

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500774

研究課題名（和文）食品中の血栓予防成分の探索と血液凝固系の日内変動を考慮した
機能性食品の開発

研究課題名（英文）Exploration of antithrombotic substances and development of new
functional foodstuffs considering the circadian rhythms of blood
coagulation

研究代表者

大蔵 直樹 (OHKURA NAOKI)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：60349256

研究成果の概要（和文）：血栓を予防するとされる健康食品を対象にして探索を行い、あしたの葉やプロポリスが血栓症予防効果を持つ可能性のある食品であることを見出した。また、あしたの葉に含まれるキサントアンゲロール、プロポリスの成分であるクリシンが有効な成分であることを示した。しかし、血液凝固系の日内変動を考慮した健康食品の摂取の有効性については明らかでない点が多く、機能性食品の開発に向けては今後も有効な物質の探索や摂取法の検討など、基礎的な研究を継続する必要がある。

研究成果の概要（英文）：The notion that *Angelica keiskei* (ashitaba) and propolis have anti-thrombotic properties has not yet been scientifically proven. Here, we show that Ashitaba and propolis have potential as antithrombotic foodstuffs. We also showed that xanthoangerol from ashitaba and chrysin from propolis have antithrombotic properties. However, further investigation is needed to develop new functional foodstuffs involving ashitaba and propolis considering the circadian rhythms of blood coagulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：血栓症、機能性食品、血液凝固、日内変動

1. 研究開始当初の背景

日本人の三大死因のうち、心疾患や脳血管疾患はいずれも血液凝固調節や血管の異常が基盤になっている。血管障害や血栓症は糖尿病や肥満などの生活習慣病と強く関わることから、生活習慣病を持つ患者では血液や血管系を正常に保つことは重要といえる。血栓を予防するとされる食品摂取により、血液

凝固系を正常に保ち、血栓症を予防しようとする研究は数多くなされ、さまざまな食品の有効性が示唆されている。しかし、科学的解析の進んでいない食品も多く、実際に血栓症の予防に役立てるためには、本当に有効かどうかを明らかにし、食品中の有効成分の特定と機能の解明が必要である。一方、血栓症は発生頻度に日内変動がみられるが、食品によ

る血栓の予防に日内変動を考慮しようとする研究はほとんどみられない。応募者らは、課題研究に着手する以前に生活習慣病と血液凝固系の日内変動に注目し、血栓の出来やすい時間があること(Ohkura et al. *J Thromb Haemost* 2006, Ohkura et al. *Thromb Res.* 2009)、生活習慣病による体内時計の乱れが血栓症につながること(Oishi and Ohkura et al. *FEBS Lett.* 2005)を証明してきた。一方で、応募者らは、血栓症予防効果があるとされる生薬に注目した研究も並行して進め、ショウガ科生薬の成分を培養ヒト血管内皮細胞(HUVEC)に作用させると、血栓形成性に強く関わるとされるPAI-1の産生が抑制されること[日本薬学会第126年会2006年、日本薬学会第129年会2009年]、民間薬として止血に使われるガマ花粉(蒲黄)が内因系凝固系と血小板に作用すること[第30回日本血栓止血学会学術集会2007年]などを示してきた。我々が扱ってきた血栓予防効果のある生薬の中には、食品として食べられているものも多いが、研究分担者らは、早くから野菜としても食べる生薬に注目し、それらの成分や作用に関する研究成果をあげてきた(Taniguchi et al. *Chem Pharm Bull* 2005, Taniguchi et al. *Chem Pharm Bull* 2000)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、日常の食生活によって血液凝固系を正常に保ち、血栓症を予防するという発想で、食品中の血栓症予防成分の探索と機能解析を行うこと、および、有効性を見出した食品を利用して血液凝固線溶系の日内変動を考慮した新たな機能性食品の開発につながることである。本研究では、血栓予防効果を持つとされる食品に着目し、(1)血栓を予防する可能性のある食品の探索、(2)物質の単離と血栓予防機能の解明、(3)マウスを用いた効果の検討を行い、新たな機能性食品としての開発の可能性を調べた。

