

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

西堀 頼史¹⁾, 鈴木 陽子¹⁾, 岸 浪 昌礼¹⁾, 藤澤 紘¹⁾,
永岡 茂樹¹⁾, 山崎 則之¹⁾, 松井 博之²⁾, 松田 芳和²⁾
(¹⁾株式会社新薬開発研究所*, ²⁾日本クリニック株式会社中央研究所**)

Study of Safety and Functionality in Oyster Extract Powder

Yorifumi NISHIHORI¹⁾, Yoko SUZUKI¹⁾, Masahiro KISHINAMI¹⁾, Hiro FUJISAWA¹⁾,
Shigeki NAGAOKA¹⁾, Noriyuki YAMAZAKI¹⁾, Hiroyuki MATSUI²⁾ and Yoshikazu MATSUDA²⁾

¹⁾New Drug Development 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 Powder exhibits several physiological activities including anti-platelet aggregation effect in human and experimental animals. Recently, possible interaction between medical drugs and health foods has attracted the public attention, and in some health foods, occurrence of drug interaction is reported by concomitant ingestion with medical drugs. This time, we investigated the safety and possible drug interaction of Oyster Extract Powder in rabbits and rats.

Safety assessment by a 90 days repeated oral dose toxicity study in rats revealed no significant toxic effects of Oyster Extract Powder. Possible drug interaction was investigated with anti-platelet aggregation drugs including aspirin and ticlopidine, and anti-blood coagulation drug, warfarin, and no interaction was observed with any drugs. From these results, it was confirmed that Oyster Extract Powder is a safety health food showing no possible drug interaction with anti-platelet aggregation and anti-blood coagulation drugs.

In addition, glutathione level in hippocampus was analyzed since it was reported that Oyster Extract Powder increased glutathione levels. Then, significant increase in total glutathione level in hippocampus was noticed by administration of Oyster Extract Powder.

カキは、種々の生体への有効性、機能性が報告されている。カキを原材料としたカキ抽出エキスパウダー（日本クリニック株式会社）は、5'-AMP, cAMP, イノシンなどの核酸関連物質及びミネラルを含有し、ラットを用いた検討¹⁾、ヒトを用いた検討²⁾で、いずれも血小板凝集抑制作用を有することが報告されている。

近年、医薬品と健康食品の併用による相互作用が注目されており、一部の健康食品では、医薬品との併用による相互作用の発現が報告されている。グレープフルーツジュース、セントジョーンズワート、イチヨウ葉エキスなどの健康食品と医薬品との併用により、医薬品の効果が増強あるいは減弱されることはよく知られている³⁾。

以上のことより、今回、カキ抽出エキスパウダーについて、安全性ならびに医薬品との相互作用について動物を用

いて検討を行った。安全性試験としては、ラットを用いて90日間反復投与により検討を行った。医薬品との相互作用については、血小板凝集抑制薬であるアスピリン及びチクロピジン、血液凝固抑制薬であるワルファリンを用いて検討を行った。

また、前骨髄性白血病細胞 HL60 を用いた *in vitro* での検討により、カキ抽出エキスの添加により濃度依存的に細胞内グルタチオン含量が増加すること、ヒトを用いた検討において、カキ抽出エキス摂取により、血中グルタチオンが増加することが報告されている⁴⁻⁶⁾。このようなことから、今回、ラットにカキ抽出エキスパウダーを投与した際の、海馬グルタチオン含量について検討を行った。

*所在地：北海道恵庭市戸磯452-1（〒061-1405）

**所在地：京都市右京区太秦開日町10-1（〒616-8555）

実験方法

1. カキ抽出エキスパウダーのラットにおける 90 日間反復経口投与毒性試験

カキ抽出エキスパウダー含有食品の安全性評価の一環として、カキ抽出エキスパウダーを 90 日間反復経口投与したときの毒性についてラットを用いて検討した。

投与開始時 5 週齢の CrI:CD(SD) (SPF) ラット雌雄を用いた。雌雄各 6 匹で媒体 (注射用水)、カキ抽出エキスパウダーを 1000 及び 2000 mg/kg/day の投与量で、90 日間反復経口投与した。安全性の評価は一般状態観察、体重推移、摂餌量、尿及び血液検査、臓器重量、病理解剖学的及び病理組織学的検査を指標に行った。

