

ココアおよびカカオポリフェノールによる 慢性炎症の調節

ジョシュア・D・ランバート

ペンシルバニア州立大学食品科学部

摘要

慢性炎症は数々の疾患の発現および進行における病因因子である。肥満症および脂肪過多症が慢性炎症状態を誘発することがわかっている。カカオパウダーはカカオノキ（アオイ科 *Theobroma cacao*）の種子に由来する食品成分である。脂肪と糖を多く含む嗜好品によく使われるが、カカオパウダー自体は、脂肪と糖の含有量が比較的少なく、繊維を多く含み、モノマーのフラバン-3-オールとポリマーのプロアントシアニジン（PAC）の両方をはじめ、ポリフェノール化合物を豊富に含む。筆者らの研究では、アルカリ化していないカカオパウダーを栄養補助食品として追加した結果、高脂肪食を与えたC57BL6/Jマウスにおいて肥満に関連する炎症症状が軽減した。その効果には、全身性炎症マーカーおよび脂肪組織の血管間質分画における炎症遺伝子の発現の調節が含まれる。これらの効果は、カカオの投与による代謝性エンドトキシン血症の阻害および腸のバリア機能の改善によるものと考えられる。さらなる研究が必要とされるが、この研究の結果は、カカオが慢性炎症症状の抑制に有効であることを示唆する。

緒言

カカオノキ（*Theobroma cacao*）の種子に由来するカカオパウダーは、人気のある食品成分として世界中で利用されている。米国では、成人人口の約12%がチョコレート消費する（1）。カカオパウダーは、チョコレートのような脂肪と糖を多く含む嗜好品によく使われるが、それ自体は繊維が多く、脂肪と糖の含有量は比較的少なく、ポリフェノールの含有量が多い（2）。カカオに含まれるポリフェノールの特徴は、(-)-エピカテキン（EC）や(+)-カテキンなどのモノマーのフラバン-3-オールと、フラバン-3-オールのポリマーであるプロアントシアニジン（PAC）の両方が存在することである（図1）（3, 4）。研究室での試験と観察研究の結果から、カカオおよびカカオマス、カカオ

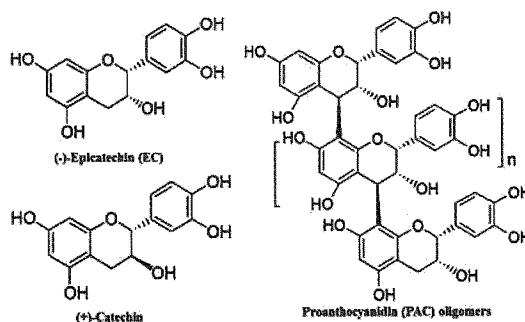


Figure 1. Major polyphenolic compounds in cocoa

図1. カカオに含まれる主なポリフェノール化合物

パウダー、チョコレート（ミルクチョコレートとダークチョコレート）のようなカカオ製品の消費が、抗酸化、抗高血圧、抗炎症、抗アテローム形成という特性により、また、インスリン感受性と血管内皮機能に対する作用により、健康に良い影響を与えることが示唆されている（5-7）。これらの有益な効果は、最近の総説やメタ分析にまとめられ、カカオが代謝性危険因子に対して果たす有効な役割を裏付けている（8-10）。

ココアおよびカカオポリフェノールによる肥満関連炎症の予防

いくつかの *in vitro* 研究により、カカオ由来のフラバン-3-オールとPACが、ヒト末梢血単核細胞およびマクロファージ中の炎症促進性サイトカインの転写と分泌の調節により、抗炎症活性を示すことが判明している（11-13）。

我々の研究により、ポリフェノールに富むカカオ抽出物が、無細胞系においてホスホリパーゼA2（PLA₂）の活性を用量依存的に阻害する（図2A）のに対し、アルカリ化（Dutched）によりポリフェノールを低下させたカカオ抽出物では、阻害効果が低下することが判明した（14）。PACの阻害活性は重合度（DP）に従い上昇し、分子量が大きい化合物ほど（DP>7）活性が高かった（図2B）。PAC10量体による阻害は、非競争的メカニズムによるものであった（図2C）。

