

[10]

氏名(本籍)	山岸 恵 (東京都)		
学位	博士 (学術)		
学位記番号	博乙第 40 号		
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 8 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
論文題目	Chemopreventive action of cacao polyphenols —カカオに含まれるポリフェノール類の発癌に対する化学予防作用—		
論文審査委員	(主査)	教授	戸谷 誠之
		教授	福場 博保
		教授	木村 修一
	国立医薬品食品 衛生研究所		広瀬 雅雄

論文要旨

【研究背景】

日本では 1981 年以降、癌が死因の第一位となり、その後増加の一途をたどっている。癌の発症が増加した原因として、ライフスタイル、特に食生活の変化が大きな影響を及ぼしていると考えられている。発癌の要因の大部分は、外因性の環境因子によるものであり、その中でもたばこや食事が大きな比重を占めている。一方では、野菜や果物といった植物性食品を積極的に摂取することが癌のリスクを低減させるという多くの疫学調査が報告されている。癌はヒトの正常細胞が発癌刺激を受け、多段階を経て発生すると考えられている。第 1 段階は、正常細胞の DNA や染色体に起こる突然変異で、イニシエーションといわれる。次に、イニシエーションを受けた細胞が癌化するプロモーションと呼ばれる段階があり、さらに癌化した細胞が浸潤、転移するプログレッションという段階がある。癌を予防するためには、発癌物質を環境から見つけ出し排除すること、あるいは、発癌を予防する物質を積極的に摂取することが挙げられる。

【研究目的】

植物性食品の摂取と発癌リスクの低減との相関に関しては、多くの疫学的研究がなされており、特にポリフェノール類については、種々の実験系を用いた発癌抑制効果が報告されている。チョコレートやココアの主原料として用いられるカカオ豆には、抗酸化作用を有するポリフェノール類が多く含まれており、カテキン類やエピカテキンの重合体であるプロシアニジン類が分離同定されている (Osakabe, N. et al. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 1998, 44, 313-321., Sanbongi, C. et al. J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 454-457., Natsume, M. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000, 64, 2581-2587.)。本研究ではカカオ豆を発酵・焙炒させ、すりつぶしたカカオマスから溶媒を用いて抽出したカカオマスポリフェノールを用いて、発癌の各段階にあわせた実験を実施し、発癌修

飾作用及び発癌予防食品・素材としての有用性を検討した。

【研究結果】

1. カカオマスポリフェノールのヘテロサイクリックアミンに対する変異原性抑制作用

発癌過程のイニシエーション期は正常細胞のDNAが損傷を受け突然変異を起こす段階である。そこで、食品由来の変異原物質であるヘテロサイクリックアミン(HCAs)の変異原性に対するカカオマスポリフェノールの作用を、サルモネラ菌TA98を用いた矢作法とマウスを用いた宿主経路法にて検討した。カカオマスポリフェノールはHCAsのサルモネラ菌に対する変異原性を抑制した。予め代謝活性化した活性型に対してより強い作用を示したことから、代謝活性化酵素の阻害作用が弱いことから、この抑制作用は代謝活性化の阻害が主体ではなく、活性型変異原物質に直接作用して不活化するものと推察された。マウスを用いた宿主経路法の結果から、抑制作用は生体内においても確認され、これは吸収されたポリフェノール成分が肝臓内で抑制作用を発揮するか、消化管内で変異原物質の吸収を阻害することで示されるものと推察された。(Yamagishi, M. et al. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 5074-5078.)

2. マイトマイシンCによるDNA損傷に対するカカオマスポリフェノールの染色体異常誘発抑制作用

化学物質や放射線はDNAに対して二本鎖切断や架橋形成することで損傷を与え、これらの損傷が修復されずDNAが複製されいくと染色体異常となるといわれている。カカオマスポリフェノールの染色体異常誘発抑制作用を、マイトマイシンC(MMC)を化学物質として用い、DNA鎖切断抑制試験と小核試験にて検討した。カカオマスポリフェノールはMMCによるDNA鎖切断とマウスの骨髄細胞及び末梢血での小核発生を抑制した。MMCによって生じる活性酸素を消去することでDNA鎖の断片化を抑え、更にDNA損傷によって引き起こされる染色体異常を生体レベルで抑制することが機作として考えられた。(Yamagishi, M. et al. Food Chem. Toxicol. 2001, 39, 1279-1283.)

