

コラーゲン-アドレナリン誘発肺血栓塞栓症マウスモデルにおける アシタバポリフェノールの効果

坂野 史明¹ 大藏 直樹² 坂野 麻里子³

肺血栓塞栓症（PTE）は、主に深部静脈血栓症に引き続いて起こる致死的な静脈血栓塞栓症であり、急性期死亡率は30%を越える。また、死亡例の多くは極めて短時間で突然死に至ることから治療が難しく、徹底した予防が重要となる。しかし、動脈硬化を基盤として発症する動脈血栓症（脳梗塞や心筋梗塞など）と比べ、PTEの発症や予防に関わる食品やその成分に関する情報は圧倒的に少ない状況にある。本研究では、抗血栓作用が近年明らかにされたアシタバポリフェノールの摂取がPTE症状に及ぼす影響について、マウスモデルを用いて検討した。C57BL/6Jマウスを通常食またはアシタバポリフェノール含有食で3週間飼育後、血小板凝集を惹起するコラーゲン+アドレナリン溶液を静注することでPTEを誘発し、生存率および肺血管内血栓形成を比較解析した。その結果、コラーゲン+アドレナリン溶液静注後の生存率、生存時間、肺血管閉塞度には、いずれも通常食群とアシタバポリフェノール食群で有意差は認められなかった。したがって、アシタバポリフェノールの抗血栓作用は、血小板凝集を契機として引き起こるPTEの抑制には反映されないことが明らかとなった。

キーワード：アシタバ カルコン 肺血栓塞栓症 静脈血栓塞栓症 マウスモデル

1. 緒言

肺血栓塞栓症（PTE）および、その原因となる深部静脈血栓症（DVT）は、静脈血栓塞栓症（VTE）と総称され、日本でも食生活の欧米化や高齢化、診断率の向上等に伴い、特に1990年代以降急増している¹⁾。VTEは航空機利用等に伴う長時間の同一姿勢の継続が、その発症を誘発するため「エコノミークラス症候群」とも呼ばれており、直近の能登半島地震をはじめとする大規模災害後の車中泊や新型コロナウイルス感染療養中の突然死の原因としても、度々注意が喚起されている²⁾。

生体内での血栓形成には、1856年にRudolf C. Virchowが提唱した①血流のうっ滞、②血管壁の損傷、③血液凝固能の亢進（ウィルヒョウの三徴）が相互に関わるとされており、基本的には現在でも、この概念に従って血栓形成が起こると考えられている。しかし、三徴がどの段階でどの程度寄与するかは、血栓が生じる血流・血管環境により大きく異なってくる。

動脈内に血栓が生じる動脈血栓症では、主に動脈硬化粥腫（アテローム）の破裂を契機として血栓形成が進行するため、アテローム性血栓症と呼ばれている³⁾。粥腫が破裂した部位では、血管内皮細胞が剥がれて露出した内皮下組織に血小板が集積する。この血小板血栓が成長して血流速度が低下する（血流がうっ滞する）と血液凝固反応も進行して凝血塊が生じ、閉塞血栓となる。心臓を栄養する冠動脈で粥腫の破裂が起これば心筋梗塞

1 東京家政学院大学 人間栄養学部 人間栄養学科

2 帝京大学 薬学部 生体防御学研究室

3 相模女子大学 栄養科学部 健康栄養学科

を、頸動脈を含む脳動脈系で粥腫の破裂が起これば脳梗塞を発症する。

一方、VTE では血管内皮細胞は剥離せず、形態学的には無傷の状態では血栓形成が進行する^{4,5)}。静脈は動脈に比べて血流が緩やかなため、特に静脈弁の裏のポケットに血流のうっ滞が生じやすい(図1)。うっ血による低酸素状態が血管内皮細胞を活性化すると、P-セレクトリンやフォンビルブランド因子(VWF)等の接着分子が内皮細胞上に表在化し、ここに血小板、単球、好中球が集まってくる。単球は組織因子を発現して外因系凝固を活性化し、好中球はNeutrophil extracellular traps (NETs) と呼ばれる核内物質の放出反応を介して、内因系凝固や血小板凝集を惹起する。血小板は単球、好中球の集積を補助し、NETs 形成を飛躍的に促進する働きを担う。凝固反応亢進の結果生じるフィブリンが赤血球を取り込みながら赤色血栓として成長し、最終的にPTEを引き起こすような塞栓が生じると考えられている。

