

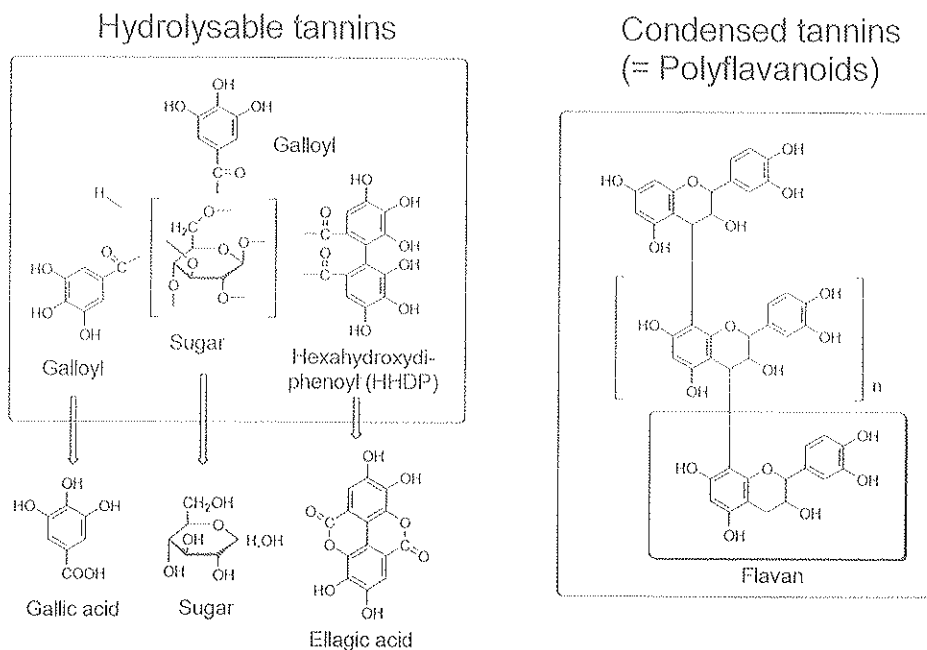
# タンニンの科学と カカオマスポリフェノール

波多野 力 (岡山大学薬学部助教授)

カカオを発酵、乾燥後、取り出した種子を焙炒、磨砕して得られるのがカカオマス cacao liquor であり、チョコレートやココアはこのカカオマスを製造原料とする。このカカオマスの 50%強は脂質であり、20%弱が食物繊維であるが、これらを除くと、ポリフェノールは主成分のひとつであり、カカオマス中に約 3 ~ 4 %含まれる。

ポリフェノールには、フラボノイド、リグナン、ケイヒ酸誘導体などいろいろなタイプの化合物群があるが、カカオマスの主要なポリフェノール成分は、タンニンとその関連化合物である。分子内に複数のフェノール性水酸基を有するポリフェノールの中でも、タンニンは特に蛋白質などと複合体を形成して水溶液から沈殿を形成しやすい性質を有する、比較的分子量の大きい物質群である。化学構造上は、糖やポリアルコールに、gallic acid やその 2 量体などがエステル結合した加水分解性タンニン hydrolysable tannins と、フラバン類 flavans のオリゴマーないしポリマーである縮合型タンニン condensed tannins に大きく分けられる (図 1)。カカオのタンニンは縮合型タンニンに分類される。

