

ラットを用いたステロイドによる副腎萎縮に対するカキ肉エキスの影響

今野 誠¹⁾, 森川 広樹¹⁾, 五十嵐 雅陽¹⁾, 菊田 麻朱美¹⁾, 後藤 平¹⁾,
山崎 則之¹⁾, 松田 桂²⁾, 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 2020年9月2日, 受理 2020年10月7日)

Effect of oyster extract on steroid-induced adrenal atrophy in rats

Makoto KONNO¹⁾, Hiroki MORIKAWA¹⁾, Masaharu IGARASHI¹⁾, Masumi KIKUTA¹⁾, Hitoshi GOTO¹⁾,
Noriyuki YAMAZAKI¹⁾, Katsura MATSUDA²⁾, Tatsuya ISHIDA²⁾, Hiroyuki MATSUI²⁾, 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 the effect of oyster extract on the side effects of steroids in rats.

The oyster extract was administered for 28 days. Dexamethasone was subcutaneously administered at 100 µg/kgBW/day from the 14 days to the 14th days of administration of the oyster extract.

Administration of dexamethasone to rats causes typical steroid toxic effects (side effects) such as decreased body weight gain, decreased food intake, atrophy of the spleen, thymus, adrenal gland, and decreased serum corticosterone levels. The administration of oyster extract showed no change in adrenal gland weight compared to the control, but a significant increase in serum corticosterone concentration was observed at 500 mg/kgBW/day of oyster extract. It was shown that the variation of corticosterone obtained in this study did not affect the anti-inflammatory effect.

The oyster extract was shown to be effective in reducing the side effects of steroids.

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⁾。カキ肉エキスは、抗酸化作用²⁻⁷⁾や肝障害抑制作用⁶⁻⁸⁾、マウスの抗不安作用⁹⁾やサルスの抗ストレス作用¹⁰⁾などの様々な機能が報告されており、現在多岐にわたり研究が進められている。また、副腎皮質ホルモン製剤 (ステロイド剤) は、近代医学に最も貢献している代表的薬物の一つとして各種疾患の治療に用いられているが、顕著な有効性が得られる一方で、感染症の誘発・増悪、副腎の機能不全、骨粗鬆症、耐糖能異常、高脂血症などの重篤な副作用も多く報告されており、ステロイド剤による副作用は大きな社会問題となっている。

今回我々は、カキ肉エキスのステロイド剤の副作用軽減に対する評価の一環として、Dexamethasone (以下 Dex) の投与により発現する副腎に対する作用を指標に検討を行った。

実験方法

1. 被験物質および試薬 (Dex, カラゲニン)

カキ肉エキスパウダー (提供: 日本クリニック株式会社) は、薄茶色～茶色の粉末を使用した。粉末は、20 mg/mL, 50 mg/mL または 100 mg/mL の濃度で注射用水 (大塚蒸留水) に溶解しカキ肉エキス投与液とした。Dex は、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム注射液 (デカドロン注射液 3.3 mg, アスペンジャパン) を使用し、生理食塩液 (大塚生食注) で 50 µg/mL (デキサメタゾンとして) となるよう希釈して使用した。カラゲニンは、λ-Carrageenan (東京化成工業株) を生理食塩液 (大塚生食注) で 1% となるように調製して使用した。

2. カキ肉エキスの影響 I (Dex の副作用に関する検討)

試験には、5 週齢 CrI: CD (SD) (SPF) 雄性ラットを

*所在地: 北海道恵庭市戸磯452-1

**所在地: 京都市北区大將軍西町1

日本チャールスリバー(株)より購入し、1週間の検疫を含む馴化期間を経た後、一般状態観察において異常が認められなかった6週齢の動物を使用した。群構成は、無処置群、対照群、カキ肉エキス200および500 mg/kgBW/dayの4群、各群6匹を設定し、1日1回28日間強制経口投与した。Dexはカキ肉エキス投与14日目より100 µg/kgBW/dayの用量で14日間皮下投与した。投与28日目にイソフルラン吸入麻酔下で常法により採血し、各種血液検査および血清中コルチコステロン濃度(ELISA法)の測定を行った。また、採血後、腹大動脈を切断し放血致死させた後、脾臓、胸腺および副腎を摘出し、組織重量の測定を行った。なお、本実験は、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(審議No. 200121 A)を得た後に実施した。

