

## Thesis

マウスおよびラット敗血症性ショックに対する  
ココア投与の有効性に関する検討

埼玉医科大学総合医療センター高度救命救急センター

(指導：堤 晴彦教授)

小野 一之

## 緒 言

重症患者の治療においては、適切な栄養管理が極めて重要である。栄養状態の悪化は創傷治癒の遅延や免疫能の低下を招き、合併症率を高めて予後を悪化させることとなる。重症患者の栄養管理法に関し、ここ数十年間における最も大きな進歩の一つは、Dudrick らによって開発された高カロリー輸液であろう<sup>1)</sup>。これは医療の様々な分野で有益であったが、特に経口摂取が不可能な術後患者の手術成績向上に寄与するところ大であった。現在でもその有用性を疑う者はいないが、近年になって高カロリー輸液に伴う様々な合併症が認識され、過剰な高カロリー輸液への反省がなされている。過剰な栄養投与は肝機能障害、糖代謝異常、電解質異常などをもたらし、必ずしも栄養状態の改善に役立たないばかりか有害ですらある。また、非生理的な栄養投与経路であるため、栄養状態の改善が期待されたほどには進まず、長期にわたる絶食は腸管粘膜の萎縮をきたす<sup>2)</sup>。そのため、患者の代謝量に見合った高カロリー輸液を行い、腸管が利用できる場合には、できる限り速やかに経腸栄養を開始することが一般的となってきている。この流れは、腸管粘膜の萎縮が要因と考えられている bacterial translocation の概念によって強く加速され、現在に至っている<sup>3,4)</sup>。Bacterial translocation が実際の患者で本当に起こっているのか、さらにはどのような病的意義を持つのかは未だ確立されていないが<sup>5,6)</sup>、早期の経腸栄養開始が患者の予後や合併症率に好ましい影響を与えることは様々な報告によって示されている<sup>7-9)</sup>。さらに、最近では栄養管理を単なる栄養補給という観点のみからではなく、炎症反応すなわち systemic inflammation response syndrome (SIRS) を制御するという immunomodulation の一方法として捉える方向へと向かっている。これは、生体

にとって必要な、いわゆる必須栄養素を投与するというだけではなく、栄養素材の質に目を向け、生体防御機能を高めて重症患者の予後や合併症率を向上せしめようという試みである。重症患者の予後を左右する重要な因子として感染症があるが、敗血症から多臓器不全に至る経路を抑制できるならば極めて有意義である。近年、このような目的で食物繊維、グルタミン、アルギニンなどが経腸栄養剤へ添加され、腸管粘膜構造の正常化、窒素出納の改善、免疫能の向上に寄与し、予後や合併症率にも好ましい影響を及ぼすことが示されている<sup>10-13)</sup>。

経腸栄養剤の添加物としては、上記のように食品の抽出精製成分や合成物を用いるのが一般的だが、既存の食品そのものを用いることができれば医療経済的にも有利であり、この観点からココアに着目した。ココアは *Theobroma cacao* の果実の胚乳部分を脱脂、乾燥して製造される。湯に溶かして飲用に供せられるだけではなく、チョコレートの主原料としても用いられている。インカ帝国時代には医薬品と見なされ、近代においても健康食品として広く愛飲されてきた。近年、様々な疾患に対する予防効果をココアが有する可能性が指摘され、食品業界や消費者の関心が高まっている。ココアは食物繊維やポリフェノールを豊富に含み<sup>14-16)</sup>、ポリフェノールの抗酸化作用は広く一般に知られるところとなっている。ココアに豊富に含まれるポリフェノールは心臓・血管疾患の予防効果を持つと考えられ<sup>17)</sup>、ワインや緑茶とともに生活習慣病を防ぐ効果が期待されている。これらの効果はおもに長期的飲用によるものだが、短期間の摂取で得られる効果も考えられる。ココアには重症患者で不足しがちな亜鉛などの微量元素も豊富に含まれている<sup>18)</sup>。また、豊富に含まれる食物繊維のみを考慮しても、ココアを経腸栄養剤の添加剤として用いることは有用と思われる。しかし、最近はこのにとどまらず、ココアは腸

管出血性大腸菌 O-157 に対する抗菌作用<sup>19)</sup>, cimetidine に匹敵する抗消化性潰瘍効果<sup>20)</sup>, 肝庇護作用<sup>21)</sup>, 齧歯の抑制効果<sup>22)</sup>, 便臭の軽減効果<sup>23)</sup>, immunomodulation 効果<sup>24, 25)</sup>などを有することが報告されている。重症患者では腸蠕動や消化吸収能の低下, 耐糖能の低下などに対応するため, 経腸栄養を 24 時間持続投与とすることが少なくない。その際には経腸栄養剤を長時間室温にさらすことが食品衛生上問題となり, 食中毒起炎菌に対する抗菌効果は重要である。ストレス潰瘍は重症患者にとって重大な合併症であり, その予防に H<sub>2</sub>-ブロッカーが多用される。しかし, 胃内酸度の低下は呼吸器感染症の頻度を増すという報告があり, 汎血球減少症などの副作用も問題となる。ココアの抗潰瘍作用は予防的抗潰瘍薬投与を減らすことに寄与しうる。肝機能障害は軽度のものまで含めると重症患者では頻度の高い合併症である。多種, 多量の薬剤投与, 敗血症, 長時間のショック状態などが肝機能障害を引き起こすが, これらの患者にとって肝庇護作用は重要な機能である。齧歯の抑制効果は経管栄養の患者には直接関係しないが, 顔面骨折に対して顎間固定を行っている患者などのように, 口腔内の清潔が保ちづらい患者には有意義であろう。便臭はこれまではあまり重要視されてこなかった問題であるが, ベッド上での排泄を余儀なくされる集中治療室などの状況では極めて重要である。今後, 高齢者の在宅介護が増加すれば, 更に注目される問題である。Immunomodulation 効果は本論文の主旨とも深く関与する機能であり, 感染症患者の過剰な炎症反応を制御する効果が本当に存在すれば, 極めて魅力的な機能である。これらの作用がいかなる成分によるものかは未だ完全には同定されていないが, 単なる栄養補給にとどまらないココアの可能性を示唆するものである。そこで, 重症患者に対して可及的早期に経腸栄養を開始し, ココアを経腸栄養剤に添加することで様々な補助的効果が得られると考えた。ココアは広く摂取されている食品であり, その飲用の歴史も長い。人類による栽培も 3000 年以上昔から行われており, 常用量を著しく逸脱しない限り, その安全性は既に確立していると考えられる。また, ココアは既に粉末に加工されており, 経腸栄養剤への添加剤として用いることは安価かつ簡便であり, 風味の点からも受け入れやすいものと思われる。

以上の観点から, 筆者を含む研究グループは創傷治癒の促進効果, *Helicobacter pylori* への抗菌作用, 便通の正常化など, ココアの添加剤としての有用性を多方面から検討してきたが, 本稿ではココア投与が敗血症に与える影響を検討する。in vivo においては, マウスまたはラットにココアを経口摂取させ, その後に腹腔内へ lipopolysaccharide (LPS) を投与, 生存率, 臓器障害, interleukin-6 (IL-6) 血中濃度の差を検討した。IL-6 の血中濃度は, 炎症反応の程度と良く相関すると

考えられている。ココア摂取の有無による IL-6 濃度の差から, ココアが LPS 投与による炎症反応を抑制する効果を検討した。in vitro においては, マウスマクロファージの LPS および interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 刺激による nitric oxide (NO) 産生量がココア抽出液の存在によって変化するか否かを検討した<sup>26)</sup>。NO はその血管拡張作用により敗血症性ショックの血行動態に深く関与する物質であり, 特に炎症反応の一環としてマクロファージ等で誘導される inducible nitric oxide synthase (iNOS) によって産生される NO は重要な役割を果たすと考えられている。そこで, マクロファージの NO 産生量を測定することで, LPS に対するマクロファージの反応に及ぼされるココアの影響を検討した。

