

カキ (*Crassostrea gigas*) 中の血小板凝集抑制物質

太田 隆 男¹⁾・中塚 正 博¹⁾・坂田 元 記¹⁾
柴田 幸 雄¹⁾・田中 達 郎¹⁾・古武 彌 三²⁾
沖中 靖³⁾・仲佐 輝 子³⁾・石津 弘 視⁴⁾

(¹⁾愛知医科大学学生化学教室*, (²⁾元神戸学院大学**, (³⁾同志社女子大学***, (⁴⁾植木病院****)

Compounds Depressing Platelet Aggregation in Oyster (*Crassostrea gigas*)

Takao OHTA¹⁾, Masahiro NAKATUSKA¹⁾, Motoki SAKATA¹⁾, Yukio SHIBATA¹⁾, Tatsuro TANAKA¹⁾,
Yazo KOTAKE²⁾ Yasushi OKINAKA³⁾, Teruko NAKASA³⁾ and Hiroshi ISHIZU⁴⁾

¹⁾Department of Biochemistry, Aichi Medical University, ²⁾Formerly, Kobe Gakuin University,

³⁾Doshisha Women's College and ⁴⁾Ueki Hospital

The intake of oyster extract has been known to give various physiological effects. I found out the fact that oyster extract also inhibited platelet aggregation, and so will report in this paper.

Oyster extract inhibited human platelet aggregation induced by ADP, collagen, epinephrine, and arachidonic acid. Oyster extract was subfractionated to two fractions, high and low molecular weight fractions, by gel filtration on Sephadex G-50 column. Low molecular weight fraction inhibited the platelet aggregation. This fraction was further subdivided into three more subfractions by gel filtration on Sephadex G-10 column. Among these, two fractions inhibited the platelet aggregation, and contained both various nucleotides and minerals which were present in complex forms with nucleotides and amino acids. To identify the inhibitory substance, the effects of those subfractions were compared with those of authentic nucleic acids. Purine base and ribose were at least essential to exhibit the suppressive effect on platelet aggregation, but the effective concentrations of all authentic nucleic acids were higher than those of the subfraction samples. In the subsequent experiment using male Wister rat, the administration of oyster extract or its low molecular weight fraction resulted in the reduction of platelet aggregation. Moreover, the administration of oyster extract to alloxan-diabetic rats for 21 days pro-

*所在地：愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21 (〒480-11)

**所在地：大阪市淀川区三国本町3-33-6 (〒532) [自宅]

***所在地：京都市上京区今出川通寺町西入玄武町602 (〒602)

****所在地：堺市黒土町 (〒591)

duced remarkable improvements on platelet aggregation and glucose tolerance test. These findings suggested that the formation of complexes of nucleotides or amino acids and metal ions in oyster extract increased the suppressive effect on platelet aggregation, and that the intake of oyster extract might be available for the improvement of diabetes mellitus.

実験方法と結果

水産動植物からの生理活性物質の分離精製は、長年盛んに行なわれており¹⁾、特にプロスタグランディンの発見以来その傾向はますます増加しつつある。軟体動物であるカキは、我が国で広く食用のために養殖され一般的な食品として利用されている。その成分的な特徴は、蛋白質含量に対して亜鉛の含量が非常に高いこと²⁾、ケルダール分析における窒素含量に対して核酸含量が高いこと³⁾、及び脂肪酸中の高度不飽和脂肪酸含量の比率が約50%と極めて高いことである⁴⁾。坪内らは、すでにラットにおいてカキ抽出物投与による血中微量金属と亜鉛の増加及び血清中のタウリンの増加を報告している^{5,6)}。そこで我々はカキ抽出物のもつ生理作用に興味を持ち、特にその血小板凝集及び血糖値等への影響に対して、種々の検討を行なった。広島湾において養殖されたマガキ (*Crassostrea gigas*) を脱殻後、むき身にして蒸留水を加え、80°C 1時間加熱抽出した。遠心分離後その上澄部を Sephadex G-50 カラムにかけ蒸留水を流出液としゲルろ過クロマトグラフィーを行ない、高分子画分と低分子画分を得た。熱水抽出試料、高分子画分、低分子画分各々についてADP、コラーゲン等を凝集惹起物質とする血小板凝集への影響を検討した。熱水抽出試料に血小板凝集抑制作用が認められた (Fig. 1)。低分子画分においてそ