動脈硬化は代表的な生活習慣病の一つであり、古くから栄養学の標的として、解析が進められてきた。このため、動脈硬化を基盤として発症する動脈血栓症に対する食品や栄養成分の影響については、数え切れないほど多くの報告がある。VTE の場合もその血栓形成機序(図1)から、血小板機能、白血球機能、血管内皮細胞機能、血液凝固反応、NETs 形成、線溶反応等に影響を及ぼす食品成分が、発症や予防に関わっている可能性が高い。

しかし、VTE は栄養学分野の研究者にとって馴染みの薄い疾患であるからか、現在までVTE の発症や予防に関わる食品や栄養成分に関する情報は驚くほど少ない状況にある。当研究室では、複数のマウスモデルを用いてVTE の抑制に有効な食品成分の探索を進めており、本研究ではアシタバに含まれるポリフェノール類(アシタバカルコン)に着目した検討を実施した。

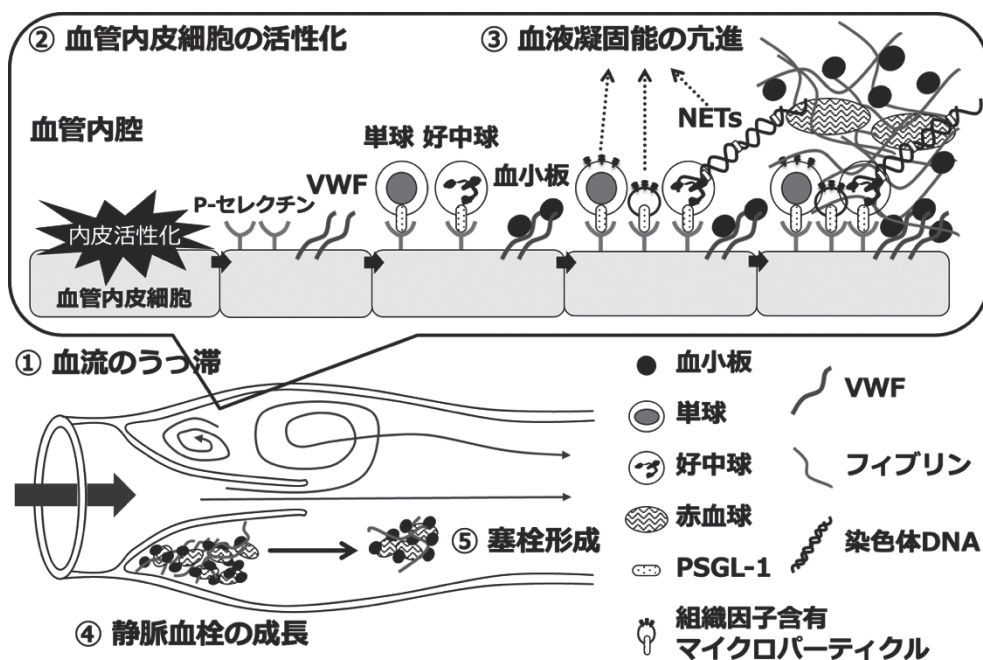


図1 VTE の発症機序

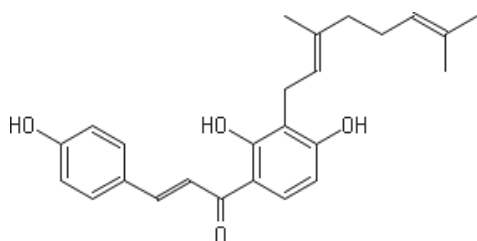
血流のうっ滞によって活性化した内皮細胞上で、血小板、単球、好中球が協調的に働いて血液凝固を亢進することで静脈血栓が形成される。この血栓が遊離して肺動脈を閉塞するとPTEが引き起こる。