3. 研究の方法

(1) 血栓を予防する可能性のある食品の探索

血液の凝固反応、培養細胞を用いた2種類の評価系を用い、健康食品抽出物やそれらの粗分画物の血栓予防作用の可能性を評価した。

① 凝固反応による評価系

血液凝固反応は、血漿に外因系あるいは内因系凝固反応開始剤とカルシウム溶液を加え、フィブリンが形成されて流動性がなくなるのを捉えて検出する方法(スチールボール法)により評価した。凝固抑制作用の強さは、評価する物質を添加したときのスチールボール法での凝固時間延長の程度により評価した。

② 培養細胞による評価系

培養した血管内皮細胞(HUVEC)を、評価する物質を添加したDMEM培地でさらに3時間培養した後、腫瘍壊死因子(TNF α)で刺激した。刺激により培地中に増加するプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター1(PAI-1)をELISA法によって測定し、評価する物質がTNF α 刺激によるPAI-1産生増加を抑制する程度により有効性を評価した。

(2) 物質の単離と血栓予防機能の解明

① 物質の単離

酢酸エチルやヘキサンなどの有機溶媒を用いて抽出後、ODSやシリカゲルカラムを用いたオープンカラムクロマトフィーや逆相HPLCにより成分を分画した。

② 凝固反応への作用点の評価

外因系凝固反応、内因系凝固反応のどちらかに作用しているかを明らかにした後、どの凝固系因子による反応に作用しているかを、凝固法や合成基質法により評価した。

③ PAI-1産生抑制に必要な構造の検討など

上記(1)②の培養細胞による評価系を利用して、TNF α 刺激によるPAI-1産生増加の低下作用を指標に化合物の構造と活性の相関を評価した。またリアルタイムPCR法によりHUVECのPAI-1 mRNA発現量への影響を調べた。

(3) マウスを用いた効果の検討

7週齢の雄ICRマウスにリポポリサッカライド(LPS)を腹腔内あるいは皮下投与し血栓形成傾向としたマウスを用いて評価した。LPS投与後にマウス血中に増加するPAI-1をELISA法により測定し、経口または腹腔内に評価する物質を投与した時にどの程度血中のPAI-1濃度が低下するかを指標に評価した。

日内変動を考慮した検討では、経口ゾンデによる摂取の影響と自由摂食での検討を行った。7週齢の雄ICRマウス経口ゾンデにより、休息期始めに単回または4週間連続で投与し、活動期初めに採血した。db/dbマウスとその対照マウスには自由摂食で摂取させ休息期始めと活動期初め1日2回採血した。マウス血中のPAI-1をELISA法により測定し、心臓と肝臓のPAI-1 mRNA発現量をリアルタイムPCR法で定量した。

なお、動物実験は帝京大学動物実験に関する倫理委員会が定めたガイドラインに従って行った。

4. 研究成果

(1) 血栓を予防する可能性のある食品の探索

① プロポリス

血液凝固反応の抑制効果 ブラジル産プロポリスエタノール抽出物(最終濃度0.1%)では、内因系および外因系凝固反応が共に阻害され凝固しなかったことから、プロポリス中には凝固反応の共通系路を阻害する物質

が含まれ、抗凝固作用を示す可能性が考えられた。

PAI-1 産生抑制効果 プロポリスエタノール抽出物を培地に添加して培養し TNF α で刺激した HUVEC では、TNF α による培地中への PAI-1 産生増加が有意に抑制された。プロポリスの摂取は血管内皮細胞からの PAI-1 産生を抑制し、血栓予防的に働く可能性が示唆された(図 1)。

