

研究ノート

マウスにおけるカカオポリフェノールおよびアルカロイド粗抽出画 分摂取による血中 HDL コレステロールに対する効果

八巻幸二^{*}, 高橋陽子

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門
〒 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

Effect of dietary cacao crude extract with polyphenols and alkaloids on serum HDL cholesterol level of C57BL/6J mice.

Kohji Yamaki^{*} and Yoko Takahashi

Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-12 Kannondai,
Tsukuba, Ibaraki 305-8642 Japan

Abstract

Cacao contains some polyphenols such as catechin and procyanidins and some alkaloids such as theobromine and caffeine. These compounds are expected the health benefit as healthy food components. Especially, theobromine, which is contained relatively in a cacao, is expected as a physiologically functional component. Some health effects of theobromine in the cacao on human blood cholesterol have been reported. Therefore, C57BL/6J mice were bred giving diet containing the cacao crude extract with polyphenols and alkaloids for 4 weeks. After breeding, serum cholesterol levels were analyzed. As the results, the cacao crude extract had an effect of increasing HDL cholesterol level, resulting decrease of LDL/HDL ratio. It was suggested that cacao crude extract was an effective food for lipid metabolism improving from these results.

Key words: cacao crude extract, HDL cholesterol, C57BL/6J mouse

* 連絡先 (Corresponding author), kyamaki@affrc.go.jp

緒 言

カカオには、カテキン等のポリフェノールやテオブロミンの様なアルカロイドが含まれており、その健康効果が期待されている。特にカカオに含まれるテオブロミンは、血中コレステロールに対する効果がいくつか報告されている。Neufingerlらは、テオブロミンのHDLコレステロールの上昇効果をカカオの同時摂取で検討して、テオブロミンの単独効果であると報告している¹⁾。他の人試験での報告では、フラボノール含有のココア摂取が、HDLコレステロールを上昇させることが報告されている²⁾³⁾。メタアナリシスを行いカカオ製品の血中脂質に対する効果を検討した報告もあり、用量依存的に健常人にのみLDLコレステロール低下効果を確認している⁴⁾。LDL・VLDLコレステロールの酸化に対するカカオの効果を人試験で調べた報告もある⁵⁾⁶⁾。しかし、この効果について現象のみの報告が多く、不明な点が多い。このようにカカオ成分の摂取によるHDLコレステロール上昇効果は主に人試験での報告が多く、動物試験では報告は少ない、マウスで行う実験で人と同様の結果が得られれば、詳細なメカニズム解析を行う理由を得ることができる。そこでマウスにカカオからポリフェノールおよびアルカロイド粗抽出画分を添加した食を与え、血清のコレステロールに対する効果を調べた。

実験材料および方法

1. 試薬

市販のカカオパウダーをヘキサンで脱脂後、80%エタノールで抽出し、その後溶媒を留去し、これを粗抽出画分として用いた。その画分の収率は58.3%であり、その画分のFolin-Denis測定による総ポリフェノール含量は、没食子酸等量で換算して9.2%含有であった。没食子酸はSigma-Aldrich Co.より、カフェイン、テオブロミン、テオフィリンおよびその他特級試薬は富士フィルム和光純薬より購入した。

2. 動物

C57BL/6J雄性マウス(SPF, 日本チャールズリ

バー社, 横浜)を5週齢で購入し1週間予備飼育後、飼育実験に用いた。飼育は室温24-25℃, 湿度40-60%, 8:00-20:00昼の環境下で行った。また動物実験は農業・食品産業技術総合研究機構規程で定められた飼育環境と同機構・食品研究部門要領に従って、食品研究部門動物実験委員会承認の下に行われた。この実験の承認番号はH26-020である。

3. 飼育実験

入荷後約1週間の予備飼育後、このカカオ粗抽出画分を0.01%-0.3%含有させた標準粉末(NMF粉末飼料, オリエンタル酵母(株))混合食を作成し、C57BL/6Jマウスに与えて、2~3日間隔で体重を測定し、1群6匹とし4週間飼育した。飼育終了後、血液を採取し、総コレステロール、HDLコレステロール、LDL・VLDLコレステロールをEnzyChrom AF Cholesterol Assay Kit (E2CH-100, バイオアッセイシステム社)を用いて測定した。

