

令和元年6月19日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00920

研究課題名(和文)現代の生活習慣が引き起こす血栓症を予防する新規食品機能成分の探索と応用

研究課題名(英文) Search and application of novel functional food and its components that prevent thrombosis caused by modern lifestyle

研究代表者

大藏 直樹 (Naoki, Ohkura)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：60349256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肥満、加齢、睡眠障害によって血栓傾向となるモデルマウスを用い、現代の生活習慣によって乱れた血液凝固系が原因となって生じる血栓傾向を改善する新規食品機能成分を見出し、食生活からの血栓症の予防に応用することが目的である。モデルマウスを用いて検討を行ったところ、アシタバ黄汁や黒酢の摂取はこれらのマウスの血栓傾向を改善できる可能性ことがわかった。アシタバ黄汁や黒酢は本研究の目的である食生活からの血栓症の予防に応用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、現代の生活習慣が引き起こす血栓症を食生活から予防できる食品やその食品成分の候補を見出すことができた。これらの食品を食生活に取り入れたり、食品成分を利用して新たな保健機能食品を開発すれば、血栓症の予防という面から国民の健康な生活の維持に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used a mouse model that is prone to thrombosis due to obesity, aging, and sleep disorders, and found a new food functional component that improves the thrombotic tendency caused by the modern disturbed lifestyle. The aim of this study is to apply these components to prevent thrombosis. By using various model mice, it was found that intake of ashitaba and kurozu may improve the thrombotic tendency. Our study showed that ashitaba and kurozu may be applicable to the prevention of thrombosis from the diet.

研究分野：血栓止血学

キーワード：食品機能 血栓症 生活習慣

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の国民の生活では、シフトワークや深夜勤務が日常的になっている。航空機での海外渡航で、時差ぼけを頻繁に経験するビジネスマンも多い。また、食の欧米化により肥満が原因で発症する糖尿病患者も増加傾向にある。このような生活習慣は、エコノミークラス症候群や脳梗塞、心筋梗塞など、血栓が原因で起こる疾患(血栓症)の発生とも密接な関係がある。一方で、社会の成熟に伴い、わが国は世界が経験したことのない超高齢者社会を迎えつつあるが、高齢者は血液凝固系のバランスが乱れやすく、血栓症を発症しやすい。現代社会の生活習慣や高齢化による血栓症の増加は大きな社会問題であり、将来に向けて、今、何らかの対策を行う必要がある。

2. 研究の目的

深夜勤務やシフトワーク、睡眠障害による生活リズムの乱れ、肥満や糖尿病などの生活習慣病は血栓症の発症リスクを増加させる。また、我が国が直面している社会の超高齢化により、今後確実に血栓症が増加する。

本研究では、当研究グループで構築し利用してきた、肥満、加齢、睡眠障害、時差ぼけによって血栓傾向が見られる独創的なモデルマウスによる評価系を応用し、現代の生活習慣によって起こる血栓症を日常の食生活から予防する新しい食品成分を見出して、ヒトで応用することを目的とした研究を行った。

本研究は、見出した食品機能成分を使って、新たな保険機能食品の利用基盤を築き、食生活からの血栓症の予防を目指すものである。

3. 研究の方法

血液凝固反応への影響は、抽出物やその分画物を血漿に加え、凝固開始剤添加後の血漿の凝固時間が延長するかどうかをコアギュロメーターで調べた。血小板凝集は、全血に検体を添加した後に血小板凝集開始物質を添加し、自動セルカウンターを用いて、血小板数の減少を指標に検出した。Plasminogen activator inhibitor 1(PAI-1)産生抑制効果は、産生血管内皮細胞(EA.hy926)を検体存在下で培養後にTNF- α を添加して刺激し、その後に培地中のPAI-1濃度をELISAにより測定して評価した。

マウスを用いた検討では、肥満・糖尿病マウス(TSOD)、15ヶ月齢まで飼育した高齢のICRマウス、睡眠障害マウス(PLoS One, 2013;8(1):e55452.)、SAMマウスなどを使用した。検体を含む餌を摂取させ、麻酔下で採取した血液から血漿を調製し凝固線溶因子の抗原量や活性を測定し、心臓、肝臓、白色脂肪組織におけるmRNAの発現を調べた。

