

ココアのヘリコバクター・ピロリに及ぼす効果 カカオFFAの殺菌作用について

神谷 茂 (杏林大学医学部感染症学教室)

1. はじめに

われわれは第3回及び第4回の本シンポジウムでココアのヘリコバクター・ピロリ（以後、*H. pylori*と記す）に対する抗菌効果、即ち、胃上皮細胞に対する*H. pylori*の接着抑制効果及び*H. pylori*殺菌効果、について報告した。今回は、*H. pylori*殺菌効果を有するココア成分の同定及びその殺菌メカニズムに関する研究結果について解説し、臨床試験結果についても報告する。

2. ココアに含まれる*H. pylori*殺菌成分の同定

近年、ココアの機能性研究が注目を集めているが、その発端になったのは抗酸化能を有するココアポリフェノールであろう。緑茶に含まれるポリフェノールが*H. pylori*殺菌効果を有するとの報告もあるので、われわれもまず始めにココアポリフェノールと*H. pylori*殺菌効果との関係について検討した。緑茶などのポリフェノールの機能性を研究する際にしばしば用いられる実験方法に従い、ココアの80%エタノール抽出液から順にクロロホルム、酢酸エチルでの抽出を行い最後に残った水層を残存水層画分とし、それぞれの画分の*H. pylori*殺菌効果を調べた(図1)。ちなみに、緑茶、ウーロン茶の場合、クロロホルム層にはカフェインなどが抽出され、重合度の低いポリフェノールは主に酢酸エチル層に、重合度の高いポリフェノールは主に残存水層に抽出されると報告されている^{1,2)}。

図2に示すように、ポリフェノール含量が最も多かった残存水層は、*H. pylori*に対して菌数を増加させない静菌作用を有してはいたが、殺菌効果と呼べるような強い活性は有していなかった。次にポリフェノール含量が高かった酢酸エチル層にはほとんど殺菌活性は認められなかった。最も*H. pylori*殺菌活性が強かったのはクロロホルム層であり、80%エタノール抽出液の*H. pylori*殺菌活性を100%とした場合、約