2. 医薬品との相互作用の検討

2.1 血小板凝集抑制薬との相互作用

カキ抽出エキスパウダーと血小板凝集抑制薬のアスピリンあるいはチクロピジンとの相互作用について、ウサギを用いて確認を行った。

10～13 週齢の Kbs:JW (Healthy) 雄性ウサギを用いた。ウサギに媒体 (注射用水) あるいはカキ抽出エキスパウダーを、1 日 1 回 7 日間経口投与を行った。投与 7 日目のカキ抽出エキスパウダーの投与 30 分後に、血小板凝集抑制薬 (アスピリンあるいはチクロピジン) を経口投与した。血小板凝集抑制薬の投与前及び投与後 30 分並びに 3 時間後に採血を行い血小板凝集率の測定を行った。得られた凝集率及び投与前値を 100% とした時の変化で評価を行った。凝集惹起物質として、アスピリン投与の場合は、コラーゲン及びアラキドン酸、チクロピジン投与の場合は、ADP 及びトロンビンを用いた。群構成は、対照群、血小板凝集抑制薬 単独投与群、血小板凝集抑制薬及びカキ抽出エキスパウダー併用群として、カキ抽出エキスパウダーは 2 用量設定した。投与量は、アスピリンは 50 mg/kg、チクロピジンは 100 mg/kg、カキ抽出エキスパウダーは 200 及び 500 mg/kg とした。

2.2 血液凝固抑制薬との相互作用

カキ抽出エキスパウダーと血液凝固抑制薬のワルファリンとの相互作用について、ラットを用いて確認を行った。

6 週齢の CrI:CD(SD) (SPF) 雄性ラットを用いた。ラットに媒体 (注射用水) あるいはカキ抽出エキスパウダーを、1 日 1 回 7 日間経口投与を行った。投与 6 日目のカキ抽出エキスパウダーの投与 30 分後に、血液凝固抑制薬 (ワルファリン) を経口投与した。ワルファリンの投与 24 時間後に採血を行い、プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。群構成は、対照群、血液凝固抑制薬 単独投与群、血液凝固抑制薬及びカキ抽出エキスパウダー併用群として、カキ抽出エキスパウダーは 2 用量設定した。投与量は、ワルファリンは 1 mg/kg、カキ抽出エキスパウダーは 200 及び 500 mg/kg とした。

3. 海馬のグルタチオン含量の検討

前述の 2.2 血液凝固抑制薬との相互作用の試験の、採血後の動物を用いて実施した。採血後に速やかに冷却下で海馬を摘出し重量を測定した。グルタチオン量は、Total Glutathione Quantification Kit (株同仁化学研究所) を用いて測定した。

実験結果

1. カキ抽出エキスパウダーのラットにおける 90 日間反復経口投与毒性試験

いずれの群においても死亡例は認められなかった。

一般状態観察、体重推移、摂餌量及び臓器重量では、カキ抽出エキスパウダー投与による影響を示唆する変化は認められなかった。

尿、血液検査、病理解剖学的及び組織学的検査については、カキ抽出エキスパウダー投与による影響を示唆する変化は認められなかった。

2. 医薬品との相互作用の検討

2.1 血小板凝集抑制薬との相互作用

アスピリンとの併用試験では、コラーゲン及びアラキドン酸による凝集は、いずれもアスピリン投与前値を 100% とした時の凝集率の変化は、投与後 30 分及び 3 時間に A 群と比較してアスピリン単独投与の B 群は有意な低値を示した。B 群と比較してカキ抽出エキスパウダーを併用した C 及び D 群では、統計学的な差は認められなかった (Fig. 1)。

チクロピジンとの併用試験では、ADP 及びトロンビンによる凝集は、いずれもチクロピジン投与前値を 100% とした時の変化において、投与後 30 分及び 3 時間に A 群と比較してアスピリン単独投与の B 群は有意な低値を示した。B 群と比較してカキ抽出エキスパウダーを併用した C 及び D 群では、統計学的な差は認められなかった (Fig. 2)。