図 1 タンニンの分類



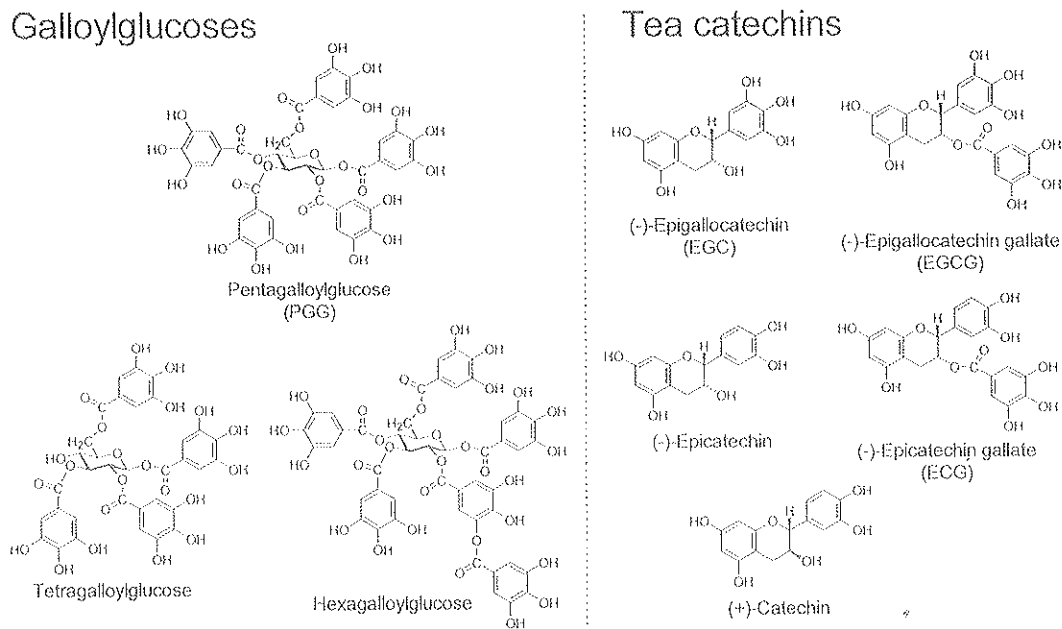
タンニンの化学構造に関する研究はこの四半世紀に劇的と言える進歩を遂げ、この構造研究の進歩を基礎として、抗腫瘍作用や抗ウイルス作用など多くの生物活性が明らかにされつつある。ここでは、タンニンの化学構造と生物活性に関する研究の進歩の概略を紹介するとともに、カカオマスのタンニン関連物質について最近我々が明らかにしてきた知見についても述べる。

## 1. タンニンとは何か

日本のゲンノショウコ、ヨモギ、ユキノシタなどはもとより、ヨーロッパ諸国などで民間薬として使用される薬用植物の中には、タンニンが薬効に関与していると考えられてきたものが多く、実際、最近の研究でタンニンが単離されたものが少なくない。しかし、タンニンを精製し、化学構造を明らかにする研究は、それほど早くから進展していたわけではない。タンニンは化学構造が類似した化合物群として同一植物中に多数含まれる場合が多く、しかも精製の手法によっては分離用の素材(クロマトグラフィー担体)に非可逆的に吸着されたり化学変化をおこしたりしてしまうこと、また、分子量は数千に及ぶものがあって化学構造の解析が容易でないことなどから、19世紀以来化学構造研究が進められてきたアルカロイドなどとは対照的に、取り扱いが困難な化合物群として長い間、放置されてきた。したがって、十分に精製されない状態で種々の混合物のままでタンニンとして利用されたり、化合物の構造を考慮することなく様々なタイプの化合物がタンニンと呼ばれたりしてきていた。

「タンニン酸」はタンニンの正式な名称であるかのように扱われる場合があるが、「タンニン酸」として医療用に使用されている物質は、五倍子や没食子から得られる pentagalloylglucose (PGG) (図2)など様々なガロイルグルコース類 galloylglucoses の混合物であり、これらガロイルグルコースは、種々の加水分解性タンニンの中の1タイプであるにすぎない。

図2 タンニン酸を構成するガロイルグルコースの例と茶葉中の代表的なポリフェノール成分(カテキン類)



