

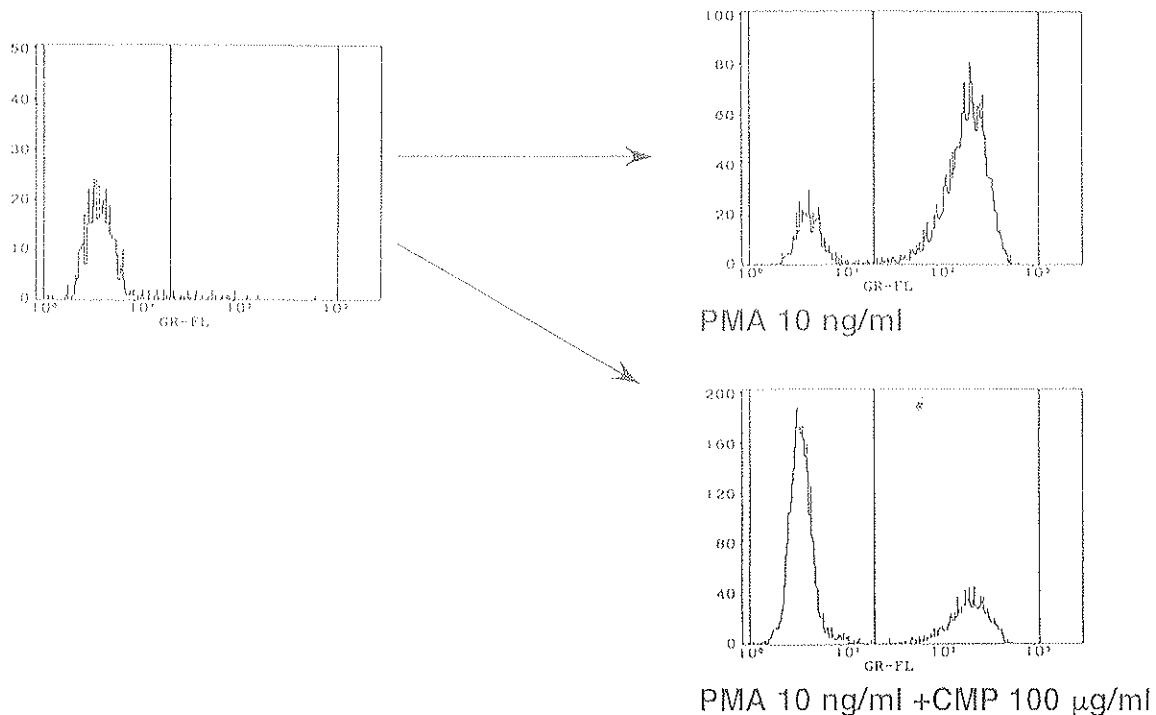
カカオマス抗酸化物質(CMP)の抗炎症、 免疫抑制作用に関する検討

坂根 剛 (聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター教授)

抗酸化作用のあるカカオマスポリフェノールが種々の疾患に予防作用のあることが試験管のレベルだけでなく実際に摂取したときにも効能が発揮されることが明らかになってきた。活性酸素は炎症の場において殺菌作用を示し感染防御に働くのみでなく、免疫系においても細胞のシグナル伝達に関わって細胞の活性化を引き起こすなど重要な役割を担っている。しかし、過剰に産生された活性酸素はむしろ組織傷害を引き起こし、種々の疾患を発症させる要因にもなる。チョコレートの原料であるカカオマスのポリフェノール画分 (CMP) はその抗酸化作用により過剰な活性酸素を抑制して、免疫応答を調節することを過去2回のシンポジウムで報告してきた。今回は免疫系の異常によってもたらされるアレルギーや慢性関節リウマチなどの慢性炎症に対するCMPの効能について、主として実際に摂取したときの生体内における役割について報告する。

好中球からの過剰な活性酸素の産生は様々な病態の増悪因子と考えられているが、CMPはこの好中球からの過剰な活性酸素の産生を強く抑制する。すなわち、*in vitro*においてヒトの好中球をPMAで刺激すると、大部分の好中球は、活性酸素の一つである過酸化水素を産生するようになる。このPMA刺激好中球の培養系にCMPを添加すると好中球による過酸化水素の産生は著しく減少する(図1)。

