

## 機能性食品としての食酢：血液，血管系への線溶発現効果

須見洋行・矢田貝智恵子・中島伸佳・美原恒\*

### 著 言

古くから食酢には食欲増進，疲労，肩こり，高血圧，便秘，動脈硬化や糖尿病に効果があるとされ<sup>(1)</sup>，またこのところ我が国では酢大豆，黒酢や玄米酢がブームとなっている。しかし，その詳しい生理作用，さらには微量含まれる有効成分についての研究は少ない<sup>(2-5)</sup>。特に，循環系への影響としては最近，黒酢中にアンジオテンシン変換酵素（ACE）の阻害に働く成分が認められている<sup>(6)</sup>。

我々はこれまで170種あまりの食品検索，特に日本の伝統食品である納豆<sup>(7-10)</sup>，酒（焼酎）<sup>(11)</sup>，あるいはインドネシアのテンペ<sup>(12)</sup>など一連の発酵食品が持つ循環系への影響とその作用成分についての研究を続けてきた。そのうち海洋生物<sup>(13)</sup>，納豆<sup>(14)</sup>，酒類<sup>(15)</sup>については一部を本誌でも紹介した。今回は，日本農芸化学会，及び中塾研究奨励会の研究助成をもとに，食酢成分の血液-血管系への影響，特に線溶系の引き金となる酵素であるプラスミノーゲンアクチベーター放出に関して検討したのでその成績を紹介する。

### 材料と方法

食酢としては原料に米（普通および純米，穀物酢及び純米酢），ワイン（ワインビネガー），リンゴ（リンゴ酢）を用いたもの（株.中塾酢店，愛知），及び梅酢（株.三明化学，東京），伝統酢（酢屋商店，福岡）を購入した。その他，食酢の対照として酢酸，クエン酸，及び乳酸は試薬特級（和光純薬）を用いた。動物投与用の食酢成分はワイン酢をエバポレーターで濃縮した後 Sephadex G-25 によるゲル濾過にかけ脱塩したものを（M.W.5000以上）遠心濃縮し（Tomy Centrifugal Concentrator CC-100），生理的食塩水に溶解して用いた。

血液への添加効果は，各種の食酢（あるいは酸類）をラット血漿に添加後，20倍量に蒸留水で希釈（pH 5.2-5.3）にする Milstone の方法<sup>(16)</sup>でユーグロブリン（euglobulin）分画を調整し，それを Astrup 及び

Müllertz 法による標準フィブリン平板<sup>(17, 18)</sup>にのせ（30  $\mu$ l/平板），37℃でインキュベーションして生じる溶解面積（EFA）で調べた。ブタ耳の灌流実験は Klöcking の方法<sup>(19, 20)</sup>に従い，屠殺5時間以内のブタ耳を Tyrode 液（37℃，pH 7.4）で動脈側よりペリスタポンプを用いて灌流し（0.75ml/分）行なった。ラット（ウイスター雄，410-520g）へのストレス負荷実験は田村らの方法<sup>(21)</sup>に順じ，水温25℃で5分間泳がせた後，得られたラットの血漿ユーグロブリン分画の線溶活性を測定することで行った。また，ラットへの食酢成分の投与実験はネンブタール麻酔下に頸静脈内にカニューレを挿入して行った。

血漿プラスミノーゲンアクチベーター（t-PA）活性は3.8%クエン酸ナトリウム（チトラート：ミドリ十字社）を用いて採血し，分離された血漿を酸処理後，H-D-Val-Leu-Lys-pNA（カビ社）及びGlu-plasminogen（シグマ社）を基質として測定する Chmielewski らの方法<sup>(22)</sup>により測定した。また，血漿プラスミノーゲンアクチベーター阻害物質（PAI 1）活性は Klocking らの方法<sup>(23)</sup>で，ヒト子宮 t-PA（シカゴ大学 K.C. Robbins 提供）を標準に測定した。

### 成 績

1. ストレス負荷を行ったラットの血漿ユーグロブリン分画でフィブリン分解活性の亢進が確認された。即ち，未処理の対照群（N=5）のフィブリン溶解活性がいずれも 0  $\text{mm}^2/18\text{hr}$ であったのに対してストレス負荷群（N=5）では  $49 \pm 13 \text{mm}^2/18\text{hr}$ であった。この線溶活性の高いユーグロブリン分画に対して種々の濃度の食酢あるいは有機酸を添加し，37℃のインキュベーションを行ってみたが線溶活性に変化は認められなかった。
2. 一方，各種食酢を血液あるいは血漿に添加，室温1時間インキュベーションした後にユーグロブリンを調整し，線溶活性を測定してみたところ，同分画の線溶能（EFA：フィブリン溶解活性）は対照の

