

カカオマスの抗ストレス効果と その有効成分の探索

武田 弘志 (東京医科大学助教授)

チョコレートの原料であるカカオマスには、フェノール性水酸基を複数持つ多種のポリフェノール物質が含有されていることが知られている。近年、このカカオマスポリフェノールの生理作用が注目され、多くの学際的研究が精力的に行われている。現在、カカオマスポリフェノールは、抗酸化作用 (Osakabe N. et al., 1998)、免疫調節作用 (Sanbongi C. et al., 1997)、胃潰瘍の予防作用 (Osakabe N. et al., 1998)、抗動脈硬化作用、抗ストレス作用、静菌・殺菌作用やペルオキシナイトレートの作用を抑制する効果 (Arteel G.E. and Sies H., 1999) など多種多様な生理活性を有することが報告されている。我々は、先にカカオマスおよびカカオマスポリフェノールが身体的あるいは心理的ストレス状況下で惹起される諸種のストレス反応 (情動変化、内分泌系の変化、中枢神経系の神経化学的变化など) を抑制し、さらにストレス状況への適応 (慣れ) を促進する作用を有することを明らかにした (武田弘志、1997年、1998年、1999年)。本稿では、カカオマスの抗ストレス効果の特徴とその有効成分を考究する目的で、恐怖条件付けストレス (Conditioned fear stress: CFS) が惹起する行動学的ストレス反応に及ぼすカカオマス抽出成分の影響について検討した結果について紹介する。

(1) カカオマス抽出成分の効果

実験には7週齢のICR系雄性マウスを用いた。CFS (1度電撃ショックを経験した状況に再びもどされる恐怖によるストレス) は、マウスを金属グリッド床のフットショック箱に入れ、強度1ミリアンペア、間隔10秒、持続時間1秒の電撃刺激を6分間加えて恐怖条件付けを行い、その24時間後にマウスを再びフットショック箱へもどすことにより負荷した (Miyamoto J. et al., 2000)。また、CFSの負荷により発現する行動学的ストレス反応は、すくみ行動の発現時間 (無動時間) と運動活性の変化 (行動距離の変化) を指標として評価した (図1)。被検物質は、カカオマスからヘキサン、ジクロロメタン、ジエチルエーテルおよび70%エタノールの各有機溶媒を用いて連続的に抽出した分画成分1~5を用いた (図2)。被検物質の投与量は、カカオマス220mg (チョコレート1g) に含有される各分画量を算出し、これに抽出操作での回収率を考慮して決定した (分画1: 110.4mg/kg、分画2: 0.994mg/kg、分画3: 0.205mg/kg、分画4: 17.5mg/kg、分画5: 77.9mg/kg)。なお、被検物質は、再びフットショック箱へもどす30分前に経口投与した。

CFS負荷は、すくみ行動の有意な増加と運動活性の著大な減少を惹起した。また、分画成分1および4の経口投与により、CFSが惹起するすくみ行動の増加が有意に抑制されたが、分画成分2、3および5の経口投与では変化が生じなかった (図3)。さらに、分画成分1、2および5の経口投与は、CFS負荷による運動活性の減少に対して特記すべき影響を示さなかったが、分画成分3および4の経口投与により、運動活性の減少が有意に抑制された (図4)。これらの結果から、カカオマスから

