

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05538

研究課題名(和文)血栓性脳梗塞の予防を目的とした機能性食品の探索と抗血栓薬併用時の相互作用解析

研究課題名(英文)The search of the functional food with antithrombotic effects and influence with combination of drugs

研究代表者

岩田 直洋 (Iwata, Naohiro)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：50552759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞や心筋梗の発症には、アテローム性動脈硬化などによる血栓の形成が関与している。これらの発症は、正確な予測が困難であることから一次予防の考えが重要とされる。本研究では、抗血栓効果を有する食品を探索するとともに抗血栓薬との併用による影響についても評価することを目的とした。動脈硬化様症状を呈するL-NAME処置に加え、塩化鉄曝露による血栓形成モデルラットを作製して評価した結果、継続的に椎茸菌糸体抽出物を摂取させることで血栓形成を抑制する可能性が示唆された。その効果におけるメカニズムの一端には、動脈硬化様病変時の酸化ストレス障害を抑制し、血管組織を保護することで効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、発症が予測しにくい血栓症に対して一次予防を可能とする機能性食品・食品成分を探索し、その効果を検証するとともに作用機序を明確にすることである。さらに、食品-薬物相互作用について検討することで、二次予防の観点から抗血栓薬との併用時においても影響を受けにくく、且つ安全であり、薬剤の代替として成り得る機能性食品・食品成分を選別することである。本研究において、椎茸菌糸体抽出物は比較的強い抗血栓作用を有することが見出されたことから、将来的に脳梗塞を代表とする血栓症全般における新たな予防法や治療法の提案に対する食品の価値を示す一助となると考える。

研究成果の概要(英文)：The vessel occlusions by thrombus formation are the major factors in the development of cerebral infarction and myocardial infarction. Thrombosis is unpredictable because it occurs suddenly. Therefore, primary prevention is important for these diseases. In this study, the antithrombotic effects of the functional food were verified using an established rat model in carotid arterial thrombosis is induced by ferric chloride. The results demonstrated that histological examination of carotid arterial revealed that thrombosis was partially improved in a water-soluble extract from culture medium of Lentinus edodes mycelia group compared with the L-NAME induced thrombosis group. Furthermore, a water-soluble extract from culture medium of Lentinus edodes mycelia was suggested to inhibit oxidative stress damage caused by L-NAME induced-thrombosis and protect vascular tissue.

研究分野：食品科学

キーワード：機能性食品 血栓 酸化ストレス 抗血栓薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は我が国の死因の上位にあり、その70~80%は脳梗塞に代表される虚血性脳血管障害である。虚血性脳血管障害は、動脈硬化等が原因で脳に酸素や栄養分を送る動脈が閉塞して生じる脳組織の循環障害であり、再発率が高い。脳梗塞には、頭蓋内外の血管閉塞によるアテローム血栓性脳梗塞、心臓で発生した血栓が脳血管を閉塞させる心原性脳塞栓、脳深部血管の閉塞によるラクナ梗塞に分類され、どれも血栓形成が要因となっている。脳梗塞発作が生じた際には、処置が遅れるほど症状は重篤化し致死的となり、命を取りとめた場合でも半身運動麻痺、嚥下障害、言語障害、意識障害等の後遺症が患者 QOL の低下や介護負担の増大をもたらす。また、脳細胞はきわめて虚血に脆弱であるため、脳梗塞に至る前段階の軽い脳虚血発作(一過性脳虚血発作)であっても、発作を繰り返すことで記憶に重要な海馬の神経細胞が損傷し、認知症等の原因となる。このように、虚血性脳血管障害は、国民の生命を脅かすのみならず、医療コストを増大させている重大疾患であり、その対策が急がれている。また、現在の医療技術では血栓性脳梗塞の発症を正確に予測することは困難であることから日常的に予防することが重要であり、抗血栓効果を有する機能性食品による一次予防に今後益々重点が置かれる。

