

担癌マウスを用いたカキ抽出物の抗腫瘍作用の評価

五十嵐 雅 陽¹⁾, 山 崎 則 之¹⁾, 菊 田 麻朱美¹⁾, 鈴 木 孝太郎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**)

(受付 2017年8月28日, 受理 2017年9月28日)

Evaluation of Oyster extracts on anti-tumor activities for murine tumor model

Masaharu IGARASHI¹⁾, Noriyuki YAMAZAKI¹⁾, Masumi KIKUTA¹⁾, Kotaro SUZUKI¹⁾,
Hiroyuki MATSUDA²⁾ and Yoshikazu MATSUDA²⁾

¹⁾New Drug Research Center, Inc.

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

Summary

Oyster (*Crassostrea gigas*) contains abundant nutritional elements, including glycogen, vitamins, zinc and taurine. It is reported that Oyster extract exhibited several physiological activities.

In this study, we reported evaluation of Oyster extracts on anti-tumor activities for murine tumor model, colon 26, based on the inhibition of tumor growth.

Tumor cells were inoculated with subcutaneous injection of BALB/c mice. Oyster extract powder or paste administered for 14 days after inoculation. After termination of administration of test substance, tumor weight and plasma tumor marker were measured.

Oyster extracts inhibited with tumor growth but not significantly different from control group. In the tumor growth inhibition rate calculated based on the average tumor weight ratio (T/C%), the oyster extract paste 500 and 2000 mg/kg/days group and powder 200, 500 and 1000 mg/kg/days group was showed 30% or more, and had the antitumor effect was suggested.

真牡蠣 (学名: *Crassostrea gigas*) は、グリコーゲン、脂溶性・水溶性ビタミン、亜鉛およびタウリンなどを多く含有しており、食経験も長く、世界各地で食されている¹⁾。カキ抽出物に関しては、肝障害抑制作用²⁻⁴⁾、抗酸化作用³⁻⁸⁾、血清亜鉛濃度増加作用⁹⁾、学習・記憶障害およびパーキンソンニズムに対する作用¹⁰⁾、抗不安作用¹¹⁾、グルタチオン増加作用^{4, 12-13)}などが報告されている。更に、抗腫瘍作用に関しては、培養細胞およびマウス腹水中への腫瘍細胞の移植モデルを用いた評価により、抗腫瘍作用を有することが報告されている¹⁴⁻¹⁵⁾。

今回、真牡蠣を原料としたカキ抽出物の抗腫瘍作用について、固形腫瘍の移植モデルである、マウス結腸癌由来腫瘍細胞である Colon-26 を移植したマウスを用いて、腫瘍の増殖抑制作用を指標に検討を行った。

全ての動物実験は、株式会社新薬リサーチセンターの動物倫理委員会の審議・承認を得た後に実施した。

実験方法

1. 被験物質、試薬および媒体

カキ抽出物ペーストおよびパウダーを用いた。カキ抽出物ペーストは黒色のペースト、カキ抽出物パウダーは、薄茶色～茶色の粉末である。試薬として、生理食塩液 (大塚生食注, (株)大塚製薬工場) および媒体として、注射用水 (大塚蒸留水, (株)大塚製薬工場) を使用した。

2. 腫瘍株

本試験で使用した Colon-26 腫瘍株は、マウス結腸癌由来細胞株、BALB/c 系統を独立行政法人 理化学研究所 バイオリソースセンターより購入し、 -80°C 以下で凍結保存したものを BALB/c マウスを用いて継代維持したものである。なお、本腫瘍株は、固形癌として制癌剤スクリーニングに用いられており、臨床予測性に優れた株として知

*所在地: 北海道恵庭市戸磯452-1 (〒061-1405)

**所在地: 京都府京都市北区大將軍西町1 (〒603-8331)

られている。近年では、食品の抗腫瘍効果の検討にも繁用されている株であるため選択した。

3. 使用動物

4週齢のBALB/c Cr Slc (SPF) マウスを日本エスエルシー(株)より入荷した。動物は入荷から群分け日まで馴化した。ただし、入荷7日までの期間は検疫を行った。

4. 飼育条件

動物は温度 22 ± 3 °C, 湿度 50 ± 20 %, 換気回数 13 ~ 17 回/時間, 照明時間 8:00 ~ 20:00 (明 12 時間, 暗 12 時間) の環境下で, ステンレス製可動ラック (1790W × 470D × 1650H mm) にポリカーボネート製ケージ (外径: 182W × 260D × 128H mm) を置き, 動物を個別に収容した。