図1 ココア有機溶媒分画方法—その1

80%エタノール抽出液

クロロホルムによる抽出

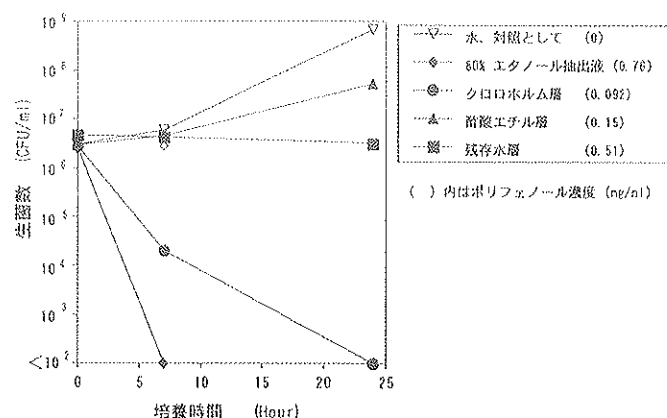
クロロホルム層

酢酸エチルによる抽出

酢酸エチル層

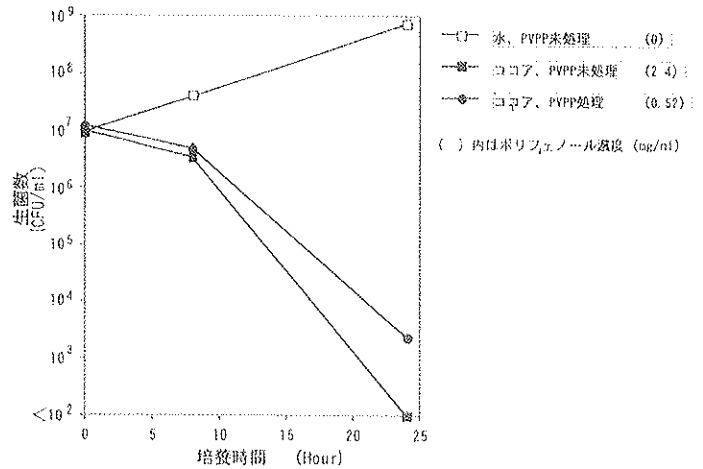
残存水層

図2 ココア有機溶媒抽出液の*H. pylori*殺菌効果



80%の殺菌活性がクロロホルム層に回収されていた。一方、ポリフェノールとしては80%エタノール抽出液の約12%しか回収されていなかった。さらに、図3に示すように、ポリフェノールを吸着する樹脂であるPVPP (polyvinylpolypyrrolidone) を用いて吸着処理前のサンプルと吸着処理後のポリフェノール除去サンプル(ポリフェノールの約80%が除去された)との*H. pylori*殺菌効果を比較した。その結果、PVPP処理を行いポリフェノールを除去したサンプルでもポリフェノール除去前のほぼ80%の殺菌活性を有していることが確認された。

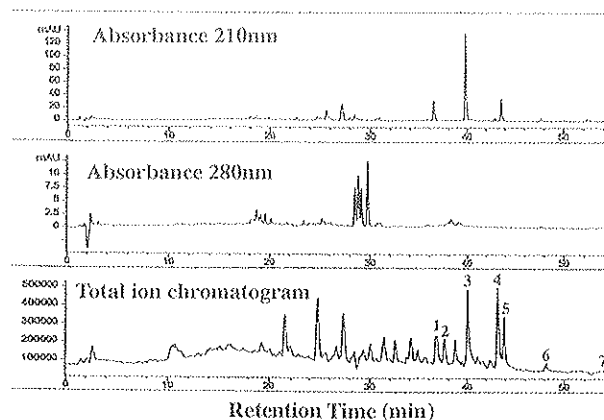
図3 PVPP処理による *H.pylori* 殺菌効果の変化



これらの2つの結果から、ココアの場合、*H. pylori*殺菌効果に対するポリフェノールの寄与は小さいと判断した。

そこで次に、ココアに含まれる主たる*H. pylori*殺菌成分の同定を試みることにした。図3に示したポリフェノール含有量が少なく*H. pylori*殺菌効果が強いクロロホルム層を出発試料とし、ODSカラムを用いて殺菌効果の強い画分を集め、LC/MSにより分析した結果、この画分には各種の遊離脂肪酸が含まれていることが明らかとなった(図4)。ココアに含まれる主な遊離脂肪酸(以後、カカオDFAと記す)は、飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸、不飽和脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸の4種類であり、この4種類で95%以上を占めている。これらの遊離脂肪酸は水に溶けにくく、80%エタノール抽出液から出発している上記の一連の精製方法では回収効率が悪く正確にはココアに含まれる遊離脂肪酸の*H. pylori*殺菌活性が測定できていないと考えた。そこで、われわれはココア中の遊離脂肪酸を効率よく回収できる方法に精製方法を変更し、遊離脂肪酸の*H. pylori*殺菌効果についてさらに検討することにした。

図4 ココアに含まれる *H.pylori* 殺菌成分の同定
—LC/MSによる精製パターン—



1~7はそれぞれリノレン酸、ミリスチン酸、リノール酸、パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸およびアラキシン酸を示す。その他に微量のフラボノイド類が存在する。

ココアからアセトンを用いて遊離脂肪酸を含む脂溶性物質を抽出した後、さらに50%エタノールでポリフェノールを含む水溶性物質を抽出した(図5)。それぞれに含まれるカカオFFA量とポリフェノール量を表1に示す。この両者の*H. pylori*殺菌効果を比較したところ、アセトン抽出画分：50%エタノール抽出画分の比が1.1：1であった。また、それぞれの画分の脂肪酸組成を調べ、その脂肪酸組成に従って市販されている遊離脂肪酸のミクスチャーを作成しその*H. pylori*殺菌効果を調べたところ、80%以上の活性が遊離脂肪酸で説明できることがわかった。なお、脂肪酸がグリセリンに結合したトリグリセライド(中性脂肪)では*H. pylori*殺菌効果を有していないことを確認した。ここまでの結果を総合し、ココアが有する*H. pylori*殺菌効果の主たる活性成分は遊離脂肪酸であると結論した。