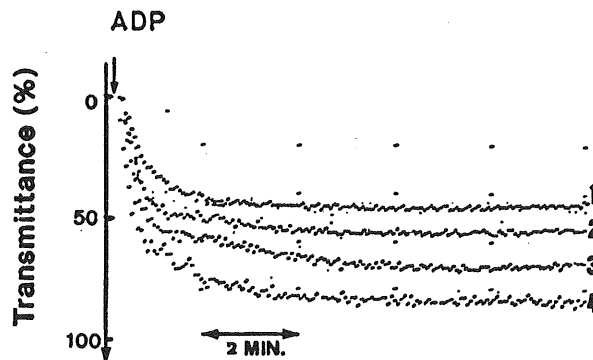


Fig. 1. Effect of oyster extract on 5 μ M ADP-induced aggregation. Oyster extract was added to the reaction mixture at the final concentrations of (1) 691.2, (2) 172.8 (3) 10.8 and (4) 0 μ g /m

の作用が増強されたが、高分子画分には抑制作用が認められなかった (Fig. 2)。次に低分子画分を水素化ホウ素ナトリウム処理した⁷⁾ Sephadex G-10 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーを上記と同様の条件で行ない、各分画の紫外外部吸収、金属、ニンヒドリン陽性物質⁸⁾と糖の含量⁹⁾、血小板凝集抑制活性¹⁰⁾を測定した。280nm, 260nm の吸収によるクロマトグラムから低分子画分は三つのフラクシヨ

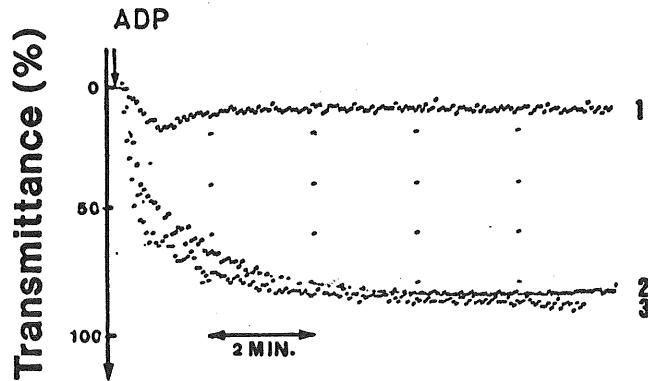


Fig. 2. Effects of high and low molecular weight fractions on 5 μ M ADP-induced aggregation.

1. Low molecular weight fraction (100 μ g/ml)
2. High molecular weight fraction (100 μ g/ml)
3. Control

ンに分画された (Frn. I, Frn. II, Frn. III)。Frn. Iにおいては, 280nm と260nm の吸光度比は約1 : 1であるがFrn. II, IIIにおいては, 約1 : 2となる。又その紫外吸収スペクトル, アミノ酸分析の結果からFrn. Iがタウリン, アラニン, グリシン等のアミノ酸及びペプチドに少量の核酸塩基が混じった混合物と判断した。Frn. II, IIIは糖及びニンヒドリン反応の両方に陽性で紫外外部吸収スペクトル, HPLCによる核酸の分析¹¹⁾, ろ紙クロマトグラフィーの結果から, 核酸混合物であった。Frn. IIはヌクレオチドのAMPが主成分で少量のサイクリックAMPを含み, またFrn. IIIはヌクレオシドのイノシンが主成分で他に少量のウリジン, グアニンを含むことが分かった。金属分析の結果¹²⁾, 亜鉛, 銅はFrn. Iに, カリウムとマグネシウムはFrn. IとFrn. IIに, ナトリウムはFrn. IIの画分に多いことが示された。Frn. I, Frn. II, およびFrn. IIIのADP, エピネフリン, コラーゲン, アラキドン酸を凝集惹起物質とする血小板凝集に対する凝集抑制効果を測定した (Table 1, Fig. 3)。Frn. IIとFrn. IIIには

Table 1. Minimum inhibitory concentrations of subdivided fractions from low molecular weight fraction for human platelet aggregation induced by various compound

Frn.	Addition to assay mixture			
	ADP (3 μ M, 5 μ M)	Epinephrine (3 μ g/ml)	Collagen (2 μ g/ml)	Arachidonic acid (3 μ M)
	μ g/ml	μ g/ml	μ g/ml	μ g/ml
O.E.*	10.8	117.0	21.6	6244.0
I	693.0	N.I.	693.0	N.I.
II	0.6	6.5	1.2	347.0
III	7.3	33.0	17.0	N.I.