飼料は固型飼料ラボ MR ストック (日本農産工業(株)) を, 飲料水は水道水を試験期間を通じ自由に与えた。

5. 腫瘍の移植

継代維持動物より, 細胞移植後 14 日目の Colon-26 腫瘍細胞を摘出し, 生理食塩液を用いて懸濁した。この細胞懸濁液を試験用マウスの腹側部皮下に 1×10^5 cells/0.05 mL/mouse の割合で移植した (0 日目)。

6. 群分け

腫瘍移植動物の体重を測定し, 層別連続無作為化法により各群に割り付けた。

群構成表を Table 1 に示す。

7. カキ抽出物の投与

カキ抽出物ペーストおよびパウダーは, いずれも注射用水に溶解させて投与液とした。投与回数は 1 日 1 回とし, 投与期間は 14 日間とした。

8. 検査項目

1) 一般状態観察

生死についての観察を毎日行った。

2) 体重測定

体重は, 投与期間中 2 回/週の頻度で, 更に, 腫瘍摘出日に測定を行った。

3) 採血および腫瘍摘出

最終投与日の翌日に採血および腫瘍の摘出を行った。

マウスをエーテル麻酔下で正向反射の消失を確認後, あらかじめへパリナイズを行った注射針および注射筒を用いて腹部大静脈より血液を採取した。採血後放血致死させ, 腫瘍を摘出して湿重量を測定した。

4) 血中腫瘍マーカー

採血後の血液については血漿を分取し, *a* 1-acid glycoprotein (ELISA 法, Cusabio) および fibrinogen (ELISA 法, Assaypro LLC) を測定した。

9. 統計処理

統計処理は統計ソフト SPSS 14.0J (SPSS Inc.) を用いて, 対照群とカキ抽出物ペースト群間あるいは, 対照群とカキ抽出物パウダー群間で, 以下の方法で行った。すなわち, 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。

有意水準は Bartlett 法, 一元配置分散分析, Kruskal-Wallis の H 検定では危険率 5 % とした。Dunnett 法では危険率 5 % および 1 % とした。

また, 対照群に対するカキ抽出物各投与群の平均腫瘍重量比 (T/C%) および腫瘍増殖抑制率を次の数式により算出した。

平均腫瘍重量比 (T/C%)

$$= B \sim G \text{ 各投与群の平均腫瘍重量(T) / A 群の平均腫瘍重量(C)} \times 100$$

腫瘍増殖抑制率 (%) = $100 - T/C$ (%)

(腫瘍増殖抑制率が 30% 以上の時, 腫瘍増殖抑制効果ありと判定¹⁴⁾)

Table 1 Test group of experiments.

Group	Dose (mg/kg/day)	Administrated period (day)	No. of animals
A Control (distilled water)	0	14	8
B Paste low dose	200	14	8
C Paste middle dose	500	14	8
D Paste high dose	2000	14	8
E Powder low dose	200	14	8
F Powder middle dose	500	14	8
G Powder high dose	1000	14	8

結 果

1. 一般状態観察および体重推移

すべての群において、投与期間中に死亡動物は認められなかった。

体重推移を Fig.1 に示した。各群で体重は徐々に増加し、いずれの群でも同様な推移を示した。

2. 腫瘍重量

腫瘍湿重量を Fig.2 に、腫瘍増殖抑制率 (%) を Fig.3 に示した。

対照群の腫瘍湿重量は、 0.978 ± 0.238 g であった。

カキ抽出物ペースト 200, 500 および 2000 mg/kg/day 群の腫瘍湿重量では、それぞれ 0.699 ± 0.137 , 0.660 ± 0.134 および 0.656 ± 0.194 g であった。

カキ抽出物パウダー 200, 500 および 1000 mg/kg/day 投与群の腫瘍湿重量では、それぞれ 0.496 ± 0.115 , $0.543 \pm$

0.159 および 0.492 ± 0.046 g であった。

カキ抽出物ペースト及びパウダーのいずれの投与量群にも対照群と比較して有意な差は認められなかったものの減少傾向がみられた。

平均腫瘍重量比 (T/C%) では、ペースト 200, 500 および 2000 mg/kg/day 群でそれぞれ 71.5, 67.5 および 67.1%, パウダー 200, 500 および 1000 mg/kg/day 群ではそれぞれ 50.7, 55.5 および 50.3% を示した。腫瘍増殖抑制率では、ペースト 200, 500 および 2000 mg/kg/day 群でそれぞれ 28.5, 32.5 および 32.9%, パウダー 200, 500 および 1000 mg/kg/day 群ではそれぞれ 49.3, 44.5 および 49.7% を示し、ペーストは 500 および 2000 mg/kg/day, パウダーは 200, 500 および 1000 mg/kg/day で腫瘍増殖抑制率が 30% 以上を示した。