4. 研究成果

(1) *in vitro* の評価系を用いた探索

黒酢 10 倍濃縮液および黒酢もろみ末のエタノール抽出物については血管内皮細胞からのPAI-1産生を抑制する効果が見られた。黒酢もろみ末のエタノール抽出物については、血小板の凝集を抑制する効果を見出した。そこで、黒酢 10 倍濃縮液と黒酢もろみ末のエタノール抽出物について、各種クロマトグラフィーを用いて分画を行い、血管内皮細胞からのPAI-1産生抑制を指標に、活性成分の単離を試みたが、分画後に活性が消失してしまったため単離は断念した(第19回Pharmaco-hematologyシンポジウム)。活性物質が微量であったり不安定であったりしたため、分画の過程で活性が消失したと思われる。黒酢もろみ末エタノール抽出物については、血小板凝集抑制物質の単離を進めたが、この活性も分画後に失われてしまった。なお、黒酢 10 倍濃縮液についてはDiaion HP-20カラムからのアセトニトリル溶出画分に血液凝固反応を阻害する物質が含まれることがわかり、その後も分画を進めているが、研究期間内での単離には至らなかった。

食品に含まれる種々のポリフェノールを用いて血液凝固反応を阻害するものの探索を行った。その結果、アシタバ由来のポリフェノールであるキサントアンゲロールがトロンビンの活性を弱いながらも阻害することがわかった(日本生薬学会第65年会 血液凝固を阻害するポリフェノールの探索)。食品に含まれる種々のフラボノイドで検討したところ、ブドウなどの果実に含まれるミリセチンが血液凝固を阻害したが、ミリセチンのトロンビン阻害活性については他のグループにより既に報告されていた。

アシタバ由来のキサントアンゲロールと4-ヒドロキシデリシンについては、血小板凝集を抑制する作用がみられた(Die Pharmazie 2016)。血管内皮細胞からのPAI-1産生抑制を指標に種々のポリフェノールを対象に探索を行ったところ、プロポリスなどに含まれるクリシンが、炎症刺激により培地中に増加したPAI-1の産生を抑制することを示した。また、クリシンの構造類似体との活性を比較することでクリシン分子中の水酸基の位置が活性発現に重要なことも明らかとした(Nat Prod Commun. 2017)

(2) マウスモデルを用いた検討

肥満や糖尿病では、血中のPAI-1が上昇し血栓傾向となるが、肥満・糖尿病マウス(TSOD)でもヒトと同様に血中PAI-1が上昇し血栓傾向となることがわかっている。アシタバの茎を切った時の浸出液であるアシタバ黄汁の凍結乾燥粉末を混ぜた餌で摂取させたTSODマウスで調べ

たところ、血中の PAI-1 の上昇が抑制されていることがわかった。血中の PAI-1 増加抑制は肝臓での PAI-1 の産生の抑制によるものであること、アシタバ黄汁の摂取は PAI-1 産生に關与する TNF α の産生も抑制していることがわかった (J Diet Suppl. 2019)。

PAI-1 は加齢により高値となるため加齢による血栓傾向の増加に關与すると考えられているが、マウスでも加齢に伴い血中の PAI-1 が上昇することがわかっているため、加齢に伴う PAI-1 の上昇への食品の影響を調べた。アシタバ黄汁を混餌で摂取させて高齢まで飼育したところアシタバ黄汁を摂取したマウスは対照群と比べて PAI-1 の上昇が有意に抑制されていた。これまでにアシタバ黄汁中のキサントアンゲロールが培養細胞の PAI-1 産生を抑制することがわかっていることから、TSOD マウスや高齢マウスでみられた PAI-1 抑制作用は、アシタバ黄汁の主成分であるキサントアンゲロールによる可能性が高い。アシタバ黄汁は本研究の目的である食生活からの血栓症の予防に応用できる可能性がある。

黒酢については、今回の我々の検討では、肥満糖尿病マウスや高齢マウスで血栓傾向を抑制するような結果は得られていないが、黒酢 10 倍濃縮液および黒酢もろみ末を混餌投与したマウスで、炎症性に誘発した血栓傾向を抑制する効果を見出した (Food and Nutrition Sciences 2018)。高齢者では炎症による血栓傾向が若年者より強くなることから、黒酢や黒酢もろみの摂取も高齢者の血栓症の予防に有効かもしれない。

なお、本研究では睡眠障害マウスや加齢促進マウス (SAM マウス) での検討も行った。睡眠障害マウスの血栓形成傾向は不安定で、本研究のモデルマウスとして適切かどうか疑わしい結果となったため、このモデルを使った検討は断念した (第 38 回日本血栓止血学会学術集会 2016 年)。また、SAM マウスは加齢による血栓傾向を抑制する機能性成分の探索を短期間で進める目的で検討を進めたが、通常の高齢マウスで見られるような加齢による血栓傾向を示す血中因子の変化が SAM マウスではみられなかった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

Ohkura N, Atsumi G, Uehara S, Ohkta M, Taniguchi M.