* : Oyster extract

N.I. : not inhibited

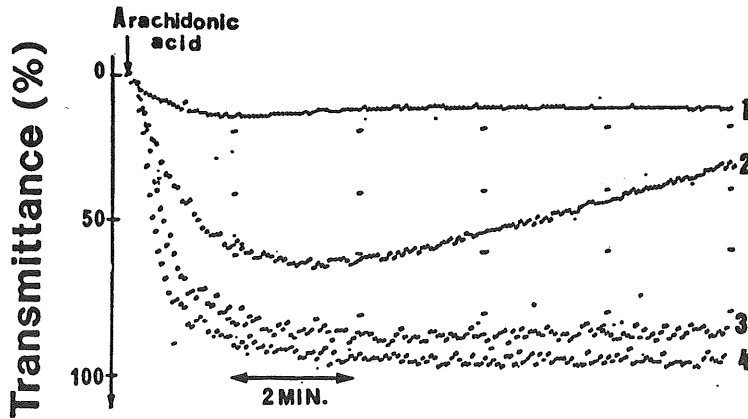


Fig. 3. Effect of fraction II on 3 μ M arachidonic acid-induced aggregation. Freeze-dried Frn. II was added to reaction mixture at the concentration of (1) 694, (2) 347, (3) 174 and (4) 0 μ g/ml

抑制効果が認められたが、Frn. Iにはその効果は認められなかった。Frn. IIは、ADPとアラキドン酸による血小板凝集をそれぞれ0.6 μ g/ml、347 μ g/mlでいずれも60%阻害した。Frn. IIIは7.3 μ g/mlでADPによる血小板凝集を約50%抑制した。次に熱水抽出試料から核酸の過塩素酸抽出を行ない¹³⁾、各分画を凍結乾燥した後、終濃度83.3 μ g/mlになるように調製した後、ADP凝集に対する抑制をみたところ、AMP、アデノシン、イノシン、GMPを多く含む分画にその効果が認められた。IMPを多く含む分画はそれらと比較すると弱い効果が認められた。市販核酸標品の血小板の最大凝集に対する50%抑制濃度は、AMP14 μ g/ml、アデノシン17 μ g/ml、イノシン57 μ g/ml、アデニン70 μ g/mlであった。抑制作用のないものとしては、ウラシル、ウリジン、シトシンであった。ADP凝集に対する抑制の発現には、プリン骨格+リボースの形態が必要であると推測される。Wistar系雄性ラットをコントロール群、熱水抽出試料投与群、限外ろ過膜を使用し調製した低分子画分投与群について、凝集惹起物質としてコラーゲンとADPを用いて、血小板凝集抑制効果を検討した結果、各凝集惹起物質に対して熱水抽出試料投与群、限外ろ過試料投与群ともにコントロールに比べ有意な血小板凝集能の低下があり、その結果 *in vivo*においても *in vitro* 同様カキ抽出物投与による血小板凝集の抑制効果が認められた。

(Fig. 4)。糖尿病時、血小板凝集能が亢進することはよく知られている。そこでアロキサンの腹腔内投与により作製したアロキサン糖尿ラットにカキ抽出試料を投与し、血小板凝集能にあたる影響を検討した結果、アロキサン糖尿ラットの亢進していた血小板凝集能は限外ろ過試料低分子画分投与により有意に改善された。同時に各投与グループに対して耐糖能テストを行なったところ、限外ろ過試料低分子画分投与群はアロキサン糖尿群と比べ有意な高血糖改善傾向を示した (Fig. 5)。カキ抽出試料の特徴的成分である亜鉛、タウリン、亜鉛+タウリンの混合物投与ラットにおける血小板凝集能の測定、耐糖能テストの結果、血小板凝集能に対してわずかに効果が認められたが、血糖値の低下作用は認められなかった。