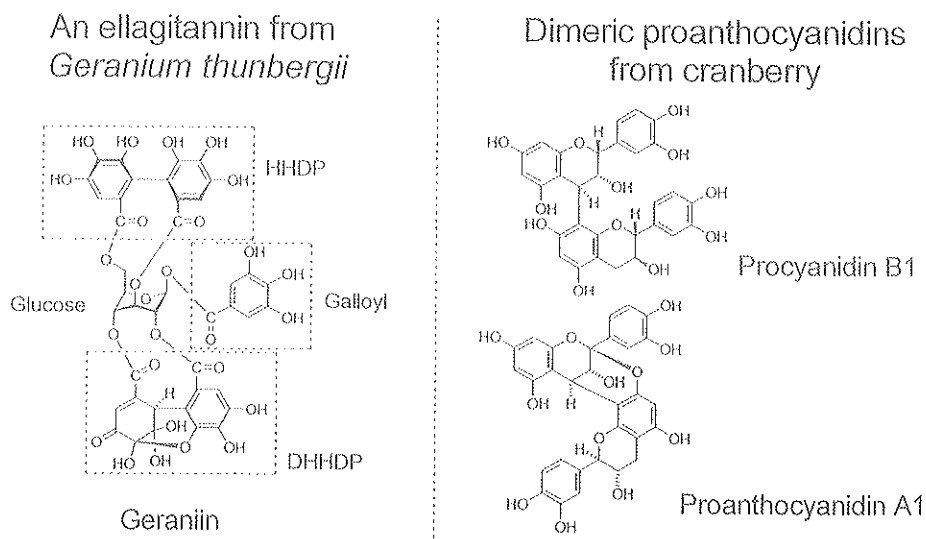
他方、日本で一般的にタンニンという言葉を使用する場合、最も身近に感じられるのは、おそらく緑茶の「タンニン」であろう。緑茶の「タンニン」と呼ばれる物質は、主として (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) などの分子量が500以下の比較的 low molecular weight のポリフェノール類(緑茶カテキン類 tea catechins) であり(図2)、五倍子などから得られる「タンニン酸」などと比較すると、蛋白質への結合力は弱い。緑茶にはEGCGのほかに、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epicatechin gallate (ECG)、(-)-epicatechin、(+)-catechinなどが含まれるが、これらは、EGCGより分子も小さく、蛋白質への結合力はEGCGよりさらに弱い。これらは、タンニンに関する次のような歴史的な議論からすると、タンニンの定義からはずれてしまう。

タンニン tannin は、歴史的には、獣皮 (hide) を基 (leather) になめす目的で使用される、カシ類などの樹皮や、ブナ科やウルシ科の樹木に形成される虫エイ (昆虫の寄生によって形成される虫コブ) などから得られる、蛋白質との強い結合力を有するポリフェノール性の物質を指す言葉であった。今日的には、種々の植物から得られるタンニンについて、皮革産業のほか、醸造産業や医薬、インクの製造など広範な利用があり、またタンニンの性質として、アルカロイドのような塩基性物質や金属などと結合しやすいこともよく知られる。こうしたタンニンの性質のうち最も重要で基本的な性質は蛋白質、特に皮革のコラーゲンに対する結合力であるとみなされてきた。分子が小さすぎると蛋白質への結合力が弱く、大きすぎるとコラーゲンなどの蛋白分子間に浸透しにくいことから、分子量にして約 500~3000 程度のポリフェノールがタンニンとしての性質を有するとされてきた。

## 2. タンニンの化学構造研究の展開と生物活性研究

加水分解性タンニンに関する化学的研究は、当初、ドイツのハイデルベルグ大学を中心に展開されたが、その成果を基礎として日本でも研究が開始され、日本の代表的な民間薬の1つであるゲンノショウコから geraniin (図3) の単離とその基本構造が報告されたのは 1976 年のことであった。Geraniin は加水分解性タンニンの1種で、酸分解により ellagic acid を生じるエラージタンニン ellagitannins に分類される。この化合物は glucose 核に 1) galloyl 基、2) gallyol 基が 2 量化した hexahydroxydiphenoyl (HHDP) 基、3) HHDP 基が酸化された dehydro-HHDP (DHHDP) 基がエステル結合した構造を有する。この DHHDP 基の溶液中での存在形態や、geraniin 分子内の各部分の絶対配置を含めた構造が報告されたのは 1982 年である。その間に、さらにアカメガシワ、ザクロ、サンシュユ、キブシ、グアバなど種々の薬用植物のエラージタンニンの構造解明が進められている。

図3. ゲンノショウコの加水分解性タンニン(エラージタンニン)と  
コケモモのプロアントシアニン 2 量体



他方、縮合型タンニン関連化合物については 1970 年代からイギリス、南アフリカなどの研究グループによって精力的に研究が進められ、分離精製や構造決定の基本的手法とともに、構成単位であるフラバンの構造や、フラバン間結合の様式等について基本的な知見が確立された。その後、さらに日本やニュージーランドなどのグループによって研究が展開された。

