

食餌性高コレステロール血症ラットの血小板機能に対する 赤ワインポリフェノール成分長期摂取の効果

小林優子, 山田晃子, 村田恵理, 清水良美, 利美賀子, 下田智子,
會田智美, 伊藤恒賢*, 石幡明**, 片野由美

山形大学医学部看護学科臨床看護学講座

*山形大学医学部動物実験施設

**奥羽大学薬学部病態機能学分野

(平成20年4月22日受理)

要 旨

【背景】 赤ワインに含まれるポリフェノール化合物 (Red Wine Polyphenolic Compounds; RWPC) が循環器疾患の予防・改善効果をもたらすことが示唆されている。高コレステロール血症では虚血性心疾患の発症頻度が高く、その原因の一つに血小板凝集能の亢進が考えられる。RWPCは血小板凝集抑制作用を持つことが報告されているが、生体内での血小板凝集抑制機序については不明な点が多い。本研究では、食餌性高コレステロール血症ラットの血小板機能に対するRWPC含有赤ワイン凍結乾燥品の長期投与の効果を検討した。

【方法】 雄性Fischer 344ラット (2~3ヵ月齢) を三群に分け、通常の飼料 (対照群)、通常の飼料に4%コレステロールを混合した飼料 (コレステロール群)、4%コレステロールに0.62%赤ワイン凍結乾燥品 (RWPC) を混合した飼料 (RWPC+コレステロール群)、の各々の飼料で1ヵ月間飼育し、血小板凝集能、血漿脂質を測定するとともに、肝臓での脂肪沈着の変化を検討した。

【結果および結論】 1) 血小板機能: コレステロール群では、対照群に比べ有意に亢進した。一方、RWPC+コレステロール群では、コレステロール群でみられた血小板凝集能亢進作用を有意に抑制し、対照群と差がなかった。2) 血漿脂質: コレステロール群とRWPC+コレステロール群では、対照群に比べ有意に増加し、コレステロール群とRWPC+コレステロール群に差はなかった。3) 肝臓の脂肪沈着: コレステロール群およびRWPC+コレステロール群では、対照群に比べ広範な脂肪沈着が認められた。

以上より、RWPC長期投与は、食餌性高コレステロール血症ラットの血小板機能亢進を抑制すること、その効果は、血漿脂質の変化とは関連していないことが示唆された。

キーワード: 赤ワイン、ポリフェノール、血小板凝集、高コレステロール血症

緒 言

近年、我が国では食生活の欧米化に伴い、動物性脂肪摂取量等の増加により高脂血症や糖尿病などの生活習慣病が増加している¹⁾。さらに、人口の高齢化とともに動脈硬化症や虚血性心疾患などの循環器疾患による死亡率が増加している¹⁾。動物性脂肪摂取量と虚血性心疾患による死亡率には、正の相関関係が報告されているが、フランスでは、動物性脂肪を多く含む食事を摂取する食習慣にもかかわらず、他の欧米諸国に比べ、虚血性心疾患による死亡率が低いことが報告された²⁾。この疫学的事実は、“French paradox”と呼ばれている。その後の研究によりフランスの冠血管疾患等による死亡率が他国と比較して低いことは、赤ワイン摂取量の多さと関係していることが示唆され、赤ワインに含まれるポリフェノール化合物 (Red Wine Polyphenolic Compounds; RWPC) が、冠血管疾患の予防に関与していることが推察された³⁾。著者らは、RWPCの冠血管疾患を予防する機序を解明するために、RWPCの冠循環、血管に対する作用について検討し、摘出心臓、血管において冠循環改善効果⁴⁾、内皮依存性血管弛緩作用⁵⁾があることを明らかにしてきた。しかし、これらは単回投与による効果であり、長期間投与の効果については明らかでない。そこで、RWPCの長期投与効果を検討するために、食餌性高コレステロール血症モデル動物を作製し、冠血管、胸部大動脈において循環改善効果の有無について検討した。その結果、冠血管においてRWPCを長期間投与した場合に冠循環改善効果が認められること⁶⁾、胸部大動脈においてRWPCを長期投与した場合に、血管内皮細胞由来の一酸化窒素 (NO) 産生遊離機能を高めることで血管保護効果に寄与している可能性があること⁷⁾が明らかとなった。

