

カニクイザルを用いたカキ肉エキスのストレスに対する影響（予備的検討）

安田 仁^{1)†}, 光岡 ちほみ¹⁾, 山崎 則之¹⁾, 岡林 佐知¹⁾, 櫻庭 峻¹⁾,
 山之内 智彦¹⁾, 田原 宏輔¹⁾, 石田 達也²⁾, 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 2018年8月30日, 受理 2018年10月16日)

**Pilot study for the effect of oyster extract on light-stress response
 in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)**

Hitoshi YASUDA¹⁾, Chihomi MISTUOKA¹⁾, Noriyuki YAMAZAKI¹⁾, Sachi OKABAYASHI¹⁾, Takashi SAKURABA¹⁾,
 Tomohiko YAMANOUCHI¹⁾, Kosuke TAHARA¹⁾, Tatsuya ISHIDA²⁾, Hiroyuki MATSUDA²⁾, Yoshikazu MATSUDA²⁾

¹⁾New Drug Research Center, Inc.

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

Summary

Oyster (*Crassostrea gigas*) contains abundant nutrients, including glycogen, vitamins, zinc and taurine. It is reported that Oyster extract exhibited anti-oxidative effect, anxiolytic-like effects and several physiological activities in mice.

In this pilot study using three male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), we reported evaluation of effect of oyster extract on stress in cynomolgus monkey by analysis of blood glucose, serum cortisol, serum DHEA and serum adrenalin levels.

Oyster extract administrated. After 7 days of administration of test substance, light-stress was induced and the stress marker was measured.

The number of monkeys used for the experiment was three and the statistical inference was not performed. There were no difference in blood glucose and DHEA level between control group and oyster extract. Oyster extract group had lower serum cortisol level in the endocrine system of the stress transmission, than control group. In serum adrenaline level in the autonomic nervous system of the stress transmission pathway, control group rapidly increased 2 hours after administration. However, oyster extract had only a moderate rise.

Because the outcomes of the study were tentative and exploratory, any conclusion cannot be advocated until further confirmatory study.

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、全世界の浅い海に分布し、古くから食されている¹⁾。カキ抽出エキスに関しては、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。

増澤ら¹¹⁾は、カキ肉エキスの抗不安作用について、マウスを用いたホールボード法により評価を行っており、カキ肉エキスの5日間投与で抗不安作用を示すことを確認している。そこで今回は、カキ肉エキスの抗不安作用につい

て、サルを用いて予備的に検討を行った。

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（承認番号：171219A）。

実験方法

1. カキ抽出エキスおよび投与方法

カキ抽出エキスは、薄茶色～茶色の粉末を使用した。粉末は60 mg/mLの濃度で蒸留水に溶解しカキ抽出エキスとした。カキ抽出エキスの投与量は300 mg/kg/dayを1

*所在地：神戸市中央区港島南町7-1-14（〒650-0047）

**所在地：京都市北区大將軍西町1（〒603-8331）

†連絡先（Corresponding author）, Tel: 078-306-0554, Email: h-yasuda@ndrcenter.co.jp

回/日、経口投与した。対照群は蒸留水を同量・回数投与した。

2. 使用動物

3歳の雄性カニクイザル3頭を用い、細菌検査（サルモネラ、赤痢、ツベルクリン）、ウイルス検査（B-VIRUS）結果に異常のない動物を使用した。

3. 飼育条件

温度 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\pm 15\%$ 、換気回数1時間6～20回、照明時間1日12時間（07:00～19:00）の動物飼育室で金属製個別ケージ（W450×D600×H800mm）にて飼育した。ケージは毎日洗浄し、動物飼育室床は毎日清掃後、消毒液を週3回以上の割合で散布した。