3. 血中腫瘍マーカー

血中の α 1-acid glycoprotein を Fig.4 に、fibrinogen を

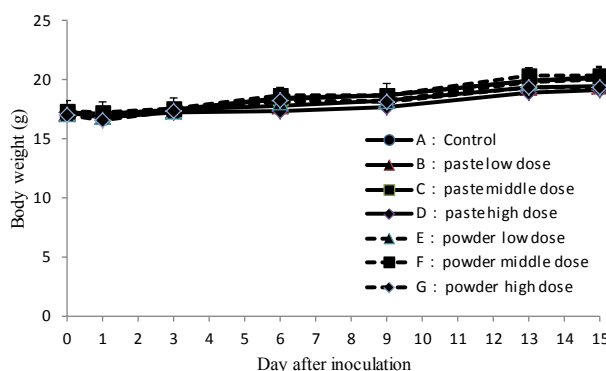


Fig. 1 Body weight changes of tumor bearing mouse administrated with oyster extract. Each value represents with mean \pm SE of 8 mice. Not significantly different from the control group by Dunnett's multiple comparison test.

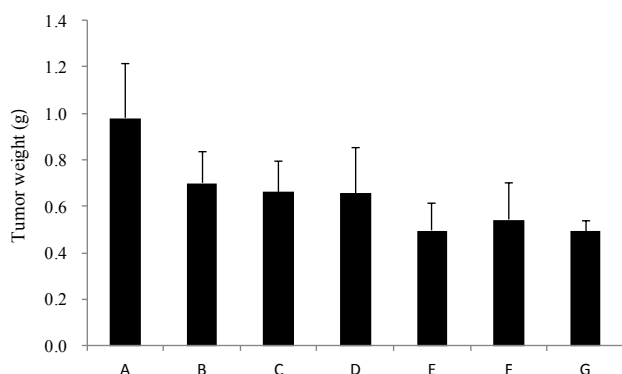


Fig. 2 Tumor weight of tumor bearing mouse administrated with oyster extract. Each value represents with mean \pm SE of 8 mice. Not significantly different from the control group by Dunnett's multiple comparison test. A : control, B : paste low dose, C : paste middle dose, D : paste high dose, E : powder low dose, F : powder middle dose, G : powder high dose

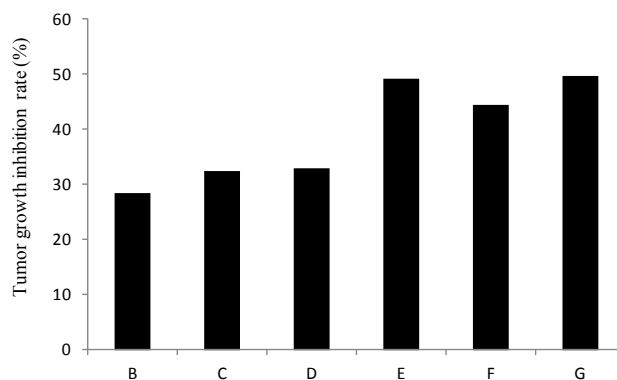


Fig. 3 Tumor growth inhibition rate of tumor bearing mouse administrated with oyster extract. Each value calculated as follow $100 - (\text{Mean tumor weight of each group} / \text{Mean tumor weight of control group}) \times 100$. B : paste low dose, C : paste middle dose, D : paste high dose, E : powder low dose, F : powder middle dose, G : powder high dose

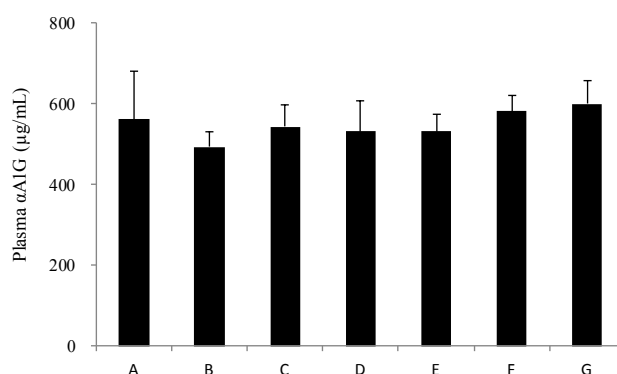


Fig. 4 Plasma α 1G concentration of tumor bearing mouse administrated with oyster extract. Each value represents with mean \pm SE of 8 mice. Not significantly different from the control group by Dunnett's multiple comparison test. A : control, B : paste low dose, C : paste middle dose, D : paste high dose, E : powder low dose, F : powder middle dose, G : powder high dose

