

# カカオフラバノールと炎症性メディエーター： 分子論的メカニズムと血管応答

ヘルムート・シーズ（ドイツ・ハイน์リッヒハイネ大生化学・分子生物学研究所）

## 1. はじめに

ポリフェノールならびに活性酸素は現在たいへん注目されている研究対象である。ここでは炎症性メディエーターである過酸化窒素、リボキシゲナーゼならびにミエロペルオキシダーゼ (MPO) について述べたい。これらについては *in vitro* だけでなくヒトを対象とした血管応答についても検討している。

カカオのフラバノール（フラボノイド）の抗炎症作用についてはこれまでも多くの研究が行われているが、その作用は次のようなものと考えられている。すなわちカカオポリフェノールやその代謝産物は、リボキシゲナーゼ活性の阻害やヒドロパーオキシド排出作用による前炎症性メディエーター生産を直接に減弱させたり、一酸化窒素 (NO) のような抗炎症性メディエーターとして作用する。また同時に炎症作用に含まれるたんぱく質の遺伝子発現も調節している。

カカオと人類との関わりは非常に長い歴史があり、中南米では古くから飲み物として利用されており、またマヤ＝アステカでは薬剤としても用いられていた。カカオは16世紀に中米からヨーロッパ、その後さらにアメリカやアジア、また前世紀にはアフリカにも伝わり、全世界にひろがることになった。

## 2. フラボノイド研究のこれまで

フラボノイドに関するもっとも有名な論文は1995年にオランダで発表されたもので、冠動脈疾患の死亡率とフラボノイド摂取との間には負の相関があり、フラボノイド摂取が増えるほど死亡率は低下するというものである。もちろんこれは疫学的な調査結果に基づく研究であって何かを証明したものではない。しかしこの論文がきっかけとなって、以後フラボノイドの分子レベルでの解明が進められることになった。また少し古くなるが1936年にビタミンCの研究によってノーベル賞を受賞したセント・ジョージはフラボノイドも研究しており、この物質が血管壁で透過性 (Permeability) を有することを確認していたが、ビタミンの一種と考えていたため彼はこれをビタミンPと命名している。今日ではこの物質はビタミンではなく微量栄養素のフラボノイドであると認識されている。

2001年にデンマークのグループが行った研究では、チョコレートに含まれるプロシアニジンによってロイコトリエン、プロスタサイクリンの比が減少することがヒトによる試験で確かめられている。これはプロシアニジンが血管応答により影響をもたらすものであることを示している。また同年に発表された越阪部らの論文もこれと同様の傾向を示しており、ココアを健常者に摂取してもらったところ、LDLコレステロールの酸化が抑制されるという結果を得ている。これらからひとつの仮説が考えられる。すなわちフラボノイドの多い食品を摂取すれば心血管系疾患のリスクが減少す

るのではないかということである。これに関与している因子としてはフラボノイドの抗酸化機能が考えられる。またそれ以外にも血管の反応性やサイトカインの産生、あるいは血小板の機能に対しても変化がもたらされるのではないかという仮説が考えられる。カテキンやエピカテキンはダイマー（二量体）やオリゴマー（配糖体）としてあるいはプロシアニジンとして赤ワインや緑茶、チョコレートやココアに含まれている化合物である。これらはフラボノイドのすぐれた供給源である。チョコレートとココアについていえば、カカオポリフェノールの主要な存在形態はオリゴマーあるいはエピカテキンである（越阪部ら、1998）。

アーティルによれば、ペルオキシナイトレートによっておこるチロシンの窒素化がポリフェノールを添加することで抑えられたという。ペルオキシナイトレートをインキュベーションするとニトロチロシンの生成がみられるが、エピカテキンを添加することによってその産生が抑えられ、オリゴマーを添加するとその産生はさらに抑えられることを、280nmならびに430nmのいずれの領域においても確認している。心血管系疾患においてはたんぱく質の窒素化が大きな問題となっているが、このことはムラドラによってたんぱく質の窒素化により、生体内で活性酸素が生成されることが確認されている。

このたんぱく質の窒素化を生物学的な指標として抗酸化能を調べることができる。古くは1966年にたんぱく質に含まれるチロシンの窒素化の研究が始まり、1994年にベックはたんぱく質の窒素化によって動脈硬化が起きることを免疫学的・組織学的に研究した。つまり動脈硬化の進行を抑えるためにはたんぱく質の窒素化をどこかで抑制する必要があるということである。エピカテキンによるたんぱく質の窒素化の抑制において興味深いのは、動脈硬化を抑えるうえで窒素化の抑制のほうが酸化抑制よりもはるかに効果的であるということであり、しかもそれがエピカテキンによってヒトの血漿で達成されているのと同程度の濃度で達成されていることである。このことはペルオキシナイトレートでもMPOでも同様であることが確認されており、エピカテキン濃度が $0.1 \mu\text{M}$ 以上で濃度依存的に産生が抑制されることが分かっている。またこれはLDLの酸化抑制においても同様である。

