

かき成分の血小板凝集能におよぼす影響

太田 隆男¹⁾・大久保雅啓¹⁾・奥村 重雄¹⁾・

毛利 威徳²⁾・秋山 弘³⁾・服部 雅康⁴⁾

(¹⁾日本クリニック株式会社中央研究所,* ²⁾東洋食品工業短期大学,** ³⁾四国鉄道病院,*** ⁴⁾近畿大学東洋医学研究所****)

Effects of Oyster Extract on Human Platelets Aggregation

Takao OHTA¹⁾, Masahiro OOKUBO¹⁾, Shigeo OKUMURA¹⁾, Takenori MOURI²⁾,
Hiromu AKIYAMA³⁾, and Masayasu HATTORI⁴⁾

¹⁾Central Research Institute, JAPAN CLINIC Co., Ltd.,

²⁾Toyo Junior College of Food Technology, ³⁾Shikoku Hospital of
Japanese National Railways and ⁴⁾The Research Institute of
Oriental Medicine, Kinki University

The present paper deals with the inhibiting effect of oyster extract on the aggregation of human platelets, Oyster (*Crassostrea gigas*) were extracted with hot water. Hot water extract of oyster inhibited the aggregation of human platelets induced by adenosine diphosphate (ADP), collagen, epinephrine and arachidonic acid. Gel filtration chromatography of the oyster extract on the column of Sephadex G-10 (NaBH₄ treated) demonstrated that the active substance existed in Fraction II and Fraction III. These fractions were consisted of nucleotidic compounds (5'-AMP, cyclic-AMP, inosine etc.) and minerals.

* 所在地：京都市右京区太秦開日町10 (〒616)

** 所在地：兵庫県川西市南花屋敷4-23-2 (〒666)

*** 所在地：高松市西内町2-30 (〒760)

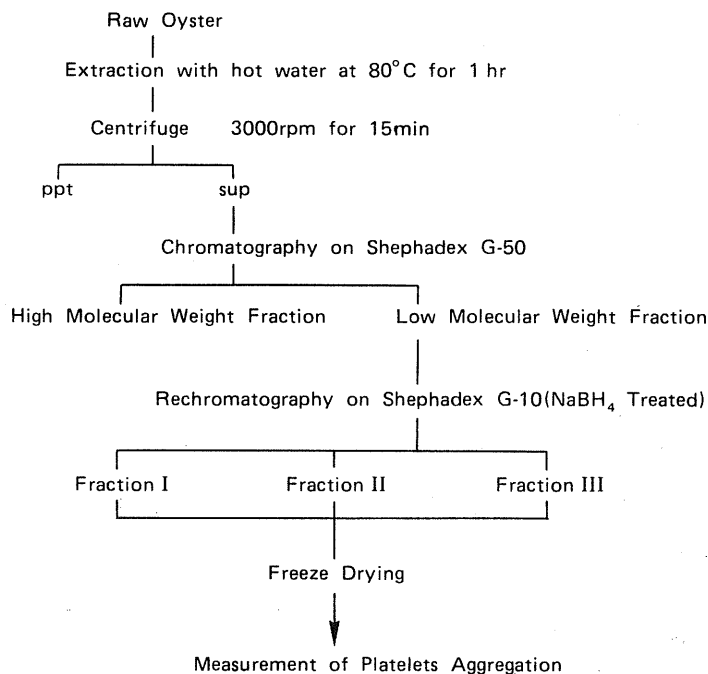
**** 所在地：大阪府南河内郡狭山町大字西山 (〒589)

近年とくに血小板機能亢進の考えられる血栓症、動脈硬化性疾患、糖尿病などについて多くの臨床的検討があり、血小板凝集能検査では *in vitro* 系での評価から十分臨床効果の予想が可能であることから血小板凝集能検査は広く行われている。¹⁻¹⁰⁾

かきは糖尿病の治療食として使用され、栄養価の高い食品として親しまれてきたがその薬理学的な研究は全くなされていなかった。本研究において、まがき熱水抽出物について血小板凝集能におよぼす影響について検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験材料と方法

1. 試料 試料のまがき (*Crassostrea gigas*) は昭和59年広島産のものを使用し、脱殻後むき身にして用いた。
2. 試料の抽出および分画 血小板凝集抑制試験用試料分画の概要を Scheme 1 に示した。
3. 血小板凝集能の測定法 健康な人の全血 (9 容量) に 3.8 % クエン酸ソーグ (1 容量) を混和し、遠心分離により多血小板血漿 (PRP) と乏血小板血漿 (PPP) を得た。凝集はアグリコダ PA-3210 (京都第一科学) で測定し、惹起物質の ADP (アデノシン-2-リン酸)、コラーゲン、エピネフリン (L-エピネフリン重酒石酸塩) はアグリパック (京都第一