この過程で、procyanidin B1 (図3) などのフラバン 2 量体類のように、蛋白質等との複合体形

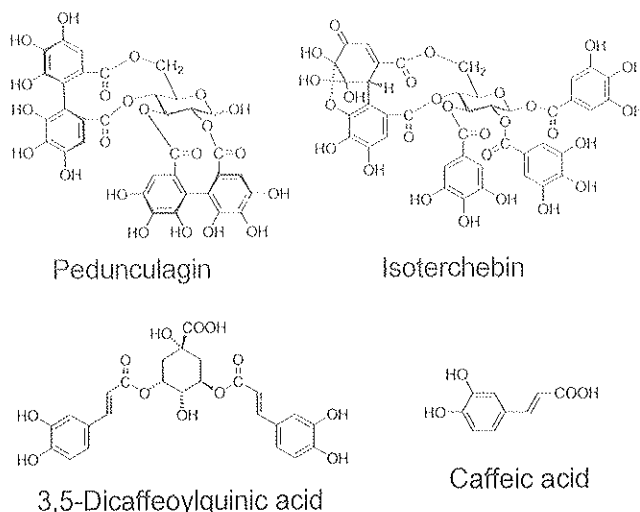
成能は弱くとも、縮合型タンニンと共通の化学的性質を有し、化学構造上類縁関係にある化合物群について、より高分子の縮合型タンニンとあわせてプロアントシアニジン proanthocyanidins と呼ぶことが提唱されている。これは、酸分解によりアントシアニジンを生じることに基づく名称である。加水分解性タンニンについても、低分子物質に関して同様の扱いが可能であり、縮合型タンニン、加水分解性タンニンおよびそれぞれの関連低分子化合物を含めて「ポリフェノール」と呼ばれるようになってきている。したがって、「ポリフェノール」という場合、このような立場から、タンニンおよび関連の低分子物質を指す場合と、より広範に、各種のフラボノイド等を含めて、分子内にフェノール性水酸基を複数持っている化合物群を指す場合とがある。

### 3. 脂質過酸化抑制作用を有するタンニン及び関連ポリフェノール

種々のタンニンが単離、構造解明されるようになってくると、それによって、個々の化学構造を基礎とした生物活性の検討が可能となる。そうした研究としては、蛋白質分解酵素に対する酵素阻害活性、アスコルビン酸に対する酸化防止効果や、重金属イオンに対する還元作用などが明らかにされた。さらに、1983年には各種タンニンの脂質過酸化抑制作用も報告された。

アスコルビン酸と adenosine 5'-diphosphate (ADP) を使用すると、*in vitro* でラット肝ミトコンドリアでの脂質過酸化反応が進行するが、ここに各種薬用植物から得たタンニンを加えておくと、この脂質過酸化が抑制される。特に、シャクヤクなどに含まれる pentagalloylglucose (PGG) のほか、グアバの葉などから得られる pedunculagin や、サンシュユから得られる isoterchebin (図4)などが強い抑制効果を示した。また、ADP と NADPH によるラット肝ミクロゾームでの脂質過酸化に対しても、PGG や pedunculagin 等が強くこれを抑制した。これらの作用は抗酸化剤として知られる  $\alpha$ -tocopherol に比べると非常に強いものであった。さらに、ヨモギ、オオヨモギなどから得られた caffeic acid 誘導体 (図4) についても同様の脂質過酸化抑制が認められた。その後、タンニンについては、四塩化炭素等による培養肝細胞障害に対する抑制など種々の実験系で抗酸化作用が示されている。他方、ゲンノショウコの主タンニンである geraniin や、caffeic acid などについては、経口投与でのラット血清中の脂質代謝の改善も明らかになっている。

図4. 脂質過酸化抑制作用を有するタンニンおよび関連ポリフェノール



タンニンによる脂質過酸化抑制の機構については、当初、タンニンによる金属や酵素に対する作用の関与の可能性も検討されたが、これらの実験系においては過酸化反応の開始過程こそ異なるが、

その後の連鎖反応の進行過程は共通であり、タンニンがそれ自身安定ラジカルを形成しうることから、タンニンがラジカルスカベンジャーとして作用する機構が示された。これについてはさらに、自動酸化進行過程にタンニンを共存させた系でタンニン由来の ESR シグナルが観察されたことにより、過酸化の連鎖反応を停止させる際に、タンニンが安定ラジカルを形成することが裏付けられた。低分子のポリフェノールに対して、比較的高分子のポリフェノールであるタンニンが効率よく脂質過酸化を抑制する理由については必ずしも明確ではないが、gallic acid のような低分子ポリフェノールに比べてタンニン由来のラジカルの安定性が高いためであることが示唆されている。

このような抗酸化剤が形成する安定ラジカルは次のような系でも観測することができる。 $\alpha$ -Tocopherol の場合、脂質中のラジカルのモデルとしてよく使用される diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) ラジカルを消去する際、tocopherol ラジカルの ESR シグナルを観測することができるが、同様にタンニン類についても、DPPH ラジカルを消去する際、タンニンラジカルの ESR シグナルが認められた。