図1 Effect of CMP on superoxide production of activated neutrophils



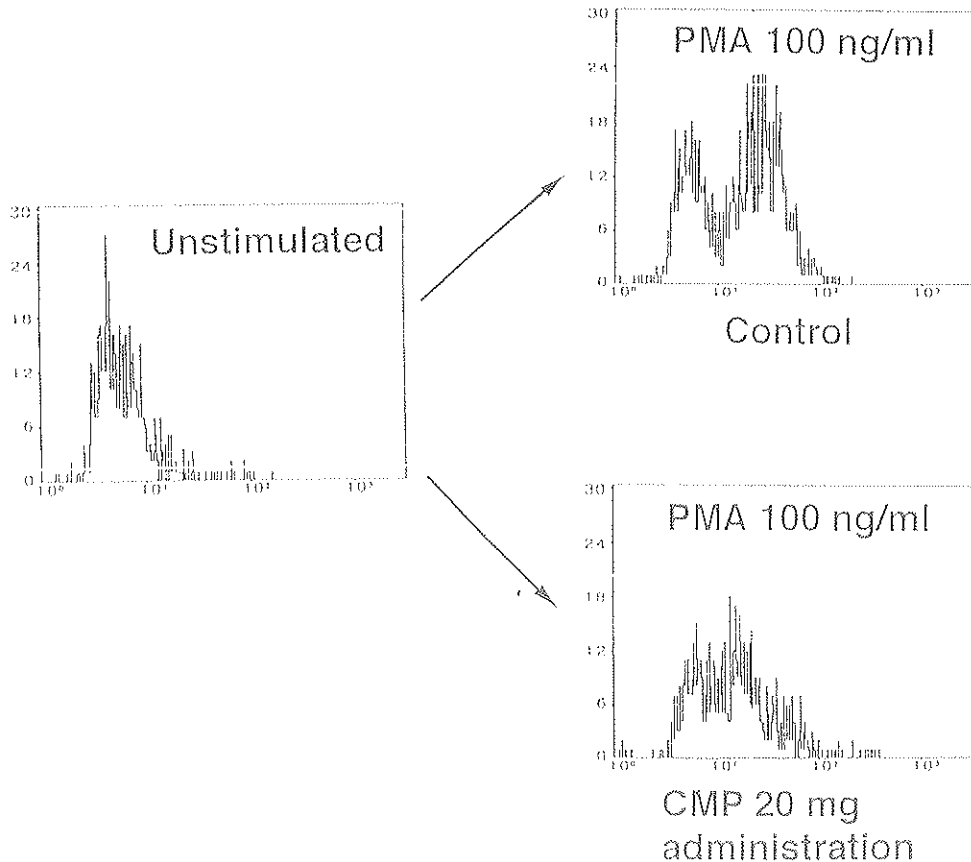
次に、好中球からの活性酸素をCMPが*in vivo*でも実際に抑制できるかどうかをマウスを用いて検討した。マウスにCMPを経口摂取させ、好中球の活性酸素の産生抑制が認められるかどうかを検

討した。マウスを一晩絶食後、CMP 20mgを経口摂取させたあと、採血し、マウスの好中球をPMAで刺激し、好中球による活性酸素の産生について調べてみた。

マウス好中球をPMAで刺激すると著しい過酸化水素の産生が認められる。しかし、CMPを予めマウスに投与しておく、PMA刺激による好中球の過酸化水素の産生は明らかに低下する（図2）。

In vivoにおけるCMPの効能をリウマチの動物モデルでも検討してみた。マウスにウシII型コラーゲンを投与すると、ヒトのリウマチに似た関節炎が誘導できる。しかし、ウシII型コラーゲンの投与を開始する7日前から予めCMPを投与しておく、CMPを摂取させたマウスでは関節炎の発症が強く抑制されることがわかった。

図2 Effect of CMP on H₂O₂ production by activated neutrophils of mice



II型コラーゲンを免疫したあと37日後には大部分のマウスは関節炎を発症するがCMPを投与したマウスでは関節炎をほとんど発症しないことがわかる（図3）。

実際、病理学的にマウスの足の組織像を観察してみると、CMPを投与していないマウスでは滑膜の著明な増生、パンヌス形成、炎症細胞の浸潤などが認められ関節破壊が著しいことがわかる。

しかし、CMPを投与したマウスでは、僅かに炎症像が認められるが、滑膜の増生の程度も低く関節破壊が抑制されていることがわかる。

リウマチでは滑膜細胞、特に線維芽細胞様のB型滑膜細胞の過剰な増殖がパンヌス形成の主役となり、関節破壊につながっている（図4）。

In vitroで、リウマチ患者関節組織から採取した線維芽細胞様のB型滑膜細胞をTNF- α 刺激を行うと、滑膜細胞の強い増殖が認められる。しかし、この培養系にCMPあるいはCMPの抗酸化成分の1つであるエピカテキンを添加すると滑膜細胞の増殖は著しく抑制される（図5）。

図3 Effect of CMP on collagen induced arthritis in mice

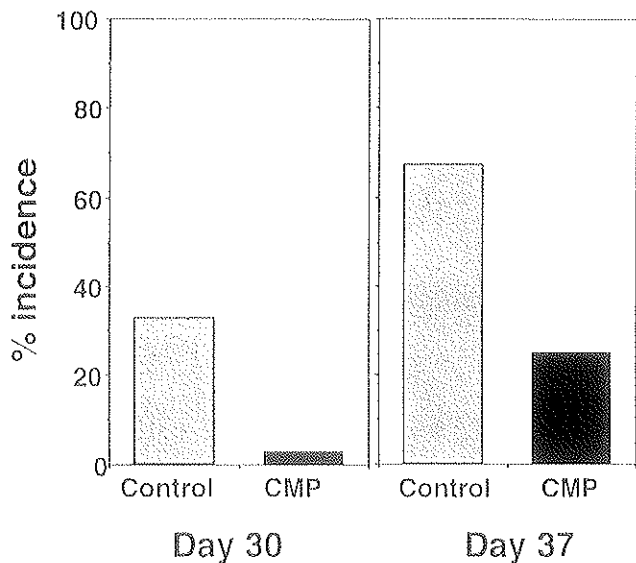


図5 Effect of CMP on proliferative responses of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis

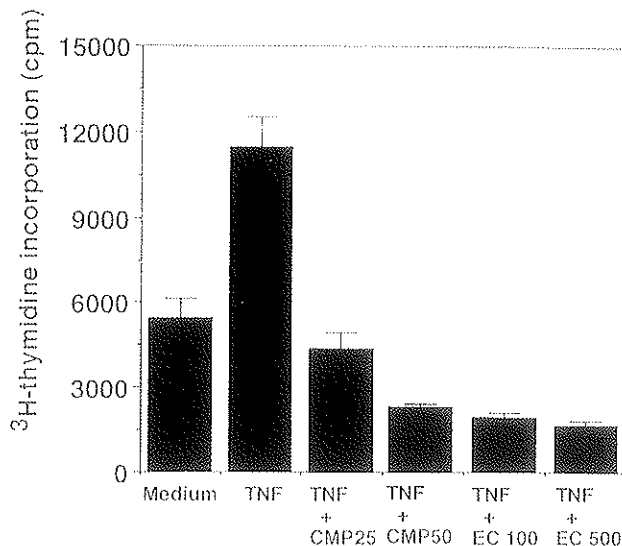
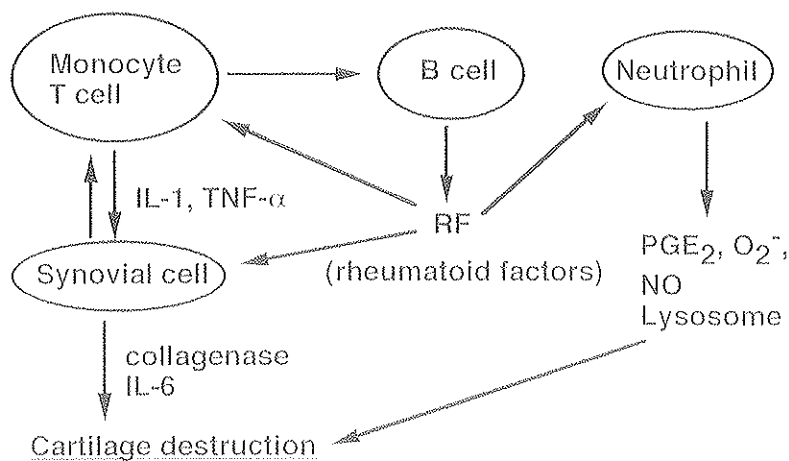


図4 Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis



増殖した滑膜細胞やパンスヌスからは炎症性サイトカインが産生され、病態の維持、増悪、関節破壊に深く関わっている。炎症性サイトカインの一つであるIL-6の滑膜細胞による産生をmRNAレベルで調べてみるとTNF刺激を行った滑膜細胞ではIL-6、mRNAの強い発現が認められる。この培養系にCMPあるいはエピカテキンを加えるとIL-6、mRNAの発現は著しく減少し、実際にIL-6蛋白の産生も強く抑制される(図6)。

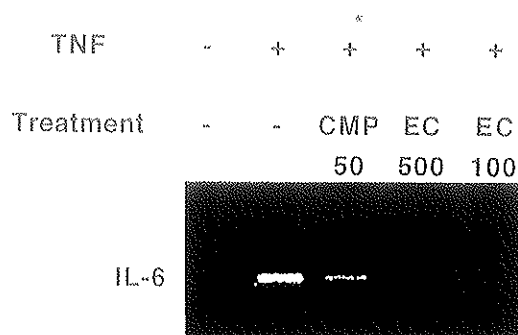
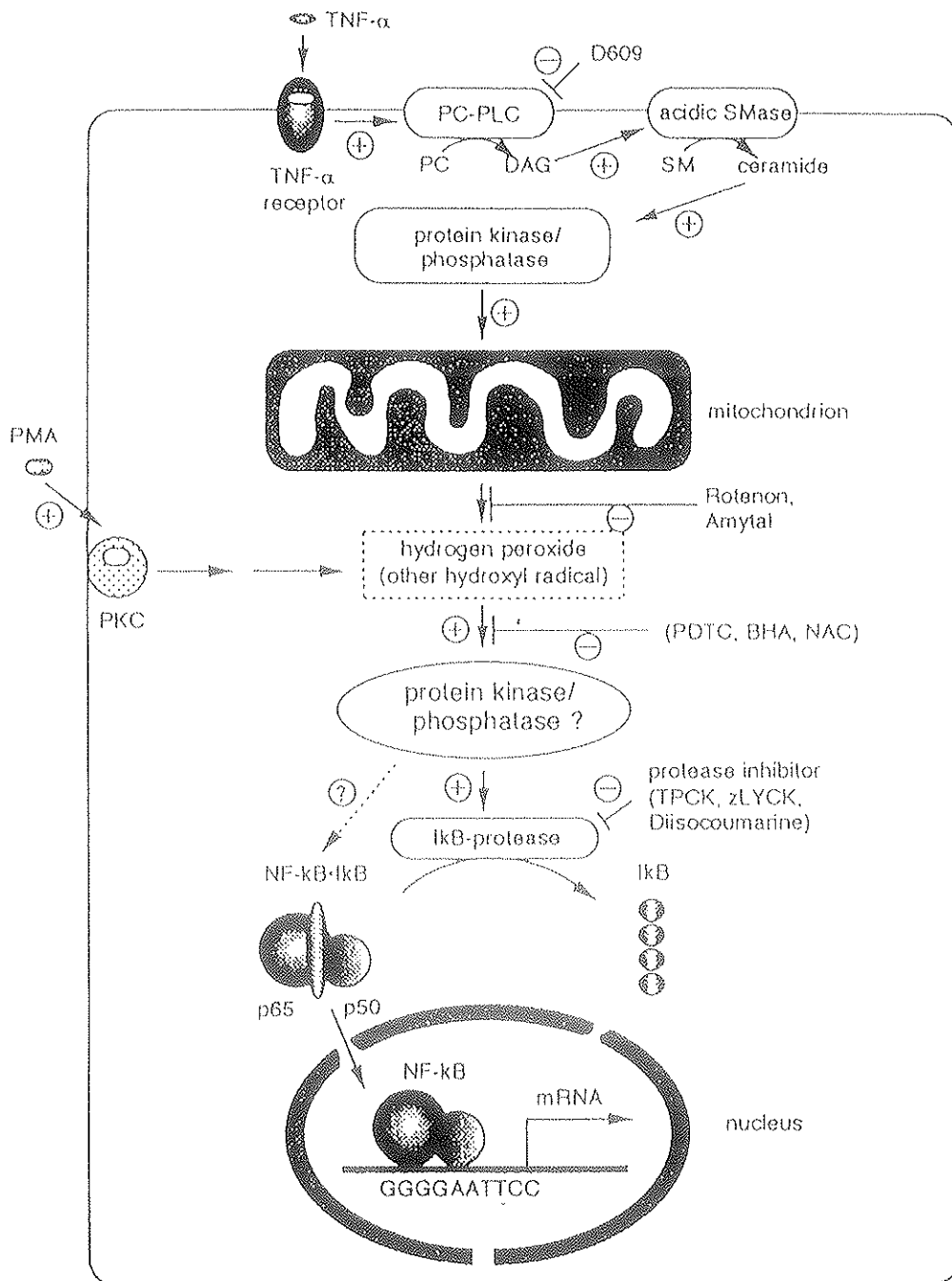