図1 恐怖条件付けストレス (Conditioned fear stress:CFS) の
負荷と行動学的ストレス反応の評価

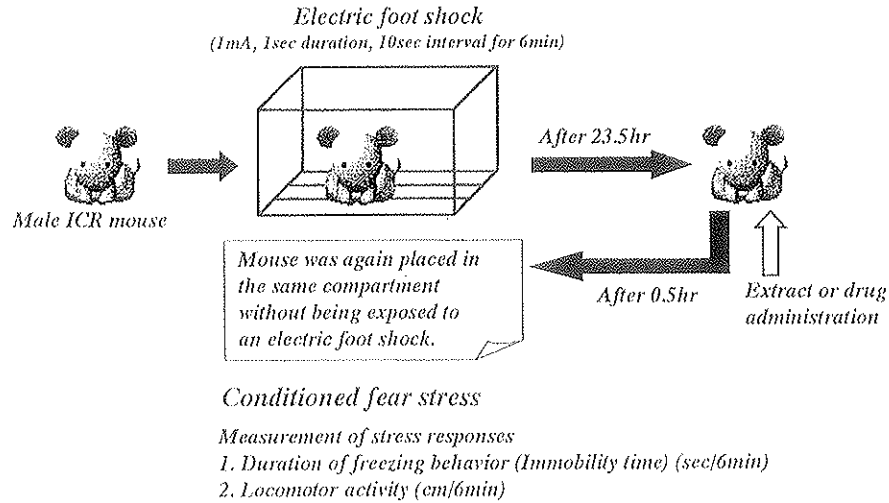


図2 カカオマス抽出成分の分画法 (分画1-5)

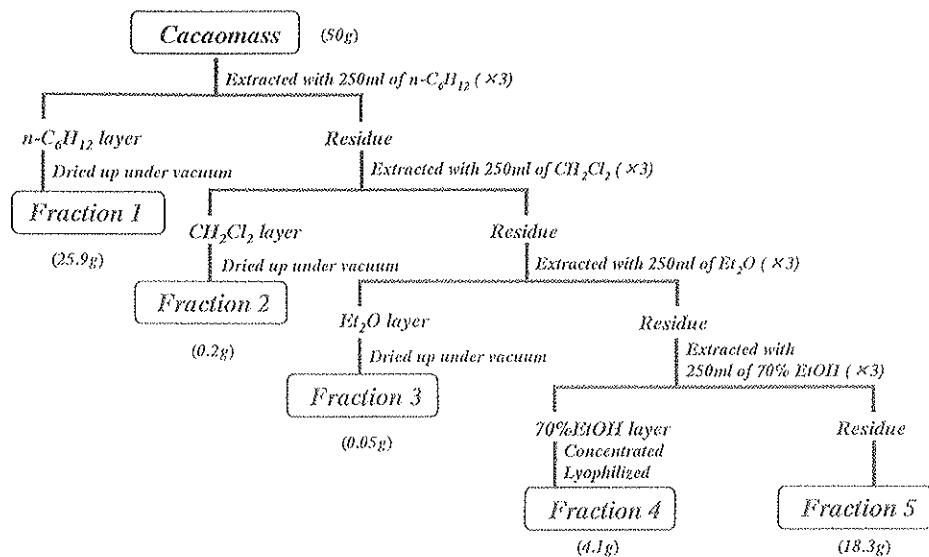


図3 カカオマス抽出成分の分画法(分画1-5)の
恐怖条件付けストレス(CFS)が惹起する
すくみ行動に及ぼす影響

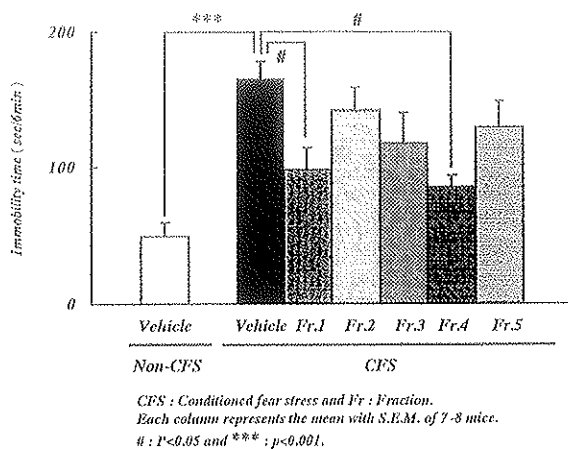
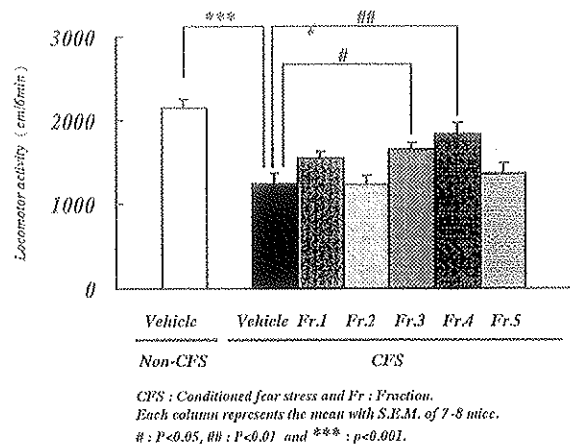