一方、虚血性脳血管障害の再発防止には、抗凝固薬や抗血小板薬などの抗血栓薬を処方する二次予防が実施されているが出血などの副作用の観点から常に個別管理が必要であり、さらに抗凝固薬を代表とするワーファリンなどは、食事(ビタミン K)による影響を受けやすいことも薬剤投与の管理を難しくしている。従って、抗血栓効果を有する機能性食品の探索が叶うならば、その機序も明確にすることで血栓症に対する一次予防としての食品の有用性を示すことに繋がる。また、食品-薬物相互作用を明確にすることで、より安全に薬剤との使用が可能となり得る。これらのことから、将来的に脳梗塞や心筋梗塞などを代表とする血栓症全般における新たな予防法や治療法の提案に対する食品の価値を見出すものとなる。

### 2. 研究の目的

上記の背景から、申請者らは発症が予測しにくい血栓症に対して一次予防を可能とする機能性食品・食品成分を探索し、その効果を薬理学、生化学、分子生物学など多岐にわたる分野にて検証するとともに、そのメカニズムを明確にすることで、2つ目に食品-薬物相互作用について検討することで、二次予防の観点から抗血栓薬との併用時においても影響を受けにくく、薬剤の代替として成り得る機能性食品・食品成分を選別することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *in vitro*による抗血栓作用を有する食品・食品成分の探索と評価

候補となる食品を調製(0.03、0.3、3 mg)し、抗血栓効果を評価するためにフィブリン凝塊試験を行った。また、ポジティブコントロールとして、直接トロンビン阻害剤であるダビガトランを用いた。また、線溶系作用を評価するためフィブリン溶解試験を行った。こちらの試験におけるポジティブコントロールには、血栓溶解剤である t-PA 製剤(アルテプラザーゼ)を用いた。

#### (2) *in vivo*による血栓形成に対する食品・食品成分の効果

実験動物は、SD ラット(8週齢, ♂)に水または、椎茸菌糸体抽出物(1 g/kg/day)を2週間摂取させた群をそれぞれ Vehicle、椎茸菌糸体抽出物群とした。Warfarin は、単回摂取で0.2 mg/kg 体重となるようにゾンデで経口投与した。Aspirin は、単回投与で20 mg/kg 体重となるようにゾンデで経口投与した。また、一酸化窒素合成酵素阻害剤である L-NAME 水(1g/L)を2週間自由飲水させて、動脈硬化を誘発させた動脈硬化様モデルに対しても同様の処置を行い、それぞれの群を作製した。これらの群に対して、頸動脈を剥離して塩化鉄溶液(40%)を曝露させることで血栓モデルを作製した後、頸動脈を摘出して血栓重量を測定した。また、凍結ブロックを作製し、HE 染色にて組織学的評価を行った。加えて、ラットの尻尾の先端切断による止血時間測定、プロトロンビン時間測定、凝固因子の第Ⅱ因子、第Ⅶ因子、第Ⅸ因子、第Ⅹ因子測定、血小板凝集能測定を行った。

#### (3) 抗血栓作用を有する食品・食品成分によるメカニズム解析の検討

頸動脈に曝露する塩化鉄溶液(40%)の条件として、3分間曝露した後に4時間後に総頸動脈を採取し、Nitrotyrosine、p-GSK-3 $\beta$ 、p-NF- $\kappa$ B p65、組織因子(TF)量を Western blot 法で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) *in vitro*による抗血栓作用を有する食品・食品成分の探索と評価

##### ① フィブリン凝塊に対する各食品・食品成分の評価

血液が凝固する最終段階では、トロンビンの酵素作用によってフィブリノーゲンをフィブリンに変化させ、さらに会合することでフィブリン線維を形成することが知られていることから、血栓形成に対する機能性食品の効果を *in vitro* 実験において評価し、フィブリン凝塊に対する

効果を検討した。その結果、数十種類の食品・食品成分の中からキノコに含まれるリグニンなどに抗凝塊作用が認められた。また、椎茸菌糸体抽出物にもその効果が強く認められた (Fig. 1A 結果の一部を示す)。