2.2 血液凝固抑制薬との相互作用

ワルファリンとの併用試験では、プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間共に、A 群と比較してワルファリンの B 群は有意な延長を示した。B 群と比較してカキ抽出エキスパウダーを併用した C 及び D 群では、統計学的な差は認められなかった (Fig. 3)。

3. 海馬のグルタチオン含量の検討

海馬の総グルタチオン量の測定において、カキ抽出エキスパウダーを投与していない A 及び B 群と比較して、カキ抽出エキスパウダーを投与した C 及び D 群は、有意な増加が認められた (Fig. 4)。

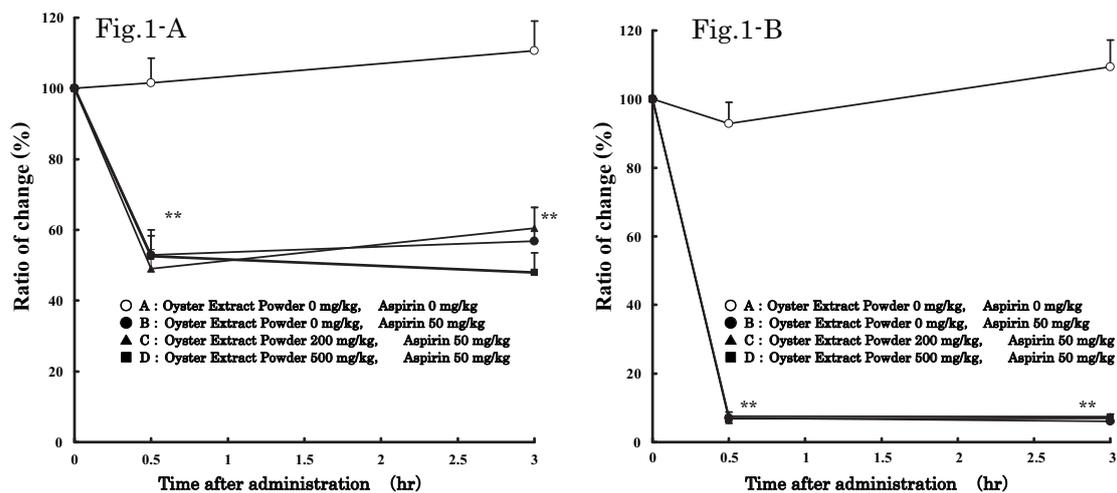


Fig. 1 Effects of Oyster Extract Powder and Aspirin on the platelet aggregation in rabbits.
 Fig.1-A) Collagen 16 µg/mL aggregation time course Fig.1-B) Arachidonic acid 75 µg/mL aggregation time course
 Data are expressed as mean ± S.E. of 6 rabbits. ** p < 0.01 A vs B by student t-test

