

## 【第133回生涯教育講座】

# テオブロミンの経口投与および ダークチョコレート摂取による 認知機能の向上

し 藤 おさむ すみ よし え り  
紫 藤 治<sup>1)</sup> 住 吉 愛 理<sup>1)</sup>  
まつ ざき けん た ろう すぎ もと なお とし  
松 崎 健 太 郎<sup>1)</sup> 杉 本 直 俊<sup>2)</sup>

キーワード：テオブロミン，チョコレート，神経栄養因子，認知機能，前頭葉機能

## はじめに

テオブロミン (theobromine) はカフェインやテオフィリンと似た構造を持つメチルキサンチン誘導体であり (図1), 1878年にカカオ (*Theobroma cacao*) から抽出されたアルカロイドである。カカオを多量に使用した食品 (ダークチョコレートやココアなど) には当然ながらテオブロミンが多く含まれている。近年, カカオを多量に使用した食品の摂取がヒトの健康維持や健康増進に有効であるとする研究結果が幾つか報告されている。特に循環器系においてはダークチョコレートの摂取により血圧が低下することが示唆されている<sup>1)</sup>。良く知られるように, カカオにはポリフェノール (カカオポリフェノール) も多く含まれている。ポリフェノール類には強い抗酸化作用があり, ポリフェノールの経口摂取により, 抗炎症作用, 抗アレルギー作用, 認知機能維持作用

## メチルキサンチン誘導体

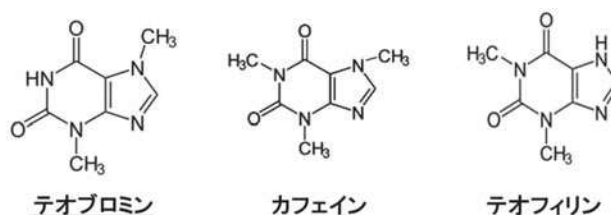


図1 三種のメチルキサンチン誘導体の構造

テオブロミンはチョコレート・ココアに多く含まれ, カフェインとテオフィリンはコーヒー, 紅茶・緑茶に多く含まれる。カフェインとテオフィリンは日本薬局方に収載された薬剤でもある。

などが誘導される。したがって, カカオを多量に含む食品の生体への効果はカカオポリフェノールに由来する可能性が高いと考えられていた。しかし, 先述のよう特徴的なカカオ由来成分にテオブロミンがある。テオブロミン自体も様々な薬理作用を有しており, 例えば, ヒト由来の悪性神経膠腫細胞の増殖を抑制することが示唆されている<sup>2)</sup>。近年, 我々のグループは長期間のテオブロミン摂取の生体への効果について, 認知機能の変化を中心に動物を用いて検討してきた。さらに, 健康成人を対象としダークチョコレートの長期摂取によ

Osamu SHIDO et al.

1) 島根大学医学部環境生理学講座

2) 金沢大学医薬保健研究域医学系, 島根大学医学部特別協力研究員  
連絡先: 〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1

島根大学医学部環境生理学講座

る認知機能の変化をも検討した。今回の講座では我々の得た動物実験の結果を簡潔に解説するとともに、ダークチョコレートに関する検討について詳細に紹介したい。なお、カカオの学術名の属名にあたる *Theobroma* はギリシャ語で「神様 (theos)」の「食べ物 (broma)」を意味しているようで、カカオも高貴な食べ物であったようである。

### 動物実験におけるテオブロミンの経口投与の効果

#### 1. 生体内での動態

マウスおよびラットを用いて、普通食餌もしくはテオブロミン含有食餌 (0.05%W/W) を摂取させる実験を行った。最初に、普通食餌にはテオブロミンとカフェインが含まれていないこと、さらに、テオブロミン食餌にはカフェインが含まれていないことを質量分析により確認した。

マウスでは、30日間のテオブロミン食餌期間後、血漿と脳内 (大脳皮質および海馬) にテオブロミ

ンが検出され、カフェインは検知されなかった<sup>3)</sup>。また、脳内のテオブロミン濃度は血漿中の10分の1程度であった。普通食餌群の血中と脳内からはテオブロミンやカフェインは検出されてはいない。これらの結果は、マウスではテオブロミンが生体内でカフェインに変換されないこと<sup>4)</sup>、さらに、テオブロミンは血液脳関門を通過できるが、その通過にはある程度の制限があることを示唆している。

