

カカオポリフェノールの発癌予防作用

廣瀬 雅雄 (国立医薬品食品衛生研究所病理部)

野菜や果物などの摂取と発癌リスクの低減との相関に関しては、多くの疫学的研究がなされており、特にポリフェノール類については、種々の実験系を用いた発癌抑制効果が報告されている。本研究では、チョコレートやココアの主原料であるカカオ豆に含まれ、抗酸化性や抗変異原性を持つカカオポリフェノール (CLPr) の発癌修飾作用を2種類の動物モデルを用いて検討した。

日本では1981年以降、癌が死因の第一位となり、その後増加の一途をたどっている。死亡率の推移を見てみると、明治から昭和初期まで多かった肺炎、結核、胃腸炎などの感染性疾患は、戦後急速に減少し、生活習慣病といわれる癌、心臓病、脳血管疾患などによる死亡が上位を占めるようになった。癌の発症が増加した原因として、ライフスタイル、特に食生活の変化が大きな影響を及ぼしていると考えられている。また、癌の早期発見や治療に関する医療技術の進歩が見られるものの、一次予防の面からの進歩は遅い。発癌の要因は種々あるが、その大部分は外因性の環境因子によるものであり、その中でもたばこや食事が大きな比重を占めている。一方では、野菜や果物といった植物性食品を積極的に摂取することが癌のリスクを低減させるという多くの疫学調査が報告されている。Blockらのレビューによると156の疫学調査の内、128は有意な予防効果を示し、有害な結果となったのはわずかに4つであったり。

癌はヒトの正常細胞が発癌刺激を受け、多段階を経て発生すると考えられている。第1段階は、正常細胞のDNAや染色体に起こる突然変異で、イニシエーションといわれる。次に、イニシエーションを受けた細胞が癌化するプロモーションと呼ばれる段階があり、さらに癌化した細胞が浸潤、転移するプログレッションという段階がある。癌を予防するためには、発癌物質を環境から見つけ出し排除すること、あるいは、発癌を予防する物質を積極的に摂取することが挙げられる。多くの疫学的研究を背景として、植物性食品などに含まれる癌予防物質に関する研究が行われている。その中からまず、抗酸化物質やカカオにも含まれているカテキン類である、緑茶カテキンを用いた我々の研究について紹介する。

2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) は加熱調理の過程で生成するヘテロサイクリックアミン (HCA) の一つで、げっ歯類の乳腺、大腸、前立腺に癌を誘発することが報告されており、欧米人における発癌の一要因と考えられている。PhIP誘発ラット乳腺発癌に対する効果を検討する実験では、0.02%PhIPを混餌にて雌ラットに与えると、対照群では腺癌が40%発生した。しかし、抗酸化物質である1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) を同時に摂取させると、腺癌の発生頻度、平均個数が有意に減少し、緑茶カテキンでも、腫瘍サイズが対照群と比較して有意に減少した²⁾。次に、7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) 誘発ラット乳腺発癌に対する作用であるが、イニシエーションと同時期あるいはイニシエーション後に、緑茶カテキンを混餌

にて与えた結果、緑茶カテキンをイニシエーション後に与えた群でのみ、腫瘍の発生個数の有意な減少が観察された³⁾。一方、大腸発癌に対しては、イニシエーションとして1,2-dimethylhydrazine (DMH, 40mg/kg体重)を週2回、計4回皮下注射した後に、緑茶カテキンを混餌にて与えたところ、腺腫の発生個数は減少したものの、逆に腺癌の発生頻度、平均個数は有意に増加し、緑茶カテキンには大腸腫瘍の発生を促進する可能性のあることがわかった。2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine (DHPN) 誘発のラット肺発癌に対しては何らの効果も示さなかった⁴⁾。また、ラット中期肝発癌試験法では、N-diethylnitrosamine (DEN) でイニシエーションを行った後、HCAの一つである2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) を与えると同時に各種抗酸化剤を投与した結果、MeIQxによるGST-P陽性巣の数、面積の増加が緑茶カテキンにより減少傾向を示した⁵⁾。これらの研究から、緑茶カテキンや抗酸化物質での発癌予防作用は標的臓器、発癌物質の種類、被検物質の投与時期や投与方法によって異なる と推察された。

