

## ラットにおける 5-フルオロウラシル (5-FU) 誘発毒性に対する カキ抽出物の効果

山崎 則之<sup>1)</sup>, 藤澤 紘<sup>2)</sup>, 佐々木 麻衣<sup>1)</sup>, 山口 ゆかり<sup>1)</sup>, 縦山 貴也<sup>1)</sup>,  
西堀 頼史<sup>1)</sup>, 松井 博之<sup>3)</sup>, 松田 芳和<sup>3)</sup>  
(<sup>1)</sup>株式会社新薬リサーチセンター\*, (<sup>2)</sup>株式会社薬物安全性試験センター\*\*, (<sup>3)</sup>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)

### Effects of oyster extract on 5-Fluorouracil (5-FU) induced toxicity in rat

Noriyuki YAMAZAKI<sup>1)</sup>, Hiro FUJISAWA<sup>2)</sup>, Mai SASAKI<sup>1)</sup>, Yukari YAMAGUCHI<sup>1)</sup>, Takaya MOMIYAMA<sup>1)</sup>,  
Yorifumi NISHIHORI<sup>1)</sup>, Hiroyuki MATSUI<sup>3)</sup> and Yoshikazu MATSUDA<sup>3)</sup>  
<sup>1)</sup>New Drug Research Center, Inc.  
<sup>2)</sup>Drug Safety Testing Center Co., Ltd  
<sup>3)</sup>Central Research Institute, Japan Clinic Co, Ltd.

### Summary

Oyster (*Crassostrea gigas*) contains abundant nutritional elements, including glycogen, vitamine, zinc and taurine. It is reported that oyster extract exhibited several physiological activities. In this study, the symptom relieving effects of oyster extracts on 5-fluorouracil (5-FU) induced toxicity in rats was examined mainly on gastrointestinal toxicity and myelotoxicity. Test groups were as follow, control, 5-FU, 5-FU and oyster extract (200 and 500 mg/kg/days). Oyster extracts were administrated for 21 days in rats. 5-FU was administrated for 5 days after 14 days of oyster extracts administrated. After termination of administration of oyster extracts, recovery period was established for 3 days, and autopsy was performed.

No deaths were observed throughout the study period. Regarding body weight and food intake, significant reduction suppression and dose-dependent reduction tendency was observed. In the hematological examination, influence was observed on the white blood cell count, red blood cell count, hemoglobin amount and hematocrit value due to administration of 5-FU.

Evaluation of intestinal mucosa by histopathological examination, mucosal thickness, villous height and crypt thickness were dose - dependent or high trend without dose - dependence. In addition, a suppression tendency was also observed for mucosal atrophy of the duodenum due to administration of 5-FU. From the above results, it was suggested that oyster extract is effective in alleviating gastrointestinal toxicity by 5-FU.

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<sup>1)</sup>。カキ抽出物に関しては、肝障害抑制作用<sup>2-4)</sup>、抗酸化作用<sup>3-8)</sup>、血清亜鉛濃度増加作用<sup>9)</sup>、学習・記憶障害およびパーキンソンニズムに対する作用<sup>10)</sup>、抗不安作用<sup>11)</sup>、グルタチオン増加作用<sup>4, 12-13)</sup>などが報告されている。

5-フルオロウラシル (5-FU) は、長い間、制癌剤として使用されている化合物である。本剤は、葉酸拮抗物質と

して、癌細胞の RNA 機能障害および DNA 合成阻害により制癌効果を発揮する。5-FU の副作用としては、消化管毒性、骨髄毒性が顕著であり、その毒性発現に酸化ストレスが関与することが知られている<sup>14)</sup>。

今回、5-FU による副作用の発現に対するカキ抽出物の作用について、ラットを用いて、消化管毒性および骨髄毒性を指標として検討を行った。

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。

\*所在地：北海道恵庭市戸磯452-1 (〒061-1405)

\*\*所在地：埼玉県比企郡吉見町黒岩25-1 (〒355-0166)

\*\*\*所在地：京都府京都市北区大將軍西町1 (〒603-8331)

