

マウスを用いたカキ抽出物の学習・記憶能力およびパーキンソニズムに対する作用の評価

鈴木 孝太郎¹⁾, 野々村 徹¹⁾, 山崎 則之¹⁾,
高橋 尚彰¹⁾, 松井 博之²⁾, 松田 芳和²⁾

(¹⁾ 株式会社新薬リサーチセンター*, (²⁾ 日本クリニック株式会社中央研究所**)

Evaluation of effect of Oyster extract on learning-memory skill and Parkinson's disease in mice

Kotaro SUZUKI¹⁾, Toru NONOMURA¹⁾, Noriyuki YAMAZAKI¹⁾,
Hisaaki TAKAHASHI¹⁾, Hiroyuki MATSUI²⁾, Yoshikazu MATSUDA²⁾

¹⁾ New Drug Research Center, Inc.

²⁾ Central Research Institute, Japan Clinic Co., Ltd.

Summary

Oyster is an old worldwide food containing abundant nutritional elements including many kinds of minerals such as zinc, nucleic acid, glycogen, and amino acids. It is reported that Oyster extract exhibits several physiological activities in experimental animals. Recently, we reported that Oyster extract enhanced hippocampus glutathione levels in rats. In general, glutathione is known as an antioxidant. On the other hand, Oxidative stress is a key factor of pathogenesis of dementia and Parkinson's disease. This time, we investigated effect of Oyster extract by experimental Alzheimer-type dementia model of mouse and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced experimental parkinsonism model of mouse.

As a result, on experimental Alzheimer-type dementia model, Oyster extract tended to exert moderation effect on deficit memory in mice administered for 14 days or 28 days. Furthermore, on MPTP-induced experimental parkinsonism model, Oyster extract tended to exert moderation effect on parkinsonism in mice administered for 11 days.

真牡蠣 (学名: *Crassostrea gigas*) は、グリコーゲン、ビタミンなどを多く含有し、栄養が豊富であるといわれ、食経験も長く、世界各地で食されている¹⁾。カキ抽出物については、肝障害抑制作用²⁾、抗酸化作用^{3,6)}および血清亜鉛増加作用⁷⁾など様々な機能が報告がされている。また、ラットにおいて、カキ抽出物が抗酸化物質であるグルタチオンを増強することが報告されている⁸⁾。

一方、わが国は高齢化社会を迎え、老化に伴う疾患に対する対策が課題となっている。その中でも、アルツハイマー病やパーキンソン病は、患者数が増加傾向にあり、予防や治療についての対策が急がれているが、それらの発症の一部に酸化ストレスが関与していると考えられている。

以上のことより、今回、マウスを用いた実験的アルツハイマー型認知症モデル^{9,10)}および1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 誘発パーキンソン病モデル¹¹⁻¹³⁾を用いて、カキ抽出物 (提供: 日本クリニッ

ク株式会社) の作用を検討した。実験的アルツハイマー型認知症モデルにおいては、 β アミロイドタンパク ($A\beta$) を脳室内投与することでモデルを作製した。また、MPTP 誘発パーキンソン病モデルにおいては、MPTP を腹腔内投与することによりモデルを作製した。なお、 $A\beta$ および MPTP は各モデルにおいて広く用いられている化学物質である。

実験方法

1. 学習・記憶能力に対する作用

6週齢のICRマウスに、カキ抽出エキス75, 150および300 mg/kg/dayを14日間経口投与、または基礎飼料MF (オリエンタル酵母工業株式会社) にカキ抽出物を0.1および0.3%混餌した飼料 (100および300 mg/kg/dayの投与量に相当) を28日間経口摂取させた。 $A\beta$ の投与は、

*北海道恵庭市戸磯452-1 (〒061-1405)

