

カカオポリフェノール類の ダイオキシン毒性抑制作用

芦田 均 (神戸大学農学部生物機能化学科)

はじめに

人類の経済産業活動発展の結果、天然には存在しなかったさまざまな化学物質が生み出され、一部の化学物質は人類や他の生物種にとって有毒・有害であるため、負の遺産として環境汚染をもたらしている。これらの環境汚染をもたらすさまざまな化学物質の多くは、微生物、紫外線、酸素などの作用により生物学的・化学的に分解されるが、ダイオキシン類に代表されるいくつかの化学物質は、環境中や生体内で分解されにくいいため、主に食物連鎖を経て生物濃縮されることでヒトに暴露され、長期間にわたり体内でさまざまな悪影響を及ぼす原因となると想定されている。ダイオキシン類のヒトへの暴露は90%以上が食品を介していることから[1]、そのリスク軽減は食品の安全性確保の観点から重要な課題である。

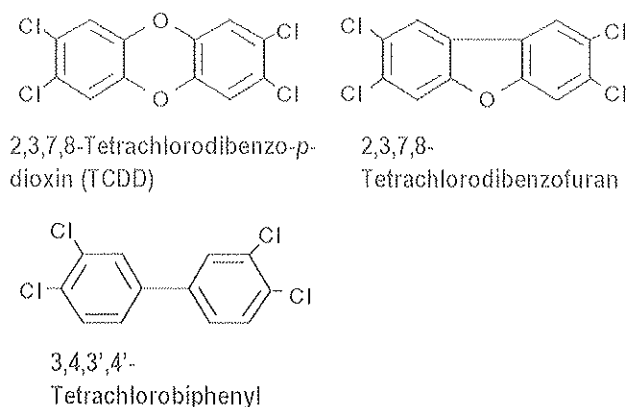
ダイオキシン類とその毒性[2, 3]

ダイオキシン類は、ジオキシン構造をもつ物質、ジベンゾフラン構造をもつ物質、ビフェニル構造をもつ物質の総称であり、骨格に結合する塩素の数と位置により、それぞれ75種、135種、209種の化合物がある。このうちWHOが毒性等価係数を定めた物質は、それぞれ7種、10種、12種であり、2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-para-ジオキシン (TCDD) の毒性が最も強く、かつ最もよく研究対象になっている化合物である (図1)。

ヒトに対するダイオキシン毒性は未だ明確ではなく、塩素座瘡 (皮膚のひどいアクネ様症状) をもたらす可能性や発がんリスクを高める可能性が示唆されている。一方、実験動物におけるダイオキシン毒性は、体重減少 (消耗性症候群)、肝代謝障害、肝肥大と肝細胞壊死、胸腺や脾臓の萎縮、免疫不全などの免疫毒性、発がん性 (プロモーション作用)、催奇形性 (口蓋裂、水腎症や胸腺低形成) をはじめとする生殖毒性、個体の死など多岐にわたることが知られており、また、種差や性差が大きいことも知られている。

このような多岐にわたる毒性の殆どはダイオキシン類が、別名ダイオキシン受容体とも言われているアリール炭化水素受容体 (AhR) に結合し、この受容体を形質転換させ、転写因子として様々な遺伝子発現を誘導したり、タンパク質のリン酸化経路を攪乱したりすることに基づいている。