## 実験方法

### 1. 被験物質、試薬および媒体

カキ抽出物は、薄茶色～茶色の粉末であった。試薬として、5-フルオロウラシル (5-FU, 和光純薬工業(株)) 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. 使用動物

5週齢の Crl:CD (SD) (SPF) 雄性ラットを日本チャールス・リバー(株)より入荷した。動物は入荷からカキ抽出物投与開始日まで馴化した。ただし、入荷7日までの期間は検疫を行った。

### 3. 飼育条件

動物は温度  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 20\%$ 、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) に装着したステンレス製金網 2 連ケージの 1 区画 (255W×185D×200H mm) に個別に収容した。

飼料は固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業(株)) を、飲料水は水道水を試験期間を通じ自由に与えた。排泄物の処理は、ケージ下に敷いた汚物受け皿に受け、汚物受け皿を交換することにより処理した。

### 4. 動物の選択および群分け

検疫・馴化期間の一般状態観察において全例において異常が認められなかったことより、体重推移を基準に動物の選択を行った。選択した動物は馴化期間終了時の体重による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。

### 5. カキ抽出物および 5-FU の投与

カキ抽出物および 5-FU は、用時に注射用水に溶解または懸濁させて投与液とした。投与回数はカキ抽出物および 5-FU 共に 1 日 1 回とし、投与期間はカキ抽出物は 21 日間、5-FU は 5 日間 (カキ抽出物投与 14 日より 18 日まで) とした。回復期間は 3 日間 (投与 19 日 (回復 1 日) から剖検日 (回復 3 日) まで) とした。

## 6. 検査項目

### 1) 一般状態観察

一般状態観察は、毎日行った。

### 2) 体重測定

体重は、投与 1 週は週 3 回、投与 2 週は週 2 回、投与 3 週は週 7 回および剖検日に測定した。

### 3) 摂餌および摂水量測定

摂餌および摂水量は、投与 1 週は週 3 回、投与 2 週は週 2 回、投与 3 週は週 7 回および剖検日に測定した。

### 4) 血液学的検査

投与 19 日 (回復 1 日) および病理解剖学的検査時に採血を行った。採取した血液で以下の項目を検査した。

白血球数, 赤血球数, 色素量, ヘマトクリット値, 平均赤血球容量, 平均赤血球色素量, 平均赤血球色素濃度, 血小板数, 好中球比率, リンパ球比率, 単球比率, 好酸球比率, 好塩基球比率, 網状赤血球比率

### 5) 病理解剖学的検査および器官組織の摘出

採血後、腹大動脈からの放血により安楽死させ直ちに剖検を行った。頭部および胸腹部の器官・組織を肉眼的に観察した。摘出する器官・組織を下記に示した。

胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 大腿骨・脛骨 (骨髄), 脾臓, 胸腺, 精巣

### 6) 器官重量の測定

摘出後、下記の器官の重量を測定した。

脾臓, 胸腺, 精巣

### 7) 骨髄総グルタチオン量測定

左大腿骨および脛骨から骨髄を採取し、Total Glutathione Quantification Kit (株)同仁化学研究所) を用い、総グルタチオン量を測定した。

### 8) 骨髄塗抹検査

右大腿骨から骨髄を採取した。スライドガラス上に骨髄を均一に塗抹し、メイ・グリュンワルドーギムザ染色を施した。骨髄細胞の形態、骨髄細胞を計数し、骨髄細胞千分

Table 1 Test group of experiments

Group	Dose (mg/kg/day)		No. of animals
	Oyster extract	5-FU	
Control	0 <sup>a)</sup>	0 <sup>a)</sup>	6
5-FU	0 <sup>a)</sup>	30	6
5-FU+oyster extract low dose	200	30	6
5-FU+oyster extract high dose	500	30	6

a): Distilled water was administrated.

