

チヨコレート・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)

われわれは、昨年の本シンポジウムにおいて、

チヨコレート・ココアの原料であるカカオマスにエピカテキン・カテキン・クロバミ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を見だし報告した。またそれからポリフェノールが、DNAを損傷したり、細胞膜の構成成分である脂質を酸化する有害な活性酸素を消去することを確認した。この活性酸素は生体内でも威力を発揮し、癌・動脈硬化・糖尿病などの生活習慣病や老化を引き起こすことが示唆されているため、いくつかの疾病モデル動物におけるカカオマスポリフェノールの有効性を検証した。

今回は、カカオマスポリフェノールの全体像を明らかにすることを目的として分析を進め得られた知見について、また、ポリフェノールが持つもう一つの重要な生理活性である抗変異原性について検討したので報告する。

1. カカオポリフェノールの組成と抗酸化作用

チヨコレート・ココアの原料であるカカオマスをヘキサンで脱脂し、八〇％エタノールで二回抽出した。得られた抽出液(カカオマス抽出物 CME)をダイヤイオンHPLCで吸着カラムクロマトグラフィーを用い、分解精製し、脱脂カカオマスポリフェノール画分(CMP)を得た。さらにCMPをシリカゲルクロマトグラフィーおよび逆相HPLCを用いて分画し、分子量五〇〇〜一〇〇〇のフラクション(カカオマススタンニン画分、CMT)を分解した(図1)。

これらの分画物のポリフェノール量をアルシアンブルー法で定量した。標準物質としてエピカテキンを用いたところ、CMPの約五〇％、CMTの約七〇％がポリフェノールであった。

さらにその組成を調べるため、硫酸シンコニンを用いた沈澱法で分別定量したところ、CMPのポリフェノールの組成は、縮合型タンニン約五五％、非重合フラバン約三七％、加水分解型タンニ

ン約七％であり、単純フェノール類はほとんど認められなかった。また、CMTでは縮合型タンニンの割合が約八〇％まで上昇していた(図2)。

CMTの *In vitro* における抗酸化活性をリノール酸の変敗および肝ミクロソームを用いた系で測定したところ、リノール酸の変敗に対する抑制活性はCMPより若干弱かったが、生体を想定したモデルであるミクロソームを用いた系ではほぼCMPと同等の活性を示した。

2. カカオポリフェノールの抗変異原性

近年、果物や野菜といった植物性食品を日常的に多く摂取している人は、肉類を多食する人より癌になる率が低いことが疫学的調査から明らかとなってきた。また喫煙している人でも植物性食品を摂取することによって発癌のリスクが低下することも、数々のデータから示唆されている。これらのことは、食用植物中に癌を予防する成分が含まれていることを示しており、その有効成分の候補として、これまでにビタミンCやビタミンE、βカロチンなどの抗酸化ビタミンが栄養介入試験などの手法を用い検証されてきた。しかしこれら単独の成分の摂取によって、必ずしも癌を予防する効果が得られないことから、植物中に含まれる別の成分、たとえばカテキンなどのポリフェノール類などが注目されるようになってきた。今回、われわれは多段階にわたる発癌のメカニズム

