

カカオリグニン成分の生理活性評価に関する研究

坂上 宏 (明海大学歯学部病態診断治療学講座薬理学分野教授)

1. 研究目的

チョコレートの主原料であるカカオ豆については、抗酸化作用¹⁾、抗動脈硬化作用²⁾、抗菌作用³⁾、抗ウイルス作用⁴⁾などの生物活性や、カテキン、エピカテキンやその重合体であるプロシアジニンB₂、プロシアジニンC₁、シンナムタンニンA₂⁵⁾、あるいは食物繊維としてのリグニン⁶⁾などの成分分析が報告されている。リグニン配糖体は、高い抗ウイルス活性、ビタミンCとの相乗作用など、ユニークな生理作用を示すことが明らかになりつつある。しかしながら、カカオ由来のリグニンの生理機能についてはほとんど知られていない。本研究ではカカオ成分の新規機能性の解明を目的として、カカオハスク（カカオの豆の殻）およびカカオマス（カカオハスクと胚芽を除きペースト状にしたもの）のリグニン配糖体の抗HIV活性、抗インフルエンザウイルス活性、抗菌活性、ラジカル消去活性、マクロファージ活性化能について検討した。

2. 材料と方法

リグニン配糖体画分の調製

カカオハスク①～③、⑦～⑨、⑬～⑮あるいはカカオマス④～⑥、⑩～⑫、⑯～⑲に1% NaOHを添加し、2時間室温で抽出した。酢酸を添加して、pH5.0でリグニン配糖体画分①⑦⑬；④⑩⑯を沈殿させた。遠心上清にエタノール（終濃度50%）を添加し多糖画分②⑧⑭；⑤⑪⑰を沈殿させた。遠心上清にエタノール（終濃度83%）を添加し、低分子画分③⑨⑮；⑥⑫⑲を沈殿させた。これらを水に対して透析後、凍結乾燥した（図1）。

抗HIV活性

ヒトT-細胞白血病細胞MT-4を、HIV-1_{umb}で感染させ細胞を死滅させた（m.o.i.）= 0.01）。HIV-感染、非感染MT-4細胞を5日間、種々の濃度の試料とともに培養し、相対的生細胞数を、MTT法で測定した。非感染細胞、感染細胞から、それぞれ、CC₅₀と、50%の細胞を生存させる濃度（EC₅₀）を測定した。抗HIV活性は、選択係数SI（SI=CC₅₀/EC₅₀）により数値化した。

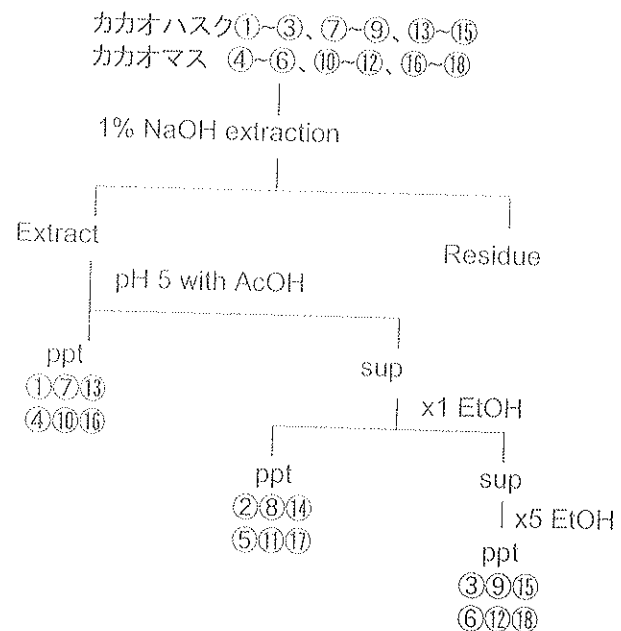


図1. カカオリグニン配糖体の調製法

抗インフルエンザウイルス活性

MDCK細胞に、InfA/H1N1を感染させた。非感染細胞、感染細胞から、それぞれ、CC₅₀と、EC₅₀を測定した。抗インフルエンザウイルス活性は、選択係数SI (SI=CC₅₀/EC₅₀)により数値化した。