図1 ダイオキシン類の構造例

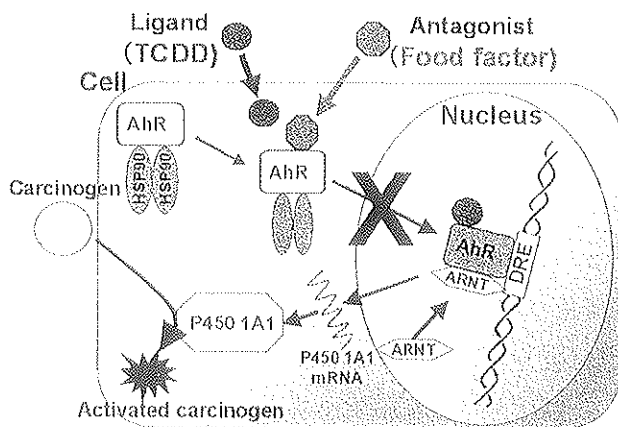


AhRは細胞質中で90kDaのヒートショックタンパク質（Hsp90）などのタンパク質と複合体を形成し、不活性な状態で存在しているが、ダイオキシン類などのリガンドが結合することで活性化し、核へと移行してHsp90を解離する。その後、パートナー分子であるAhR核内輸送担体（Arnt）とヘテロ二量体を形成し、DNA上のダイオキシン応答配列に結合する[4]。この応答配列は、例えば第I相薬物代謝酵素であるシトクロームP450 1Aサブファミリー（CYP1As）などのエンハンサー領域に存在しており、転写因子であるAhR/Arnt二量体の結合により転写が開始される[5]。また、AhRノックアウト動物では、ダイオキシン毒性が発現し難いこともわかっている。これらのことから、AhRの形質転換はダイオキシン毒性の発現における初発段階であると認識されている。したがって、AhRの形質転換を阻害することができれば、ダイオキシン毒性は軽減・抑制できることが推測できる。

ダイオキシン毒性を抑制する可能性がある食品およびその成分

われわれは、ダイオキシン類の暴露は予測できないため、「日常摂取している食品からAhRの形質転換を阻害する成分を見出すことが出来れば、毒性発現の抑制に繋がるはずである」という仮説（図2）に基づいて研究を進めている。これまでの研究から、食品中にはAhRの形質転換を阻害する成分が多種多様に含まれていることが判った。

図2 食品成分によるAhRの形質転換制御



例えば、野菜、茶、果物などに広範に含まれるフラボン、フラボノールやカテキンなどのフラボノイド類が無細胞系や培養細胞系試験でAhRの形質転換を阻害することを明らかにした[6-9]。無細胞系試験において、フラボンやフラボノールが形質転換を50%抑制するIC₅₀値は、1~50 μM程度であり、数種の化合物ではIC₅₀値が1 μM以下と強い効果を示した[7, 8]。

フラボノイド類をはじめとするポリフェノール含量が高い緑茶や紅茶は、培養細胞系でもAhRの形質転換を阻害するとともに、その

下流に位置するシトクロームP450 1A（CYP1A）の発現も抑制する [9-12]。茶葉に含まれる有効成分としては、カテキンをはじめとするフラボノイド以外に、クロロフィルとルテインを見出しており[9]、紅茶に含まれるカテキン重合体であるテアフラビンも無細胞系ではカテキンより強い有効性を示すこともわかった[9, 10]。また、ブドウ種子に多く含まれるレスベラトロール[13]やウコンに含まれるクルクミン[14]にも抑制効果があることが報告されている。

さらに、約40種の野菜抽出物の検索から、モロヘイヤが特に強い抑制活性を示し、これはヒトあるいはマウス由来の肝細胞において、あるいは小腸様細胞と肝細胞とで構築した腸管透過モデル系において有効性を示した。モロヘイヤ抽出物はラットに経口投与した場合でも、肝臓においてAhRの形質転換を抑制した[15]。これは、食品素材としての有効性をはじめて動物実験で検証した例である。フラボノイドをアグリコンとして豊富に含むプロポリスも形質転換抑制に有効な食品素材である[16, 17]。

カカオポリフェノールの有効性検証

カカオもカテキンやその重合物であるプロシアニジンなどのポリフェノール化合物を多く含む。これまでの多くの研究成果から、カカオポリフェノールは抗酸化性をはじめとする多様な機能性を示すことが知られている。しかし、カカオポリフェノールによるAhR形質転換抑制効果は不明であったため、本研究ではココアならびにその抽出物についての評価を実施した。方法としては、SD系雄性ラット肝臓より形質転換していないAhRを含む細胞質画分を調製し、これにダイオキシン類で最も毒性の強いTCDDを1nMで作用させることで形質転換を誘導した。形質転換したAhRはわれわれが構築したサウスウエスタン-ELISA (SW-ELISA) 法で定量した[18]。