ラットでテオブロミン食餌開始後の血漿、肝臓、大脳皮質のテオブロミン濃度を検討したところ<sup>5)</sup>、血漿濃度はテオブロミン食餌開始後30日から急激に増加し、大脳皮質濃度は40日から急激に増加した (図2)。マウスと同様に大脳皮質濃度は血漿濃度の10分の1に近かった。肝臓の濃度は明確な経時的変化はなかった。

以上からマウスやラットを用いる場合、テオブロミンの明確な生体への効果を観察するのに30~40日以上 of 長期のテオブロミン食餌が望まれることが考えられる。さらに、テオブロミン摂取後に観察される効果は様々な薬理作用を有するカフェ

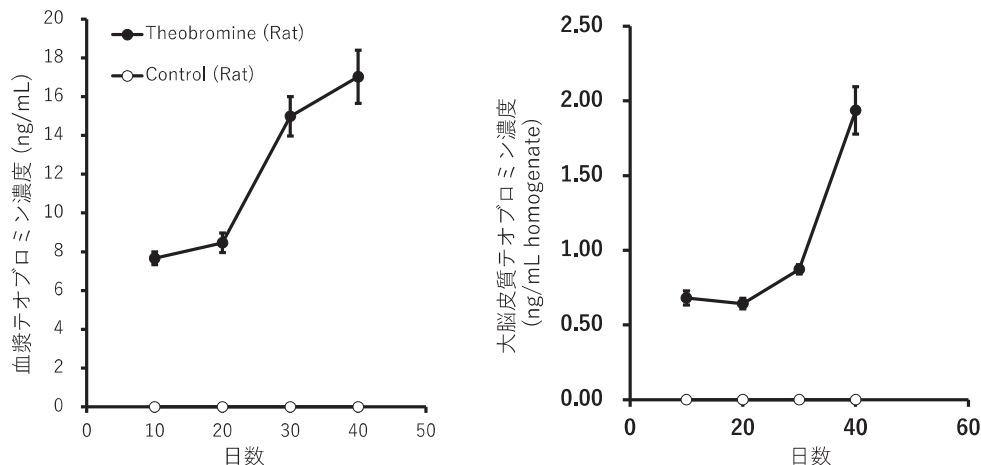


図2 ラットの血漿中および大脳皮質のテオブロミン濃度変化

横軸はテオブロミン食餌開始後の日数を示す。テオブロミン食餌 (theobromine ●) 開始後30日以降で両濃度は急激に上昇している。普通食 (control ○) ではテオブロミンは検出されていない。

インを介するものでなく、テオブロミン自体の直接的作用によるものであることが推察された。なお、テオブロミン摂取により、体重の増加の程度や一般的血液生化学検査結果などにおいて異常は観られていない。

## 2. 認知機能への影響

テオブロミン食餌によるマウスの学習能力をオペラント行動実験で評価した<sup>3)</sup>。「レバーを押すと餌がもらえる」1レバータスクとより複雑で高度な「三つのレバーを特定の順で押すと餌がもらえる」3レバータスクを学習させ、成功率{(餌をもらえた回数) ÷ (レバーを押した回数) × 100}を算出した。30日間の普通食餌あるいはテオブロミン食餌の後、30日間の普通食餌を与え、その後行動実験を行った。1レバータスクではテオブロミン食餌によって成功率は変化しなかった。しかし、3レバータスクではテオブロミン食餌により成功率が有意に高くなった(図3)。また、大脳皮質および海馬では神経成長因子の一つである脳

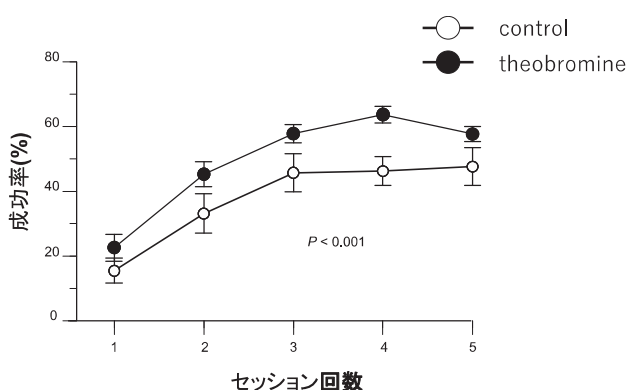


図3 マウスのオペラント行動実験での成功率

横軸は一回の実験による3レバータスクの試行回数を示し、縦軸は30日間のテオブロミン食餌終了後30日目の実験におけるタスクの成功率を示す。普通食餌(○)に比べてテオブロミン食餌(●)では成功率が有意に上昇している。(Yoneda et al., J Nutr Biochem. 39: 110-116, 2017.から改変)