4. アルカロイド成分測定

混合食に使用した粗抽出画分を、0.1N水酸化ナトリウム液で溶解し、フィルターでろ過したものを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の試料とした。カカオ成分で特徴的なアルカロイドであるカフェインとテオブロミンの含量をHPLCで測定した。カラムはCapcell pak C18 MG II (4.6 mm x 250 mm, Shiseido Co., LTD.)を用い、移動相は、直線グラジェントで5-30%のアセトニトリルを5-35 min, 30-90%を35-40 min, 90%で40-50 minとして流速0.8 mL/minで行った。また検出は、UV273 nmで行った。

5. 統計処理

統計処理は、各群の平均値と標準誤差で表し、一元配置分散分析(ANOVA)を行った後、Dunnettの多重比較で各群とコントロール群との有意性の検定を行った。

実験結果および考察

1. 体重変動

C57BL/6J雄マウスをカカオ粗抽出画分添加食で4週間飼育し、一定間隔で体重測定を行った結果を図1に示した。体重増加に関して、粗抽出画分の添加による影響はほとんど無かった。また結果には示

さないが、実験終了後、肝臓重量を測定した結果、0.01%から0.1%で、わずかな上昇傾向を示した（結果は省略）。この体重と肝重量の結果から、カカオ粗抽出画分の添加による体重や肝臓重量に対する影響はなく、またこれまでのカカオの食経験等もあることより、大量摂取でも有害性の現れる可能性は低いと推測される。

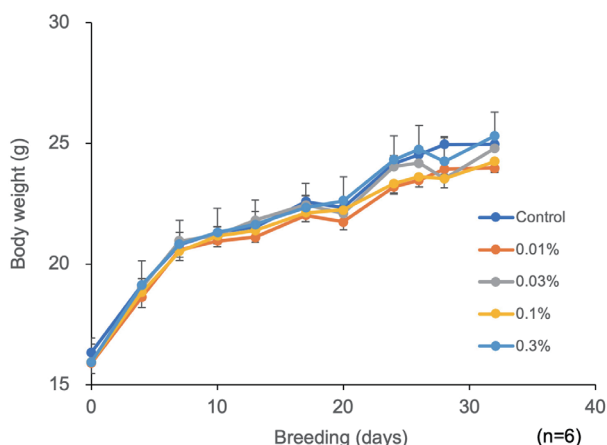


図1 カカオ粗抽出画分添加食で飼育時のマウス体重変動

C57BL/6J 雄性マウスをカカオ粗抽出画分添加食で飼育して、2-3日間隔で体重を測定した。

2. 血清コレステロール値の変動

C57BL/6J 雄マウスを粗抽出画分添加食で4週間飼育後の血清中の総コレステロール値の測定結果を図2に示した。総コレステロール値は0.01%から0.1%粗抽出画分含有食で上昇し、0.03%粗抽出画分含有食群でコントロール群に対し5%危険率で有意な上昇、0.1%粗抽出画分含有食群はコントロール群に対し、1%危険率で有意な上昇を示した。また、HDLコレステロールの測定結果を図3aに示し

た。齧歯類ではコレステロールの約6割がHDLコレステロールで、残りの3割がLDL・VLDLコレステロールであり、総コレステロールの変動の主要因がHDLコレステロールであると考えられた。測定結果では、0.01%から0.1%の含有食群でHDLコレステロール上昇が確認され、0.03%含有食群では1%の危険率で有意な上昇を示し、0.1%含有食群では0.1%の危険率で有意な上昇を示した。またLDL・VLDLコレステロール値の測定結果を図3bに示した。その結果、LDL・VLDLコレステロール値は0.01%から0.1%含有食群はコントロール群と比較してほとんど差が無かった。しかし、0.3%最大含有食群は5%危険率で有意な低下を示した。0.3%群の変動の理由は、コレステロール物質関連の合成抑制等も推察されるが、詳細な検討が必要である。