VWF: フォンビルブランド因子, PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1 (P-セレクトリンのリガンド分子), NETs: Neutrophil extracellular traps

アシタバ (学名: *Angelica keiskei* Koidzumi) は日本の太平洋岸に自生するセリ科の大型多年草で、「今日摘んでも明日には新しい芽が出る」と言われるほど生命力が強く、古くから八丈島などで健康野菜や薬草として利用されてきた。アシタバの茎や葉を切断すると切り口からネバネバした黄汁が流出するが、この黄汁にポリフェノールの一種であるカルコン類が豊富に含まれている。アシタバ黄汁中には10種類以上のカルコン類が含まれているが、特にキサントアンゲロール (XA) と4-ヒドロキシデリシン (4-HD) の含量が高く、全アシタバカルコン含量の90%以上を占める (図2)^{6,7)}。

最近の研究から、これらのアシタバカルコンにコラーゲン惹起血小板凝集抑制作用、線溶阻害因子であるプラスミノゲンアクチペーターインヒビター-1 (PAI-1) 上昇抑制作用、エンドトキシン誘発血栓形成抑制作用などの抗血栓作用が見られることが明らかにされた^{6,7)}。そこで本研究ではまず、アシタバカルコンの摂取がコラーゲン-アドレナリン投与によって誘発されるマウスの

キサントアンゲロール (XA)



4-ヒドロキシデリシン (4-HD)

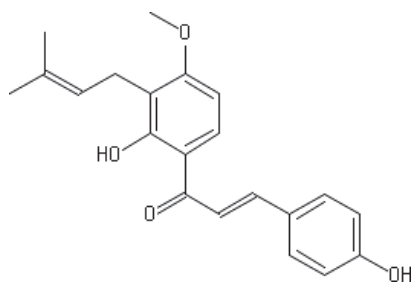


図2 主要なアシタバカルコンの化学構造

PTE 症状を予防、軽減できるか否か検討した。

2. 方法

2-1 実験動物および飼育条件

実験動物として、C57BL/6J マウスの♂7週齢 (日本SLC) を用いた。マウスは室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、明暗サイクル12時間 (照明時間 8:00 ~ 20:00) に設定された動物室内で飼育した。

アシタバの茎切断面から採集した黄汁の凍結乾燥粉末 (CHALSAP-P8) は、株式会社 日本生物・科学研究所から提供を受けた。アシタバカルコン含有飼料は既報に準じて、市販固形飼料 CE-2 (日本クレア) に0.75%の割合で CHALSAP-P8 を加えて調製した^{8,9)}。

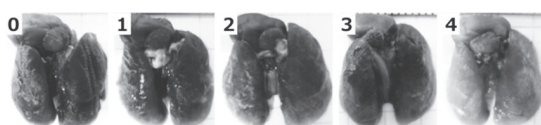
マウスを CE-2 で1週間予備飼育後、2群に分け、通常食 (CE-2, コントロール群, $N = 21$) またはアシタバカルコン含有食 (CE-2 + 0.75% CHALSAP-P8, アシタバ群, $N = 21$) を与えて3週間飼育した。飼育期間を通して飼料および飲用水は自由摂取させ、摂餌量を1日おきに記録した。

動物実験は東京家政学院大学動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号: 4 動物実験委第8号)。また、動物愛護の観点から、マウスに与える苦痛を最小限にするよう配慮して進めた。

2-2 コラーゲン-アドレナリン誘発 PTE モデル¹⁰⁻¹²⁾

コラーゲン懸濁液は、牛アキレス腱由来 I 型コラーゲン (SIGMA) を 0.5M 酢酸中で1時間ホモジナイズして調製した。アドレナリン溶液は、ボスミン注 1mg (第一三共) を使用した。

飼育期間終了後、麻酔下にマウスの腹部を正中線に沿って切開し、下大静脈を露出させた。血小板凝集を惹起するコラーゲン ($5 \mu\text{g/g}$ 体重) + アドレナリン ($0.5 \mu\text{g/g}$ 体重) 混合溶液を下大静脈から投与することで急性 PTE を誘発し、呼吸停止までの時間を20分間測定して生存率および生存時間を調べた。また、呼吸停止2分後に右心室から青色色素 Evans blue (富士フィルム和光純薬) の1%溶液を0.5 mL 注入し、肺全体の染色像から5段階の肺血管閉塞スコアを判定した (図3)。スコアの判定は肺染色像を盲検化した後、