Ashitaba (*Angelica keiskei*) Exerts Possible Beneficial Effects on Metabolic Syndrome.

OBM Integrative and Complementary Medicine. 2019 査読有

DOI: 10.21926/obm.icm.1901005

Ohta M, Fujinami A, Oishi K, Kobayashi N, Ohnishi K, Ohkura N.

Ashitaba (*Angelica Keiskei*) Exudate Prevents Increases in Plasminogen Activator Inhibitor-1 Induced by Obesity in Tsumura Suzuki Obese Diabetic Mice.

J Dietary Supplements. 16(3) 331-344 2019 査読有

DOI: 10.1080/19390211.2018.1458366

Ohkura N, Atsumi G, Ohnishi K, Baba K, Taniguchi M.

Possible antithrombotic effects of *Angelica keiskei* (Ashitaba).

Die Pharmazie. Vol.73(6) 73(6) 315-317 2018 査読有

DOI: 10.1691/ph.2018.8370

Ohkura N, Kihara-Negishi F, Fujii A, Kanouchi H, Oishi K, Atsumi G, Nagano M.

Effects of fermented rice vinegar Kurozu and its sediment on inflammation-induced plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) increase. Food and Nutrition Sciences. Vol.9(3) 235-246 2018 査読有

DOI: 10.4236/fns.2018.93018

Ohkura N, Fujita R, Kanai R, Ishibashi K, Ueda H, Atsumi G.

An in vitro screening study of food functions among vegetable cultivars consumed in Japan. Am J Res Med Sci. Vol.3(1) 1-6 2018 査読有

DOI: 10.5455/ajrms.20180126090406

Ishibashi K, Takeda Y, Nakatani E, Sugawara K, Imai R, Sekiguchi M, Takahama R, Ohkura N, Atsumi G.

Activation of PPAR γ at an Early Stage of Differentiation Enhances Adipocyte Differentiation of MEFs Derived from Type II Diabetic TSOD Mice and Alters Lipid Droplet Morphology. Biol Pharm Bull. Vol.40 852-859 2017 査読有

大藏直樹 明日葉に抗血栓作用があるのか フードスタイル 21 Vol.21 24-27 2017 査読なし

DOI: なし

大藏直樹 止血作用を持つ植物由来物質 THE CHEMICAL TIMES 2017 Vo.1 22-27 査読なし

DOI: なし

Ohkura N, Ando K, Takata Y, Kanai K, Ishibashi K, Taniguchi M, Tatefuji T, Atsumi G.

Positions of Hydroxyl Groups in Chrysin are Critical for Inhibiting Plasminogen Activator Inhibitor-1 Release from Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Natural Product Communications. Vol.12 499-502 2017 査読有

DOI: なし

Maruyama K, Kihara-Negishi F, Ohkura N, Nakamura Y, Nasui M, Saito M.

Simultaneous Determination of Catechins and Caffeine in Green Tea-Based Beverages and Foods for Specified Health Uses. Food and Nutrition Sciences. Vol. 8 316-325 2017 査読有

DOI: 10.4236/fns.2017.83021

Oishi K, Yamamoto S, Oike H, Ohkura N, Taniguchi M.

Cinnamic acid shortens the period of the circadian clock in mice. Biochem Biophys Rep. Vol.9 232-237 2017 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.12.008

Oishi K, Yasumoto Y, Higo-Yamamoto S, Yamamoto S, Ohkura N.

Feeding cycle-dependent circulating insulin fluctuation is not a dominant Zeitgeber for mouse peripheral clocks except in the liver: Differences between endogenous and exogenous insulin effects. Biochem Biophys Res Commun. Vol.29, 165-170, 2017 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.173.

Oishi K, Ohkura N, Yasumoto Y, Yamamoto S.

Circadian fluctuations in circulating plasminogen activator inhibitor-1 are independent of feeding cycles in mice. Chronobiol Int. Vol.34, 254-259, 2016 査読有

DOI: 10.1080/07420528.2016.1256299.

Ohkura N, Ohnishi K, Taniguchi M, Nakayama A, Usuba Y, Fujita M, Fujii A, Ishibashi K, Baba K, Atsumi G.

Anti-platelet effects of chalcones from *Angelica keiskei* Koidzumi (Ashitaba) in vivo. Die Pharmazie Vol. 71, 651-654, 2016 査読有

DOI: 10.1691/ph.2016.6678

Ohkura N, Oishi K, Kihara-Negishi F, Atsumi GI, Tatefuji T.