## 方 法

### ココア添加飼料の作成

固形飼料 CE-2 (日本クレア, 東京) と同組成の粉末飼料に森永製ココア (商品名: MORINAGA COCOA PURE COCOA) を 12.5% 添加し, 固形化したものをココア添加飼料として用いた。この固形飼料の作成は日本クレアに依頼した。ココア非投与群の通常飼料としては, 日本クレア製 CE-2 を用いた。

### ココア摂取が LPS 投与マウス生存率に与える影響 (実験 1-1, 1-2)

#### 1) 実験 1-1

LPS 投与時 6 週齢, 平均体重 31.0 g の std:ddy 系雄性マウス (日本 SLC, 静岡) 40 匹を用いた。20 匹にはココア添加飼料を, 残り 20 匹にはココアを含まない通常飼料を 2 週間自由摂取させた。その後, ココア摂取マウス中の 10 匹には 30 mg/kg body weight の LPS を投与し (COCOA/30 群), 残り 10 匹には 20 mg/kg body weight の LPS を投与した (COCOA/20 群)。通常飼料摂取マウスも同様に二群に分け, 30 または 20 mg/kg body weight の LPS を投与した (CE-2/30 群 及び CE-2/20 群)。LPS (*Escherichia coli*; Difco, Detroit, USA) は生理食塩水で 2.0 mg/ml の濃度に溶解し, ろ過滅菌後に腹腔内投与した。投与からマウスが死ぬまでの期間を 96 時間観察した。なお, 4 群間でのマウス平均体重に有意な差はない。

#### 2) 実験 1-2

LPS 投与時 6 週齢, 平均体重 33.0 g の std:ddy 系雄性マウス (日本 SLC, 静岡) 40 匹を用いた。実験 1-1 の結果を受け, LPS 投与量, 観察期間を限定した。平均体重に差がでないように 20 匹ずつ 2 群に分け, COCOA 群にはココア添加飼料を, CE-2 群には通常飼料を 2 週間自由摂取させた。その後, 20 mg/kg body weight の LPS を実験 1-1 と同様に調製し, 腹腔内投与した。投与からマウスが死ぬまでの期間を 48 時間観察した。



### ココア摂取が LPS 投与マウスの臓器障害に与える影響 (実験 2)

LPS 投与時 6 週齢, 平均体重 25.4 g の BALB/c 系雄性マウス (日本クレア, 東京) 18 匹を用いた. 平均体重に差がでないように 6 匹ずつ 3 群に分け, COCOA 群にはココア添加飼料を, CE-2 群と control 群には通常飼料を 2 週間自由摂取させた. その後, COCOA 群と CE-2 群には LPS (*Escherichia coli*; Difco, Detroit, USA) を 0.07 mg/ml の濃度に生理食塩水で溶解し, ろ過滅菌後に LPS 1.0 mg/kg body weight を腹腔内投与した. control 群には LPS 投与群と同容量の生理食塩水のみを腹腔内投与し, 対照とした. 腹腔内投与の 48 時間後にエーテル麻酔下に剖検を行った. 開腹し, 肝臓に数カ所の切れ目を入れ, 開胸して心臓より生理食塩水 20 ml を注入した. 続いて, 心臓より中性緩衝ホルマリン 20 ml を注入し, 肺, 肝, 腎の順に採取して中性緩衝ホルマリンに保存した. 通常の方法で組織標本を作製して hematoxylin and eosin 染色 (以下 HE 染色と略す) を行い, 臓器障害の状態を光学顕微鏡にて比較した.

### ココア摂取が LPS 投与ラットの IL-6 濃度に与える影響 (実験 3)

LPS 投与時 9 週齢, 平均体重 209.2 g の Wistar 系雄性ラット (日本クレア, 東京) 18 匹を用いた. 平均体重に差がでないように 6 匹ずつ 3 群に分け, COCOA 群にはココア添加飼料を, CE-2 群と control 群には通常飼料を 2 週間自由摂取させた. その後, COCOA 群と CE-2 群には実験 2 と同様に調整した LPS を腹腔内に 1.0 mg/kg body weight 投与した. control 群には COCOA 群, CE-2 群と同容量の生理食塩水を腹腔内投与した. LPS または生理食塩水投与 3 時間後に採血を行い, 分離した血清は氷冷中に保存した. 血清中の IL-6 濃度は Rat IL-6 Cytokine ELISA Kit (コスモバイオ, 東京) を用いて測定した. 本測定キットの検出限界は 16 pg/ml である.

### ココア抽出液の作成

ココア 50 g に沸騰した純水 500 ml を加え, 沸騰した水浴中で攪拌しながら 1 時間抽出を行う. これを 25℃ まで冷却した後, 15000 rpm で 10 分間遠心分離し, 上清を得る. 更にこの上清を濾過し, 10% ココア抽出液とする.

### マクロファージの培養

培地は 10% ウシ胎仔血清を含み, フェノールレッドは含まない RPMI1640 培地 (Sigma Chemical, St. Louis, USA) を用いた (以下, これを培地とのみ記す). マウス J774A.1 マクロファージ様細胞 (ATCC, Manassas, USA) を 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養する. 細胞はピ

ペットにて回収し, Dulbecco's PBS 中で洗浄する. 細胞を  $5 \times 10^5$  個/ml の密度に培地中に調整し, 0.8 ml ずつ 24 ウェル培養プレート (住友ベークライト, 東京) の各穴に注入した. このプレートを 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で一晩培養した. 各ウェルを 1.0 ml の培地で洗浄した後, 0.8 ml の新鮮な培地を加えて以下の実験に供した.

### Nitrite の測定

NO の安定した酸化物である nitrite を NO 産生量の指標として測定した. nitrite の定量は Green らの記載に従い<sup>27)</sup>, 以下のごとく行った. 培養後培地を 10,000 rpm, 4℃ で 1 分間遠心し, 上清または NaNO<sub>2</sub> 標準液 0.1 ml を 96 ウェル酵素免疫測定用プレート (Nalge Nunc International, Rochester, USA) の各ウェルに注ぐ. それぞれに Greiss 試薬 (和光純薬, 大阪) 0.1 ml を加え, 37℃ で 10 分間反応させる. 反応終了後, 直ちに 546 nm の吸光度を測定する (Sjeia Auto Reader; 三光純薬, 東京). 測定結果は 0.1 ml 中の nitrite 量 ( $\mu$ M) で表した.

### ココア抽出液が NO 産生に与える影響 (実験 4)

培養プレートのウェルを 3 群に分け, それぞれに 0.1 ml の純水, 0.05% ココア抽出液, 0.25% ココア抽出液のいずれかを加える. さらに, 各群の半数のウェルには 1.0 mg/ml の LPS (*Escherichia coli*; Difco, Detroit, USA) および 100 U/ml の IFN- $\gamma$  (Sigma Chemical, St. Louis, USA) を含む培地 0.1 ml を加えた. 残り半数のウェルにはコントロールとして LPS, IFN- $\gamma$  を含まない培地 0.1 ml を加えた. このプレートを 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養する. その後, プレートを氷上で冷却して誘導反応を停止し, nitrite を測定する. 各群におけるココア等の添加の有無は Fig. 1 にまとめて示す.