タンニンや関連の低分子のポリフェノールは、スーパーオキシドラジカルに対してもスカベンジャーとして作用する。上述の、タンニンの抗酸化作用に関する種々の実験系の中には、xanthine-xanthine oxidase (XOD) 系によって引き起こしたマウス水晶体の細胞膜脂質の過酸化に対するタンニンの影響を検討したものがあり、geraniin や PGG、EGCG などは、この実験系においても強い抗酸化作用を示すことが明らかにされている。この実験系は脂質過酸化抑制作用を見ているのであるが、xanthine-XOD 系、あるいは hypoxanthine-XOD 系それ自体はスーパーオキシドの発生系として繁用される実験系であることから、各種タンニンのスーパーオキシドに対する直接の作用について検討を進めた。

Hypoxanthine-XOD 系で発生させたスーパーオキシドをスピントラップ剤を使用して ESR で観測すると、タンニン存在下では、タンニンの量に依存してスーパーオキシド由来のシグナルが減少し、特に加水分解性タンニン 2 量体の coriariin A (後述) は強い抑制を示した。他方、低分子ポリフェノールの中では、EGCG や EGC がスーパーオキシドの産生を強力に抑制した。この際、タンニンが XOD に対して酵素阻害剤として作用し、結果的にスーパーオキシドの産生が抑制されている可能性を考慮して、XOD による尿酸形成能に対するタンニンの阻害作用との比較、および非酵素系でのスーパーオキシド産生に対するタンニンの作用についての検討を行い、スーパーオキシドに対してタンニンが直接作用していることを確かめた。

#### 4. 抗腫瘍作用を有する加水分解性タンニンオリゴマー

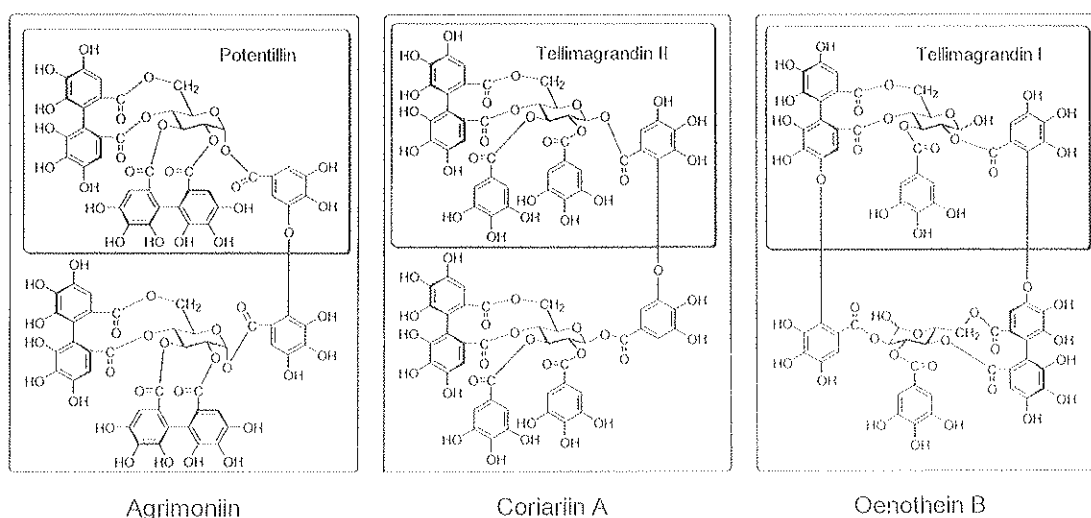
タンニンや関連ポリフェノールの中には、変異原性抑制作用や発ガンプロモーション抑制作用を示すものがあることが見いだされており、特に茶葉中の EGCG の発ガンプロモーション抑制作用については、発ガン予防の積極的推進に向けて精力的な検討が進められている。また、培養ガン細胞を使用した研究によって、ミロバランのタンニン抗腫瘍作用が見いだされている。

他方、ガン細胞に対して直接的に攻撃するのではなく、ある種のタンニンが生体の免疫系を介して抗腫瘍作用を示すことが明らかにされている。この実験系は sarcoma-180 を移植したマウスの腫瘍死に対するタンニン投与による延命効果を検討するもので、タンニンの前投与によっても効果が現れ、その効果が宿主介在性とみなされるところが特徴的である。