3. カキ肉エキスの影響Ⅱ (Dexの薬効に対する影響)

試験には、4週齢Slc: Wistar (SPF) 雄性ラットを日本エスエルシー(株)より購入し、1週間の検疫を含む馴化期間を経た後、一般状態観察において異常が認められなかった5週齢の動物を使用した。群構成は、無処置群、対照群、カキ肉エキス500および1000 mg/kgBW/dayの4群、各群8匹を設定し、1日1回14日間強制経口投与した。14日目の被験物質投与30分後にDex100 µg/kgBWの用量で皮下投与し、その30分後に、1%カラゲニン生理食塩溶液0.1 mLを右後肢足蹠皮下に投与した。カラゲニン投与後3、4、5時間後に右後肢足蹠容積を測定した。なお、本実験は、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(審議No. 200401 A)を得た後に実施した。

4. 飼育方法

温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数13~17回/時間(HEPAフィルターで濾過したオールフレッシュ方式)、照明時間8:00~20:00(明12時間、暗12時間)の設定環境下で、ステンレス製可動ラック(1790 W × 470 D × 1650 H mm)に装着したステンレス製金網2連ケージの1区画(255 W × 185 D × 200 H mm)に個別に収容した。

飼料は、ステンレス製固型飼料給餌器により固型飼料CRF-1(オリエンタル酵母工業(株))または固型飼料ラボMRストック(日本農産工業(株))を、自由に与えた。飲料水は、ポリサルフォン製給水器(先管ステンレス製)により水道水を、自由に与えた。汚物受け皿は3回/週、給水器については2回/週その他の器材は2回/月の頻度で、それぞれオートクレーブで高圧蒸気滅菌したものと交換した。

5. 統計処理

得られた数値は、各群で平均値および標準誤差を算出した。無処置群と対照群の比較は、F検定により等分散の検定を行い、等分散の場合はStudentのt検定、不等分散の

場合はAspin-Welchのt検定を行った。また、対照群と被験物質間の比較は、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F検定、Bartlett法、一元配置分散分析、Kruskal-WallisのH検定では危険率5%とし、t検定、Dunnett法では危険率5%および1%とした。なお、統計解析は、SPSS14.0J(日本アイ・ビー・エム(株))、Microsoft Excel 2013(Microsoft Corp.)及びOS(Windows 10, Windows XP)をそれぞれ用いて実施した。

実験結果

1. カキ肉エキスの影響Ⅰ (Dexの副作用に関する検討)

1) 体重・摂餌量

体重推移をFig.1に摂餌量推移をFig.2に示した。被験物質の投与開始からDexの投与開始前までは、一定の体重増加と摂餌量推移が確認されたが、Dexの投与開始から試験終了日までは、顕著な体重増加抑制、摂餌量の低下が認められた。これら試験期間中において、被験物質投与による変化は認められなかった。

2) 器官・組織重量

脾臓、胸腺および副腎の重量をTable 1に示した。

Dex投与により顕著な重量の低下が認められたものの、被験物質投与による変化は認められなかった。

3) 血液学的検査および血液生化学的検査

血液学的検査および血液生化学的検査をTable 2, 3に示した。

Dex投与により白血球数、血小板数で顕著な低下が認められ、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、総蛋白、アルブミン及びトリグリセリドでは顕著な増加が認められた。しかし、被験物質投与による変化は認められなかった。

4) 血清中コルチコステロン濃度

血清中コルチコステロン濃度の結果をFig.3に示した。

Dex投与によりコルチコステロンレベルの顕著な低下が認められ、被験物質の高用量において有意な高値を示した。

2. カキ肉エキスの影響Ⅱ (Dexの薬効に対する影響)