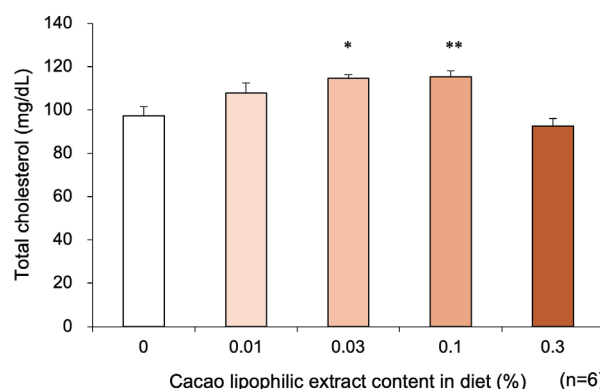


図2 カカオ粗抽出画分添加食飼育後の血清総コレステロール値の変動

C57BL/6J 雄性マウスをカカオ粗抽出画分添加食で4週間飼育した後、血液を採取し、血清中の総コレステロール値を測定した。値は平均値と標準誤差で表した。有意差の検定は、Dunnettの多重比較で、各群とコントロール群との有意差を検定した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

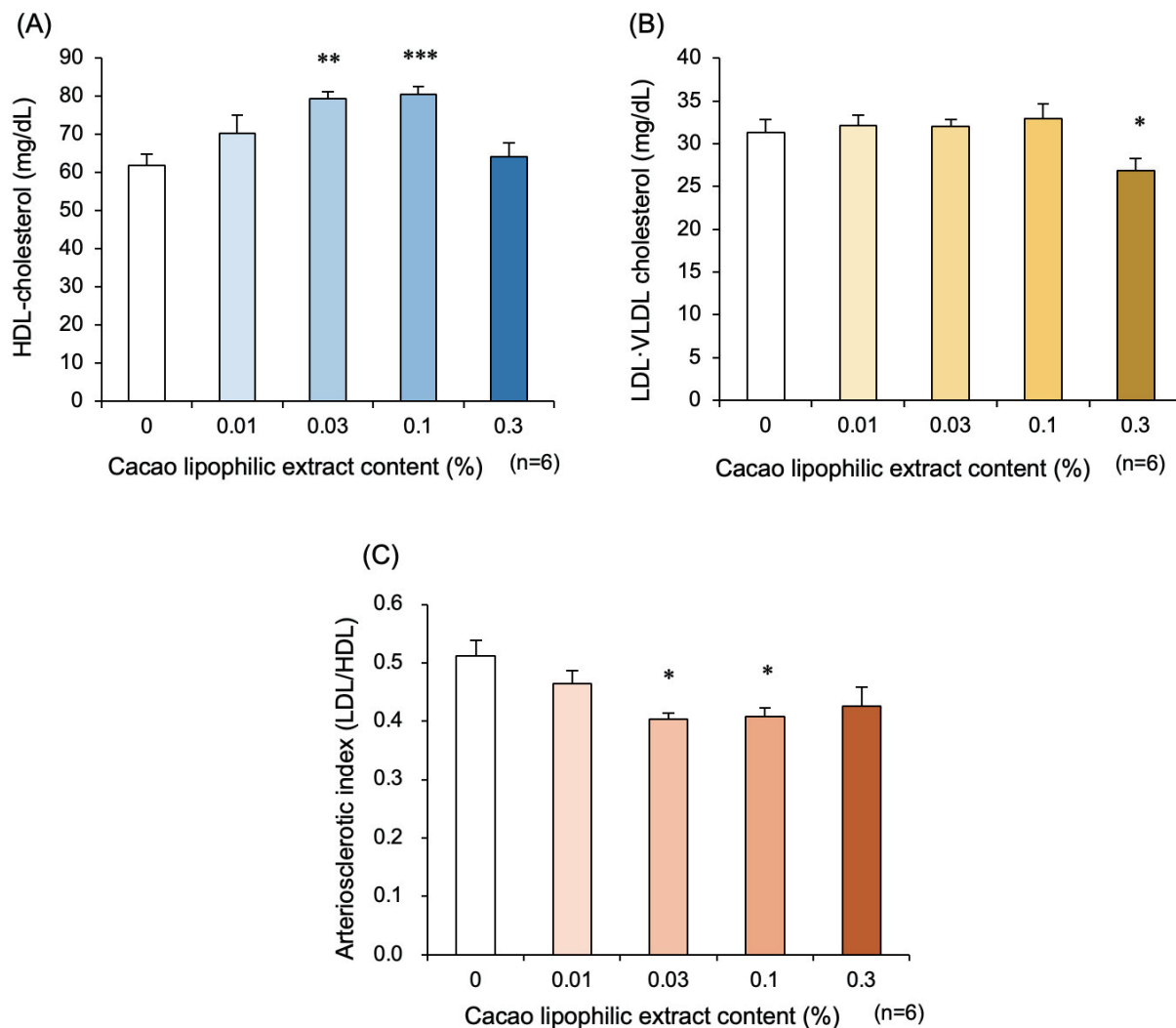


図3 カカオ粗抽出画分添加食飼育後の血清 HDL コレステロール値, 血清 LDL・VLDL コレステロール値および動脈硬化指数値の変動

C57BL/6J 雄性マウスをカカオ粗抽出画分添加食で4週間飼育した後, 血液を採取し, 血清中の HDL コレステロール値 (A) と血清中の LDL・VLDL コレステロール値 (B) を測定した. また血清中の HDL コレステロールと LDL・VLDL コレステロール値の比をマウス毎に計算し, 動脈硬化指数 (C) として表した. 値は平均値と標準誤差で表した. 有意差の検定は, Dunnett の多重比較で, 各群とコントロール群との有意差を検定した. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

3. 動脈硬化指数の変動