判定基準

0 : Evans blueが100%灌流（血管閉塞無し），1 : Evans blueが75%以上灌流，
2 : Evans blueが50%以上灌流，3 : Evans blueが25%以上灌流，
4 : Evans blueの灌流がほぼ0%（完全閉塞）

図3 肺血管閉塞スコアの判定

正常な肺はEvans blueの灌流により、完全に青く染まる（スコア0）。肺動脈が完全に閉塞した肺はEvans blueの灌流後もピンク色のままとなる（スコア4）。この染まり具合を5段階で評価した。

3名の独立した観察者が行った。

2-3 統計処理

コントロール群とアシタバ群間の統計学的有意性は、Student's *t*-testにより分析し、有意水準5%未満の場合を有意差ありと判定した。両群の生存曲線については、Mantel-Cox log-rank testにより分析し、同様に判定した。

3. 結果

飼育期間中の摂餌量は、コントロール群で 3.6 ± 0.1 g/日/匹（平均値 \pm SD）、アシタバ群で 3.5 ± 0.1 g/日/匹となり、両群間に違いは認められなかった（図4）。ポリフェノール類は特有の苦味や渋味を呈することから、アシタバカルの飼料への添加によって、マウスの摂餌量が減少す

る可能性もあった。しかし、本研究の用量であれば、飼料へのアシタバカルコン添加は摂食行動には影響せず、通常の摂餌量が維持されたと考えられた。

コラーゲン+アドレナリン溶液静注後の生存曲線は、コントロール群とアシタバ群で同様に推移し、両群間に有意差は認められなかった（図5）。コラーゲン+アドレナリン溶液静注20分後までの死亡率も、コントロール群で90.5%、アシタバ群で95.2%と同等であった。また、コラーゲン+アドレナリン溶液静注後の生存時間は、コントロール群で 4.4 ± 1.1 分（平均値 \pm SEM）、アシタバ群で 4.0 ± 0.8 分であり、やはり両群間に有意差は見られなかった（図6）。

「死亡」というハードエンドポイントに加えて、コラーゲン+アドレナリン溶液を負荷したマウスの肺血管閉塞度をEvans blueの灌流によって評価した。Evans blueは血中でアルブミンと結合して血管内を循環し、血管外には漏出しない。このため肺組織中で肺動脈が開通している部分のみが青く染まる^{13, 14)}。このEvans blueの灌流スコアもコントロール群で 0.81 ± 0.21 （平均値 \pm SEM）、アシタバ群で 0.63 ± 0.13 と、両群間に有意差は認められなかった（図7）。

以上の結果からアシタバカルコンには、コラーゲン-アドレナリン投与によって、血小板凝集を契機として誘発されるマウスのPTE症状を予防、軽減する効果は無いと考えられた。