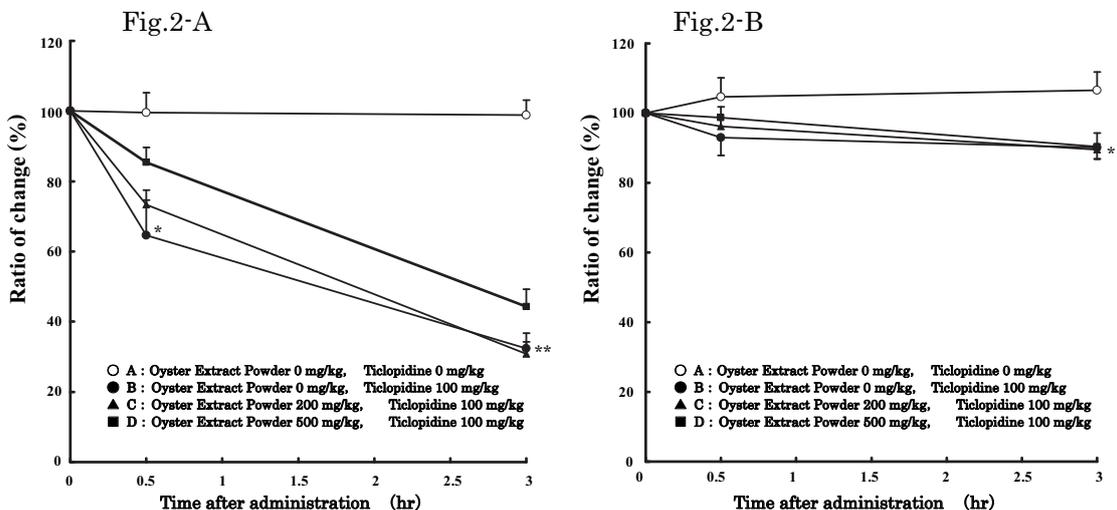


Fig. 2 Effect of Oyster Extract Powder and Ticlopidine on the platelet aggregation in rabbits.
 Fig.2-A) ADP 16 µmol/L aggregation time course Fig.2-B) Thrombin 0.5 U/mL aggregation time course
 Data are expressed as mean ± S.E. of 6 rabbits. * p < 0.05, ** p < 0.01 A vs B by student t-test

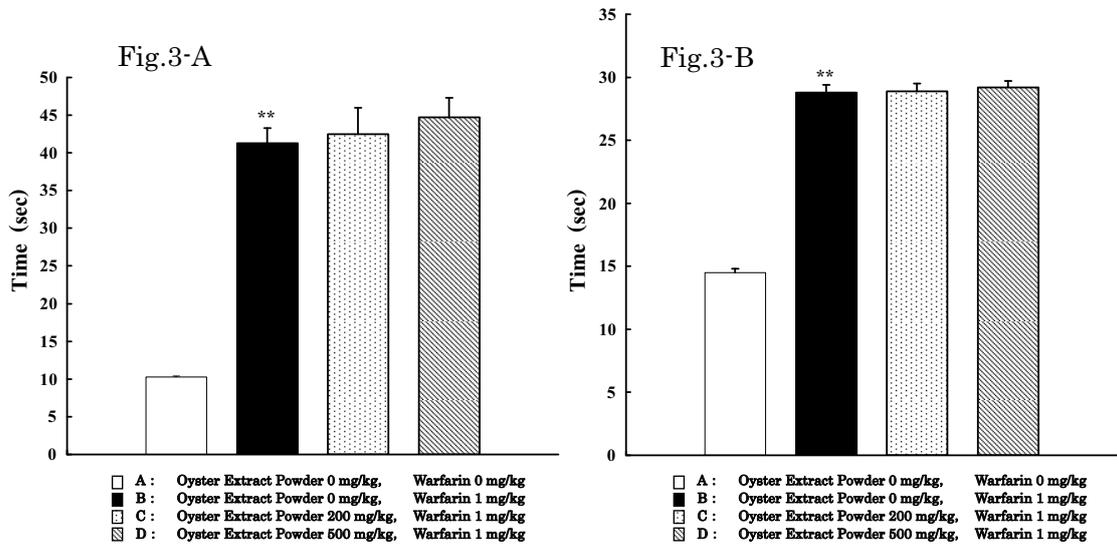


Fig. 3 Effects of Oyster Extract Powder and Warfarin on blood coagulation in rats.
 Fig.3-A) Prothrombin time Fig.3-B) Activated partial thromboplastin time
 Data are expressed as mean ± S.E. of 10 rats. ** p < 0.01 A vs B by student t-test