本研究では、循環動態の維持に重要な役割を果たしている血小板機能に対するRWPCの作用

に着目した。血小板は、血管の損傷により露出した血管内皮下組織において粘着・顆粒放出・凝集反応によって止血作用を示すことで、創傷治癒に重要な役割を果たしている⁸⁾。しかし、血小板凝集能の異常な亢進は血栓形成を促進し、凝集塊による冠血管の閉塞を起こしやすくする⁹⁾。特に、高コレステロール血症などの高脂血症では、血小板凝集の亢進により、冠血管疾患の発症の頻度が高くなることが報告されている¹⁰⁾。これまでに、RWPCは、洗浄血小板のADPによる凝集を抑制することが報告されている¹¹⁾。しかし、RWPCは血管内皮細胞におけるプロスタサイクリン (PGI₂) やNOの産生を増加させることで血小板凝集を抑制する¹³⁾と報告されているものの、生体内におけるRWPCの血小板凝集抑制効果についてはまだ十分に明らかにされていない^{12), 13)}。

そこで、本研究では、食餌性高コレステロール血症ラットにおける血小板凝集作用、血漿脂質および肝臓組織の変化と、それらに対するRWPC長期投与の効果を検討した。

対象と方法

実験には雄性Fischer 344ラット (2~3ヵ月齢) を用いた。本実験は、山形大学医学部動物実験指針¹⁰⁾、動物愛護及び管理に関する法律 (昭和48年法律第105号)、実験動物の使用及び保管等に関する基準 (昭和55年総理府告示第6号) を遵守して行った。

1. 高コレステロール血症ラット作製とRWPCの投与

ラットの通常飼料に4%コレステロールを加えた特殊飼料を調製した (日本配合飼料株式会社、愛知)。この特殊飼料で1ヵ月間飼育することにより食餌性高コレステロール血症を発症させた。RWPCは、上記の特殊飼料に0.62%の赤ワイン凍結乾燥品を混合した飼料を調製して (日本配合飼料株式会社、愛知)、経口投与した。飼育期間中、ラットは水と飼料を自由に摂

取できるようにした。なお、実験の前日から絶食とした。

与える飼料の相違により、ラットを以下のような三群に分けた。(1) 対照群：通常の飼料 (CE-2, クレア, 東京)、(2) コレステロール群：通常の飼料に4%コレステロールを混合した飼料、(3) RWPC+コレステロール群：通常の飼料に4%コレステロールと0.62%赤ワイン凍結乾燥品を混合した飼料。各群のラットは各々の飼料で1ヵ月間飼育した後、実験に用いた。

2. 採血および血漿採取

ラットの腹腔内にヘパリンナトリウム (1000 units/kg) を投与後、エーテルで麻酔し、下大静脈より採血した。採血用注射器にはあらかじめ3.8%クエン酸ナトリウムを入れておき、血液の凝固を抑制した。なお、ヒトと比べてF344ラットでは全血血小板凝集計でのADP凝集が非常に弱いことから、適度なADP凝集を安定して得ることができるようクエン酸ナトリウムと血液の割合を0.5:9.5とした。採血後の血液を遠心 (1300 × g, 4°C, 15分) し、血漿を分離した。

3. 全血血小板凝集能測定

血小板凝集能は、Screen Filtration Pressure (SFP: 細口吸引圧検知方式) 法¹⁵⁾による全血血小板凝集能測定装置 (WBA-4S, エム・シー・メディカル株式会社、東京) を用いて測定した。採血後、1時間室温で静置した血液にadenosine diphosphate (ADP) を添加し、血小板凝集を惹起した。血液をマイクロメッシュフィルタ (メッシュ径30 μm × 30 μm、開口数300個/1 mm²) を通して吸引し、全血血小板凝集により生ずる吸引圧の変化をもとに血小板凝集能を測定した。

4. 血漿脂質測定

血漿脂質 (総コレステロール、トリグリセライド、HDL-コレステロール) は、ドライケミストリー法を採用したSpotchemEZ-4430¹⁶⁾ (Arkray, Kyoto) を用いて測定した。総コレステロールにはスポットケム™II 総コレステロー

ル、トリグリセライドにはスポットケム™II トリグリセライド、HDL-コレステロールにはスポットケム™II HDL-コレステロール (直接法) の各測定試薬キットを用いた。

