

# チョコレート摂取のヒト免疫能に対する影響

鈴木 登 (聖マリアンナ医科大学助教授)

## はじめに

チョコレートの原料であるカカオ豆には大量のポリフェノールが含まれていて、カカオマスポリフェノールCMPと呼ばれている。カカオマスポリフェノールは抗酸化活性を基本にして多彩な機能を生体内で示すことが多くの研究室から報告されている。我々もすでにカカオマスポリフェノールCMPがin vitroの実験系において抗炎症、免疫調節作用を示すことを報告してきた。ここではチョコレートに含まれるカカオマスポリフェノールCMPの免疫系細胞に対する作用についてin vitroでの成績と、さらに実際にチョコレート摂取時のヒト免疫系に対する作用について検討した成績を紹介する。

## 活性酸素と組織障害

感染性微生物が生体内に侵入すると、好中球やマクロファージは活性化され、活性酸素を放出する。活性酸素は感染性微生物の殺菌に働くが、生体のもつ抗酸化防御システムで消去しきれない過剰な活性酸素は組織障害を惹起する方向に作用する(図1)。外因性に摂取した抗酸化物質はこの過剰な活性酸素による組織障害を抑制するように働く。そこで正常者好中球からの活性酸素産生に対してカカオマスポリフェノールが抑制的に作用するのかin vitroで検討してみた。正常人末梢血好中球に蛍光プローブであるDCFHという非蛍光色素を取り込ませたあと、好中球 phorbol myristate acetate, PMA で刺激すると、好中球は過酸化水素を産生する。過酸化水素と接触したDCFHは、蛍光を発光するDCFに転換する。この蛍光を発する細胞をフローサイトメーターで測定した(図2)。非刺激好中球では大部分が低い蛍光を示し、ほとんど活性酸素を産生しないのに対し、好

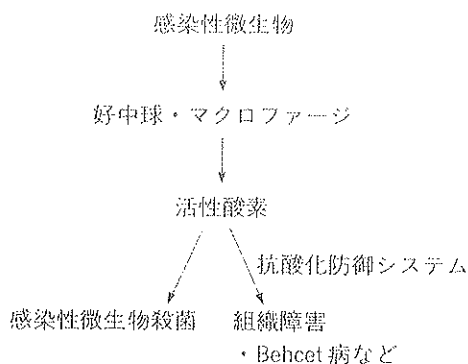


図1 好中球活性酸素産生の役割

## 方法 (in vitro)

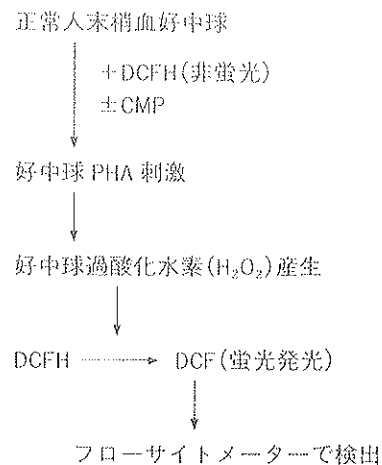


図2 好中球活性酸素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)産生の検出法

中球を PMA で刺激すると大部分の好中球は右側にシフトして強い蛍光を発し、多量の過酸化水素を産生する。この PMA 刺激好中球の培養系にカカオマスポリフェノール CMP 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加すると好中球の蛍光は減弱し (図 3)、CMP は好中球による過酸化水素の産生を抑制中和する方向に作用することが明らかになった。活性酸素は感染性微生物の殺菌のみでなく、細胞増殖、細胞活性化のための刺激伝達、signal transduction にも重要な役割を果たしている。活性酸素は転写因子である、NF- $\kappa\text{B}$  や AP-1 を活性化し、細胞の様々な遺伝子転写を亢進させ、mRNA の合成促進、蛋白質の合成を促進し、細胞増殖、細胞活性化を誘導する (図 4)。そこでリンパ球の活性化にかかわる活性酸素産生に対するカカオマスポリフェノール CMP の効果を検討した。正常者末梢血からフィコール比重遠心法でリンパ球を分離し蛍光プローブである水酸化エチジウム HE を加えてリンパ球に取り込ませ、ビタミン K3 である menadione で刺激するとリンパ球はスーパーオキシドアニオンを産生し、その結果、蛍光を発するエチジウムが産生される (図 5)。カカオマスポリフェノール