まず、缶、瓶、ペットボトル、あるいは紙パック形態で市販されている15種類の飲料を用いて、2%あるいは5%で細胞質に処理し、TCDDによる形質転換に対する抑制効果を調べた[19]。市販のココア飲料は、いずれの濃度でも形質転換を完全に抑制し、他の飲料と比較すると強い効果を示すことがわかった (図3A)。しかし、市販のココア飲料はミルク成分を含んでおりそれがSW-ELISA法を妨害する可能性があったので、従来法であるゲルシフト法でも効果を調べたところ、この方法でもココア飲料の有効性が確認できた (図3B)。ココア抽出物を用いて同様にSW-ELISA法でその抑制効果を検討したところ、ココア抽出物は50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で濃度依存的に抑制効果を示し、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で完全にAhRの形質転換を抑制した (図4)。また、ココア抽出物の50%阻害濃度 (IC₅₀値) は約100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これらの実験結果から、ココアはAhRの形質転換を抑制する成分が含まれていることが明らかとなった。

そこで、ココアに含まれるポリフェノール化合物[20]に注目して、それらの効果を調べた。カカオポリフェノールの粗分画物として、単量体画分、二量体画分、三量体画分、および四量体画分をそれぞれ50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で評価したところ、すべての画分で有意な形質転換抑制効果が認められた (表1)。抑制率は、単量体画分で15%、二量体画分と三量体画分で35%、四量体画分で55%であり、重合度が高くなるほど抑制効果が強くなることがわかった。次に、それぞれの画分に含まれる代表的

図3 TCDDが誘導するAhR形質転換に対する市販飲料の抑制効果

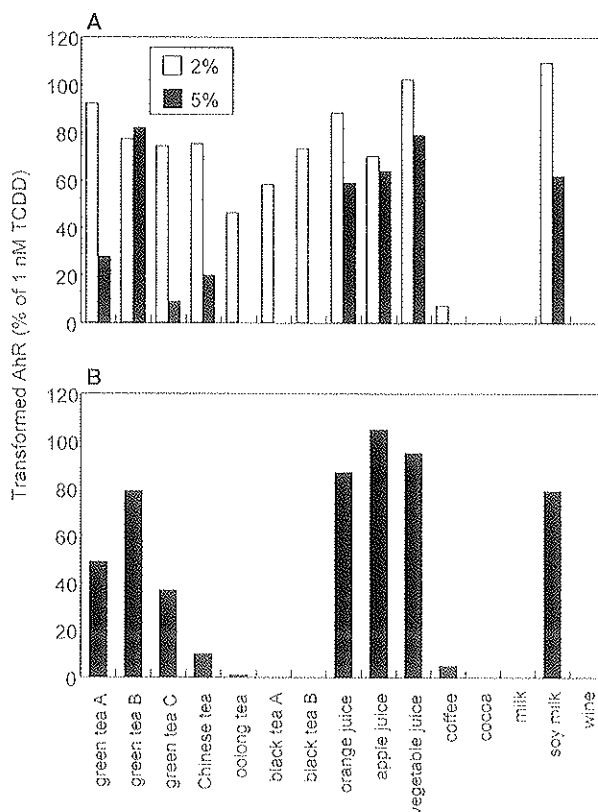
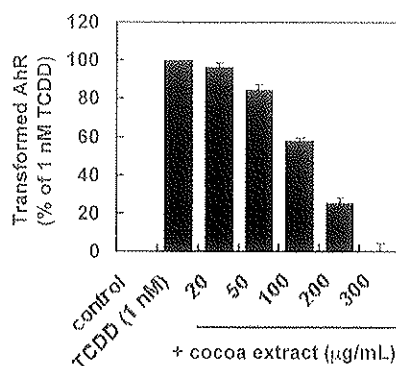


図4 TCDDが誘導するAhR形質転換に対するココア抽出物の抑制効果



な化合物について抑制効果を調べた (表2)。評価した化合物は、単量体として (-)-カテキン、(+)-エピカテキン、ならびにこれらのメチル化体、二量体としてプロシアニジンB2とB5、三量体としてプロシアニジンC1、四量体としてシナムタンニンA2である (図5)。その結果、単量体 (-)-カテキンは有意な抑制を示したがその効果は弱く、(+)-エピカテキンは抑制効果を示さなかった。二量体のプロシアニジンB2とB5は、それぞれ有意に15%と30%の抑制を示した。一方、三量体のプロシアニジンC1は抑制効果がなかったが、四量体のシナムタンニンA2は有意に25%抑制した。これらのことから、カカオ由来のプロシアニジンは単量体であるカテキンよりも効果が強いことが判った。紅茶に含まれるテアフラビンもカテキンより抑制効果が強いことがわかっている [9, 10]。カテキン単量体と比べて重合物の抑制効果が強くなる理由は不明であるが、プロシアニジンやテアフラビンの構造の一部がAhRのリガンド結合部位に相互作用しやすいのかもしれない。

