

# カカオポリフェノールの生体内における存在と生理作用

大澤 俊彦 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

我々はこれまでカカオに含まれるポリフェノール類が種々の生理効果を有することを確認し、その多くはポリフェノール類の強い抗酸化性にに基づく作用であった。今回はこの中でも動脈硬化に焦点を絞り、動物モデルを用いて詳細に検討した結果と、カカオポリフェノールの動脈硬化進展抑制作用メカニズムとして明らかとなってきた知見について報告する。

## 1. 動物実験モデルを用いたカカオポリフェノールの動脈硬化進展抑制作用

カカオポリフェノールの動脈硬化に対する作用として、これまでにビタミンDによって惹起されたラットの動脈石灰化モデルあるいは家族性高脂血症のモデルであるKHCウサギを用いて検討したところ (図1)、いずれも顕著な動脈硬化の進展抑制が確認されている。

今回は代表的な実験モデル動物であるApoEノックアウトマウスを用いてその作用について検討した。8週令の雄性ApoEノックアウトマウスあるいはC56マウスにコントロール飼料 (AIN-93) あるいは0.25%または0.4%のカカオポリフェノールを含む飼料を16週間摂取させ、実験終了時に採血及び解剖を実施した。摘出した大動脈はホルマリン固定後、病理切片を作成し、病理組織学的解析及び免疫組織学的検討を実施した。写真1に摘出した大動脈及び展開した後オイルレッドによって染色した像を示すが、写真上にあるような大動脈弓に白く見える部分あるいは写真下にあるように

図1 ココアを摂取したKHCウサギの動脈中の粥状動脈硬化面積の比較

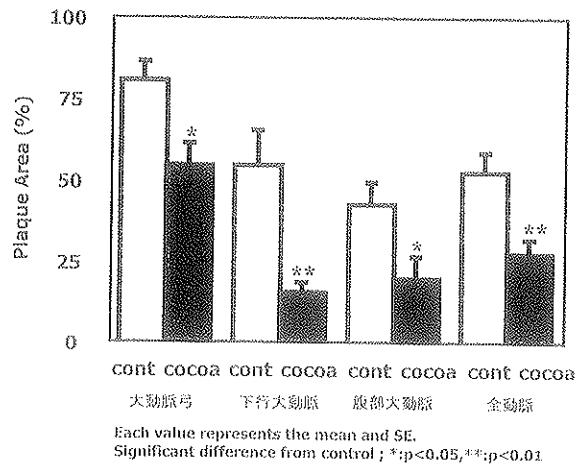
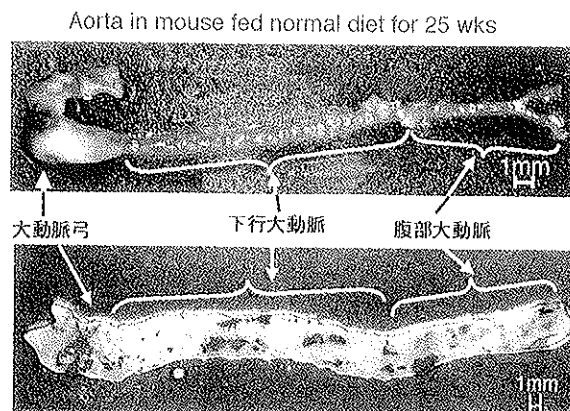


写真1 ApoEノックアウトマウスより摘出した大動脈並びに展開した後のオイルレッド染色像



赤く染色された部分が粥状動脈硬化病変である。これらの病的変化について定量的に解析したところ、特に腕頭動脈部分での発症に関してカカオポリフェノールは有意にその発症を抑制することがわかった。またその部分の酸化ストレスマーカーの生成を免疫組織学的に解析したところ、カカオポリフェノール摂取群では対照群に比較しその生成が抑制されていた。また動脈硬化発症時に大きな役割を示す接着分子の発現に関しても抑制が認められ、カカオポリフェノールはLDLの酸化を抑制するのみならず他の生化学的変化を抑制することで病態の進展を抑制することが示唆された。