カラゲニン誘発足蹠浮腫の結果をFig.4に示した。

Dex投与により顕著な浮腫率の低下が認められたものの、被験物質投与による変化は認められず、同程度の浮腫抑制作用を示した。

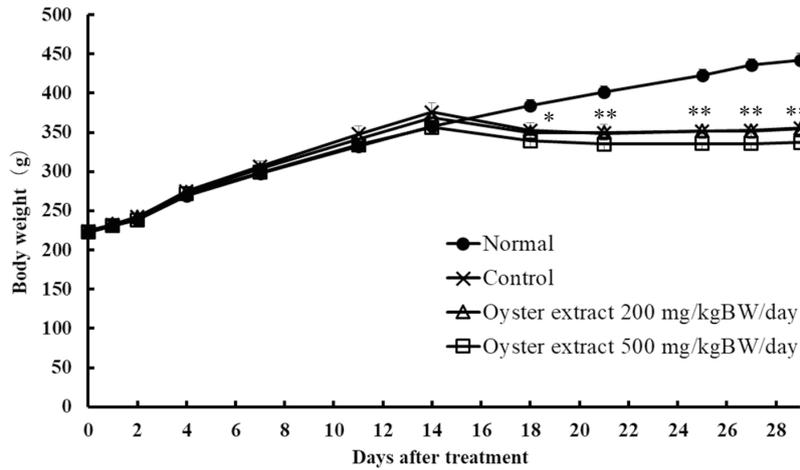


Fig. 1 Effect of oyster extract on steroid-induced adrenal atrophy in rats —Body weight—
 Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 rats.
 No significant difference from control group by Dunnett's test.
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from normal group by t-test.

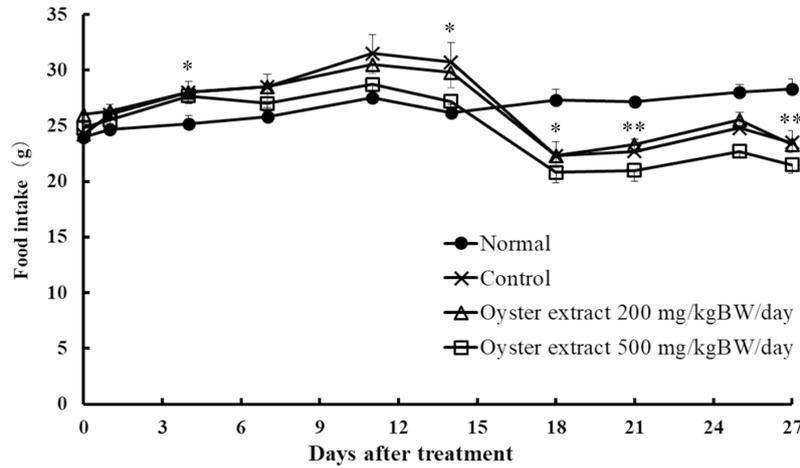


Fig. 2 Effect of oyster extract on steroid-induced adrenal atrophy in rats —Food intake—
 Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 rats.
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from normal group by t-test.
 No significant difference from control group by Dunnett's test.

Table 1 Effect of oyster extract on steroid-induced adrenal atrophy in rats —Tissue weight—

Group	Tissue weight (g)				
	Thymus	Spleen	Adrenal gland		
			Right	Left	Total
Normal	0.5725 \pm 0.0460	0.7752 \pm 0.0390	0.0302 \pm 0.0022	0.0311 \pm 0.0026	0.0612 \pm 0.0048
Control	0.0702** \pm 0.0061	0.3884** \pm 0.0097	0.0115** \pm 0.0004	0.0117** \pm 0.0003	0.0232** \pm 0.0006
Oyster extract 200 mg/kgBW/day	0.0679 \pm 0.0095	0.3819 \pm 0.0201	0.0126 \pm 0.0008	0.0128 \pm 0.0002	0.0254 \pm 0.0009
Oyster extract 500 mg/kgBW/day	0.0667 \pm 0.0066	0.3614 \pm 0.0293	0.0128 \pm 0.0013	0.0130 \pm 0.0011	0.0258 \pm 0.0024

Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 rats.
 ** $p < 0.01$, significantly different from normal group by t-test.
 No significant difference from control group by Dunnett's test.