カテキンの体内への吸収やその代謝に関しては未だ不明な点が多いが、カカオに含まれる単量体の (-)-カテキンや (+)-エピカテキンは、プロシアニジンのような重合物と比べると体内に取り込まれやすく、取り込まれたカテキンは小腸や肝臓で容易に抱合化やメチル化を受けて尿中に排出される。例えば、ヒトに一日あたりココア26gを2回、12週間摂取させた場合、血漿のHDLコレステロールを上昇させ酸化LDL量を減少させるが、このとき、カテキンは摂取量の約10%が尿中に排泄されるという報告がある [21]。カテキンの抱合体の効果については不明であるが、メチル化カテ

表1 TCDDが誘導するAhR形質転換に対するプロシアニジン混合物の抑制効果

Compound	AhR transformation (% of 1 nM TCDD)
Control	0
TCDD (1 nM)	100
+ Monomer	80.9 ± 1.6 *
+ Dimer	65.8 ± 3.6 *
+ Trimer	80.9 ± 1.6 *
+ Tetramer	65.8 ± 3.6 *

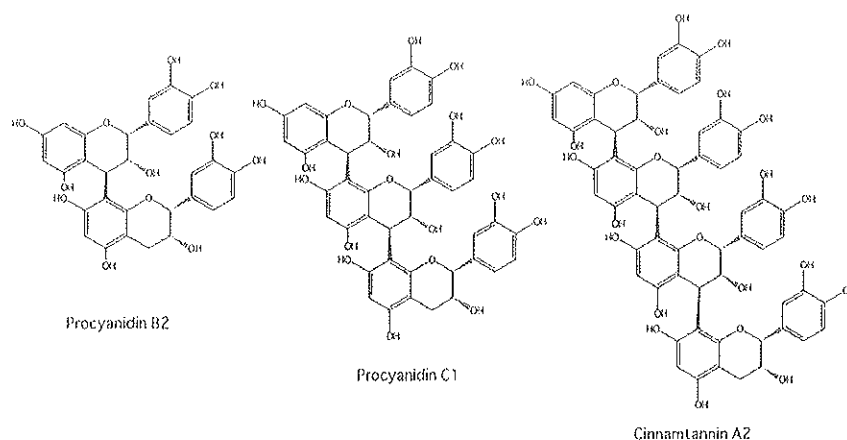
値は平均値 ± 標準偏差 (n=3)。
*, TCDDの値に対して有意差あり (p<0.05)。

表2 TCDDが誘導するAhR形質転換に対するカテキンとプロシアニジンの抑制効果

Compound	AhR transformation (% of 1 nM TCDD)
Control	0
TCDD (1 nM)	100
+ (+)-Catechin	91.9 ± 3.8 *
+ (+)-Epicatechin	98.1 ± 3.2
+ 3'-O-Methyl-catechin	76.7 ± 3.8 *
+ 3'-O-Methyl-epicatechin	66.6 ± 7.2 *
+ Procyanidin B2	85.8 ± 1.3 *
+ Procyanidin B5	68.0 ± 7.4 *
+ Procyanidin C1	96.4 ± 5.0
+ Cinnamtannin A2	73.5 ± 0.6 *