### ココア抽出液投与時期による NO 産生量の変化 (実験 5)

培養プレートのウェルを A, B, C, D の 4 群に分ける. A 群と C 群の各ウェルには 0.1 ml の純水を加え, B 群と D 群の各ウェルには 2.0% ココア抽出液 0.1 ml を加える. さらに, 全てのウェルに IFN- $\gamma$  (100 U/ml) を含む培地 0.1 ml を加える. 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 4 時間培養後に培地を除去し, 1.0 ml の培地で各ウェルを洗浄後に新しい培地 0.8 ml を加える. 次に, A 群と B 群の各ウェルには 0.1 ml の純水を加え, C 群と D 群の各ウェルには 2.0% ココア抽出液 0.1 ml を加える. さらに, 全てのウェルに LPS (0.1 mg/ml) を含む培地 0.1 ml を加える. 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 16 時間培養後にプレートを氷上で冷却, 誘導反応を停止して nitrite を測定する. 各群のココア抽出液添加の時期等は Fig. 2 にまとめて示す.

統計学的検討

生存率の差の検定は Fisher' exact probability test を用いた. IL-6 の濃度および nitrite 産生量の差の検定

は Welch's t-test を用いた. 何れも, p 値 0.05 未満をもって有意差ありとした.

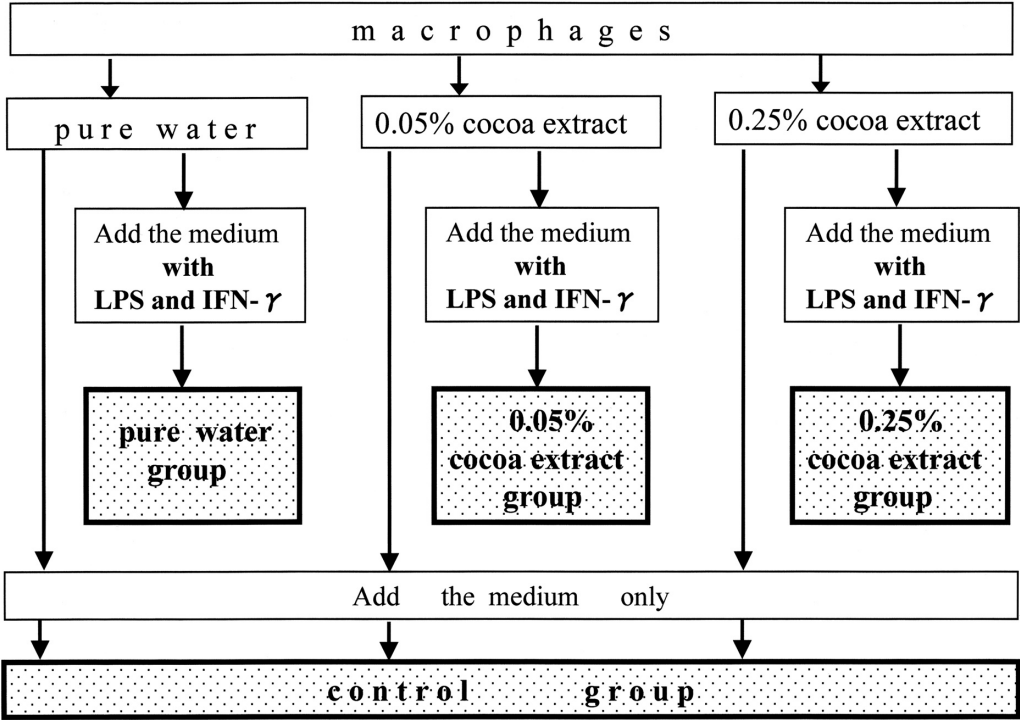


Fig. 1. 実験 4 における各群のココアおよび LPS の添加 (文献 26 より引用).

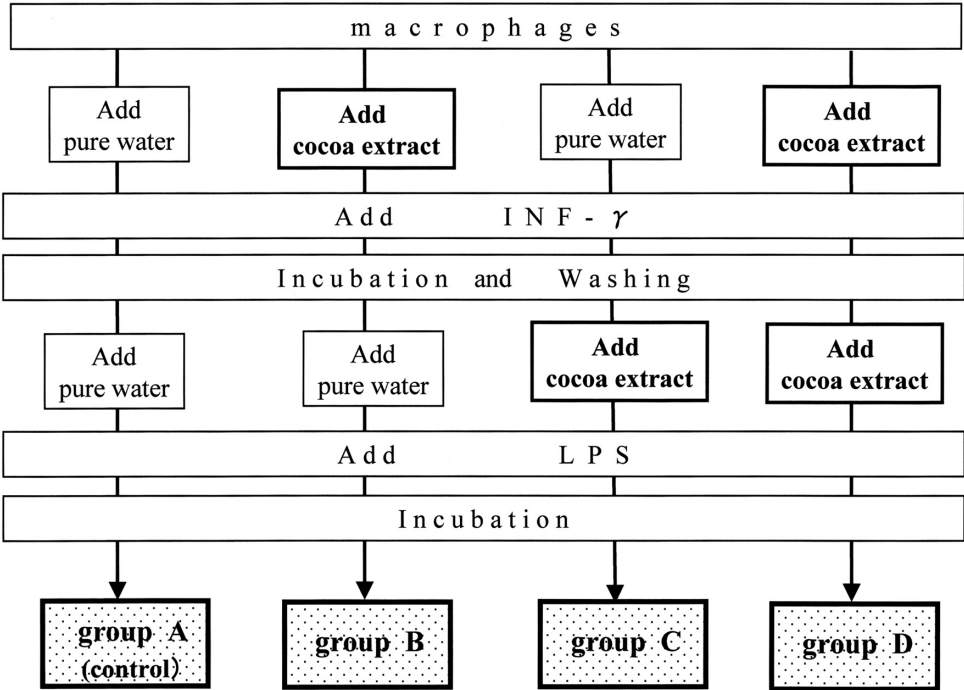


Fig. 2. 実験 5 における各群のココア添加時期 (文献 26 より引用).



## 結果

### ココア摂取が LPS 投与マウス生存率に与える影響 (実験 1-1, 1-2)

#### ①実験 1-1

各群の経時的生存率を Fig. 3-1, 3-2 に示す。LPS 30 mg/kg 投与群 (COCOA/30 群と CE-2/30 群) では、ほぼ同様の死亡経過をたどった (Fig. 3-1)。LPS 20 mg/kg 投与群 (COCOA/20 群と CE-2/20 群) では、ココア投与群である COCOA/20 群の方が常に高い生存率を示していたが、統計学的有意差を認めなかった (Fig. 3-2)。31 時間経過時の生存率が COCOA/20 群、CE-2/20 群でそれぞれ 90% と 50% であり、 $p=0.0704$  と最も 0.05 に近かった。

#### ②実験 1-2

両群の経時的生存率を Fig. 4 に示す。24 時間経過時の生存率は COCOA 群、CE-2 群でそれぞれ 95%、80% であり、 $p=0.1708$  であった。48 時間経過時の生存率はそれぞれ 60%、50% であり、 $p=0.3755$  であった。常に COCOA 群で生存率が高い傾向は見られたが、いずれも統計学的有意差を認めなかった。

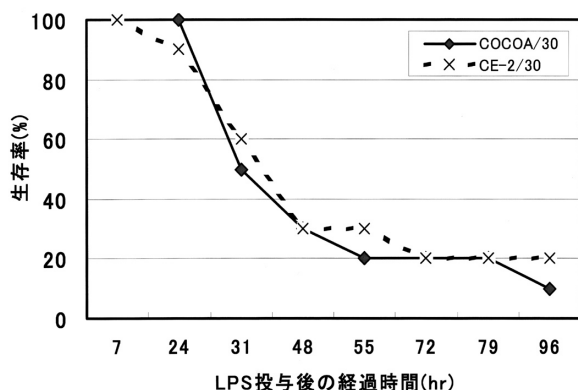


Fig. 3-1. LPS 投与後のマウスの生存率の推移 (実験 1-1, LPS 30 mg/kg body weight).

