

## マウス大腸前癌病変の発現におよぼすカキ肉エキス給餌の影響

細見 亮太<sup>1)</sup>, 松田 芳和<sup>2)</sup>, 石丸 綾子<sup>1)</sup>,  
竹村 沙織<sup>1)</sup>, 福永 健治<sup>1)</sup>, 吉田 宗弘<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科\*, (<sup>2)</sup>日本クリニック中央研究所\*\*)

### Effect of Dietary Oyster Extract on the Colonic Aberrant Crypt Foci in Mice

Ryota HOSOMI<sup>1)</sup>, Yoshikazu MATSUDA<sup>2)</sup>, Ayako ISHIMARU<sup>1)</sup>,  
Saori TAKEMURA<sup>1)</sup>, Kenji FUKUNAGA<sup>1)</sup> and Munehiro YOSHIDA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry,

Materials and Bioengineering, Kansai University

<sup>2)</sup>Central Research Institute, Japan Clinic Co., Ltd.

#### Summary

In Japan, colorectal cancer demonstrates the third highest cancer mortality following lung cancer and gastric cancer. Western dietary habits symbolized by a high fat/low fiber diet are regarded as one of the risk factors on an epidemiological survey. The present study evaluated the preventive effects of oyster extract on the formation of chemically induced colonic aberrant crypt foci (ACF). Mice fed an AIN93G modified diet containing oyster extract (0.2 %, 1.0 % and 5.0 %) were subcutaneously injected with 1, 2-dimethylhydrazine (DMH) (15 mg/kg body wt) once weekly for 6 weeks (Experiment 1). Mice that were first administered DMH once weekly for 6 weeks, were then fed an AIN93G modified diet-containing oyster extract (Experiment 2). The number of ACF was evaluated after 0.02 % methylene blue staining of the colon and was scored under a light microscope at 40 times magnification.

Experiment 1 demonstrated weight loss of 10-15 % in the Control group beginning one week after dosing with DMH. In the group receiving oyster extract powder, weight loss was slight. The mice fed the oyster extract diet showed a decreased number of total colonic ACF with a multiplicity of 4<sup>+</sup> aberrant crypts compared with that in Control. In experiment 2, the mice fed an oyster extract diet did not show a change, total colonic ACF or a multiplicity of 4<sup>+</sup> aberrant crypts compared with those in Controls. Oyster extract did not diminish or delay development depression after precancerous manifestation, however we could expect suppression of the initiator action of the carcinogen routine consumption.

我が国における3大死因は、悪性新生物、心疾患、脳血管疾患の順であり、1981年以降悪性新生物が死因1位である。近年の癌年齢調整死亡率の変遷をみると、胃癌、子宮頸癌の減少と肺癌、大腸癌、乳癌といった欧米型癌の増加が顕著である。とくに、大腸癌は癌死亡順位で肺癌・胃癌に次ぐ第3位に位置し、食生活の欧米化による影響が最も大きい。大腸癌抑制効果を食品由来成分に求めた研究は多く、食物繊維や魚介類に特徴的なn-3系多価不飽和脂肪酸といった様々な食品成分について抗癌活性の検討が行われている<sup>1)</sup>。本研究は、これまでに各種生活習慣病の予防をはじめ健康の維持・増進機能が確認されているカキ肉エキス<sup>2, 3)</sup>について、大腸癌発現予防効果の作用機序を明らかにすることを

\*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

\*\*所在地：京都府京都市右京区太秦開日町10-1 (〒616-8555)

目的とする。すなわち本研究では、ヒトにおいても大腸癌前癌病変の生物学的指標として臨床応用が進んでいる異常腺窩巢<sup>4)</sup> (Aberrant crypt foci; ACF) の発現抑制効果を指標にし、1, 2-ジメチルヒドラジン (DMH) による ACF 誘発と同時にカキ肉エキスを給餌して ACF 誘導抑制効果を検討し、さらに DMH による ACF 誘発後、カキ肉エキスの給餌を行い、ACF 進展抑制効果を検討した。