## 2. カカオポリフェノールの生体内での挙動

カカオポリフェノールはこれまで報告してきたようにカテキンとその縮合物であるプロシアニジンによって構成されている (図2)。(-) -epicatechinと (+) -catechinのカテキン類はチョコレートやココアとして摂取した場合、その約25から30%が吸収され尿中にカテキン類縁体として観察される。しかしながら、その代謝パターンはヒトとラットで大きく異なり、図3に示すようにラットではその殆どが血中でグルクロン酸抱合体として検出されるのに比べ、ヒトではグルクロン酸あるいは硫酸及びグルクロン酸・硫酸抱合体がほぼ同程度検出される。また興味深いことに同じ分子量を示すヒトとラットのグルクロン酸抱合体でもHPLCで分析した結果、異なるリテンションタイムを示すことから、化学構造が異なることが示唆された。そこで (-) -epicatechinを摂取したラット及びヒトの尿中から幾つかの (-) -epicatechinの代謝物を単離・精製したところ、図4に示すような物質を確認した。(-) -epicatechinのグルクロン酸抱合位置は、図に示すようにラットの場合

図2 カカオに含まれるポリフェノール類の主な構造

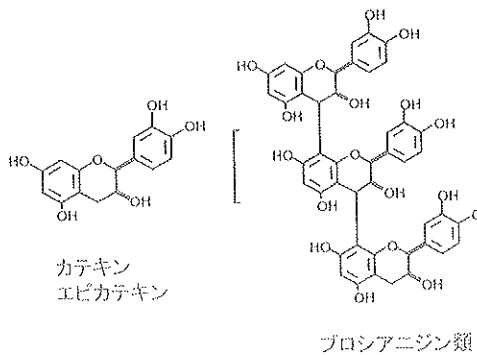


図3 血漿中のエピカテキン代謝物のプロファイル

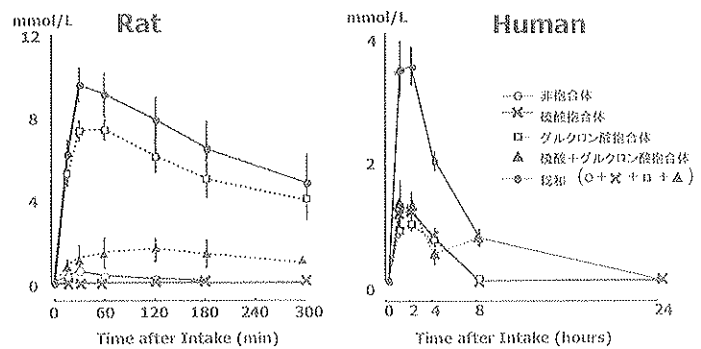
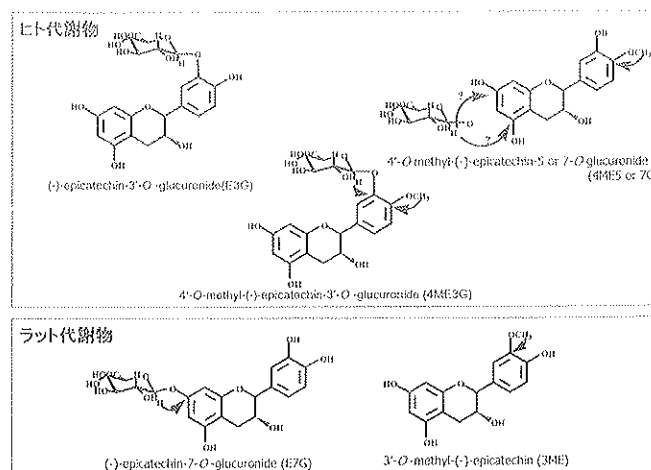