率（顆粒球系細胞，赤芽球系細胞およびその他細胞）およびM/E比を算出した。

## 9) 病理組織学的検査

全例の十二指腸，空腸および回腸について，ヘマトキシリン・エオジン染色を行い，腸管粘膜の厚さおよびその他所見について観察した。

## 7. 統計処理

統計処理は統計ソフトSPSS 14.0J (SPSS Inc.) を用いて行った。有意差検定は，対照群と各投与群，5-FU投与群と5-FU+カキ抽出物投与群間で行った。

体重，摂餌量，摂水量，白血球型別百分率を除く血液学的検査，器官・組織の重量と相対重量，骨髓総グルタチオン量，骨髓塗抹検査のM/E比および病理組織学的検査の腸管粘膜の厚さについては，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Dunnnett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Dunnnett法により平均順位の比較を行った。血液学的検査の白血球型別百分率および骨髓塗抹検査の骨髓細胞百分率については，Kruskal-WallisのH検定を行い，有意な場合はDunnnett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。Dunnnett法では危険率5%および1%とした。

## 結果

### 1. 一般状態観察

試験期間を通じ，対照，5-FU，5-FU+カキ抽出物投与群に死亡は認められなかった。

一般状態観察では，糞量減少が5-FU投与群において全

例に認められた。5-FU+カキ抽出物投与群では，糞量減少の抑制が認められた。また，全身被毛の光沢の消失および肛門部被毛の汚れが5-FUおよび5-FU+カキ抽出物投与群に散見された。

## 2. 体重

結果をFig. 1に示した。

対照群と5-FU投与群間では，5-FU投与群で，投与17~20日および剖検日に有意な低値が認められた。

5-FU群とカキ抽出物投与各群間については，5-FU+カキ抽出物高用量群において投与18~20日および剖検日に有意な高値が認められた。

## 3. 摂餌・摂水量

摂餌量については，対照群と5-FU投与群間については，5-FU投与群で，5-FU投与期間中および剖検日に有意な低値が認められた。5-FU群とカキ抽出物投与各群間については，5-FU投与期間中に有意な高値が認められた。

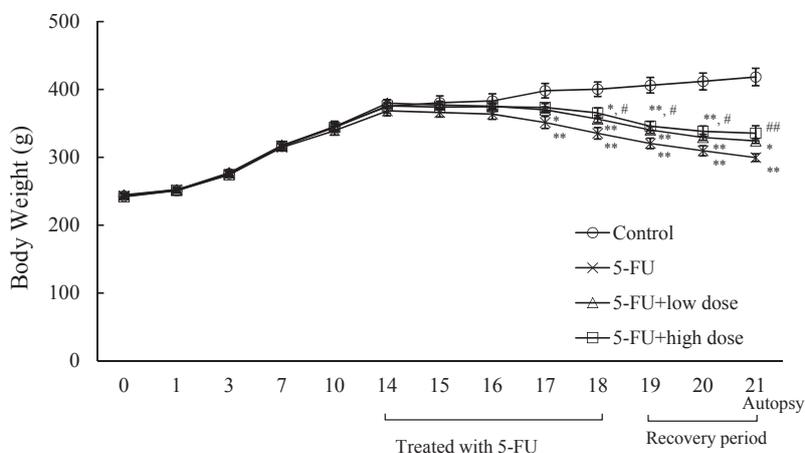
摂水量については，対照群と5-FU投与群間において投与18日に有意な減少が認められた。5-FU群とカキ抽出物投与各群間には影響は認められなかった。

## 4. 血液学的検査

結果をTable 2および3に示した。

対照群と5-FU投与群間では，回復1日および剖検日で，網状赤血球数および白血球数の有意な低値，平均赤血球血色素濃度の有意な高値が認められた。上記に加え，回復1日目では，赤血球数，血色素量，ヘマトクリット値，好酸球比率の有意な高値が，剖検日では，リンパ球比率の有意な高値，単球比率および血小板数の有意な低値が認められた。

5-FU投与群とカキ抽出物投与群間では，回復1日目では低用量群において白血球数の有意な高値が認められ赤血球



**Fig. 1** Body weight changes of rats treated concomitantly with Oyster extract powder and 5-Fluorouracil. Each value represents mean  $\pm$  SE from 6 rats. \*, \*\*: Significantly different from control group at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively. #, ##: Significantly different from 5-FU group at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