5. 組織学的検討

各ラットの肝臓を10%ホルマリンで固定しパラフィン包埋した。その後、4 μmに薄切片しHematoxylin-Eosin染色を行った。さらに、O.C.T Compound に包埋した肝臓から、5 μmの凍結切片を作製しOil Red O染色を行った。各組織の光顕像を冷却CCDオリンパス顕微鏡デジタルカメラシステムで記録した。

6. 使用薬物

アデノシン二リン酸 (ADP) はSigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) から、ヘパリンナトリウム、クエン酸ナトリウムは和光純薬 (大阪) から購入した。RWPCは、赤ワイン (CASTILLO DE ARMOUR, スペイン) を凍結乾燥しアルコールを除去し、得られた製品を蒸留水で1 g/mlに溶解したものを原液とした。

7. 統計処理

得られたデータについては、一元配置分散分析法 (ANOVA) と多重比較検定を用いて検定を行った。それぞれの値はすべて平均値±標準誤差で表現した。P<0.05の場合に有意差があるものとした。

結 果

1. 血小板凝集反応

対照群、コレステロール群、RWPC+コレステロール群すべてにおいて、血小板凝集反応はADPの濃度に依存して亢進した (図1)。コレステロール1ヵ月投与群では、対照群に比べ血小板凝集反応は有意に亢進した。一方、RWPC+コレステロール群では、血小板凝集反応は抑制され、対照群と差は認められなかった。

2. 血漿脂質

コレステロール1ヵ月投与群とRWPC+コレステロール1ヵ月投与群の血漿総コレステロー

ル、HDL- コレステロールは、対照群に比べ有意に増加した。しかし、コレステロール群とRWPC+コレステロール群の間に差はなかった(図2)。

血漿トリグリセライドも、コレステロール群とRWPC+コレステロール群では、対照群に比べ有意に増加した。しかしコレステロール群と

RWPC+コレステロール群の間に差はなかった。

3. 組織学的検討

各群のラット肝臓のOil Red O染色を行った結果、対照群では脂肪の沈着は認められなかった。一方、コレステロール群では、対照群に比べ脂肪の沈着が広範に認められた。同様に、

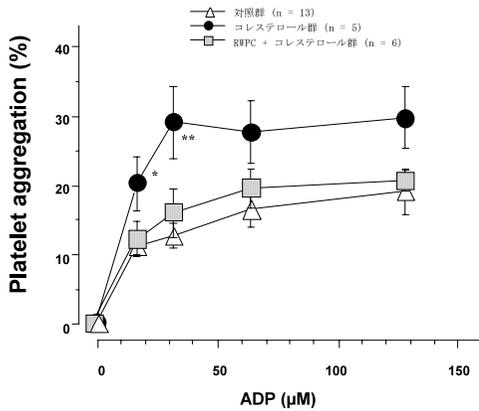


図1. ラット血小板凝集反応に対するコレステロールとRWPCの長期投与効果
各値は、平均値±標準誤差。nは実験例数。
*P<0.05、**P<0.01 (vs. 対照群)

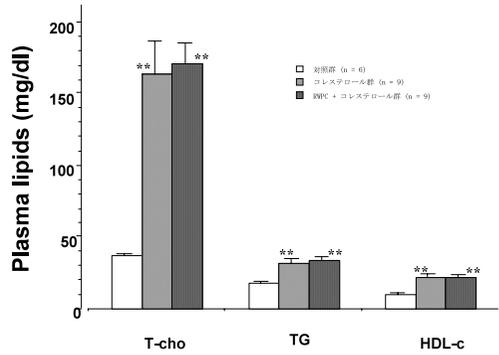


図2. 血漿脂質に対するコレステロールとRWPCの効果
T-cho:総コレステロール、TG:トリグリセライド、HDL-c:HDL-コレステロール。各値は平均値±標準誤差。nは実験例数。
**P<0.01 (vs. 対照群)