図4 カカオマス抽出成分の分画法(分画1-5)の
恐怖条件付けストレス(CFS)が惹起する
運動活性変化に及ぼす影響

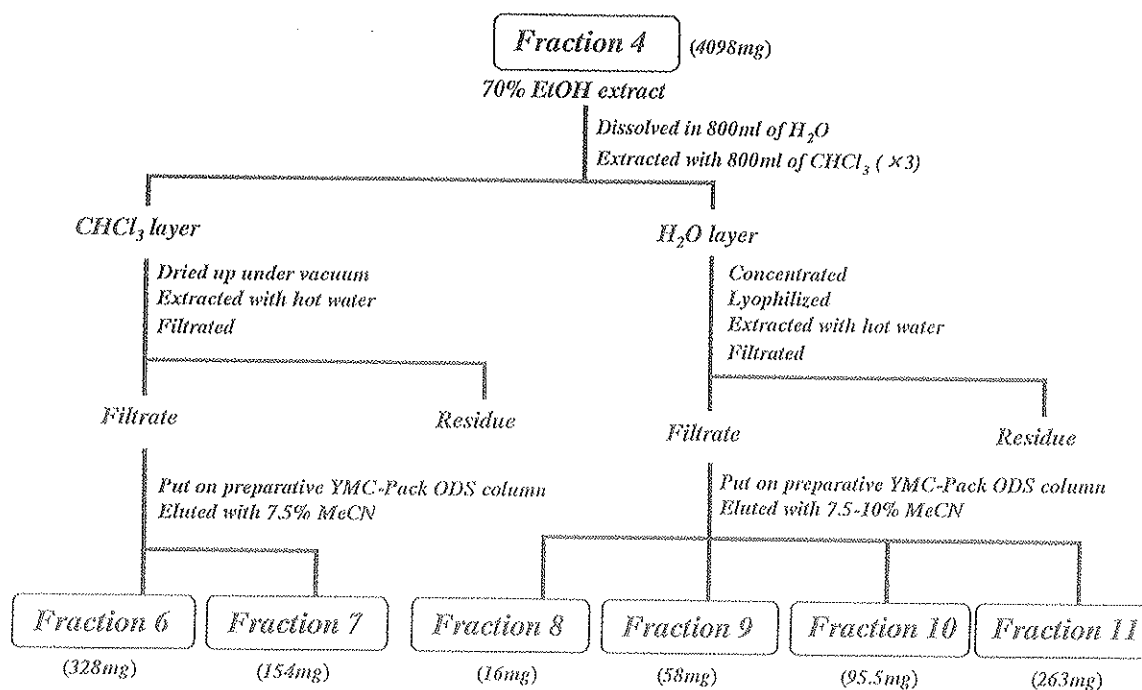


抽出した分画成分4には、CFSが惹起する行動学的ストレス反応の発現を抑制する有効な成分が含まれていることが考えられる。

(2) 抗ストレス成分の探索と同定

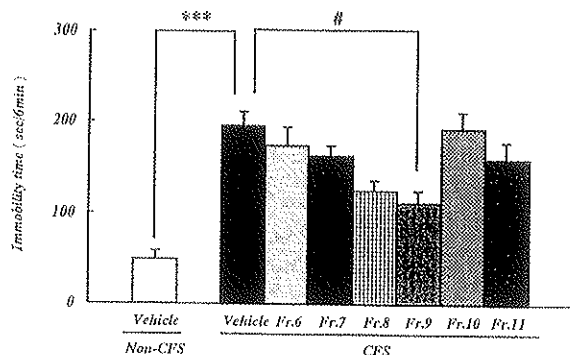
(1)の項で得た結果から、カカオマスから抽出した分画4に抗ストレス成分が含まれていることが考えられることから、この項では、分画4をさらに抽出し、得られた分画成分の効果とその有効成分の同定を試みた。分画4をクロロホルムで抽出し、クロロホルム層と水層に分離した。さらにそれぞれの分離層を分取型YMC-Pack ODSカラムを用いて分画し、分画成分6~11を得た(図5)。これら分画成分のCFSが惹起する行動学的ストレス反応(すくみ行動の増加、運動活性の減少)に及ぼす影響については、(1)項に示した実験方法と同様に行った。なお、各分画成分(被検物質)の投与量は、(1)項と同様にカカオマス220mgに含有される各分画量と抽出操作での回収率から算出し決定した(分画6:1.79mg/kg、分画7:0.76mg/kg、分画8:0.223mg/kg、分画9:0.578mg/kg、分画10:0.426mg/kg、分画11:1.30mg/kg)。

図5 カカオマス抽出成分の分画法(分画6-11)



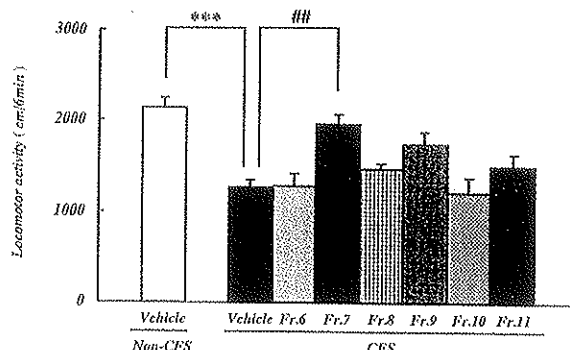