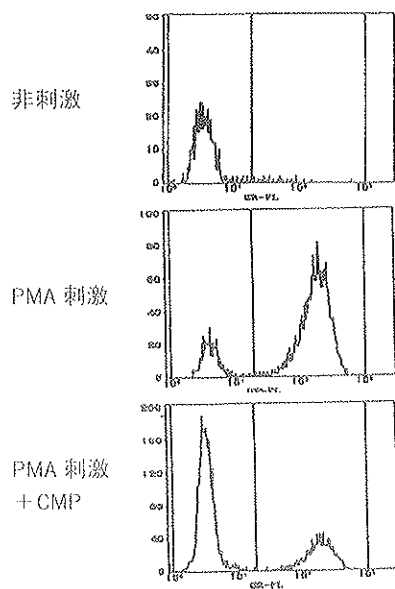


図 3 好中球  $\text{H}_2\text{O}_2$  産生に対する CMP の効果

活性酸素

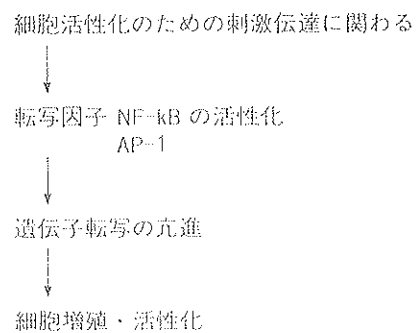


図 4 活性酸素と細胞内刺激伝達

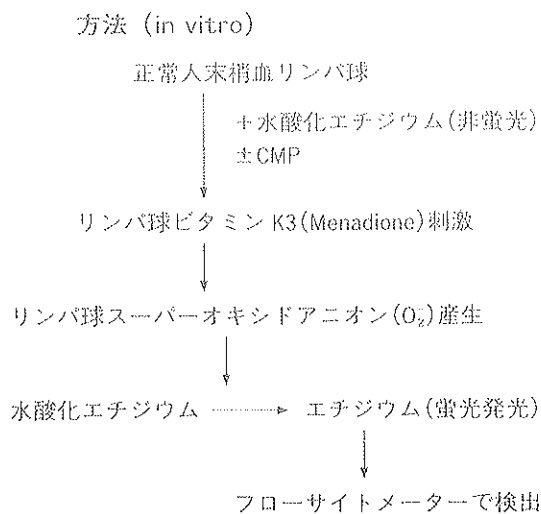


図 5 リンパ球活性酸素( $\text{O}_2^-$ )産生の検出法

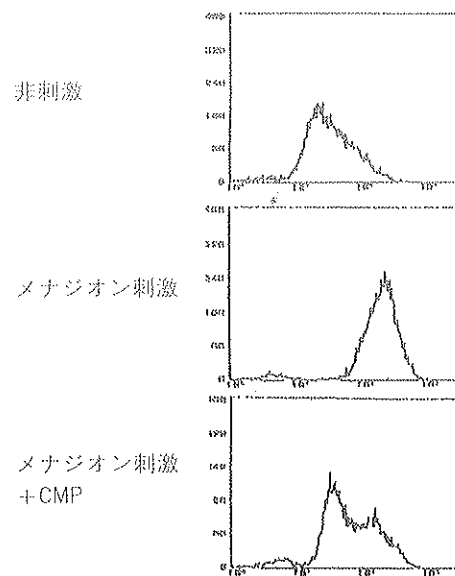


図 6 リンパ球  $\text{O}_2^-$  産生に対する CMP の効果

ール CMP を添加するとリンパ球の蛍光輝度は低下して、リンパ球による活性酸素、スーパーオキシドアニオンの産生が濃度依存的に減少することが示された。同様に menadione 刺激によるリンパ球からの過酸化水素産生も CMP の添加によって抑制、中和された (図 6)。すなわちカカオマスポリフェノール CMP はリンパ球の活性化に伴うスーパーオキシドアニオンと過酸化水素の両者の活性酸素の産生を抑制することが明らかになった。その後の検討からカカオマスポリフェノールは細胞内刺激伝達にかかわる活性酸素産生を抑制することで T リンパ球の活性化、増殖を遺伝子転写のレベルで制御し、その機能を抑制し、in vitro で免疫調節作用を示すことが明らかになった。

