

チョコレート・ココアに含まれる

## ポリフェノール類の抗酸化作用について

大澤 俊彦

(名古屋大学農学部教授)

ヒトを含む好気性生物は、酸素を利用し生命活動に必要なエネルギーを得ている。しかし、生体に取り込まれた酸素のうち数パーセントは、生体内において金属イオンや酵素の影響を受け活性酸素となる。通常健康人においては、スーパーオキシドジスムターゼなどの生体内の抗酸化物質が防御にあたり、大きな問題とならないが、ストレス、運動、喫煙、アルコールの摂取など体に負荷がかかった場合には、スーパーオキシド・ハイドロキシラジカル・一重項酸素などに代表される活性酸素が過剰に発生し、DNAの損傷、細胞膜の構成成分である脂質の酸化、タンパク質の変性などを引き起こし、生体にダメージを与えることが最近の研究で明らかとなってきた。さらに現在の死亡原因の上位を占める癌や動脈硬化、あるいは糖尿病などの成人病、果ては老化に至るまで、これら活性酸素が成因あるいは増悪因子であることが示唆される研究結果が数多く報告されている。このような背景のなかで、とくに注目されているのが食品成分として摂取しうる植物

中の抗酸化物質である。実際に茶、豆類、穀類、野菜類および香辛料には、こうした抗酸化物質が豊富に含まれており、癌や心疾患の予防作用を有することを示す研究がなされている。豆類の一種であるカカオ豆にはフラボノイドなどのフェノール性OH基を複数持つポリフェノール類が多量に含まれることは従来から知られていた。しかし、発酵や焙焼を経て、チョコレートやココアなどの食品として加工された場合の挙動についての報告はきわめて少数である。また、これらの物質の抗酸化活性に関する報告は皆無に等しい。今回われわれは、チョコレートの主原料であるカカオマス中のポリフェノール類を精製・分離し、構成成分を物理化学的に明らかにするとともに、実験動物を用いその生理学的な有効性を確認したので以下に報告する。

### 1. カカオマスに含まれるポリフェノールの化学構造と抗酸化活性

原料としてはチョコレートに二五％程度配合さ

れるカカオマス(カカオビター)を用いた。五六％の脂肪分を含むこのカカオマスをまず圧搾して取り除き、さらにヘキサンを用いて完全に脱脂した。次いで、五％倍量の八〇％含水エタノールで抽出し、抽出液を減圧濃縮した。濃縮液をダイヤイオンHP2MG吸着クロマトグラフィーにアプライし含水エタノールで段階的に溶出した(図1)、各フラクションの抗酸化能をリノール酸の変敗を指標に評価したところ、三〇％エタノール以上の画分で強い抗酸化能が観察された。この画分を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析したところ、二八〇nm付近に強い吸収をもつ十数個の