CFS負荷により、すくみ行動の有意な増加と運動活性の減少が認められた。分画成分6、7、10および11の経口投与は、CFSが惹起するすくみ行動の発現に対して特記すべき影響を与えなかったが、分画成分8および9の経口投与は抑制効果を示した。特に分画成分9の効果は統計学的に有意であった(図6)。また、分画成分7および9の経口投与は、共にCFSが惹起する運動活性の減少を抑制したが、有意な効果は分画成分7の投与で認められた(図7)。さらに分画6-11をLC-MSシステムにより同定した結果、各分画を構成する主成分は、分画6:テオブロミン、分画7:カフェイン、分画8:カテキン、分画9:エピカテキン、分画10:プロシアニジンB2、分画11:テオブロミンであった。以上の結果から、CFSが誘発する行動学的ストレス反応に対するカカオマスの抑制効果は、分画9の主成分であるエピカテキンのすくみ行動抑制作用と運動活性亢進作用および分画7の主成分であるカフェインの運動活性亢進作用の複合的な作用に基づくことが考えられる。

図6 恐怖条件付けストレス(CFS)が惹起する
すくみ行動に及ぼすカカオマス抽出成分
(分画6-11)の影響



CFS : Conditioned fear stress and Fr : Fraction.
Each column represents the mean with S.E.M. of 7-8 mice.
: $P < 0.05$ and *** : $p < 0.001$.

図7 恐怖条件付けストレス(CFS)が惹起する
運動活性変化に及ぼすカカオマス抽出成分
(分画6-11)の影響



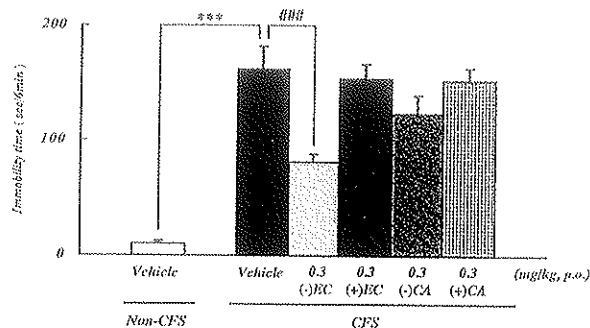
CFS : Conditioned fear stress and Fr : Fraction.
Each column represents the mean with S.E.M. of 7-8 mice.
: $P < 0.01$ and *** : $p < 0.001$.

