

フラボノイド—それは抗酸化物質あるいはそれ以上のもの？

バリー・ハリウエル (シンガポール国立大学大学院総合化学工学科)

1. はじめに

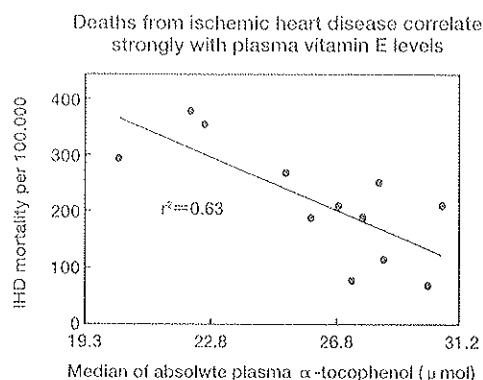
オキシダントおよびフリーラジカルは非常に多くの関心が寄せられている研究分野であるが、いくつかの矛盾した結果が得られている。ここではそれはなぜなのか、またこの分野で実際にどのような研究が行われてきたのか、また現に行われているのかについて述べたい。

まずはじめにヒトは体内でどのように酸素を利用しているかを説明すると、酸素は体内では主としてエネルギー産生に使われ、ミトコンドリア内でその85%が、残りは酵素オキシダーゼによって消費され、また少量ではあるが酸素の1~5%は活性酸素ROSの産生に用いられる。なぜ体内で酸素が消費され、ROS (O₂や活性酸素) が産生されるかについては2つの理由がある。まず第1は偶然の産物だということである。すなわち体内にはいろいろな分子が存在し、それらが酸素と反応することでROSが産生されるというものである。第2は体内の意図的な産生によるもの—すなわち体内の防御機能や細胞間の信号伝達に必要なだからである。仮に酸素消費量の1%がROS産生に使われたとすれば、1日に150mmol、1年では2kg近頃のROSが産生されることになる。これだけ多くのフリーラジカルが産生されるため、体内には抗酸化物質が存在し、バランスを保っている。抗酸化物質には多くの種類があり、ほとんどのフリーラジカルを除去するが、すべてを除去するわけではない。というのもフリーラジカルはヒトにとって有益なものもあるからである。またこれら体内の抗酸化物質だけでは不十分なため、体外から食事によって摂取される抗酸化物質—たとえばビタミンEやC、フラボノイドが必要になるわけである。10年ほど前まではフリーラジカルは悪玉であり、抗酸化物質を多く摂取すればさまざまな病気を防ぐことができると考えられていた。しかし実際にはいくつかの矛盾する結果が得られてきたのだが、それはなぜなのか。

2. これまでの研究

これまでに数多くの疫学調査が行われた。まず第1には抗酸化物質の摂取量とその血中濃度を調べ、疾病の発症率との間の相関関係をみるというものである。たとえばFig.1にみられる多国間の試験では、ビタミンEの血中濃度が高いほど心血管系死亡率が低くなる負の相関が得られている。またビタミンCやEおよびβ-カロテンの血中濃度が高いヒトほど心血管系の疾病リスクが低いことも分かっている。ただしこれらの結果には注意が必要である。すなわち食事内容によってビタミンCやE、β-カロテンの血漿濃度には大きな差があり、

Fig.1 Epidemiological Evidence



ある種類の栄養素だけを調べても、結果は食事内容によって異なるとの認識を持つ必要がある。たとえばフラボノイドを多く含む食品としてチョコレートやワイン、あるいは果物を摂取した場合を考えてみても、これらはいろいろな化合物の集合体であって、ある特定の栄養素だけを摂取しているわけではない。通常の食事ではさまざまな栄養素が低濃度で複合的に摂取されているわけで、疫学調査ではこうした食事のもつ意味と影響を考えなくてはならない。