数, 血色素量およびヘマトクリット値の用量依存的な低値傾向が認められた。

### 5. 病理解剖学的検査

主な所見として, 全身被毛の光沢の消失が5-FU群において4例, 5-FU+ カキ抽出物低用量群において3例, 5-FU+ カキ抽出物高用量群において2例, 胸腺小型化が5-FU, 5-FU+ カキ抽出物低用量および5-FU+ カキ抽出物高用量群において各6例認められた。

### 6. 器官重量

対照群と5-FU投与群間では, 胸腺および脾臓について, 絶対重量および相対重量とも有意な低値が認められた。5-FU投与群とカキ抽出物投与群間については, 有意な変動は認められなかった。

### 7. 骨髓総グルタチオン量

結果を Table 4 に示した。

対照群と5-FU投与群間では, 5-FU投与群で, 骨髓総

**Table 2** Hematology of rats treated concomitantly with Oyster extract powder and 5-Fluorouracil (Recovery period day 1)

Recovery period (Day 1)						
Group		Control	5-FU	5-FU + test substance		
				low dose	high dose	
No. of animals		6	6	6	6	
Erythrocytes	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	832 $\pm$ 21	929 $\pm$ 18**	907 $\pm$ 13**	892 $\pm$ 9*	
Reticulocytes	(%)	5.09 $\pm$ 0.34	0.26 $\pm$ 0.05**	0.28 $\pm$ 0.02**	0.31 $\pm$ 0.02*	
Hemoglobin	(g/dL)	16.7 $\pm$ 0.2	18.9 $\pm$ 0.5**	18.4 $\pm$ 0.2**	18.0 $\pm$ 0.3*	
Hematocrit	(%)	48.6 $\pm$ 0.7	52.9 $\pm$ 1.1**	51.8 $\pm$ 0.7*	50.0 $\pm$ 0.7	
MCV	(fL)	58.5 $\pm$ 1.1	57.0 $\pm$ 0.6	57.1 $\pm$ 0.7	56.1 $\pm$ 0.6	
MCH	(pg)	20.1 $\pm$ 0.4	20.3 $\pm$ 0.2	20.3 $\pm$ 0.3	20.2 $\pm$ 0.2	
MCHC	(%)	34.4 $\pm$ 0.3	35.6 $\pm$ 0.2**	35.6 $\pm$ 0.1**	35.9 $\pm$ 0.2**	
Leukocytes	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	156.5 $\pm$ 16.8	50.3 $\pm$ 1.6**	70.8 $\pm$ 4.3###	58.1 $\pm$ 3.5**	
Differential count of leukocytes (%)						
Eosinophils		1.0 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.3*	1.7 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.6*	
Neutrophils		16.4 $\pm$ 1.6	26.1 $\pm$ 5.4	30.9 $\pm$ 3.2*	28.3 $\pm$ 2.9	
Basophils		0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	
Monocytes		4.9 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.3	3.6 $\pm$ 0.7	
Lymphocytes		77.7 $\pm$ 2.2	69.2 $\pm$ 5.3	64.7 $\pm$ 3.2	65.5 $\pm$ 3.2	
Platelets	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	101.5 $\pm$ 3.8	77.7 $\pm$ 7.9	98.4 $\pm$ 7.3	78.7 $\pm$ 7.7	
Each value represents mean $\pm$ SE.						
*, **: Significantly different from control group at p<0.05 and 0.01, respectively.						
### : Significantly different from 5-FU group at p<0.01.						

