

クロロゲン酸類の DPPH ラジカル消去活性と マウスマクロファージ様細胞に対する影響について

渡辺 悟 三沢尚子 坂上 宏*

DPPH Radical Scavenging Activity of Chlorogenic Acid Related Compounds and their Effects against Mouse Macrophage-like Cells

SATORU WATANABE, NAOKO MISAWA and HIROSHI SAKAGAMI*

Green coffee contains a large amount of polyphenols, especially caffeoyl quinic acid (CQA) related compounds. Using TOYOPEARL HW-40F column chromatography, five fractions (I ~ V) were separated from green coffee bean extract. HPLC technique demonstrated that Frs. II and III were mainly composed of CQA, whereas Frs. IV and V were mainly composed of diCQA.

We measured the DPPH radical scavenging activity of these fractions. Frs. III and V had higher DPPH radical scavenging activities than green coffee bean extract. We also investigated the effect of these fractions on the cytotoxicity and the nitric oxide (NO) production by LPS-activated mouse macrophage-like Raw 264.7 cells. Noncytotoxic concentration of Fr. III (CQA fraction) inhibited NO production by activated Raw 264.7 cells. Fr. IV (diCQA fraction) showed higher cytotoxicity and increased NO production at lower concentration.

The present study demonstrated that green coffee bean extract contains numerous substance which regulate the function of activated macrophages.

クロロゲン酸 (5-カフェオイルキナ酸、5-CQA) はコーヒー生豆から初めて単離され、多くの双子葉植物の果実や葉などに広く分布する¹⁾。5-CQA はこれまでに抗 HIV 活性²⁾、抗酸化活性^{1, 3, 4)}、発癌抑制活性^{5, 6, 7, 8)}、チトクローム P450 酵素に対する修飾活性^{9, 10)}、抗アレルギー誘発活性¹¹⁾、抗糖尿病作用^{12, 13, 14)}等の様々な生物学的活性を示すことが報告されている。そして新たに著者らは5-CQAがある種の癌細胞のアポトーシスを誘導すること

を報告した¹⁵⁾。

クロロゲン酸 (5-CQA) はキナ酸の5位の水酸基とコーヒー酸のカルボキシル基がエステル結合した構造をもつ (Fig. 1)。

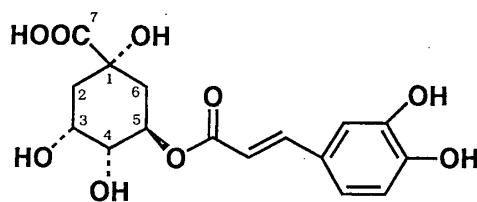


Fig. 1 Chlorogenic Acid

Key words : Chlorogenic acid, DPPH radical, Macrophage-like cells

*明海大学 歯学部

キナ酸には全部で4つの水酸基がついており、3位、4位、5位の水酸基にコーヒー酸が結合したものが知られている。3位についたものをネオクロロゲン酸 (3-CQA)、4位についたものはクリプトクロロゲン酸 (4-CQA)、そして3、4、5位のうち2箇所についたものをイソクロロゲン酸 (diCQA)、3箇所ついたものをトリカフェオイルクロロゲン酸 (triCQA) と呼び、そしてこれらを総称して CQA 類と呼んでいる。

CQA 類はコーヒー生豆に多く含まれる。本報告では、コーヒー生豆抽出物から CQA 類画分を得、それらの DPPH ラジカル消去活性、LPS 処理により活性化したマクロファージ様細胞による一酸化窒素 (NO) 産生に対する抑制活性、そして細胞毒性を測定したのでここに報告する。

材料と方法

1. 試薬

コーヒー生豆抽出物 (クロロゲン 50) は研光通商社製のものを使用した。クロロゲン酸 (5-caffeoyl quinic acid、以下 5-CQA) と DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) は和光純薬社製のものを使用した。DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) はギブコ社製、MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl] 2, 5-diphenyltetrazolium bromide)、LPS (lipopolysaccharide) および FBS (fetal bovine serum) はシグマ社製のものを使用した。Griess 試薬はモレキュラープローブ社製のものを使用した。

他のすべての試薬は市販品特級またはこれに準ずるものを使用した。

2. トヨパール HW-40F による分離

東ソー社製のゲルろ過クロマトグラフィー用充填剤トヨパール HW-40F をカラム (2.0 ϕ \times 700 mm) に充填して使用した。溶離液は HPLC 用蒸留水を用い、流速 25.6 mL/min で 7.9 mL/tube で分画した (吸光度は 5-CQA の極大吸収波長である 325 nm で測定した)。