図6 Effect of CMP on IL-6 mRNA expression of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis

滑膜細胞の増殖や炎症性サイトカインの産生は、細胞質に存在する転写因子NF- κ Bの活性化により、NF- κ Bが細胞質から核内に移行し、遺伝子転写が亢進することにはじまる。そこでCMPのリウマチに対する抑制効果がNF- κ Bの活性化を介したものであるのかどうかを検討してみた。

TNF- α で刺激していない滑膜細胞のNF- κ Bは細胞質内に存在し、核の中には全く認められない。しかし、滑膜細胞をTNF- α で刺激すると、NF- κ Bの核内への移行が起こり、核の部分が赤く染まる。このTNF- α 刺激培養系にCMP、あるいはエビカテキンを添加すると、核は赤く染まらず、NF- κ Bの核内移行は抑制されていることがよくわかる (図7)。

図7 Activation of NF- κ B by TNF- α and PMA



転写因子NF- κ Bの活性化には活性酸素が関与している。CMPが滑膜細胞のNF- κ Bの活性化を抑制した成績は、抗酸化作用をもつCMPの滑膜細胞からの活性酸素の産生の抑制を介したものである

ことを推測させる。実際、B型滑膜細胞にビタミンK₃, menadioneを添加するとこれも活性酸素の一つであるスーパーオキシドアニオンの産生が起こる。この培養系にCMPを添加すると、予想通り滑膜細胞からのスーパーオキシドアニオンの産生が抑制される (図8)。

リウマチ因子はリウマチの病態を悪化させる方向に働く。そこで、重症免疫不全マウス、SCIDマウスにリウマチ患者のリンパ球を移入してヒトのリンパ球をSCIDマウスに生着させ、よりヒトに近い動物モデルでCMPの効能を検討してみた (図9)。

その結果、CMPを摂取していないマウスでは強いヒト型のリウマチ因子の産生を認めるが、CMPを経口摂取させたマウスではリウマチ因子の出現がきれいに抑制される (図10)。