**Table 3** Hematology of rats treated concomitantly with Oyster extract powder and 5-Fluorouracil (Autopsy day)

Recovery period (Autopsy day)						
Group		Control	5-FU	5-FU + test substance		
				low dose	high dose	
No. of animals		6	6	6	6	
Erythrocytes	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	772 $\pm$ 19	824 $\pm$ 17	837 $\pm$ 13	815 $\pm$ 15	
Reticulocytes	(%)	4.31 $\pm$ 0.24	0.32 $\pm$ 0.03**	0.52 $\pm$ 0.19*	0.38 $\pm$ 0.08**	
Hemoglobin	(g/dL)	14.6 $\pm$ 0.1	15.9 $\pm$ 0.3	16.0 $\pm$ 0.1**	15.5 $\pm$ 0.4	
Hematocrit	(%)	44.1 $\pm$ 0.3	45.6 $\pm$ 0.7	46.3 $\pm$ 0.2	44.9 $\pm$ 1.0	
MCV	(fL)	57.3 $\pm$ 1.4	55.4 $\pm$ 0.7	55.4 $\pm$ 0.9	55.0 $\pm$ 0.7	
MCH	(pg)	19.0 $\pm$ 0.4	19.3 $\pm$ 0.2	19.2 $\pm$ 0.3	19.0 $\pm$ 0.2	
MCHC	(%)	33.2 $\pm$ 0.2	34.9 $\pm$ 0.1**	34.6 $\pm$ 0.2**	34.5 $\pm$ 0.3**	
Leukocytes	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	91.5 $\pm$ 12.9	28.5 $\pm$ 10.5**	34.5 $\pm$ 6.0**	28.1 $\pm$ 5.8**	
Differential count of leukocytes (%)						
Eosinophils		0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.2	
Neutrophils		12.8 $\pm$ 1.8	5.6 $\pm$ 2.8	3.3 $\pm$ 1.1	1.5 $\pm$ 0.4**	
Basophils		0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1	
Monocytes		2.3 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.2**	0.9 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.2*	
Lymphocytes		84.2 $\pm$ 2.3	93.2 $\pm$ 2.9*	95.2 $\pm$ 1.2	97.3 $\pm$ 0.4**	
Platelets	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	110.2 $\pm$ 3.2	46.4 $\pm$ 11.1**	66.9 $\pm$ 6.3**	56.5 $\pm$ 9.3**	
Each value represents mean $\pm$ SE.						
*, **: Significantly different from control group at p<0.05 and 0.01, respectively.						

グルタチオン量について、有意な低値が認められた。5-FU 投与群とカキ抽出物投与群間では有意な変動は認められなかった。

## 8. 骨髓塗抹検査

対照群と5-FU 投与群間で、有意な変動は認められなかった。5-FU 投与群とカキ抽出物投与群間についても同様であった。

## 9. 病理組織学的検査

結果を Table 5, Photo 1~4 に示した。

### 1) 腸管粘膜の厚さ

対照群と5-FU 投与群間では、5-FU 投与群で、十二指腸については、粘膜の厚さおよび絨毛高に有意な低値が、

陰窩の厚さに有意な高値が認められた。空腸については、粘膜の厚さおよび絨毛高に有意な低値が認められた。回腸については有意な変動は認められなかった。

5-FU 投与群とカキ抽出物投与群間については、十二指腸および空腸ともに、粘膜の厚さ、絨毛高および陰窩の厚さに用量依存的な高値傾向又は用量依存を伴わない高値傾向が認められた。

### 2) 病理所見

対照群と5-FU 投与群間では、十二指腸および空腸とも、粘膜萎縮、粘膜上皮の変性・剥離、粘膜固有層の浮腫が認められた。

5-FU 投与群とカキ抽出物投与群間については、十二指腸の粘膜萎縮に抑制傾向が認められた。

**Table 4** Bone marrow total glutathione of rats treated concomitantly with Oyster extract powder and 5-Fluorouracil

Group	Control	5-FU	5-FU + test substance		5-FU + test substance	
			low dose	high dose	low dose	high dose
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Bone marrow total GSH (nmol/mg tissue)	2.80 ± 0.19	1.37 ± 0.17**	1.61 ± 0.19**	1.26 ± 0.23**		
Each value represents mean ± SE.						
** : Significantly different from control group at p<0.01.						