### チョコレート摂取とヒト免疫応答

以上に述べてきた in vitro での検討はカカオマスポリフェノールが免疫調節作用を持つことを示唆している。そこでヒトではチョコレート摂取が本当に免疫応答に作用するのかを検討した (図 7)。チョコレート摂取試験前日、夕食に抗酸化物質の少ない寿司をお水とともに食べた。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 を摂取。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、図 7 に示す項目を検討した。まずチョコレート摂取の好中球活性酸素 ( $O_2^-$ ) 産生に対する影響を検討した。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。しかし、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た。この抑制効果はチョコレート摂取 2 時間後にも認められたが、5 時間後ではもはや認められなかった (図 8)。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しても同様で、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が抑制された (図 9)。これらの成績は実際にヒトが摂取したチョコレートは消化吸収の過程を経ても生体内で有効に作用して、おそらくチョコレート中のポリフェノールが in vitro と同様に in vivo でも作用することで好中球の過剰な活性化を制御できることが示唆された。近年、本邦ではアトピー性皮膚炎患者、アレルギー性鼻炎患者、あるいは気管支喘息患者など

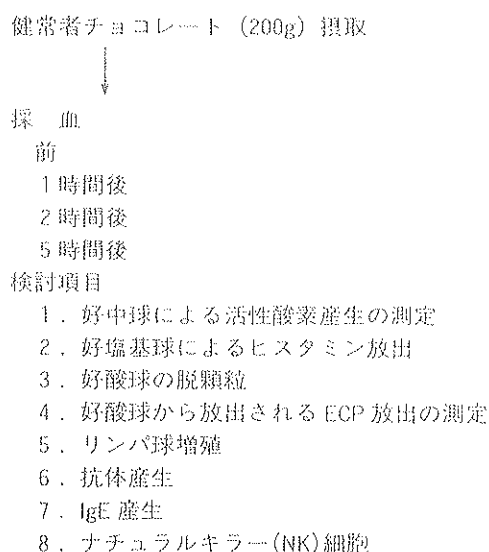


図 7 チョコレート摂取試験プロトコール

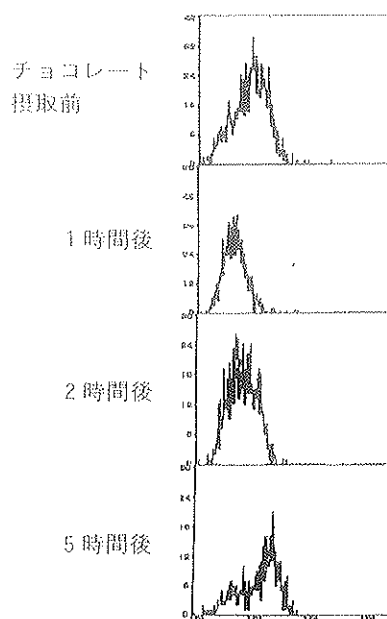


図 8 チョコレート摂取の好中球  $O_2^-$  産生に対する効果

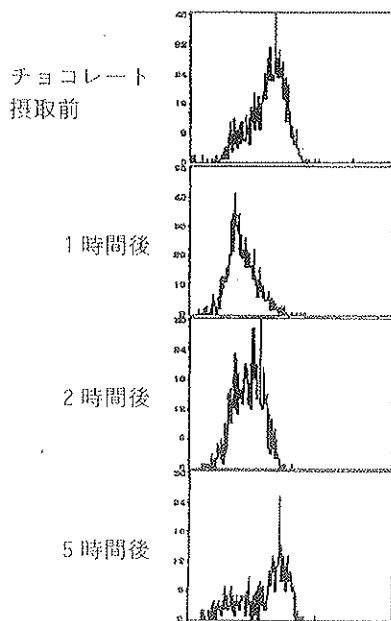


図9 チョコレート摂取の好中球  $H_2O_2$  産生に対する効果

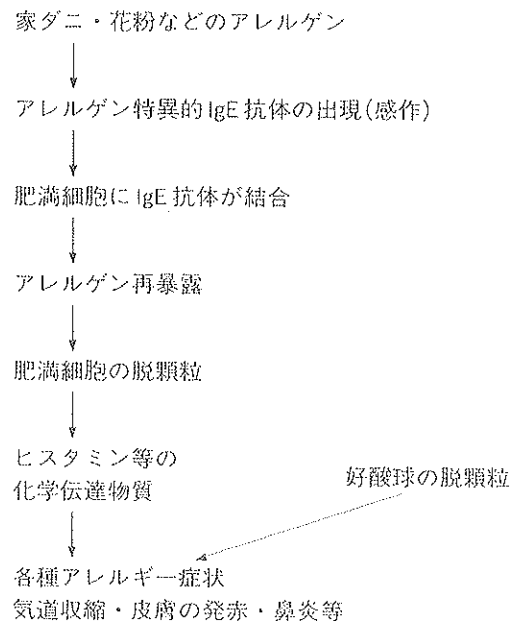