このことはアレルギー炎症にもあ

Unstimulated

Menadione

Menadione
+
CMP

Menadione
+
Epicatechin

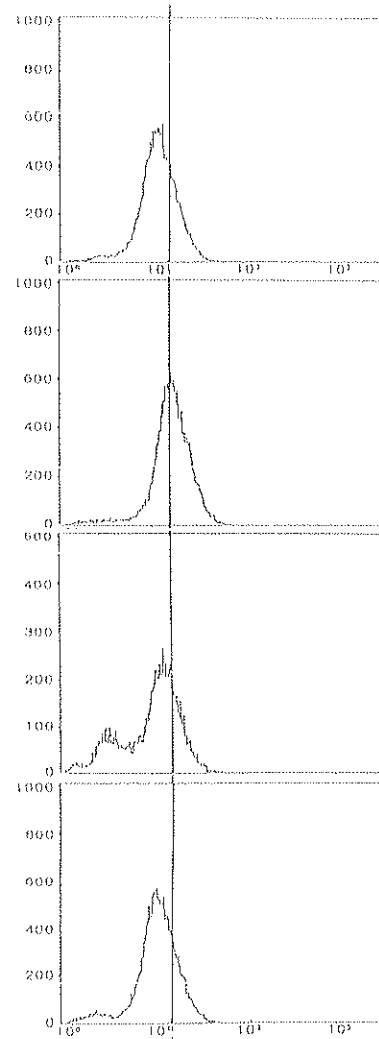
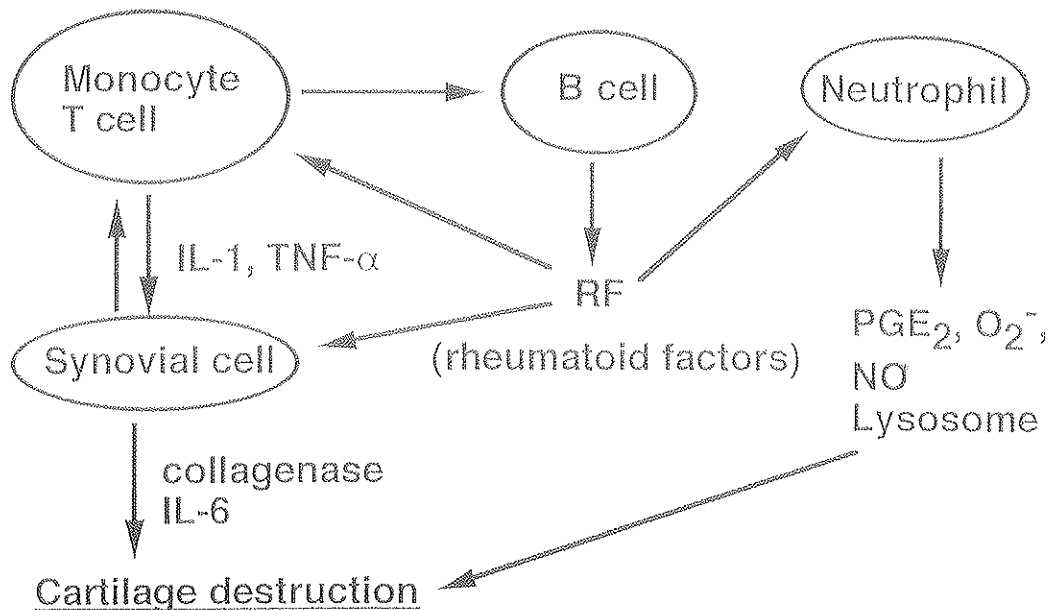


図9 Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis



てはまり、CMPをあらかじめ投与したSCIDマウスにアトピー性皮膚炎患者のリンパ球を移入して経時的にヒト型IgE産生を測定してみると、CMPを摂取していないマウスでは強いヒト型のIgE産生を認めるが、CMP摂取マウスではヒト型IgEの産生が強く抑制される (図11)。

図10 Effect of CMP on rheumatoid factor (RF) production in SCID mice engrafted with lymphocytes of a patient with rheumatoid arthritis

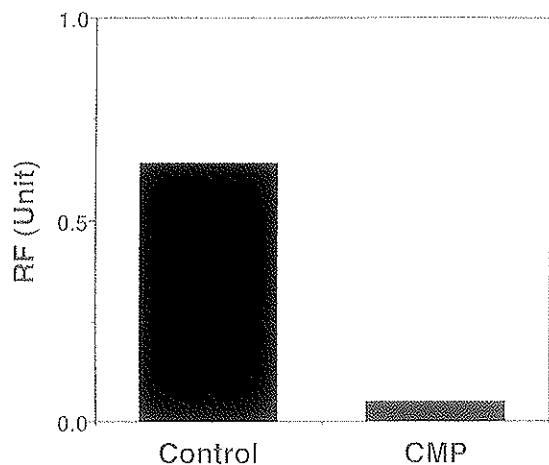
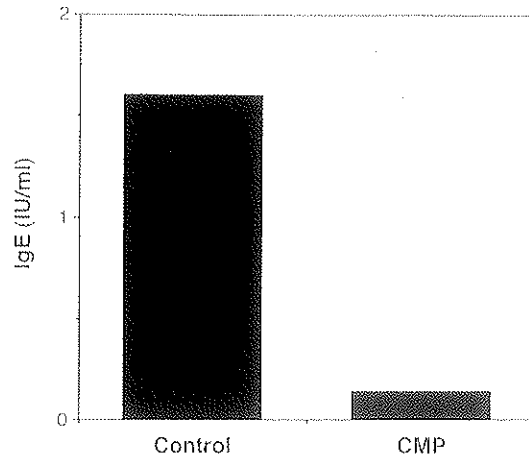


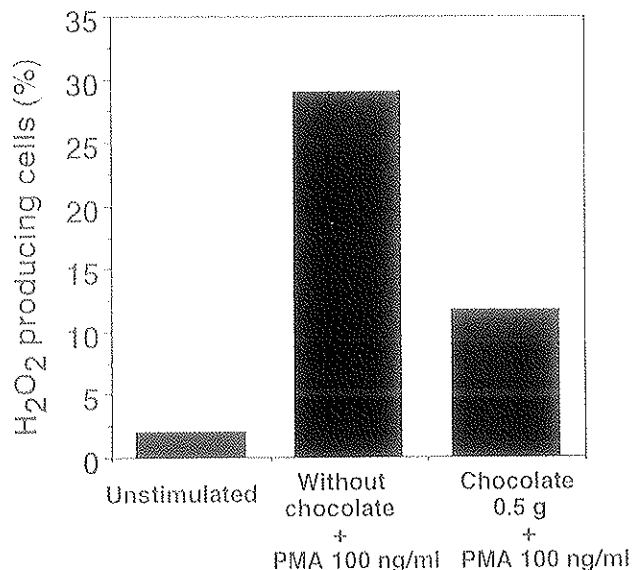
図11 Effect of CMP on human IgE production in SCID mice engrafted with lymphocytes of a patient with atopic dermatitis