カカオポリフェノール (CLPr) はチョコレートやココアの主原料であるカカオ豆に含まれるポリフェノールの総称で、カテキン、エピカテキンなどのフラボノイド類とこれらが重合したプロシアニジン類であり、抗酸化性を有する。CLPrは、カカオ豆からカカオバターを取り除くことで得られるカカオマスから、70%アセトン、ブタノールでポリフェノール成分を抽出し、吸着クロマトグラフィー (Diaion HP2MG) を用いて精製することで調製した⁶⁾。

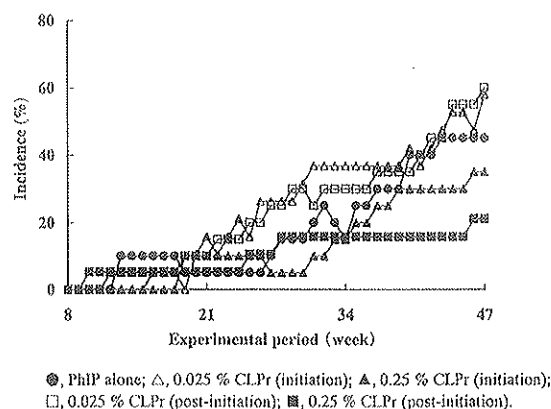
我々は、すでにCLPrがHCAの1種である3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) 及び2-amino-3,4-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ) とそれらの代謝活性化体に対する突然変異原性抑制作用を有することを報告している⁷⁾。そこで、PhIPの突然変異原性に対する抑制作用を検討するため、プレインキュベーション法を用い、菌株として*S.typhimurium* TA98を選び、S-9mixの存在下PhIPを代謝活性化させ、生じた突然変異菌数をカウントした。その結果、CLPrはPhIPの突然変異原性に対しても抑制効果を示した。従って、*in vivo*でPhIP乳腺発癌を抑制する可能性が示された。これらの結果を参考にして、CLPrの発癌修飾作用をPhIP誘発乳腺発癌モデルで検討し、さらにCLPrの全身諸臓器に対する発癌修飾作用を、中期多臓器発癌モデルを用いて検討した。

実験1：PhIP誘発乳腺発癌モデルにおける修飾作用⁸⁾

生後6週令のSD系雌ラットにイニシエーション処置としてPhIPを週2回、計8回強制経口投与した。処置後、イニシエーション期間 (4週間) あるいはポストイニシエーション期間に0.025%あるいは0.25%CLPr添加食を与える群、全期間を通じて基礎食 (5%コーン油添加CRF-1) を与える群を設けた。ほかにPhIP非処置の0.25%CLPr群、基礎食群を設け、計7群とした。実験期間中、週1回触診にて乳腺腫瘍の発生状況を観察し、48週の時点で剖検し、病理組織学的検索を実施した。

イニシエーション処置6週目から、乳腺腫瘍の発生が観察された (Fig.1)。剖検時の発生頻度はPhIP単独群55%、CLPr 0.025% (Initiation) 群63%、CLPr 0.25% (Initiation) 群65%、CLPr

Fig.1 Sequential observation of mammary tumor development in initiation groups (Exp.1)



0.025% (Post-initiation) 群50%、CLPr 0.25% (Post-initiation) 群32%であった (Table 1)。CLPr 0.25% (Post-initiation) 群は、PhIP単独群と比較して腺癌の発生頻度、平均個数、平均体積において抑制傾向を示した。PhIPを投与すると膵臓でDNA付加体が検出されていることから、膵臓も標的臓器の一つと考えられている。そこで、膵臓の病理組織学的検索を行ったところ、PhIP投与群に腺房細胞の好塩基性細胞巣が高頻度に観察された。前癌病変と考えられている腺房細胞の好酸性細胞小増殖巣の発生頻度はCLPr 0.025% (Initiation) 群、CLPr 0.25% (Initiation) 群でPhIP単独群と比較して、有意($p < 0.05$)に減少していた (Table 2)。また、PhIPは雄ラットに大腸発癌を誘発することが報告されているが、今回の実験条件で、大腸の腫瘍性病変は肉眼的に観察されなかった。