図10 アレルギー発症のメカニズム

アレルギー性疾患患者の急増を認め、大きな問題になっている。そこで、カカオマスポリフェノール CMP が、アレルギー炎症の抑制に応用できないか検討してみた。

#### アレルギー発症のメカニズム

最初に家ダニやスギ花粉などのアレルゲンに接したときに、アレルゲンに対するアレルゲン特異的 IgE 抗体が産生される。これを感作の成立と呼んでいる。肥満細胞上に産生されたアレルゲン特異的 IgE 抗体が結合し、ここに再びアレルゲンが作用すると、肥満細胞に結合した IgE が架橋され、肥満細胞からの脱顆粒がおこってヒスタミン等の炎症を惹起する化学伝達物質が遊離され、気道の収縮、浮腫、あるいは皮膚の発赤などの各種アレルギー症状が出現する。さらに、好酸球が浸潤し、アレルギー症状を修飾する (図10)。

アレルギー炎症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化学伝達物質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様々な方法が考えられている (図11)。まずはじめにカカオマスポリフェノールを含むチョコレート摂取の IgE 産生に与える影響を検討した。正常者リンパ球を非刺激状態で、あるいは、抗 CD 40抗体+インターロイキン4で刺激して IgE 産生を誘導した。チョコレートの摂取はアレルゲンに対する免疫グロブリンである IgE の産生を抑制した。この作用はチョコレート摂取後5時間で最も明らかであった (図12)。この成績はチョコレートの摂取がアレルギーに関わる IgE の産生を抑制できること、即ちアレルギー炎症のはじまりのステップである感作を抑制できることが示唆された。ヒスタミンは肥満細胞から放出されるアレルギー症状の惹起にかかわる重要な蛋白である (図13)。このヒスタミン放出に対するチョコレート摂取の効果を検討した。チョコレート摂取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た (図14)。この成績は、ヒスタミンの放出が始まりアレルギー症状が出現し始めた状態でも、チョコレートの摂取はこれを抑制できる可能性を示唆している。アレルギー炎症のもう一つの主役である好酸球の脱顆粒に対するチョコレ