抗菌活性

*Streptococcus mutans*はBacto™ Todd Hewitt Broth (BD社)中、37℃で嫌氣的に培養した。*Actinomyces viscosus*、*Fusobacterium nucleatum*と*Porphyromonas gingivalis*は、Brain Heart Infusion (Difco社) Broth (hemin 5mg/L, menadion 0.5mg/L含有)中、37℃で嫌氣的に培養した。それぞれの菌を、1mg/mLのサンプルを含む培地で2日間培養し、増殖度をもとに抗菌活性を測定した。

ラジカル消去活性

- (a) スーパーオキシドアニオンラジカル (O₂⁻) 消去活性：ヒポキサンチン (HX) —キサンチンオキシダーゼ (XOD) 反応によりO₂⁻を発生させ (HX + O₂ → Xanthine + O₂⁻)、電子スピン共鳴 (ESR) 装置にて測定した。反応液 (200 μL) [2mM HX (in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4) 50 μL; 1mM DTPA 10 μL; 8% DMPO 30 μL; サンプル (in DMSO) 40 μL; H₂O 40 μL; 0.5 U/ml XOD (in PB) 30 μL] は、試薬を順に試験管にとり、最後にXODを添加しボルテックスで攪拌後、扁平水溶液セルに移し反応開始 (XOD添加) 1分後に日本電子社製ESR装置 (JOEL JES-RE1X) を用いて測定した (center field; 335.5 ± 5.0mT, microwave power; 16mW, modulation amplitude; 0.1mT, gain; 5.0 × 100, time constant; 0.1sec., scanning time; 2min.)。
- (b) ヒドロキシルラジカル (HO·) 消去活性：HO·をフェントン反応により産生させ、ESRにより測定した (Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ + OH⁻ + HO·)。反応液 (200 μL) [0.5mM FeSO₄+0.1mM DTPA 50 μL; 1% DMPO 20 μL; サンプル (in H₂O) 50 μL; 0.1M PB 50 μL; 1mM H₂O₂ 30 μL] は、試薬を順に試験管にとり、最後にH₂O₂を添加しボルテックスで攪拌後、扁平水溶液セルに移し反応開始 (H₂O₂添加) 1分後に測定開始した。

マクロファージによるNO産生

マウスマクロファージ様細胞Raw 264.7に種々の濃度のサンプルを添加し、更に24時間培養した。培養液中の一酸化窒素 (NO) の量を、グリース法により求めた。

3. 実験結果

リグニン配糖体画分の収率

カカオハスクにおいては、リグニン配糖体画分を含む①⑦⑬の収率が最も高く (3.2 ± 1.1% (n=3))、次いで多糖画分②⑧⑭ (2.8 ± 0.2%)、そして酸性低分子画分③⑨⑮の収率が最低 (0.74 ± 0.15%) であった (表1)。カカオマスにおいては、リグニン配糖体を含む④⑩⑯の収率が最も高く (7.9 ± 3.4% (n=3))、次いで多糖画分⑤⑪⑰ (1.4 ± 0.6%)、そして酸性低分子画分⑥⑫⑱が最低 (0.73 ± 0.04%) であった。

表1. カカオハスクおよびカカオマス由来リグニン画分の抗HIV活性

	CC ₅₀ (μ g/mL)	EC ₅₀ (μ g/mL)	SI	収率 (%)
1. カカオハスク(酸沈殿)	342	3.7	92	2.1
2. カカオハスク(50%エタノール沈殿)	110	3.7	30	3
3. カカオハスク(83%エタノール沈殿)	361	299	1.2	0.75
4. カカオマス(酸沈殿)	107	22	4.9	4
5. カカオマス(50%エタノール沈殿)	>1000	542	1.8	0.85
6. カカオマス(83%エタノール沈殿)	494	115	4.3	0.77
7. カカオハスク(酸沈殿)	28	0.08	331	4.2
8. カカオハスク(50%エタノール沈殿)	>1000	0.01	>100000	2.8
9. カカオハスク(83%エタノール沈殿)	>1000	5.7	>175	0.58
10. カカオマス(酸沈殿)	618	12	50	9.9
11. カカオマス(50%エタノール沈殿)	535	104	5	1.3
12. カカオマス(83%エタノール沈殿)	>1000	24	>42	0.72
13. カカオハスク(酸沈殿)	21	0.04	511	3.4
14. カカオハスク(50%エタノール沈殿)	450	0.12	3800	2.7
15. カカオハスク(83%エタノール沈殿)	>1000	5.9	>168	0.88
16. カカオマス(酸沈殿)	776	9.3	83	9.8
17. カカオマス(50%エタノール沈殿)	376	97	3	2
18. カカオマス(83%エタノール沈殿)	395	61	6	0.7
ウーロン茶	25	>40	<1	
Dextran sulfate (μ g/mL)	361	0.077	4716	
Curdlan sulfate (μ g/mL)	625	0.032	20143	
AZT (μ M)	193	0.0053	36401	
ddC (μ M)	1340	0.3	4412	