\* 宮崎医科大学生理学講座

酢酸、クエン酸、あるいは乳酸よりも高まっていることが判った。図1は血漿を用いたその一例であるが、37°Cインキュベーション後のフィブリン平板溶解面積は、7匹の平均で穀物酢、ワイン酢、リンゴ酢、純米酢、梅酢、伝統酢、酢酸、クエン酸、及び乳酸で各々 $66.6 \pm 8.2$ ,  $77.4 \pm 10.0$ ,  $70.0 \pm 7.0$ ,  $56.3 \pm 8.1$ ,  $60.8 \pm 9.2$ ,  $65.6 \pm 7.4$ ,  $59.3 \pm 6.0$ ,  $60.8 \pm 4.8$ , 及び $50.4 \pm 11.3 \text{ mm}^2/33\text{hr}$ であった。つまり、血液成分に対するなんらかの影響（線溶賦活化）物質が食酢成分中に存在することが推測された。

3. ラット血漿への添加実験で線溶亢進効果の最も強かったワイン酢を用い、その血管灌流でのプラスミノゲンアクチベーター放出への影響を調べた。表Iに示すように、投与量に応じてt-PA活性の亢進すること、即ち、血管性の線溶賦活化因子の放出量の高まることが確認された。

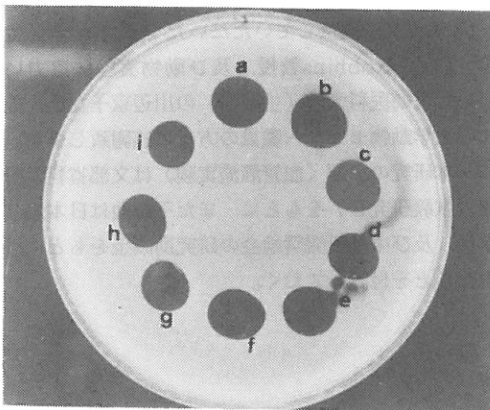


図1 食酢の血漿線溶酵素への添加効果

各種食酢及び対照として用いた有機酸（4.5%）をpH5.2-5.3になるまでラット血漿に添加後、蒸留水で20倍量に希釈し、室温1時間後得たユーグロブリン分画 $30 \mu\text{l}$ を標準平板上にのせ、37°C、33時間のインキュベーションを行った。

a:穀物酢, b:純米酢, c:ワイン酢, d:リンゴ酢, e:梅酢, f:伝統酢, g:酢酸, h:クエン酸, i:乳酸を添加。

表1 食酢成分の血管灌流によるプラスミノゲンアクチベーター放出

灌流液	濃度	例数	PA放出量	p値
対 照	—	6	$11 \pm 6$	—
食酢成分	$50 \mu\text{g/ml}$	3	$28 \pm 8$	n.s.
(ワインビネガー)	100	5	$33 \pm 5$	$<0.01$

PA（プラスミノゲンアクチベーター）活性はブタ耳の血管灌流液をGlu-プラスミノゲンを含むフィブリン平板にのせ、37°C、18時間のインキュベーション後に生じた溶解窓の面積をt-PA活性（IU/ml）に換算。

4. 次に、食酢成分（ワイン酢）のin vivoでの投与効果を検討した。その結果、図2に見られるように $10 \text{ mg/kg}$ の静注後血中t-PA活性の高まること、そのピークが投与後5分目であることがわかったが、一方、PAI活性の変化はほとんど認められなかった。

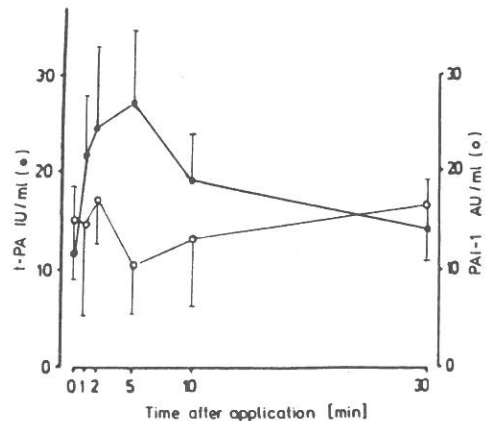


図2 食酢成分の線溶賦活化効果

5匹のラット（ウイスター系雄：410-520g）にワイン酢より得たM.W.5000以上の高分子画分を $10 \text{ mg/kg}$ 静注投与後、経時的に血中の組織プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）及び線溶系インヒビター（PAI-1）活性を測定。