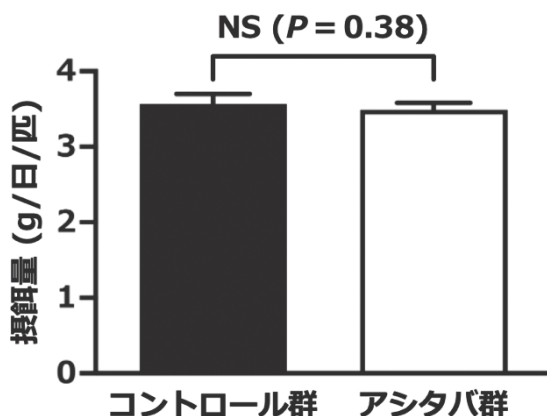


図4 飼育期間中の摂餌量
平均値 \pm SD (N = 4), NS: 有意差無し

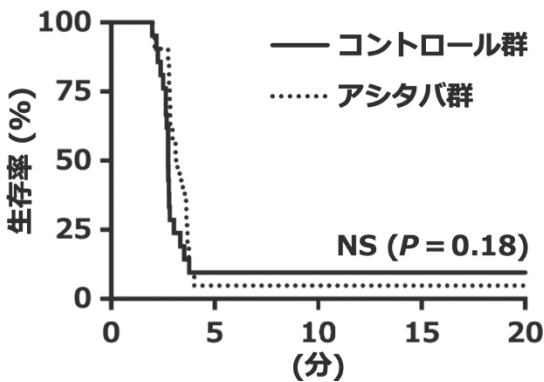


図5 PTE誘発後の生存曲線
N = 21, NS: 有意差無し

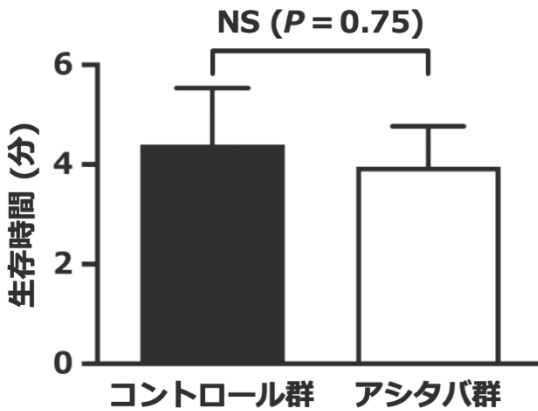


図6 PTE誘発後の生存時間
平均値 ± SEM (N = 21), NS: 有意差無し

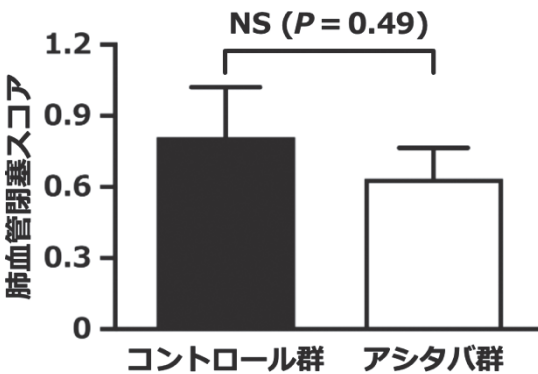


図7 PTE誘発後の肺血管閉塞スコア
平均値 ± SEM (N = 21), NS: 有意差無し

4. 考 察

アシタバ中の主要なカルコンであるXAおよび4-HDには、*in vitro*系でコラーゲン添加によって惹起される洗浄血小板の凝集反応および、全血中でのコラーゲン惹起血小板凝集を抑制する作用が報告されている^{15, 16)}。しかし本研究にて、コラーゲン-アドレナリン投与によりマウスに誘発したPTEの抑制作用は見られなかった。マウスに対して適正なアシタバカルコン投与量がどの位であるかの判断は難しいが、本研究での用量と同じ量で、マウスにアシタバカルコン投与の効果を認めている報告^{8, 9)}もあることを勘案すると、アシタバカルコンの血小板凝集抑制作用は、*in vivo*系での静脈血栓形成抑制に反映されるほど、強くは無いと推測される。

アシタバカルコンには、*in vivo*系にてエンドトキシン（リポ多糖，LPS）で誘発される血栓形成を抑制する作用も見出されている¹⁶⁾。生体内でエンドトキシンは、単球/マクロファージを活性化して、腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）やインターロイキン-1（IL-1）などの炎症性サイトカインの分泌を促すとともに、組織因子の発現を促進して血液凝固を誘導する¹⁷⁾。また、エンドトキシンが結合した血小板は、好中球からのNETs放出を促進して、これを足場として血液凝固や血小板凝集が誘発される^{18, 19)}。このため、*in vivo*系でアシタバカルコンは、炎症や凝固反応を契機として引き起こされる血栓形成に対して、より効果的に作用する可能性がある。今後、炎症性サイトカインや凝固反応の促進因子の作用で誘発されるPTEに対して、アシタバカルコンがどのような効果を発揮するか、さらに検討を進める必要がある。