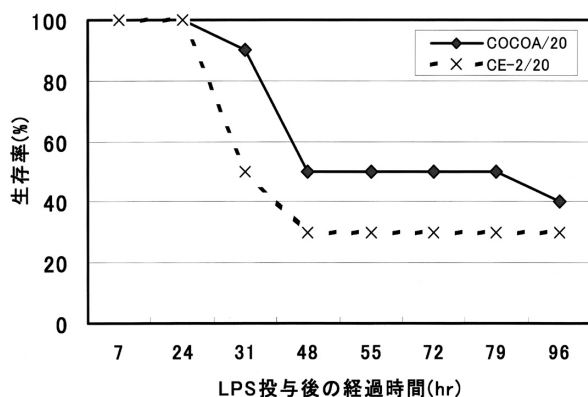


Fig. 3-2. LPS 投与後のマウスの生存率の推移 (実験 1-1, LPS 20 mg/kg body weight).

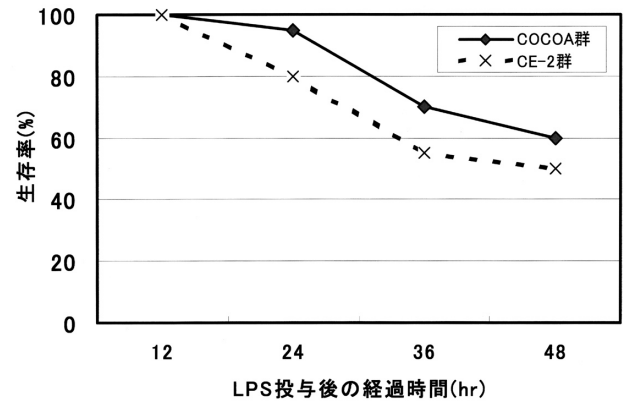


Fig. 4. LPS 投与後のマウスの生存率の推移 (実験 2, LPS 20 mg/kg body weight).

### ココア摂取が LPS 投与マウスの臓器障害に与える影響 (実験 2)

#### ①肺 (Fig. 5)

control 群と比較し、COCOA 群、CE-2 群ともに細胞数の増加が認められる。浸潤した白血球と思われるが、細胞の種類、比率の詳細は不明である。細胞数の増加は通常飼料の CE-2 群で著明であった。肺胞壁の肥厚および無気肺像が COCOA 群、CE-2 群ともに認められ、CE-2 群でより明らかであった。肺出血の所見は何れの群でも認めなかった。

#### ②肝 (Fig. 6)

COCOA 群、CE-2 群ともに細胞変性によると思われる細胞索の乱れがみられ、CE-2 群で強い傾向であった。細胞索の乱れは、中心静脈近傍に特に強い傾向はなかった。明らかな出血壊死像、細胞浸潤、繊維化は認めなかった。

#### ③腎 (Fig. 7)

COCOA 群、CE-2 群ともに、近位尿細管と遠位尿細管に軽度の変化を認めた。刷子縁の染色性の増加は軽度であり、基底膜の肥厚はほとんど認めなかった。2 群間で明らかな変化の差は認めなかった。メサングウム細胞の増加、細胞浸潤は両群ともに認めなかった。

### ココア摂取が LPS 投与ラットの IL-6 濃度に与える影響 (実験 3)

Table 1 に各群の血中 IL-6 濃度測定値を高い順番に列記する。通常飼料の CE-2 群は control 群に比べ、有意に IL-6 濃度が高かったが ( $p<0.05$ ), COCOA 群と CE-2 群、COCOA 群と control 群間では統計学的有意差を認めなかった。

### ココア抽出液が NO 産生に与える影響 (実験 4)

Fig. 8 に示したごとく、ココア抽出液の存在しない状態では、LPS および IFN- $\gamma$  の刺激により、マウスマクロファージの NO 産生量は 7 倍に増



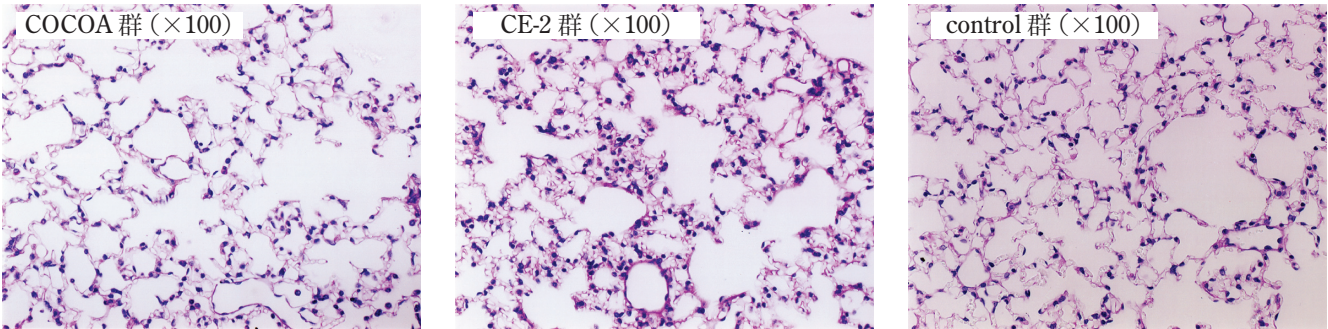


Fig. 5. 肺組織の光学顕微鏡像 (HE 染色).

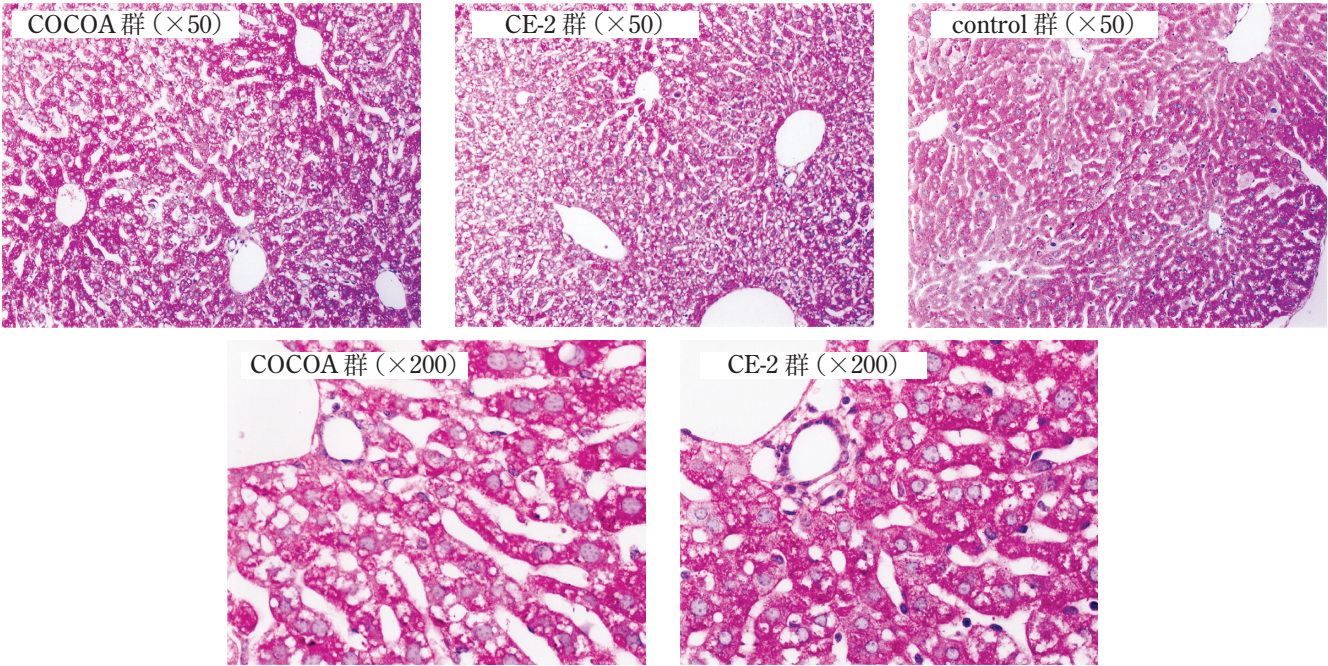


Fig. 6. 肝組織光学顕微鏡像 (HE 染色).