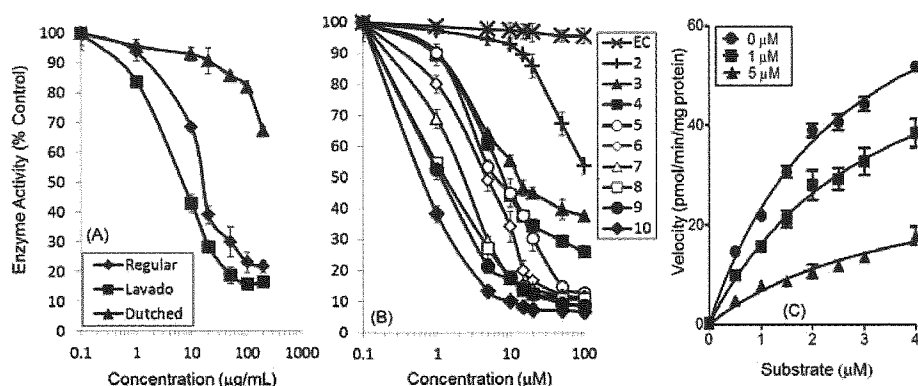


Figure 2 Inhibition of PLA₂ activity by cocoa extracts and cocoa PACs. (A) Cocoa extracts dose-dependently inhibited PLA₂ activity *in vitro* with the extracts having the highest polyphenol content being the most active. (B) Purified cocoa PACs inhibited PLA₂ activity and the potency correlated with the degree of polymerization. (C) The inhibitory kinetics of cocoa PAC decamer against PLA₂ were determined using Michaelis-Menten analysis. Values are expressed as the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments. (Modified from J Ag Food Chem 59(2011)5305 – 11.

図2. カカオ抽出物およびカカオPACによるPLA₂活性阻害。(A) カカオ抽出物は *in vitro* で用量依存的にPLA₂を阻害し、ポリフェノールを最も多く含む抽出物が最大の活性を示した。(B) 精製したカカオPACはPLA₂活性を阻害し、活性と重合度の間に相関性を認めた。(C) カカオPAC10量体のPLA₂に対する阻害動態をミカリス・メンテン式により解析した。3回以上の独立した測定を行い、その結果を平均値 $\pm$ SDで表した。(J Agric Food Chem 59(2011)5305 - 11を元に作図)

ココアおよびカカオポリフェノールの抗炎症効果を動物モデルで実証したデータが増えている（(2)にまとめられている）。例えば、高脂肪食（HFD）を与えたC57BL/6JマウスにカカオPAC抽出物を13週間投与したところ、骨格筋と褐色脂肪組織におけるグルコーストランスポーター4（GLUT4）のトランスロケーションを促進し、肥満マウスの体重、血糖値、インスリン値、総コレステロール値が有意に低下した（15）。抗炎症性のアディポカインであるレプチンとアディポネクチン

ンの血漿中濃度も低下した。これに関連する分子レベルのメカニズムは、まだ完全には解明されていない。

我々の最近の研究では、高脂肪食を与えた肥満マウスにカカオ（80 mg/g）を10週間投与したところ、高脂肪食（HF）を与えたマウスと比較し、最終的な体重と空腹時血糖値に対する効果はわずかであったが、炎症促進性メディエーターであるインターロイキン6（IL-6）、単球走化性タンパク質1（MCP-1）の血漿中濃度が有意に低下し、抗炎症性のアディポカインであるアディポネクチンの血漿中濃度が有意に上昇した（図3）（16）。また、カカオの投与により、高脂肪食を与えた肥満対照群と比較し、精巣上体白色脂肪組織の血管間質分画における数種類の遺伝子（*Il6*、*Il12b*、*Nos2*、*Emr1*）の発現が低下した（図3）。これらの結果は、体重の変化とは無関係に、カカオが抗炎症性効果を発現することを示している。

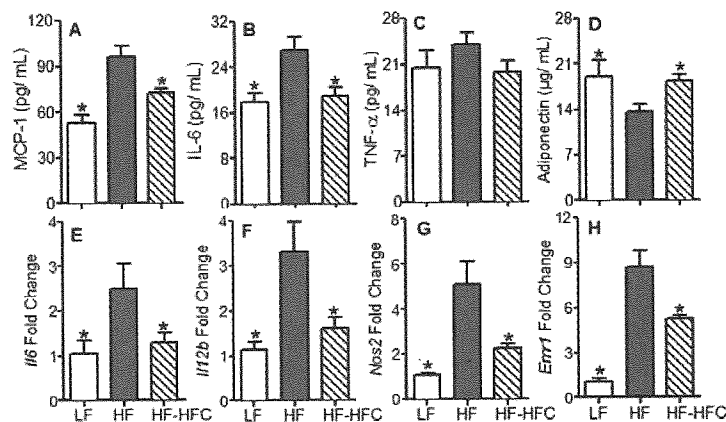


FIGURE 3. Effect of cocoa supplementation on inflammatory mediators in high fat-fed obese mice. Plasma levels of (A) MCP-1, (B) IL-6, (C) TNF- α , and (D) adiponectin were determined by ELISA. Expression of (E) *Il6*, (F) *Il12b*, (G) *Nos2*, and (H) *Emr1* was determined by real-time PCR at the end of the experiment using RNA isolated from the epididymal SVF. Means were compared to the HF-fed controls by one-way ANOVA with Dunnett's post-test (an asterisk indicates $P < 0.05$). (Modified from Eur J Nutr doi: 10.1007/s00394-013-0510-1)