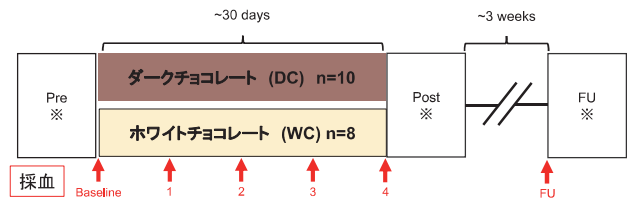
由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) の濃度が30日間のテオブロミン食餌後有意に増加した。これらから、マウスでは長期のテオブロミン摂取は運動学習 (motor learning) 能力を亢進させる可能性があること、特に、さまざまな要素 (順序学習, スキル学習, 適応) を含む複雑な運動学習に効果的であることを示唆している。さらに、テオブロミン食餌後30日経過しても運動学習能力が向上しているところから、テオブロミンは脳内でBDNFを誘導し神経新生などを介して運動学習能力を改善する可能性が考えられる。

同様の検討をラットでも行った<sup>6)</sup>。73日間の普通食餌あるいはテオブロミン食餌の後、認知機能、学習機能を3種類の行動実験 (八方迷路, Y迷路, 新奇物体探索試験 novel object recognition test) で評価した。3種類の行動テストの結果はすべてテオブロミン食餌により向上していた。また、大脳皮質のBDNFはmRNAレベル, タンパクレベルともテオブロミン摂取により上昇していた。マウスと同様にラットでも長期のテオブロミン摂取が脳内でのBDNF誘導を介して学習能力などを亢進させることが示唆される。ラットではテオブロミン食餌により海馬の神経幹/前駆細胞が分裂し、新生細胞数が増えるという結果を得ており (論文としては未発表), これが学習能力の向上に寄与している可能性がある。BDNFの誘導分子メカニズムなどについてもいくつか検討しているがここでは割愛させて頂くので、ご興味のある方は論文<sup>3,5,6)</sup>を参照されたい。

## ヒトでのダークチョコレート摂取 による認知機能の向上<sup>7)</sup>

### 1. 被験者

先述のようにダークチョコレートには多量のテオブロミンが含まれているので、ヒトを対象にダークチョコレート摂取の認知機能への効果を検討した。対照の食品としてヤカカオマスを含まず同程度のカロリーのホワイトチョコレートを用いた（色でダークチョコレートと区別できるため、厳密な意味では対照食品とはいえない）。若年健康人（平均年齢22±3歳，男性13名，女性5名）を無作為に、ダークチョコレート摂取群（24.0 g/日）とホワイトチョコレート摂取群（24.5 g/日）の2群に分け、それぞれ約30日間チョコレートを摂取した。実験のプロトコルの概要は図4に示してある。以下、30日間のチョコレート摂取前の実験結果をPre，チョコレート摂取後の結果をPost，さらにチョコレート摂取終了から3週間経過した時点点をFU（follow-up）と表記する。実験期間中、被験者をコントロールするため次の制限を行った。1）カフェインを含む飲料（コーヒー，紅茶，日本茶など）は一日3カップ以内（毎食後一杯を想定）とする，2）実験期間中はチョコレートの摂取を禁止する，3）採血直前の飲水量は一定とする，4）認知機能のテスト前の1週間は起床，就寝時間を一定とし生体の日内リズムを安定させる，さらに5）認知機能テストの前日の夕食ならび当日の朝食，昼食は飲水量も含め被験者各々で同じものとする。1）～3）の結果，Preおよび対照被験者の血中メトキサンチンレベルは極めて低く保たれ，ダークチョコレートの摂取によってその濃度が大きく上昇することが確認された（図5）。さらに高いメ