値は平均値 ± 標準偏差 (n=3)。
*, TCDDの値に対して有意差あり (p<0.05)。

図5 ココア抽出物に含まれるプロシアニジン



キンとメチル化エピカテキンはそれぞれ25%と35%の有意な抑制を示した(表2)。これらの抑制効果は、それぞれ元の(-)-カテキンと(+)-エピカテキンと比べて明らかに強くなっている。一方、プロシアニジンの体内吸収や代謝は、研究例が少ないためにカテキン以上に不明な点が多くあるが、少なくとも二量体は一部が吸収されると考えられている。われわれも紅茶を摂取させたラットの血漿と肝臓からカテキンの二量体であるテアフラビンを検出している[未発表]。また、紅茶は動物実験で緑茶と同様にAhRのアゴニストであるメチルコランズレンが誘導する形質転換を抑制したことから[12]、カテキン重合物が消化管内で分解したり、わずかに体内に取り込まれて代謝されたりした物質が有効性を発揮する可能性がある。カテキンやプロシアニジンが代謝分解されて生じると考えられているフェノールカルボン酸類には、有意な抑制効果を示す化合物が多く見出された(表3)。特に、フェルラ酸、カフェイン酸、クマル酸などは、プロシアニジンと同程度の抑制効果を示した。したがって、カカオポリフェノールは動物実験で有効性を発揮する可能性が強く示唆された。

表3 TCDDが誘導するAhR形質転換に対するフェノールカルボン酸類の抑制効果

Compound	AhR transformation (% of 1 nM TCDD)
Control	0
TCDD (1 nM)	100
+Hippuric acid	92.2 ± 5.4
+Ferulic acid	82.3 ± 1.3 *
+Caffeic acid	78.7 ± 4.3 *
+ <i>m</i> -Coumaric acid	74.8 ± 2.3 *
+ <i>p</i> -Coumaric acid	86.5 ± 6.2 *
+ <i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	95.2 ± 10.5
+3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	97.7 ± 14.1
+ <i>m</i> -Hydroxyphenylacetic acid	86.4 ± 3.6 *
+ <i>m</i> -Hydroxyphenylpropionic acid	83.0 ± 2.6 *
+ <i>p</i> -Hydroxyhippuric acid	90.0 ± 2.1 *

値は平均値±標準偏差(n=3)。

*, TCDDの値に対して有意差あり(p<0.05)。

おわりに

本研究で認められたカカオポリフェノールのAhR形質転換抑制効果は、フラボノイドであるガラジンやケンフェロールなどと比べると決して強いものではない[7, 8]。しかし、実験に用いたTCDD濃度は測定対象化合物や組成物の抑制効果を再現性良く測定するために、1nMと生体内濃度と比べてはるかに高濃度を用いた。フラボノイドではTCDD濃度を低くするとIC₅₀値も小さくなることを検証していることから[7, 9]、生理的に近いより低濃度のTCDDに対してはカカオポリフェノールも低濃度で有効性を発揮することが推測できる。以上のことから、ココアはダイオキシン毒性の抑制に有効な食品素材であると考えられる。今後より有効性を明確にするために、動物実験で有効性を検証することが望まれる。

環境中に放出されるダイオキシン量は年々減少しており[1]、ヒトに毒性を発現するほどのダイオキシン汚染が現在の社会で起こることはまずないであろう。しかし、過去にもあったような万が一の不測の事態が生じる可能性は皆無ではない。これまでの研究成果から、ココアをはじめとする植物性食品にはAhRの形質転換を抑制する成分が多く含まれていることが明らかになりつつある。有効な低分子成分の体内で容易に代謝されるものが多く、その半減期は短い、日常的に摂取していればある程度の体内濃度を保つことができると考えられる。これらのことから、「食品がダイオキシン類に汚染されていたとしてもAhRの形質転換を阻害する成分を多く含む食品を日常摂取していれば、汚染量に相当する毒性を発現しない可能性がある」ということを提言したい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、貴重なカカオポリフェノール標品をご提供いただきました明治製菓