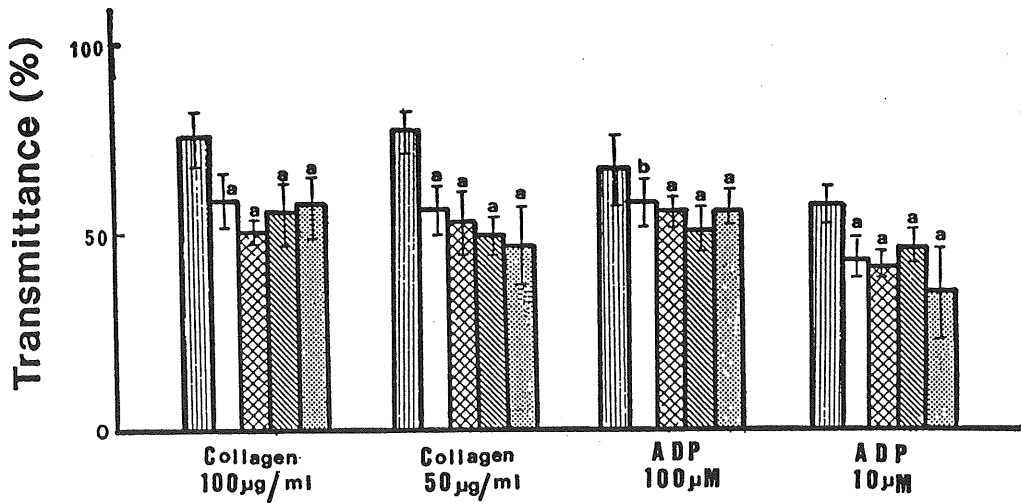


Fig. 4. Effect of the administration of oyster extract on rat platelet aggregation. Results are means \pm S.D. for six rats, and significances of difference between the value for control and those for each group are denoted by a ($p < 0.01$) and b ($p < 0.05$).

▨ : Control, □ : OE 20, ⊞ : OE 200, ▩ : LMO 20, ▨ : LMO 200

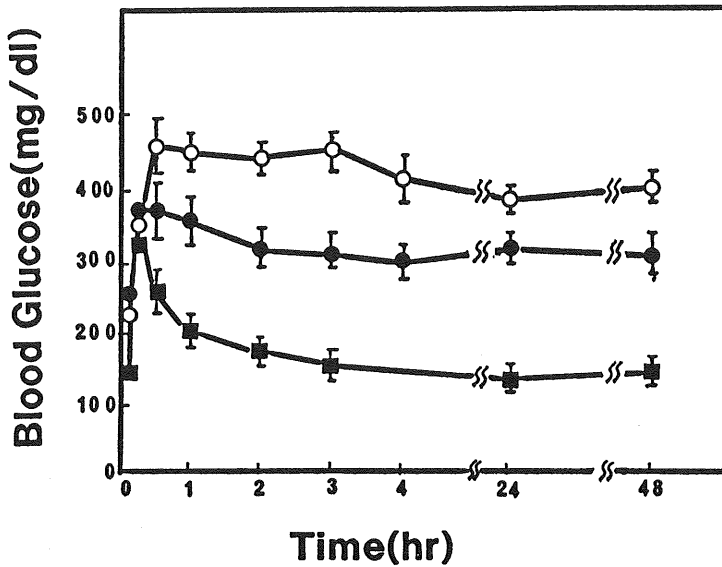


Fig. 5. Effect of the administration of low molecular weight fraction of oyster extract on GTT with 50g of glucose in alloxan-diabetic rat.

Results are means \pm S.D. for six rats.
 ■—■, Control : ○—○, AC : ●—●, ALMO20 :

考 察

カキ抽出物中の水溶性画分に血小板凝集能を抑制する物質が存在することは興味深いことである。さらに、その高分子画分より低分子画分のほうが強い抑制作用を持ち、濃度依存性を示した。*in vitro*において、カキ抽出エキス中の成分が血小板凝集能を抑制する作用は、エピネフリンやコラーゲンによる凝集に対しては弱かったが、ADPによる凝集において顕著に認められた。ADPに対して、強い抑制作用があることから、その作用機序に対して種々のプロセスの阻害を検討して、①サイクロオキシナーゼ活性の低下②ADPによる刺激に対してカルシウムイオンのトラップ作用等について研究を進めた。カキ抽出物の50%凝集抑制濃度は、 $10.8 \mu\text{g/ml}$ とかなり低い濃度を示している。この濃度は、血小板凝集能の抑制薬剤としてよく利用されるアスピリン（アセチルサリチル酸）と比較してもかなり低濃度である¹⁴⁾。