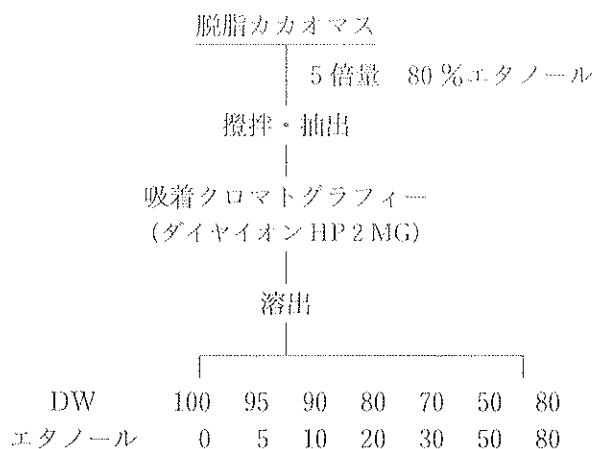


図1 カカオマスからのポリフェノールの精製法

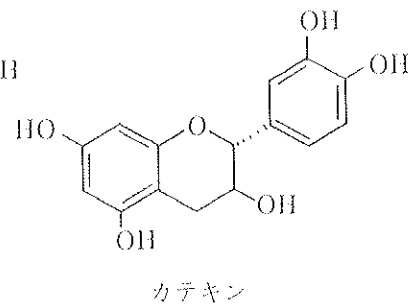
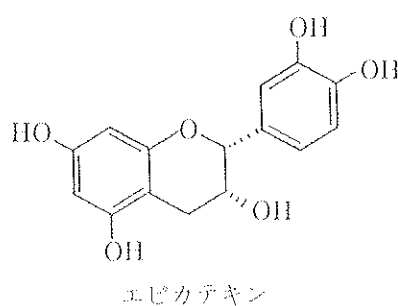
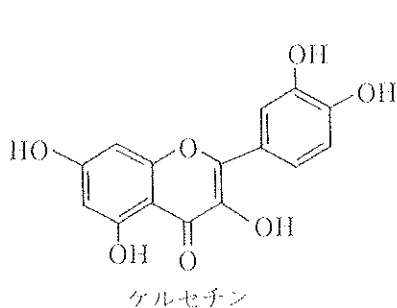
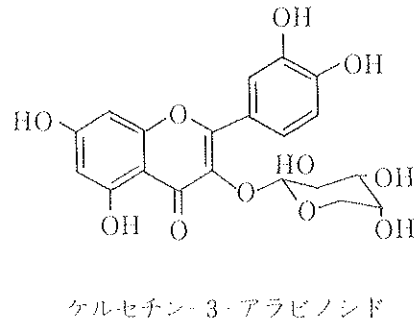
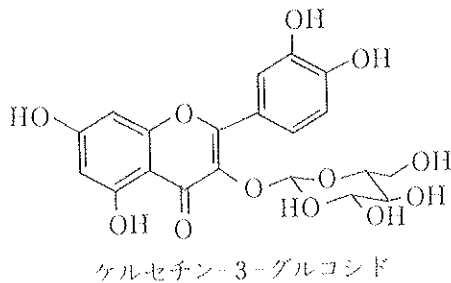
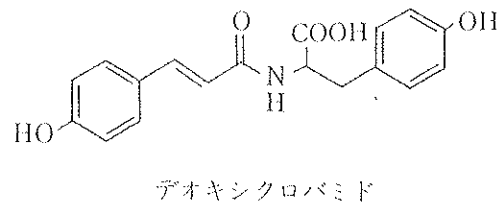
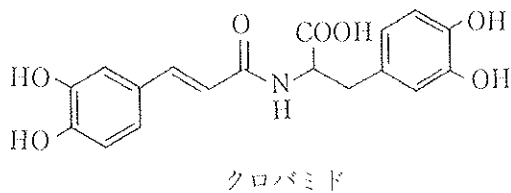


図2 カカオマスに含まれるポリフェノール類

成分が確認された。それぞれのピークを分取型 HPLC にて分離し、七つの化合物について二次元 NMR、MS (質量分析)、IR (赤外線吸収スペクトル)、UV (紫外線吸収スペクトル) などの機器分析を実施した。これらの測定結果から、カテキン、エピカテキン、ケルセチン、ケルセチン-3-グルコシド (Q3G)、ケルセチン-3-アラビノシド (Q3A)、クロバミド、デオキシクロバミドの七つのポリフェノール

ルを同定した (図2)。次に単離した各成分の *in vitro* における各成分の抗酸化活性をリノール酸の変敗で評価したところ、クロバミドが最も強く、次いで、エピカテキン、カテキン、ケルセチンの順で、抑制活性を示すことがわかった (図3)。

また、生体サンプルとしてラットの肝ミクロゾームを用い検討したところ、ケルセチンが最も強く、次いでエピカテキン、カテキン、クロバミドの順で酸化を抑制した (図4)。また、スーパーオキサイドに対する消去活性を ESR (電子スピン共鳴装置) を用い検討し、五〇%抑制濃度を計算したところスーパーオキシドラジカル捕捉強度は、カテキン、エピカテキンが最も強くついでケルセチン、クロバミドの順であった (表1)。Q3A・Q3G などの配糖体およびクロバミドからフェノール性 OH 基が二つはずれたデオキシクロバミドはいずれの系においても、強い活性を示さなかった。カカオマスに含まれるポリフェノール類は脂質の酸化において連鎖反応を阻害するだけでなく、フリーラジカルを捕捉し総合的に酸化を抑制することがわかった。