(3) エピカテキンの光学異性体による効果の差

前記した(1)および(2)項の結果から、カカオマスに含有されるエピカテキンが抗ストレス効果を有することが示唆されたことを踏まえ、この項では、エピカテキンの光学異性体による効果の相違についてカテキンと比較検討した。エピカテキンおよびカテキンの(−)−体と(+)−体の効果は、(1)および(2)項に示した実験方法に従い、CFS負荷マウスのすくみ行動の発現時間と運動活性の変化に及ぼす影響を検討し評価した。なお、被検物質の投与量は、いずれも0.3mg/kgとした。

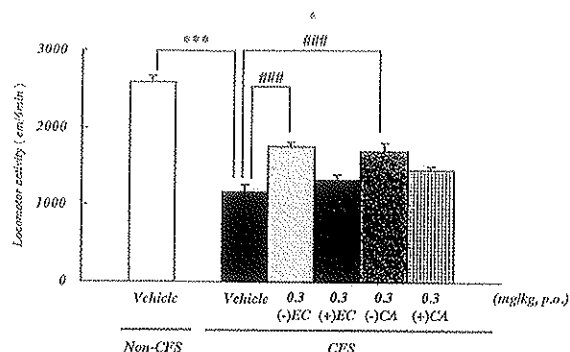
(−)−エピカテキンの経口投与は、CFSが惹起するすくみ行動の発現を有意に抑制したが、(+)−エピカテキン経口投与では何ら変化が生じなかった。一方、(+)−カテキンや(−)−カテキンの経口投与は、すくみ行動の発現に特記すべき影響を示さなかった(図8)。また、(−)−エピカテキンおよび(−)−カテキンの経口投与は、共にCFS負荷による運動活性の減少を有意に抑制したが、(+)−エピカテキンと(+)−カテキン経口投与では何ら変化が認められなかった(図9)。これらの結果と、カカオマスには主として(−)−エピカテキンと(+)−カテキンが含有されていることを踏まえると、(2)の項で示したエピカテキンのすくみ行動抑制作用や運動活性亢進作用は、(−)−エピカテキンの効果に基づくことが示唆される。

図8 恐怖条件付けストレス(CFS)が惹起する
すくみ行動に及ぼす(−)−、(+)−
エピカテキンおよびカテキンの影響



CFS : Conditioned fear stress, EC : epicatechin and CA : catechin.
Each column represents the mean with S.E.M. of 7-8 mice.
###, *** : $p < 0.001$.

図9 恐怖条件付けストレス(CFS)が惹起する
運動活性変化に及ぼす(−)−、(+)−
エピカテキンおよびカテキンの影響



CFS : Conditioned fear stress, EC : epicatechin and CA : catechin.
Each column represents the mean with S.E.M. of 7-8 mice.
###, *** : $p < 0.001$.

以上の成績を総括すると、カカオマスが有する抗ストレス効果は、カカオマスに含有される
(-) -エピカテキンとカフェインの複合的作用に起因することが考えられる。

文献

- Osakabe, N. et al. (1998) J. Nutr. Sci. Vitaminol 44:313-321
Sanbongi, C. et al. (1997) Cell Immunol. 177:129-136
Osakabe, N. et al. (1998) Biosci. Biotechnol. Biochem. 64:1535-1538
Arteel, G.E. and Sies, H. (1999) FEBS Lett. 462:167-170
武田弘志 食の科学 228:52-56, 1997年
武田弘志 食の科学 240:63-65, 1998年
武田弘志 食の科学 252:50-52, 1999年
Miyamoto, J. et al. (2000) Eur. J. Pharmacol. in press