このようにモデル動物ではあるがin vivoのレベルでもCMPの効能が明らかになった。ここまではチョコレートの成分で抗酸化作用をもつCMPを使っただけの成績を示したが、実際のチョコレートを摂取してもCMPと同じような効能が認められるかどうかを調べてみた。

まずマウスにチョコレートを経口摂取させ好中球の活性酸素の産生が抑制されるかどうかを検討した。チョコレートを投与しないマウスの好中球をPMAで活性化すると、過酸化水素の著しい産生を認めるが、チョコレートを経口摂取したマウスの好中球をPMA刺激すると、好中球の過酸化水素の産生は明らかに低下する。すなわち、チョコレートそのものを摂取させても抗酸化作用があらわれ、活性酸素の産生が抑制されることになる (図12)。

図12 Effect of chocolate feeding on H₂O₂ production by activated neutrophils of mice

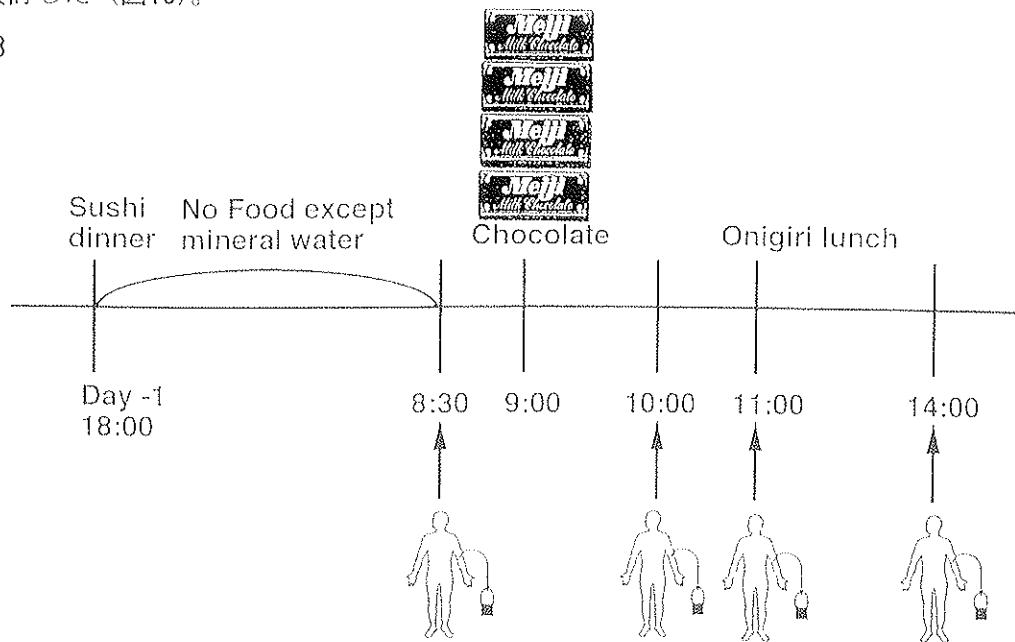


それではヒトでもチョコレート摂取による活性酸素の産生抑制を介した抗炎症、免疫調節作用が認められるかどうかを、我々の研究室にいる健康人ボランティア3人に協力してもらって調べてみた。

試験前日、夕食に抗酸化物質の少ないといわれているお寿司を1.5人前食べてもらった。試験当日朝まで水以外は何も摂取せず、朝9時にチョコレート4枚、200gを食べてもらった。チョコレート摂取前、摂取1時間後、2時間後、5時間後に採血し、まず、末梢血好中球の活性酸素産生能につ

いて検討した (図13)。

図13



PMAで刺激したときの好中球からの、スーパーオキシドアニオンの産生に対するチョコレート摂取の効果を経時的に検討した。チョコレート摂取前の好中球はPMA刺激により活性酸素を大量に産生するが、摂取1時間後では、PMA刺激による活性酸素の産生は明らかに抑制される。この効果はチョコレート摂取後2時間後にも認められたが、5時間後には認められなくなる (図14)。

次に、PMA刺激によって誘導されるもう一つの活性酸素種である過酸化水素の産生に対する効果についても検討してみた。ここでもチョコレート摂取1時間後および2時間後において、PMA刺激好中球の過酸化水素産生の抑制が認められる。これらの成績は実際にヒトが摂取したチョコレートは体内に吸収され、おそらくチョコレート中のポリフェノールが作用して好中球の過剰な活性化を制御できることを示している (図15)。