## 2. カカオ抗酸化物質の生理的作用

脱脂カカオマスから上記の方法で得られた粗ポリフェノール画分 (CMP) が、生体内において効果を発揮するかどうかを実験動物を用い以下の

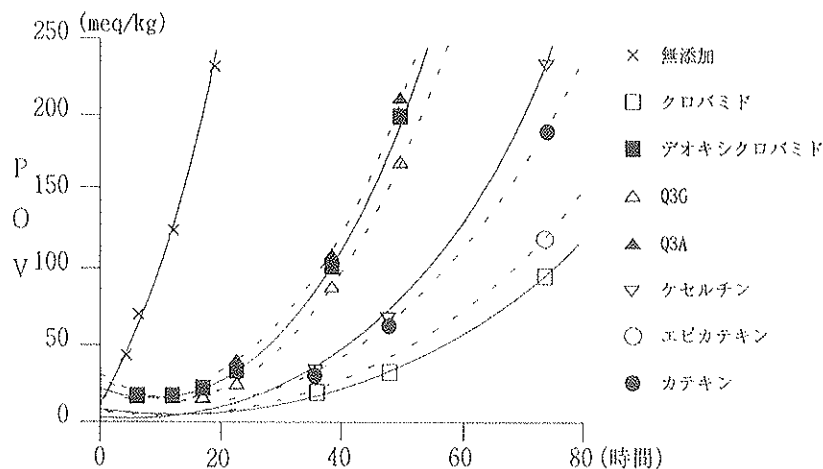


図3 リノール酸の変敗に対するカカオポリフェノールの作用

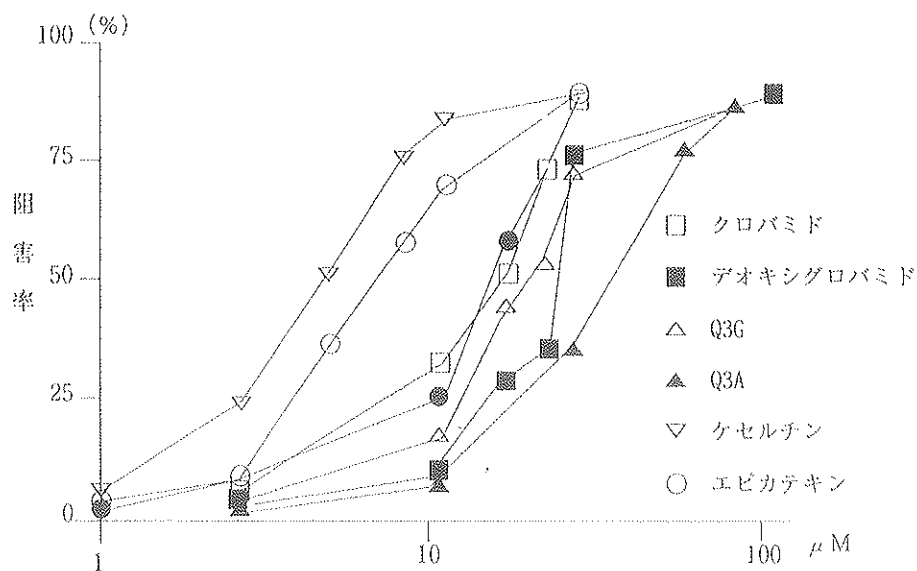


図4 肝ミクロゾームの酸化に対するカカオポリフェノールの作用

表1 カカオポリフェノールのスーパーオキシド消去作用

(50%阻害濃度)

| ポリフェノール        | 50%阻害濃度 (μM) |
|----------------|--------------|
| クロバミド          | 70.9         |
| デオキシクロバミド      | 192.9        |
| ケルセチン-3-グルコシド  | 160.7        |
| ケルセチン-3-アラビノシド | 256.7        |
| ケルセチン          | 39.8         |
| エピカテキン         | 23.2         |
| カテキン           | 40.2         |

二つの方法で検討した。  
(1) アルコール性胃粘膜障害に対する予防作用…種々の胃潰瘍モデルにおいて、SODとカタラーゼを投与することによって病態の悪化が防げることから、活性酸素の関与が示唆されている。そこでアルコール性の胃潰瘍に対するCMPの作用について検討した。一晚絶食した9週齢のSD系雄性ラットにCMP懸濁液を五〇〇mg/kg前投与し、三

〇分後に一〇〇%エタノールを五ml/kgを経口投与した。さらに一時間後に胃を摘出し、ホルマリオンで固定した。エタノール投与によって腺胃部に発生した損傷面積を画像解析装置を用いて測定したところ、対照群(アルコール単独処置群)に対してCMP前投与群では著しい抑制効果が認めら