抗HIV活性

カカオハスク由来のリグニン配糖体画分①⑦⑬の抗HIV活性 (SI=311 \pm 210 (n=3)) は、カカオマス由来のリグニン配糖体画分④⑩⑯ (SI=46 \pm 39) に比べて高い。カカオハスク由来多糖画分②⑧⑭の抗HIV活性は最大活性を示し (SI=30 \sim 100,000) (図2)、カカオマス由来多糖画分⑤⑪⑰ (SI=3.3 \pm 1.6) に比べ高い。カカオハスク由来の酸性低分子画分③⑨⑮の抗HIV活性 (SI=115 \pm 98) は、カカオマス由来の酸性低分子画分⑥⑫⑱ (SI=17 \pm 21) に比べて高かった。以上の結果は、カカオハスクの方が、カカオマスよりも抗HIV活性が高いことを示す。また、リグニン配糖体画分と多糖画分が高い抗HIV活性を示すことが明らかになった。

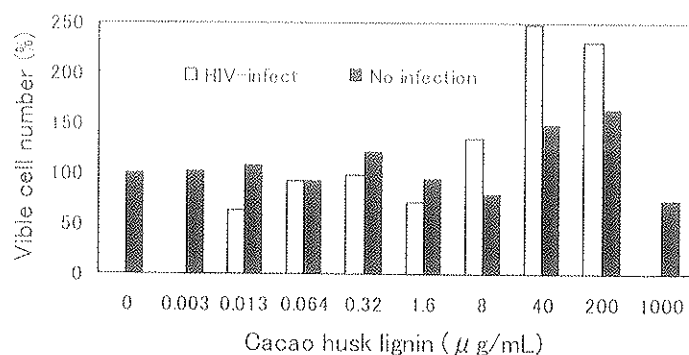


図2. カカオハスクリグニンの抗HIV活性

抗インフルエンザウイルス活性

カカオハスクリグニン配糖体画分は、インフルエンザウイルスによる細胞変性効果を抑制した (EC₅₀=0.009mg/mL; CC₅₀=1.447mg/mL, SI=155) (図3)。

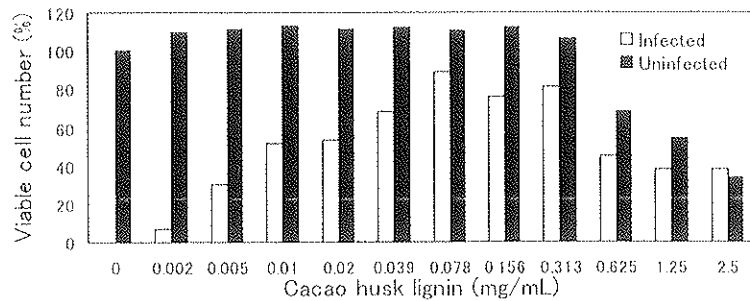


図3. カカオハスクリグニン配糖体画分の抗インフルエンザウイルス活性

抗菌活性

カカオハスクリグニン配糖体画分 (1mg/mL) は、口腔細菌の *Streptococcus mutans* (う蝕原性細菌) (グラム陽性通性嫌気性球菌)、*Actinomyces viscosus* (根面う蝕、歯周病関連細菌) (グラム陽性通性嫌気性桿菌)、*Fusobacterium nucleatum* (歯周病関連菌) (グラム陰性偏性嫌気性桿菌)、*Porphyromonas gingivalis* (歯周病関連菌) (グラム陰性偏性嫌気性桿菌) の直接的な抗菌効果はなかった (表2)。