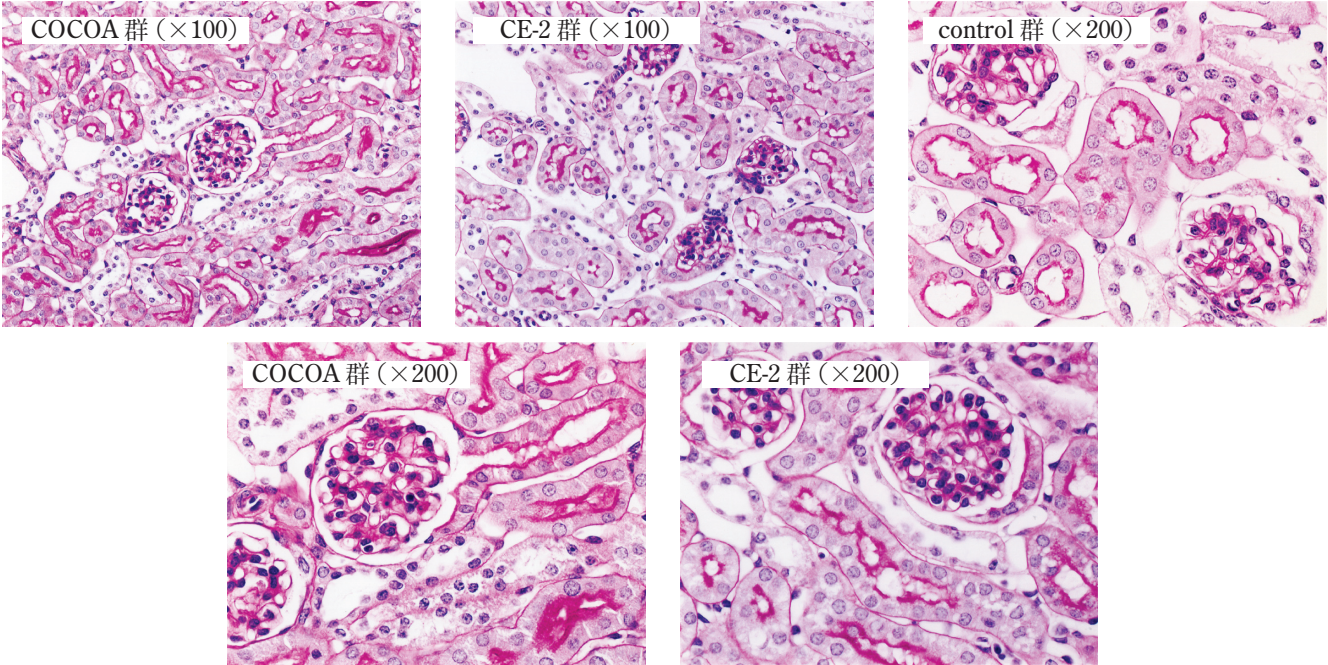


Fig. 7. 腎組織光学顕微鏡像 (HE 染色).



加した。しかし、LPS および IFN- $\gamma$  の刺激による NO 産生はココア抽出液の存在によって有意に抑制された ( $p < 0.01$ )。抑制効果は 0.05% および 0.25% のココア抽出液で、それぞれ 40% と 70% であり、抽出液の濃度が高い方が有意に抑制効果が高かった ( $p < 0.01$ )。

#### ココア抽出液投与時期による NO 産生量の変化 (実験 5)

実験 4 においては LPS と IFN- $\gamma$  を同時に加えたが、本実験では、まず IFN- $\gamma$  を加えて 4 時間反応させ、その後に LPS を加えて 16 時間反応させた。それぞれの反応段階におけるココア抽出液の有無による NO 産生量の変化を検討した (Fig. 9)。IFN- $\gamma$  による反応段階のみにココア抽出液を添加することで、NO 産生は有意に抑制され ( $p < 0.01$ )、NO 産生量はココア抽出液を加えない場合の 70% であった。LPS による反応段階のみへのココア抽出液添加でも NO 産生は有意に抑制されたが ( $p < 0.01$ )、両反応段階に添加することで最も強い抑制効果が得られ、全くココア抽出液を加えない場合の 35% の NO 産生量であった。

#### 考 察

今回の *in vivo* の実験を行うにあたり、固形飼料へのココア添加量を重量比で 12.5% としたが、これは体重あたりの摂取量を成人に換算した場合、1 日にココア 15 杯程度を飲むことになる。この量は成人の一般的な摂取量とはいえず、ココアに含まれる *caffeine* や *theobromine* による不整脈等の副作用が懸念される<sup>28, 29)</sup>。しかし、マウスの栄養所要量は体重あたりにして成人の 10 倍以上であり、全食事に占めるココアの割合として考えた場合には、通常の成人が摂取しているココアの量の範囲内と考える。無論、様々な生理活性物質を含むと考えられるココアの投与量を食品と同様に決定することは困難であるが、上記の理由から今回の添加量が妥当と考えた。栄養組成としては、脂肪分、繊維質がココアに多いため、粗脂肪が CE-2 で 4.4% であったものがココア添加飼料では

6.7% に、粗繊維が CE-2 で 4.1% であったものがココア添加飼料で 7.7% に上昇している。しかし、他の組成には大きな変化はなく、100 g あたりのカロリーも、それぞれ 342.2 kcal と 343.4 kcal となっている。また、マウスやラットが 12.5% ココア添加飼料を通常の飼料と同様に摂取するか否かが問題となるが、摂取量には差がなかった。データは示さなかったが、予備実験において、2 週間の自由摂取ではココア添加飼料を与えたマウスも通常の飼料を与えたマウスと同様の成長を示し、栄養状態にも有意な差を認めなかった。以上より、12.5% ココア添加飼料を 2 週間投与後に LPS を投与する方法を用いた。

LPS の投与方法としては、最も単純な腹腔内 1 回投与方法とした。この投与方法は敗血症モデルとしては古典的なものであるが、実際の患者の敗血症とは病態が異なることが指摘されている<sup>30, 31)</sup>。そのため、現在までに様々な敗血症や敗血症による臓器障害モデルが提唱されているが<sup>32)</sup>、今回はココアの可能性を探るという目的から、最も簡単なモデルを採用した。