れ、その強度は陽性対照として用いた抗潰瘍薬シメチジンおよびスクラルファートと同等であった(図5)写真①～⑤(13頁)。  
また同時に胃粘膜を剝離し、胃粘膜中の過酸化脂質を測定したところ、CMP投与群ではアルコール投与によって上昇する過酸化脂質を有意に抑制した(図6)。次に胃潰瘍に於ける胃粘膜過酸化脂質の上昇機序の一つと考えられているキサンチ

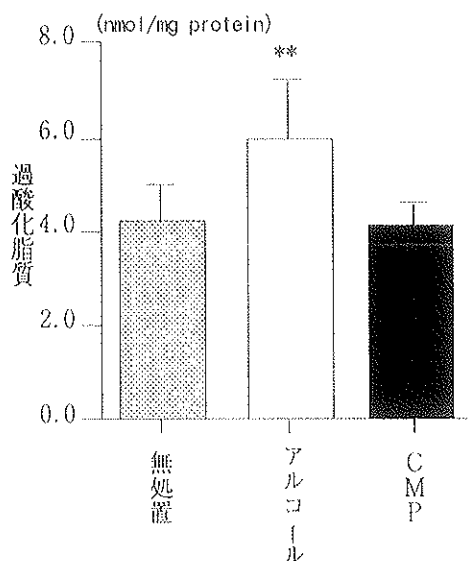


図6 アルコール投与時の胃粘膜過酸化脂質に対するカカオポリフェノールの作用

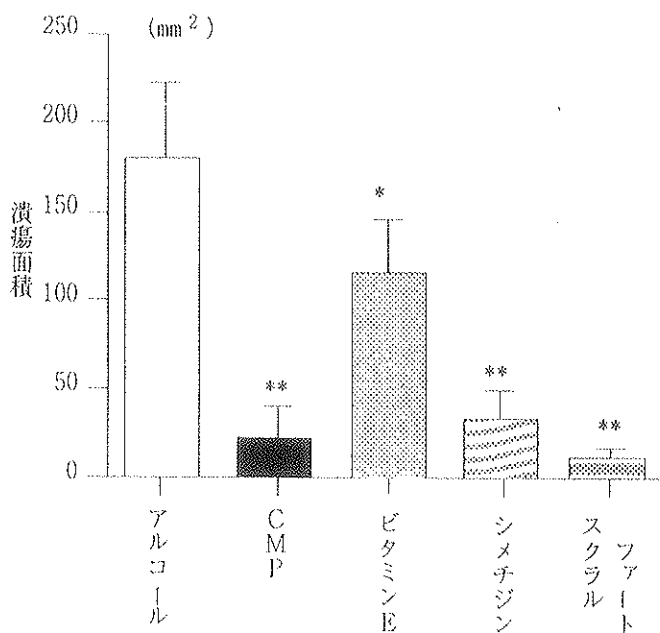


図5 カカオポリフェノールのアルコール性胃潰瘍に対する作用

ンオキシダーゼ (XOD) 活性を測定したところ、無処置群およびアルコール処置群に対して、C M P 投与群では活性の低下が認められた(図7)。またもう一つの上昇機序として、炎症部位に浸潤してくる活性化した好中球が生成するスーパーオキシドラジカルの関与が示唆されているため、好中球特異的な酵素であるミエロペルオキシダーゼ(MPO) 活性(図8)を測定したところ、アルコール投与によって上昇したMPO 活性をC M Pは著しく抑制した。C M PにはMPO 活性を直接的に阻害する作用がないことから、このことは好中球の胃粘膜への浸潤を何らかの機序でC M Pが抑制していると考えられる。これらの結果から、C M