サル用固型飼料CMK-2（日本クレア(株)）約100gを1日1回、飲料水は水道水を自動給水装置により自由に摂取させた。

4. ストレス誘発方法

最終投与翌日、給餌を行い、その15分後に動物をモンキーチェアに保定し、外部から仲間の声や音、刺激等がないように1頭/室で、8時間継続して実験室に配置した。

動物は、モンキーチェアによる固定および採血に対して十分に馴化された個体を用いた。

5. 群分け

すべての動物を使用し、対照群およびカキ肉エキス群をクロスオーバーにて実施した。

群構成表をTable 1に示す。

6. 検査項目

1) 一般状態観察

毛並み、元気さなどの全身状態の観察を毎日行った。

2) 体重測定

体重は、投与期間中1回/週の頻度で測定を行った。

3) 採血

ストレス誘発前、誘発開始後2、4、6および8時間（計5時点）に無麻酔下で橈側皮静脈又は伏在静脈より血液を採取した。

4) ストレスマーカー

採血後の血液については一部全血で血糖値測定器（ニプロスタットストリップXP3）を用いて血糖値を測定

した。残りの血液は、室温で約30分以上放置した後、遠心処理して血清を分取し、血清コルチゾール（一般社団法人 予防衛生協会）、血清デヒドロエピアンドロステロン（Dehydroepiandrosterone、略称DHEA、LC-MS/MSシステム、Thermo Scientific）および血清アドレナリン（LC-MS/MSシステム、Thermo Scientific）濃度を測定しストレス誘発前を100とした変化率で評価した。

なお、今回の検討は3頭/群での評価であることから、統計処理は行わなかった。

実験結果

1. 一般状態観察

実験期間中、全ての動物の全身状態は良好であった。また、動物の体重に変化は認められなかった。

2. ストレスマーカー

血糖値をFig.1に、血清コルチゾールをFig.2に、血清DHEAをFig.3に、血清アドレナリンをFig.4に示した。

血糖値は、対照およびカキ肉エキスを投与した全てにおいて大きな差はみられなかった。

血清コルチゾールは、対照群は誘発後8時間まで増加した。カキ肉エキス群は誘発後2時間を最大として誘発後4時間からは減少した。

血清DHEAは、対照群は誘発後4時間から減少した。カキ肉エキス群は誘発後6時間から減少した。

血清アドレナリンは、対照群は誘発後2時間で最大値を示した。カキ肉エキス群は誘発後4時間で最大であったが、対照群に比べると緩やかな上昇であった。

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エキスは、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。

増澤ら¹¹⁾は、ストレスを負荷しないマウスおよびホールボード法によりストレスを負荷したマウスのいずれについても、カキ肉エキスの5日間投与により、抗不安作用を示すことを報告している。そこで、今回、サルにカキ肉エキスを7日間投与して、ストレスに対する作用の検討を

Table 1 Test group of experiments.

Group	Dose (mg/kg/day)	Administrated period (day)	No. of animals
A Control (distilled water)	0	7	3 ^{a)}
B Oyster extract	300	7	3 ^{a)}

a) : Crossover trial.

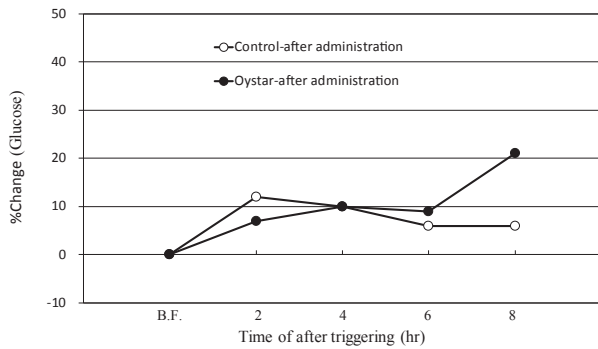


Fig. 1 Effect of Oyster extract on light stress in cynomolgus monkeys - Glucose - Each points represents mean value from 3 animals.

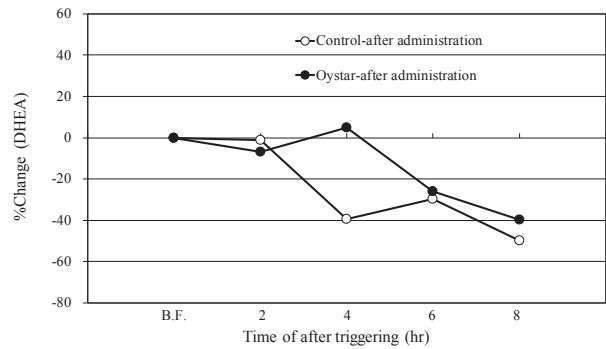


Fig. 3 Effect of Oyster on light stress in cynomolgus monkeys - DHEA - Each points represents mean value from 3 animals.