**京都市右京区太秦開田町10-1 (〒616-8555)

カキ抽出物の投与終了7日前に実施した。A β (β -アミロイド1-42, ABBIOTEC, LLC 製) は生理食塩液を用いて、所定の濃度に溶解して調製した。投与経路は脳室内投与とした。投与回数は1回、投与量は3 nmol/4 μ L/mouseとした。なお、A β を投与しない群(無処置群)については、媒体(生理食塩液)を同容量投与した。カキ抽出物の投与終了翌日、学習・記憶能力についてステップスルー型受動的回避学習試験により評価を行った。

2. ステップスルー型受動的回避学習試験

獲得試行は、カキ抽出物の最終投与日に実施した。マウスをステップスルー型受動的回避反応装置(室町機械株式会社製)の明室に入れてから、60秒後に暗室の扉を開き、マウスが暗室に進入するまでの時間(潜時)を測定した。測定後、暗室中のマウスに0.25 mAの電流を10秒間与え続けた。なお、潜時は最大で60秒まで計測した。

再生試行は、獲得試行実施の翌日に実施した。マウスに獲得試行と同様の操作を行い、潜時を測定した。ただし、暗室に進入したマウスに電流刺激は与えなかった。なお、潜時は最大で300秒まで計測した。

3. パーキンソン病に対する作用

8週齢のC57BL/6マウスに、カキ抽出物75, 150および300 mg/kg/dayを11日間経口投与した。MPTPの投与は、カキ抽出物の投与7日目から4日間連続で実施した。MPTP(SIGMA製)は生理食塩液を用いて、所定の濃度に溶解して調製した。投与経路は腹腔内投与とした。1日1回4日間連続で投与した。投与量は30 mg/kg/dayとした。なお、MPTPを投与しない群(無処置群)については、媒体(生理食塩液)を投与した。カキ抽出物の投与終了翌日、運動機能についてローターロッド法により評価を行った。さらに、ローターロッド法を実施した後、マウスの脳を摘出し、ブレインマトリックスを用いて脳切片を作製した。作製した脳切片より線条体相当部位を分取し、線条体中のDA(dopamine)およびHVA(homovanillic acid)含有量を測定した。

4. ローターロッド法

8週齢の雄性C57BL/6マウスを用いて、Rota-rod(有限会社シナノ製作所製)に対する馴化を3日間連続で行った。最初は直径3.0 cmの回転棒を低速(約3 rpm)に設定し、マウスを回転棒の上部に載せ、約120秒間保持した。さらに、段階的に高い速度を設定して同様に約120秒間保持させ、最終的に3日間かけて12 rpmで約120秒間保持するようにした。馴化終了翌日、直径3.0 cmの回転棒を15 rpmに設定し、マウスを回転棒の上部に載せ、落下までの時間(潜時)を測定した。なお、カキ抽出物の投与終了翌日、馴化終了翌日と同様の条件にて潜時を測定した。

5. 統計処理

得られた数値は各群で平均値および標準誤差を算出した。

対照群と各被験物質群間の比較については、Bartlett法により等分散性の検定を行い、等分散の場合は更に一元配置分散分析を行い、有意な場合はDunnett法により平均値の比較を行った。不等分散の場合はKruskal-WallisのH検定を行い、有意な場合はDunnett法により平均順位の比較を行った。

無処置群と対照群間の比較については、F検定により等分散性の検定を行ったところ、等分散であったためStudentのt検定を行った。

F検定、Bartlett法、一元配置分散分析およびKruskal-WallisのH検定については有意水準を危険率5%、Dunnett法およびt検定については有意水準を危険率5%および1%とした。

実験結果

1. 学習・記憶能力に対する作用

マウスにA β を投与したところ、無処置群と比較して、対照群において再生試行時の潜時が有意に低下したことより、A β 投与による学習・記憶能力への障害が確認された。また、対照群と比較して、カキ抽出物300 mg/kg/dayを14日間経口投与した群および0.3%飼料(300 mg/kg/dayの投与量に相当)を28日間経口摂取させた群において、再生試行の潜時の延長傾向が認められた。