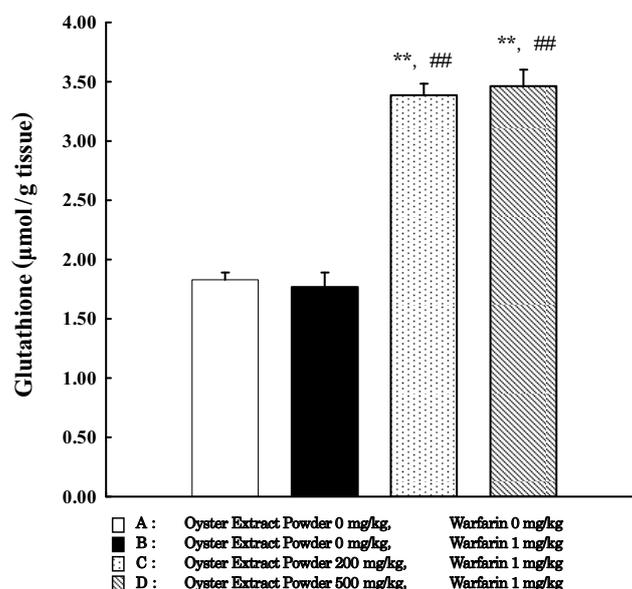


Fig. 4 Effects of Oyster Extract Powder and Warfarin on hippocampal glutathione in rats. Data are expressed as mean \pm S.E. of 10 rats. ** p < 0.01 vs A by student t-test ** p < 0.01 vs B by Dunnett multiple comparison test.

考 察

今回試験に供したカキエキス（カキ抽出エキスパウダー、日本クリニック株）は、独自の製法でカキのエキスを抽出し、製品化されたものである。本製品の特徴は、瀬戸内、主に広島で収穫された生牡蠣を使用し、日本クリニック株独自の製法である、湯煎抽出法により、最も有効性の高いエキスを使用した製品である。

以上より、今回、カキ抽出エキスパウダーの安全性、医薬品との相互作用及び機能性についての検討を行った。

ラットを用いた90日間反復投与による安全性の評価では、カキ抽出エキスパウダー投与による影響を示唆する変化は認められなかった。今回の検討より、無毒性量は、雌雄共に2000 mg/kg/day（ヒトの推奨量の120倍）を超えるものと推察された。また、カキエキスの安全性に関する報告では、細菌を用いた復帰突然変異試験においても陰性の結果が得られており⁷⁾、マウスを用いた催奇形性試験においても催奇形性は認められないという報告がなされている⁸⁾。

次に、医薬品との相互作用についての検討を行った。カキエキスは、ラットを用いた検討¹⁾、ヒトを用いた検討²⁾で、いずれも血小板凝集抑制作用を有することが報告されている。したがって、血小板凝集抑制薬あるいは血液凝固抑制薬との併用により、相互作用の発現が懸念される。これらのことより、今回、血小板凝集抑制薬としては、アスピリン及びチクロピジン、血液凝固抑制薬としてはワルファリンを用いて相互作用の有無についての確認を行った。

アスピリンは、アラキドン酸カスケードに関与するシクロオキシゲナーゼを抑制することにより血小板凝集抑制作用を示すことが知られている。チクロピジンは、血小板の

ADP受容体P2Y₁₂と共役する抑制性G蛋白質Giの機能を阻害し、cAMPを増加させ、さらに、血小板内の遊離Ca²⁺濃度を抑えることにより、各種血小板凝集因子による凝集反応を抑制することが知られている。今回、ウサギを用いて、血小板凝集抑制作用を指標に相互作用の有無についての確認を行った。凝集惹起剤としては、アスピリンについては、コラーゲン及びアラキドン酸、チクロピジンについては、ADP及びトロンビンを使用した。ヒト血液を用いた血小板凝集抑制作用の検討に汎用されるアドレナリンについては、ウサギ血小板ではアドレナリンによる血小板凝集は惹起されないことから⁹⁾、アドレナリンは使用しなかった。以上により検討を行った結果、カキ抽出エキスパウダーの併用は、アスピリンあるいはチクロピジンの血小板凝集抑制作用に影響を与えず、相互作用は示さないことが確認された。なお、今回用いたカキ抽出エキスパウダーの投与量は、ヒト推奨量の12及び30倍であり、相互作用を評価するに十分な投与量であると考えられる。

ワルファリンは、血栓塞栓症の治療・予防に処方されている抗凝固薬であり、血液凝固に働くビタミンKに拮抗することで血液凝固を抑制する。また、血漿タンパク質との結合率も高く、相互作用がしばしば問題とされる薬である。今回は、プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間を指標に、ワルファリンとの相互作用についての検討を行った。その結果、カキ抽出エキスパウダーの併用は、ワルファリンの血液凝固抑制作用に影響を与えず、相互作用は示さないことが確認された。