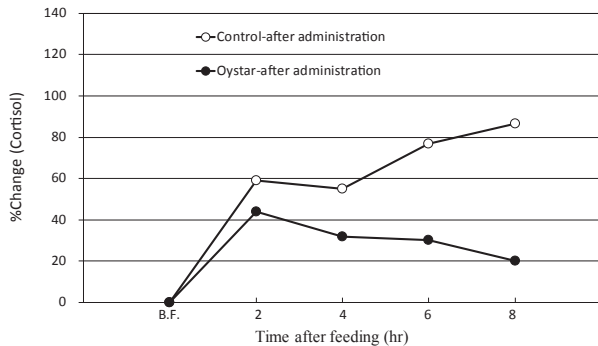


Fig. 2 Effect of Oyster extract on light stress in cynomolgus monkeys - Cortisol - Each points represents mean value from 3 animals.

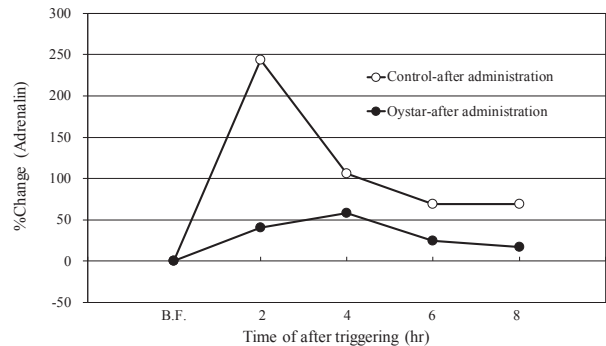


Fig. 4 Effect of Oyster extract on light stress in cynomolgus monkeys - Adrenalin - Each points represents mean value from 3 animals.

行った。投与量については、マウスのホールボード法を用いた5日間投与による評価で効果が認められた300 mg/kg/day と設定した。

カキイザルは、野生では群をなして生活をしており、当研究室においてもお互いの姿が見えるようにして、コミュニケーションが取れる状態で飼育をしている。そのような状態から、1頭/室になるように実験室に隔離して、モンキーチェアにて保定することにより、軽度な心理的なストレスおよび肉体的なストレスを誘発させた。このサルの軽ストレスモデルを用いて、カキ肉エキスを1日1回、7日間連続で経口投与を行い、経時的に採血することによりストレスマーカーを測定した。対照群として、蒸留水を投与した群を設定し、カキ肉エキス群とクロスオーバーで行った。

投与期間中に病理学的変化は認められなかった。血糖値は、対照およびカキ肉エキスを投与した全てにおいて大きな差はみられなかった。

ストレスは、大脳皮質や大脳辺縁系を經由して視床下部に情報が伝達され、視床下部-交感神経-副腎髄質系(SAM系)と視床下部-下垂体前葉-副腎皮質系(HPA系)を活性化させることが知られている¹⁴⁾。SAM系が活性化されるとアドレナリンが分泌され、HPA系が活性化されるとコルチゾールが分泌される。

今回、SAM系のバイオマーカーである血清アドレナリンについては、対照群では誘発後顕著に増加し、2時間で最大値を示した。これに対し、カキ肉エキス群では誘発後に顕著な増加は認められなかった。HPA系のバイオマーカーである血清コルチゾールに注目すると、対照群の血清コルチゾールは誘発後8時間まで経時的に増加したものの。カキ肉エキス群では、誘発4時間後より減少が認められた。また、ストレスにより分泌されるアドレナリンやコルチゾールは、分泌が継続すると組織に対して負の影響を誘発することも知られている。DHEAは、障害を受けた組織の修復に機能する物質として、その役割が期待されている¹⁵⁾。今回、対照群では、誘発後にDHEAが減少したのに対して、カキ肉エキス投与群では減少は認められなかった。