図4 (-) -エピカテキンのヒト並びにラットの代謝物の構造



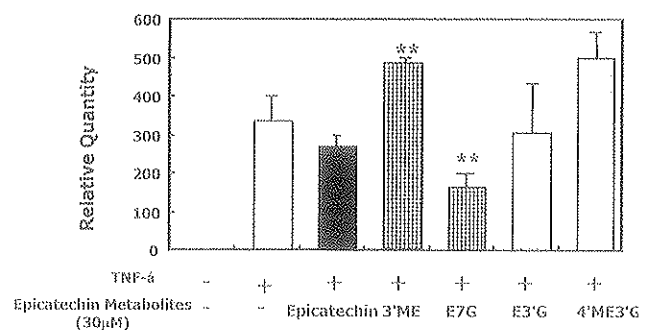
Natsume M, Osakabe N, Oyama M, Sasaki M, Baba S, Nakamura Y, Osawa T, Terao J. *Free Rad. Biol. Med.* 2003

A環の7位であったのに対してヒトの場合ではB環の3'位であった。カテキン類の抗酸化性はB環のカテコール構造に依存する部分が多いことから、これらの化合物の抗酸化性には差異があることが推測される。そこでスーパーオキシドラジカル及びDPPHラジカル捕捉作用、ペルオキシナイトライドによるニトロチロシンの生成に対する作用、あるいはLDLのラグタイムまたは血漿中の過酸化脂質生成に対する作用などを検討した。この結果 (-)-epicatechinはペルオキシナイトライドによるニトロチロシンの生成に対する作用以外の測定項目で最も強い作用を示し、B環のカテコール構造が維持されたラット由来の代謝物では抗酸化活性が比較的維持されていたのに比較して、ヒト由来の代謝物では活性の減弱が著しかった。

### 3. カカオポリフェノールの動脈硬化抑制メカニズム

上述したようにヒト由来の (-)-epicatechinのグルクロン酸抱合体の抗酸化活性は極めて低かったが、ヒトに毎日ココアを摂取させた場合にはLDL酸化抵抗性が上昇するということが我々を含め幾つかの研究グループによって報告されている。すなわち、カカオポリフェノールのLDL酸化抑制効果は、ココアあるいはチョコレート摂取時に血中に存在する (-)-epicatechinのグルクロン酸抱合体以外の成分によるものと考えられるのである。それでは最も多く血中に存在するこの物質群は動脈硬化発症に関して全く関与していないのであろうか？ そこでこの疑問を解決すべく、これらの物質の血管内皮細胞に対する作用についてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討することとした。HUVECを炎症性サイトカインであり、内皮の機能不全を引き起こすTNF- $\alpha$ で刺激した時に誘導される接着分子の一種であるVCAM-1の発現をRT-PCR法によって測定した。また、刺激時に同時に30  $\mu$ Mの (-)-epicatechin代謝物を添加し、4時間後の変化を解析した。この結果、図5に示すように (-)-epicatechin

図5 TNF- $\alpha$ 刺激によって誘導されるHUVECに対するVCAM-1へのエピカテキン代謝物の作用



のグルクロン酸抱合体はVCAM-1の誘導を抑制する傾向があることがわかった。このように、これらの代謝物は抗酸化作用以外のメカニズムで動脈硬化に対して抑制的に働く可能性が示唆された。

カカオに含まれるポリフェノールにはカテキンだけでなくプロシアニジンがある。我々はプロシアニジンの血中への移行に関しては否定的なデータを得ているが、最近プロシアニジンは腸内細菌によって変化を受け、幾つかのフェノール酸として吸収されているという報告もあり、前述したLDLの酸化抵抗性に対してはこのような物質群が寄与しているのかも知れない。また今回報告したように、抗酸化性を持たない形に変化した代謝物であっても別のメカニズムによって動脈硬化に抑制的に働いている可能性もある。カカオポリフェノールの抗動脈硬化作用解明のためには、今後これらの点についてさらなる検討が必要であると思われる。