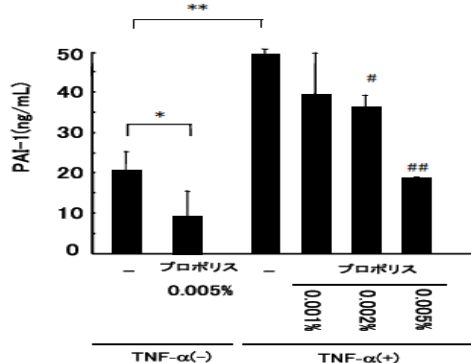


図 1 プロポリスは HUVEC からの PAI-1 産生を抑制した。 *Journal of Apicultural Research* 51(2):179-184 (2012)

②あした葉黄汁

PAI-1 産生抑制効果 あした葉黄汁凍結乾燥品(最終濃度 5 μ g/mL)を培地に添加して培養し TNF α で刺激した HUVEC では、TNF α による培地中への PAI-1 産生増加が有意に抑制された。あした葉黄汁中には血管内皮細胞からの PAI-1 産生を抑制する成分が含まれることがわかった。

(2) 作用する物質の同定と機能の解明

①プロポリス

血液凝固反応の抑制効果 プロポリスは、プロポリスエタノール抽出物をシリカゲルカラムに添加し、ヘキサン、クロロホルム、メタノールなどで順次溶出して分画した。メタノールで溶出された画分に凝固反応を抑制する効果がみられたが、さらに分離を進めた画分では効果がみられなくなった。プロポリスは凝固反応の共通系路を阻害すると考えられるため、プロポリスに含まれる市販の成分 12 種類についてトロンビン活性と第 Xa 因子活性への影響を調べた。その結果、アルテピリン C やカフェイン酸フェネチルエステルが両酵素の活性を阻害したが、阻害にはどちらも 10 mM 程度の高濃度が必要であった。微量のプロポリスが凝固反応を抑制したことから考えると、プロポリス添加でみられた凝固阻害には検討した成分以外のもの関与すると考えられる。

PAI-1 産生抑制効果 プロポリスに含まれる市販の成分について検討したところクリ

シンに抑制効果がみられた。しかし、微量のプロポリスが PAI-1 産生増加を阻害したのに対し、クリシンは 10 μ M 程度の高濃度が必要であったことから、プロポリスの PAI-1 産生抑制効果にはクリシン以外の他の因子が関与する可能性が考えられる。

プロポリス中の有効物質特定と機序解明に向けて今後も検討を進めたい。

②あした葉

血液凝固反応の抑制効果 あした葉黄汁のカルコンの主成分である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検討したが、これらは凝固反応に影響しなかった。

PAI-1 産生抑制効果 キサントアンゲロール、キサントアンゲロール B、キサントアンゲロール D、キサントアンゲロール E、キサントアンゲロール F、と 4-ヒドロキシデリシンについて、HUVEC からの PAI-1 産生抑制効果を調べた。その結果キサントアンゲロール B やキサントアンゲロール D、キサントアンゲロール E では 10 μ g/mL 添加したのものには PAI-1 産生抑制効果が見られ、30 μ g/mL 添加したもので強い抑制効果がみられた。一方、分子中に疎水性側鎖を持つキサントアンゲロール F や 4-ヒドロキシデリシンでは 10 μ g/mL 添加では効果がみられず 30 μ g/mL 添加では強い細胞毒性がみられた。側鎖の親水性基の存在が PAI-1 産生抑制に重要な役割を果たすと考えられる。

(3) マウスを用いた効果の検討

プロポリスとあした葉黄汁を使用し、マウスによる検討を行った。プロポリス、あした葉(図 2)ともに ICR マウス腹腔内への短期投与では LPS 投与による血中の PAI-1 産生上昇を抑制した。経口投与による同様な効果の発現には両者ともに 6 週間以上の長期投与が必要であった。