3. PhIP誘発乳腺発癌モデルにおけるカカオマスポリフェノールの発癌修飾作用

PhIPはHCAsの一つでげっ歯類の乳腺、大腸、前立腺に癌を誘発することが知られており、欧米人における発癌の一要因とも考えられている。PhIP処置したSD系雌性ラットにイニシエーション期間あるいはポストイニシエーション期間にカカオマスポリフェノールを混餌にて与えた。実験期間中、週1回触診にて乳腺腫瘍の発生状況を観察し、48週の時点で剖検し、病理組織学的検索を実施した。カカオマスポリフェノールを与えると乳腺腫瘍の発生頻度、平均個数、平均体積で抑制傾向が見られた。膀胱では前癌病変である腺房細胞の好酸性細胞小増殖巣の発生頻度を有意に減少させていた。(Yamagishi, M. et al. Cancer Lett. 2002, 185, 123-130.)

4. 多臓器発癌モデルにおけるカカオマスポリフェノールの発癌修飾作用

カカオマスポリフェノールの全身諸臓器に対する発癌修飾作用を検討するため、5種類の化学

物質を投与することで諸臓器に癌を発生させる多臓器発癌モデルを用いた。DEN, MNU, BBN, DMH 及び DHPN でイニシエーション処置した F344 系雄性ラットにカカオマスポリフェノールを混餌にて与えた。実験開始 36 週後に屠殺剖検し、諸臓器を病理組織学的に検索した。カカオマスポリフェノールを与えると実験期間中の生存率を有意に増加させていた。病理組織学的検索結果から、肺発癌に対し抑制作用をもち、甲状腺発癌に対して抑制傾向を示すこと、主要な臓器において発癌促進作用を示さないことが明らかとなった。(Yamagishi, M. et al. *Cancer Lett.* 2003, 191, 49-57.)

【結語】

以上のことから、カカオマスポリフェノールは発癌の種々の段階で作用する発癌予防物質である可能性が示唆された。変異原性や染色体異常誘発に対する抑制作用では、サルモネラ菌やファージ DNA を用いた *in vitro* の試験系での効果のみならず、マウスの生体内でも同様な効果が観察され、ヒトにおいてもカカオマスポリフェノールを含む食品を摂取することで同様な効果が期待される。今までの研究で明らかとなっている抗酸化性や本研究で見いだした抗変異原性を踏まえて実施した動物モデルを用いた発癌修飾試験においても、特定の臓器に対して発癌予防作用を有することと主要な臓器に対して発癌促進作用を持たないことが明らかとなった。作用機序に関しては、不明な点が多く更なる検討が必要であるが、突然変異や DNA 損傷の抑制作用、癌の進行に関与するといわれている活性酸素に対する抗酸化作用によるものと考えられる。カカオマスポリフェノールの構成成分であるエピカテキンやエピカテキンの重合体であるプロシアニジン類の生体内での代謝や分布が明らかになってくれば、発癌予防に関するメカニズムの研究も進むものと期待している。

植物に含まれるポリフェノールやフラボノイドは動物実験や疫学調査から癌や心疾患のリスクを低減させることが報告されており、チョコレートもこれらの供給源の一つとして考えられる。本研究において、カカオマスに含まれるポリフェノール類にも他の食品由来のフラボノイドやカテキン類と同様の発癌予防作用が確認されたことから、発癌予防食品及び素材としての開発が期待される。カカオ(学名テオブロマ・カカオ)は13世紀頃にはマヤやアステカで栽培されていた。その頃には「神様のたべもの」と呼ばれ、カカオ豆をすりつぶした飲料は高価で贅沢な王侯貴族の飲み物であった。現在でも、カカオはチョコレートやココアという形で我々の食生活に根ざしており、食による疾病の予防や健康維持に貢献できる食品・素材として有用であると考えられる。

審査報告要旨

本研究はチョコレートやココアの原材料であるカカオマスの主成分であるポリフェノール類カカオマスポリフェノールが発癌機構の様々の部分に対して化学的癌予防作用を示すことについて調べた貴重な報告である。