またアシタバカルコンは、肥満や慢性炎症によってマウスに引き起こされるPAI-1産生上昇を抑える作用も持つことが報告されている^{9, 20)}。このため、アシタバカルコンの摂取は、静脈内に形成された血栓の退縮や血管の再構築を促進する可能性もある。今後、マウスDVTモデル等を用いたこの点の解明も期待される。

本稿は東京家政学院創立 100 周年を祝して寄稿させていただきました。大学を取り巻く状況はますます厳しくなっていますが、学問の火を絶やさないように、学内外の教職員の皆様と団結して前進していきたいと考えています。東京家政学院のさらなる発展を心より祈念いたします。

5. 謝 辞

本研究に御協力頂きました東京家政学院大学人間栄養学部人間栄養学科の小川佳子 氏、二宮夏希 氏に深く感謝するとともに厚く御礼申し上げます。

6. 文 献

- 1) (班長) 伊藤正明ら: 肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症の診断, 治療, 予防に関するガイドライン (2017 年改訂版). 1-93, 2018.
- 2) (班長) 下川宏明, 苅尾七臣, 代田浩之ら: 災害時循環器疾患の予防・管理に関するガイドライン (2014 年版). 3-104, 2014.
- 3) Libby P: Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med* 368: 2004-2013, 2013.
- 4) von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S: Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice *in vivo*. *J Exp Med* 209: 819-835, 2012.
- 5) 羽藤高明: 最新の静脈血栓形成機序から治療を考える. *静脈学* 26: 1-8, 2015.
- 6) Ohkura N, Atsumi G, Oishi K, Baba K, Taniguchi M: Possible antithrombotic effects of *Angelica keiskei* (Ashitaba). *Pharmazie* 73: 315-317, 2018.
- 7) Ohkura N, Taniguchi M, Oishi K, Inoue K, Ohta M: *Angelica keiskei* (Ashitaba) has potential as an antithrombotic health food. *Food Research* 6:18-24, 2022.
- 8) Li Y, Goto T, Ikutani R, Lin S, Takahashi N, Takahashi H, Jheng HF, Yu R, Taniguchi M, Baba K, Murakami S, Kawada T: Xanthoangelol and 4-hydroxyderricin suppress obesity-induced inflammatory responses. *Obesity* 24: 2351-2360, 2016.
- 9) 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 Diet Suppl* 16: 331-344, 2019.
- 10) Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 107: 3161-3166, 2006.
- 11) Banno F, Chauhan AK, Kokame K, Yang J, Miyata S, Wagner DD, Miyata T: The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of *in vivo* thrombus formation. *Blood* 113: 5323-5329, 2009.
- 12) Banno F, Kita T, Fernández JA, Yanamoto H, Tashima Y, Kokame K, Griffin JH, Miyata T: Exacerbated venous thromboembolism in mice carrying protein S K196E mutation. *Blood* 126: 2247-2253, 2015.
- 13) Weiss EJ, Hamilton JR, Lease KE, Coughlin SR: Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood* 100: 3240-3244, 2002.
- 14) Hamilton JR, Cornelissen I, Coughlin SR: Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 8: 1429-1435, 2004.
- 15) Son DJ, Park YO, Yu C, Lee SE, Park YH: Bioassay-guided isolation and identification of anti-platelet-active compounds from the root of Ashitaba (*Angelica keiskei* Koidz.). *Nat Prod Res* 28: 2312-2316, 2014.
- 16) 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*. *Pharmazie* 71: 651-654, 2016.
- 17) Pawlinski R, Pedersen B, Schabbauer G, Tencati M, Holscher T, Boisvert W, Andrade-Gordon P, Frank RD, Mackman N: Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood* 103: 1342-1347, 2004.
- 18) Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Verge E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P: Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13: 463-469, 2007.
- 19) Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD: Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15880-15885, 2010.
- 20) Ohkura N, Nakakuki Y, Taniguchi M, Kanai S, Nakayama A, Ohnishi K, Sakata T, Nohira T, Matsuda J, Baba K, Atsumi G: Xanthoangelols isolated from *Angelica keiskei* inhibit inflammatory-induced plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) production. *Biofactors* 37: 455-461, 2011.
-
- (受付 2024.1.29 受理 2024.7.19)