2. パーキンソン病に対する作用

マウスにMPTPを投与したところ、無処置群と比較して、対照群においてRota-rodに載せてから落下までの時間(潜時)が有意に低下したことより、MPTP投与によ

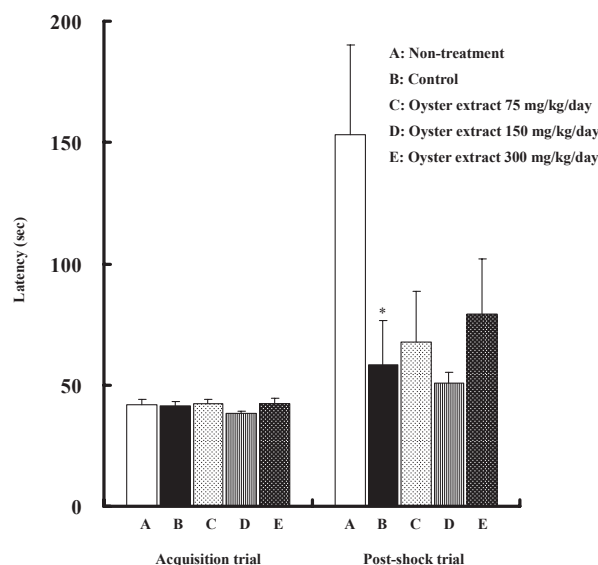


Fig. 1 Effect of Oyster extract on memory-learning skill in the step-through type passive avoidance test in A β -induced memory impairment mice. - 14 days repeated administration - Each data are expressed as mean \pm S.E. of 10 mice.

* p < 0.05 A vs B by student t-test

る運動機能への障害が確認された。また、対照群と比較して、カキ抽出物 75 mg/kg/day を 11 日間経口投与した群において、潜時の延長傾向が認められた。さらに、無処置群と比較して、対照群において、線条体ドーパミン含量の有意な低下が認められたが、カキ抽出物を 11 日間経口投与したいずれの群においても線条体ドーパミン含量および線条体 HVA 含量には大きな変動は認められなかった。

考 察

アルツハイマー型認知症は記憶障害を主な症状とする進行性の神経変性疾患であり、そのひとつの原因として、 β アミロイドタンパク ($A\beta$) があり、それが脳内の組織にたまり重合・凝集することにより脳の神経細胞が死滅することが考えられている。なお、 $A\beta$ の神経毒性は、酸化ストレスが一部関与していると考えられている。また、

パーキンソン病は脳内の黒質にあるドーパミン神経細胞の減少によりドーパミンが不足し、その結果、アセチルコリンが相対的に増加することで、動作緩慢（無動）、手足のふるえ（振戦）、筋萎縮などを発症する神経変性疾患である。ヒトにおけるパーキンソン病については様々な原因が仮説として考えられているが、その中の一説に酸化ストレス説があり、フリーラジカルが黒質の神経細胞変性を引き起こす原因と考えられている。また、パーキンソン病では、フリーラジカルから組織を守る還元型グルタチオン (GSH) などの物質が低下することも知られている。その一方で、ビタミン E などの抗酸化物質の摂取によりアルツハイマー型認知症の発生率が低下するという報告がある¹⁴⁾。さらには、カキ抽出物を投与したラットにおいて海馬グルタチオン含量が増加することが報告されている⁸⁾。従って、カキ抽出物は、認知症およびパーキンソン症の予防に有用であることが期待される。

そこで、本実験では、カキ抽出物を用いて、学習・記憶能力およびパーキンソニズムに対する作用に関する検討を行った。なお、今回の試験で用いたカキ抽出物は日本クリニック株式会社より提供されたものであり、瀬戸内、主に広島で収穫された生牡蠣を使用し、独自の製法でカキのエ

