

# カカオ抽出物の免疫機能に及ぼす効果

菅原 卓也

愛媛大学大学院 農学研究科教授、食品健康科学研究センター長

はじめに

カカオには、ポリフェノール類をはじめとする、健康機能を持つ様々な成分が含まれている。カカオポリフェノールには、血圧低下作用、動脈硬化抑制作用、脂肪蓄積抑制作用など、生活習慣病改善に資する保健効果が知られており、機能性表示食品としての開発も進んでいる。一方、生体防御に関わる免疫系に及ぼす影響についての研究はあまり進展していない。免疫とは、バクテリアやウイルスなどの侵入物や、ガン細胞などの変異自己細胞を排除するシステムである（図1）。免疫システムには、①皮膚や粘膜による物理的な排除、②不特定多数の侵入異物に対応する自然免疫（抗原非特異的免疫）、③特定の侵入異物に対して強力な排除能を持つ獲得免疫（抗原特異的免疫）の3段階から成る。本研究では、特に②自然免疫と③獲得免疫に及ぼすカカオ抽出物の効果について検討した。

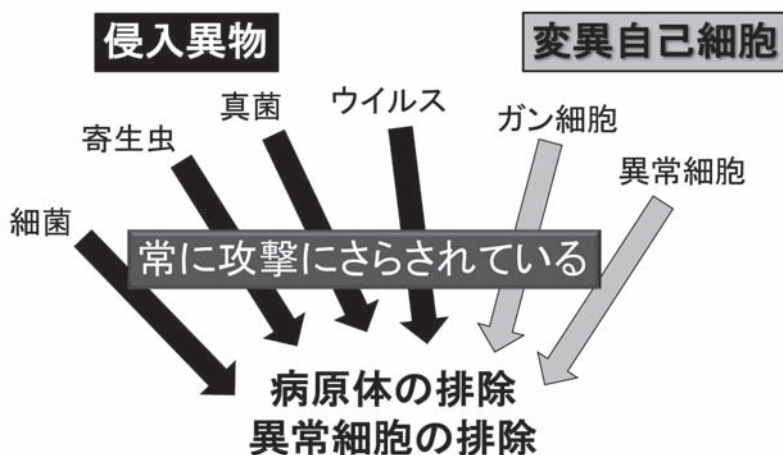


図1 免疫システム

## 1. *In vitro*におけるカカオ抽出物の免疫賦活作用

本実験には、脱脂カカオマスを手酸化ナトリウム水溶液に懸濁し、抽出された成分（カカオ抽出物）について検討を行った。カカオ抽出物の免疫系に及ぼす効果を明らかにするため、まず、免疫細胞に対する効果について培養細胞を用いて評価した。自然免疫系において、体内に侵入した微生物を貪食・分解し、その情報を他の免疫細胞に伝達することで（抗原提示）、侵入微生物に対する特異的な獲得免疫を活性化するという重要な役割を果たすマクロファージに対する効果を、マウス由来マクロファージ細胞株J774.1細胞を用いて評価した。その結果、カカオ抽出物は、J774.1細胞

が産生する免疫タンパク質であるインターロイキン (IL)-6および腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$  の産生を有意に促進することが明らかになった (図2)。その作用メカニズムを検討した結果、IL-6産生が促進された理由は、IL-6の遺伝子発現の促進によることが明らかになった。一方、TNF- $\alpha$  の遺伝子発現は促進されていないことから、カカオ抽出物は、両免疫タンパク質の産生に対して、異なるメカニズムで促進していると推察された。