5. 例数は少ないが、同食酢成分を3匹のラットへ一週間の経口投与（ $120 \text{ mg/kg/day}$ ）してみた。EFAは各々21, 64, 及び $49 \text{ mm}^2/18\text{hr}$ と、投与前（いずれも $0 \text{ mm}^2/18\text{hr}$ ）に比べてあきらかに強い線溶亢進効果を示した。

## 考 察

各種の食酢を運動負荷を行い得られたラット血中線溶酵素画分に直接添加してみたが活性の変化はなかった。しかし、血漿へ添加した場合、インキュベーションすることによって線溶活性の高まること、またその活性化には酢酸以外の食酢中の微量成分の関与することなどが推測された。こうした食酢の間接的な線溶賦活化はこれまでDICなど二次線溶でのカリクレイン、血液凝固因子Xなどが関与するという報告はあったものの、食品由来の成分については報告が全くなかった。当然ながら食酢あるいはその蒸留物に直接の線溶能はないため、恐らく凝固系におけるCaとか、リン脂質のような酵素活性化の“場”を与える物質の関与があるものと推測された。その他、血液を除いたブタ耳血管の灌流実験でも食酢成分による線溶亢進効果が認められ、血管への影響が推測された。その活性は比較的強く、また反応は濃度依存性であった。北口らによれ

ば、血管作動性の薬剤は収縮、あるいは弛緩のいずれに働く場合も血管壁からのプラスミノゲンアクチベーター放出に働くとしている。今回の実験でも血管への食酢の直接の影響をみた訳ではないが、ある種の食酢成分がプラスミノゲンアクチベーター（おそらくt-PA）放出に働き、その活性もフィブリン平板の溶解面積から考えて生理的な運動時の値（実験1の成績）に近いことがわかった。多くの食品検索の中で、我々は酒類では特にアルコール以外の微量成分の関与を推測してきた。<sup>(11, 15, 28)</sup>食酢は酒と同じ原料からなる発酵食品であり、同様の微量の発酵生産物関与の可能性もある。なお、線溶賦活化は例数は少ないがin vivoでも確認された（図2）。プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）活性の最高値の見られたのは投与後5分目であり、これまでの酒の成績<sup>(11, 15)</sup>に比べて食酢の効果は短かいが、血中の主要抑制系であるPAI-1活性の変化はほとんど認められなかった。いずれにせよこれまでの多くの食酢の伝承的な効能を説明するものとしてACE阻害物質以外にもそうした線溶関連物質の関与は否定できないものと思われる。

## 要 旨

10種類の食酢及び有機酸類を用い、直接の血液への添加実験、ブタ耳の血管灌流実験、及びin vivoでのラットへの投与実験を行い、血液-血管系への影響を検討した。

## 文 献

1. 柳田藤治：酢の機能性について。日本醸協誌 85：134-141, 1990
2. 谷澤久之、佐塚泰之、小松明子、滝野吉雄：マウスにおける米酢の急性毒性と脂質代謝に及ぼす作用について。日本栄養食糧誌 36：283-289, 1983
3. Mochizuki, S., Hata, M., Takeuchi, F. and Masai, H. : A possible mechanism for the blood ethanol lowering effects of vinegar in rats. Nutr. Rep. Int.35 : 673-681, 1987
4. Ebihara, K. and Nakajima, A. : Effect of acetic acid and vinegar on blood glucose and insulin responses to orally administered sucrose and starch. Agric.Biol.Chem.52 : 1311-1312, 1988
5. 青木みか、河野節子、辻原命子：市販食酢のラット血圧低下作用。日本栄養食糧学会総会、講演要旨 2G-13p, 1988
6. 大南宏治、松岡栄子、奥田拓道：ラット（SHR）の血圧に及ぼす黒酢の作用。基礎と臨床 19：237-241, 1985
7. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. : A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a typical and popular soybean food of the Japanese diet. Experientia 43:1110-1111, 1990
8. 須見洋行：血栓溶解酵素：ナットウキナーゼの性質とその経口線溶療法への応用。（機能性食品素材：食品由来の生理活性物質における研究と開発）工業技術会、東京, p.88-96, 1989
9. Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. : Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. Acta Haematol.84 : 139-143, 1990
10. Sumi, H., Kawabe, K. and Nakajima, N. : Effect of various polyamino acids and D- and L-amino acids on the blood fibrinolytic system. Comp. Biochem. Physiol. 102B : 159-162, 1992
11. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H. and Mihara, H. : Urokinase-like plasminogen activator increased in plasma after alcohol drinking. Alcohol & Alcoholism 23 : 33-43, 1988