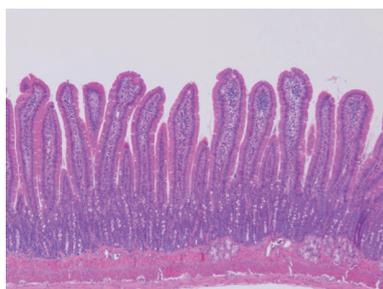
**Table 5** Histopathology of rats treated concomitantly with Oyster extract powder and 5-Fluorouracil

Tissue	Finding	Group	Control	5-FU	5-FU +test substance	5-FU +test substance	
			No. of animals	6	6	low dose	high dose
			Grade	- ± + ++ +++	- ± + ++ +++	- ± + ++ +++	- ± + ++
Duodenum	Mucosal atrophy	6		3 3	1 2 2 1	2 1 2 1	
	Degeneration and desquamation of the mucosal epithelium	6		1 2 2 1	2 2 2	2 2 2	
	Dilatation of the glandular spaces	6		5 1	6	6	
	Edema in the lamina propria	6		3 2 1	4 1 1	4 1 1	
	Crypt hyperplasia	6		4 2	4 2	2 3	
	Thickness of mucosa (×10 <sup>-1</sup> mm)	Mean±S.E.	7.83 ± 0.21	6.58 ± 0.24 *	7.50 ± 0.34	7.67 ± 0.40	
	Height of villus (×10 <sup>-1</sup> mm)	Mean±S.E.	5.46 ± 0.16	3.38 ± 0.15 **	4.08 ± 0.37 *	4.13 ± 0.40	
Thickness of crypt (×10 <sup>-1</sup> mm)	Mean±S.E.	2.38 ± 0.09	3.21 ± 0.10 **	3.42 ± 0.12 **	3.54 ± 0.20		
Jejunum	Mucosal atrophy	6		1 3 2	2 3 1	5	
	Degeneration and desquamation of the mucosal epithelium	6		1 2 3	2 1 3	3 3	
	Dilatation of the glandular spaces	6		6	6	6	
	Edema in the lamina propria	6		1 2 3	4 1 1	3 3	
	Crypt hyperplasia	6		2 4	2 3 1	2 4	
	Thickness of mucosa (×10 <sup>-1</sup> mm)	Mean±S.E.	5.00 ± 0.13	2.50 ± 0.18 **	3.08 ± 0.27 **	3.08 ± 0.15	
	Height of villus (×10 <sup>-1</sup> mm)	Mean±S.E.	3.71 ± 0.10	1.29 ± 0.18 **	1.75 ± 0.25 **	1.54 ± 0.14	
Thickness of crypt (×10 <sup>-1</sup> mm)	Mean±S.E.	1.29 ± 0.04	1.21 ± 0.08	1.33 ± 0.05	1.54 ± 0.10		
Ileum	Mucosal atrophy	6		6	5 1	6	
	Degeneration and desquamation of the mucosal epithelium	6		5 1	5 1	6	
	Dilatation of the glandular spaces	6		6	6	6	
	Edema in the lamina propria	6		4 1 1	3 2 1	4 2	
	Crypt hyperplasia	6		1 4 1	1 3 2	1 5	
	Thickness of mucosa (×10 <sup>-1</sup> mm)	Mean±S.E.	3.50 ± 0.13	3.25 ± 0.25	2.92 ± 0.20	3.08 ± 0.15	
	Height of villus (×10 <sup>-1</sup> mm)	Mean±S.E.	2.08 ± 0.11	2.00 ± 0.13	1.67 ± 0.08 *	1.75 ± 0.06	
Thickness of crypt (×10 <sup>-1</sup> mm)	Mean±S.E.	1.42 ± 0.05	1.25 ± 0.14	1.25 ± 0.13	1.33 ± 0.11		

\*, \*\*: Significantly different from control group at p<0.05 and 0.01, respectively.

# : Significantly different from 5-FU group at p<0.05.

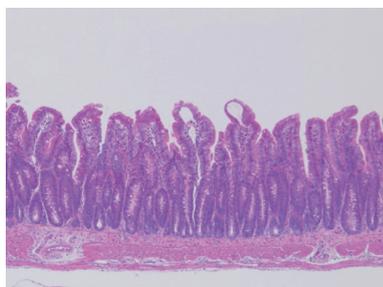
Grade of histopathological findings - : no remarkable changes, ±: minimal, +: slight, ++: moderate, +++: severe



**Photo 1** Control

No remarkable changes.