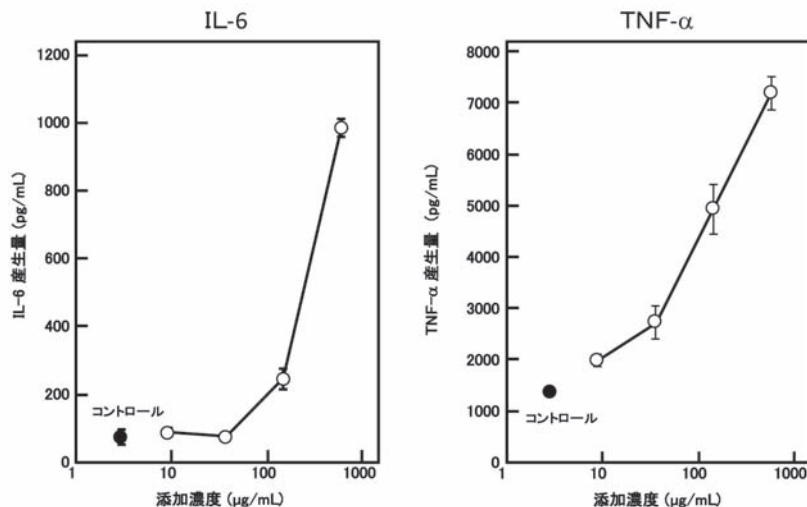


図2 J774.1細胞のサイトカイン産生に及ぼすカカオ抽出物の効果

次に、IL-6の遺伝子発現が促進されたことから、その促進メカニズムを明らかにするため、マクロファージの活性化メカニズムに大きな役割を果たす、Toll様受容体 (TLR)-4の下流に存在するMAPキナーゼに対する影響を検討した。TLR-4のリガンドであり、マクロファージを活性化する微生物由来のリポ多糖 (LPS) をポジティブコントロールとして、カカオ抽出物の影響を評価した。その結果、MAPキナーゼのうち、JNKとp38のリン酸化がカカオ抽出物の影響によって顕著に活性化されることが明らかになった (図3)。

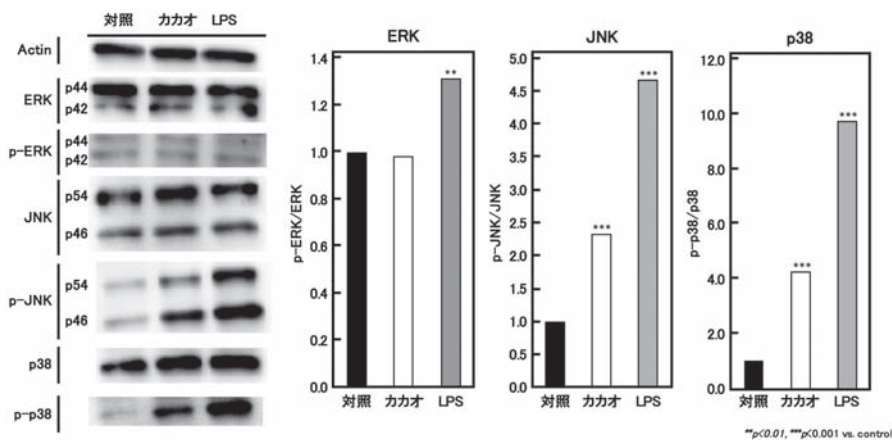


図3 J774.1細胞のMAPキナーゼ活性に及ぼすカカオ抽出物の影響

マクロファージの重要な働きとして、貪食活性がある。貪食とは、侵入微生物を細胞内に飲み込み、分解する作用を示す。J774.1細胞の貪食活性に及ぼすカカオ抽出物の影響を検討したところ、わずかではあるものの、貪食活性を促進することが明らかになった。

以上の結果から、培養下において、カカオ抽出物はマクロファージを活性化することが明らかとなった。

## 2. 生体内におけるカカオ抽出物の免疫賦活作用

カカオ抽出物がマクロファージ細胞株の活性を促進したことから、カカオ抽出物をマウスに経口投与し、免疫系に及ぼす影響を検討した。6週齢BALB/cマウスにカカオ抽出物を 50mg/kg/day（低用量投与群）、および500mg/kg/day（高用量投与群）経口投与した。コントロール群には、溶媒である水を投与した。各群8匹のマウスに2週間経口投与した後、各個体よりマクロファージ、血液、腸間膜リンパ節、および脾臓を採取し、免疫系に及ぼす効果を評価した。

まず、体重に及ぼす影響を検討したところ、コントロール群と比較して顕著な変化は認められず、カカオ抽出物の投与による影響は認められなかった。次に、血液中の抗体量を測定したところ、血液中のIgM、IgGおよびIgA濃度に顕著な変化は認められなかった。また、血中のIL-1 $\beta$ 、IL-6およびTNF- $\alpha$ の濃度についても、カカオ抽出物の経口摂取による有意な影響は認められなかった。

カカオ抽出物の経口投与による血中抗体量に顕著な変化が認められなかったため、食べたものの影響がより顕著に観察できる腸間膜リンパ節の免疫細胞に対する経口投与の影響を検討した。マウスから腸間膜リンパ節を摘出したのち、細胞を回収し培養することで、免疫細胞の活性に及ぼすカカオ抽出物の経口投与の影響を評価した。腸間膜リンパ節から回収した免疫細胞を48時間培養し、培養上清中の免疫タンパク質の量を測定した。その結果、リンパ球が産生する抗体については、IgG、IgMおよびIgAのいずれの抗体についても、顕著な影響は認められず、リンパ球の抗体産生活性には影響しないことが明らかになった。また、主にマクロファージが産生するIL-1 $\beta$ 、IL-6およびTNF- $\alpha$ についても、経口投与による有意な影響は認められなかった。

次に、同様の方法で脾臓に存在する免疫細胞の活性に及ぼすカカオ抽出物の経口投与の影響を評価した。その結果、図4に示すように、脾臓リンパ球のIgGおよびIgM産生が促進されることが明