Scheme 1 Scheme for the fractionation of oyster extract

科学)およびアラキドン酸ナトリウム(Sigma社製)を用いた。

4. 金属類の分析 島津原子吸光 A A-640-12 を用い、原子吸光法にて測定した。
5. 糖の定量 ゲルろ過溶出液は、フェノール硫酸法により 490nm で吸光値を測定した。¹¹⁾
6. ニンヒドリン陽性物質の定量 ニンヒドリン定量法を用いて、570nm で吸光度を測定した。¹²⁾
7. 核酸関連物質の定性 核酸関連物質の同定にはイオン交換クロマトグラフィー、ろ紙薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーにより行った。^{13), 14)}
8. ろ紙電気泳動法による金属分布 亜鉛含有分画のろ紙電気泳動には、水平式電気泳動装置 SJ-1078 型(アトー株)を用い、ろ紙は東洋ろ紙 No. 51A, 支持電解質として 0.05 M の酢酸ナトリウムを用い、300 V 定電圧で 1 時間泳動させた。泳動後ろ紙は乾燥し、ニンヒドリン発色液にて発色させた。一方、金属分布はろ紙を 10 mm 間隔に細切りにし、0.5% 硫酸 10 ml で溶出させ、原子吸光法にて測定した。

結 果 と 考 察

1. 熱水によるまがきの抽出とその抽出物のゲルクロマトグラフィーによる分画 図 1

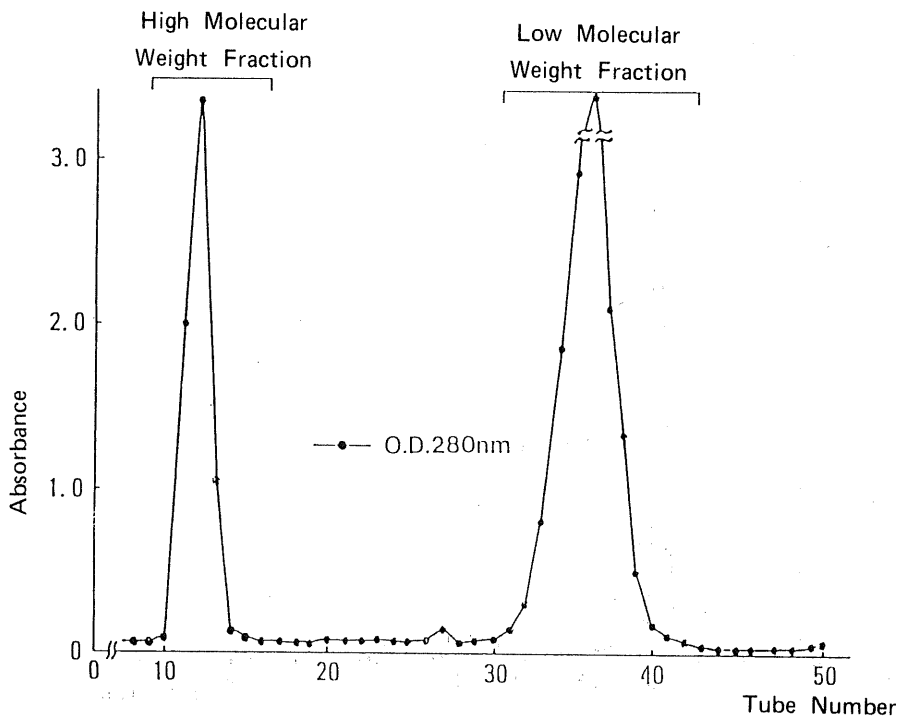


Fig. 1. Gel filtration of oyster extract on Sephadex G-50

に Sephadex G-50 によるゲルろ過クロマトグラムを示した。高分子分画部と低分子分画部に 280nm による吸収ピークが存在した。次に、得られた低分子分画部を 40℃以下で減圧濃縮し、Sephadex G-10 によるゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ところが、Sephadex G-10 は陽イオン性化合物、たとえば金属イオンなどが吸着され、回収率が低下することがわかった。そこで、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) でカルボキシル基を還元して Sephadex G-10 を用いゲルろ過を行った。¹⁵⁻¹⁷⁾ 図 2 に Sephadex G-10 (NaBH_4 処理) 後のゲルろ過クロマトグラムを示した。亜鉛などの金属のゲルへの吸着は認められなかった。また、ゲルろ過後のニンヒドリン陽性物質および全糖量を図 3 に示した。

2. 惹起物質に対するかき熱水抽出成分の影響 まがきの熱水抽出物は終濃度 10.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 21.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 117 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 624 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で ADP, コラーゲン, エピネフリン, アラキドン酸凝集を抑制した。ADP に対する濃度依存性を図 4 に示した。Sephadex G-10 (NaBH_4 還元処理) 後の各 Fr. について血小板凝集抑制能を検討したところ, Fr. II と Fr. III に抑制効果が強かった。Fr. II, Fr. III の濃度依存性を図 5, 図 6 にそれぞれ示した。Fr. II は ADP, コラーゲン, エピネフリン, アラキドン酸に対してそれぞれ終濃度 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 6.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 347 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で凝集を抑制した。