動脈硬化のなりやすさの指数として LDL・VLDL コレステロールの値を HDL コレステロールの値で割ったものが汎用的に用いられている. この値をそれぞれ算出して, 動脈硬化指数として図 3c に示した. その結果, カカオ粗抽出画分添加食は, この指数を低下させ, 0.03% 含有食群, 0.1% 含有食群では危険率 5% で有意な抑制効果を示した. この結果, 0.03-0.1% カカオ粗抽出画分の摂取は, HDL コレステロールを上昇させることにより, 動脈硬化指数を低下させ動脈硬化を予防軽減する効果を有する可能

性が期待される.

4. 成分測定

Neufingerl らは, 人介入試験において, テオブロミンの HDL コレステロールの上昇効果をカカオの同時摂取で検討した結果, それはテオブロミンの単独効果であると報告している¹⁾. そこでこのカカオ粗抽出画分に含まれるメチルキシサンチン系アルカロイドの含量測定を行った. カカオ粗抽出画分で特徴的なアルカロイドであるテオブロミンとカフェインの成分含量を測定した. 標準の HPLC クロマトグ

ラムを図 4a に示した。アルカロイドを測定するために、試料であるカカオ粗抽出画分を弱アルカリ性蒸留水で抽出し、フィルター過したものを HPLC 試料とした。そのクロマトグラムが図 4b である。リテンションタイム 15.6 min と 24.5 min にテオブロミンとカフェインのピークが観測され、絶対検量線法で含量を計算した結果、テオブロミンは粗抽出画分の 2.36 %、カフェインは粗抽出画分の 0.12 % の含有率であった。