## 実験方法

### 1. 餌料および試薬

餌料調製に用いた $\alpha$ -トウモロコシ澱粉、 $\beta$ -トウモロコシ澱粉、ミルクカゼイン、ショ糖、セルロース粉末、AIN93G用ミネラル混合およびビタミン混合はオリエンタル酵母工業(株)、L-シスチンは、シグマアルドリッチジャパン(株)、重酒石酸コリンおよび大豆油は和光純薬工業(株)から購入した。また、中性緩衝10%ホルマリン溶液、メチレンブルーは和光純薬工業(株)、DMHは東京化成工業(株)から購入した。カキ肉エキス粉末は、日本クリニック(株)から供与されたものを用いた。

### 2. 動物実験

#### 実験1 ACF誘導抑制の評価

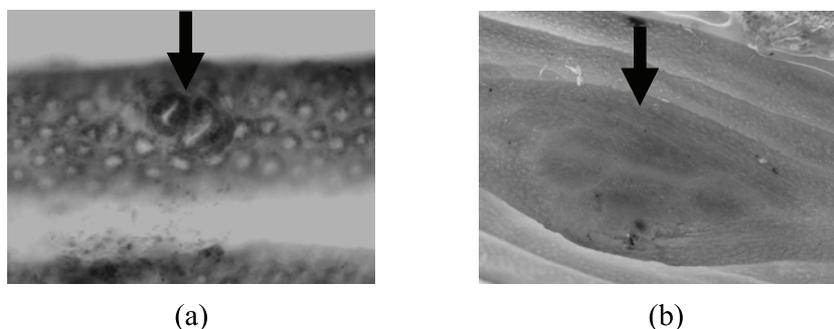
以下に示す動物実験条件は、カキ肉エキスの健康維持・増進機能について検討した研究<sup>2, 3)</sup>を参考に設定した。カキ肉エキス被験動物として4週齢雄A/Jマウスを清水実験材料(株)から購入し、1週間の対照群用餌料 (AIN93G) 給餌による予備飼育後、無作為に4群 (1群10匹) に分割した。実験群は、対照群用餌料に0.2%、1%および5% (w/w) のカキ肉エキス粉末を混合した3群と対照群とした。飼育期間中、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ に保持し、水および試験餌料は自由摂取とした。試験餌料の給餌開始と同時に週1回、大腸前癌病変誘起物質であるDMHを生理食塩水に溶解し、背部皮下に投与 (15 mg/kg B.W.) した<sup>5)</sup>。試験餌料を給餌し、6週間飼育した。飼育期間終了後、エーテル麻酔下で大腸を摘出した。

#### 実験2 ACF進展抑制の評価

4週齢の雄A/Jマウスを無作為に4群 (対照群、0.2%群、1%群、5%群) にわけ、各群とも対照群用給餌による飼育を6週間行った。飼育開始6週目までは週1回DMH (1週目5 mg/kg, 2週目10 mg/kg, 3週目以降15 mg/kg) を背部に皮下投与した。その後、実験1と同様の試験餌料を給餌した。飼育期間中、水および餌料は自由摂取とした。飼育開始7週目より6週間試験餌料を給餌した。飼育期間終了後、エーテル麻酔下で採血し、大腸を摘出した。

### 3. ACFの発現評価

摘出した大腸は、切開後、十分に生理食塩水で洗浄、内容物を除去し、濾紙に貼り付け、中性緩衝10%ホルマリン溶液で24時間固定した。固定した大腸を0.02%メチレンブルー溶液で染色後、実体顕微鏡下 ( $\times 40$ ) で大腸粘膜組織に形成された ACF を計測した<sup>6)</sup>。ACFあたりの異型腺窩 (Crypt) 数1, 2, 3および4個以上に分類した。Fig. 1にはCrypts 2およびCrypts 4以上の実体顕微鏡の画像を示した。