3. 吸光度と吸収スペクトルの測定

吸光度と吸収スペクトルの測定は、島津自記分光光度計 UV-2200 型を用いた。MTT 法による生細胞数の測定と Griess 試薬による NO 濃度の定量においては、東ソー社製マイクロプレートリーダー (MPR-A4i II) を用いて 540 nm で測定した。

4. 高速液体クロマトグラフィーによる分析

カラムは野村化学社製の Develosil C30-UG-5 (4.6 ϕ \times 250 mm) を用い、ポンプは日立製作所製の L-6200、検出は東ソー社製の多波長検出器 PD-8020 を使用した。

溶離液として A 液 [1% 酢酸・アセトニトリル (95 : 5, v/v)] と B 液 [1% 酢酸・アセトニトリル (5 : 95, v/v)] の 2 種を用いた。A 液 100%・B 液 0% から 30 分で A 液 50%・B 液 50% になるようにグラジエント溶出した。流速は 1.0 mL/min でカラムオープンの温度は 40 $^{\circ}$ C でおこなった。

5. DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性の測定は吸光度法によりおこない、517 nm の吸光度を測定した。つまり、0.5 mM DPPH・エタノール溶液 1 mL と トリス・塩酸緩衝液 (pH7.4) 900 μ L に各試料 100 μ L を加え混合し、10 分以内で 517 nm の吸光度を測定した。

6. 細胞培養

マウスマクロファージ様細胞 (Raw 264.7) は非働化 (56 $^{\circ}$ C、30 min) した FBS を 10% 添加した DMEM 培地中で 5% CO₂ インキュベーターにおいて培養した。

7. 細胞毒性活性の測定

CQA 類の様々な濃度下で 100 ng/mL の LPS 処理したものとしなない Raw 264.7 を 24 時間培養した。リン酸緩衝液 (pH7.4) で一度洗浄し、0.2 mg/mL MTT を含む培養液 0.1 mL 中で 37 $^{\circ}$ C で 4 時間インキュベートした。その後、培養液を除去し、0.1 mL の DMSO で細胞を溶かし、540 nm における吸光度を測定した。その値は生細胞数に反映し、検量線から生細胞を 50% 減少させる CQA 類の濃度 (CC₅₀) を算出した^{16, 17)}。

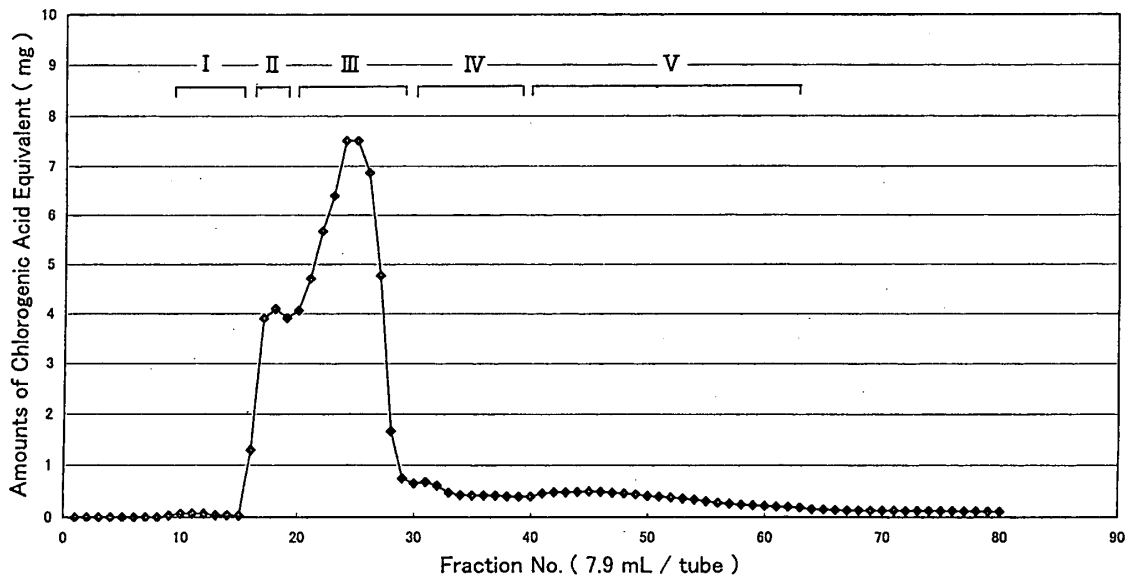


Fig. 2 Elution Pattern of Chlorogen 50 on TOYOPEARL HW-40F.