表2. カカオハスクリグニン配糖体画分の抗菌活性

			培地	C*	⑦	⑧	⑩
グラム陽性菌	球菌	<i>Streptococcus mutans</i>	A	***	+	+	+
	桿菌	<i>Actinomyces viscosus</i>	B	+	+	+	+
グラム陰性菌	桿菌	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	B	+	+	+	+
		<i>Fusobacterium nucleatum</i>	B	+	+	+	+

*: コントロール **: サンプル 1 mg/ml で菌の成育が観察された (抗菌効果なし)

ラジカル産生

リグニン画分の方が、多糖画分よりも、ラジカル産生が強かった (表3)。

表3. カカオハスクリグニン配糖体画分のラジカル強度

	Radical intensity		
	pH 7.4	pH 11	pH 13.5
⑦ (Lignin)	0.34	0.38	0.76
⑧ (Polysaccharide)	0.31	0.31	0.54
⑩ (Lignin)	0.31	0.42	0.86
⑪ (Polysaccharide)	0.27	0.33	0.41

0.2 M buffer (pH 7.0, 11.0 or 13.5) : sample 4 mg/ml. (PB) (1:1) mixed 40 sec

スーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) の消去活性

スペクトルの両端のピークはマンガン (MnO) マーカー (外部基準) である。4本のシグナルは O_2^- とDMPOのスピンアダクトである。 MnO マーカーと一番目シグナルとのラジカル強度比を計測

した。カカオハスク、カカオマス共にリグニン配糖体①、④が最大の O_2^- 消去活性を示した (図4)。アスコルビン酸ナトリウム塩 (ビタミンC、VC) 2.5 μ M単独では、 O_2^- 消去活性がなかった。カカオハスクリグニン配糖体の O_2^- 消去活性は、VCと併用することにより相乗的に増強された (表4)。