※ 認知機能テスト

図4 ダークチョコレートを用いたヒト介入試験のプロトコル

Pre：チョコレート摂取前，Post：チョコレートを約30日間摂取した後，FU（Follow-up）：チョコレート摂取終了後3週間後（なおこの3週間はチョコレートを摂取していない）。（Sumiyoshi et al., Nutrients 11: 2800, 2019.から改変）

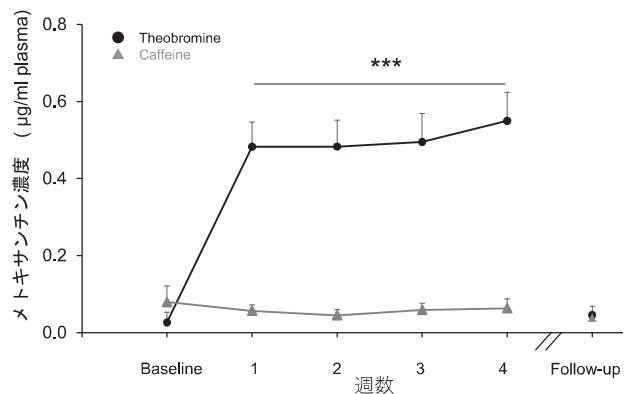


図5 チョコレート摂取前，中，後のヒトの血漿メトキサンチン濃度の変化

横軸はダークチョコレート摂取開始後の週数を示す。Baselineは摂取開始直前，Follow-upは約30日間のチョコレート摂取が終了した後3週間目を示す。縦軸はテオブロミン（Theobromine ●）とカフェイン（Caffeine ▲）の濃度を示す。テオブロミンはダークチョコレート摂取開始後1週間から安定して高値をとっている。（Sumiyoshi et al., Nutrients 11: 2800, 2019.から改変）

トキサンチンレベルは以後3週間安定していた。なお，FUではPreのレベルに戻っている。また，通常の血液生化学検査ではチョコレート摂取による明らかな数値の異常はなかった。

## 2. 認知機能

認知機能の評価法として、古くから使用されている Stroop color ward test<sup>8)</sup>を改変したテストを用いた。4種類の色(赤, 黄, 青, 緑)を示す漢字をそれら4色の色でランダムに印字し, さらに100文字をランダムに配列したシート(図6参照)を複数パターン用意した。実験時, 被験者には2種類のタスクをそれぞれ1分間課した。一つ目はシートの漢字を音読するもの(文字読み words test), 二つ目は漢字の印刷された色を答えるもの(色読み colors test)である。評価には様々な解析パラメータがあるが, ここでは単純に時間内での正当数で解析した。ダークチョコレートの摂取により文字読みの正当数が有意に上昇したが, ホワイトチョコレートには効果がなかった(図7左)。興味深いことに文字読み能力の亢進はダークチョコレート摂取3週間後も継続した。色読みでも同様の結果が得られたが, ホワイトチョコレート摂取後のFUでは正当数が有意に上昇した。ダークチョコレート摂取後のFUで

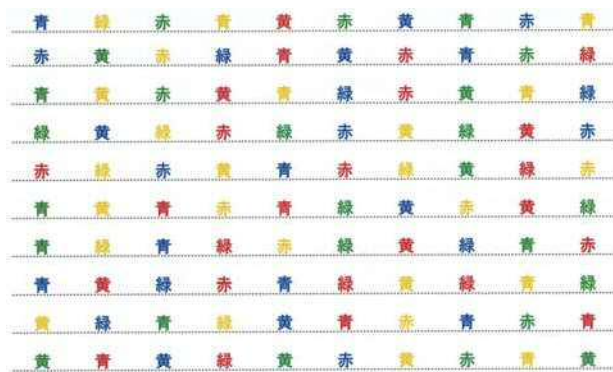


図6 改変 Stroop color ward test に用いた検査シートの一例

4種類の色(赤, 黄, 青, 緑)を示す漢字をそれら4色でランダム印字し, 100文字をランダムに配列したシート。異なったパターンのシートを多数用意した。

も Post に比べさらに正当数が増加する傾向があったことからこの変化は学習効果である可能性がある。また, FUではダークチョコレート摂取後の正当数がホワイトチョコレート摂取後より明らかに多くなっていた。これらから, ダークチョコレートの長期摂取は健康成人の認知機能を向上させること, さらに, その効果は以後少なくとも3