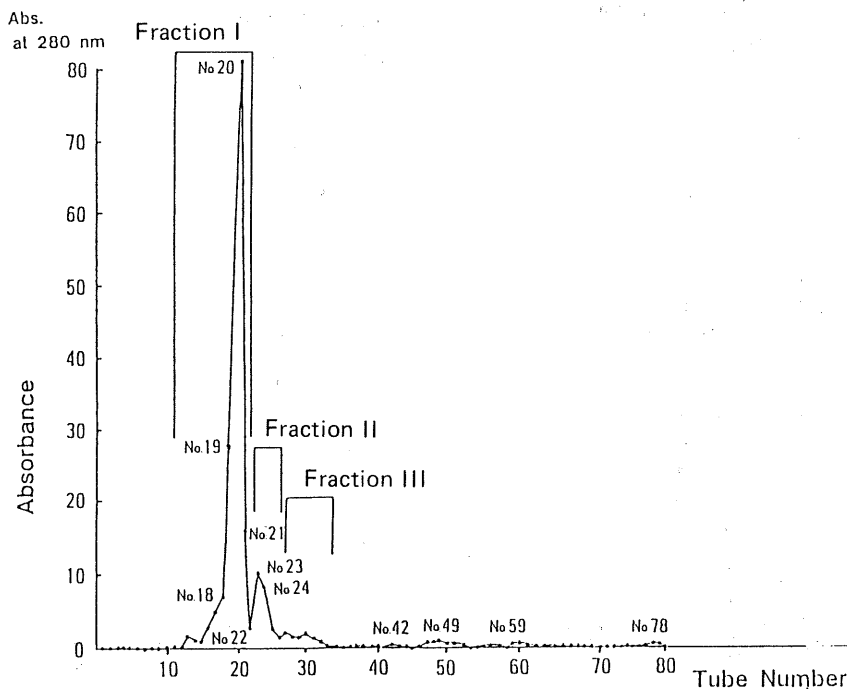


Fig. 2. Rechromatography on Sephadex G-10 (NaBH_4 treated) of low molecular fraction obtained from the first Sephadex G-50 chromatography

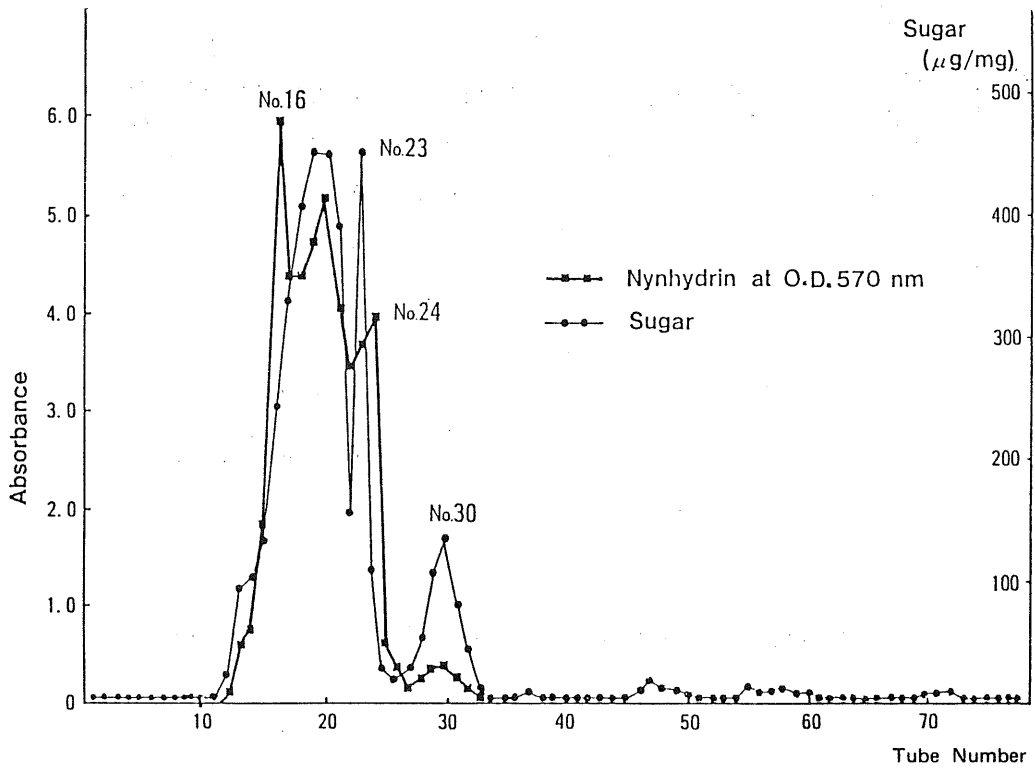


Fig. 3. Gel filtration of nynhydrin positive substance and sugar in low molecular weight fraction