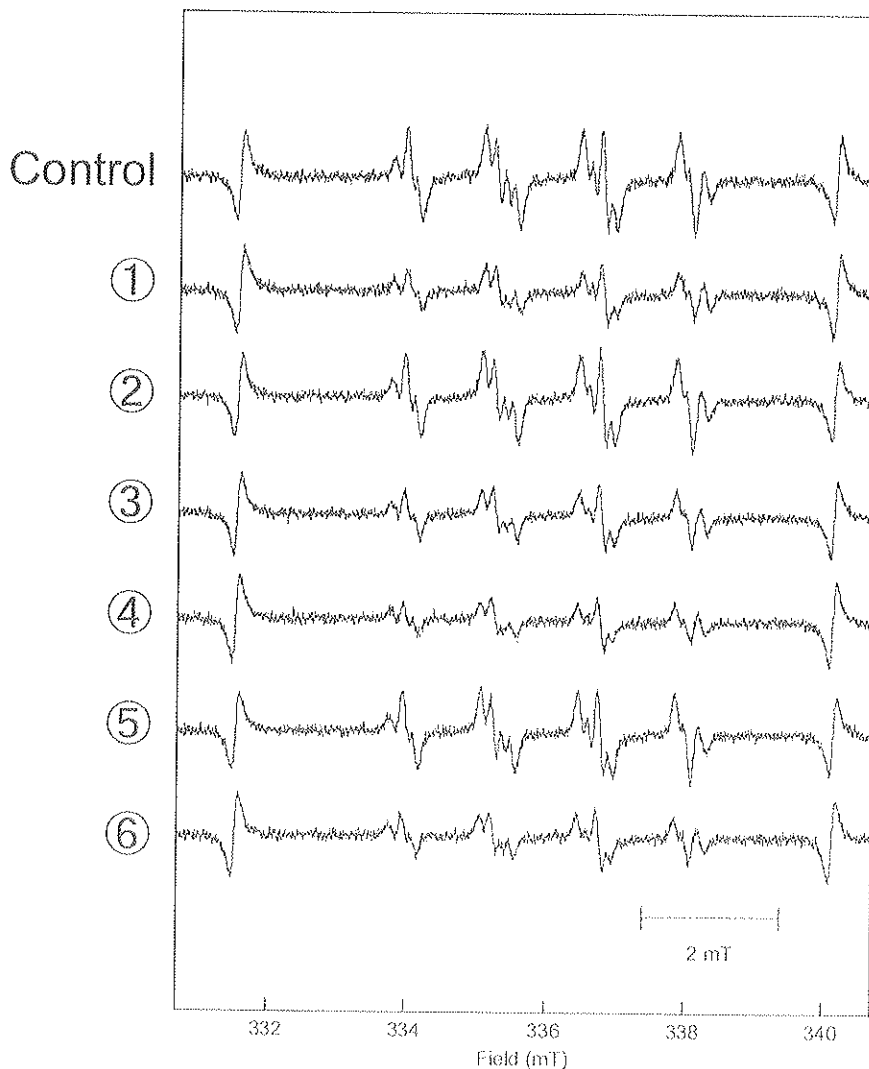


図4. スーパーオキシドラジカルの消去活性

表4. ビタミンCとカカオハスクリグニン画分および多糖画分の相乗的 O_2^- 消去活性

Fraction	DMPO-OOH radical intensity (% of control)		
	100 μ g/mL	50 μ g/mL + 1.25 μ M VC	
⑦	40.8	54.5 < 76.9 [(113+40.8)/2]	synergism
⑧	91.1	49.1 < 102 [(113+91.1)/2]	synergism
⑬	36.0	46.7 < 74.5 [(113+36.0)/2]	synergism
⑭	93.6	88.3 < 103 [(113+93.6)/2]	synergism
2.5 μ M VC	113		

ヒドロキシラジカル (HO・) の消去活性

スペクトルの両端のピークはMnOマーカー（外部基準）である。4本のシグナルはHO・とDMPOのスピンアダクトである。MnOマーカーと2番目シグナルとの強度比を計測する。コントロールのラジカル強度を100%とし、それぞれのサンプルと比較した。この結果を右図に示す。カカオハスクのリグニン画分 (①)、低分子画分 (③) において強いHO・消去活性があった。画分に関係なくカカオマスよりも、ややカカオハスクの方が全体的にHO・の消去活性は強かった (図5)。カカオハスクリグニン画分のHO・消去効果は、ビタミンCと併用することにより、相乗的に増強された (表5)。