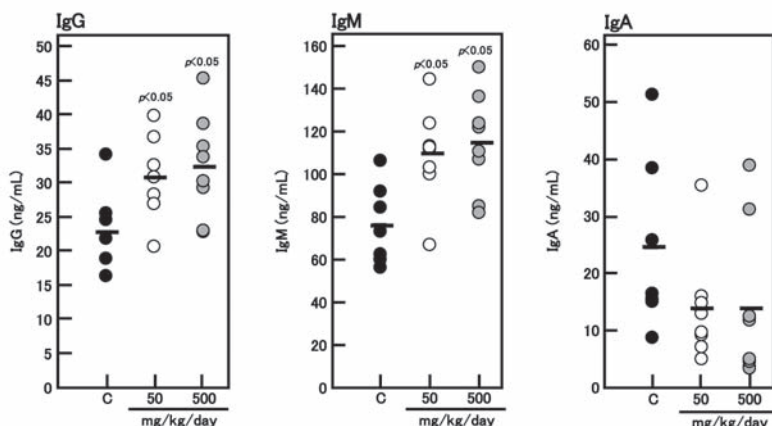


図4 脾臓リンパ球の抗体産生活性に及ぼすカカオ抽出物の経口投与の効果

らかになった。

さらに、IL-1 $\beta$ 、IL-6およびTNF- $\alpha$ 産生活性についても検討したところ、IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ の産生活性が有意に促進されることが明らかになった(図5)。また、腹腔から回収したマクロファージの貪食活性に及ぼす効果を検討したところ、わずかではあるものの貪食活性が促進されることが明らかになった。

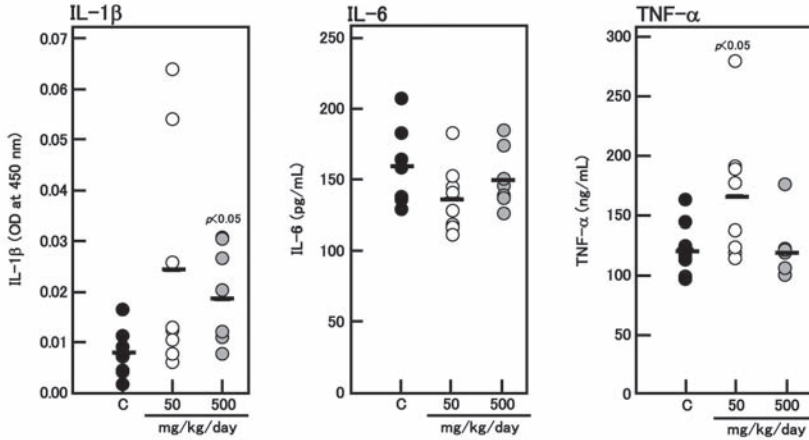


図5 脾臓リンパ球のサイトカイン産生活性に及ぼすカカオ抽出物の経口投与の効果

### 3. カカオ抽出物の抗アレルギー効果

花粉症に代表されるアレルギーは、今や国民病ともいわれており、その改善が強く求められている。好塩基球やマスト細胞がアレルギーで刺激されると、ヒスタミンが放出される。この現象を脱顆粒という。脱顆粒によりヒスタミンが細胞外に放出されると、アレルギー症状が発症する。そこで、ラット由来好塩基球細胞株RBL-2H3細胞を用い、抗原刺激による脱顆粒に及ぼすカカオ抽出物の効果を検討した。その結果、図6に示したように、カカオ抽出物は、顕著に脱顆粒を抑制することが明らかになった。

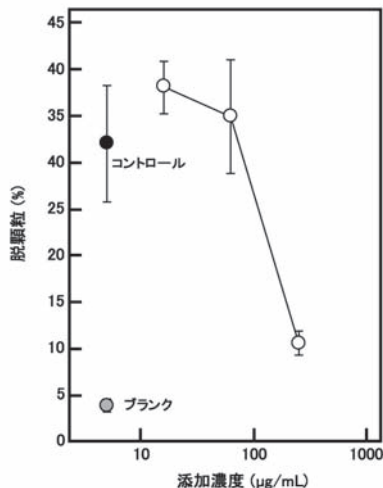


図6 カカオ抽出物の脱顆粒抑制効果

この結果から、カカオ抽出物には脱顆粒を抑制することで、花粉症などのアレルギー症状を緩和する可能性が示唆された。

#### おわりに

カカオ抽出物は、培養系において、マクロファージを活性化し、免疫タンパク質の産生や貪食作用を促進することが明らかになった。一方、カカオ抽出物の経口投与による抗体産生やサイトカイン産生に対する影響を検討した。その結果、血中の抗体とサイトカイン量、および腸間膜リンパ節の免疫細胞に対しては、顕著な影響は認められなかった。一方、脾臓細胞に対しては、コントロール群と比較してカカオ抽出物投与群において、IgGおよびIgM産生を有意に促進することが明らかになった。このように、カカオ抽出物は脾臓では促進的に作用しているのに対し、血中や腸間膜リンパ節では顕著な影響が認められず、免疫に及ぼす効果が組織ごとに異なることが明らかになった。このことは、経口摂取したカカオ抽出物の代謝や体内動態に影響されているのではないかと推察された。