図5 ココア有機溶媒分画方法—その2

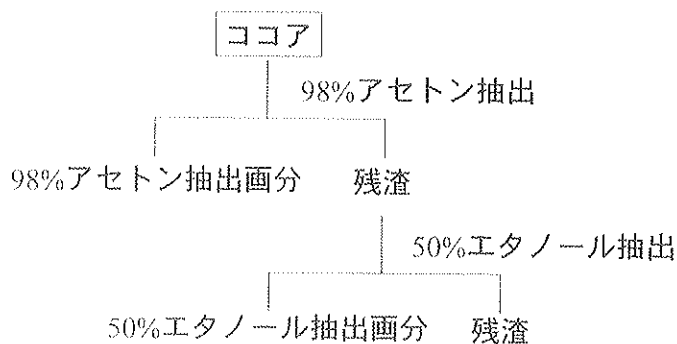


表1 98%アセトン抽出画分と50%エタノール抽出画分の*H. pylori*殺菌効果

	98%アセトン抽出画分	50%エタノール抽出画分
<i>H. pylori</i> 殺菌効果	1.1	1
遊離脂肪酸量	323ug/ml	166ug/ml
ポリフェノール量	0.0mg/ml	1.3mg/ml

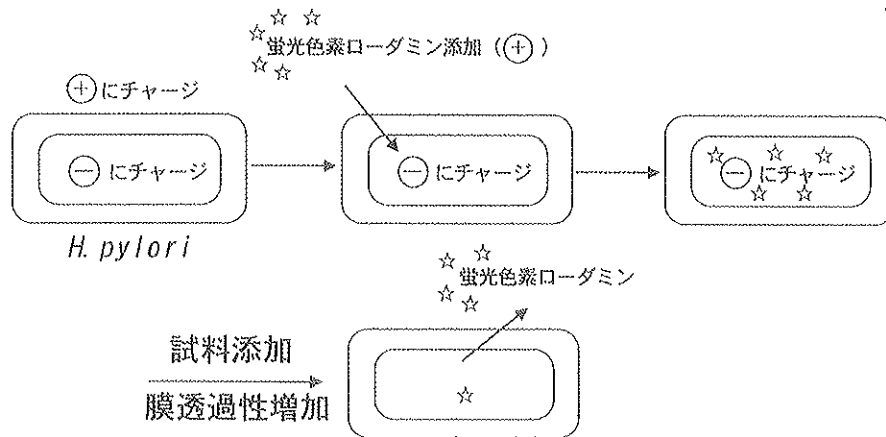
カカオFFAのうち、どの遊離脂肪酸が*H. pylori*殺菌活性を有しているかを検討するために、市販されている試薬の*H. pylori*殺菌効果を測定したところ、不飽和脂肪酸であるオレイン酸及びリノール酸の活性が強いことが明らかとなった。一方、飽和脂肪酸であるパルミチン酸やステアリン酸にはほとんど*H. pylori*殺菌効果のないことが明らかとなった。

3. 遊離不飽和脂肪酸による*H. pylori*殺菌メカニズム

われわれは、オレイン酸やリノール酸がどのようにして*H. pylori*を殺菌するのかそのメカニズムについて検討を加えた。

遊離不飽和脂肪酸が*H. pylori*殺菌効果を有しているとの報告は既にあり^{3,4)}、その報告では培地に不飽和脂肪酸を添加し培養した結果、これら不飽和脂肪酸が細胞膜に取り込まれ細胞膜の流動性が増加したことが主たる殺菌メカニズムであろうと推論している。われわれも膜の流動性に焦点を絞り実験を行った⁵⁾。その測定原理は図6に示したとおりである。*H. pylori*を含む全ての細胞は生存するために呼吸を行いその結果プロトン(+)を細胞外に放出している。しかし、プロトンは勿論のこ