図3. 高脂肪食を与えた肥満マウスにおける炎症メディエーターに対するカカオ摂取の効果。(A) MCP-1、(B) IL-6、(C) TNF- α 、(D) アディポネクチンの血漿中濃度はELISAで測定した。(E) *Il6*、(F) *Il12b*、(G) *Nos2*、(H) *Emr1*の発現は実験の最後に精巣上体SVFから単離したRNAを使い、リアルタイムPCRで測定した。一元配置ANOVAでDunnettの事後検定を用い、平均値をHF（高脂肪食）対照群と比較した（*は $P < 0.05$ を表す）。（Eur J Nutr doi: 10.1007/s00394-013-0510-1を元に作図）。

ますます多くの研究で、血中の過剰な細菌細胞壁由来リポ多糖（LPS）を特徴とする代謝性エンドトキシン血症が肥満関連炎症と関連することが示唆されている（17, 18）。高脂肪食の摂取により腸内フローラの菌叢が変わり、腸管の透過性が変化することにより、LPS産生と全身吸収代謝が過度に上昇し、それがCD14およびToll様受容体4のシグナリングを介して脂肪組織の炎症をトリガーすることが研究によって示されている（18-20）。筆者らは最近、高脂肪食を与えたC57BL/6Jマウスに、カカオを餌に混ぜて投与（80 mg/gを給餌）することにより、高脂肪食を投与した対照群と比較し、LPSの血中濃度が低下することを報告した（図4A）（Gu et al. 未発表）。それに加え、カカオ

の投与により、腸のバリア機能の指標であるグルカゴン様ペプチド2 (GLP-2) の血漿中濃度が上昇した (図4B)。これらの変化は、脂肪組織と関連するマクロファージ中の炎症遺伝子の発現低下と相関していた (データは提示せず)。これらの結果は、カカオが高脂肪食を与えたマウスで腸のバリア機能を調節することにより、全身性抗炎症効果を発現することを示唆している。

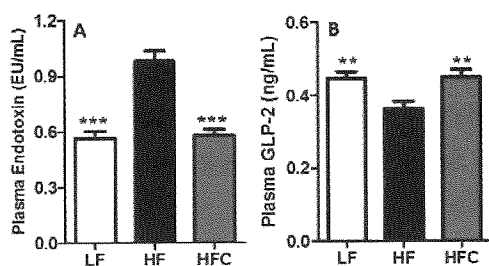


Figure 4. Effect of cocoa supplementation on the plasma endotoxin and GLP-2 levels in C57bl6/J mice. (A) Plasma endotoxin or (B) GLP-2 levels were determined at the end of 18 wk treatment with low fat diet (LF), high fat diet (HF), or high fat diet supplemented with 80 mg/g cocoa powder. Values are expressed as mean $\pm$ SEM of N = 23, 21, and 24 for LF, HF, and HFC, respectively. Means were compared by one-way ANOVA with Dunnett's post-test (HF as control). *** $P < 0.001$.

図4. カカオ摂取がC57bl/6Jマウスの血漿中エンドトキシン濃度とGLP-2濃度に与える効果。低脂肪食 (LF)、高脂肪食 (HF)、高脂肪食+80 mg/gカカオパウダー添加のいずれかを18週間与えた後、(A) 血漿中エンドトキシン濃度と (B) GLP-2濃度を測定した。LF、HF、HFCの順にN=23、21、24であった。値は平均値 $\pm$ SEMで表す。一元配置ANOVAでDunnett検定を用い、平均値を比較した (対照群はHF)。
** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