株式会社食料健康総合研究所の夏目みどり氏と越阪部奈緒美氏に深謝いたします。

参考文献

- [1] 環境省編, 平成17年版「環境白書」, (働きようせい, pp280 (2005).
- [2] 芦田均, ダイオキシンの毒性発現メカニズム。食品衛生学会誌, 41(5), J311-J315 (2000).
- [3] 芦田均, 金沢和樹, 内分泌攪乱物質と生体応答, 「農芸化学の事典」鈴木昭憲・荒井綜一編, 朝倉書店, p. 367-370 (2003).
- [4] Hankinson, O, The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35, 307-340 (1995).
- [5] Hyunsung, H. L., Okino, S. T., Qiang M., and James, P. W. Jr. Dioxin-induced CYP1A1 transcription in vivo: the aromatic hydrocarbon receptor mediates transactivation, enhancer-promoter communication, and changes in chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 430-436 (1996)
- [6] 福田伊津子, 芦田均. カテキンのダイオキシン毒性予防作用. 生物工学会誌, 82, 477-480 (2004).
- [7] Ashida, H., Fukuda, I., Yamashita, T., and Kanazawa, K. Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Lett.*, 476, 213-217 (2000).
- [8] Ashida, H. Suppressive effects of flavonoids on dioxin toxicity. *Biofactors*, 12, 201-206 (2000).
- [9] Fukuda I, Sakane I, Yabushita Y, Kodoi R, Nishiumi S, Kakuda T, Sawamura S, Kanazawa K, and Ashida H. Pigments in green tea leaves (*Camellia sinensis*) suppress transformation of the aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2499-2506 (2004).
- [10] Fukuda I, Sakane I, Yabushita Y, Sawamura S, Kanazawa K, and Ashida H. Black tea theaflavins suppress dioxin-induced transformation of the aryl hydrocarbon receptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69 883-890 (2005).
- [11] Williams, S. N., Shih, H., Guenette, D. K., Brackney, W., Denison, M. S., Pickwell, G. V., and Quattrochi, L. C., Comparative studies on the effects of green tea extracts and individual tea catechins on human CYP1A gene expression. *Chem-Biol. Interact.*, 128, 211-229 (2000).
- [12] 福田伊津子, 西海儒, 坂根巖, 藪下善行, 沢村信一, 金沢和樹, 吉田健一, 芦田均. 茶の飲用はアリール炭化水素受容体の形質転換を抑制する。日本農芸化学会2005年度大会講演要旨集, 272, (2005).
- [13] Ciolino H.P., and Yeh G.C., Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol. *Mol. Pharmacol.*, 56, 760-767 (1999).
- [14] Ciolino H.P., Daschner P.J., Wang T.T.Y., and Yeh G.C. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, 56, 197-206 (1998).
- [15] Nishiumi S, Yabushita Y, Fukuda I, Mukai R, Yoshida K, and Ashida H. Molokhia (*Corchorus olitorius* L.) extract suppress transformation of the aryl hydrocarbon receptor induced by dioxins. *Food Chem. Toxicol.*, in press (2006).

- [16] Park Y.K., Fukuda I., Ashida H., Nishiumi S., P-Guzman J., Sato H.H., and Pastore G.M. Suppression of dioxin mediated aryl hydrocarbon receptor transformation by ethanolic extracts of propolis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 935-938 (2004).
- [17] Park Y.K., Fukuda I., Ashida H., Nishiumi S., Yoshida K., Dausch A., Sato H.H., and Pastore G.M. Suppressive effects of ethanolic extracts from propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. *J. Agric. Food Chem.*, in press (2006).
- [18] Fukuda I., Nishiumi S., Yabushita Y., Mukai R., Kodoi R., Hashizume K., Mizuno M., Hatanaka Y., and Ashida H. A new southwestern chemistry-based ELISA for detection of aryl hydrocarbon receptor transformation: application to the screening of its receptor agonists and antagonists. *J. Immunol. Methods*, 287, 187-201 (2004).
- [19] Yabushita Y., Fukuda I., Nishiumi S., and Ashida H. Suppressing effects of commercial beverages on TCDD-induced aryl hydrocarbon receptor transformation. *ITE Letters on Batteries, New Technologies & Medicine* 6(4)372-377 (2005).
- [20] Natsume M., Osakabe N., Yamagishi M., Takizawa T., Nakamura T., Miyatake H., Hatano T., and Yoshida T. Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 2581-2587 (2000).
- [21] 馬場星吾, 越阪部奈緒美, 加藤陽二, 夏目みどり, 安田亜紀子, 貴堂としみ, 近藤和雄。正常域及び軽度の高脂血症者を対象としたココアの長期摂取が血漿酸化LDLならびに血漿脂質レベルに及ぼす影響。過酸化脂質研究, 29, 63 (2005).