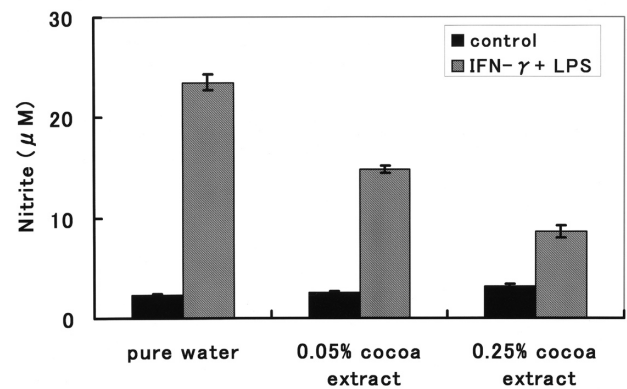


Fig. 8. ココア抽出液添加による Nitrite 産生量の変化 (文献 26 より引用)。

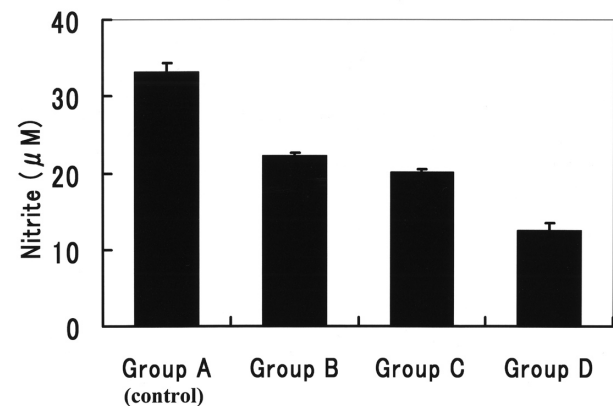


Fig. 9. ココア抽出液添加による Nitrite 産生量の変化 (文献 26 より引用)。

Table 1. LPS 投与 3 時間後の血中 IL-6 濃度

| COCOA群    | CE-2群 | control群 |
|-----------|-------|----------|
| 1598      | 1496  | 33       |
| 99        | 1296  | 7        |
| ND        | 681   | ND       |
| ND        | 631   | ND       |
| ND        | 549   | ND       |
| ND        | ND    | ND       |
| 単位: pg/ml |       |          |

ND:検出限界以下



実験 1-1 においては、31 時間経過時での LPS 20 mg/kg 投与群の生存率の差が  $p=0.0704$  であり、最も有意な差に近かった。そのため、実験 1-2 においては、LPS 投与量は 20 mg/kg のみとし、各群の匹数を倍に増やしたが、やはり有意差は得られなかった。しかし、統計学的有意差は得られなかったものの、2 度の実験においてココア投与群において生存率が高い傾向が見られた。このことから、LPS の投与法の変更や輸液などの追加によって生存率に差がでる可能性がある。

LPS 投与による臓器障害はココア添加飼料群、通常飼料群ともに認められ、肺における変化が最も明瞭であった。肺における変化は細胞浸潤と肺胞壁の肥厚であり、ARDS の初期像として矛盾のないものと思われる<sup>33)</sup>。通常飼料群の方が変化が著明であった事より、ココアには LPS の毒性を軽減する効果があるものと考えるが、定量的な比較は困難である。差を定量化するためには、呼吸機能等の変化を比較する必要がある。また、肺病変の二群間の差は程度の差のみに見えるが、浸潤細胞の種類、比率に差がないか否かを明らかにするには HE 染色のみではなく、抗体染色等を行う必要がある。肝における変化は両群ともに細胞索の乱れが主であり、LPS による細胞変性と考えられる<sup>34)</sup>。sudan black B による染色を行えば脂肪変性を来しているか否かを明瞭にできると考える。二群間の変化の差は肺ほどには明瞭ではないが、通常飼料群で強い傾向であった。差を明らかにするためには、肺同様に機能的な変化を捉える必要がある。腎については、二群ともに形態的变化は明瞭ではなかった。明らかな変化が現れるためには、今回の実験における LPS 投与後 48 時間では短い可能性がある。何れの臓器の変化についても、LPS 投与による早期の変化を観察しているものであり、尿所見や肺機能などの機能的変化を捉える方が形態的变化よりも明瞭かもしれない。あるいは、LPS の少量持続投与とモデルなどを用いれば、より明瞭な形態的变化が捉えられと思われる。しかし、既に述べたように、今回の一連の実験はココアの可能性を探る目的から計画したものであり、単純な LPS 一回投与のみの実験法の限界と考える。

上記の如く、ココアの前投与によって LPS の毒性が軽減される可能性が示されたことから、LPS 投与後のサイトカイン濃度に差がないかどうかを検討した。Sanbongi らの末梢血リンパ球に対するココアポリフェノールの効果を検討した *in vitro* の報告では、IL-2 の産生が抑制される<sup>24)</sup>。ココアポリフェノールの主成分の一つである procyanidin を用いた Mao らの報告では、IL-1  $\beta$  と IL-4 に対しては procyanidin の重合度によって抑制、刺激両方に働き、IL-2 に対しては重合度の高い場合に抑制に働く<sup>25)</sup>。本論文ではサイトカイン濃度の測定を IL-6 について行ったが、これは IL-6 が侵

襲に対する急性相反応において重要な働きを持つサイトカインであり、その血中濃度は重症度と良く相関すると言われているからである<sup>35, 36)</sup>。また、技術的にも IL-6 は侵襲が加わった後に数時間で血中濃度がピークを迎え、*in vivo* の実験において測定が容易である。TNF や IL-1 も侵襲に対するサイトカインとして重要なものではあるが、血中濃度の高い時間が短く、二群間の濃度差の比較が困難である。同一個体からの経時的採血が可能であれば、二群間の比較は可能であるが、眼窩静脈からの採血のみでもサイトカインの血中濃度が上昇するため（データは示さず）、マウスやラットを用いた実験では不可能である。以上の理由から LPS 投与 3 時間後の IL-6 血中濃度を測定し比較した。ココア投与群と通常飼料群間では統計学的有意差は得られなかったが、これはココア投与群の一頭で 1598 pg/ml という高値を示したことが強く影響している。これのみがココア投与群中でかけ離れて高く、三群中でも最も高値である。これを除外すれば、通常飼料群の方がココア投与群よりも IL-6 濃度が明らかに高い。また、通常飼料群でも一頭で測定限界値以下であり、測定値のばらつきが大きい。この原因は不明であり、個体差と技術的な問題による要素が考えられる。個体差に関しては、クローズドコロニーである Wistar 系ラットを用いているため、予想される事態ではある。近交系マウスを用いて実験頭数を増せば、ばらつきは減少させられる可能性がある。今回の実験では明らかな技術的問題は確認できなかったが、他のサイトカイン等に対する効果とともに、更に検討を加えたい。他のサイトカインに関しては、緑茶において検討した報告が散見するが、IL-1  $\beta$  は低下、TNF- $\alpha$  と IL-10 は不変と増加、IL-6 は不変と低下など、必ずしも結果が一致しない<sup>37, 38)</sup>。これらの違いは実験系や用いたポリフェノールの相違による差であることが疑われる。しかし、食品中には多種類のポリフェノールが含まれ、既に述べたように同一のものでも重合度によって作用が異なるため、解釈は困難である。さらに、そもそもポリフェノールのみが原因物質とは断定できず、純粋な合成物ではない限り、他の物質の混在も否定はできない。また、生体にとって炎症性サイトカインの抑制が有利に働くか否かも問題となる。炎症反応を抑制することで生体の防御能を低下させる恐れもある。すなわち、ココアが IL-6 の産生を抑制するとした場合、生体にとっては不利に働く可能性も存在する。現在のところ、ココアによって免疫能が低下するという報告はなく、むしろポリフェノールの一種である catechin 類で感染に対する抵抗力が増すと報告されている<sup>39)</sup>。