8. 一酸化窒素 (NO) 濃度の測定

様々な濃度の CQA 類存在下で 24 時間培養した後、産生された NO 濃度を、NO₂⁻を用いた標準曲線より Griess 試薬を用いて定量した。

結果および考察

1. クロロゲン 50 からの CQA 類の分離

CQA 類はコーヒー生豆に多く含まれるので、コーヒー生豆から CQA 類が量的に分取できるか否かを検討した。コーヒー生豆抽出物としてクロロゲン 50 (研光通商社製) 200 mg/10 mL をトヨパール HW-40F カラムに供した。分画後、5-CQA の極大吸収波長である 325 nm の吸光度を測定し、5-CQA 相当量を算出した。その結果を Fig. 2 に示した。Fig. 2 に示すように画分 I ~ V に分け、それぞれを凍結乾燥して、凍結乾燥粉末を得た。I ~ V の収量はそれぞれ 29.0, 49.8, 56.4, 17.2, 8.0 mg であったが、画分 I には CQA 類が検出されなかったので以後の実験に供さなかった。分離の状況を把握するため、もとのクロロゲン 50 と分取した画分 II ~ V の HPLC 分析をおこなった (Fig. 3)。

トヨパール HW-40F を用いたゲルろ過により、分子量の大きい diCQA が CQA よりおくれて溶出された (Fig. 2, 3)。画分 II と III

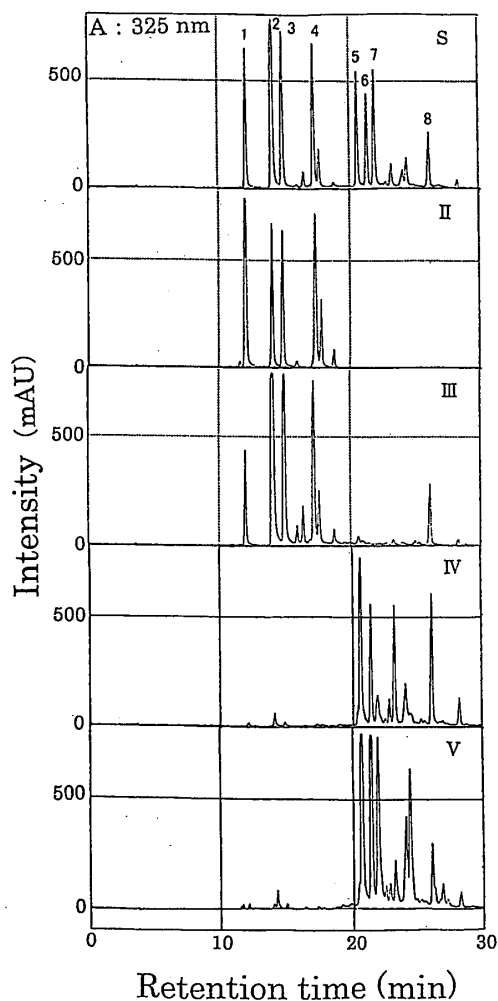


Fig. 3 HPLC Pattern of Chlorogen 50 (S), Fraction II, III, IV and V.
1 : 3-CQA, 2 : 5-CQA, 3 : 4-CQA, 4 : Caffeine,
5 : 3, 4-diCQA, 6 : 3, 5-diCQA, 7 : 4, 5-diCQA,
8 : 3, 4, 5-triCQA

は主に CQA を含み、画分ⅣとⅤは主に diCQA を含んでいた。このことは、分子ふるいではなく逆相の原理により分離されていることを示す。事実、トヨパール HW-40 が逆相クロマトとして使われている例がある¹⁸⁾。

画分Ⅴは Fig. 2 でわかるようになりに液量が多く、この画分の溶出にはアルコール等を用いたグラジエント溶出が適当と思われる。またカラムを長くすることにより、CQA 類の分離がさらに良くなることが推測される。