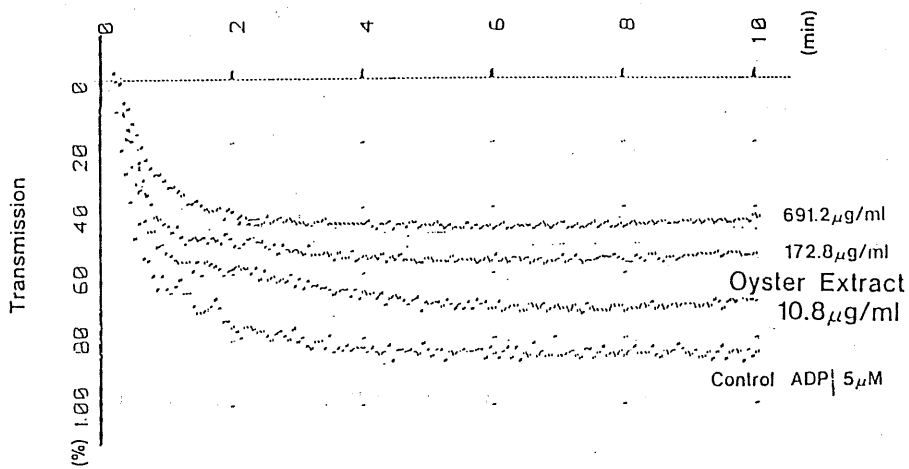


Fig. 4. Effect of oyster extract on 5 μM ADP induced aggregation

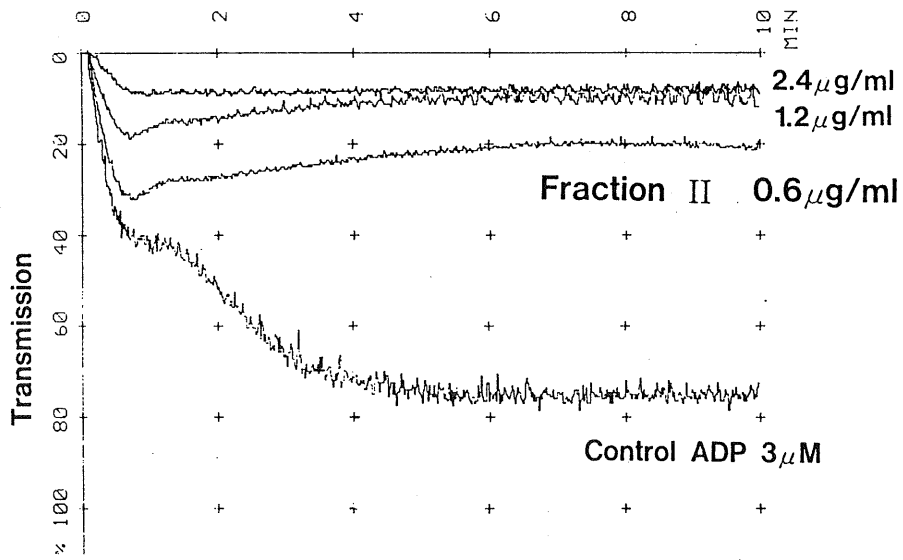


Fig. 5. Effect of Fraction II on 3 μ M ADP induced aggregation

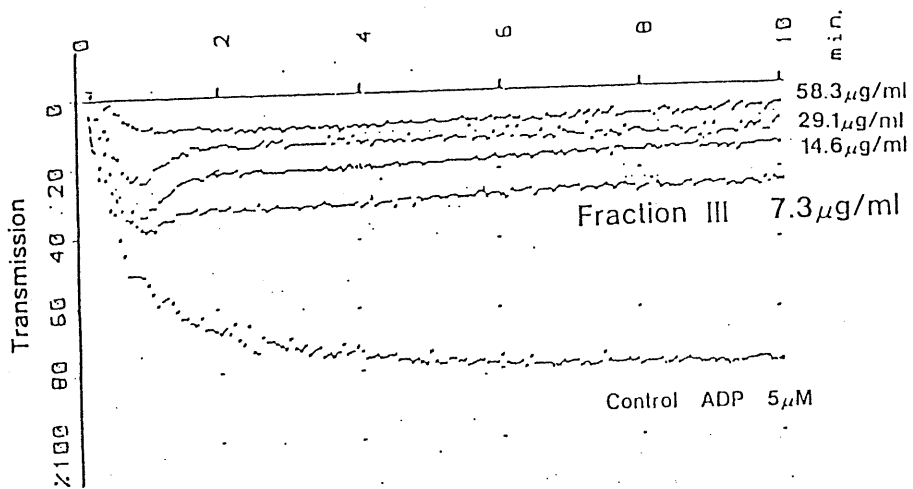


Fig. 6. Effect of Fraction III on 5 μ M ADP induced aggregation

3. Sephadex G-10 (NaBH_4 処理) ゲルクロマトグラフィー後の金属類の分布 各tube 溶液について直接原子吸光法にて測定した Zn, Na, Mg, Ca, Cu の分布を図7 - 図10 に示した。標準亜鉛化合物として塩化亜鉛 (ZnCl_2) を流したところ tube number 80 以降にピークを認めた。このことからまがきに存在する金属の大部分は何等かの有機物と結合していることが示唆された。