NO は IL-6 と同様に炎症反応の程度を示す良い指標と考えられるが、実験 4 の結果からはココアの温水による抽出液中にマクロファージの NO 産生を濃度

依存性に抑制する物質が存在することが確認された。Karim らによれば、ココアに含まれるポリフェノールにはウサギの大動脈内膜の NOS を活性化し、平滑筋を弛緩させる作用が存在する<sup>40)</sup>。この報告は本論文の結論と反するようにも思われる。しかし、彼らの研究は血管内膜の NOS に関するものであり、我々はマクロファージの iNOS に着目した。両者の反応が異なることは驚きにあたらない。また、彼らは他種類存在するポリフェノールの一類である flavonoids を分離して実験に用いており、我々はココアの温水による粗な抽出液をそのまま用いている。活性物質はポリフェノール、特に flavonoids のみとは限らず、決して矛盾した実験結果とは言えない。本来、NO は殺菌作用や免疫応答の調節に必要な物質であり、その産生を著しく阻害しすぎることは好ましくない。また、臓器血流を適正に保つためには、血管内膜で産生された NO の血管拡張作用が重要な役割を果たすと考えられており、非選択的な強い抑制作用も同様に好ましくない。N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine-methylester や N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine は NOS の阻害物質として知られているが、その作用は非選択的である。これらの物質の敗血症性ショックに対する有効性は臨床では未だ実証されておらず、むしろ有害の可能性もある<sup>41, 42)</sup>。iNOS の選択的阻害薬に関しても研究が進められており、有効性が期待されているが、未だ明らかな結果を見ていない<sup>43)</sup>。敗血症を含む SIRS の発症には様々な反応経路が関与しており、その中の一カ所のみを抑制することでは大きな効果を期待できず、むしろ反応系全体の均衡を崩し、逆効果となりうる。様々なサイトカインの拮抗薬が試みられたが、いずれも有効性が実証されなかったことが実例であろう<sup>44, 45)</sup>。それ故に、ココアがマクロファージの iNOS を抑制し、その一方で血管内膜の NOS を活性化するという推論は魅力的なものである。

実験 5 の結果から、ココアの NO 産生抑制効果は LPS を直接中和するのではなく、マクロファージに作用してもたらされるものであることが推測される。しかし、ココアには様々な活性物質が含まれており、LPS や IFN- $\gamma$  を直接中和する作用も存在することは否定できない。van Acker らによればココアの flavonoids には NO radical を除去する作用がある<sup>46)</sup>。ココアには LPS や NO を直接中和したり除去する効果が存在することは否定できないが、実験 5 の B 群ではココアが存在しない状態で LPS が加えられており、それでもコントロールの A 群よりも低い NO 産生量を示している。これらの結果より、マクロファージに直接作用して NO 産生を抑制する効果が存在すると考えられる。この NO 産生抑制物質の有力な候補はポリフェノールであるが、その分離同定は現在施行中である。

今回の *in vitro* の実験で用いたココアの最終濃度 (0.005 %, 0.025 %, 0.2 %) は一般の飲用に供される濃度 (3.5 %) の 10 分の 1 以下であるが、NO 産生抑制物質が何であるかが不明なため、適切なココア抽出液の実験濃度を決定することは不可能である。とりあえず、ポリフェノールを含む飲料摂取後のポリフェノール血中濃度を参考にして実験濃度を決定した。しかし、既に述べたように一概にポリフェノールと言っても、食品中には極めて多岐にわたる種類が存在する。ほとんどの種類のポリフェノールでは、その食品中の含有量、消化管からの吸収率、生体内での代謝経路、生理活性作用などは断片的にしか知られていない。Maiani らの測定結果では、緑茶一杯の摂取 30 分後の epigallocatechin gallate の血中濃度は 2  $\mu$ g/ml であった<sup>47)</sup>。ポリフェノールの種類や吸収率が同じではないため、この結果をそのままココアに当てはめることには無理があるが、ココアのポリフェノール含有量から概略で推計すると、ココアの摂取でも同程度のポリフェノール血中濃度が得られると推測される。今回の実験で用いられたポリフェノールの培地中濃度は、ココアのポリフェノール含有量 (約 20 mg/g) から推計すると、それぞれ 1, 5, 20  $\mu$ g/ml 程度であり、ココアの経口摂取ではあり得ない濃度とは言えない。

本論文中的一連の実験結果より、ココアの経口摂取によって LPS の毒性を軽減できる可能性が示された。その作用機序の詳細は未だ不明であるが、NO 産生に及ぼす実験結果から考えると、単に LPS を中和することではなく、生体の LPS に対する反応を抑制する効果、すなわち何らかの immunomodulation 効果であることが推測される。既に述べたように、ポリフェノールはこれらの効果をもたらす成分の候補である。しかし、いくらポリフェノールに多くの種類があるとはいえ、ココアの様々な作用を全てポリフェノールと食物繊維に帰することには無理がある。実験 4 においては、control 群として LPS を加えなかったマクロファージの NO 産生量が、ココアの添加のみでも増加する傾向が見られた。この傾向はココアの濃度が高い方が強く、ココア中に LPS と類似した作用を持つ物質が少量ながら含まれる可能性が考えられる。LPS の少量反復投与によって LPS に対する反応性が低下する現象は endotoxin tolerance として知られている<sup>48-50)</sup>。ココア中に endotoxin tolerance を来しうる物質が存在し、これが LPS に対する反応性を低下させ、臓器障害や NO 産生量を低下させたという仮説が考え得る。本来、endotoxin tolerance は致死量以下の LPS 投与によってもたらされる効果を指すものであるが、その具体的な機序は未だ未解明である。LPS そのものではなくとも、LPS 投与によって生体内で産生される物質を投与することでも同様の効果が得られる可能性がある。LPS 投与により産生される物質としては、TNF



やIL-1が生体の反応にとって重要視されているが、これらの投与によってLPS投与と同様のトレランスが得られるか否かに関しては、意見の一致を見えない<sup>51-53)</sup>。LPS類似の作用を示す成分がココアに含まれるか否かは、現在分析中であり、臨床例における有効性についても今後検討を加えたい。

## 結 論

ココアの経口摂取によってLPS腹腔内投与による臓器障害が軽減され、マウスの生存率が向上する可能性が示された。その作用機序の詳細は不明であるが、マクロファージからのNO産生抑制効果が関与していることが推測される。その有効成分は不明であり、現在分析中である。