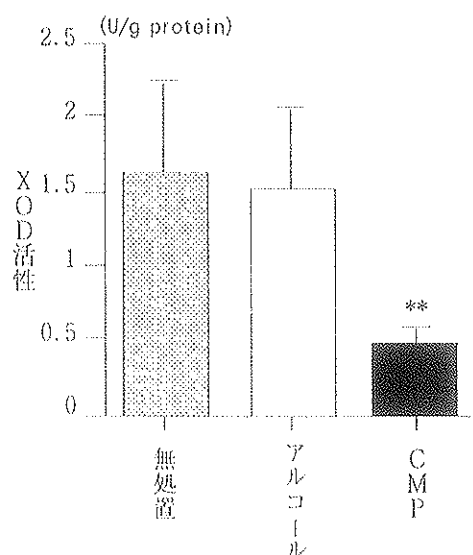


図7 胃粘膜キサンチンオキシダーゼ活性に対するカカオポリフェノールの作用

七週後に採血および解剖を実施し、肝・腎・心・  
○%含有させた飼料を七週間摂取させ飼育した。  
VE 欠乏飼料にC M Pを○・二五、○・五、一・  
76 改変飼料)、ビタミンE (VE) 欠乏飼料および  
三週令のSD 系雄性ラットに正常飼料(AIN  
かをビタミンE 欠乏ラットを用い検討した。  
身性の酸化ストレスに対して影響を及ぼすかどう  
ことは、上記の実験でわかったが、非特異的な全  
C M Pが消化管内で局所的に抗酸化能を発揮する  
(2) ビタミンE 欠乏時の酸化ストレスに対する抑制作用…  
C M Pが消化管内で局所的に抗酸化能を発揮する

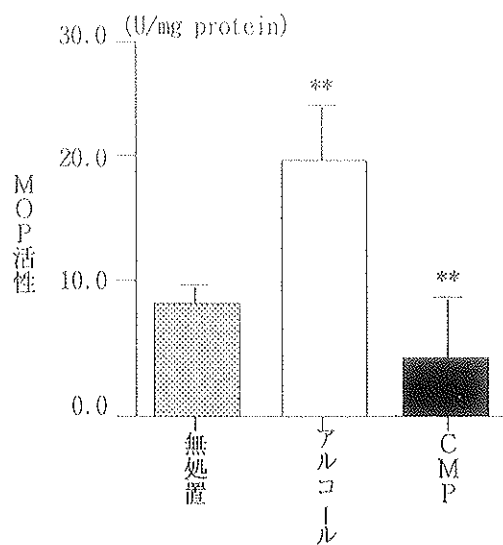


図8 胃粘膜ミエロペルオキシダーゼ活性に対するカカオポリフェノール作用

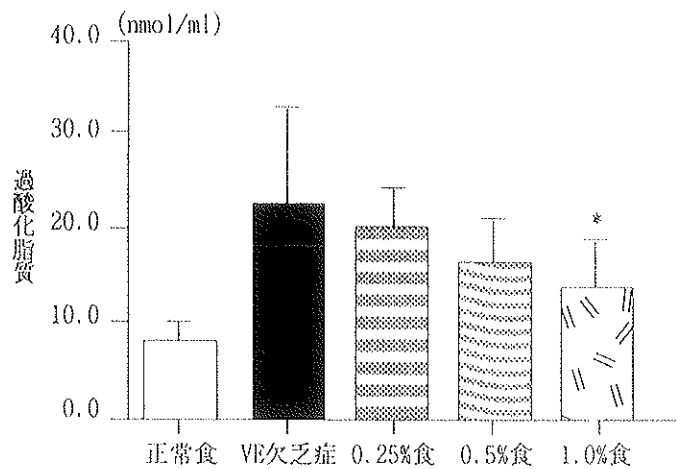


図9 ビタミンE欠乏食摂取ラットの血漿過酸化脂質濃度に対するカカオポリフェノールの作用

脳を摘出した。飼育期間中の体重および飼料摂取量は全群間で差異は認められなかった。血漿および各臓器のVE濃度は、正常食群に対して、VE欠乏食摂取群ではCMPの有無にかかわらず、著しく低下しており、CMPはVEの代謝に影響を及ぼさなかった。血漿中の過酸化脂質濃度は、VE欠乏食群に対してCMP添加群では用量依存的な抑制傾向を示した(図9)。また、肝・腎・心・脳中の過酸化脂質濃度についてもCMP添加群は用量依存的な抑制を示したが、その効果はとくに肝で著しかった(図10)。これらの結果から、カカオ豆に含まれる抗酸化物質は経口摂取によって吸

取され、生体内に広く分布し抗酸化作用を及ぼすことが明らかとなった。このことは、CMPが生体内で発生する活性酸素が一つの原因となる疾患である癌や動脈硬化の予防に役立つ可能性を示唆しているため、今後さらに検討する必要があるであろう。