以上の結果より、サルの軽ストレスモデルでは、対照群では、ストレス誘発後に、血中アドレナリンおよびコルチゾールのいずれも増加傾向を示し、また、血清DHEA値は減少傾向を示したこれに対して、カキ肉エキスの投与群では、血清アドレナリンおよびコルチゾールの増加を抑制し、DHEAに対しては、減少は認められなかった。これらの結果は、カキ肉エキスが、サルにおいても抗ストレス作用を有する可能性がある。

増澤ら¹¹⁾は、マウスで認められた抗ストレス作用について、カキ肉エキスに含有する亜鉛の機能について着目し

ている。評価に用いたマウスのモデルが、ベンゾジアゼピンにより抑制されること、ベンゾジアゼピンの抑制作用が、グルタミン酸、GABA系に関与すること、また、亜鉛は、アルツハイマー型認知症、統合失調症、パーキンソン病などの脳の疾患に関与しており¹⁶⁾、亜鉛の抗不安作用は、グルタミン酸、GABAのシステムを調節していると報告されている¹⁷⁾ことから、亜鉛の関与を示唆している。また、橋本¹⁸⁾は、アルツハイマー病の発症と亜鉛との関連について、亜鉛が、グルタミン酸作動性神経のシナプスに関与して、グルタミン酸の異常興奮を抑制することを報告している。

海野¹⁹⁾は、マウスの社会的ストレス負荷モデルを用いて、テアニンの抗ストレス作用を評価している。社会的ストレス負荷が視床下部のグルタミン酸の分泌を促進して、HPA系を活性化し、CRH、ACTH、コルチゾールの分泌を誘発することに対して、テアニンがグルタミン酸の分泌を調節することで、抗ストレス作用を示すことを報告している。この報告から、カキ肉エキスについても、テアニンと同様に、亜鉛がグルタミン酸の分泌を調節することで、抗ストレス作用を示すことが考えられる。

SAM系のマーカーである血中アドレナリンの増加抑制作用については、カキエキスが、 α 受容体の拮抗作用による血管の収縮抑制作用を介して、高血圧、心血管疾患の発症抑制に関与するという報告²⁰⁾もあることから、アドレナリン受容体などに関する今後の解析が期待される。

今回の予備的検討の結果は、マウスを用いた実験で示されたカキ肉エキスの抗ストレス作用がサルにおいても存在する可能性を否定するものではなかった。以前の報告から、その作用には、カキ肉エキスに含まれる亜鉛が関与しているものと想定される。なお、今回の検討は、3頭/群での評価であり、統計学的な評価も行っていないことから、今後、更なる検討を行う予定である。

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), バランスター [カキ *Crassosfrea 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 I, 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) 田中喜秀, 脇田慎一 (2011), ストレスと疲労のバイオマーカー, 日本薬理学雑誌, 137, 185-188.
- 15) 西風脩, 古屋悦子 (1998), ストレスと抗コルチゾールホルモン——組織修復マーカーとしての17-ケトステロイド硫酸抱合体——産業医科大学雑誌, 20 (4), 273-295.
- 16) Stuart D. Portbury and Paul A. Adlard (2017), Zinc Signal in Brain Diseases, Int. J. Mol. Sci. 18, 2506-2518.
- 17) Partyka A, Jastrzebska-Wiesek M, Szewczyk B, Stachowicz K, Slawinska A, Peleszak E, Doboszeska L, Pilc A, Nowak G (2011), Anxiolytic-like activity of zinc in rodent test, Pharmacol. Rep., 63, 1050-1055.
- 18) 橋本道男 (2008), アルツハイマー病と食事栄養——とくに銅・亜鉛とドコサヘキサエン酸, 微量栄養素学

会誌, 25, 8-18.

- 19) 海野けい子 (2011), 社会心理的ストレスによる老化の促進とテアニンの抗ストレス作用, 35 (4), 9-15.
- 20) Kylie C, Douglas J, Candice P, Andrew F (2015),

Alpha-adrenoceptor antagonism by *Crassostrea gigas* oyster extract inhibits noradrenaline-induced vascular contraction in Wistar rats, *J Integr Med.* 13 (3), 194-200.