

カラゲニン誘発マウス足蹠浮腫に対する緑茶カテキンの抑制作用

木下 明美, 堀江 登
(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

Inhibitory effects of catechins on carrageenan-induced edema

Akemi Kinoshita and Noboru Horie

Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Life and Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan

Catechins of green tea were investigated an effect on carrageenan-induced inflammatory edema. The major part of catechins in green tea are epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECg) and epigallocatechin gallate (EGCg). It was found previously that ester type of those catechins had significant inhibitory action for thrombin on blood coagulation. In this study, EGCg in catechins of green tea inhibited markedly plasma kallikrein (p-KL), but EGC did slightly. Both EGCg and EGC scarcely inhibited glandular kallikrein (g-KL). EGCg indicated an inhibitory effect on carrageenan-induced inflammatory edema in foot in mice, but not recognized EGC.

目 的

緑茶に含まれるカテキン類がトロンビンの合成ペプチド基質とフィブリノゲンの分解を著しく阻害することを見出し¹⁾, それらがプロティナーゼ・インヒビターとして作用することから類似酵素に対する作用に興味もたれる. 一方, トロンビンと同様にアルギニンの C 末端を切断する性質を有するカリクレイン (KL) には性質も起源も異なる血漿 KL (p-KL) と腺性 KL (g-KL) がある. p-KL は高分子キニノゲンに作用して, また g-KL は低分子キニノゲンに作用して各々血管透過性の亢進などの生物活性を示すブラジキニン, カリジンを生成するプロティナーゼである.

本研究は, 緑茶カテキン類のカリクレインに対する *in vitro* ならびに *in vivo* の実験系における作用を検討したものである.

材料と方法

1. 発色性合成ペプチド基質溶液の調製

発色性合成ペプチド基質 (Chromogenix, Mön-dal) は, S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA) を $3.8 \times 10^{-3} \text{M}$, S-2266 (H-D-Val-Leu-Arg-pNA) を $2.7 \times 10^{-3} \text{M}$ にそれぞれ蒸留水で溶解した.

2. 酵素溶液の調製

KL 溶液は, ヒトの p-KL (Sigma 社, St. Louis) を 1.9U/ml に, ブタ・膵臓の g-KL (Sigma 社) を 2.3KU/ml にそれぞれ生理食塩水で溶解した.

3. 合成アミド基質分解に対するカテキン類の阻害作用の測定

純度 98% 以上の市販品カテキン類 (栗田工業) を生理食塩水で溶解した各種濃度のカテキン溶液 $10 \mu\text{l}$, 各種濃度の酵素溶液 $10 \mu\text{l}$, 50mM トリス塩酸緩衝液 (p-KL; pH7.8, g-KL; pH9.0) $100 \mu\text{l}$ を混和した後, 合成ペプチド基質溶液 $30 \mu\text{l}$ を加えて 37°C で 10 分間反応させた後, Micro Plate Reader (MPRA4 型, Toyo Soda 社, 東京) で 405nm における吸光度を測定した. 阻害活性は次のように計算した.

$$\text{阻害活性(\%)} = \frac{C-I}{C} \times 100$$

C; カテキン類を含まない酵素液の1分間当りの吸光度の上昇値(対照値)

I; カテキン類を含む酵素液1分間当りの吸光度の上昇値

4. カラゲニン足蹠浮腫法

実験動物として雄性8週齢のJcl-ICRマウス(日本クレア, 東京)を使用した。カラゲニン注入で誘発した足蹠浮腫は、マウスの右後肢の足蹠部に2% α -カラゲニン(タイプIV, Sigma社)溶液を、対照として左後肢に生理食塩水をそれぞれ20 μ lを注入して作製した。その5分後に左右の足蹠部に10mMのEGC, EGCg溶液あるいは生理食塩水をそれぞれ20 μ lを注入し、その24時間後に足蹠部の肥厚状態をマイクロメーター(Mitutoyo, 0~25mm用, 精度0.01mm)で計測した。さらに24時間後に計測を行った。24時間後あるいは48時間後の計測値から実験開始直前に計測した値を各々差し引いた値を足蹠の肥厚した値とした。カテキン類によるカラゲニン誘発足蹠浮腫に対する抑制活性はカテキン類の代わりに生理食塩水を注入した場合の肥厚を対照に統計処理して評価した。

結果

1. カテキン類によるKLに対する阻害作用

p-KLおよびg-KLに対するカテキン類の阻害を図1に示す。p-KLに対する50%阻害濃度は 8.5×10^{-7} M(EGCg)および 1.8×10^{-4} M(EGC)であった。g-KLに対する阻害はEGCとEGCgの溶解可能な限界濃度 1.0×10^{-3} Mでいずれも認められなかった。また、EGCgのp-KLに対する阻害様式は非拮抗型であり、 K_i 値は 8.5×10^{-7} Mであった。

2. カラゲニン誘発マウス足蹠浮腫に対するカテキン類の影響

マウスの足蹠にカラゲニンを注入して誘発した炎症性浮腫に対して、その局所にEGCおよびEGCgを注入した成績を図2に示す。EGCgを注入したことによって炎症性浮腫が対照に比べて1日目で58%, 2日目で43%抑制された。しかし、このような阻害作用はEGCを注入したものでは認められなかった。