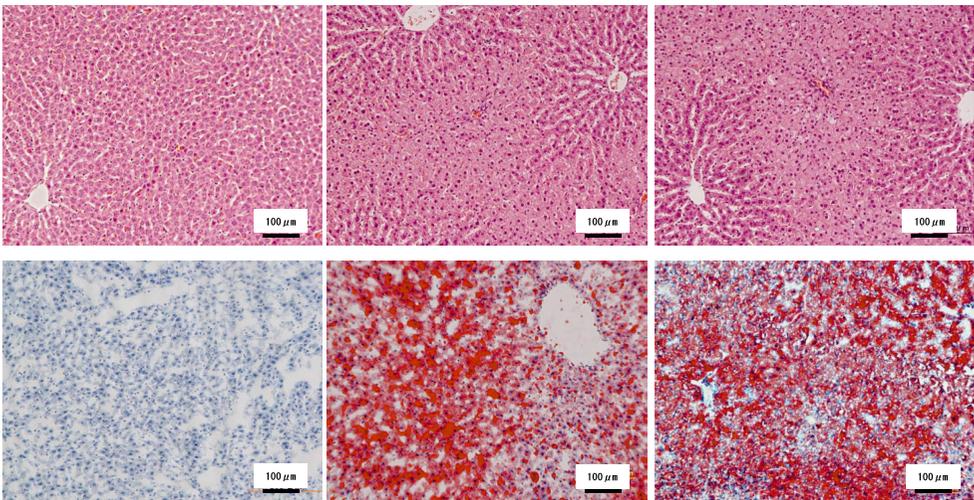


図3. コレステロール、RWPCによるラット肝臓の組織変化
上段: Hematoxylin-Eosin 染色 (青紫色は細胞核、桃色は細胞質、結合組織)
下段: Oil Red O 染色 (青色は細胞核、赤色は脂肪) (×10)
左から対照群、コレステロール群、RWPC+コレステロール群

RWPC+コレステロール群でも、対照群に比べ脂肪の沈着が広範に認められ、その程度はコレステロール群と同等であった(図3)。

考 察

血小板凝集能へのRWPC長期投与効果

F344ラットにおけるADPによる血小板凝集反応は、長期の高コレステロール食摂取により有意に亢進し、RWPCの付加により抑制された。本研究の結果は、食餌性高コレステロール血症ウサギにおけるADPによる洗浄血小板凝集反応が12週間のRWPCの付加投与により有意に抑制されたとの報告¹²⁾と一致している。

現在、血小板凝集能測定は、主に血液から血小板のみを分離した多血小板血漿(Platelet-rich plasma; PRP)による透過光法¹⁷⁾が広く用いられている。しかし、この方法には、PRP作製操作が煩雑で測定までに時間を要すること、血球成分が除かれるため生体内と異なる条件での測定となることなどの問題がある。本研究は、SFP法¹⁵⁾を用いた全血での検討であり、血小板以外の血球や血漿成分が存在する条件での血小板凝集能測定ができ、より生体内に近い条件での測定が可能である。

高コレステロール血症では、血小板凝集を惹起するトロンボキサンの生合成や、刺激物質への血小板の反応性が増大するため血小板凝集能が亢進する¹⁸⁾。Wollnyらは、RWPCが内皮でのPGL₂やNOの産生を増加させることで血小板凝集を抑制すると報告している¹³⁾。NOは血小板自体でも産生される¹⁹⁾。以上のことから、ポリフェノール化合物は高コレステロール血症による血小板凝集能亢進に対して、NO産生の増加により血小板凝集抑制作用を発揮している可能性が考えられる²⁰⁾。

血漿脂質へのRWPC長期投与効果

1ヵ月間の高コレステロール飼料投与は血漿脂質の増加をもたらしたが、本研究の実験条件下では、RWPCの長期投与によっても血漿脂質

は変化しないことが示された。同様に、2%高コレステロール飼料5ヵ月間投与による高コレステロール血症ラットにおいても、RWPCの長期摂取は血漿脂質に影響しない²¹⁾。一方、1.65%高コレステロール飼料の4週間投与では、RWPCが脂質の減少と胆汁酸の合成、排出増加をおこしたとの報告もある²²⁾。本研究結果との相違は、投与したコレステロール量の違い、投与期間、ラットの系統などの実験条件の違いによるものと考えられる。