以上の結果をまとめると、カキ抽出エキスパウダーは、ラットを用いた90日反復毒性試験において、投与による影響を示唆する変化は認められなかった。一方、変異原性及び催奇形性に関しては、いずれも陰性であることが報告

されており、安全な食品であることが再確認された。更に、カキ抽出エキスパウダーは、血小板凝集抑制作用を有することが報告されているが、この作用は、血小板凝集抑制薬及び血液凝固抑制薬との間に相互作用を示さないことが確認された。

アルツハイマー病 (AD) は進行性の神経変性疾患であり、海馬でのアミロイド β ($A\beta$) やタウの凝集・蓄積に起因する神経変性が病態に関与すると考えられている。AD の発症は酸化ストレスの増強と関連し、ビタミン E などの抗酸化物質の摂取が AD の発生率を低下させるという疫学的研究報告がある¹⁰⁾。更に、培養神経細胞を用いた研究で、過酸化水素の暴露により、細胞内の還元型グルタチオン (GSH) が低下し、引き続いて細胞死が観察されることが報告されている¹¹⁾。また、カキエキスは、スーパーオキシド・ヒドロキシラジカルについて、濃度依存的な消去作用を示し、過酸化水素による細胞障害に対しても、濃度依存的な抑制作用を示すことが報告されている¹²⁾。これらのことより、今回、カキ抽出エキスパウダーを1週間投与したラットの海馬中のグルタチオン含量の測定を行った。その結果、カキ抽出エキスパウダーの投与により、海馬中の総グルタチオン量で有意な増加が認められた。この結果は、カキ抽出エキスパウダーが、老化及び認知症の予防に有用である可能性が高いことを示唆している。

文 献

- 1) 杉野徳和, 太田隆男, 大久保雅啓, 奥村重雄, 坪内涼子, 服部雅康, 柴田幸雄 (1986) かき成分の血小板凝集能におよぼす影響. 微量栄養素研究 3: 61-68.
- 2) 大田隆男, 柴田幸雄 (1988) カキ抽出エキスの血小板凝集に与える影響 - 核酸成分を中心として. 糖尿病動

物 2: 265.

- 3) 内田信也, 山田静雄 (2007) 食品・サプリメントと医薬品との相互作用. ふんせき 9: 454.
- 4) H Tapiero, KD Tew (1996) Increased glutathion expression in cells induced by *Crassostera gigas* extract (JCOE). Biomed & Pharmacother 50: 149.
- 5) L Gate, M Schltz, E Walsh, S Dhalluin, G Nguyenba, H Tapiero, KD Tew (1998) Impact of dietary supplement of *Crassostera gigas* extract (JCOE) on glutathione levels and S-transferase activity in rat tissues. In vivo 12: 299.
- 6) H Tapiero, KD Tew, S Dhalluin, G Nguyenba, V Soupramanien, J Kouyate (1998) The antioxidant effects of *Crassostera gigas* extract (JCOE) in human volunteers. In vivo 12: 305.
- 7) 日本クリニック(株), 未発表
- 8) Toshiaki Watanabe, Yoshikazu Matsuda, Takao Ohta and Yukio Shibata (1998) Effects of Oyster Extract on Teratogenicity and Embryonic Development in Zinc-Deficient Mice Trace Nutrients Research 15: 73-8.
- 9) 周藤俊樹 (2003) 実験動物の血小板凝集能の測定法. 日本血栓止血学会誌 14(3), 265-269.
- 10) 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.
- 11) 福島哲郎 (2010) 新規神経栄養因子様低分子化合物 T-817MA の薬効薬理. 日本薬理学雑誌 136, 11-14.
- 12) T Yoshikawa, Y Naito, K Masui, T Fujii, Y Boku, S Nakagawa, N Yoshida, M Kondo (1997) Free radical-scavenging activity of *Crassostera gigas* extract (JCOE) Biomed & Pharmacother, 51, 328.