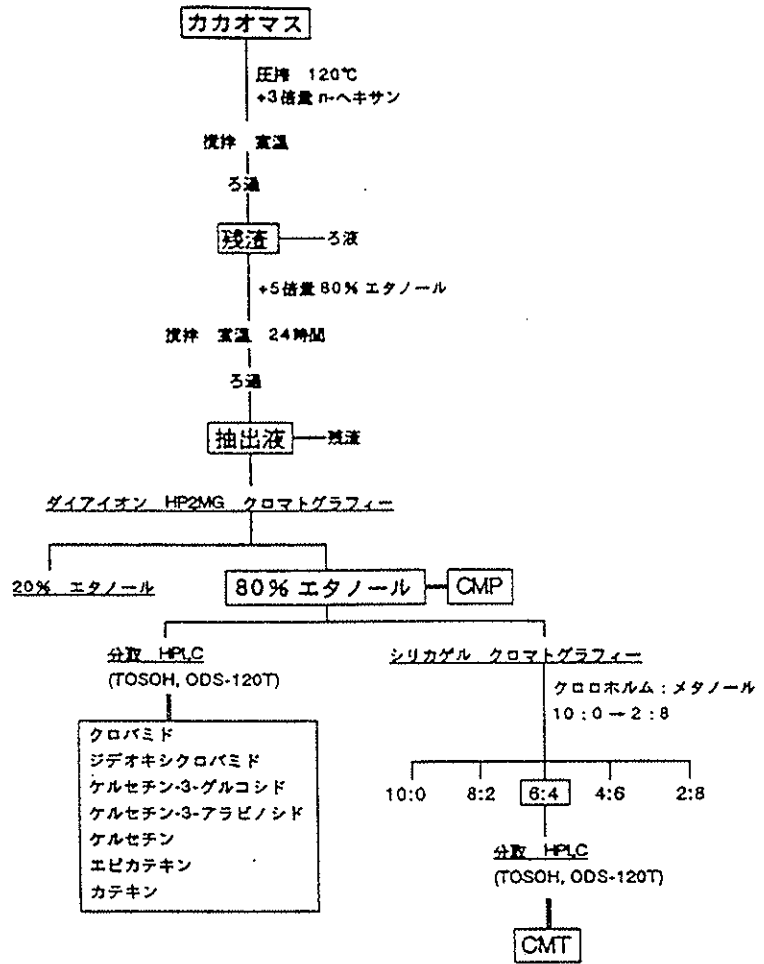


図1 カカオマスポリフェノールの調整法

のうち、とくに細胞の遺伝子(DNA)に修復不可能な損傷が生じ、潜在的癌細胞となる段階(イニシエーション)に着目し、カカオポリフェノールの作用について検討したので報告する。

(1)食品由来変異原物質に対する

カカオマスポリフェノールの阻害作用

癌の発生要因はまだ不明な点が多いが、最近その大部分がわれわれのライフスタイルに依存するという見方が注目されている。一九八二年にドル

物質として用い、*Salmonella typhimurium* (TA98)を使った*in vitro*の実験(A.M.E.S試験)を実施した。変異原物質と肝臓の代謝酵素であるSODを同時添加した系においては、CMPの構成成分のうちケルセチンが最も強く、次いでCMTの順であり、強い抗酸化活性を有するにもかかわらず、エピカテキンおよびカテキンにはほとんど効果が認められなかった(図3)。

またTrp、P₂やMeIQが肝臓で代謝されるこ

らによって発表された調査結果では、癌を誘発する要因の三割以上が食事にあると結論されている。そこでわれわれはまず食品由来の変異原物質に対するカカオマスポリフェノールの作用を検討した。第一段階としてアミノ酸の熱変性物であるTrp、P₂およびMeIQを変異原

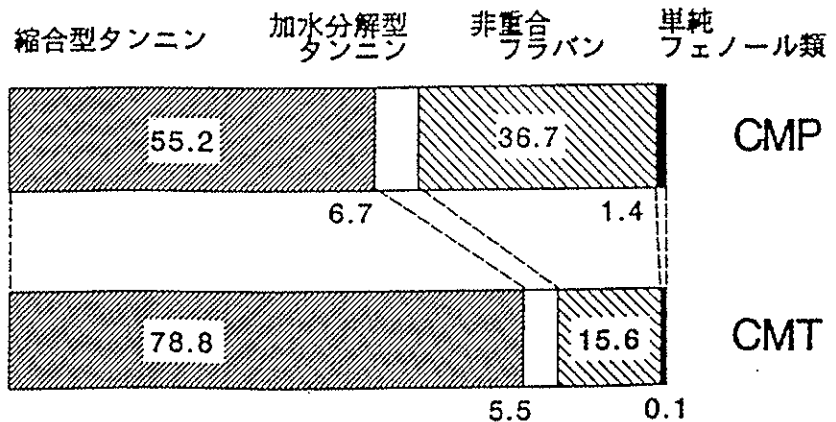


図2 カカオマスポリフェノールの組成

とによって生成し、細胞のDNAを直接障害するNOH体(この作用を持つ物質を究極変異原物質という)を添加した系においては、CMTの効果が最も著しく、ケルセチン・エピカテキン・カテキンにはほとんど効果が認められなかった(図4)。