Table 1 Incidence, multiplicity and volume of mammary tumors (Exp.1)

Group	No. of rats	Fibroadenoma		Adenocarcinoma		Volume (cm ³ /rat) ^a
		Incidence (%)	Multiplicity ^a	Incidence (%)	Multiplicity ^a	
PhIP	20	3 (15)	0.25 ± 0.72	10 (50)	0.80 ± 0.95	4.70 ± 15.43
PhIP+0.025 % CLPr (initiation)	19	7 (37)	0.42 ± 0.61	8 (42)	1.05 ± 1.99	9.47 ± 18.84
PhIP+0.25 % CLPr (initiation)	20	4 (20)	0.25 ± 0.55	8 (40)	0.80 ± 1.47	8.69 ± 23.60
PhIP+0.025 % CLPr (post-initiation)	20	5 (25)	0.25 ± 0.44	11 (55)	1.20 ± 1.36	5.26 ± 14.17
PhIP+0.25 % CLPr (post-initiation)	19	2 (11)	0.11 ± 0.32	6 (32)	0.68 ± 1.49	4.15 ± 10.90

^a Values are means ± SD.

Table 2 Incidence and multiplicity of pancreatic lesions (Exp.1)

Group	No. of rats	Basophilic foci		Eosinophilic foci	
		Incidence (%)	Multiplicity ^a	Incidence (%)	Multiplicity ^a
PhIP	18	18 (100)	1.15 ± 1.00	13 (72)	1.15 ± 1.00
PhIP+0.025 % CLPr (initiation)	18	18 (100)	1.65 ± 3.32	6 (33) [*]	1.65 ± 3.32
PhIP+0.25 % CLPr (initiation)	20	20 (100)	0.79 ± 1.69	6 (30) [*]	0.79 ± 1.69
PhIP+0.025 % CLPr (post-initiation)	20	20 (100)	0.64 ± 0.86	10 (50)	0.64 ± 0.86
PhIP+0.25 % CLPr (post-initiation)	19	19 (100)	1.96 ± 3.28	10 (56)	1.96 ± 3.28

^a Values are means ± SD.

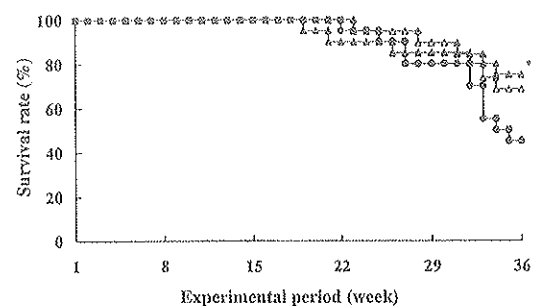
^{*} Significantly different at $p < 0.05$ vs. PhIP alone group.

実験2：中期多臓器発癌モデルにおける修飾作用⁹⁾

生後6週令のF344系雄ラットにイニシエーション処置として最初の4週間にDEN, *N*-methylnitrosourea (MNU), *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN), DMH, DHPNでイニシエーション (DMBDD処置) を行った。DMBDD処置後7日目から、0.025%および0.25% CLPr 添加食または基礎食 (DMBDD群) を与える群、DMBDD処置を行わないで全期間を通じて0.25% CLPr添加食、基礎食を与える群の計5群を設定した。実験開始36週後に屠殺剖検し、諸臓器を病理組織学的に検索した。

実験開始19週から死亡例が出始め、実験終了時の生存率は、DMBDD群で45%、DMBDD + CLPr 0.25%群で68%、DMBDD + CLPr 0.25%群で75%となり、DMBDD + CLPr 0.25%群は、

Fig.2 Survival curves for initiation groups (Exp.2)



●, DMBDD; △, DMBDD+0.025 % CLPr; ▲, DMBDD+0.25 % CLPr.
* Significantly different from DMBDD group ($p < 0.05$).

