終濃度 1×10^{-6} M）を添加し、回腸収縮反応に対する作用を検討した。収縮の強さは、アセチルコリンによる収縮に対するロイコトリエン D₄ による収縮の比率（%）で表した。

急性毒性試験 ICR 系マウス（雄, ca. 35 g, 1群5匹）に0.25% メチルセルロースに懸濁した茶葉サポニンを 100, 1000 及び 2000 mg/kg の用量で1回経口投与し、室温 23±5°C, 湿度 50±10% の飼育条件下で1週間観察した。対照群には媒体のみ投与した。投与1週間後にエーテル麻酔下で心採血を行い、血清を分離した。主要臓器を肉眼で観察し秤量した。血清 GPT, GOT, アルブミン及び A/G 比は、臨床検査キット（和光純薬（株））を用いて測定した。

結 果 及 び 考 察

皮膚病原性真菌に対する抗菌活性

Tsheshce らは大多数のサポニンは比較的弱い抗菌活性と著明な抗カビ（真菌）作用を有すると報告している。⁷⁾ 皮膚病原性糸状菌及び酵母に対する茶葉及び茶種子サポニンの抗菌活性を調べたところ、Table 1 に示すような抗真菌活性を示した。特に茶葉サポニンは、深在性頭部白癬を引き起こすオードアン小孢子菌 (*M. audouinii*) に対し MIC が 10 µg/ml という高い抗真菌活性を示し、また毛瘡白癬菌 (*T. metagrophytes*) や表皮菌 (*E. floccosum*) に対しても、MIC が 25 µg/ml という比較的高い抗真菌活性を示した。サポニンの抗菌、抗カビ作用の機構として、菌膜のコレステロールとのコンプレックス形成が示唆されている。またサポニンに特徴的な性質である溶血作用も、赤血球膜のコレステロールとのコンプレックス形成が関与していると言われている。しかし茶葉及び茶種子サポニンに関しては、溶血性は茶種子サポニンの方が強かった⁹⁾ のに対し、抗真菌活性は茶葉サポニンの方が強い傾向を示した。したがって、抗真菌作用にはこれ以外の作用機作が関与している可能性がある。

Table 1. Antimicrobial Activity of Tea-leaf (TLS) and Tea-seed (TSS) Saponins

| Microorganism | MIC (µg/ml) | |
|---|-------------|-----|
| | TLS | TSS |
| <i>Microsporum audouinii</i> (IFO-8147) | 10 | 25 |
| <i>Epidermophyton floccosum</i> (IFO-9045) | 25 | 50 |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (IFO-5466) | 25 | 100 |
| <i>Trichophyton rubrum</i> (IFO-5808) | >100 | 100 |
| <i>Candida albicans</i> (IFO-1061) | 100 | 100 |

カラゲニン誘発足浮腫に対する抗炎症作用

Fig. 2 に示すように、カラゲニンで足浮腫を惹起する 1 時間前に、茶葉サポニンを経口投与しておくと、50 mg/kg 群では対照とほぼ同様な推移を示したが、100 mg/kg 投与群はカラゲニン処置後 1 時間目に、200 mg/kg 投与群では 1 時間目と 2 時間目に有意な足浮腫の抑制が見られ、抑制傾向は 5 時間目まで続いた。抗炎症作用あるいは抗浮腫作用もサポニンの一般的な薬理作用で、glycyrrhizin や escin のように抗炎症剤として臨床で使用されているサポニンもある。Escin は茶種子サポニンと構造が似ており、1.3 mg/kg の用量で静注すると、カラゲニン足浮腫を 30% 抑制することが報告されている。⁸⁾ サポニンは一般に消化管からの吸収率が低く、経口投与で静注と同程度の効果を得るには、大量のサポニンを投与しなくてはならないとされる。今回茶葉サポニンは 100 mg/kg の経口投与により、2 時間後の足浮腫率を約 25% 抑制した。この効果は文献⁹⁾に示される β -eschin の効果とほぼ同程度と推定される。

ヒアルロニダーゼ阻害作用

ヒアルロニダーゼはヒアルロン酸の加水分解酵素で、広く炎症に関与する酵素であることが知られている。また I 型アレルギーにおける肥満細胞の脱顆粒やヒスタミンの遊離に関与している可能性が指摘されている。¹⁰⁾ 今回、茶葉サポニンを含む数種のサポニンのヒアルロニダーゼ活性に及ぼす影響を検討したところ、Table 2 に示すような阻害活性が観察された。特に茶葉サポニンは、 $IC_{50}=0.11$ mg/ml という高い活性を示した。茶葉サポニンの平均分子量を約 1300 と仮定すると (teasaponin B₁ の分子量は 1306^{3b)})、これは約 0.08 mM となり、抗アレルギー剤である DSCG と同程度の活性を示すこ

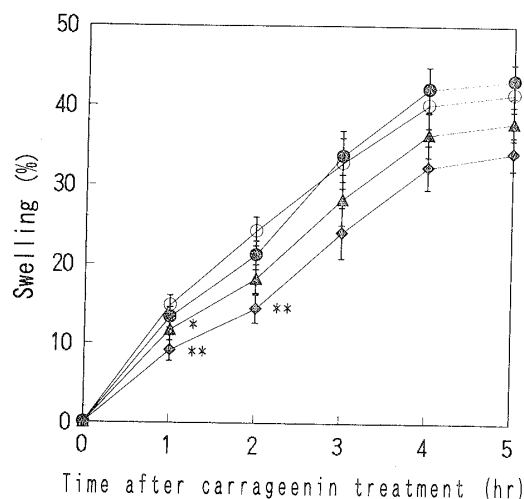


Fig. 2. Inhibitory Effect of Tea-leaf Saponin (TLS) on the Rat Hind Paw Edema Induced by Carrageenin (1%, 0.05 ml)

TLS was administered orally 1 h before carrageenin treatment.