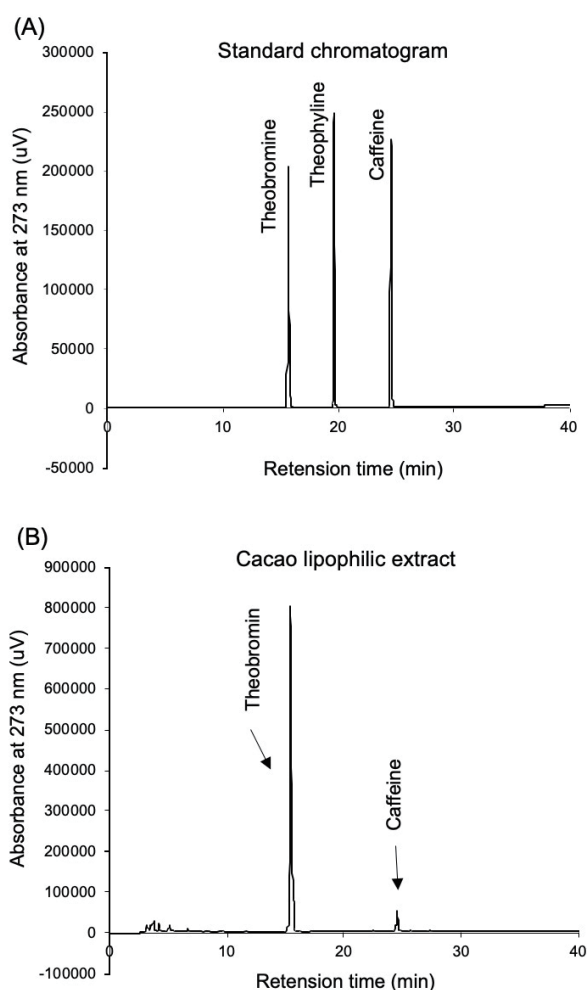


図 4 カカオ粗抽出画分のアルカロイドの HPLC クロマトグラム

カカオ粗抽出画分を弱アルカリ性蒸留水で溶解した試料を HPLC で測定した。HPLC の分析は、実験材料および方法で述べた方法で行った。(a): 標準品のクロマトグラム; 標準品 (テオブロミン, テオフィリン, およびカフェイン) を 500 ng それぞれ注入した。(b): 試料のクロマトグラム; カカオ粗抽出画分試料を弱アルカリ性蒸留水で溶解した試料を測定した。

アルカロイドのテオブロミンの含量は約 2.4% と高値であったことより、今回の実験で、粗抽出画分を摂取したマウスの HDL コレステロール上昇効果はこのテオブロミンの可能性が推定される。Neufuingerl らは、体重約 70kg の人に 850mg のテオブロミンを投与して HDL コレステロール上昇効果を確認している¹⁾。この投与量は約 12 mg/kg/day となり、このマウス実験の場合、0.3% 含有食摂取群において、11.5 mg/kg/day の計算となり、ほぼ同量であり、効果の期待できる量となる。しかし文献にある様にカカオ粗抽出画分には、フラボノイドのカテキンやエピカテキン、プロシアニジンが多く含まれており^{5),7)}、これらの作用の可能性も否定できない。カテキンの血中コレステロールに対する効果については、その多くが LDL コレステロールや総コレステロールに関しての効果報告しているが、HDL コレステロールへの効果は少ない⁸⁾⁹⁾。この粗抽出画分に含まれるカテキン類は測定していないが、数% 含まれるとすると、実験で用いた用量での最大でも 0.5 mg/day となり、以前の試験で調べた 10 mg/day カテキンの結果 (データは示さず) でもコレステロールの変動は認められないため、その影響を確認するのは困難である。ココアに含まれるテオブロミンの HDL コレステロール上昇効果は人試験では報告は多いが、マウスでの HDL 上昇効果の報告はほとんどない。マウスは HDL コレステロール含量が高いため、その変動が少なく、効果の判定が難しい。そのためこの結果は新規性の高いものと推察される。実験動物として汎用されるマウスの試験が成功することは、他の食品成分との相互作用等に応用することに都合が良いと考えられる。本研究においてこのマウスで確認された HDL コレステロール上昇効果による動脈硬化指数の低下効果は、カカオに含まれるテオブロミンの効果である可能性が高いものと推測される。今後、カカオの HDL コレステロールの上昇の効果がテオブロミンであることが明確になった場合、HDL コレステロールを上昇させる機能性表示食品の開発に寄与できるものと推察される。その意味では、テオブロミンの詳細な投与試験が必要である。