**Fig. 1** Typical magnifying view of a colonic aberrant crypt foci (ACF).

(a) ACF of Crypts 2

(b) ACF more than Crypts 4

#### 4. 血清の分析\*

血清生化学指標であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), 総脂質 (Total Lipid), 総タンパク質 (Total Protein), 尿素窒素 (BUN) をオリンパス AU5431 自動分析計により測定した。(\*実験2のみ)

### 結 果

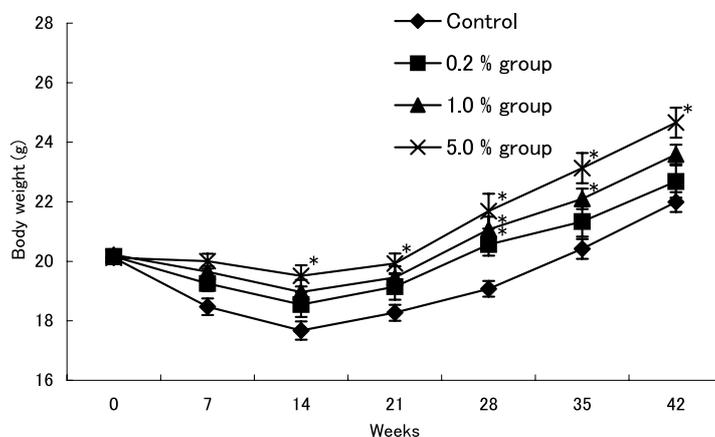
#### 実験1 ACF誘導抑制の評価

Fig. 2に本飼育期間中の各群の体重変化を示した。飼育開始1週から2週の間10%~15%の体重減少がみられたが、その後体重は増加に転じた。カキ肉エキス含量の高い給餌群ほど体重減少は軽微であった。また、飼育開始1週から2週の間に対照群では4匹, 0.2%群では3匹, 1%群では2匹の死亡が確認された。その後, 対照群n = 6, 0.2%群n = 7, 1%群n = 8, 5%群n = 10として実験を続けた。カキ肉エキス含量の高い給餌群ほど死亡数が少なかった。5%群では体重の減少も少なく, 死亡例はみられなかった。

総ACFおよびACFをCrypt数毎に分類してTable 1に示した。総ACFは, 0.2%群と5%群で有意に少なかった。1%群では, 有差はなかったものの少ない傾向にあった。また, ACFごとのCrypt数はカキ肉エキス餌料中添加量が多いほどACF発生が抑制された。

#### 実験2 ACF進展抑制の評価

Fig. 3に本飼育期間中の各群の体重変化を示した。実験餌料投与開始時に体重の差が確認されたが, その週以外各群とも体重変化は確認されなかった。総ACFおよびACFをCrypt数毎に分類してTable 2に示した。各群ともCrypt数1, 2, 3, 4以上および総ACFについて有意な差はなかった。Table 3に血清生化学指標であるAST, ALT, Total Lipid, Total Protein, BUNを示したが, 各群とも有意な差はみられなかった。



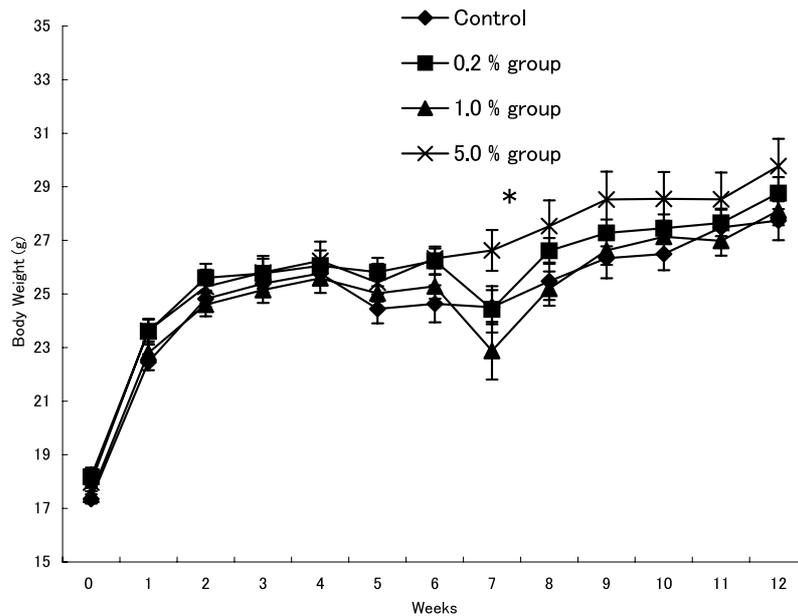
**Fig. 2** Changes in body weight of mice. (Experiment 1)