これまでに、*in vitro*でココアに含まれるポリフェノールが免疫細胞に対して抑制的に作用することが報告されている (1)。*in vivo*では、ラットにおいてココアの7週間の投与により腸管免疫におけるIL-6産生およびIgA産生が強く抑制されることが報告されている (2)。また、ラットにおいてココアの3週間の投与により血中および脾臓において、IgA、IgG、IgMの産生量が減少することが報告されている (3-4)。本研究で使用したカカオ抽出物にも同様のポリフェノールが含まれているとは思われるものの、本結果を見る限りにおいては、その作用は限定的であると考えられる。

一方、脾臓においては、脾臓に特異的に吸収・分布する成分の影響により促進効果が認められた可能性が考えられる。これまでに、マイタケ由来の $\beta$ グルカン Mausへ経口投与した際の、免疫系に及ぼす影響及び生体吸収に関する報告がある (5)。 $\beta$ グルカン投与マウスにおいて、血中では $\beta$ グルカンはほとんど検出されないのに対し、投与1日後にはパイエル板のマクロファージや樹状細胞で $\beta$ グルカンが検出され、投与3、7日後には $\beta$ グルカンを取り込んだマクロファージや樹状細胞が脾臓で検出されるとの報告がある。また、その他の多糖類においても免疫賦活効果を有する $\alpha$ -D-グルカンやデキストラン誘導体であるカルボキシメチルデキストラン、レンチナン (シイタケ由来多糖類) 投与マウスでは、これら成分が脾臓に分布することが報告されている (6-8)。このように、多糖類は脾臓に分布する可能性があるのではないかとと思われる。カカオ抽出物にも同様の多糖類が含まれ、脾臓に特異的に吸収されることで免疫系に促進的に作用した可能性も考えられる。

培養系におけるマクロファージの活性化に加え、マウスへの2週間の経口投与による脾臓における免疫マーカーの活性化が認められたことから、カカオ抽出物には生体においても免疫系に作用する可能性が示唆された。カカオ抽出物に含まれる活性成分を分離・同定することで、より明確に免疫賦活効果を明らかにすることができるとと思われる。また、本カカオ抽出物が脱顆粒を抑制したことから、花粉症などのアレルギー症状を緩和する作用を持つ可能性があり、今後の研究の進展に期待が持てる。

#### 参考文献

1. Ramiro E, Franch A, Castellote C, Pérez-Cano F, Permanyer J, Izquierdo-Pulido M, Castell M., Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *J Agric Food*

- Chem. 53 (22) : 8506-11 (2005).
2. Pérez-Berezo T, Franch A, Castellote C, Castell M, Pérez-Cano FJ., Mechanisms involved in down-regulation of intestinal IgA in rats by high cocoa intake., *J Nutr Biochem.* 23 (7) : 838-44 (2012).
  3. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramírez-Santana C, Castellote C, Izquierdo-Pulido M, Permanyer J, Franch A, Castell M., Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Clin Exp Immunol.* 149 (3) : 535-42 (2007).
  4. Pérez-Berezo T, Franch A, Ramos-Romero S, Castellote C, Pérez-Cano FJ, Castell M., Cocoa-enriched diets modulate intestinal and systemic humoral immune response in young adult rats. *Mol Nutr Food Res.* 55 Suppl 1 : S56-66 (2011).
  5. Masuda Y, Inoue H, Ohta H, Miyake A, Konishi M, Nanba H., Oral administration of soluble  $\beta$ -glucans extracted from *Grifola frondosa* induces systemic antitumor immune response and decreases immunosuppression in tumor-bearing mice. *Int J Cancer.* 133 (1) : 108-19 (2013).
  6. Hoshi H, Iijima H, Ishihara Y, Yasuhara T, Matsunaga K., Absorption and tissue distribution of an immunomodulatory alpha-D-glucan after oral administration of *Tricholoma matsutake*. *J Agric Food Chem.* 56 (17) : 7715-20 (2008).
  7. Charef S, Papy-Garcia D, Courty J., Absorption and tissue distribution of a novel carboxymethyl-dextran after oral administration. *Biomed Pharmacother.* 64 (9) : 627-32 (2010).
  8. O'Hara Y., [Fate of lentinan (antitumor polysaccharide) I : - fate of lentinan in mice, rats, and dogs (author's transl)]. *J Toxicol Sci. Suppl* : 59-72 (1980).