他の有力な方法としては介入試験がある。たとえばβ-カロテンの摂取が肺がん発症率に及ぼす影響を調べるため、喫煙者に高濃度のβ-カロテンを投与したところ、かえって肺がんの発症リスクが高くなる結果が得られた。このような介入試験は他の栄養素についても行われており、たとえば高濃度のビタミンE投与が心臓病のリスクを軽減させる可能性があるかをみた試験では、一例を除いて結果は全て否定的で、むしろ高濃度のビタミンE摂取は心臓病発症リスクを高めるというものであった。

このように食事由来の栄養成分の摂取による結果は、一種類のみまたは特定栄養成分の結果とは置き換えられない。

3. 最近の研究から

最近の試験結果をみてみよう。たとえばASAP試験という520名の高コレステロール血症男女を対象とした6年間の追跡試験では、ビタミンEと徐放性ビタミンCを併用した時に、動脈硬化の進行にどのような影響を及ぼすかをみたものであるが、結果は男性のみにその進行を遅らせる効果がみられ、女性にはみられなかった。また心臓移植後の患者でも同様の結果が得られている。さらにフランスで行われた大規模試験は現在10年間にわたって被験者のデータを追跡中であるが、低容量のサプリメント（ビタミンC120mg、ビタミンE30mg、β-カロテン6mgにセレン100μg、亜鉛20mgを含む）を投与したところ、死亡率は37%、がん発症率は31%低下したが、この結果は男性のみにみられ、女性には有意な差は認められなかった。その理由については、先進国ではもともと女性のほうが男性よりも寿命が長く、食事内容もよいのでそれ以上の大きな変化がみられないためではないかということと、女性のほうがミトコンドリア内のフリーラジカルが少ないためかもしれない。

こうした介入試験についてもいくつか注意すべき点がある。第1は男女の挙動が異なるために結果に差が生じることがありうるからである。第2はサプリメントの投与量である。高容量では予期していたのかえって逆の結果が得られることから、サプリメントについても最適量があるのではないかというものである。初期の介入試験では単一の抗酸化物質が用いられることが多かったが、現在では抗酸化物質も多くの種類が知られるようになり、それとともに複数のものが試験に用いられるようになった。たとえば以前はβ-カロテンのみを用いていた場合でも、現在は他のカロテノイドを用いたり、フラボノイドでも類縁のポリフェノールの効果も考慮する必要があるという具合である。ひとつの物質を高容量で用いるのではなく、多くの成分を低容量で含有するサプリメントを用いる介入試験のほうが正しい結果が得られることが多い。

自然界には多数のフラボノイドが存在し、それらは極めて強力な抗酸化物質として種々の作用を持つことが知られている。すなわちスカベンジャーとしての機能、金属のキレート効果などである。フラボノイドがフリーラジカルによる障害をいかにして防ぐかについて述べる。ヒト尿中に存在する過酸化水素をマーカーとして緑茶を飲んだ時の量を調べたところ、尿中の過酸化水素量は有意に低下し、緑茶が抗酸化作用を持っていることが確かめられた。チョコレートに関するデータをわれ

われはまだ持っていないが、ぜひボランティア試験を行ってみたい。

このように疫学的調査からさまざまな食品の摂取とそれらが健康に与える影響や、また介入試験によってどんな成分をどれくらい摂取することが望ましいかも分かってきている。

抗酸化物質の効果を調べるために培養細胞を用いた種々の試験が行われているが、ここにも矛盾する結果が含まれている。理由のひとつは培養細胞は通常の生体内における細胞とは異なる異常な環境におかれていることによる。もうひとつの理由はここで用いられている培地は通常ビタミンCやE、カロテン、フラボノイド、セレンなどの抗酸化物質をあまり含んでいないからと考えられる。

一例を紹介しよう。ビタミンC投与は培養細胞内で培養されているがん細胞に対して効果があるとされてきた。たとえばHL-60はヒト白血病のがん細胞であるが、ビタミンCを投与するとアポトーシス（細胞の自殺）がみられる。Fig.2は2つの異なる培地（RPM培地およびDME培地）で培養した白血病細胞に対するビタミンCの効果を見たものだが、DME培地ではビタミンCによって誘導されるアポトーシスが顕著なのに対し、RPM培地ではビタミンCはがん細胞にそれほど大きなダメージを与えていない。もしビタミンCそれ自体ががん細胞に対して効果があれば、いかなる培地を用いても結果に差はないはずだから、ビタミンCそのものの効果に疑問があることにな