Table 2 Effect of oyster extract on steroid-induced adrenal atrophy in rats —Hematological test—

	WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	Plt ($\times 10^4/\mu\text{g}$)
Normal	72.1 ± 9.4	750 ± 13	14.6 ± 0.1	41.9 ± 0.5	110.7 ± 2.3
Control	34.3** ± 3.0	864** ± 5	16.5** ± 0.1	46.2** ± 0.4	92.4** ± 3.8
Oyster extract 200 mg/kgBW/day	35.0 ± 2.7	860 ± 16	16.1 ± 0.2	45.5 ± 0.6	96.4 ± 5.8
Oyster extract 500 mg/kgBW/day	35.9 ± 1.6	861 ± 7	16.6 ± 0.2	46.6 ± 0.6	91.3 ± 5.0

Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 rats.

**p < 0.01, significantly different from normal group by t-test.

No significant difference from control group by Dunnett's test.

WBC: White Blood Cell, RBC: Red Blood cell, Hb: Hemoglobin, Hct: Hematocrit, Plt: Platelet

Table 3 Effect of oyster extract on steroid-induced adrenal atrophy in rats —Blood biochemistry—

	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	GLB (g/dL)	CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)
Normal	5.7 ± 0.1	2.5 ± 0.0	3.2 ± 0.1	59 ± 4	149 ± 22	72 ± 5	35 ± 2	805 ± 41
Control	6.5** ± 0.1	3.1** ± 0.1	3.4 ± 0.0	71 ± 5	369** ± 59	163 ± 66	128 ± 61	843 ± 43
Oyster extract 200 mg/kgBW/day	6.3 ± 0.1	3.1 ± 0.1	3.2 ± 0.1	61 ± 3	331 ± 30	151 ± 33	115 ± 29	779 ± 58
Oyster extract 500 mg/kgBW/day	6.5 ± 0.1	3.1 ± 0.1	3.4 ± 0.1	64 ± 4	307 ± 27	127 ± 14	104 ± 20	787 ± 33

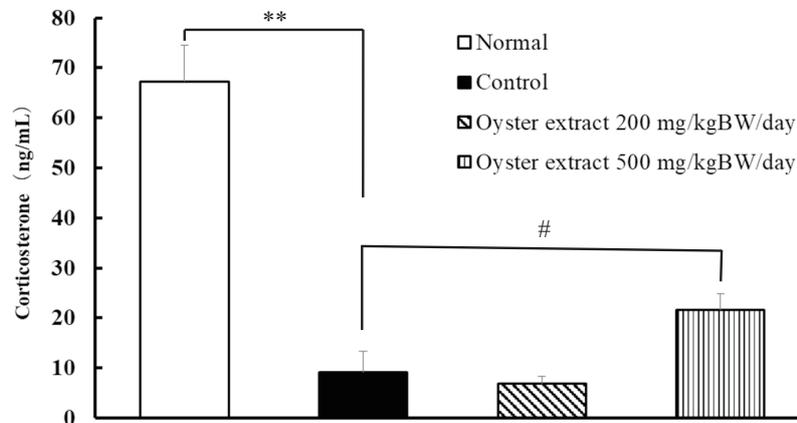
Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 rats.

**p < 0.01, significantly different from normal group by t-test.

No significant difference from control group by Dunnett's test.

TP: Total Protein, ALB: Albmen, GLB: Globulin, CHO: Cholesterol, TG: Triglyceride,

AST: Aspartate Aminotransferase, ALT: Alanine Aminotransferase, ALP: Alkaline Phosphatase

**Fig. 3** Effect of oyster extract on steroid-induced adrenal atrophy in rats —Corticosterone—

Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 rats.

**p < 0.01, significantly different from normal group by t-test.

p < 0.05, significantly different from control group by Dunnett's test.