Data are means  $\pm$  SEM. \*Significantly different from Control group at  $p < 0.05$ .

**Table 1** Effect of dietary oyster extract on ACF formation in mice colon (Experient 1)

	Control group	0.2 % group	1.0 % group	5.0 % group
ACF-1 Crypts	3.0 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.6	2.4 $\pm$ 1.2	1.3 $\pm$ 0.4*
ACF-2 Crypts	1.3 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.27
ACF-3 Crypts	1.5 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.2*
ACF-4 <sup>+</sup> Crypts	10.5 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.6*	6.9 $\pm$ 0.6*	3.0 $\pm$ 0.6*
ACF Total	16.3 $\pm$ 1.4	9.8 $\pm$ 2.2*	12.0 $\pm$ 1.0	5.2 $\pm$ 0.8*

Data are means  $\pm$  SEM. \*Significantly different from Control group at  $p < 0.05$ .



**Fig. 3** Changes in body weight of mice. (Experiment 2)  
Data are means  $\pm$  SEM. \*Significantly different from Control group at  $p < 0.05$ .

**Table 2** Effect of dietary oyster extract on ACF formation in mice colon (Experiment 2)

	Control group	0.2 % group	1.0 % group	5.0 % group
ACF-1 Crypts	1.0 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.3
ACF-2 Crypts	1.1 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.5
ACF-3 Crypts	0.5 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.3
ACF-4 <sup>+</sup> Crypts	4.6 $\pm$ 0.5	5.7 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 0.5	4.3 $\pm$ 0.5
ACF Total	7.1 $\pm$ 0.6	9.7 $\pm$ 0.7	7.6 $\pm$ 0.6	8.5 $\pm$ 0.4

Data are means  $\pm$  SEM. \*Significantly different from Control group at  $p < 0.05$ .

**Table 3** AST, ALT, Total Lipid, Total Protein and BUN concentrations in serum of mice

	Control group	0.2 % group	1.0 % group	5.0 % group
AST	59.6 $\pm$ 2.6	61.0 $\pm$ 3.7	60.2 $\pm$ 3.7	56.6 $\pm$ 3.5
ALT	42.8 $\pm$ 1.9	45.4 $\pm$ 2.9	43.0 $\pm$ 2.9	42.3 $\pm$ 2.0
Total Lipid	297.4 $\pm$ 12.0	301.4 $\pm$ 9.7	293.4 $\pm$ 9.7	277.5 $\pm$ 8.9
Total Protein	5.5 $\pm$ 0.2	5.5 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.1	5.2 $\pm$ 0.1
BUN	26.4 $\pm$ 1.1	25.4 $\pm$ 0.9	25.2 $\pm$ 0.9	24.2 $\pm$ 1.6

Data are means  $\pm$  SEM. \*Significantly different from Control group at  $p < 0.05$ .