図6 カカオFFAによる *H.pylori* 殺菌メカニズムの検討



と、その他のイオンの細胞膜透過性も厳密に制御されている。その結果、細胞内外には常に細胞外をプラスとする一定の電位差を生じ、その電位差を制御することにより細胞はその恒常性を保っている。*H. pylori*を培養している培地にプラスの電荷をもった蛍光色素ローダミンを添加すると、ローダミン色素は細胞内に取り込まれ蛍光が弱くなり消光という現象がおこる。次いで、細胞膜のイオン透過性を増す試薬を添加すると、細胞内外の電位差が消失するために細胞内に蓄積していたローダミンが培地中に浸出し再び蛍光強度が上昇する現象が認められる。

結果は図7に示すように、対象として水を添加した系では細胞膜の透過性は全く変化しないことから消光という現象がますます進むが、一方不飽和脂肪酸を添加した場合はすぐに蛍光強度の再上昇が認められ細胞膜の透過性が増加していることが示唆された。4種類のカカオFFAの膜透過性増加効果をまとめたものを表2に示す。これよりカカオFFAのうち、不飽和脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸に強い膜透過性増加効果が認められた。この膜透過性の増加は不飽和脂肪酸添加後かなり短い時間で認められることから、殺菌作用のメカニズムを以下のように考えている。添加した不飽和脂肪酸は短時間のうちに細胞膜を構成しているリン脂質の脂肪酸の部分に入り込み、物理的にそれら脂肪酸を押し広げ、その結果膜の透過性が増加する。通常は細胞の恒常性を保つために厳密に制御されている細胞内外のイオンの通過が、細胞膜の透過性が増加することにより正常に制御できなくなり、その結果細胞内外のイオンバランスが崩れ、細胞がダメージを受け死に至るといものである。

図7 膜透過性増加効果の検討

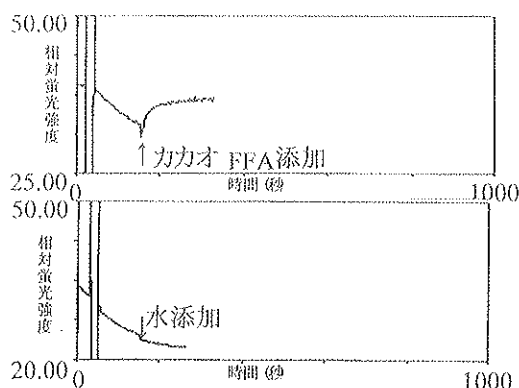


表2 殺菌メカニズム実験結果
—膜透過性増加効果—

カカオFFA	最小有効濃度 (μ M)
パルミチン酸 (C16:0)	>200
ステアリン酸 (C18:0)	>200
オレイン酸 (C18:1)	50
リノール酸 (C18:2)	50

カカオFFAの*H. pylori*殺菌効果の強さと膜透過性増加効果の強さを比較すると、どちらの効果とも不飽和脂肪酸であるオレイン酸及びリノール酸で活性が強く、パルミチン酸及びステアリン酸の活性は弱いことから、膜透過性増加によるダメージが*H. pylori*殺菌効果の原因の一つであることが強く示唆される。