4. 核酸関連物質の分析 血小板凝集抑制活性の強かった Fr. II および Fr. III は各々 258 nm と 248 nm に吸収極大を示した。高速液体クロマトグラフィー, ろ紙薄層クロマトグラフィー (図11, 図12) の結果から Fr. II は 5'-AMP が主成分 (90%以上) で少量の cyclic-AMP を含み, Fr. III は Inosine が主成分で他に uridine, guanine を含むことが判った。

5. 標準品 5'-AMP, Inosine との血小板凝集抑制能の比較 Fr. II, Fr. III は金属や少量の他成分を含むが主成分は 5'-AMP と inosine であることから市販の標準品と比較した。Fr. II, Fr. III は生理食塩水に溶解したが, 標準品 5'-AMP と inosine はいずれも生理食塩水に難溶なため, 乏血小板血漿に溶解して凝集抑制能試験に供した。図13, 図14 にそれぞれ ADP に対する標準品 5'-AMP および inosine の濃度依存性を示した。比較から明らかのように, Fr. II, Fr. III は市販標準品の約 10 分の 1 量で ADP による血小板凝集を抑制していることが判った。Fr. II, Fr. III にはいずれも核酸関連化合物が二, 三種混っていることから, 核酸関連化合物の組合せによる相乗効果もしくは, 共存している金属類などによる相乗効果が考えられる。

6. 亜鉛含有分画のろ紙電気泳動 亜鉛含有量の多かった Fr. I の泳動図を図15に示した。ニンヒドリン陽性物質と亜鉛のピークが同じ挙動を示していることが認められた。

ま と め

1. まがき熱水抽出画分の Sephadex G-10 (NaBH_4 処理) ゲルろ過後得られた Fr. II は終濃度 0.6 $\mu\text{g/ml}$, 1.2 $\mu\text{g/ml}$, 6.5 $\mu\text{g/ml}$, 347 $\mu\text{g/ml}$ で ADP, コラーゲン, エピネフリン, アラキドン酸凝集を抑制した。

2. 血小板凝集抑制効果のあった画分には主成分として核酸関連物質 (5'-AMP, cyclic-AMP, inosine など) が含まれており, その他に金属類も共存していた。

3. 市販標準品核酸関連物質との比較において血小板凝集抑制能および溶解性において差異を認めた。核酸関連物質の組合せによる相乗効果また, 金属などの他成分との相乗効果が考えられ, 今後分析を重ね追究する。