1. IgE 産生抑制 (感作の抑制)
2. 肥満細胞の脱顆粒抑制 (ヒスタミン等の遊離の抑制)
3. 好酸球の脱顆粒抑制

図11 アレルギー反応の制御方法

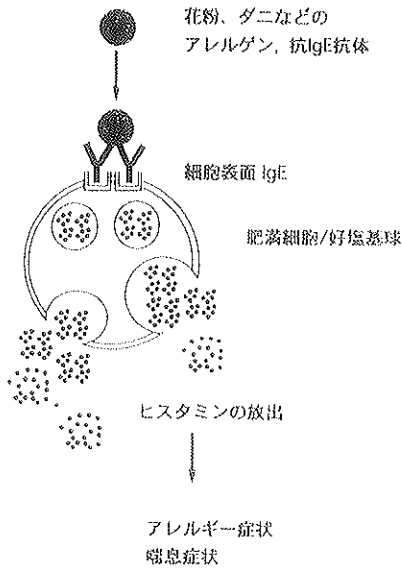


図13 ヒスタミンの放出とアレルギー症状

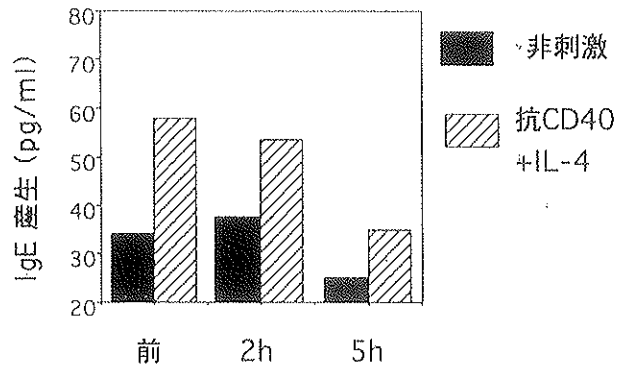


図12 チョコレート摂取のヒトリンパ球機能に及ぼす影響

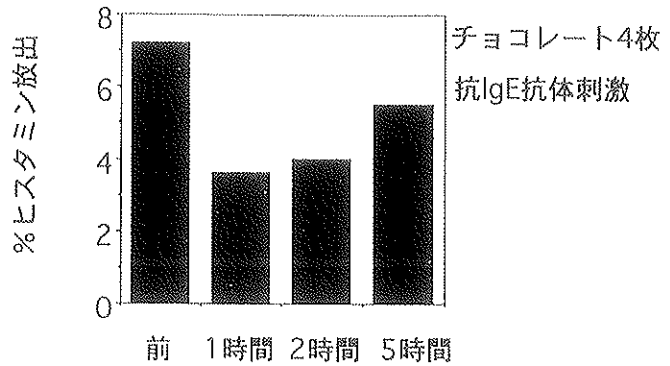


図14 チョコレート摂取のヒト好塩基球ヒスタミン放出に対する影響

チョコレート摂取の効果も検討した。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起こし、その結果、細胞質内に多数の空胞が生じる。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時間後の好酸球では脱顆粒の割合が著しく減少していた。すなわち、カカオマスポリフェノール CMP は好酸球の脱顆粒も抑制できることが示唆された。さらに好酸球はその顆粒中に Eosinophilic cationic protein ECP を含んでおり、この ECP は各種のアレルギー症状を惹起する。好酸球の脱顆粒により ECP が放出され、結果として血中 ECP 濃度が上昇する。そこでチョコレート摂取の好酸球機能に対する影響を検討する目的でチョコレート摂取前後に採血し、RIA 法を用いて血中の ECP を測定した。チョコレート摂取は好酸球からの ECP 放出も多くの場合に抑制することが示された (図15)。これまで

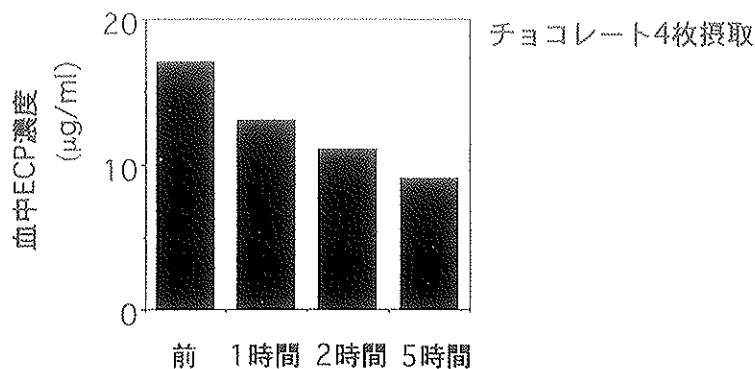


図15 チョコレート摂取のヒト好酸球塩基球性蛋白(ECP)放出に対する影響

に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が細胞内刺激伝達にかかわることが示されており、チョコレート摂取によりCMPが細胞内刺激伝達にかかわる活性酸素を抑制することで、抗アレルギー作用がもたらされると考えられる。