4. 胃・十二指腸潰瘍患者を対象にした臨床試験

遊離脂肪酸量を市販ミルクココアに比べ約2倍に高めた機能性ココアを作成し臨床試験を行った。胃・十二指腸潰瘍患者を対象にし、通常除菌療法に加えて機能性ココアを1日3杯飲むことによる除菌率の改善効果を検討することを目的にしたもの(表3, 4及び図8, 9)である。一昨年11月に保険適用を受けた3剤除菌療法の場合、ココアを1日3杯飲むことにより除菌率が81%から89%に上昇した(図8)。また、3剤除菌療法が保険適用される以前に行われた2剤除菌療法の場合、ココアを1日3杯飲むことにより、除菌率が45.5%から61.3%に上昇した(図9)。いずれの臨床試験でも現在のところ症例数が十分でなく統計学的な有意差は認められなかったが、ココア飲用が*H. pylori*除菌率の改善効果を示す傾向が認められた。このことから、ココアには*H. pylori*除菌療法時の補助食品としての可能性が期待される。

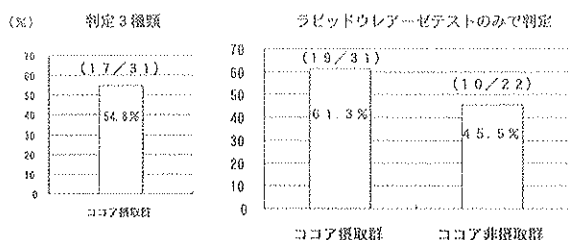
表3 (2剤除菌+ココア)における臨床試験プロトコール

対象者	: <i>H. pylori</i> 陽性である胃・十二指腸潰瘍患者
被験者数	: ココア摂取群 31名, ココア非摂取群 22名
投与物質	: 2剤及びココア
投与薬剤	: 胃酸分泌抑制剤(タケプロン, 60mg) 抗生物質(クラリス, 400mg)
投与期間	: 10日間
ココア飲用量	: 1日3杯/食間に飲用
飲用期間	: 除菌療法時及び除菌療法後1か月間
除菌判定	: 除菌施行の1か月後、以下の項目で判定
ココア非摂取群	: ラピッドウレアーゼテスト
ココア摂取群	: ラピッドウレアーゼテスト, <i>H. pylori</i> 培養試験, 病理学的検査
※ただし、ココア非摂取群と条件をそろえるため、ラピッドウレアーゼテストのみの判定結果も算出し、対照群と比較した	

表4 (3剤除菌+ココア)における臨床試験プロトコール

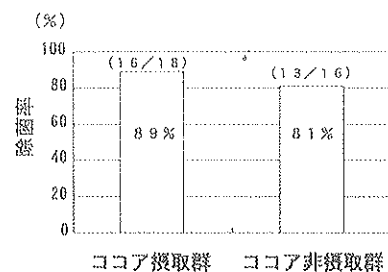
対象者	: <i>H. pylori</i> 陽性である胃十二指腸潰瘍患者
被験者数	: ココア摂取群 18名 ココア非摂取群 16名
投与物質	: 3剤及びココア
投与薬剤	: 胃酸分泌抑制剤(タケプロン, 60mg) 抗生物質2剤(クラリス, 400mg / サワシリン1500mg)
投与期間	: 1週間/朝晩2回
ココア飲用量	: 1日3杯/食間に飲用
飲用期間	: 除菌療法時及び除菌療法後約1か月間
除菌判定	: ラピッドウレアーゼテスト, <i>H. pylori</i> 培養試験及び病理学的検査で全て陰性の場合、または、尿素呼吸試験で陰性の場合のみ陰性と判定

図8 (2剤除菌+ココア)における除菌率改善効果



※判定3指標 : 除菌の判定をラピッドウレアーゼテスト, *H. pylori* 培養試験, 病理学的検査の3指標の項目で確認

図9 (3剤除菌+ココア)における除菌率改善効果



5. 健常人を対象にした臨床試験

*H. pylori*に感染しているが全く胃腸症状を有しない健常人を対象にし、1日1杯機能性ココアを飲むことによる*H. pylori*菌数の低減効果の検討を目的に行った(表5及び図10, 11)。ココアを飲まない対照群で試験開始1カ月経過後の尿素呼気試験測定値はほとんど変化しなかったが、ココア飲用群では試験開始1カ月経過後の尿素呼気試験測定値が約15%低下した(図11)。尿素呼気試験測定値は感染*H. pylori*菌数のある程度反映と言われており、対照群との間で有意差は認められなかったものの、1日1杯のココアを飲むことにより感染している*H. pylori*菌数を減少させる可能性が示唆された。一方、1カ月間という試験期間が短いことも一因だと思われるが、ペプシノーゲンI/II比及び抗*H. pylori*抗体価に大きな変化は認められなかった。