この実験系では特に加水分解性タンニンオリゴマー類が強い延命効果を示している。加水分解性

タンニンオリゴマーの最初の例はキンミズヒキの根から得られた agrimoniin で、岡山大学のグループによって 1982 年に報告された(図 5)。このタンニンは、potentillin の 2 量体に相当する構造を有する。その後、ハマナス、サンシュユ、フウ、ヒシ、トウダイグサ科植物等から数多くのオリゴマーが得られている。一方、北陸大学の研究グループはキンミズヒキの抗腫瘍活性成分の検討を進め、その活性成分が agrimoniin であることを明らかにした。その後、両者の共同研究として、タンニンの抗腫瘍作用の検討が進められた。加水分解性タンニンオリゴマーの中でも coriariin A や oenothein B などは強い抗腫瘍活性を示した(図 5)。Oenothein B は当初、オオマツヨイグサから単離され、その後、アカバナ科やフトモモ科植物に広く分布することが明らかになったタンニンで、特異な大環状構造を有している。Agrimoniin および oenothein B については、さらに MM-2 や Meth-A など種々の腫瘍に対しても効果を有することが明らかにされた。タンニンの抗腫瘍作用については、さらに機構解明の研究が進められており、その過程でタンニンがマクロファーや単球で  $1L-1\beta$  を誘導する活性が見いだされている。

図 5. 抗腫瘍作用を有する加水分解性タンニンオリゴマーの構造



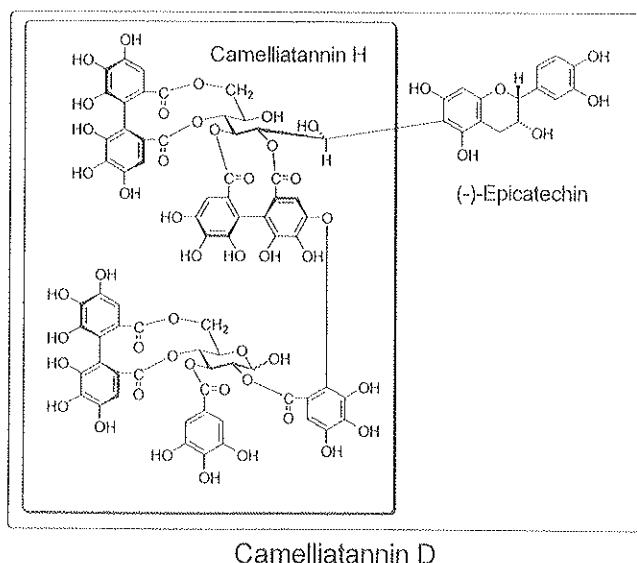
これまでにタンニンについては、ヘルペスウイルスや AIDS ウイルスに対する抗ウイルス効果、ヒスタミン遊離抑制作用等多くの作用が明らかにされている。中でも、加水分解性タンニン 2 量体と epicatechin が結合した構造を有する。複合タンニンの camelliatannin D (図 6) などについては、骨吸収抑制作用も見いだされており、骨粗鬆症治療研究への応用が期待される。

## 5. 甘草、決明子等のポリフェノールとその MRSA に対する抗菌作用

甘草は、漢方処方に最も高頻度に配合される生薬であり、また医薬品原料とされる。グリチルリチン及び関連のサポニンの他に、多くのフラボノイド関連のフェノール性成分を含み、それらについて多くの薬理活性が明らかにされてきている。一方、決明子は緩下・強壯などの目的で使用されてきた生薬であり、ナフトレン、アントラキノン誘導体を含む。これらの生薬のポリフェノールの中には抗菌作用を有するものがあることが報告されている。

他方、茶葉のポリフェノールの EGCG のほか、ECG や、加水分解性タンニンの tellimagrandin I などは、耐性菌における抗生物質の耐性を抑制することが最近明らかにされており、我々は、現在、臨床で大きな問題となっている多剤耐性菌の MRSA に対する作用について検討するとともに、ポリフェノールの併用による抗生物質の抗菌活性の増強効果について検討を進めている。