次に、チョコレートの摂取によるアレルギー炎症に対する効果を検討してみた。アレルギー発症のメカニズムについて簡単に説明しておく、最初にアレルゲンに接したときに、アレルゲンに対するIgE抗体が作られ、このアレルゲン特異的IgE抗体が肥満細胞に結合し、再びアレルゲンに接触すると肥満細胞に結合したIgEが架橋され、脱顆粒がおこってヒスタミン等の化学伝達物質が遊離し、気道収縮、発赤、浮腫などのアレルギーの症状が出現するわけである。アレルギーを制御する方法として、IgE産生を抑制する方法と肥満細胞からのヒスタミンなどの遊離を抑制する方法、アレルギー炎症の主役である好酸球の脱顆粒を抑制する方法などがある。この中で、CMPによるIgEの産生抑制に関しては、先に示したようにSCIDマウスにアレルギー患者のリンパ球を生着させCMPをマウスに摂取させることにより、IgE産生が実際に低下した。しかし、ここではアレルギーのない健康者にチョコレートを食べてもらったので、IgE産生がチョコレートを食べることで抑制されるかどうかを調べることはできない (図16)。

そこでチョコレート摂取したときのヒスタミン遊離に対する効果について検討を加えた。末梢血好塩基球を抗IgE抗体刺激すると好塩基球からヒスタミンが遊離する (図17)。

しかし、チョコレートを摂取すると1時間後には抗IgE抗体刺激によるヒスタミンの遊離は著しく抑制される。この成績はアレルギー症状がすでに進行している場合でもチョコレートの摂取によ

図14 Effect of intake of chocolate on O_2^- production by activated neutrophils; Human study

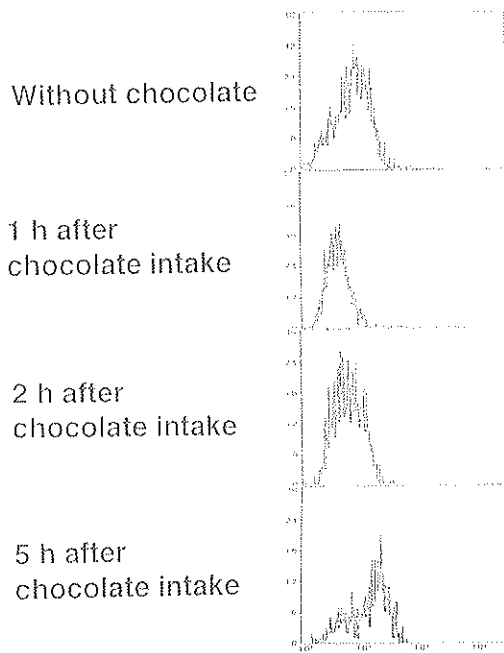


図15 Effect of intake of chocolate on H_2O_2 production by activated neutrophils; Human study

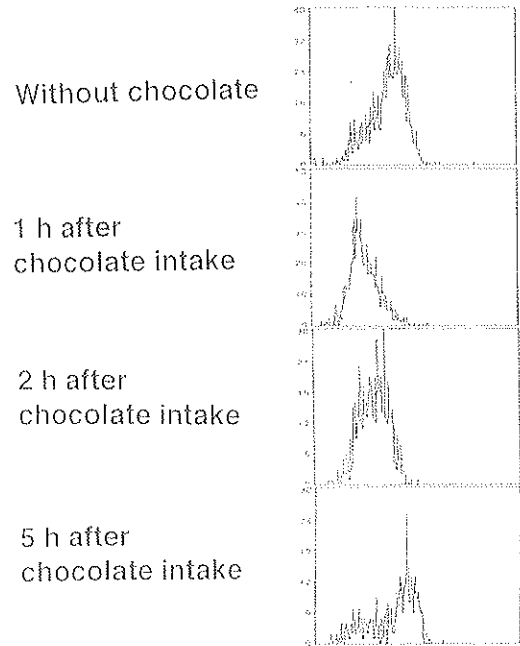
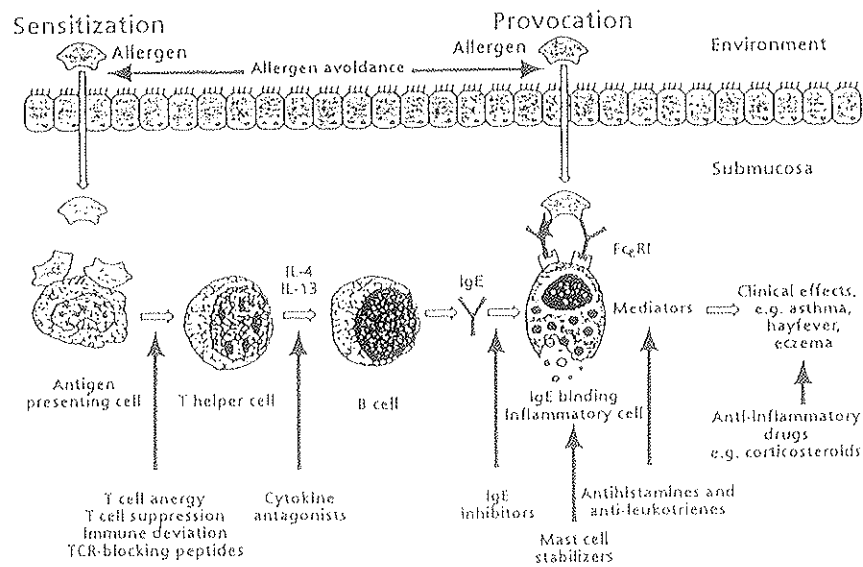