DMBDD群と比較して有意($p < 0.05$)に高かった (Fig.2)。DMBDD処置群の体重、摂餌量は非処置群と比して低値を示したが、それぞれの群におけるCLPrによる影響は見られなかった。肝比重量はDMBDD処置で変わらなかったが、腎比重量は増加した。

病理組織学的検索の結果、肺では、過形成は全DMBDD処置群に高頻度に見られ、腺腫はCLPrによる抑制作用は見られなかった。しかし、腺癌の発生個数がDMBDD + 0.25%群で有意($p < 0.05$)に減少した (Table 3)。甲状腺では、腺腫の発生頻度がDMBDD単独群で8/19に対し、CLPr 0.025%群で4/19、CLPr 0.25%群で2/19と減少傾向を示し、腺癌の発生個数においても減少傾向を示した。腺癌の発生に関して差は見られなかった (Table 4)。膀胱では、腫瘍性病変の発生頻度は低いものの減少傾向が見られた。その他、腎臓、小腸及び大腸の腫瘍性病変の発生に対するCLPrの修飾作用は認められなかった。

Table 3 Incidences and multiplicities of preneoplastic and neoplastic lesions in the lung (Exp.2)

Group	No. of rats	Hyperplasia	Adenoma		Carcinoma	
		Incidence (%)	Incidence (%)	Multiplicity ^a	Incidence (%)	Multiplicity ^a
DMBDD	19	19(100)	10(52.6)	1.16±1.34	5(26.3)	0.32±0.58
DMBDD+0.025 % CLPr	19	18(94.7)	8(42.1)	0.95±1.27	2(10.5)	0.11±0.32
DMBDD+0.25 % CLPr	19	18(94.7)	9(47.4)	0.90±1.05	0(0)	0*

^a Values are means ±SD.

* Significantly different from DMBDD group ($p < 0.05$).

Table 4 Incidences and multiplicities of preneoplastic and neoplastic lesions in the thyroid gland (Exp.2)

Group	No. of rats	Hyperplasia	Adenoma		Adenocarcinoma	
		Incidence (%)	Incidence (%)	Multiplicity ^a	Incidence (%)	Multiplicity ^a
DMBDD	19	5(27.8)	8(44.4)	0.50±0.62	3(16.7)	0.17±0.38
DMBDD+0.025 % CLPr	19	8(44.4)	4(22.2)	0.22±0.43	2(11.1)	0.11±0.32
DMBDD+0.25 % CLPr	19	8(44.4)	2(11.1)	0.11±0.32	2(11.1)	0.17±0.51

^a Values are means ±SD.

これらのことから、カカオポリフェノールは特定の臓器において発癌予防作用を示す一方、どの臓器においても毒性や発癌促進作用を示さないことが示唆された。

<参考文献>

- 1) G. Block *et al*, Nutr. Cancer 18 : 1-29, 1992
- 2) M. Hirose *et al*, Carcinogenesis 16 : 217-221, 1995
- 3) H. Tanaka, M. Hirose *et al*, Cancer Lett. 83 : 149-156, 1994
- 4) M. Hirose *et al*, Cancer Lett. 168 : 23-29, 2001
- 5) M. Hirose *et al*, Cancer Lett. 143 : 173-178, 1998
- 6) M. Natsume *et al*, Biosci. Biotechnol. Biochem. 64 : 2581-2587, 2000
- 7) M. Yamagishi *et al*, J. Agric. Food Chem. 48 : 5074-5078, 2000
- 8) M. Yamagishi, M. Hirose *et al*, Cancer Lett. in press
- 9) M. Yamagishi, M. Hirose *et al*, Cancer Lett. in preparation