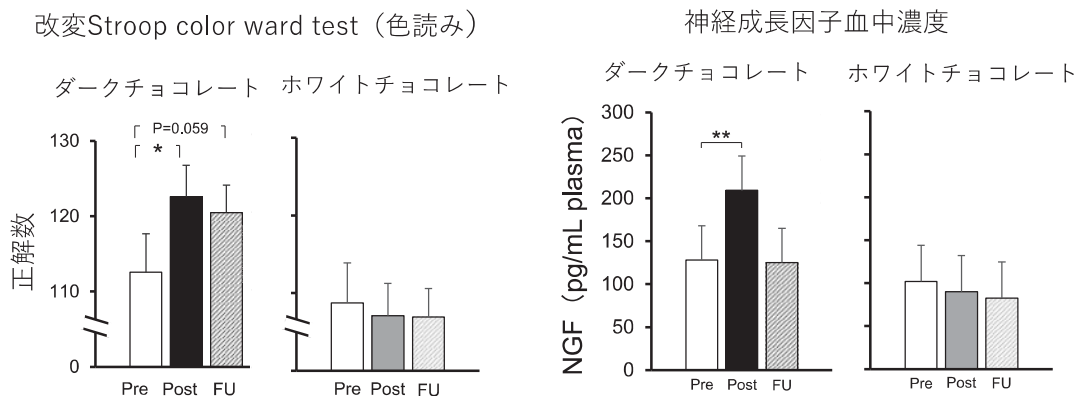


図7 認知機能テスト結果と神経成長因子 (NGF) 血中濃度

Pre, Post, FU はそれぞれチョコレート摂取前, チョコレートを約30日間摂取した後, チョコレート摂取終了後3週間後を示す。改変 Stroop color ward test (色読み) の正解数(左)はダークチョコレート摂取後有意に上昇し, FUでも継続した。ホワイトチョコレート摂取は正当数に影響しなかった。神経成長因子(NGF)濃度(右)はダークチョコレート摂取後有意に上昇したが, FUでは摂取前のレベルまで戻った。ホワイトチョコレート摂取により有意な変化はなかった。(Sumiyoshi et al., Nutrients 11: 2800, 2019. から改変)

週間は継続することが示唆された。

### 3. 前頭葉機能

前頭葉機能（高次脳機能）の評価として注意機能スクリーニングテスト（digital cancellation test, D-CAT）を用いた<sup>9)</sup>。これはトータル600個の0から9の数字から、指定された数字を見つけ出す方法で、用紙、解析法などは市販されているのでご興味のある方は参照願いたい。改変 Stroop color ward test の文字読みの結果と同様にダークチョコレート摂取の Post ではパフォーマンスが有意に亢進し、それはFUまで継続した。ホワイトチョコレート摂取では変化なかった。ヒトの前頭葉機能もダークチョコレート長期摂取により向上し、以後、長期間維持されることが示唆された。

### 4. 脳血流量

認知機能テスト前、中、後の前頭前野脳血流量を近赤外線分光法（near-infrared spectroscopy, NIRS）で、中大脳動脈脳血流量を超音波ドップラー法で測定した。ダークチョコレート摂取により認知機能テスト中の脳血流量が改善するとの結果は得られなかった。

### 5. 神経栄養因子

BDNF および他の神経栄養因子の一つである神経成長因子（nerve growth factor, NGF）の血漿濃度を測定すると、ダークチョコレート摂取により血漿 NGF 濃度が有意に上昇していた。ダークチョコレート摂取3週間後では血漿 NGF 濃度は Pre のレベルまで減少していた（図7右）。ホワイトチョコレート摂取では有意な変化はなかった。血漿 BDNF 濃度はダークチョコレート

摂取により上昇する傾向はあったが、有意な差ではなかった。ホワイトチョコレートの摂取は血漿 BDNF 濃度に影響しなかった。脳機能の活動には神経栄養因子が関与することが示唆されている。ダークチョコレート摂取によるヒトの認知機能の亢進には血漿 NGF 濃度の上昇が寄与している可能性が考えられる。

以上のように、健康若年成人ではダークチョコレートの継続的な摂取は、脳の活性化に関与する NGF を増加させ、認知機能を向上することが示唆された。さらに、チョコレート摂取を中止した後も認知機能の向上が少なくとも3週間は維持されることから、脳の形態学的変化が誘導されていることが推察される。