## 考 察

実験1では、DMHによるACF誘発と同時に実験餌料であるカキ肉エキス給餌を行った。カキ肉エキス給餌量が多いほど飼育期間中の体重減少とマウス死亡数が少ないことから、DMHによる急性毒性発現の抑制作用、すなわち肝臓におけるDMHの解毒の促進が考えられる。カキ肉エキス給餌によって総ACFが減少し、とくに大腸ガンに発展する可能性の高いCrypt 4以上のACFが少なく、5%群では顕著な抑制がみられた。総ACFは、1%群だけ有意差はみられないものの減少傾向にあった。これは、個体差およびガンに発展する可能性の低いCrypt数3個以下のACF数が多かったためである。DMH投与期間に平行してカキ肉エキスを給餌していることから、前述のようにカキ肉エキスはDMHの解毒作用によってACF抑制的に作用していると考えられるが、ガンに進展する可能性の高いACFすなわちCrypt 4以

上のACF増殖抑制が確認出来たことから、前癌病変発生後の進展抑制効果も期待できる。しかし、カキ肉エキス給餌がACF増殖のどの過程を抑制しているかは実験1の結果から明確ではない。

実験2では、DMHによるACF誘発後、カキ肉エキス給餌を開始した。飼育期間中に体重変化、各Crypt数のACF、血清生化学指標において有意な差は確認されなかったことから、前癌病変発生後にカキ肉エキスを投与した場合、ACFの進展抑制作用はないと考えられる。

実験1および実験2の結果から、カキ肉エキスには、大腸前癌病変であるACF発症後の進展抑制効果ないが、DMHによる急性毒性発現の抑制作用と肝臓でのDMHの解毒の促進作用により、発癌物質によるイニシエータ作用の抑制効果が確認された。カキ肉エキスを日常的に摂取することで、発癌物質解毒による抗癌作用が期待できると考えられる。

カキ肉エキス給餌による大腸前癌病変の発現抑制効果は、アスピリンやスリダックなど非ステロイド性消炎鎮痛剤(NSAIDs)にみられるシクロオキシゲナーゼ-2選択阻害作用<sup>7)</sup>やビタミンDのCytochrome P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 4 (CYP3A4)発現誘導を介した腸管内リトコール酸解毒作用を介したACFのアポトーシス誘導作用ではなく<sup>8)</sup>、癌誘発物質の毒性軽減作用によることが示された。

今後、DMH解毒促進作用機序、癌抑制機序解明についてさらに検討を進めたい。

本研究は、平成19年度関西大学学術研究助成基金(共同研究)において、研究課題「水産廃棄物に含有される機能性食品成分の有効利用に関する研究」として研究費を受けたものの成果として公表するものである。

#### 参考文献

- 1) Coleman LJ, Landstrom EK, Royle PJ, Bird AR, McIntosh GH (2002) A diet containing alpha-cellulose and fish oil reduces aberrant crypt foci formation and modulates other possible markers for colon cancer risk in azoxymethane-treated rats. *J Nutr* 132(8): 2312-2318.
- 2) 松田芳和, 出田祐久, 藤田忠義, 村田道代, 土井悦四郎, 太田隆男, 中塚正博, 石津弘視, 坪内涼子, 柴田幸雄 (1992) 糖尿病患者における血小板凝集能と、血中ミネラル、核酸関連物質の変動に及ぼすカキ肉エキスの影響. *微量栄養素研究* 9: 67-74.
- 3) 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. *微量栄養素研究* 15: 121-128.
- 4) Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, Stellato TA (1991) Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 51(5): 1564-1567.
- 5) McLellan E, Bird RP (1991) Effect of disulfiram on 1,2-dimethylhydrazine- and azoxymethane-induced aberrant crypt foci. *Carcinogenesis* 12(6): 969-972.
- 6) Roncucci L, Medline A, Bruce WR (1991) Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1(1): 57-60.
- 7) Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B (2000) The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 342(26): 1946-1952.
- 8) Martinez ME, Giovannucci EL, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Speizer FE, Wing A, Willett WC (1996) Calcium, vitamin D, and the occurrence of colorectal cancer among women. *J Natl Cancer Inst* 88(19): 1375-1382.