リポキシゲナーゼまたNOの関与について述べる。シュウエーらとのこの研究はまだ進行中であるためデータを完全には示せないが、ポリフェノールの添加によって炎症性メディエーターに介在する酵素である15-リポキシゲナーゼが抑制されることが確かめられた。ヒトの血漿に存在する12-リポキシゲナーゼも同様に抑制された。またココアに含まれるフラボノイドは好中球に存在するロイコトリエンを低分子レベルで阻害する。ヒトの実験でココアを摂取することでロイコトリエンの血漿濃度が低下したことはすでに述べたが、このことに結びつく成果であると考えている。ハイゼンによればMPOは脂質過酸化の酵素的な触媒として大きな役割を果たしている（とくに炎症部位において）という。2003年にコステクらはフラボノイドによってMPOが介在するLDLの酸化が阻害されることを分子レベルで確かめている。すなわちMPOやNO<sub>2</sub>が介在する脂質の過酸化つまりLDLの過酸化がフラボノイドによって調節されているのである。フラボノイド類の阻害濃度であるIC<sub>50</sub>を示す。数字が少ないほうがその効果が高いわけであるが、エピカテキンは4.4、ケルセチンは2.2、カンフェロールでは効果はそれほどではないが、いずれも効果があることを示している。すなわちMPOの動脈硬化に関連する作用がフラボノイドによって抑えられたことが分かる。

### 3. 結果と考察

さてヒトにおける実験結果をみてみよう。フラボノイド摂取によって産生がどれだけ抑えられたかをみたものであるが、血漿中のF<sub>2</sub>（イソプラスタン）はこの効果を調べるための非常によいバイオマーカーと考えられるので、これを用いた。非喫煙健常人にフラボノイドの多いココアとフラボノイドの少ない飲料とをそれぞれ摂取してもらったところ、フラボノイドを多く含むココアを摂取した時にはバイオマーカーの産生が低く抑えられたが、フラボノイドの含量が少ない飲料を飲んだ場合にはF<sub>2</sub>は高かった。また運動によってバイオマーカーが減少するのではないかと推察し、疲労困憊するまで自転車をこいでもらい、非運動群との差をみたところ、F<sub>2</sub>の産生にはほとんど差がみられなかった。このことからスポーツの効果については疑問といえる結果となった。

NO関連の話題に移りたい。エピカテキンの阻害効果がどの部分にあるかを調べるための実験を行った。そこでチロシンやニトロチロシン、dL-チロシンについて調べてみた。チロシンのアナログとしては脂溶性の形態がよく知られており、エステル化されたものまで含めると多くの種類があるが、脂溶性、二量体のいずれにおいてもニトロチロシンの産生はエピカテキンを添加することによって抑えられることが分かった。このことから以下のようなことが想定される。つまりチロシンから始まり、ニトロチロシン、さらにはチロシンラジカル、3ニトロチロシン（あるいはダイチロシン）となるが、ラジカル以後の系の反応ではエピカテキンが作用して阻害活性をもつと考えられる。エピカテキンの作用についてはリボヌクレオチドリクターゼでも確認されているが、これは増殖組織にとって重要な反応部位にあり、がん治療もこの部位を標的としている。われわれだけでなくグラスルンドらが行った試験によってもエピカテキンがチロシンラジカル産生を阻害することが確認されており、ヒドロキシウレアにおいても同様の結果が得られている。

化学や*in vitro*の結果はこのくらいにして、次に血管反応についてとくにフローメディエーター拡張（FMD＝血流介在型の血管拡張作用）と血漿のNO化合物、これを生物活性のあるNO——RNOと総称している——の機能について述べたい。ベニトラによればフラボノイドを多く含む食餌を与えたラットの大動脈においてRNO産生が増えたという結果が得られている。フラボノイドを多く含んでいるパープルグレープジュースを摂取することによって血管内皮細胞ならびにLDLコレステロールの酸化感受性が改善したことが、冠動脈疾患の患者を対象とした実験によって報告されている。同様に紅茶の摂取によって冠動脈疾患の患者の血管内皮細胞の機能改善がみられたという報告もある。