血小板凝集能に影響を与える可能性のある物質としてカキに大量に含まれることから筆者は次のようなものを、その影響因子と考えるに至った。

①核酸関連物質 ②含硫アミノ酸の一つであるタウリンやその他のアミノ酸類 ③海水産生物に特徴的に分布する金属類に注目することにした。

抽出エキス中にATPやADPが少ないのは、加熱抽出中に分解してしまい、AMPが増加するものと思われる。本実験においては、カキ抽出物中の核酸成分と核酸標品の凝集抑制作用を比較した結果、ピリミジン骨格を持つものより、プリン骨格を持つもの、特にAMP、アデノシンに強い抑制作用がみられたことから、ADP凝集に対する抑制の発現には、プリン骨格+リボースの形態が必要であると推察された。ADPによって、惹起される血小板凝集に対するAMP、アデノシン等プリン骨格をもった核酸関連物質によるその作用の低減は、ADP、AMP、アデノシンの構造上の類似性に起因することが推測しうる。Michel et al.¹⁵⁾は、人間の血中において、アデノシンを添加すると、その結果サイクリックAMPは増加し、そして血小板凝集は阻害されると述べている。このことは、著者らの結論ともよく一致する。また早川らは¹⁶⁾、シイタケ水抽出物中の血小板凝集抑制物質として、グアノシン+リン酸塩基1個との存在が必要であると述べている。一方、*in vivo*における血小板凝集能の抑制は、核酸（AMP、イノシン、サイクリックAMP）とタウリン、及び金属イオンの混在による相乗作用として現れていると推測される。カキ抽出物低分子画分中には、サイクリックAMPが少量含まれており、AMP、サイクリックAMPの相乗作用が強い凝集抑制を示す原因であると推測される。

文 献

1. 江口祝, 野村正, 芝哲夫ほか (1979) 海産有用物質の検索, 海洋天然物化学 (日本化学会編) 学会出版センター, 東京: pp.215-276
2. HAMBIDGE, K. M., C. CASEY and N. F. KREBS (1986) Trace elements in human and animal nutrition, ed. by Mertz, W., Academic Press, Orlando: pp.1-137
3. TAJIMA, M., N. MATSUMOTO (Koyama) and Y. NISHIO (Kozu) (1989) Nucleic acid contents of Japanese foods, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 36: 934-939

4. 大久保雅啓, 太田隆男, 綱島勇, ほか (1985) 超臨界二酸化炭素によるカキ脂質の抽出 (会), 日本水産学会春季大会発表要旨, 東京: pp.251
5. 横峯 (坪内) 凉子, 大塚 (村上) 英嗣, 柴田幸雄, 古武彌三, 奥村重雄 (1984) かき食品の脳内トリプトファンならびにリチウムに及ぼす作用とその関連性, 微量栄養素研究 1:19-24
6. 柴田幸雄, 外川嘉子, 岩田章子, 竹内章夫, 坪内凉子, 大久保勉, 服部雅康, 古武彌三, 白石節子, 杉野徳和, 奥村重雄 (1986) かき成分と神経機能特にタウリンの作用について, 微量栄養素研究 3:75-78
7. LÖNNERDAL, B. and B. HOFFMAN (1981) Alkaline reduction of dextran gels and crosslinked agarose to overcome nonspecific binding of trace elements, *Biol. Trace Elem. Res.* 3:301-307
8. MOORE, S. and W. H. STEIN (1954) A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds, *J. Biol. Chem.* 211:907-913
9. DUBOIS, M., K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, et al. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28:350-356
10. 中井一吉, 内田景博, 寺田信幸, ほか (1981) 新しい血小板凝集能検査装置の開発と評価, 臨床検査 25:457-460
11. 山中信介, 川西祐成, 奥井一義 (1980) 高速液体クロマトグラフィーによる清酒中の核酸関連物質の分析, 醸酵工学 58:203-207
12. 鈴木正巳 (1984) 原子吸光分析法はどのように応用するか, 原子吸光分析法 (日本分析化学会編) 共立出版, 東京: pp.81-154
13. 中島宣郎 (1972) 旨味成分の定量法 (II), 調理科学 5:202-209
14. SMITH, J. B. and A. L. WILLIS (1971) Aspirin sel actively inhibits prostaglandin production in human platelets, *Nature New Biol.* 231:235-237
15. MICHEL, H., J. P. CAEN, G. V. R. BORN et al. (1976) Relation between the inhibition of aggregation and the concentration of c-AMP in human and rat platelets, *Br. J. Haematol.* 33:27-38
16. 早川道彦, 葛谷文男 (1985) シイタケと血小板凝集に関する研究, 日老医誌 22:151-158