肝臓組織における脂肪沈着とRWPCの長期投与の効果

高コレステロール飼料の1ヵ月間投与によって、肝臓には多量の脂肪沈着がおこった。コレステロールと同時にRWPCを与えた場合にも肝臓の脂肪沈着が認められた。Okazakiら²³⁾も、12週間1.5%の高コレステロール飼料を投与したマウス肝臓で広範な脂肪沈着を観察している。本研究ではRWPCの長期投与でも同様に脂肪沈着が認められたことから、この実験条件下では、RWPCはコレステロールの長期摂取による肝臓の脂肪沈着に影響を及ぼさないことが示唆された。

赤ワインを凍結乾燥して抽出されるポリフェノール化合物には、主としてガリク酸、カテキン、エピカテキン、ケルセチン、タンニン酸などがあることが報告されている²⁴⁾。本研究で用いた赤ワイン凍結乾燥品にもこのようなポリフェノール化合物が含まれていると考えられる。利ら^{5), 25)}は、RWPC中に含まれるどのポリフェノール化合物が循環改善に関与しているかを明らかにするために、カテキン、ケルセチン、タンニン酸の血管弛緩作用について検討した。しかし、いずれにおいても単体(モノマー)で用いた場合にはRWPCが示すような血管弛緩効果は認められなかった。佐藤²⁶⁾は、赤ワインの抗動脈硬化作用には、重合体(ポリマー)となったポリフェノール化合物が最も効果的であることを明らかとした。さらに、重合体は赤ワインの長期間の発酵・熟成により生成されるため、

長期熟成した赤ワインほどより効果的であると報告している。このことから、本研究で見られた血小板機能に対する赤ワインの効果も、その熟成過程に生成された重合体によるものであった可能性が考えられる。それゆえ、赤ワイン凍結乾燥品中の成分分析を行い、血小板凝集抑制作用を発揮する重合体成分を同定することが今後の課題である。

本研究より、食餌性高コレステロール血症ラットにおいて異常に亢進した血小板凝集能は、RWPCの長期投与によって抑制されること、その抑制効果は血漿脂質の変化とは関連していないことが示唆された。

謝 辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金（基盤C, 19590239）によって行われたものである。

文 献

1. 国民衛生の動向 2007 ; 54 : 36-92
2. Renaud S, Lorgeil M: Wine alcohol platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339: 1523-1526
3. Leger AS, Cochrane AL, Moore F: Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* 1979; 313: 1017-1020
4. Katano Y, Takino T, Takahashi K, Ishihata A, Aita T, Murata E, et al.: Aging and the effects of red wine polyphenols on coronary circulation in rats. *J Pharmacol Sci* 2004; 94 (Suppl. 1): 219
5. 利美賀子, 石幡明, 會田智美, 下田智子, 片野由美: 老化血管に対するポリフェノール含有赤ワイン凍結乾燥物の内皮依存性弛緩作用とその機序: 若齢血管との比較. *山形医学* 2005 ; 23 : 33-41
6. Katano Y, Aita T, Shimoda T, Kaga M, Murata E, Yamada A, et al.: Effect of freeze-dried red wine on the coronary circulation of rats with cholesterol-rich diet. *J Pharmacol Sci* 2006; 100 (Suppl. 1): 228
7. 山田晃子, 小林優子, 村田恵理, 石幡明, 片野由美: 食餌性高コレステロール血症ラットの血管機能に対するポリフェノール化合物含有赤ワイン凍結乾燥品 (RWPC) の長期投与の影響—第2報. 第10回北日本看護学会学術集会抄録集 2006 ; 116
8. Hourani SM, Cusack NJ: Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 243-298
9. Willerson JT, Golino P, Edit J, Campbell WB, Buja LM: Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions. *Circulation* 1989; 80: 198-205
10. Lacoste L, Lam JY, Hung J, Letchacovski G, Solymoss CB, Waters D: Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation* 1995; 92: 3172-3177
11. Lange DW, van Gold PH, Scholman WLG, Kraaijenhagen RJ, Akkerman JWN, van de Wiel A: Red wine and red wine polyphenolic compounds but not alcohol inhibit ADP-induced platelet aggregation. *Eur J Int Med* 2003; 14: 361-366
12. Wang Z, Huang Y, Zou J, Cao K, Xu Y, Wu JM: Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Mol Med* 2002; 9: 77-79
13. Wollny T, Chabielska E, Malinowska-Zaprzalka M, Nazarko J, Rozmyslowicz-Szerminska W, Buczek W: Effects of Bulgarian red and white wines on primary hemostasis and experimental thrombosis in rats. *Pol J Pharmacol* 2003; 55: 1089-1096
14. 山形大学医学部動物実験指針 2001 ; 1-2
15. Ozeki Y, Sudo T, Toga K, Nagamura Y, Ito H, Ogawa T, et al.: Characterization of whole blood aggregation with a new type of aggregometer by a screen filtration pressure