ココアに関しては、通常のココア（低フラバン-3-オールのココア）とフラボノイドの多いココア（高フラバン-3-オールのココア）を飲んだところ、ヒト血管中のNOの生物活性が高まったという結果を得ている。WHO基準による慢性疾患に関連する危険因子（動脈硬化、喫煙習慣など）を少なくともひとつ以上もっている26人の被験者にフラボノイドを摂取させ、危険因子の減少がみられるかを確かめるという試験を行った。血管内皮機能は次のような方法で測定した。FMDは超音波の高解像度装置を用い、他にグリセロールナイトレート400 $\mu$ gを舌下投与して血管拡張作用を測定した。被験者の腕の袖口をしばっておき、5分間うっ血状態におく。その後この状態を解くと充血がおこるので、これを測定したものがFMDである。FMDをパーセントであらわしたところ、心血管系の危険因子がない通常人では10-11%であるが、危険因子が増えてくるのに伴いFMDの低下がみられる。ココアを飲む前のFMDが2-3%である被験者では摂取2時間後に2倍に上がるが、6時間後には飲む前よりも低値となる。また血漿中のエピカテキンならびにその代謝物の濃度は摂

取2時間後にピークを示している (図1)。

次に個人のデータをみてみる。被験者にフラボノイド含量が100mlあたり10mgの低フラボノイド飲料および100mlあたり170mgの高フラボノイド・ココアをそれぞれ飲んでもらい、20例の被験者ひとりひとりのデータをプロットしたところ、低フラボノイド飲料では摂取2時間後のFMDはほとんど上がらないのに対して、高フラボノイド・ココアを飲んだ場合には1例を除いていずれもFMDの上昇がみられた (図2)。同じ20人に対して別の日に行った試験でも結果は同様であった。フラボノイドを多く含む飲料を摂取することによって、一時的にせよ血管内皮機能の回復がみられたわけである。NOSの経路でこれがどのように作用しているかはまだ試験中で結論は出ていない。アーテイルらによれば、アルコール誘発型の肝臓障害をもつ炎症疾患モデルラットを用いてカカオ抽出物を摂取させたところ、炎症が抑えられたという。

Figure1. Time Course of Flow-Mediated Dilatation After Ingestion of 100mL of Cocoa Drink Containing High (176mg mL ; n=6) or Low (<10mg mL ; n=3) Amounts of Flavan-3-ols

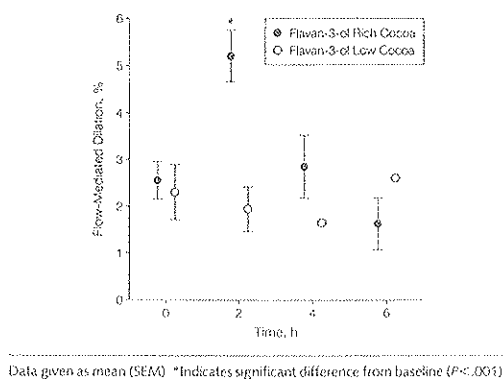
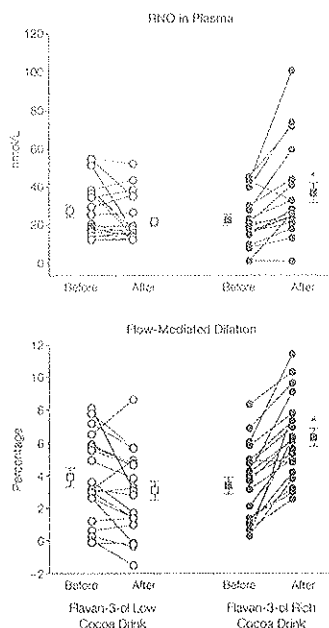


Figure2. Effects of Cocoa Drink Containing Low (<10mg/100mL) or High (176mg/100mL) Amounts of Flavan-3-ols on Plasma Nitric Oxide Pool and Flow-Mediated Dilatation



Nitric oxide pool was measured as the nitrosylated and nitrosated species collectively referred to as RNO (S-nitrosothiols, N-nitroso-proteins). Ingestion of 100 ml of the cocoa drink rich in flavan-3-ols increased RNO concentrations and flow-mediated dilation significantly over the controls. Squares indicate means; error bars, SEM. \*Indicates significant difference from baseline (P<.001).

#### 4. おわりに

よく、よい栄養はフードピラミッドにたとえられる。フードピラミッドとは1日に摂取すべき食品の種類をピラミッド型に図示したもので、食生活指針を分かりやすく、具体的にあらわしたものである。さてピラミッドにはいつも隠された暗室があり、そこに未知の食料や栄養素が眠っているのだが、そこにはおそらくチョコレートが眠っているといっただろう。アメリカには「1日1個のチョコレートは医者をおどらせる」という言葉があるが、フラボノイドの効果については分子レベルや酵素活性レベル、細胞レベル、さらにはヒト試験においても知見が蓄積されつつあり、今後の研究の進展が期待される。