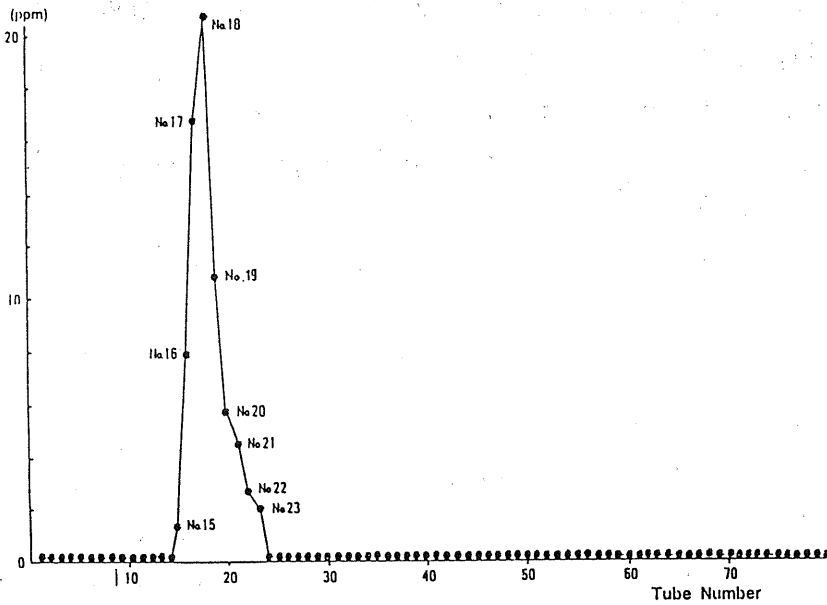


Fig. 7. Gel filtration of Zn in low molecular weight fraction

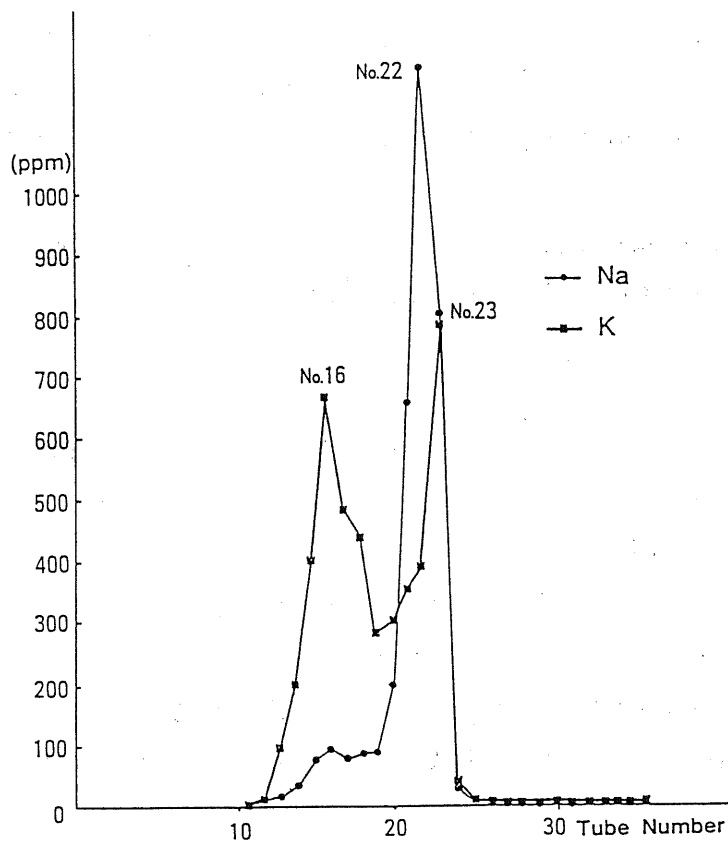


Fig. 8. Gel filtration of Na and K in low molecular weight fraction

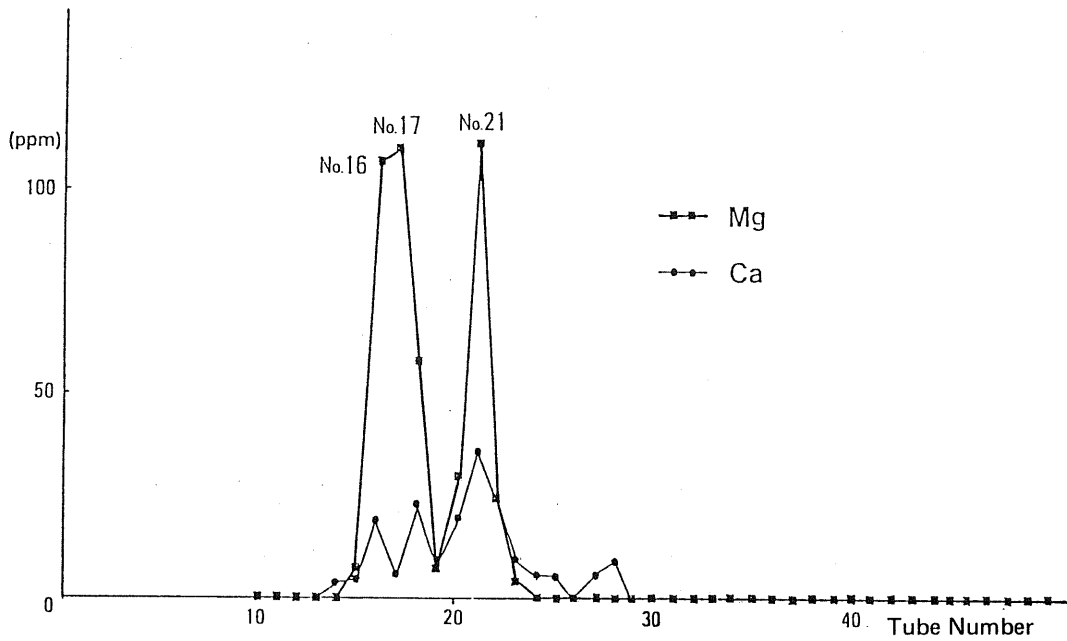


Fig. 9. Gel filtration of Ca and Mg in low molecular weight fraction

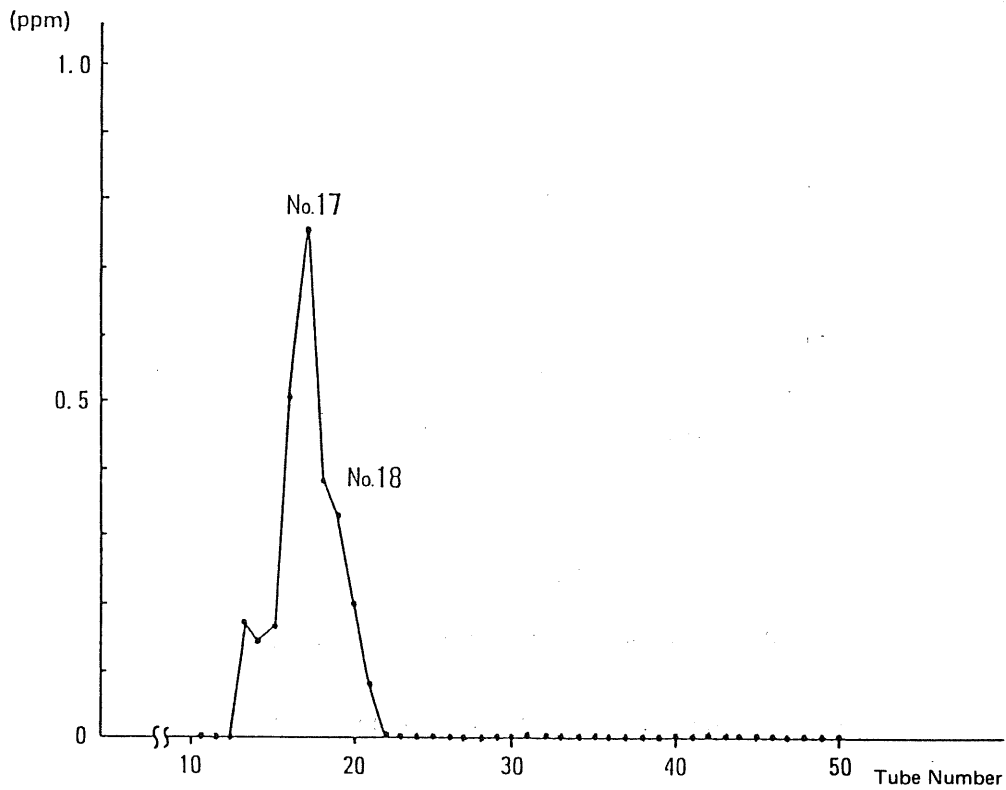


Fig. 10. Gel filtration of Cu in low molecular weight fraction

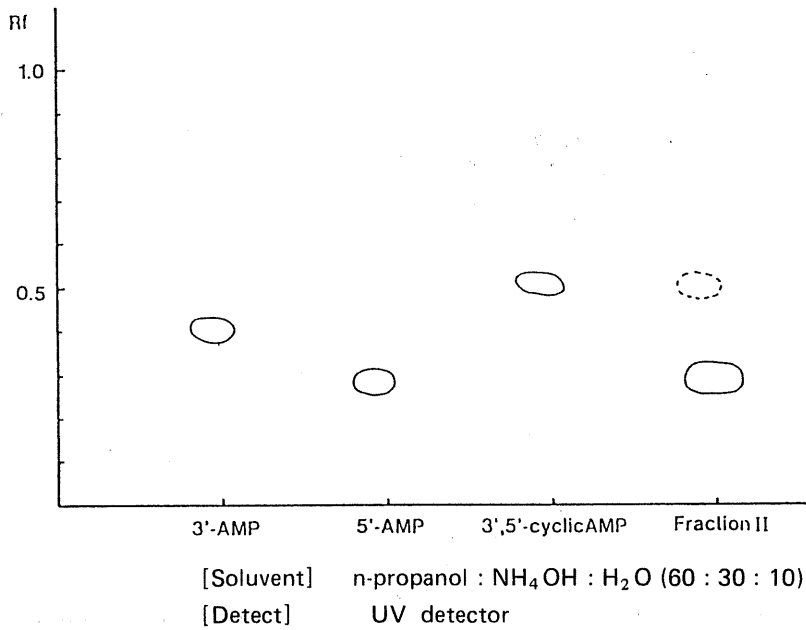


Fig. 11. Thin layer chromatography of Fraction II

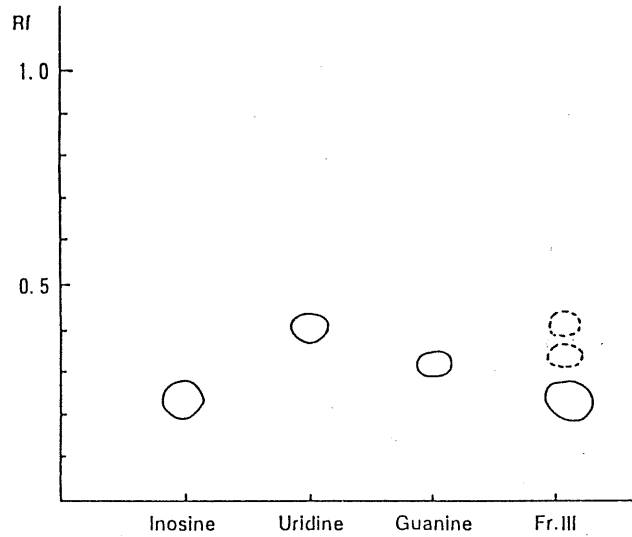


Fig. 12. Thin layer chromatography of Fraction III

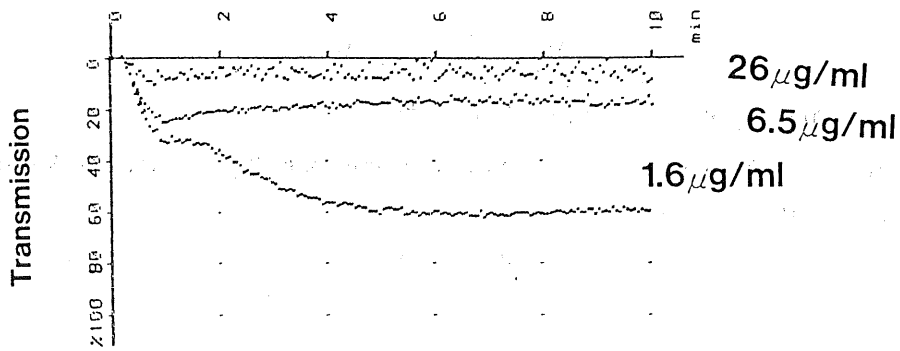