Effects of a diet containing Brazilian propolis on lipopolysaccharide-induced increases in plasma plasminogen activator inhibitor-1 levels in mice. J Intercult Ethnopharmacol. Vol.5, 439-443, 2016 査読有

DOI: 10.5455/jice.20160814112735

[学会発表](計 14 件)

赤瀬智子、伊藤瑞季、大藏直樹、榎原弘子、福田真佑、矢野道子、伊吹愛
明日葉黄汁粉末摂取による肥満マウスの皮下脂肪層に対する組織学的検討

第 25 回日本未病システム学会学術総会 2018 年 10 月 東京

大藏直樹、植木翔吾、原実之莉、西村魁人、石橋賢一、叶内宏明、藤井暁、長野正信、谷口雅彦、厚味巖一

黒酢もろみ末エタノール抽出物および分画物の食品機能の評価

第 23 回日本フードファクター学会、第 12 回日本ポリフェノール学会、第 15 回日本カテキン学会 合同学術集会 2018 年 9 月 京都

大藏直樹、金子広実、厚味巖一、谷口雅彦

血液凝固を阻害するポリフェノールの探索

日本生薬学会第 65 年会 2018 年 9 月 広島

西村魁人、植木翔吾、藤井 暁、長野正信、叶内宏明、厚味巖一、大藏直樹

黒酢もろみ末エタノール抽出物に含まれる機能性物質の探索

第 5 回時間栄養科学研究会 2018 年 8 月 埼玉

西村魁人、植木翔吾、原実之莉、石橋賢一、藤井暁、長野正信、谷口雅彦、大藏直樹、厚味巖一

黒酢もろみ末エタノール抽出物に含まれる機能性物質の探索

第 19 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2018 年 8 月 東京

外川弘大、武田剛寛、中谷絵理子、石橋賢一、大藏直樹、板部洋之、厚味巖一

マクロファージ共培養下での脂肪細胞由来マイクロパーティクルの血液凝固亢進

日本薬学会第 138 年会 2018 年 3 月 金沢

大藏直樹

機能性食品の開発への TSOD マウス応用の検討

第 12 回 TSOD (肥満・糖尿病) マウス研究会情報交換会 2018 年 3 月 つくば

大藏直樹

黒酢および黒酢もろみによる血栓症予防の可能性の検討

第 4 回日本黒酢研究会 2017 年 6 月 東京 (招待講演)

大藏直樹、厚味巖一、大石勝隆、藤波 綾、谷口雅彦、太田光熙、大西克典

明日葉カルコンのマウスモデルにおける PAI-1 上昇抑制効果 第 38 回日本血栓止血学会学術集会 2016 年 6 月 奈良

大藏直樹、肥後(山本)明花、大石勝隆

LPS および高脂肪食摂取による負荷が睡眠障害マウスの血液凝固線溶系に与える影響 第 38 回日本血栓止血学会学術集会 2016 年 6 月 奈良

藤井文音、株本恵梨、藤田真緒、石橋賢一、忍足鉄太、大藏直樹、厚味厳一
ノビレチンとその構造類似体の血小板凝集抑制作用と構造との関係 第 17 回
Pharmaco-Hematology シンポジウム 2016 年 9 月 東京
藤田理子、金井瑠璃、原実之莉、石橋賢一、上田浩史、大藏直樹、厚味厳一
種々の野菜由来抽出物を用いた野菜の新たな機能の探索 第 17 回 Pharmaco-Hematology シ
ンポジウム 2016 年 9 月 東京
大藏直樹、大西克典、大石勝隆、厚味厳一、馬場きみ江、谷口雅彦
アシタバ黄汁を長期摂取させて飼育した高齢マウスを用いた検討 日本生薬学会第 63 年会
2016 年 9 月 富山
大藏直樹、藤井 暁、叶内宏明、根岸文子、大石勝隆、厚味厳一、長野正信
黒酢および黒酢もろみ末による血栓症予防の可能性についての基礎的検討 第 39 回日本血
栓止血学会 2017 年 6 月 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：プラスミノゲンアクチベーターインヒビター (PAI-1) 上昇抑制

発明者：大藏直樹、長野正信、橋口和典、藤井 暁

権利者：

種類：特許

番号：特開 2018-118930

出願年：2017

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/read0094504/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：大石 勝隆

ローマ字氏名：(OISHI, Katsutaka)

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：バイオメディカル研究部門

職名：研究グループ長

研究者番号 (8 桁)：50338688

研究分担者氏名：忍足 鉄太

ローマ字氏名：(OSHITARI, Tetsuta)

所属研究機関名：帝京大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：00279043

研究分担者氏名：谷口 雅彦

ローマ字氏名：(TANIGUCHI, Masahiko)

所属研究機関名：大阪薬科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：00278590

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。