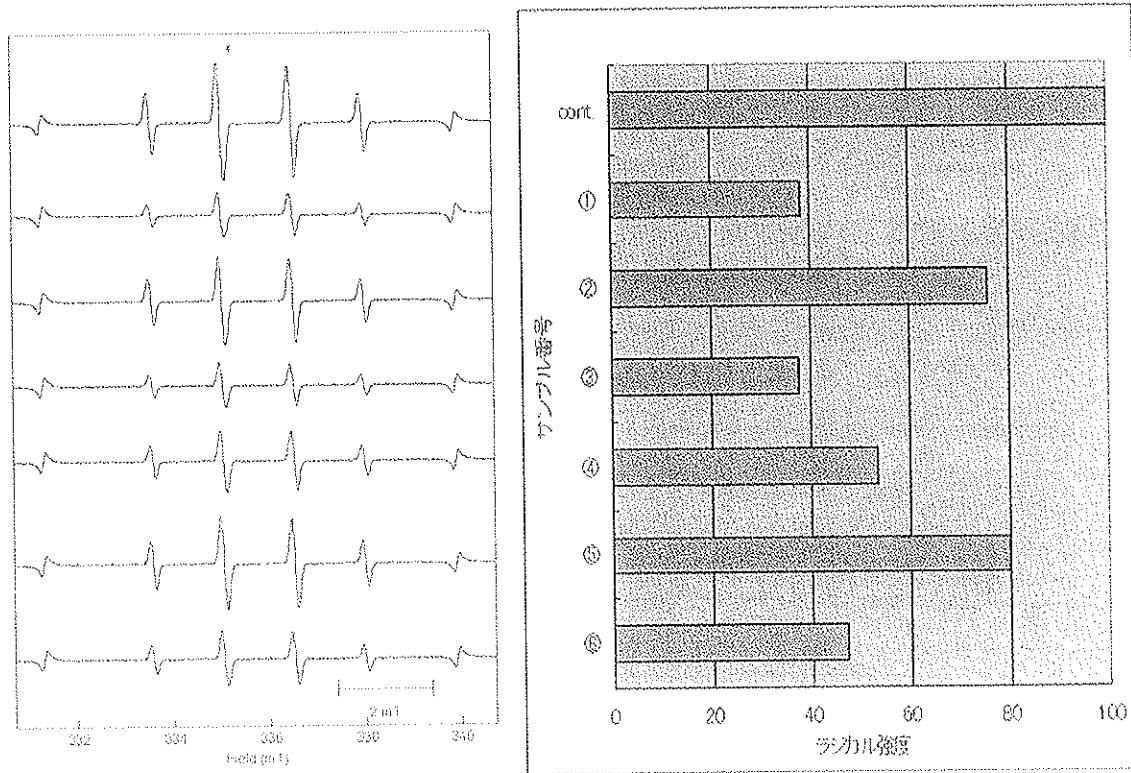


図5. ヒドロキシラジカルの消去活性

表5. ビタミンCとカカオハスクリグニン配糖体画分の相乗的HO・消去活性

Fraction	DMPO-OH radical intensity (% of control)		
	100 μ g/mL	50 μ g/mL + 1.25 μ M VC	
Fr. 7	72.4	39.2 < 53.0 [(33.6+72.4)/2]	synergism
Fr. 8	82.0	61.4 > 57.8 [(33.6+82.0)/2]	
Fr. 13	70.4	46.2 < 52.0 [(33.6+70.4)/2]	synergism
Fr. 14	91.4	49.1 < 62.5 [(33.6+91.4)/2]	synergism
50 μ M VC	33.6		

マクロファージ活性化能

リグニン配糖体画分 (3-50 $\mu\text{g/mL}$) は、マウスマクロファージ様細胞Raw264.7によるNO産生 (最大7 μM) を、多糖画分 (50-400 $\mu\text{g/mL}$) よりも強く誘導した。LPS (3-800 ng/mL) による最大NO産生量は、半分程度 (3 μM) であった (図6)。