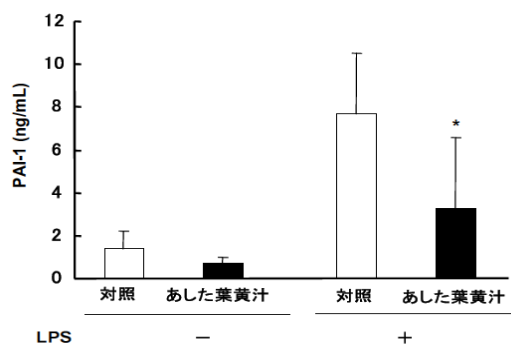


図 2 あした葉黄汁を 6 週間経口投与マウスは LPS による PAI-1 上昇が抑制された。 *Biofactors* 37(6):455-461 (2011)

一方、血液凝固系の日内変動を考慮した検討は、あした葉黄汁の PAI-1 への影響に焦点を絞って行った。あした葉黄汁を db/db マウ

スおよび対照マウスに2週間自由摂食で混餌投与したが、血中 PAI-1 および肝臓と心臓の PAI-1 mRNA 発現量の日内変動には有意な影響を示さなかった。また、肥満による PAI-1 の上昇にも影響しなかった。次にマウス休息期始めに投与時間を限定し経口ゾンデで投与した結果、1 度の投与では効果が見られなかったが、長期間投与したマウスでは PAI-1 の日内変動ピーク時の濃度が弱く低下する傾向がみられた。

血液凝固系の日内変動を考慮した健康食摂取が、機能性食品開発に応用できるかについては明らかにできなかった点が多く、今後も新たな有効な物質の探索や摂取法の検討など、基礎的な研究を継続する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Ohkura N, Oishi K, Nakakuki Y, Miura M, Atsumi G (2013)
Lipopolysaccharide-induced plasma PAI-1 increase does not correlate with PAI-1 synthesised de novo in the liver
Thrombosis Research in press 査読有
- ② Oishi K, Koyanagi S, Ohkura N (2013)
The molecular clock regulates circadian transcription of tissue factor gene
Biochem Biophys Res Commun 431(2) 332-335 DOI:10.1016/j.bbrc.2012.12.098 査読有
- ③ Oishi K, Ohkura N (2013)
Chronic circadian clock disruption induces expression of the cardiovascular risk factor plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Blood Coagul Fibrinolysis* 24(1) 106-108 DOI: 10.1097/MBC.0b013e32835b5bdf3 査読有
- ④ Ohkura N, Shirakura M, Nakatani E, Oishi K, Atsumi G (2012)
Associations between plasma PAI-1 concentrations and its expressions in various organs in obese model mice. *Thrombosis Research* 130(6):e301-304, DOI:10.1016/j.thromres.2012.08.297 査読有
- ⑤ Ohkura N, Takata Y, Ando K, Kanai S, Watanabe E, Nohira T, Atsumi G (2012)
Propolis and its constituent chrysin inhibit plasminogen activator inhibitor 1 production induced by tumour necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *Journal of Apicultural Research* 51(2):179-184