② フィブリン溶解に対する各食品・食品成分の評価

血栓溶解剤であるアルテプラゼ処置では、顕著な血栓重量の減少が確認されたのに対し、椎茸菌糸体抽出物には有意な差は認められなかった (Fig. 1B)。

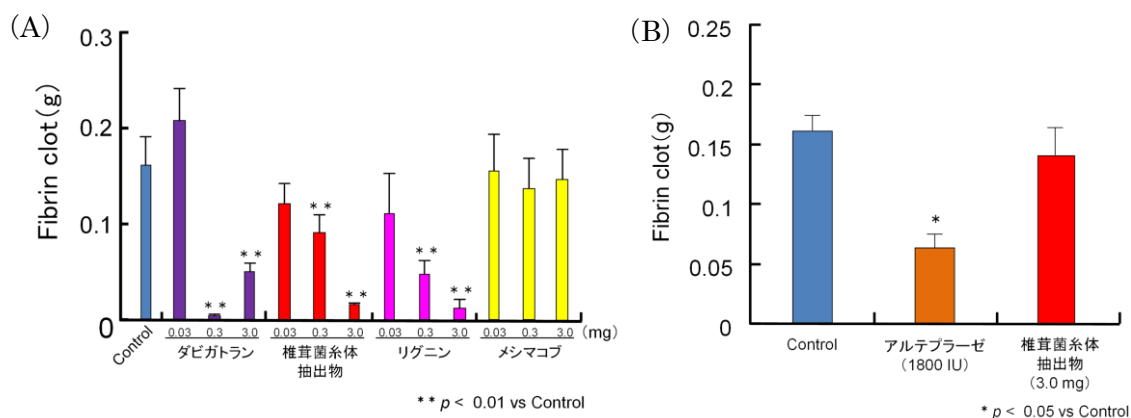


Fig. 1 抗血栓作用を有する食品・食品成分の探索と評価  
フィブリン凝塊試験 (A)、フィブリン溶解試験 (B)

(2) *in vivo*による血栓形成に対する食品・食品成分の効果

① 血栓形成モデルラットに与える影響

ラットに椎茸菌糸体抽出物 (1 g/kg) を2週間経口投与した後、頸動脈を剥離し、塩化鉄 (40%) を曝露して血栓形成を誘導した。また、ポジティブコントロールには抗凝固薬であるワーファリン単回投与 (0.2 mg/kg) 群およびアスピリン単回投与 (20 mg/kg) を作製した。その結果、コントロール群では、塩化鉄曝露によって血栓が確認されたのに対し、ワーファリンおよびアスピリン群では顕著な抑制が見られた。しかし、椎茸菌糸体抽出物では血栓の抑制は認められなかった (Fig. 2A)。そこで、動脈硬化様症状を呈する L-NAME 処置ラットを作製し、塩化鉄曝露処置にて評価した。その結果、動脈硬化様症状を呈するラットに椎茸菌糸体抽出物を投与しておくことで血栓が顕著に抑制されることが明らかになった (Fig. 2B)。一方で、副作用については、血液凝固時間の指標となるプロトロンビン時間および止血時間について評価した結果、特に問題はみられなかった。

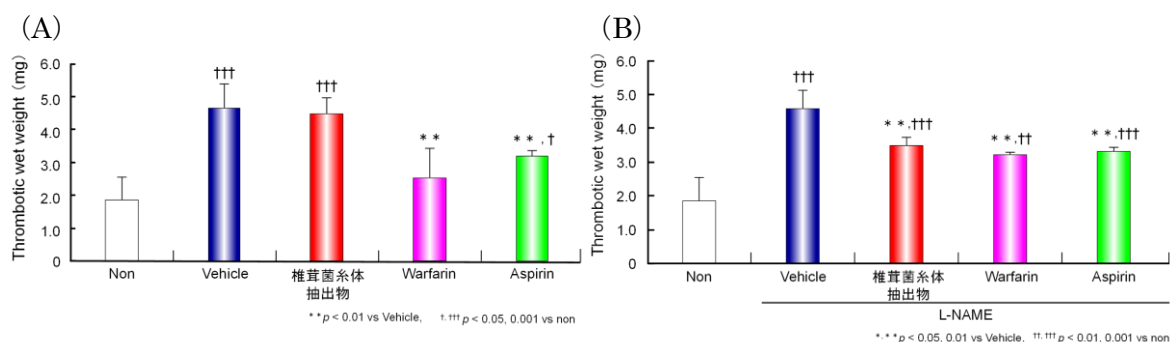


Fig. 2 血栓形成モデルラットにおける血栓重量と椎茸菌糸体抽出物の効果  
正常ラットの血栓形成に与える影響 (A)、動脈硬化モデルラットの血栓形成に与える影響 (B)