以上のように正常人ボランティアの成績からチョコレート摂取はその抗酸化作用によりアレルギーの病態を改善する方向に作用することが示唆された。

#### チョコレート摂取のリンパ球機能に対する作用

次にチョコレート摂取のTリンパ球機能、Bリンパ球機能に対する影響を観察した。チョコレート摂取前のTリンパ球をマイトゲン刺激すると強い増殖が誘導されるが、チョコレート摂取後のTリンパ球はマイトゲン刺激を加えても、もはや増殖しない。すなわち、チョコレート摂取はこのリンパ球の増殖を抑制することが明らかになった(図16)。Bリンパ球をB細胞マイトゲンである pokeweed mitogen, PWM で刺激すると免疫グロブリンが産生される。チョコレートの摂取はこのBリンパ球による免疫グロブリン産生も抑制した(図17)。これらの成績はCMPを用いた *in vitro* の成績とはほぼ同様で、チョコレートに含まれるCMPは *in vivo* でもその抗酸化作用を基本として免疫調節作用をはじめとした多彩な作用を示すことが示された。

今回の検討はチョコレートの単回投与であるが、今後はチョコレートの長期摂取の作用を検討する必要がある。さらにチョコレート摂取においてはカカオマスポリフェノール以外の成分が免疫系に与える作用も明らかにする必要がある。このようなチョコレートのもつ健康増進の作用を科学的に検討していくことは、食品と健康との関連を明らかにしていくうえで今後ますます重要になると考えられる。

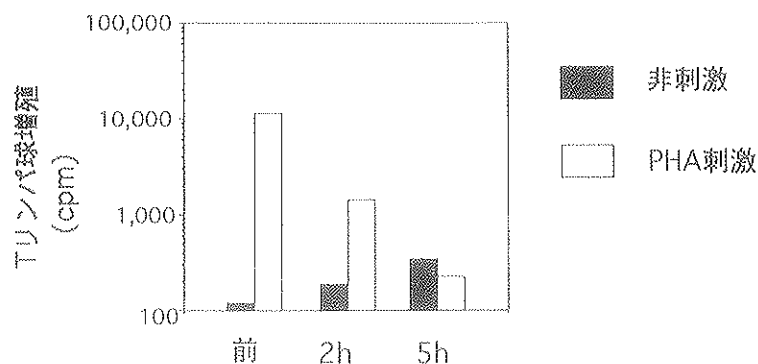


図16 チョコレート摂取のヒトリンパ球機能に及ぼす影響

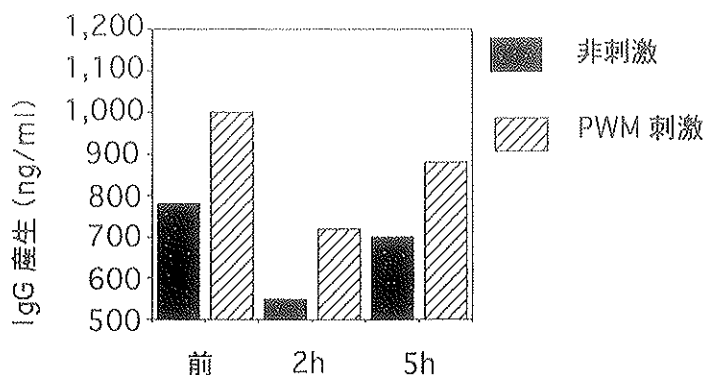


図17 チョコレート摂取のヒトリンパ球機能に及ぼす影響