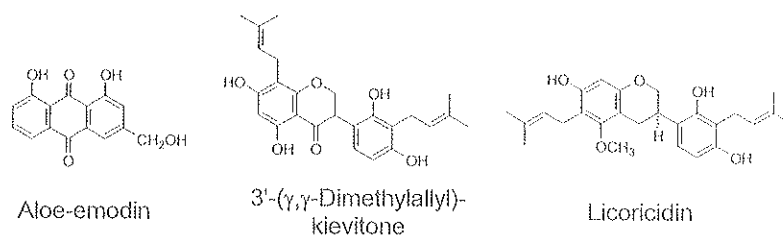
図 6. 骨吸収抑制作用を有するツバキの複合タンニン



その結果、aloe-emodin や  $\gamma,\gamma$ -dimethylallylkievitone などが MRSA に対して比較的強い抗菌活性を有すること、さらに、licoricidin などについては oxacillin の MRSA に対する抗菌活性を回復させる作用を有することを明らかにしている (図 7)。

図 7. MRSA に対する抗菌作用を有する植物成分

licoricidin については MRSA の抗生物質に対する感受性を回復させる作用が見られる。



#### 6. カカオマスに含まれるタンニンおよび関連ポリフェノール

一方、最近、チョコレートやココアについて種々の効用が明らかにされてきており、それらの多くはポリフェノール成分によることが示唆されている。これらポリフェノール、特に縮合型タンニン関連物質の実体を明らかにする目的で、カカオマスの成分について精査を進めた。

その結果、フラバンの 2 量体～4 量体に加えて、これらにガラクトースまたはアラビノースが結合した化合物数種を得た (図 8, 図 9)。これらのうち図 9 に示すものは新規化合物である。

こうして得た化合物の一部については抗酸化作用を検討し、それらについても、 $\alpha$ -tocopherol と同等またはそれ以上の脂質過酸化抑制作用、DPPH ラジカルに対するスカベンジャーとしての作用等を認めている。

今後、カカオマスのポリフェノールについても、タンニンや関連ポリフェノールについて見いだされてきた上述の種々の活性の検討・解明が望まれる。

図 8. カカオマス中の縮合型タンニン関連ポリフェノール

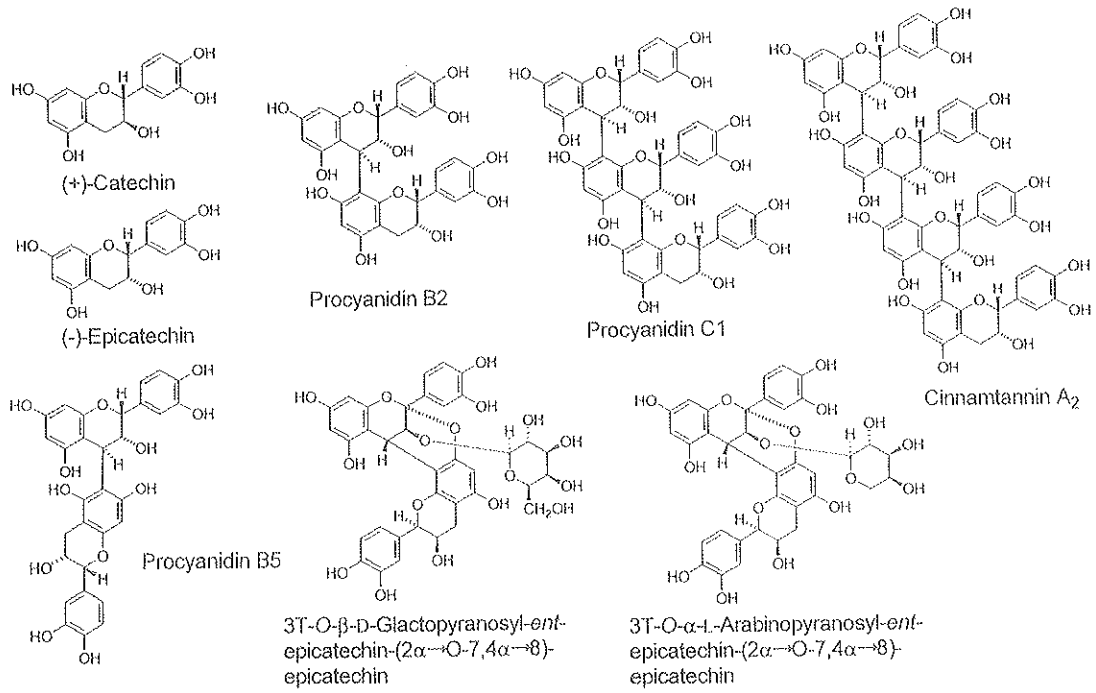


図 9. カカオマスから得た新規ポリフェノール成分