2. CQA 類の DPPH ラジカル消去活性

クロロゲン 50、画分Ⅱ～Ⅴの DPPH ラジカル消去活性を吸光度法により測定した。

まず 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mM の 5-CQA の DPPH ラジカル消去活性をプロットした検量線より、5-CQA の DPPH ラジカル消去活性と各試料のそれを測定して比較した。その結果を Table. 1 に示した。各試料はいずれも 5-CQA より活性が低かったが、クロロゲン 50 を 1 とした比活性は、画分Ⅲが 1.59、画分Ⅴが 1.41 と高かった。特に収量の多い画分Ⅲは CQA を主体とした抗酸化剤と

しての有効利用が考えられる。

3. CQA 類のマクロファージ様細胞に対する影響について

マウスのマクロファージ様細胞 (Raw 264.7) における LPS 刺激の有無による NO 産生に対する各試料による抑制効果を調べた。試料としては、5-CQA、クロロゲン 50、画分ⅢとⅣを用いた。画分Ⅴは収量が低かったため測定できなかった。50 %細胞障害濃度 [CC₅₀ (μg/mL)] と NO 産生を 50 %阻害する濃度 [EC₅₀ (μg/mL)]、そして EC₅₀ に対する CC₅₀ の割合 [SI (CC₅₀/EC₅₀)] を Table. 2 に示した。SI が高いということは、細胞に障害を与えない濃度で NO 産生を抑制する活性が強いことを示す。

Table. 2 からわかるように、5-CQA、クロロゲン 50、画分Ⅲはいずれも CC₅₀ 値は LPS の有無にかかわらず 2 mg/mL 以上であった。それ以上添加すると培地の pH (7.4) が低くなり培養条件が変化したため、数値を出せなかった。これらの試料は細胞毒性が極めて低いと考えられる。画分Ⅳは 2 mg/mL 添

Table 1 DPPH-radical Scavenging Activity of Chlorogenic Acid Related Compounds

Sample	Activity (5-CQA = 100%)	Relative activity
Chlorogen 50	26.9	1.00
Ⅱ	16.5	0.61
Ⅲ	42.9	1.59
Ⅳ	19.6	0.73
Ⅴ	37.8	1.41

Table 2 Effect of Chlorogenic Acid Related Compounds on NO Production by LPS-stimulated Macrophage-like Cells

Sample	Cytotoxicity CC ₅₀ (μg/mL) *		Inhibition of NO production EC ₅₀ (μg/mL) **	Selectivity index SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)
	LPS (-)	LPS (+)	LPS (+)	
Chlorogenic acid	> 2000	> 2000	80	> 25.0
Chlorogen 50	> 2000	> 2000	106	> 18.9
Ⅲ	> 2000	> 2000	175	> 11.4
Ⅳ	1917	1364	> 2000	< 0.68

* CC₅₀: 50% cytotoxic concentration

** EC₅₀: Concentration required to inhibit NO production by 50%.

(Control cells produced 5 ~ 15 μM NO in the culture medium.)

加するとマクロファージ細胞数を50%減少させ、LPS添加のほうが添加しないよりいっそう細胞数を減少させた。LPSとdiCQAの共存による細胞毒性の増強が考えられる。

一方、NO産生を50%阻害する濃度は5-CQA<クロロゲン50<画分Ⅲの順で少しずつ高くなった。これは、純品の5-CQAが最も阻害活性が低く、5-CQAを含む混合物のクロロゲン50と画分Ⅲの阻害活性は弱いことを意味する。クロロゲン50や画分Ⅲには5-CQAの作用を弱める物質が含まれているのではないかと考えられる。画分Ⅳは反対に125 μg/mL添加したときにNO産生を10.1 μMから22.3 μMに上昇させた。それ以上の濃度ではNO産生を下降させたが、計算上50%阻害する濃度は2 mg/mL以上になった。これは、画分Ⅳがマクロファージ様細胞を活性化する物質とNO産生を阻害する物質の両方を含む可能性が考えられる。

SI値が最も高かったのは5-CQAであり、細胞を殺さずにNO産生を抑制するという安全な抗酸化剤であると考えられる。一方、diCQAが主成分の画分ⅣはCQAより細胞毒性があり、NO産生を上昇させ、低いSI値を示した。画分ⅣにはtriCQAも含まれており、それが細胞障害性に関与している可能性がある。