表5 健常人における臨床試験プロトコール

対象者	胃腸症状を有しない健常人で <i>H. pylori</i> 保菌者	
被験者数	ココア摂取群	29名
	対照群	26名
平均年齢	ココア摂取群	44.6才±10.4
	対照群	45.6才±9.1
投与物質	ココア	
	ココア飲用量: 1日1杯/夕食後2時間後に飲用 ※ただし、眠れなくなったり、お腹がもたれたりする被験者は、 食後の午後3時後に摂取	
飲用期間	1カ月間	
測定項目	<i>H. pylori</i> 菌数増減の判断項目として、以下の項目を測定 尿素呼気試験、ペプシノーゲンI/II比、抗 <i>H. pylori</i> 抗体価	

図10 健常人における臨床試験スケジュール

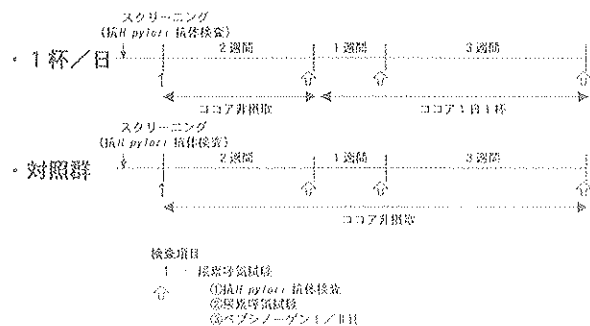
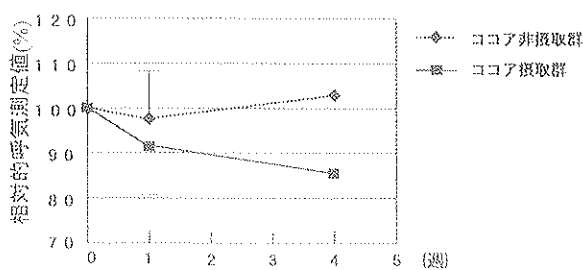


図11 健常人を対象とした臨床試験結果
—尿素呼気試験測定値経時変化—



※ 0, 1週目と4週目の3点のみの平均尿素呼気試験測定値(%)。0週目の測定値平均を100%にした場合の経時的変化を示す。

6. おわりに

ココアは安全でおいしい嗜好食品として長年親しまれてきた。一方、ココアの機能性食品としての側面については、本シンポジウムでも第1回から多くの研究が報告されてきた。*H. pylori*殺菌効果はその一つであるが、日本人の50才前後、いわゆる団塊の世代と呼ばれる人々はその70%以上に*H. pylori*が感染していると言われており、感染菌数の低減効果及び除菌時の補助飲料としての可能性が期待される。

8. 謝辞

今回の研究成果は、千葉大学小山範征教授、埼玉医科大学太田慎一教授、玉田親造講師、北里研究所鈴木達夫研究部長との共同研究で得られたものであり深く感謝申し上げます。

文献

- 1) *Bio Industry*, 14, 53 (1997)
- 2) 中里賢一ほか、日本農芸化学会誌、72,51 (1998)
- 3) L. Thompson *et al.*, *Gut*, 35, 1557 (1994)
- 4) S. Khulusi *et al.*, *J. Med. Microbiol.*, 42, 276 (1995)
- 5) N. Koyama, *FEMS Microbiol. Lett.*, 61, 7 (1989)