DOI:10.3896/IBRA.1.51.2.06 査読有

- ⑥ Ohkura N, Tamura K, Tanaka A, Matsuda J, Atsumi G (2011)
Experimental study on the hemostatic activity of *Pollen Typhae*: a traditional folk medicine used by external and oral application. *Blood Coagul Fibrinolysis* 22(8):631-636. DOI: 10.1097/MBC.0b013e328349a22c 査読有
 - ⑦ Ohkura N, Nakakuki Y, Taniguchi M, Kanai S, Nakayama A, Ohnishi K, Sakata T, Nohira T, Matsuda J, Baba K, Atsumi G (2011)
Xanthoangelols isolated from *Angelica keiskei* inhibit inflammatory-induced plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) production. *Biofactors* 37(6):455-461. DOI: 10.1002/biof.187. 査読有
- [学会発表] (計 12 件)
- ① 安藤久美子, 大藏直樹, 高田裕子, 厚味厳一 (2012 年 10 月 13 日) プロポリスに含まれるクリシンの抗血栓作用について(第 56 回日本薬学会関東支部大会) 東京 (昭和大学)
 - ② 大藏直樹 (2012 年 6 月 30 日) 機能性食品による血栓症の予防(第一回あしなが予防医学研究会) 鹿児島 (鹿児島大学)
 - ③ 根岸由貴, 大藏直樹, 西井綾香, 横内晴菜, 三村真里世, 厚味厳一 (2012 年 6 月 16 日) SennosideA が持つ抗血栓作用の可能性(第 12 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム) 東京 (日本薬学会会長井記念館)
 - ④ 大藏直樹, 中久木義孝, 松田重三, 厚味厳一 (2012 年 6 月 9 日) あした葉カルコンの血栓症予防効果(第 34 回日本血栓止血学会) 東京 (ハイアットリージェンシー東京)
 - ⑤ 厚味厳一, 大藏直樹 (2012 年 3 月 31 日) 血栓を作りにくくする天然物成分同定の試み(日本薬学会第 132 年会) 札幌 (北海道大学)
 - ⑥ 根岸由貴, 大藏直樹, 西井綾香, 横内晴菜, 三村真里世, 厚味厳一 (2012 年 3 月 30 日) 生薬からの抗血栓作用を持つ物質の探索(日本薬学会第 132 年会) 札幌 (北海道大学)
 - ⑦ 大藏直樹, 中久木義孝, 谷口 雅彦, 金井志帆, 大西克典, 阪田敏幸, 野平知良, 松田重三, 馬場きみ江, 厚味厳一
Xanthoangelols isolated from *Angelica keiskei* inhibit inflammatory-induced plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) production (2011 年 7 月 25 日) Isth2011 (XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and

Haemostasis) 京都 (京都国際会館)

- ⑧ 大藏直樹, 厚味厳一 (震災のため誌上開催) 天然物成分による血液凝固系の調節静岡 (日本薬学会第 131 年会)
- ⑨ 安藤久美子, 大藏直樹, 高田裕子, 西井綾香, 横内晴菜, 福迫莉衣, 渡辺恵美子, 金井志帆, 野平知良, 松田重三, 厚味厳一 (震災のため誌上開催) ブラジル産プロポリス中のフラボノイドが持つ抗血栓作用 (日本薬学会第 131 年会)
- ⑩ 大藏直樹 (2010 年 11 月 5 日) TSOD マウスを用いた肥満による血中 PAI-1 上昇と脂肪組織 PAI-1 の関連解明 (第 6 回 TSOD (肥満・糖尿病) マウス研究会情報交換会) 東京 (総評会館)
- ⑪ 大藏直樹, 安藤久美子, 高田裕子, 西井綾香, 横内晴菜, 福迫莉衣, 渡辺恵美子, 金井志帆, 野平知良, 松田重三, 厚味厳一 (2010 年 10 月 5 日) プロポリスによるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI-1) 産生の抑制 (第 15 回日本フードファクター学会) 仙台 (仙台市民会館)
- ⑫ 大藏直樹, 安藤久美子, 高田裕子, 西井綾香, 横内晴菜, 福迫莉衣, 渡辺恵美子, 金井志帆, 野平知良, 松田重三, 厚味厳一 (2010 年 10 月 2 日) プロポリスのプラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI-1) 産生抑制作用 (第 54 回日本薬学会関東支部大会) 東京 (東京薬科大学)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

- ①平成 22 年度 富山大学 和漢医薬学総合研究所 共同利用・共同研究拠点 共同研究

<http://wakandb.u-toyama.ac.jp/wiki/Report:Report2010>

総説等

- ① 大藏直樹, 大石勝隆 (2012) 血栓症と体内時計 THE CHEMICAL TIMES 2012 No. 3 225 巻 平成 24 年 7 月発行

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大藏 直樹 (OHKURA NAOKI)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号: 60349256

(2) 研究分担者

大石 勝隆 (OISHI KATSUTAKA)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・研究グループ長

研究者番号: 50338688

谷口 雅彦 (TANIGUCHI MASAHIKO)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 00278590

厚味 厳一 (ATSUMI GEN-ICHI)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号: 70276608