## おわりに

動物での検討では経口摂取したテオブロミンは血液脳関門を通過して脳実質に移行することが確認され、その結果特に複雑な認知学習機能を向上させた。この時、神経栄養因子の一種である BDNF が脳内で増加しており、また、認知学習機能の向上はテオブロミン摂取終了後30日目で確認されている。これらから、テオブロミンは脳の機能を短期的に亢進させるのみならず、神経シナプスや樹状突起の形成、神経新生など脳の形態を変化させることにより、長期的に認知学習機能を向上させる可能性が示唆される。ヒトにおいてもテオブロミンを多量に含むダークチョコレートの長期摂取により動物での検討と同様の結果を得た。すなわち、血中の NGF が増加し、認知機能や前頭葉機能の亢進が示唆された。さらに、その認知機能向上はダークチョコレート摂取後、3週間は維持されていた。無論、ダークチョコレートには

ポリフェノールなど薬理活性をもつ物質が含まれるため、これらヒトでの結果がテオブロミン自体に起因すると結論はできないが、少なくとも一部には関与することが十分に考えられる。

テオブロミンは類似のメチルキサンチン誘導体であるカフェインやテオフィリンと異なり、医薬品として扱われていないようである。このためかその作用を検討する余地が未だに多く残されている。

テオブロミンは非常に安定した物質で扱いやすく、また、幾つかの食品に豊富に含まれている。今回はヒトや動物の認知機能を中心とした検討であったが、大げさな言い方をすると、今後、単独の医薬品として、あるいは食品に含まれる場合は特定保健用食品や機能性食品などとして、様々な医療の分野において広くその利用や応用が期待される。

### 参 考 文 献

- 1) Grassi D, Desideri G, Necozione S, Lippi C, Casale R, Properzi G, Blumberg JB, Ferri C. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *J Nutr*. 138: 1671-1676, 2008.
- 2) Sugimoto N, Miwa S, Hitomi Y, Nakamura H, Tsuchiya H, Yachie A. Theobromine, the primary methylxanthine found in *Theobroma cacao*, prevents malignant glioblastoma proliferation by negatively regulating phosphodiesterase-4, extracellular signal-regulated kinase, Akt/mammalian target of rapamycin kinase, and nuclear factor-kappa B. *Nutr Cancer*. 2014; 66(3): 419-23. doi: 10.1080/01635581.2013.877497. Epub 2014 Feb 18. PMID: 24547961
- 3) Yoneda M, Sugimoto N, Katakura M, Matsuzaki K, Tanigami H, Yachie A, Ohno-Shosaku T, Shido O. Theobromine up-regulates cerebral brain-derived neurotrophic factor and facilitates motor learning in mice. *J Nutr Biochem*. 39: 110-116, 2017.
- 4) Czok G. Zur Frage der biologischen Wirksamkeit von Methylxanthinen in Kakaoprodukten. *Z Ernährungswiss* 13: 165-171, 1974.
- 5) Sugimoto N, Katakura M, Matsuzaki K, Sumiyoshi E, Yachie A, Shido O. Chronic administration of theobromine inhibits mTOR signal in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019 May; 124(5): 575-581. doi: 10.1111/bcpt.13175. Epub 2018 Dec 12. PMID: 30451374
- 6) Islam R, Matsuzaki K, Sumiyoshi E, Hossain ME, Hashimoto M, Katakura M, Sugimoto N, Shido O. Theobromine Improves Working Memory by Activating the CaMKII/CREB/BDNF Pathway in Rats. *Nutrients*. 2019 Apr 20; 11(4): 888. doi: 10.3390/nu11040888.
- 7) Sumiyoshi E, Matsuzaki K, Sugimoto N, Tanabe Y, Hara T, Katakura M, Miyamoto M, Mishima S, Shido O. Sub-Chronic Consumption of Dark Chocolate Enhances Cognitive Function and Releases Nerve Growth Factors: A Parallel-Group Randomized Trial. *Nutrients*. 11: 2800, 2019. doi: 10.3390/nu11112800.
- 8) Stroop, J. R. Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of experimental psychology* 18, 643 (1935).
- 9) Hatta, T., Yoshizaki, K., Ito, Y., Mase, M. & Kabasawa, H. Reliability and validity of the digit cancellation test, a brief screen of attention. *Psychologia* 55, 246-256 (2012).