結論

カカオおよびカカオポリフェノールによる抗炎症効果を示唆するデータが増加している。世界的な肥満率の上昇、および肥満から派生する疾病のメディエーターとしての慢性炎症の役割という観点から、カカオは肥満関連炎症症状の寛解に有効な食事療法として利用できる可能性がある。我々のデータは、カカオが消化管の生理学的パラメータを調節することにより効果を発現する可能性を示唆している。ただし、まだいくつか疑問点があり、さらなる研究が必要とされる。まず、カカオに含まれるポリフェノールが抗炎症効果の主要因なのか、それとも他の要因も寄与するのか、という点が不明である。例えば、肥満および糖尿病 (Ob-db) ラットにメチルキサンチンを豊富に含むカカオ抽出物を4週間投与すると、血漿中の遊離脂肪酸、総コレステロール、トリグリセリド、酸化ストレスバイオマーカー (8-イソプロスタン) が有意に低下した (21, 22)。さらに、カカオ中のPACの吸収・代謝は低い、それらのPACは腸内フローラにより広範に代謝されるものと考えられる。これらの代謝産物がカカオの抗炎症性効果において何らかの役割を果たす可能性もあるが、まだデータが不足している。最後に、動物モデルのデータが、どの程度までヒトでも通用するかを判断するため、又、適切な用量と投与計画に関する重要な情報を提供するために、対照群をおいたヒト試験を実施することが不可欠である。

参考文献

1. O'Neil CE, Fulgoni VL, 3rd, Nicklas TA. Candy consumption was not associated with body weight measures, risk factors for cardiovascular disease, or metabolic syndrome in US adults: NHANES 1999-2004. *Nutr Res.* 2011 ; 31 : 122-30.
2. Gu Y, Lambert JD. Modulation of metabolic syndrome-related inflammation by cocoa. *Mol*

3. Wollgast J, Pallaroni L, Agazzi ME, Anklam E. Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. 2001 ; 926 : 211-20.
4. Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 1999 ; 47 : 490-6.
5. Almoosawi S, Fyfe L, Ho C, Al-Dujaili E. The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects. *Br J Nutr*. 2010 ; 103 : 842-50.
6. Baba S, Natsume M, Yasuda A, Nakamura Y, Tamura T, Osakabe N, Kanegae M, Kondo K. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J Nutr*. 2007 ; 137 : 1436-41.
7. Berry NM, Davison K, Coates AM, Buckley JD, Howe PR. Impact of cocoa flavanol consumption on blood pressure responsiveness to exercise. *Br J Nutr*. 2010 ; 103 : 1480-4.
8. Shrimel MG, Bauer SR, McDonald AC, Chowdhury NH, Coltart CE, Ding EL. Flavonoid-rich cocoa consumption affects multiple cardiovascular risk factors in a meta-analysis of short-term studies. *J Nutr*. 2011 ; 141 : 1982-8.
9. Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, Cassidy A. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health : a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr*. 2012 ; 95 : 740-51.
10. Tokede OA, Gaziano JM, Djousse L. Effects of cocoa products/dark chocolate on serum lipids : a meta-analysis. *Eur J Clin Nutr*. 2011 ; 65 : 879-86.
11. Goncalves R, Mateus N, de Freitas V. Study of the interaction of pancreatic lipase with procyanidins by optical and enzymatic methods. *J Agric Food Chem*. 2010 ; 58 : 11901-6.
12. Goncalves R, Soares S, Mateus N, de Freitas V. Inhibition of trypsin by condensed tannins and wine. *J Agric Food Chem*. 2007 ; 55 : 7596-601.
13. Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition*. 2003 ; 19 : 876-9.
14. Gu Y, Hurst WJ, Stuart DA, Lambert JD. Inhibition of key digestive enzymes by cocoa extracts and procyanidins. *J Agric Food Chem*. 2011 ; 59 : 5305-11.
15. Yamashita Y, Okabe M, Natsume M, Ashida H. Prevention mechanisms of glucose intolerance and obesity by cacao liquor procyanidin extract in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. *Arch Biochem Biophys*. 2012 ; 527 : 95-104.
16. Gu Y, Yu S, Lambert JD. Dietary cocoa ameliorates obesity-related inflammation in high fat-fed mice. *Eur J Nutr*. 2013.
17. Pendyala S, Walker JM, Holt PR. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology*. 2012 ; 142 : 1100-1 e2.

18. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007 ; 56 : 1761-72.
19. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des*. 2009 ; 15 : 1546-58.
20. Moreira AP, Texeira TF, Ferreira AB, Peluzio Mdo C, Alfenas Rde C. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*. 2012 ; 108 : 801-9.
21. Jalil AM, Ismail A. Polyphenols in cocoa and cocoa products : is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*. 2008 ; 13 : 2190-219.
22. Jalil AM, Ismail A, Pei CP, Hamid M, Kamaruddin SH. Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (Ob-db) rats. *J Agric Food Chem*. 2008 ; 56 : 7877-84.