Fig. 13. Effect of 5'-AMP on 3μM ADP induced aggregation

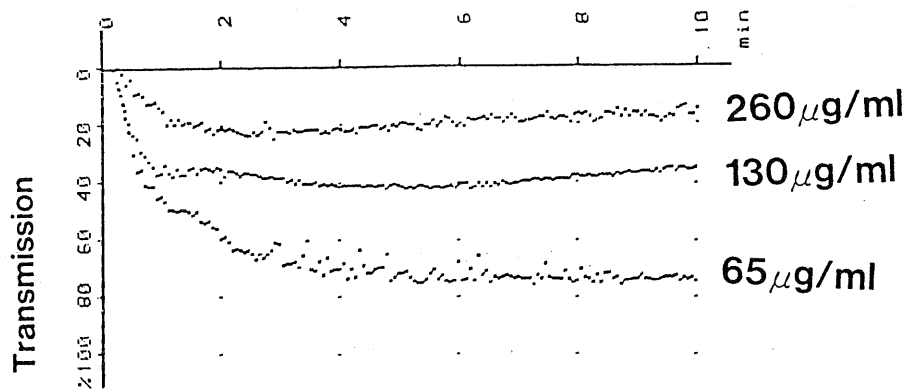


Fig. 14. Effect of inosine on 3μM ADP induced aggregation

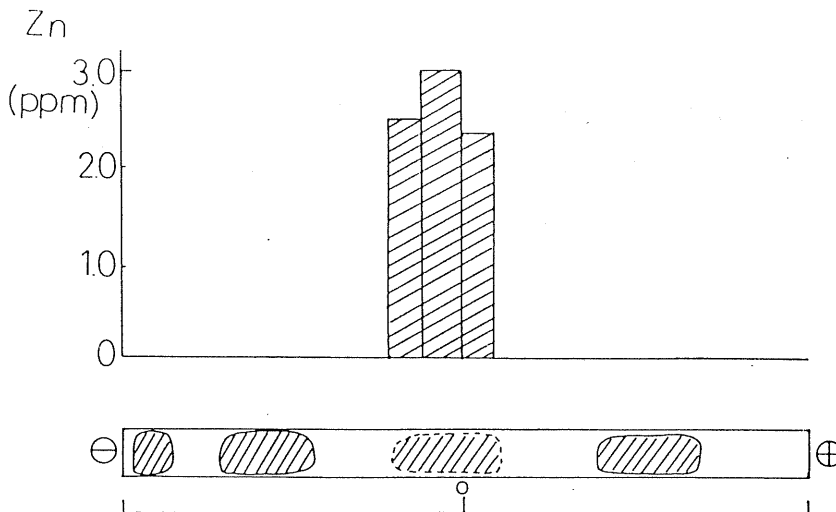


Fig. 15. Electrophoresis of Fr. I

文 献

1. 山中 學, 植田 穰 編(1982)血小板 医歯薬出版
2. HEATH, H., W. D. BRIGDEN, J. V. CANEVER, J. POLLOCK, P. R. HUNTER, J. KELSEY and A. BLOOM (1971) *Diabetologia* 7 : 308
3. KWAAN, H. C., J. A. COLWELL, S. CRUZ, N. SUWANWELA and J. G. DOBBIE (1972) *Lab. Clin. Med.*, 80 : 236
4. SALKY, N. and M. DUGDALE (1973) *Am. J. Cardiol.*, 32 : 612
5. CARVALHO, A. C. A., R. W. COLMAN and R. S. LEES (1974) *New Engl. J. Med.*, 290 : 434