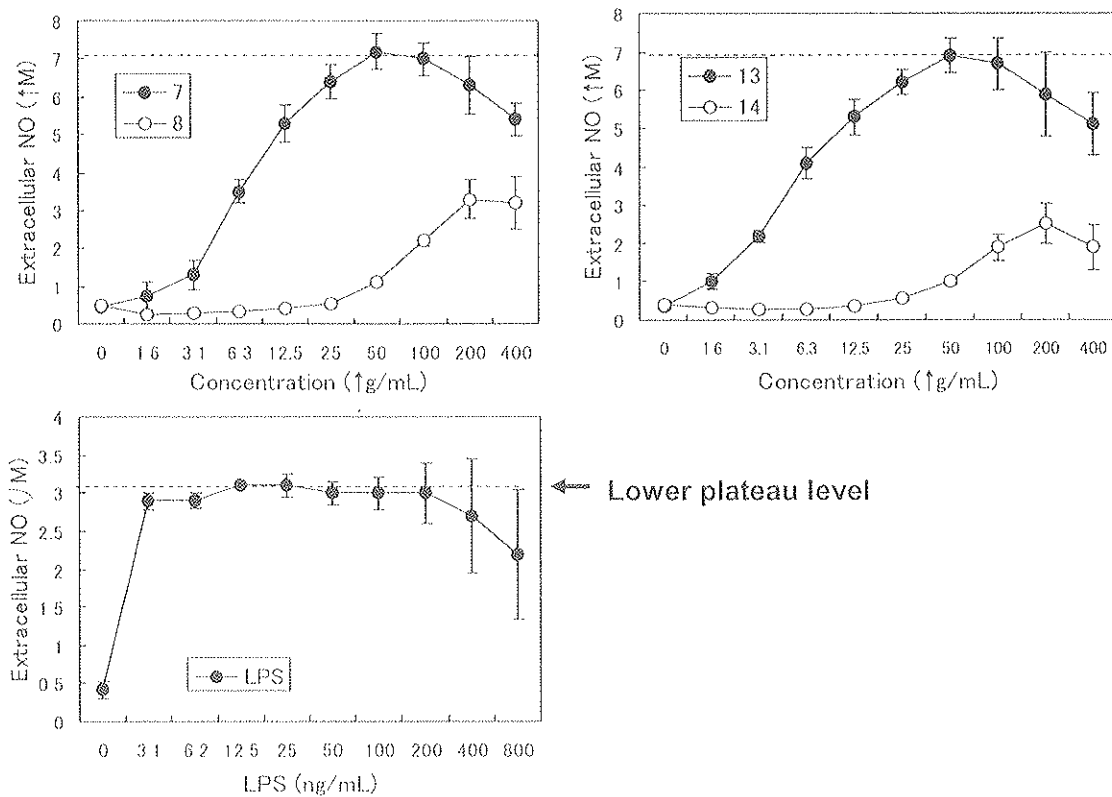


図6. カカオハスクリグニン配糖体画分とLPSによるRaw264.7細胞NO産生の促進

4. 考察

カカオハスクリグニン配糖体が強い抗HIV活性および O_2^- 消去を示すことが確認された。抗HIV活性物質抽出材料としてカカオハスクは注目に値する。カカオハスク由来のリグニン配糖体画分の抗HIV活性は、タンニン類 (SI=1-10)、フラボノイド類 (SI=1) に比べてはるかに強く、陽性対照で用いた硫酸多糖や核酸系逆転写酵素阻害剤のそれに匹敵できるからである。抗HIV活性が高い理由として、溶解性や分子量の大きさが関与しているものと思われる。更に、カカオハスクリグニン配糖体は高い抗インフルエンザウイルス活性を示すことがパイロット実験で確認された。硫酸化多糖や、他のポリフェノール類も同程度の抗インフルエンザウイルス活性を示すか否かが、今後の検討課題である。

カカオハスクリグニン配糖体はビタミンCと相乗的にラジカルを消去した。我々は、松かさ由来リグニン配糖体が、ビタミンCの癌細胞傷害活性を相乗的に促進することを報告した⁷⁾。リグニン配糖体はビタミンCの機能性を高めるため化粧品への応用が示唆される。リグニン配糖体が、タバコの煙による細胞傷害活性を抑制できるかも検討する予定である。

最後に、カカオハスクリグニン配糖体のマクロファージ活性化の機構については、LPSのシグナルを阻害する薬剤を用いて間接的に検討する予定である。

参考文献

- 1) Motohashi N, Kawase M, Kurihara T, Shirataki Y, Kamata K, Nakashima H, Premanathan M, Arakaki R, Kanbara K, Ramanan S, Satoh K, Sakagami H, Saito S and Nakamura T: Relationship between radical intensity and biological activity of cacao husk extracts. *Anticancer Res* 19: 1125-1130, 1999.
- 2) 越阪部奈緒美: ポリフェノール類の抗動脈硬化作用, *ビタミン* 80 (5, 6), 2006.
- 3) Matsumoto M, Tsuji M, Okuda J, Sasaki H, Nakano K, Osawa K, Shimura S and Ooshima T: Inhibitory effects of cacao been husk extract on plaque formation in vitro and in vivo, *Eur J Oral Sci.* 112(3), 249~252, 2004.
- 4) Unten S, Ushijima H, Shimizu H, Tsuchie H, Kitamura T, Moritome N and Sakagami H: Effect of cacao husk extract on human immunodeficiency virus infection. *Letters in Appl Microbiol* 14: 251-254, 1991.
- 5) Hatano T, Miyatake H, Natsume M, Osakabe N, Takizawa T, Ito H and Yoshida T: Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects, *Phytochemistry* 59, 749~758, 1998.
- 6) 町田尚子, 鈴木真理子, 近藤和雄: ポリフェノール: 今日のサプリメント, 230~238, 2006
- 7) Sakagami H, Hashimoto K, Suzuki S, Ogiwara T, Satoh K, Ito H, Hatano T, Yoshida T and Fujisawa S: Molecular requirement of lignin for expression of unique biological activity. *Phytochemistry* 66 (17): 2107-2119, 2005.