② 血液凝固に関与する因子に対する影響

ラットの多血小板血漿を用いて、コラーゲン刺激によって誘発される血小板凝集を解析した結果、椎茸菌糸体抽出物摂取によって血小板凝集率が低下する傾向が認められた。次に、第II、第VII、第IX、第X因子など種々の因子について測定した結果、凝固系因子に影響するワーファリンのみ凝固時間の延長がみられたが、椎茸菌糸体抽出物には影響しなかった。

(3) 抗血栓作用を有する食品・食品成分によるメカニズム解析の検討

塩化鉄曝露後の頸動脈を採取し、酸化ストレス障害の指標としてニトロチロシン化タンパク質発現量について解析した結果、正常および L-NAME 処置ラット両群ともに塩化鉄無処置群と比較して、塩化鉄曝露処置群でニトロチロシン化タンパク質発現量が増加する傾向を示したの

対し、椎茸菌糸体抽出物群では両群ともに Vehicle 群と比較して減少傾向が見られた。また、血栓形成に関与する因子についても解析した結果、正常および L-NAME 処置ラット両群ともに塩化鉄曝露処置群で  $p$ -NF- $\kappa$ B p65、TF 発現量の増加傾向と  $p$ -GSK-3 $\beta$  発現量が減少する傾向を示した。一方、両群の椎茸菌糸体抽出物群は同 Vehicle 群との  $p$ -NF- $\kappa$ B p65、TF 発現量の抑制傾向と  $p$ -GSK-3 $\beta$  発現量の増加傾向が認められた。

以上の結果から、椎茸菌糸体抽出物の抗血栓効果は、フィブリン形成の抑制に作用することで効果を示す可能性が考えられた。また、動脈硬化様病変時の酸化ストレス障害を抑制し、血管組織を保護することで効果を発揮する可能性が示唆された。さらに、GSK-3 $\beta$  / NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路を介した TF 発現を抑制することにより、血栓形成の阻害を介した動脈閉塞を遅延させる可能性が示唆された。さらに、椎茸菌糸体抽出物と薬剤併用による相互作用解析の一環として、ワーファリンとの併用効果について検討した結果、椎茸菌糸体抽出物による影響は見られなかった。今後は、他の抗血栓薬との影響についても検討すると共に、血栓性脳梗塞に対する効果についても更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 須賀 健太、柏木 まり、岩田 直洋、神内 伸也、久保田 真、飯塚 博、岡崎 真理、日比野 康英
2. 発表標題 L-NAME誘発による動脈硬化モデルラットの血栓形成に対する 椎茸菌糸体培養培地抽出物（LEM）の効果
3. 学会等名 第143回 日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 須賀 健太、柏木 まり、岩田 直洋、神内 伸也、久保田 真、飯塚 博、岡崎 真理、日比野 康英
2. 発表標題 動脈硬化モデルラットの血栓形成に対する椎茸菌糸体培養培地抽出物の効果
3. 学会等名 第142回 日本薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏木 まり、岩田 直洋、今井 十夢、神内 伸也、飯塚 博、岡崎 真理、日比野 康英
2. 発表標題 動脈硬化モデルラットにおける血栓形成に対する椎茸菌糸体培養培地抽出物（LEM）の効果
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柏木 まり、岩田 直洋、今井 十夢、神内 伸也、飯塚 博、岡崎 真理、日比野 康英
2. 発表標題 動脈硬化モデルラットにおける椎茸菌糸体培養培地抽出物（LEM）の抗血栓効果
3. 学会等名 第22回 日本補完代替医療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柏木 まり、岩田 直洋、今井 十夢、神内 伸也、飯塚 博、岡崎 真理、日比野 康英
2. 発表標題 塩化鉄傷害血栓ラットにおける血栓形成に対する椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) の効果
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 岩田直洋	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 アグリバイオ	

1. 著者名 岩田 直洋	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 アグリバイオ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	日比野 康英  (Hibino Yasuhide)  (10189805)	城西大学・薬学部・教授    (32403)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡崎 真理  (Okazaki Mari)  (50272901)	城西大学・薬学部・教授    (32403)	
研究分担者	神内 伸也  (Kamiuchi Shinya)  (80433647)	城西大学・薬学部・教授    (32403)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関