図16



ってヒスタミンの遊離を抑制して、アレルギー炎症を緩和できることを示している (図18)。

好酸球もまたアレルギー性疾患の炎症の場を集積し、アレルギー炎症を惹起する顆粒蛋白を放出してアレルギー炎症を増悪させると考えられている。

そこで好酸球の脱顆粒に対するチョコレート摂取の抑制効果を検討した。正常人末梢血の好酸球をPMAで刺激すると、大部分の好酸球は活性化され脱顆粒を引き起こした結果、細胞質内に多数の空胞が生じる。チョコレート摂取1時間後に採血した末梢血好酸球では顆粒の放出は抑制され空胞の生成は認められない。

このように脱顆粒を引き起こしている好酸球の割合をまとめたのが図19である。チョコレート摂取前には大部分の好酸球がPMA刺激により脱顆粒を引き起こすがチョコレートを摂取して1時間

図17 Histamine release

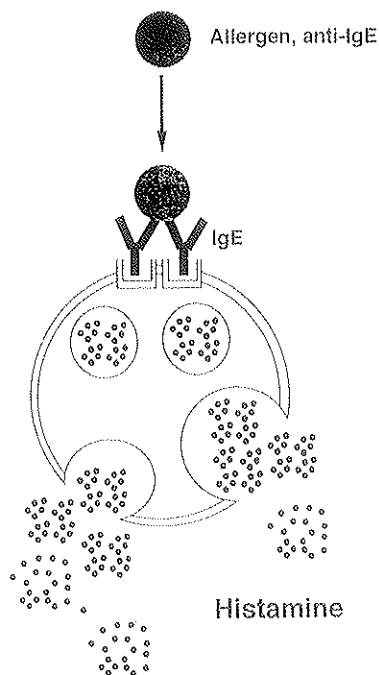
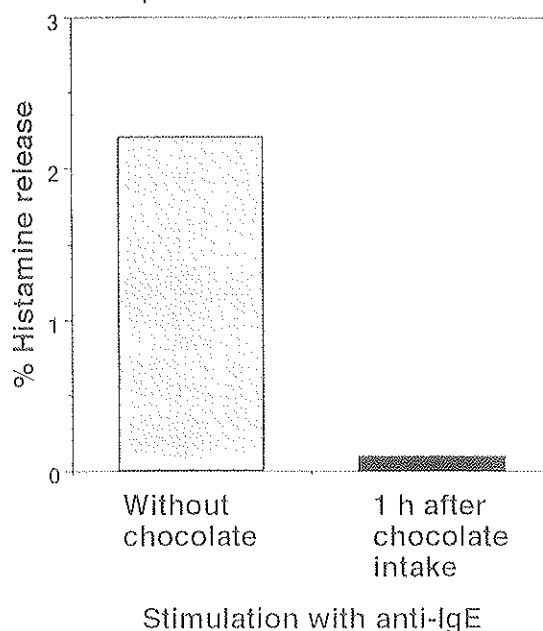


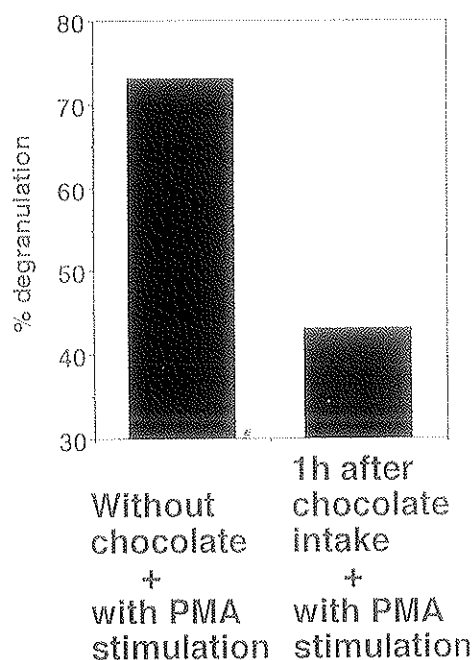
図18 Effect of intake of chocolate on ex vivo histamine release by human basophils



後の好酸球では脱顆粒の割合が著しく減少している。

ヒスタミンの遊離や好酸球の脱顆粒といったアレルギー炎症においても活性酸素の関与が明らかにされている。CMPのような抗酸化物質は免疫系の異常に関わる過剰な活性酸素をその抗酸化作用により調節し、病態を改善する方向に作用することを *in vitro*、モデル動物実験、および健常者ボランティアの協力によるテストで解明した。ここで示した成績は免疫異常が病態形成に関与する免疫疾患やアレルギー疾患に対してチョコレートなどの食品由来の抗酸化物質が有効であることを示唆している。

図19 Effect of intake of chocolate on ex vivo degranulation of human eosinophils



今後、チョコレートの長期的な摂取の影響を含めてさらなる有効性を検討していくことが必要な作業であろう。また、ここで観察した成績がカカオの抗酸化作用だけで説明できるのか、あるいは他のメカニズムも関与しているのかということも明らかにしていく必要がある。このように食品のもつ健康増進の働きを科学的に解明することは、食品と健康との関連を考え、応用していく上で今後ますます重要な課題になるものと思われる。

坂根 剛 (聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター教授)

昭和43年京都大学医学部卒業。50年同博士課程修了。51~54年米NIH客員特別研究員。54年島根医科大学医学部助教授。平成3年より聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター教授(病因免疫部門長)。厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班班長。厚生省特定疾患調査連絡協議会会長。医学博士。