6. COLWELL, J. A., J. SAGEL, L. CROOK, A. CHAMBERS and M. LAIMINS (1977) *Metabolism*, 26 : 279
7. 門田一郎, 田中研一, 服部雅康(1977) *日内学会誌* 66 : 996
8. 門田一郎, 田中研一, 服部雅康(1978) *日内学会誌* 67 : 986
9. 内村 功, 前沢秀憲(1979) *糖尿病* 22 : 150
10. 日高弘義 編著(1983)血小板の分子薬理 講談社
11. DUBOIS, M., K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS and F. SMITH (1956) *Anal. Chem.*, 28 : 350
12. MOOVE, S. and W. H. STEIN (1954) *J. Biol. Chem.*, 211 : 907
13. 山中信介, 川西祐成, 奥井一義(1980) *醸酵工学* 58 : 203
14. 毛利威徳, 平井厚子, 川崎陽子, 宮本陽子, 橋田 度(1974) *日本食品工業学会誌* 21 : 367
15. HURLEY, L. S., B. LÖNNERDAL (1982) *Nutr. Rev.*, 40 : 65
16. LÖNNERDAL, B., B. HOFFMAN (1981) *Biol. Trace Elem. Res.*, 3 : 301
17. 木村正己, 花木 昭, 中嶋暉躬 編集(1983) *金属蛋白質とそのモデル* 共立出版