CMTは肝臓の代謝活性化酵素を阻害し、究極変異原物質の生成を阻害するタイプの抗変異原物

質であるケルセチンとは異なった作用機序、すなわちすでに生成した究極変異原物質に直接的に作用し、不活性化することで、抗変異原性を示す物

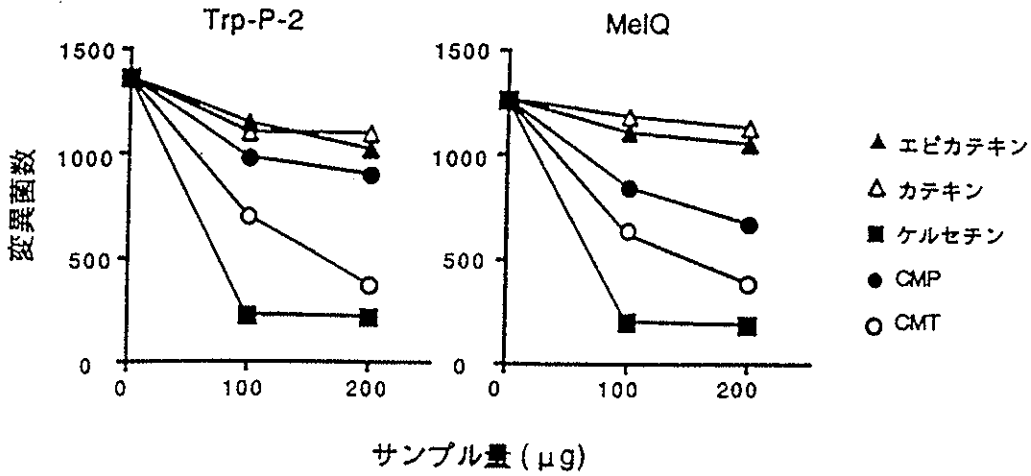


図3 ヘテロサイクリックアミンの変異原性に対するカカオマスポリフェノールの抑制作用

質であることが示唆された。次に動物を用いた実験として宿主経由法を行った。この実験はマウスの生体内でAMES試験と

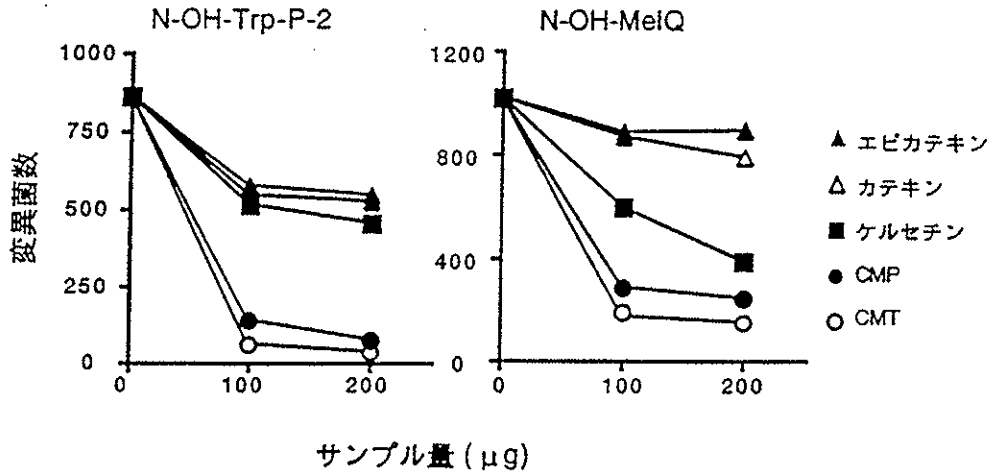


図4 ヘテロサイクリックアミン代謝活性化体の変異原性に対するカカオマスポリフェノールの抑制作用

同じ環境をつくり、被験物質の生体内での評価を行う方法である。すなわち被験物質を経口投与した後、尾静脈から *S. typhimurium* を注入、変異原物質を経口投与し、マウス肝臓内で一定時間共存させる。その後マウスの肝臓を摘出し、肝臓から菌体を取り出し、変異の有無を検出する(図5)。