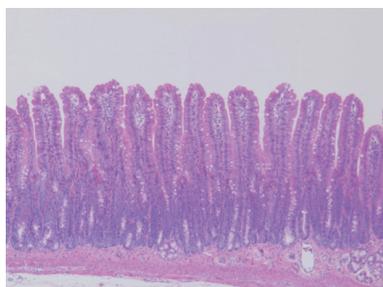
Thickness of mucosa ( $8.00 \times 10^{-1}$  mm), height of villus ( $5.50 \times 10^{-1}$  mm) and thickness of crypt ( $2.50 \times 10^{-1}$  mm)



**Photo 2** 5-FU

Mucosal atrophy (moderate), degeneration and desquamation of the mucosal epithelium (slight), edema in the lamina propria (minimal) and crypt hyperplasia (slight).

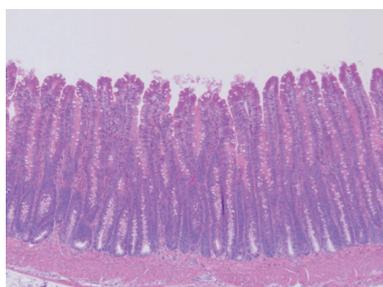
Thickness of mucosa ( $6.00 \times 10^{-1}$  mm), height of villus ( $3.00 \times 10^{-1}$  mm) and thickness of crypt ( $3.00 \times 10^{-1}$  mm).



**Photo 3** 5-FU+oyster extract low dose

Mucosal atrophy (minimal), degeneration and desquamation of the mucosal epithelium (minimal) and crypt hyperplasia (slight).

Thickness of mucosa ( $7.50 \times 10^{-1}$  mm), height of villus ( $4.25 \times 10^{-1}$  mm) and thickness of crypt ( $3.25 \times 10^{-1}$  mm).



**Photo 4** 5-FU+oyster extract high dose

Mucosal atrophy (slight) and crypt hyperplasia (moderate).

Thickness of mucosa ( $8.00 \times 10^{-1}$  mm), height of villus ( $4.25 \times 10^{-1}$  mm) and thickness of crypt ( $3.75 \times 10^{-1}$  mm).

**Photo** Duodenum macroscopy of rats treated concomitantly with Oyster extract powder and 5-Fluorouracil

## 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<sup>1)</sup>。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おり、その作用機序のひとつとして、グルタチオン増加作用が考えられている。春松ら<sup>4)</sup>は、ラットのアセトアミノフェン誘発肝障害モデルにおいて、カキ抽出物の投与が肝障害の抑制作用を示し、肝臓中のグルタチオンが有意に増加することを報告している。更に、ラット海馬においても、カキ抽出物の投与で、グルタチオン含量が増加することも報告されている<sup>12-13)</sup>。鈴木ら<sup>10)</sup>は、カキ抽出物が、学習・記憶能力の改善およびパーキンソンズム症状の緩和作用を示し、その機序として、酸化ストレスの軽減が考えられることを

報告している。一方、5-フルオロウラシル（5-FU）は制癌剤として長年にわたって使用されているが、種々の重篤な副作用が問題となっている。5-FUの毒性発現については、酸化ストレスも関与しており、毒性の軽減にグルタチオンが有効であることも知られている<sup>14)</sup>。

以上のことから、今回、5-FUによる副作用の発現に対するカキ抽出物の作用について、ラットを用いて、消化管毒性および骨髄毒性を指標として検討を行った。

群構成については、対照、5-FU、5-FU+カキ抽出物（200および500 mg/kg/day）の計4群を設定した。カキ抽出物は、6週齢より剖検日前日までの21日間経口投与を行った。5-FUの投与量は、30 mg/kg/dayに設定し、カキ抽出物投与開始14日目より5日間経口投与を行った。5-FU投与期間終了後、回復期間を3日間設けた。なお、剖検日は回復期間3日目とした。