## 参考文献

- 1) Dudrick SJ, Wilmore DW, Vars HM, Rhoads JE. Long-term total parenteral nutrition with growth development and positive nitrogen balance. *Surgery* 1968;64:134-41.
- 2) Buchman AL, Moukarzel AA, Bhuta S, Belle M, Ament ME, Eckhart CD, et al. Parenteral nutrition is associated with intestinal morphologic and functional changes in humans. *JPEN* 1995;19:453-60.
- 3) Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 1992;216:117-34.
- 4) Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 1999;340:207-14.
- 5) Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, Bishop M, Mead P, Shoemaker WC, et al. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Crit Care Med* 1993;21:839-45.
- 6) Lemaire LC, van Lanschot JJ, Stoutenbeek CP, van Deventer SJ, Wells CL, Gouma DJ. Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br J Surg* 1997;84:1340-50.
- 7) Kudsk KA, Croce MA, Fabian TC, Minard G, Tolley EA, Porter HA, et al. Enteral versus parenteral feeding: Effects on septic morbidity after blunt and penetrating abdominal trauma. *Ann Surg* 1992;215:503-13.
- 8) Cuttillo G, Maneschi F, Franchi M, Giannice R, Scambia G, Benedetti-Panici P. Early feeding compared with nasogastric decompression after major oncologic gynecologic surgery: A randomized study. *Obstet Gyn* 1999;93:41-5.
- 9) Velez JP, Lince LF, Restrepo JI. Early enteral nutrition in gastrointestinal surgery: A pilot study. *Nutrition* 1997;13:442-5.
- 10) Mosenthal AC, Xu D, Deitch EA. Elemental and intravenous total parenteral nutrition diet-induced gut barrier failure is intestinal site specific and can be prevented by feeding nonfermentable fiber. *Crit Care Med* 2002;30:396-402.
- 11) Jones C, Palmer TE, Griffiths RD. Randomized clinical outcome study of critically ill patients given glutamine-supplemented enteral nutrition. *Nutrition* 1999;15:108-15.
- 12) Houdijk AP, Rijnsburger ER, Jansen J, Wesdorp RI, McCamish MA, Teerlink T. Randomized trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet* 1998;352:772-6.
- 13) Senkal M, Mumme A, Eickhoff U, Geier B, Spath G, Wulfert D, et al. Early postoperative enteral immunonutrition: Clinical outcome and cost-comparison analysis in surgical patients. *Crit Care Med* 1997;25:1489-96.
- 14) Waterhouse AL, Shirley JR, Donovan JL. Antioxidants in chocolate. *Lancet* 1996;348:834.
- 15) Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr* 2000;130:2086s-95s.
- 16) Nugon-Baudon L, Roland N, Flinois JP, Beaune P. Hepatic cytochrome P450 and UDP-glucuronosyl transferase are affected by five sources of dietary fiber in germ-free rats. *J Nutr* 1996;126:403-9.
- 17) Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342:1007-11.
- 18) 中川栄二, 石川充, 山内秀雄, 花岡繁, 須貝研司. 経管栄養中の重症心身障害児における亜鉛欠乏症のココアによる治療. *脳と発達* 1993;25: 571-3.
- 19) 高橋俊雄, 田口晴彦, 山口博之, 大崎敬子, 佐藤進, 亀井優徳, 他. カカオマスの腸管出血性大腸菌 O157:H7 に対する抗菌効果の検討. *感染症学雑誌* 1999;73:694-701.
- 20) Osakabe N, Sanbongi C, Yamagishi M, Takizawa T, Ozawa T. Effects of polyphenol substances derived from *Theobroma cacao* on gastric mucosal lesion induced by ethanol. *Biosci Biotech Biochem* 1998;62:1535-8.
- 21) Sugiyama K, He P, Wada S, Saeki S. Teas and other beverages suppress D-galactosamine-induced liver injury in rats. *J Nutr* 1999;129:1361-7.
- 22) Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumoto M. Cariostatic activity of cacao mass

- extract. *Archs Oral Biol* 2000;45:805-8.
- 23) 間藤卓, 堤晴彦, 亀井優徳, 伊藤良一, 橋爪秀一. ココアと救命救急センター: ココア添加経腸栄養の試み. *Bio Industry* 1999;16:49-56.
- 24) Sanbongi C, Suzuki N, Sakane T. Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in human in vitro. *Cell Immunol* 1997;177:129-36.
- 25) Mao T, Van De Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion. *J Nutr* 2000;130:2093S-9S.
- 26) Ono K, Takahashi T, Kamei M, Mato T, Kamiya S, Tsutsumi H. Effects of an aqueous extract of cocoa on nitric oxide production by macrophages activated by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ . *Nutrition* 2003;19:681-5.
- 27) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- 28) Donnerstein RL, Zhu D, Samson R, Bender AM, Goldberg SJ. Acute effects of caffeine ingestion on signal-averaged electrocardiograms. *Am Heart J* 1998;136: 643-6.
- 29) Baron AM, Donnerstein RL, Samson RA, Baron JA, Padnick JN, Goldberg SJ. Hemodynamic and electrophysiologic effects of acute chocolate ingestion in young adults. *Am J Cardiol* 1999;84:370-3.
- 30) Wichterman KA, Baue A, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: A review of laboratory models and proposal. *J Surg Res* 1980;29:189-201.
- 31) Fink MP, Heard SO. Current research review laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990;49:186-96.
- 32) 島崎修次, 三島史朗. 敗血症および敗血症性ショックの動物実験モデル. *日救急医学会誌* 1994;5:1-14.
- 33) Demling RH. Current concept on the adult respiratory distress syndrome. *Circ Shock* 1990;30:297-309.
- 34) Hirata K, Kaneko A, Ogawa K, Hayasaka H, Onoe T. Effect of endotoxin on rat liver. Analysis of acid phosphatase isozymes in the liver of normal and endotoxin-treated rats. *Lab Invest* 1980;43:165-71.
- 35) Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 1992;215:356-62.
- 36) Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock: relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 1993;103:565-75.
- 37) He P, Noda Y, Sugiyama K. Green tea suppresses lipopolysaccharide-induced liver injury in d-galactosamine-sensitized rats. *J Nutr* 2001;131:1560-7.
- 38) Crouvezier S, Powell B, Keier D, Yaqoob P. The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokine* 2001;13:280-6.
- 39) Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y. In vitro therapeutic effect of epigallocatechin gallate on nicotine-induced impairment of resistance to *Legionella pneumophila* infection of established MH-S alveolar macrophages. *J Infect Dis* 2002;185:229-36.
- 40) Karim M, McCormick K, Kappagoda CT. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr* 2000;130:2105S-8S.
- 41) Spain D, Wilson M, Garrison R. Nitric oxide synthase inhibition exacerbates sepsis-induced renal hypoperfusion. *Surgery* 1994;116:322-31.
- 42) Henderson JL, Statman RD, Cunningham JN, Cheng W, Damiani P, Siconolfi A, et al. The effects of nitric oxide inhibition on regional hemodynamics during hyperdynamic endotoxemia. *Arch Surg* 1994;129:1271-5.
- 43) Szabo C, Bryk R, Zingarelli B, Southan GJ, Gahman TC, Bhat V, et al. Pharmacological characterization of guanidinoethyldisulphide (GE D): A novel inhibitor of nitric oxide synthase with selectivity towards the inducible isoform. *Br J Pharmacol* 1996;118:1659-68.
- 44) Zeni F, Freeman B, Natanson C. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: A reassessment. *Crit Care Med* 1997;25:1095-100.
- 45) Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. *N Engl J Med* 1997;336:912-8.
- 46) van Acker SABE, Tromp MNJL, Haenen GRMN, van der Vijgh WJF, Bast A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:755-9.
- 47) Miani G, Serafini M, Salucci M, Azzini E, Ferro-Luzzi A. Application of a new high-performance liquid chromatographic method for measuring selected polyphenols in human plasma. *J*



- Chromatogr B 1997;692:311-7.
- 48) Granowitz EV, Porat R, Mier JW, Orencole SF, Kaplanski G, Lynch EA, et al. Intravenous endotoxin suppresses the cytokine response of peripheral blood mononuclear cells of healthy humans. *J Immunol* 1993;151:1637-45.
- 49) Roth J, McClellan JL, Kluger MJ, Zeisberger E. Attenuation of fever and release of cytokines after repeated injections of lipopolysaccharide in guinea-pigs. *J Physiol* 1994;477:177-85.
- 50) Chang CC, McCormick CC, Lin AW, Dietert RR, Sung YJ. Inhibition of nitric oxide synthase gene expression in vivo and in vitro by repeated doses of endotoxin. *Am J Physiol* 1996;271:G539-48.
- 51) Li MH, Seatter SC, Manthei R, Bubrick M, West MA. Macrophage endotoxin tolerance: Effect of TNF or endotoxin pretreatment. *J Surg Res* 1994;57:85-92.
- 52) Ogle CK, Guo X, Chance WT, Ogle JD. Induction of endotoxin tolerance in rat bone marrow cells by in vivo infusion of tumor necrosis factor. *Crit Care Med* 1997;25:827-33.
- 53) Makhlouf M, Zingarelli B, Halushka PV, Cook JA. Endotoxin tolerance alters macrophage membrane regulatory G proteins. *Prog Clin Biol Res* 1998;397:217-26.