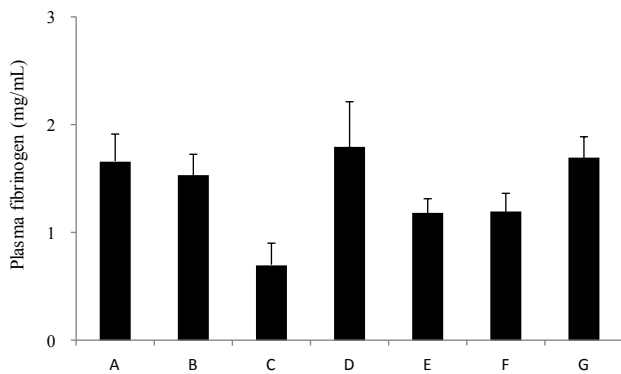


Fig. 5 Plasma fibrinogen concentration of tumor bearing mouse administrated with oyster extract. Each value represents with mean \pm SE of 8 mice. Not significantly different from the control group by Dunnett's multiple comparison test. A : control, B : paste low dose, C : paste middle dose, D : paste high dose, E : powder low dose, F : powder middle dose, G : powder high dose

Fig. 5 に示した。

血漿中 α 1-acid glycoprotein については、対照群では $561.2 \pm 119.0 \mu\text{g/mL}$ であった。ペースト 200, 500 および 2000 mg/kg/day 群では、それぞれ 492.9 ± 37.4 , 542.5 ± 53.6 および $530.5 \pm 77.2 \mu\text{g/mL}$, パウダー 200, 500 および 1000 mg/kg/day 群では、それぞれ 531.6 ± 43.8 , 580.9 ± 40.7 および $600.4 \pm 57.4 \mu\text{g/mL}$ を示し、いずれの投与量群にも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

血漿中の fibrinogen については、対照群では $1.66 \pm 0.26 \text{ mg/mL}$ であった。ペースト 200, 500 および 2000 mg/kg/day 群では、それぞれ 1.53 ± 0.20 , 0.70 ± 0.20 および $1.79 \pm 0.43 \text{ mg/mL}$, パウダー 200, 500 および 1000 mg/kg/day 群では、それぞれ 1.18 ± 0.13 , 1.19 ± 0.18 および $1.69 \pm 0.20 \text{ mg/mL}$ を示し、いずれの投与量群にも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

考 察

真牡蠣 (学名: *Crassostrea gigas*) は、グリコーゲン、脂溶性・水溶性ビタミン、亜鉛およびタウリンなどを多く含有している¹⁾。その真牡蠣を原材料としたカキ抽出物は、これまでに、様々な機能性を有することが報告されている。

食品素材の抗腫瘍効果の検討については、担癌マウスの腫瘍増殖抑制作用を指標に評価する方法が繁用されている。本モデルは、米国国立癌研究所 (NCI) で開発され、主に、制癌剤のスクリーニング系に用いられてきた手法である¹⁶⁾。腫瘍株としては、腹水腫瘍としては、マウス白血病 L-1210, P388, 固形腫瘍としては、B16 メラノーマ, マウス結腸癌由来細胞 Colon-26 などが用いられている。これらの腫瘍株を用いた評価で有効とされた物質は、制癌剤として開発されており、いずれの腫瘍株も臨床予測性に優れているとされている。

今回、真牡蠣を原料としたカキ抽出物の抗腫瘍作用につ

いて、固形腫瘍の移植モデルである、マウス結腸癌由来腫瘍細胞である Colon-26 を移植したマウスにカキ抽出物を摂取させ、腫瘍の増殖抑制作用を指標に検討を行った。

BALB/c マウスの腹側部皮下に Colon-26 腫瘍細胞を移植し、翌日からカキ抽出物ペーストおよびパウダーをそれぞれ 1 日 1 回、14 日間連続で強制経口投与を行い、最終投与の翌日に腫瘍を摘出し湿重量を測定した。併せて腹大静脈より採血を実施し、分離した血漿の腫瘍マーカーを測定した。対照群として、注射用水を投与した群を設定した。