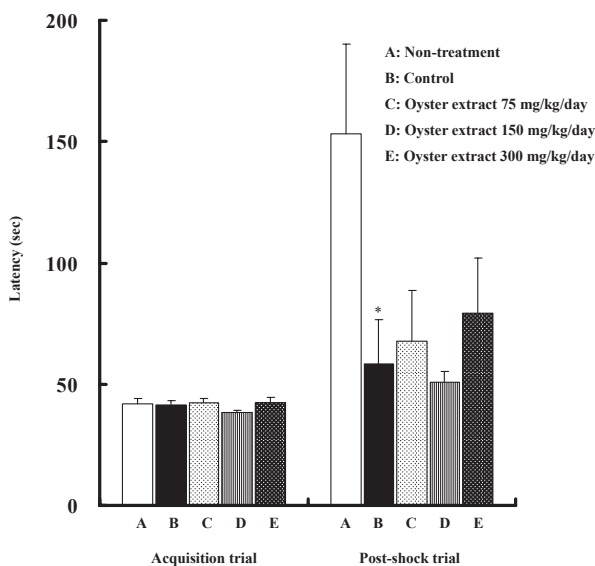


Fig. 2 Effect of Oyster extract on memory-learning skill in the step-through type passive avoidance test in $A\beta$ -induced memory impairment mice. – 28 days repeated administration – Each data are expressed as mean \pm S.E. of 10 mice. * $p < 0.05$ A vs B by student t-test

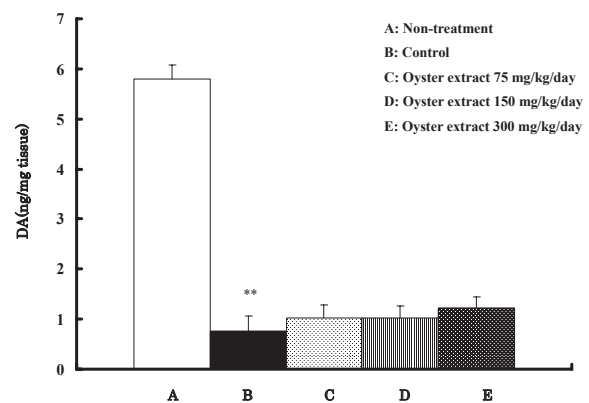


Fig. 4 Effect of Oyster extract on striatum dopamine content in MPTP-induced parkinsonism mice. Each data are expressed as mean \pm S.E. of 8 mice. ** $p < 0.01$ A vs B by student t-test

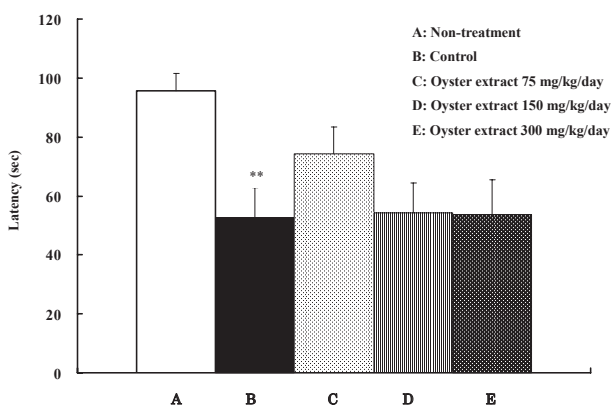


Fig. 3 Effect of Oyster extract on motor function in Rota-rod test in MPTP-induced parkinsonism mice. Each data are expressed as mean \pm S.E. of 8 mice. ** $p < 0.01$ A vs B by student t-test

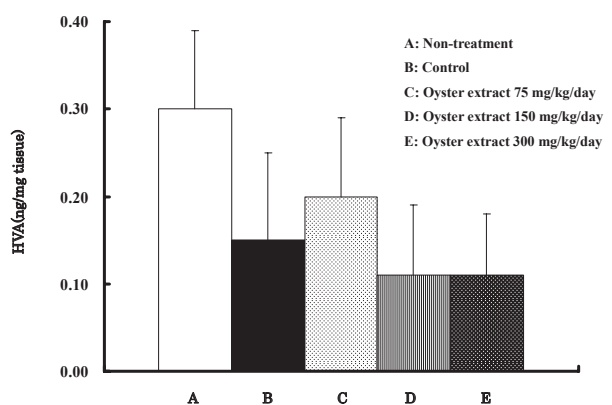


Fig. 5 Effect of Oyster extract on striatum homovanillic acid content in MPTP-induced parkinsonism mice. Each data are expressed as mean \pm S.E. of 8 mice.