今後の方針としては、カカオマスに含まれるポリフェノールの全貌を化学的に明らかにするとともに、種々の疾患に対する予防効果を臨床を含め検討し、チョコレート・ココアの新世代の機能性をもつ食品としての有用性を確認する所存である。

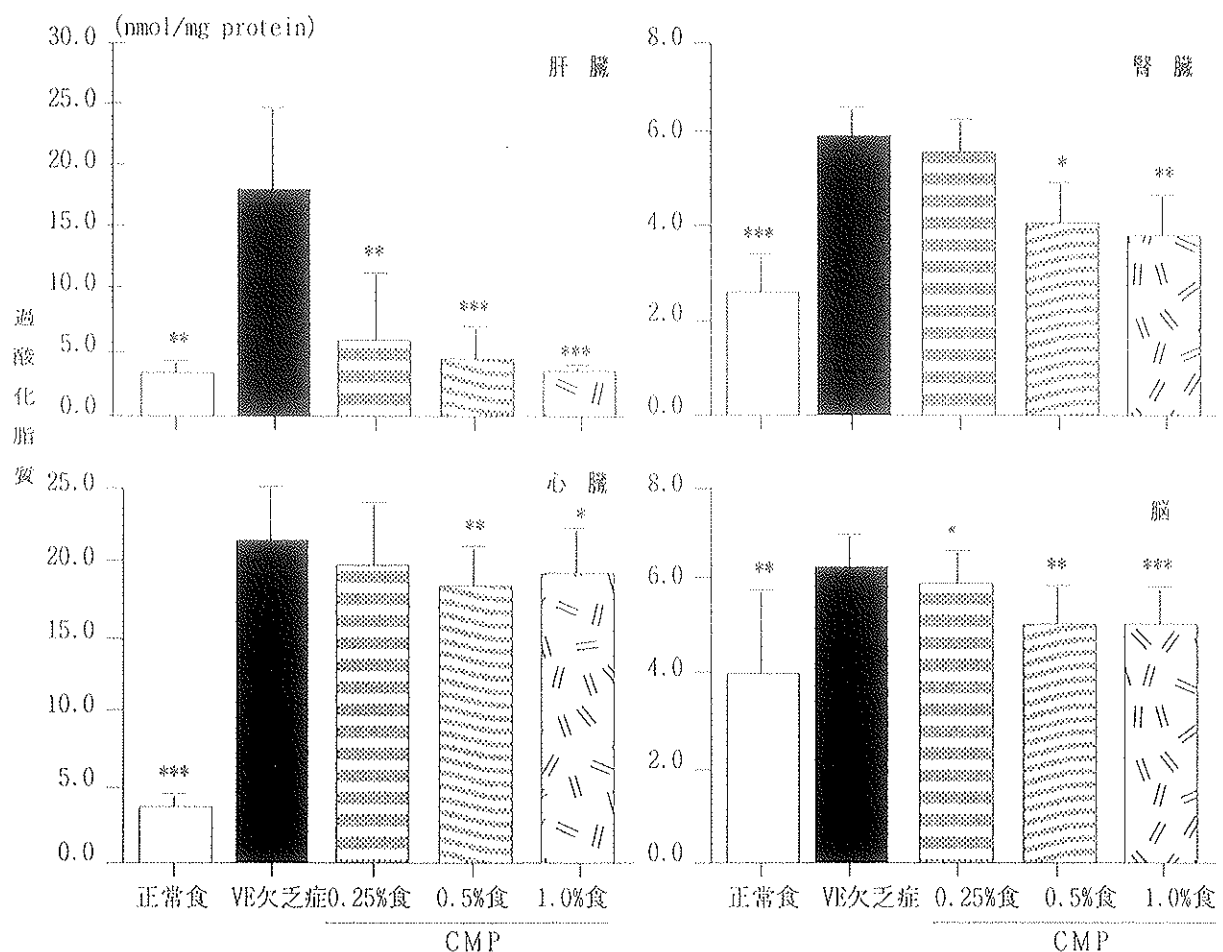
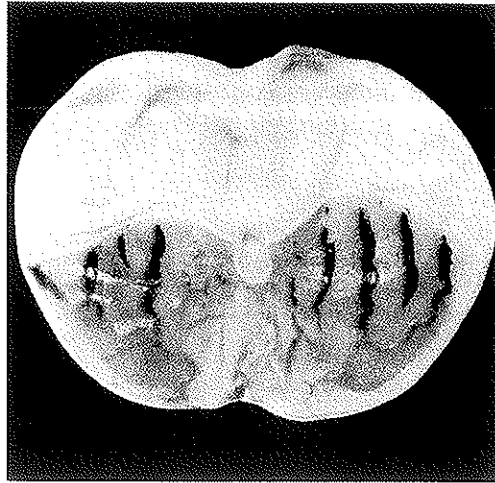