研究者はその方法として、実験動物および動物由来細胞などを用いて以下の3項に関する研究を行った。

(1) カカオマスポリフェノールの抗変異原性

発癌過程のイニシエーション期は正常細胞のDNAが損傷を受け突然変異を起こす段階である。変異原性や抗変異原性をスクリーニングする方法としてサルモネラ菌を用いたAmes Testが広く用いられている。そこで、食品由来の変異原物質であるヘテロサイクリックアミン（焼けこげ物質による発癌作用が知られている）による変異原性に対するカカオマスポリフェノールの作用を調べている。その結果、カテキン、エピカテキンには活性型変異原物質に対する弱い抑制作用が観察された。そこで、これらの作用の違いをみるために代謝活性化酵素に対する阻害作用をHPLCにて検討した。ケルセチンには強い酵素阻害作用が見られたが、CLPとCLTの作用は弱いものであった。これらの変異原性抑制作用は代謝活性化の阻害ではなく、活性型変異原物質に直接的に作用し、不活化することで抗変異原性を示す物質であることが示唆された。また、カカオマスポリフェノールの生体内での変異原性抑制作用を検討したところ、カカオマスポリフェノールの生体内での変異原性抑制作用の機序は、ポリフェノール成分が生体内に吸収されて肝臓に移行し、*in vitro*と同様な機構で阻害することや、消化管内で変異原物質の吸収を阻害する可能性を推論するに至った。カカオマスポリフェノールが食品由来の変異原物質の活性を抑制する作用を有し、その作用は生体内においても発揮するものであることを明らかにした。

(2) カカオマスポリフェノールの染色体異常誘発抑制作用

化学物質や放射線はDNAの二本鎖切断や架橋を形成することでDNAに損傷を与え、これらのDNA損傷が修復されずにDNAが複製されていくと染色体異常となる。カカオマスポリフェノールの染色体異常誘発抑制作用の有無を確認するためにマイトマイシンC(MMC)を化学物質として用い、DNA鎖切断抑制試験と小核試験にて検討した。DNA鎖切断抑制試験では、スーパーコイル型のI型DNAが切断されることで生じる環状構造のII型DNA、鎖状構造のIII型DNAを電気泳動で検出した。小核試験では骨髓細胞と末梢血において、赤血球の形成過程で染色体の損傷によって形成される小核の発生頻度を観察した。この結果、DNA鎖切断抑制試験においてMMCとカカオマスポリフェノール、またはエピカテキンを反応させると、MMCのみの場合は完全にII型、III型DNAに切断されていたが、CLPは切断を抑制していた。エピカテキンでは1%のみ抑制が見られた。MMCによって生じる活性酸素を消去することでDNA鎖の切断を抑制するものと考えられた。次に、小核試験では、ICR系雄マウスを用い、無処置群と3段階の濃度のCLEを経口投与し、6時間後にMMCを腹腔内投与する群の計4群を設けた。MMC投与24時間後に、エーテル麻酔下で採血し、大腿骨を摘出した。末梢血および大腿骨から採取した骨髓細胞の標本作製し鏡検した。マウスにMMCを腹腔内投与すると、骨髓細胞の多染色性赤血球と末梢血の網赤血球に小核の顕著な発生が確認された。カカオマスポリフェノールがMMCによるDNA鎖の断片化を抑制することで、MMCの染色体異常誘発性を抑制するものと推察された。

(3) カカオマスポリフェノールの発癌修飾作用

前述の検討で示した抗酸化性や抗変異原性、染色体異常誘発抑制作用を踏まえ、カカオマスポ

リフェノールの発癌修飾作用を2種類の発癌実験用動物モデルにおいても検討した。この実験で用いる多臓器発癌モデルは5種類の化学物質を用いて諸臓器に癌を発生させることで全身臓器に対する作用を検討することができるモデルで、何れも人への暴露量も多い化学物質に対する系である。化学物質誘発乳腺発癌モデルでは、生後6週令の動物に対して複合的な条件下でCLPr投与の有無による乳腺腫瘍の発生状況での経時的な病理組織学的検索による観察を実施した。

結果は、解剖時の乳腺腫瘍の発生頻度、平均個数、平均体積で抑制傾向が見られたが、有意差は認められなかった。一方、脾臓では、CLPrをイニシエーション期間に与えた群で、前癌病変である腺房細胞の好酸性細胞小増殖巣の発生頻度が有意に減少した。また、中期多臓器発癌モデルでは、負荷実験期間を36週と設定して種々の発癌物質を投与する条件下で研究を開始したが、実験開始19週目から死亡例が出始め、CLPr投与は実験終了時の生存率を有意に増加させた。さらに病理組織学的調査でもCLPr投与群では甲状腺等での癌発生頻度を有意に減少させていた。

以上のように、本研究はカカオマスポリフェノールが食品由来の変異原性物質に対する変異原性抑制作用、化学物質の染色体異常誘発性に対する抑制作用、動物モデルでの発癌修飾作用が存在することを明示し、発癌の種々の段階で作用する発癌予防物質である可能性を示唆する結果を導いた。この結果の全てを直ちに人にあてはめる事は困難であるが、カカオマスポリフェノールの化学発癌予防効果を具体的に示す内容である。

よって審査員一同は本研究論文提出者の学術レベルの高さ、研究展開への意欲の豊かさ、ならびにその研究手法の確実性は学術博士の称号を与えるにふさわしいと判断した。