試験期間を通じ、死亡は認められなかった。一般状態観察では糞量減少が5-FU投与群と比較し、カキ抽出物投与群で用量依存的な抑制傾向が認められた。体重および摂餌量では、5-FU群と比較し、カキ抽出物投与群で用量依存的な減少抑制が認められた。摂餌量の変化は、5-FUによる消化管毒性の軽減の可能性が、糞量減少の抑制傾向および体重の変化は、摂餌量の変化に伴う2次的変化の可能性が考えられた。摂水量では、明確な差は認められなかった。

血液学的検査では、5-FU投与群で、網状赤血球数、白血球数、血小板数および単球比率の低値、平均赤血球血色素濃度、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、好酸球比率およびリンパ球比率の高値が認められた。これに対して、カキ抽出物投与群では、低用量群において白血球数の有意な高値が認められ、赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の用量依存的な低値傾向が認められた。これらの変化は、脱水による血液の濃縮に起因する5-FU投与群の相対的増加の可能性が示唆された<sup>15)</sup>。しかし摂水量に明確な差は認められなかったことから、消化管毒性の軽減に伴い消化管機能が維持されていたことにより用量依存的な低値傾向を示したものと考えられた。

病理組織学的検査および器官重量、骨髓総グルタチオン量および骨髓塗抹検査では、意義のある差および傾向は認められなかった。

病理組織学的検査の腸管粘膜の厚さでは、5-FU投与群で、十二指腸および空腸について、粘膜の厚さおよび絨毛高に有意な低値が認められ、十二指腸ではさらに、陰窩の厚さに有意な高値が認められた。以上の変化に対して、カキ抽出物投与群については、粘膜の厚さ、絨毛高および陰窩の厚さに用量依存的な高値傾向又は用量依存を伴わない高値傾向が認められた。病理所見については、5-FU投与群で、十二指腸および空腸とも、粘膜萎縮、粘膜上皮の変性・剥離、粘膜固有層の浮腫が認められた。この変化に対して、カキ抽出物投与群については、十二指腸の粘膜萎縮に抑制傾向が認められた。上記の病理組織学的検査における腸管粘膜の厚さおよび十二指腸の粘膜萎縮の傾向から、消化管粘膜の障害が用量依存的に軽減されていることが示された。

糞量減少、体重、摂餌量、血液学的検査における赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値、病理組織学的検査の変化を包括すると、消化管毒性の軽減はカキ抽出物投与に起因する変化という結論に至った。その消化管毒性軽減の機序については、Gateら<sup>16)</sup>の報告によるとカキ抽出物投与により小腸におけるグルタチオン値に有意な高値が認められている。また、Numazawaら<sup>14)</sup>の報告によると5-FUにより酸化ストレスが誘導されることが示されている。以上のことを踏まえると、5-FUにより誘発された酸化ストレスがグルタチオンの抗酸化力により消去され、その結果として消化管毒性が軽減された可能性が考えられた。なお、5-FUの制癌作用メカニズムは葉酸拮抗作用であり、本検討で示唆された消化管毒性軽減の機序は5-FUによる

誘発された酸化ストレスのグルタチオンにおける消去であり、今回の結果が制癌作用に対して影響を及ぼす可能性は少ないことが推察された。

以上の結果より、カキ抽出物と5-FUを併用投与することにより、5-FUの消化管毒性が軽減され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 *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 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ン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, 微量栄養学会誌, 29, 106-109.
  - 14) Numazawa S, Sugihara K, Miyake S, Tomiyama H, Hida A, Hatsuno M, et al. Possible Involvement of Oxidative Stress in 5-Fluorouracil-Mediated Myelo-suppression in Mice. *Basic Clin pharmacol Toxicol.* 2011; 108: 40-5.
  - 15) 西崎統, 村上純子編. 2. 血液検査. In: 検査値の読み方・考え方 専門医からのアドバイス. 東京: 総合医学社:2008. p.32-56.
  - 16) Gate L, Schultz M, Walsh E, Dhalluin S, Nguyen Ba G, Tapiero H, et al. Impact of dietary supplement of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) on glutathione levels and glutathione S-transferase activity in rat tissues. *In Vivo.* 1998; 12: 299-303.