カカオ粗抽出画分の含有食でマウスを 4 週間飼育し血液中のコレステロール量に与える影響を調べ

るために、カカオ粗抽出画分添加食 (0.01 ~ 0.3%) でマウスを4週間飼育したところ、体重と肝臓重量の変動では、カカオ粗抽出画分添加によって、体重では有意な変動は無く、肝臓で上昇傾向であったが有意なものではなかった。よって食品としてカカオ粗抽出画分は比較的安全なものであると思われる。0.03-0.1%のカカオ粗抽出画分添加食を与えられたマウスの血清コレステロールの変動では、総コレステロール値の上昇が確認され、それはLDL・VLDLコレステロールの上昇ではなく、HDLコレステロールの上昇の結果であることが確認された。その結果、LDLとHDLの比で表す動脈硬化指数は、有意な低下を示し、このカカオ粗抽出画分を含有する食品は動脈硬化予防作用が期待できるものと考えられた。また粗抽出画分の成分分析では、テオブロミンの含量が高く、カカオ粗抽出画分を摂取したマウスのHDLコレステロールの上昇効果は、このテオブロミンの可能性が高いと考えられるが、さらに検討が必要である。

要 約

カカオには、カテキン等のフラボノイドやテオブロミンの様なアルカロイドが含まれており、その健康効果が期待されている。特にカカオに含まれるテオブロミンは、血中コレステロールに対する効果がいくつか報告されており、機能性成分としても期待される。そこでマウスにカカオ粗抽出画分を添加した食を与え、血中コレステロールに対する効果を調べた。その結果、カカオ粗抽出画分摂取によりHDLコレステロールを上昇させる効果が確認され、HDLとLDLコレステロールの比率である動脈硬化指数の改善が確認された。この結果から、カカオ粗抽出画分は脂質代謝改善効果が期待できる食材であると考えられた。

参考文献

- 1) Neufingerl, N., Zebregs, Y.E., Schuring, E.A., Trautwein, E.A. (2013). Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **97**, 1201-1209.
- 2) Martínez-López, S., Sarriá, B., Sierra-Cinos, J.L., Goya, L., Mateos, R., Bravo, L. (2014). Realistic intake of a flavanol-rich soluble cocoa product increases HDL-cholesterol without inducing anthropometric changes in healthy and moderately hypercholesterolemic subjects. *Food Funct.* **5**, 364-374.
- 3) Sarriá, B., Martínez-López, S., Sierra-Cinos, J.L., García-Diz, L., Mateos, R., Bravo, L. (2014). Regular consumption of a cocoa product improves the cardiometabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolaemic adults. *Br. J. Nutr.* **111**, 122-134.
- 4) Jia, L., Liu, X., Bai, Y.Y., Li, S.H., Sun, K., He, C., Hui, R. (2010). Short-term effect of cocoa product consumption on lipid profile: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **92**, 218-225.
- 5) Baba, S., Natsume, M., Yasuda, A., Nakamura, Y., Tamura, T., Osakabe, N., Kanegae, M., Kondo, K. (2007). 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.* **137**, 1436-1441.
- 6) Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Rissanen, T.H., Virtanen, J.K., Kaikkonen, J., Nyssönen, K., Salonen, J.T. (2004). Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1351-1359.
- 7) Natsume, M., Osakabe, N., Yamagishi, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Miyatake, H., Hatano, T., Yoshida, T. (2000). Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2581-2587.
- 8) Yousaf, S., Butt, M.S., Suleria, H.A., Iqbal, M.J. (2014). The role of green tea extract and

powder in mitigating metabolic syndromes with special reference to hyperglycemia and hypercholesterolemia. *Food Funct.* **5**, 545-556.

- 9) Kim, A., Chiu, A., Barone, M.K., Avino, D., Wang, F., Coleman, C.I., Phung, O.J. (2011). Green tea catechins decrease total and low-density lipoprotein cholesterol: a systematic review and meta-analysis. *J. Am. Diet Assoc.* **111**, 1720-1729.