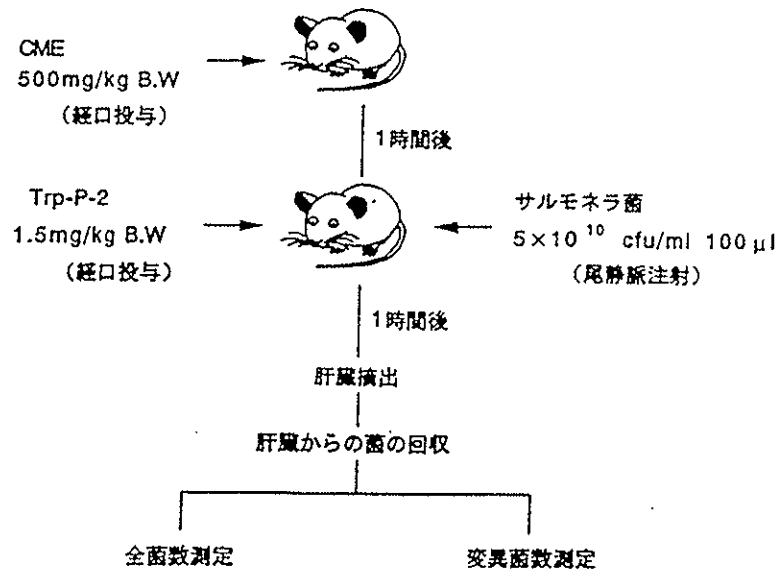
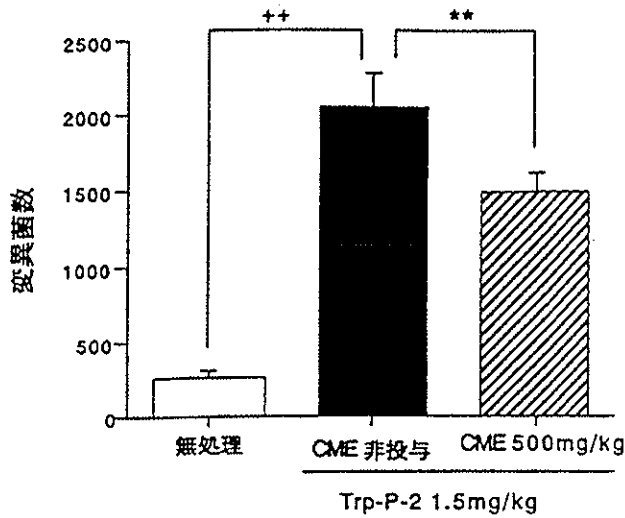


図5 宿主経由法によるカカオマスポリフェノールの変異原性抑制作用の評価

また、変異原物質として Trp-P-2 を用いて実験を行った。その結果、*in vitro* の場合と同様に、*in vivo* でもカカオマスポリフェノールに有意な変異の抑制が認められた(図6)。このことから、カカオマスポリフェノールの生体レベルでの作用機序は、生体内に吸収されて肝臓に移行し *in vitro* と同様な機構で変異原物質の作用を阻害するか、消化管内で変異原物質の吸収を抑制して結果的に変異を起こさせないかのいずれかであると推察された。