- method. *Thromb Res* 2001; 101: 65-72
16. 兵藤寛, 古田仁志: POTCとシステム. *臨床病理* 2002 ; 50 : 940-946
 17. Born GVR: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927-929
 18. Stuart MJ, Gerrard JM, White JG: Effect of cholesterol on production of thromboxane B₂ by platelets in vitro. *N Eng J Med* 1980; 302: 6-10
 19. Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD: Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100: 350-356
 20. Freedman JE, Parker C III, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, et al.: Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 2001; 103: 2792-2798
 21. Curtis A, Murzilli S, di Castelnuovo A, Rotilio D, Donati MB, Gaetano G, et al.: Alcohol-free red wine prevents arterial thrombosis in dietary-induced hypercholesterolemic rats: experimental support for the 'French paradox'. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 346-350
 22. Montilla P, Espejo I, Muñoz MC, Bujalance I, Muñoz-Castañeda JR, Túnez I: Effect of red wine on oxidative stress and hyper-cholesterolemia induced by feeding a high-cholesterol diet in rat. *J Physiol Biochem* 2004; 60: 259-264
 23. Okazaki M, Morio Y, Iwai S, Miyamoto K, Sakamoto H, Imai K, et al.: Age-related changes in blood coagulation and fibrinolysis in mice fed on a high-cholesterol diet. *Exp Anim* 1998; 47: 237-246
 24. Golde PH, Westelaken M, Bouma BN, Wiel A: Characteristics of piraltin, a polyphenol concentrate, produced by freeze-drying of red wine. *Life Sci* 2004; 74: 1159-1166
 25. Kaga M, Saitoh Y, Honma Y, Ishihata A, Katano Y: Vascular effects of polyphenolic substances in rat aorta. *J Pharmacol Sci* 2004; 94 (Suppl. 1): 220
 26. 佐藤充克: ワイン・ポリフェノールの生理的機能. *FoodStyle* 2000 ; 4 : 78-82

Effect of Chronic Intake of Red Wine Polyphenolic Compounds on Platelet Function of Dietary-Induced Hypercholesterolemic Rats

**Yuko Kobayashi, Akiko Yamada, Eri Murata, Yoshimi Shimizu,
Mikako Kaga, Tomoko Shimoda, Tomomi Aita, Tsunekata Ito*,
Akira Ishihata**, Yumi Katano**

*Course of Clinical Nursing, School of Nursing, Yamagata University Faculty of Medicine
Yamagata, Japan*

**Laboratory Animal Center, Yamagata University Faculty of Medicine, Yamagata, Japan*

***Division of Pathophysiology, Ohu University School of Pharmaceutical Sciences,
Fukushima, Japan*

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is an important risk factor of coronary heart diseases, in which platelet aggregability is enhanced. It is suggested that platelet aggregation is inhibited by red wine polyphenolic compounds (RWPC) *in vitro*. We investigated the effect of chronic administration of RWPC on platelet aggregation, plasma lipid levels and lipid deposition in liver in hypercholesterolemic rats. Male F344 rats (2 month-old) were fed standard diet (Cont), 4% cholesterol-rich-diet (Cho), or 4% cholesterol-rich-diet plus 0.62% freeze-dried red wine extracts (RWPC + Cho) for 1 month. Platelet aggregation and plasma concentrations of total cholesterol, triglyceride and HDL-cholesterol were measured. Platelet aggregation in Cho group was significantly enhanced compared with Cont, while that of RWPC + Cho was not different from Cont. Plasma concentrations of lipids were higher both in Cho and RWPC + Cho than Cont, but were not different between Cho and RWPC + Cho. Histological examination showed severe lipid deposition in liver of Cho as well as RWPC + Cho groups. These results suggest that chronic administration of RWPC inhibits platelet aggregation without affecting plasma lipid levels in dietary-induced hypercholesterolemic rats.

Key words : red wine, polyphenol, platelet aggregation, hypercholesterolemia