5-CQAはNO産生抑制活性と同様にDPPHラジカル消去活性も最も高かった。これに対してクロロゲン50、画分ⅢとⅣにおいては、NO産生抑制活性とDPPHラジカル消去活性とは一致しなかった。今後、CQA類の各成分を単離して、純品で比較実験を行う必要があるものとする。また、NO産生の抑制と癌細胞のアポトーシスの誘導との相関や、NO消去活性と抗炎症作用との相関をも検討する必要がある。

要 約

CQA類はコーヒー生豆に多く含まれる。トヨパールHW-40Fカラムにより、コーヒー生豆抽出物は5つの画分(I~V)に分画

された。逆相HPLC分析の結果、画分ⅡとⅢはCQAが、画分ⅣとⅤはdiCQAが主成分であった。

得られた画分のDPPHラジカル消去活性を吸光度法により測定した。画分ⅢとⅤはいずれももとのクロロゲン50よりDPPHラジカル消去活性が高かった。

また、細胞毒性とNOの産生抑制活性をLPSで活性化されたマウスマクロファージ様細胞(Raw 264.7)を用いて調べた。細胞障害を与えない濃度の画分Ⅲは、活性化されたRaw 264.7細胞によるNO産生を抑制した。一方、画分Ⅳは細胞毒性が画分Ⅲよりあり、ある濃度でNO産生を上昇させた。

本研究により、コーヒー生豆抽出物には、活性化マクロファージを調節する様々な物質が含まれていることが判明した。

文 献

- 1) PAGANGA, G., MILLER, N. and RICE-EVANS, C.A.: *Free Radic. Res.*, **30** (2), 153 (1999)
- 2) McDUGALL, B., KING, P.J., WU, B.W., HOSTOMSKY, Z., REINECKE, M.G. and ROBINSON, W.E.JR.: *Antimicrob Agents Chemother.*, **42** (1), 140 (1998)
- 3) YOSHINO, M. and MURAKAMI, K.: *Anal. Biochem.*, **257** (1), 40 (1998)
- 4) KONO, Y., KASHINE, S., YONEYAMA, T., SAKAMOTO, Y., MATSUI, Y. and SHIBATA, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62** (1), 22 (1998)
- 5) MORISHITA, Y., YOSHIMI, N., KAWABATA, K., MATSUNAGA, K., SUGIE, S., TANAKA, T. and MORI, H.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **88** (9), 815 (1997)
- 6) STICH, H. F.: *Prev. Med.*, **21** (3), 377 (1992)
- 7) TANAKA, T., NISHIKAWA, A., SHIMA, H., SUGIE, S., SHINODA, T., YOSHIMI, N., IWATA, H. and MORI, H.: *Basic Life Sci.*, **52**, 429 (1990)
- 8) TANAKA, T., KOJIMA, T., KAWAMORI, T., WANG, A., SUZUI, M., OKAMOTO, K. and MORI, H.: *Carcinogenesis*, **14** (7), 1321

- (1993)
- 9) TEEL, R. W. and HUYNH, H.: *Cancer Lett.* **27**, **133 (2)**, 135 (1998)
- 10) BAER-DUBOWSKA, W., SZAEFER, H. and KRAJKA-KUZNIAK, V.: *Xenobiotica*, **28 (8)**, 735 (1998)
- 11) ITO, H., MIYAZAKI, T., ONO, M. and SAKURAI, H.: *Bioorg. Med. Chem.*, **6 (7)**, 1051 (1998)
- 12) JIANG, Y., KUSAMA, K., SATOH, K., TAKAYAMA, F., WATANABE, S. and SAKAGAMI, H.: *Phytomedicine*, **7 (6)**, 483 (2000)
- 13) ARION, W. J., et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **339**, 315 (1997)
- 14) 野田栄作ら：平成 13 年度和歌山県工業技術センター「研究報告」, 17 (1999)
- 15) ADIDOFF, M. T., et al.: *Moscou, clinical report*, **12**, (1999)
- 16) SAKAGAMI, T., SATOH, K., ISHIHARA, M., SAKAGAMI, H., TAKEDA, F., KOCHI, M. and TAKEDA, M.: *Anticancer Res.*, **20**, 3143 (2000)
- 17) TERASAKA, H., TAKAYAMA, F., SATOH, K., FUZISAWA, S. and SAKAGAMI, H.: *Anticancer Res.*, **20**, 3357 (2000)
- 18) XIN-MIN, C., YOSHIDA, T., HATANO, T., FUKUSHIMA, M. and OKUDA, T.: *Phytochemistry*, **26**, 515 (1987)
-