(2) 化学物質の変異原性に対するカカオマスポリフェノールの阻害作用



数値は平均値±SD. ++ **: p<0.01

図6 宿主経路法によるカカオマスポリフェノールの変異原抑制作用

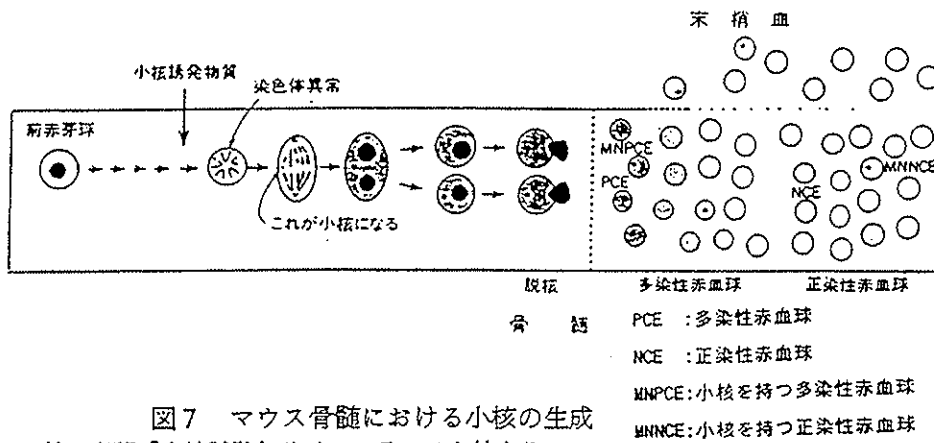
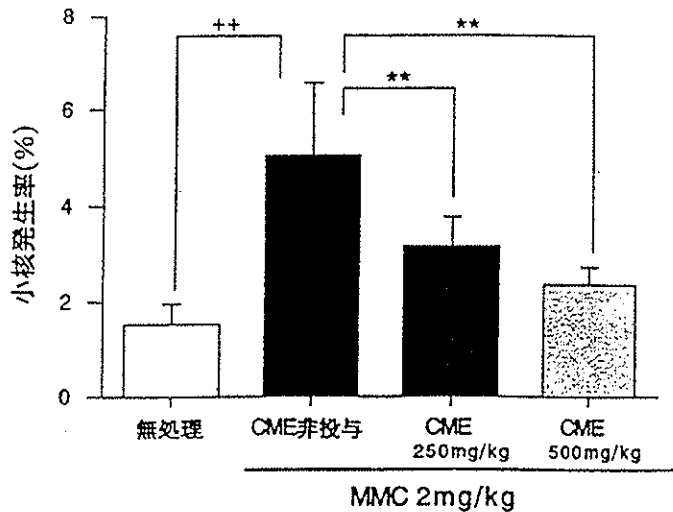


図7 マウス骨髄における小核の生成
林 真著『小核試験』サイエンティスト社より



数値は平均値±SD. ++ **: p<0.01

図8 小核試験法によるカカオマスポリフェノールの変異原抑制作用

現代社会には、残留農薬や食品添加物、医薬品、化粧品などの化学物質があふれており、これらの中には、DNAに障害を与えるものも少なくない。われわれは、次にこれら化学物質のマウス赤血球への変異に及ぼすカカオマスポリフェノール

の作用について検討した。すなわち、哺乳動物の赤血球はその形成過程で脱核し、無核細胞として成熟するが、染色体異常を誘因する化学物質を投与すると、脱核を免れたDNAの断片が小核として赤血球中に残存する(図7)。その小核の発現頻度に対するカカオマス抽出物(CME)の作用をマウスを用いて評価した。実験には六週齢の雄性ICRマウスを用いCMEを経口投与し、六時間後に変異原物質としてマイトマイシンC(MMC)を二キログラム/キログラムを腹腔内投与した。MMC投与と二四時間後に解剖し、大腿骨から骨髄細胞を調

製し、塗抹標本を作成し鏡検した。CME二五〇、五〇〇ミグマ／キログを投与することで、骨髓中の小核の発現頻度はMMC単独投与の場合に比べ、三八、五三%と顕著に抑制され、動物レベルでも強い染色体異常抑制作用を有することが確認された(図8)。

また、*in vitro*の実験として、MMCによるDNAの断片化に対するカカオマスポリフェノールの作用を検討したところ、CMEは顕著にDNAの断片化を阻害した。これらのことから、MMCが発生する活性酸素に対して、カカオマスポリフェノールが消去作用を有し、その結果としてDNAに対する障害を抑制していると考えられる。

すでにアメリカでは、国立癌研究所によって一九九〇年に「食品による癌予防」が提唱され、*「デザインードフーズプロジェクト」*として進行している。また、わが国でも厚生省による「対癌一〇カ年計画」が発表され、癌という疾病に対する予防の重要性が国内外を通じて認識され始めている。今回の結果から、チョコレートやココアといった食品が癌を予防する可能性が強く示唆された。

今後、臨床試験を含めさらに検討を重ね、癌予防という観点からカカオ利用食品の有用性を明らかにしていく所存である。