る。この違いはおそらくは人為的なものであろう。つまりDME培地にビタミンCを投与すると化学反応を起こし H_2O_2 を産生し、それががん細胞にダメージを与えるのであって、この効果はビタミンCそのものではなく H_2O_2 にあり、RPM培地ではその産生が少ないのである。このように培地の違いによって結果が異なり、矛盾したようにみえるのである。同様な結果はフラボノイドにもみられる。ケルセチンの濃度を変えてその抗酸化効果をみたところ、培地によって異なる結果が得られた。このように培養細胞で試験を行う場合には培地の差を考慮する必要がある。また培養細胞で得られた結果は*in vivo*とは異なる結果が得られることがよくあり、培地あるいは細胞培地特有の結果を示すことがあるのを頭に入れておく必要がある。DME培地の問題点は、鉄が添加されているためフリーラジカルの非常に強力な触媒になることである。

フラボノイドは抗酸化作用だけでなく、 COX_1 や COX_2 といったがんに関与する酵素や動脈硬化に関与するLOXに対する抑制効果も知られている。またフラボノイドは体内で消費されると急速に代謝されるため、血中濃度は非常に低くなる。このような低濃度では抗酸化効果はないと考えられるかもしれないが、先の緑茶の例のようにフラボノイドが体内で消費されれば H_2O_2 の生成を抑制することが*in vivo*で確認されている。もうひとつフラボノイドを豊富に含む食品を摂取する時に考えなくてはならないのは、たとえ血漿濃度は低くても腸管など消化管での濃度は高いことである。なお消化管といっても胃と大腸とでは大きな差があることも考慮する必要がある。胃がんや直腸がん、結腸がんはいずれも重大な問題であるが、それらは異なる消化管に発生する異なった種類のがんである。

多くの食物には硝酸塩が含まれているが、これを多量に摂取するとDNAの損傷が起こり、いっ

Fig.2 CELL KILLING BY ASCORBATE IN HL-60 CELLS : PROPIDIUM IODIDE

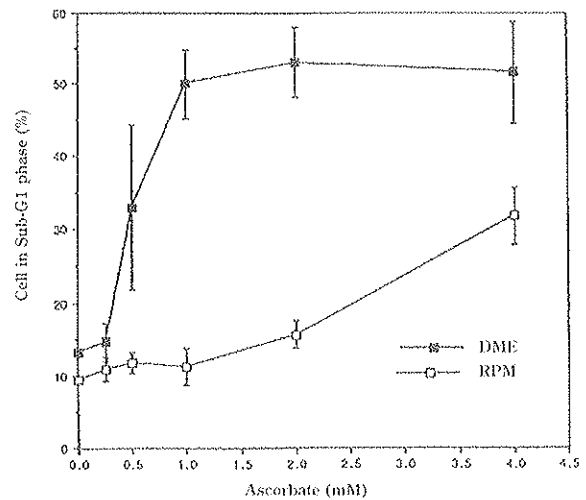


Fig.3 EFFECT OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE ON THE DEAMINATION OF DNA BASES BY NaNO₂ (500 μ M)

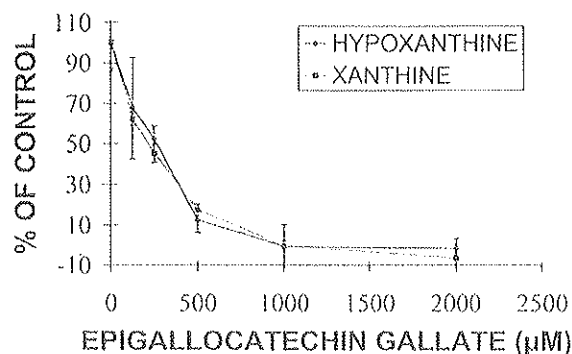


Table1 Phenolic Concentration in Faecal Water (μ M) n=15 individuals

Individual faecal samples were collected from volunteers over 24h period. Volunteers maintained their own usual diets.