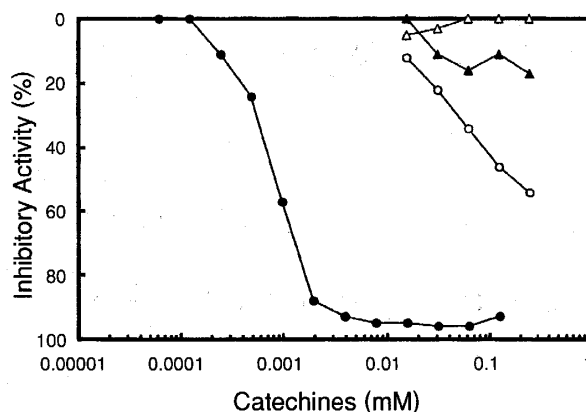


Fig. 1. Inhibitory effects of EGC(opened symbols) or EGCg(closed symbols) on amidolysis by two kinds of kallikreins.

○, ●: plasma kallikrein, △, ▲: granduraly kallikrein

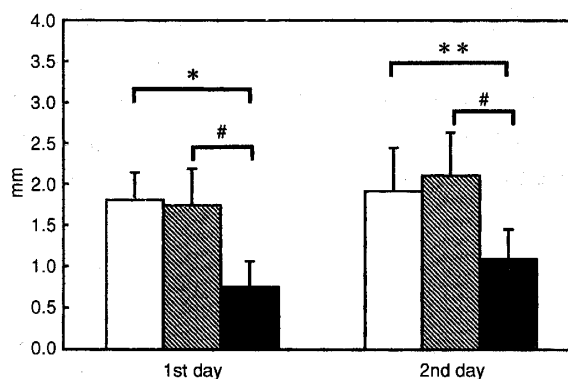


Fig. 2. Effects of EGC or EGCg on inflammatory edema in foot on the 1st and 2nd day after carrageenan injection.

Open bars; saline, shaded bars; EGC and closed bars; EGCg. The results were expressed as mean \pm SD of 5 animals. Statistical significance were determined by the unpaired Student's t-test, *: $p < 0.001$, **: $p < 0.05$ versus the each control(saline injection) and #: $p < 0.01$ versus the each EGC injection.

考察

緑茶に含まれるカテキン類は種々の生活習慣病に対する予防と改善に貢献している²⁾。緑茶中のエステル型カテキン類には血液凝固系酵素であるトロンビン¹⁾や線溶系酵素である組織型プラスミノゲンア

クチペーター³⁾に対する著しい阻害作用が認められている。このようにカテキン類がこれらのセリンプロテナーゼに対して阻害活性を示すことからキニンゲンを分解するセリンプロテナーゼであるカリクレインに対しても同様の効果が示唆された。

本研究では、緑茶のカテキン類のエステル型である EGCg が血液凝固・線溶・キニン系に関わる p-KL を著しく阻害し、その作用は g-KL には認められなかった。酵素(KL)に対して特異性があることや食物に由来する点に着目すると、分子量 20.1k ダルトンの大豆トリプシン・インヒビター⁴⁾($K_i=5 \times 10^{-9} M$)の阻害様式が非拮抗型ではあったが、類似点が見いだされた。また低分子量(458 ダルトン)であり、p-KL に対して極めて酵素に対する特異性に優れる拮抗型の合成インヒビターである PKSI-527⁵⁾($K_i=8.1 \times 10^{-7} M$)に類似しているなどの特徴を有し、注目に値するものである。

本実験で使用した α -カラゲニンを足蹠に注入することによって誘発したマウスの炎症性浮腫を EGCg が対照に比べて 1 日目で 58%、2 日目で 43% の著しい抑制効果を示した。この阻害作用は、ラットの胸腔内に α -カラゲニンで誘発した胸膜炎⁶⁾と同様に接触因子の活性化によって p-KL が活性化されて生成したブラジキニンによって生じた血管透過性の亢進による炎症症状であったことが p-KL を特異的に阻害する緑茶の低分子量成分である EGCg を使用して示されたことは注目に値する。

まとめ

- 1) 緑茶カテキン類である EGCg は p-KL を著しく阻害したが、EGC にはその作用はわずかであった。EGCg と EGC はともに g-KL に対してほとんど阻害しなかった。
- 2) カラゲニンによってマウス足蹠に誘発した炎症性浮腫に対して EGCg が著しい抑制効果を示したが、この効果は EGC はなかった。

文 献

- 1) 木下明美, 堀江 登: トロンビンに対する緑茶カテキン類の阻害作用, 血栓止血誌, 4: 412-422, 1993.
- 2) Nakachi, K. et al. : Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 254-261, 1998.

- 3) 木下明美, 堀江 登: 血液の線溶, カリクレイン・キニン系酵素に対する緑茶カテキン類の阻害作用, 血栓止血誌, 5: 98-104, 1994.
- 4) Wunderere, G. et al. : Charakterisierung des Schweine- und Human-Serum kallikreins durch die Hemmbarkeit mit Protein-Proteinase-Inhibitoren. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 353: 1646-1650, 1972.
- 5) Wanaka, K. et al. : Effect of a highly selective plasma-kallikrein synthetic inhibitor on contact activation relating to kinin generation, coagulation and fibrinolysis. *Thromb. Res.* 57: 889-895, 1990.
- 6) Katori, M. et al. : Involvement of plasma kallikrein-kinin system in rat carrageenin-induced pleurisy. *Europ. J. Rheumatol. Inflamm.* 2: 217-219, 1979.