食酢を直接線溶酵素（血漿ユーグロブリン分画）に加えても活性に影響はみられなかったが、血液あるいは血漿へ添加し、インキュベーションした場合は、同分画の線溶活性（EFA）に対する亢進効果が確認された。その効果はワイン酢、リンゴ酢、米（普通）酢、米（伝統）酢、梅酢の順に強く、いずれも等量の酢酸の添加効果よりも優れていた。

食酢成分（M.W.5000以上）はブタ耳血管の灌流実験（50-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）においても、またラットへの静注投与（10  $\text{mg}/\text{kg}$ ）でも血中線溶亢進効果を示した。血中t-PA活性化能のピークは経口投与後約5分目であり、一方PAI活性の変化は認められなかった。

こうした食酢による線溶発現には、食酢中の有機酸よりも、微量混在する発酵生産物の血液あるいは血管系への関与があるものと推測された。

## 謝 辞

t-PA標品を提供していただいたシカゴ大学（生化学）K.C. Robbins教授、及び動物実験に協力いただいた宮崎医科大学（生理学）の川辺京子女氏、並びに同大学動物センター職員の方々に感謝致します。なお、本研究の一部（血管灌流実験）は文部省科学研究費（試験研究B）をもとに、またその他は日本農芸化学会、及び中絶研究奨励会の研究助成金をもとに行われたことを付記しておく。

機能性食品としての食酢：血液、血管系への線溶発現効果

12. 須見洋行：ナットウキナーゼの機能性と応用。日刊フードケミカル 12：72-77, 1990
13. 須見洋行, 矢田貝智恵子, 中島伸佳：機能性食品としての海洋生物。無脊椎動物および藻類中に見出された血栓溶解関連物質。岡山県立短大研究紀要 36：17-21, 1992
14. 須見洋行：機能性食品としての納豆。血栓溶解酵素ナットウキナーゼとその投与効果。岡山県立短大研究紀要 35：46-52, 1992
15. 須見洋行, 清木雅雄, 美原 恒：血栓予防と飲酒。血管性プラスミノゲンアクチベーター放出作用。岡山県立短大研究紀要 37, 16～21, 1992
16. Milstone, H. : A factor in normal human blood which participates in streptococcal fibrinolysis. J. Immunol. 42 : 109-116, 1941
17. Astrup, T. and Müllertz, S. : The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys. 40 : 346-351, 1952
18. Sumi, H., Nakajima, N. and Mihara, H. : Fibrinolysis relating substances in marine creatures. Comp. Biochem. Physiol. 102B : 163-167, 1992
19. Markwardt, T. and Klöcking, H.-P. : Studies on the release of plasminogen activator. Thromb. Res. 8 : 217-223, 1976
20. Klöcking, H.-P. : Release of plasminogen activator by acetylcholine from the isolated perfused pig ear. Thromb. Res. 16 : 261-264, 1979
21. 田村俊吉, 堤 瑋二, 木津弘司：Glucuronic acid 代謝に関する研究。日本薬理誌 59 : 78-89, 1963
22. Chmielewska, J., Ranby, M. and Wiman, B. : Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma. Thromb. Res. 31 : 427-436, 1983
23. Klöcking, H.-P. : Influence of natural humic acids and synthetic phenolic polymers on fibrinolysis. Proceedings of the International Symposium on Humic Terrestrial Environment, p.1-6, Linköping, Sweden, 1989
24. Cochrane, C.G. and Griffin, J.H. : The biochemistry and pathophysiology of the contact system of plasma. Adv. Immuno. 33 : 241-305, 1982
25. Miles, L.A., Rothschild, Z. and Griffin, J.H. : Dextran sulfate-dependent fibrinolytic activity in whole human plasma. Prog. Fibrinolysis 6 : 58-61, 1983
26. Kitaguchi, H., Hijikata, A. and Hirata, M. : Effect of thrombin on plasminogen activator release from isolated perfused dog leg. Thromb. Res. 16:407-420, 1979
27. Hijikata, A., Hirata, M. and Kitaguchi, H. : Effect of proteases on plasminogen activator release from isolated perfused dog leg. Thromb. Res. 20:521-531, 1980
28. 須見洋行：酒類に含まれる血中線溶亢進および抑制に働く生理活性物質。アルコール研究と薬物依存 26 : 283, 1991

平成4年2月15日 受付

平成4年3月23日 受理