Phenolic Component	Mean Concentration (μ M)
Quercetin	0.74
Naringenin	0.61
Isorhamnetin	0.51
Formononetin	0.36
Hesperetin	0.23
Daidzein	0.10
Epicatechin	0.09
Phenyl acetic acid	409.6
3-Phenylpropionic acid	287.1
3, 4-diOH cinnamic acid (caffeic acid)	136.1
3-OH phenyl acetic acid	56.7

ほうフラボノイドはそれを阻害することが知られている。肉を多量に摂取すると、含まれている鉄が吸収されずに大腸に移行し、結腸がんの発症につながる事が示唆されている。ここで大腸内にフェノール類やフラボノイドが存在すると、鉄と結合して硝酸塩による細胞阻害を抑制する。胃の中が低pH状態の時に硝酸塩が入ってくるとDNAの損傷が起こるが、カテキンが200 μ mol存在すればこの過程は抑制される。さらに高濃度のフラボノイドを含有する食品を摂取すれば1000 μ mol程度の摂取は容易であり、これによってDNAの損傷は十分に予防できるわけである。

もうひとつエピガロカテキンガレートを用いたDNA損傷抑制試験では500 μ molの濃度でROSによる胃の中のDNAの損傷を抑える (Fig.3)。これはフラボノイドやフェノール化合物が胃を通過するとさらに小腸から大腸、結腸に至る過程で多くは吸収されるが、吸収されずに大腸まで到達したフラボノイドが有益な結果をもたらすからである。Table 1はさまざまなフェノール化合物の結腸における濃度をみたものであるが、被験者の糞中に含まれるフラボノイドはCOXまたはフリーラジカルの抑制に十分な量である。さらに多くのフラボノイドを摂取すれば大腸内の濃度はさらに高くなる。またフラボノイドは代謝速度が速いので、腸内細菌による代謝産物も有益な効果をもたらすことになる。

4. 研究のこれから

このようなフラボノイドが他の多くの食品や漢方薬にも含まれているかを調べたので最後に紹介したい。まず *in vitro* の結果であるが、Table 2に示したのは、ビタミンCやEの抗酸化能を1とした時の比較値を表している。赤ワインが非常に高い抗酸化能を示しているが、ここで注目したいのは濃い口しょうゆ (シンガポールで入手したもので日本のものとは異なる) である。この結果をもとに現在 *in vitro* での2つの試験を行っているが、このような大きな効果をもたらす成分はメラノイジンおよびフラボノイドである。このフラボノイドの構造については解析できたので、まもなく公表の予定である。また伝統的な漢方薬にも強い抗酸化能を示すものがあるが、これについては別の機会に触れたい。

Table2 Trolox Equivalent Antioxidant Capacities

Seasoning type	TEAC (mM) (mean ± SD, n=3)
HP sauce	9.80 ± 0.53
Red wines	12 - 24
White wines	≤ 5
Tomato sauce	3.23 ± 0.06
Kung Bo sauce	9.17 ± 0.91
Black vinegar	10.37 ± 1.00
Chinese cooking wine	6.17 ± 0.35
Chinese rice wine	0.36 ± 0.13
Chilli sauce	11.10 ± 1.51
Dark soy sauce (Tiger brand)	147.33 ± 9.45
Dark soy sauce (Tai Hua brand)	127.33 ± 4.93
Dark soy sauce (Woh Hup brand)	47.1 ± 1.93
Sweet dark soy sauce (Zara)	28.73 ± 2.54
Sweet soy sauce	35.43 ± 1.60
Oyster sauce	5.58 ± 2.75
Plum sauce	3.53 ± 1.27
Hoisin sauce	13.6 ± 2.16