図10 ビタミンE欠乏食摂取ラットの臓器過酸化脂質に対するカカオポリフェノールの作用

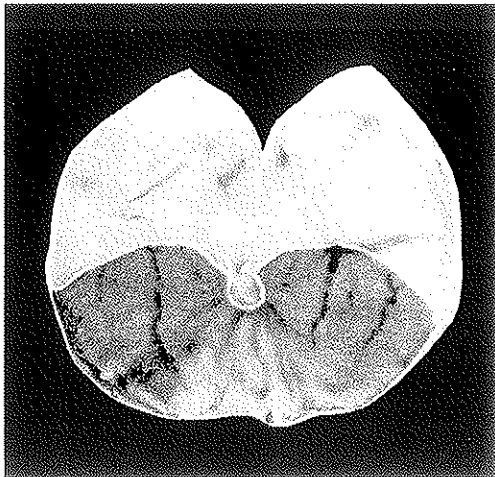
# 写真①ー⑤ アルコール性胃潰瘍の抑制効果

アルコール



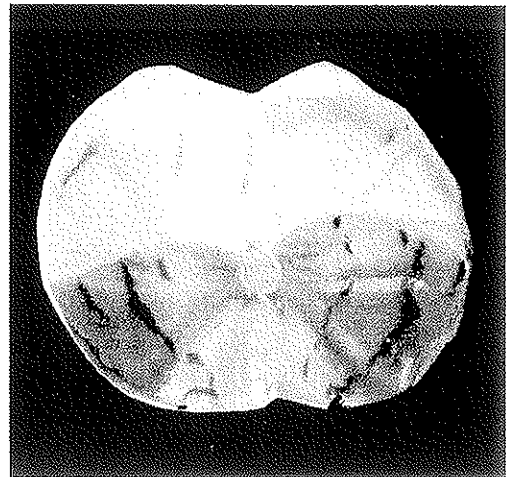
①

CMP (カカオポリフェノール)



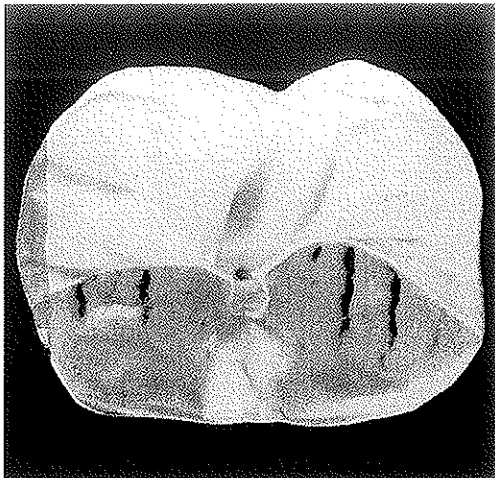
②

ビタミンE



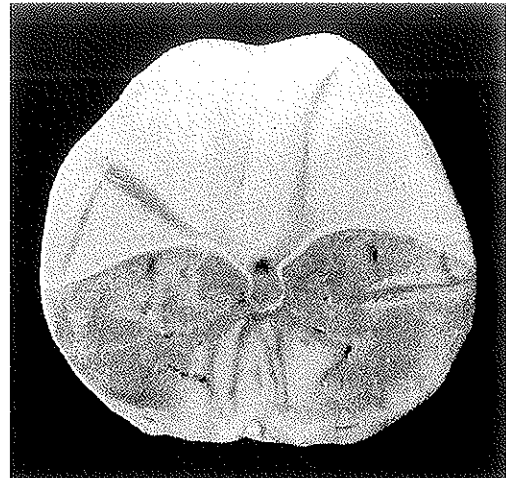
③

シメチジン



④

スクラルファート



⑤