投与期間中に死亡動物は認められなかった。

体重は徐々に増加し、いずれの群でも同様な推移を示した。腫瘍の増殖を考慮しても対照群と比較して、カキ抽出物各投与群に差はみられなかった。腫瘍湿重量では、対照群と比較してカキ抽出物各投与群に有意な差はみられなかったものの減少傾向がみられた。平均腫瘍重量比 (T/C%) をもとに算出した腫瘍増殖抑制率では、ペーストは 500 および 2000 mg/kg/day 群で、パウダーは全群で 30% 以上を示した。米国国立癌研究所 (NCI) では、 $100 - T/C$ (%) が 30% 以上を示した場合、その化合物の抗腫瘍活性は有効と評価している¹⁶⁾ ことから、カキ抽出物ペーストおよびパウダーには抗腫瘍効果を有する可能性が示唆された。血漿の腫瘍マーカーについては、明確な差は認められなかった。

松田らは、培養細胞および P388 の腹水腫瘍モデルを用いた評価において、カキ熱水抽出物が抗腫瘍活性を有することを報告している¹⁴⁾。また、タウリン¹⁷⁾ やグリコーゲン¹⁸⁾ が抗腫瘍活性を示すことが報告されている。カキ抽出物はタウリンやグリコーゲンを多く含有することから、これらの物質が抗腫瘍活性に関与した可能性も考えられる。

以上より、カキ抽出物が、固形腫瘍の移植モデルに対しても腫瘍の増殖抑制効果を示すことが認められ、抗腫瘍効果を有することが示唆された。

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), バランスター [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) 藤澤紘, 竹原功, 西堀頼史, 矢野夕幾, 山崎則之, 松井博之, 松田芳和, 福原育夫 (2012), カキ肉エキス 12 週間摂取の軽度アルコール性肝障害をもつヒトボランティアの肝機能への影響, 微量栄養素研究, 29, 13-17.
- 4) 春松慎, 福田卓, 松井博之, 松田芳和 (2013) カキ肉エキスのアセトアミノフェンによる肝障害抑制作用の検討, 30, 41-43.
- 5) T Yoshikawa, Y Naito, K Masui, T Fujii, Y Boku,

- S Nakagawa, N Yoshida, M Kondo (1997), Free radical-scavenging activity of *Crassosfrea gigas* extract (JCOE), *Biomed Pharmacother*, 51, 328-332.
- 6) Gate L, Schultz M, Walsh E, Dhalluin S, Nguyen Ba G, Tapiero H, Tew KD (1998), Impact of dietary supplement of *Crassosfrea gigas* extract (JCOE) on glutathione levels and glutathione S-transferase activity in rat tissue., *In vivo* 12, 299-303.
- 7) Tapiero H, Gate l, Dhalluin S, Nguyen Ba G, Soupramanien V, kouyate J, Tew KD (1998), The antioxidant effects of *Crassosfrea gigas* extract (JCOE) on human volunteers., *In vivo* 12, 305-309.
- 8) Tapiero H, Tew KD (1996), Increased glutathione exin cells induced by *Crassosfrea gigas* extract (JCOE). *Biomed Pharmacother*, 50, 149-153.
- 9) 安部麻美子, 松田芳和, 小邨奈美, 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.
- 10) 鈴木孝太郎, 野々村徹, 山崎則之, 高橋尚彰, 松井博之, 松田芳和, マウスを用いたカキ肉エキス抽出物の学習・記憶能力およびパーキンソニズムに対する作用の評価, *微量栄養素研究*, 30, 48-51.
- 11) 増澤徹, 松井博之, 松田芳和, 朝戸めぐみ, 池田弘子, 亀井淳三 (2012), マウスを用いたカキ肉エキス含有食品の抗不安作用に関する評価, *微量栄養素学会誌*, 29, 7-12.
- 12) 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, *微量栄養素学会誌*, 28, 40-44.
- 13) 福田卓, 春松慎, 松井博之, 松田芳和 (2012), カキ肉エキスによるラット海馬中総グルタチオン増強効果, *微量栄養素学会誌*, 29, 106-109.
- 14) 松田芳和, 高谷英子, 山口雅子, 太田隆男, 真部真理子, 河村幸雄, 広石伸互, 柴田幸雄 (1998), カキ (*Crassostrea gigas*) 熱水抽出物の癌細胞増殖抑制作用および抗腫瘍作用の検討, *微量栄養素学会誌*, 15, 121-127.
- 15) Yoshikazu Matsuda, Munehiro Yoshida (2004), Examination of the anti-tumor action of oyster extract for P388 leukemia, *日本健康医学会雑誌*, 13 (1), 3-10.
- 16) 古江尚ほか, 癌化学療法の基礎と臨床, 癌と化学療法社, 東京: pp.16-34 (1986).
- 17) 第53回日本癌学会総会記事 (名古屋), 1994.
- 18) 松江一, 高谷芳明, 内沢秀光, ほか, 糖質シンポジウム要旨集, 1996.