キスを抽出し、製品化されたものである。

検討を行ったところ、実験的アルツハイマー型認知症モデルにおいて、カキ抽出物をマウスに14日間または28日間投与したところ、記憶障害を緩和する傾向が確認された。さらに、MPTP誘発パーキンソンモデルにおいて、カキ抽出物をマウスに11日間投与したところ、パーキンソン症状を緩和する傾向が確認された。これら症状の緩和については、カキ抽出物の投与による酸化ストレスの軽減が一部関与しているものと推察された。

以上の結果より、カキ抽出物が認知症およびパーキンソン病の予防に有用である可能性が示唆された。今後は、作用機序を含めたより詳細な検討が必要であると考えられる。

参考文献

- 1) 杉田浩一, 平宏和, 田島眞, 安井明美, 日本食品大事典, 医歯薬出版株式会社, 東京: pp.415-416 (2008).
- 2) 久保道徳, 松田秀秋, 田村崇子, 高津正雄 (1980) バラノスター [カキ *Crassostrea gigas* (THUNBERG) の肉エキス] の実験的肝障害に対する予防および肝機能改善作用. 基礎と臨床 14: 1437-1442.
- 3) T Yoshikawa, Y Naito, K Masui, T Fujii, Y Boku, S Nakagawa, N Yoshida, M Kondo (1997) Free radical-scavenging activity of *Crassostrea gigas* extract (JCOE). Biomed Pharmacother 51: 328-332.
- 4) Gaté L, Schultz M, Walsh E, Dhalluin S, Nguyen Ba G, Tapiero H, Tew KD (1998) Impact of dietary supplement of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) on glutathione levels and glutathione S-transferase activity in rat tissues. In vivo 12: 299-303.
- 5) Tapiero H, Gaté L, Dhalluin S, Nguyen Ba G, Soupramanien V, Kouyate J, Tew KD (1998) The antioxidant effects of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) in human volunteers. In vivo 12: 305-309.
- 6) Tapiero H, Tew KD (1996) Increased glutathione expression in cells induced by *Crassostrea gigas* extract (JCOE). Biomed Pharmacother 50: 149-153.
- 7) 安部麻美子, 松田芳和, 小邨奈未, 吉田宗弘 (2010) カキ肉エキスを投与したラットの血清亜鉛濃度の変化. 微量栄養素研究 27: 56-59.
- 8) 西堀頼史, 鈴木陽子, 岸浪昌礼, 藤澤紘, 永岡茂樹, 山崎則之, 松井博之, 松田芳和 (2011) カキ抽出エキスパウダーの安全性および機能性に関する報告. 微量栄養素研究 28: 40-44.
- 9) Maurice T, Lockhart BP, Privat A (1996) Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. Brain res 706: 181-93.
- 10) Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, Huh SO, Suh HW, Kim YH, Song DK (2011) Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. Br J Pharmacol 133: 89-96.
- 11) H Yabe, Choudhury ME, M Kubo, N Nishikawa, M Nagai, M Nomoto (2009) Zonisamide increases dopamine turnover in the striatum of mice and common marmosets treated with MPTP. J Pharmacol Sci 110: 64-68.
- 12) Geng X, Song L, Pu X, Tu P. (2004) Neuroprotective effects of phenylethanoid glycosides from *Cistanche salsa* against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic toxicity in C57 mice. Biol Pharm Bull 27: 797-801.
- 13) Levites Y, Weinreb O, Maor G, Youdim MB, Mandel S. (2001) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. J Neurochem 78: 1073-1082.
- 14) 今泉和則, 原英彰, 伊藤芳久, 田熊一敏, 布村明彦 (2007) 神経細胞死と神経変性疾患の最先端研究. 日本薬理学雑誌 130, 144-482.