○, control; ●, TLS 50 mg/kg; ▲, TLS 100 mg/kg; ◆, TLS 200 mg/kg. Each value shows the mean \pm S.E. of 5 rats. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ vs. control.

Table 2. Inhibitory Effects of Saponins on Activation of Hyaluronidase by Compound 48/80

| | IC_{50} (mg/ml) |
|--------------------|-------------------|
| Tea-leaf saponin | 0.11 |
| Tea-seed saponin | 0.42 |
| Soyasaponin | 0.12 |
| Saikosaponin | 0.23 |
| Ginsenoside | 0.44 |
| DSCG ^{a)} | 0.39 |

a) Disodium cromoglycate.

Table 3. Effect of Tea-leaf Saponin on LTD₄ Induced Contraction of Isolated Guinea Pigs' Ileum

| Concentration (μ g/ml) | % contraction ^{a)} | Inhibition (%) |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
| 0 | 78.9 \pm 7.5 | — |
| 3 | 64.7 \pm 6.4 | 18.0 |
| 10 | 44.8 \pm 9.3* | 43.2 |
| 50 | 18.1 \pm 4.3** | 77.1 |

Each value shows the mean \pm S.E. of 5 preparations. a) Contraction force is expressed as percentage of contraction obtained by acetylcholine treatment. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs. distilled water.

Table 4. Effect of a Single Oral Administration of Tea-leaf Saponin on Mouse

| Dose (mg/kg) | 0 | 100 | 1000 | 2000 |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|
| No. of mouse | 5 | 5 | 5 | 5 |
| No. of dead | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Initial body weight (g) | 35.07±0.56 | 35.02±0.84 | 34.94±0.47 | 35.08±0.70 |
| Final body weight (g) | 39.02±0.91 | 39.08±0.72 | 39.00±0.90 | 40.34±1.55 |

Each value shows the mean±S.E. of 5 mice. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs. control.

となる。

摘出回腸に対する作用

茶葉サポニンの生理活性を評価するために、予備実験として、摘出したモルモット回腸の種々の収縮薬による収縮反応に対するサポニン (10 µg/ml) の拮抗作用を調べたところ、アセチルコリン (1 µM)、サブスタンス P (1 µM) 及び CaCl₂ (1 mM) に対しては拮抗しなかったが、ロイコトリエン D₄ (10 ng/ml) に対しては明らかな拮抗作用がみられた (未発表データ)。そこでサポニンの濃度を変えてさらに検討したところ、濃度依存的にロイコトリエン D₄ による回腸の収縮を抑制した (Table 3)。ロイコトリエン D₄ はアナフィラキシーの遅反応物質の 1 つであり、血管の透過性を亢進させ、平滑筋や気管支の収縮を引き起こすことから、炎症や喘息など多くの疾病の重要な調節因子と考えられている。サポニンがロイコトリエン D₄ に拮抗作用を示すという報告はこれまでないが、サポニンのもつ抗炎症作用や抗アレルギー作用との関連を考え合わせると興味深い。

急性毒性試験

結果を Table 4 に示す。1000 mg/kg を投与した群で、5 匹中 1 匹が投与直後に呼吸困難の兆候を示し、24 時間以内に死亡した。解剖したところ鼓腸が認められた。これがサポニンの起泡性によるものかは明らかでない。腸管粘膜に出血はみられなかった。その他のマウスについては、投与後、一時的に自発運動量が低下する傾向が若干みられた以外、毒性を示す兆候は観察されなかった。1 週間の観察期間、体重は順調に増加し、摂餌量も群間で差はなかった。投与 1 週間後に解剖した結果、肝臓、腎臓、脾臓の重量及び血清 GOT, GPT, アルブミン及び A/G 比について、対照群と差は認められなかった。茶葉サポニンの LD₅₀ は、2000 mg/kg 以上と考えられる。

引用文献及び注

- 1) 塚本昭次郎, 鐘ヶ江孝, 名児耶忠章, 加藤珠子, 渡部申一郎, 川口 誠, 日本薬学会第 112 年会, 福岡, 1992 年 3 月, 講演要旨集 2, p. 182.
- 2) 橋爪昭人, 酒戸弥二郎, 農化, **40**, 8 (1966).
- 3) a) 小林資正, 李 茂澤, 本澤朋久, 堀 一之, 北川 勲, 日本生薬学会第 40 回年会, 大阪, 1993 年 9 月, 講演要旨集, p. 88; b) Sagesaka Y. M., Uemura, T., Watanabe N., Sakata K., Uzawa J., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2036 (1994).
- 4) 小林資正, 井関孝司, 北川 勲, 植村照美, 堤坂裕子, 日本生薬学会第 42 回年会, 福山, 1995 年 9 月, 講演要旨集, p. 126.
- 5) 植村照美, 堤坂裕子, 奥 直人, 岡田昌二, 薬誌, **115**, 528 (1995).
- 6) 前田有美恵, 山本政利, 増井俊夫, 杉山 清, 横田正実, 中込和哉, 田中秀興, 高橋宇

- 正, 小林利彰, 小林栄人, 食衛誌, **31**, 233 (1990).
- 7) Tschesche R., Wulff G., *Z. Naturforsch.*, **20b**, 543 (1965).
- 8) Vogel von G., Marek M. L., Oertner R., *Arzneim. Forsch.*, **18**, 1466 (1968).
- 9) 山原條二, 壬生寛之, 沢田徳之助, 藤村 一, 白川清治, 吉川雅之, 北川 勲, 薬誌, **99**, 612 (1979).
- 10) Kakegawa H., Matsumoto H., Satoh T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 642 (1985).