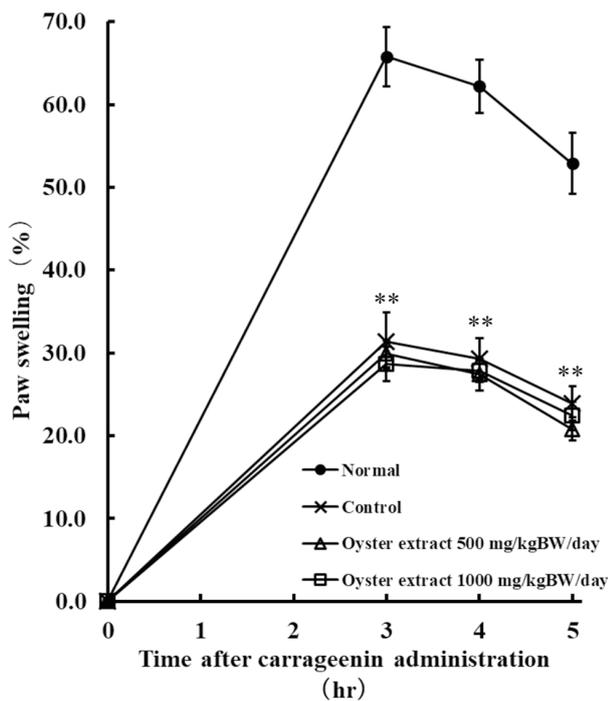


Fig. 4 Effect of oyster extract on steroid-induced adrenal atrophy in rat —Paw swelling—
 Each value represents the mean \pm S.E.M. of 8 rats.
 ** $p < 0.01$, significantly different from normal group by t-test.
 No significant difference from control group by Dunnett's test.

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肉エキスは、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。

安田ら¹⁰⁾は、カニクイザルを用いてストレスに対する影響について研究しており、カキ肉エキスの投与によりコルチゾールおよびアドレナリンの増加を抑制することを報告している。ストレスを受けると大脳皮質や大脳近縁系を経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-副腎皮質系 (HPA系) を活性化することが知られている¹¹⁾。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。HPA系は概日リズムにより調節されており、ストレスに対する反応を調節する主要な神経内分泌系であることが知られている¹²⁾。

HPA系の機能調節には、脳内の副腎皮質ステロイドホルモン受容体が重要な役割を担っている。グルココルチコイド受容体 (GR) は、ストレス環境下においてHPA系に対しネガティブフィードバックをかけストレスが過剰に伝わらないよう制御している¹³⁻¹⁴⁾。通常であれば恒常性が保たれているフィードバック機構であるが、うつ病やストレス等による疾患では、HPA系の過活動やGRの機能低

下などのネガティブフィードバック機構の障害が認められている。副腎皮質ホルモン製剤であるステロイド剤の長期投与では、副作用として副腎の萎縮やHPA系への影響が知られており、うつ病やストレスと同様な障害が認められている。以上のことから、今回、ラットを用いて、ステロイド剤の長期投与に対するカキ肉エキスの影響についての検討を行った。

ラットへのデキサメタゾンの14日間投与により、副腎や脾臓および胸腺の萎縮、血中コルチコステロンの低下、血液学や血液生化学検査の数値に対する変動が認められた。これに対して、カキ肉エキスの投与で、血液学や血液生化学検査結果には影響は認められなかったものの、血中コルチコステロン濃度で統計学的に有意な増加が認められた。

HPA系に対するROSの過剰産生をはじめ酸化的影響についての研究が進められている。今回実験で用いたデキサメタゾンはGRアゴニストとして、グルタチオンの著しい低下とROS産生の増加を誘導することが報告されている¹⁵⁻¹⁶⁾。また、Prevatto J. P.ら¹³⁾は抗酸化剤であるN-アセチルL-システイン (NAC) やビタミンE (α -トコフェロール) がHPA系の活性化を引き起こし、副腎のACTH受容体をアップレギュレートし、下垂体のグルココルチコイド受容体をダウンレギュレートすることにより全身のグルココルチコイドを増加させると報告している。カキ肉エキスは、NACやビタミンEのような抗酸化作用²⁻⁷⁾に加え、薬物の解毒に必要なグルタチオン増強作用^{7,17)}が報告されており、今回得られたコルチコステロン濃度の増加作用は、デキサメタゾンによるROSの過剰産生やグルタチオン低下に対する抑制作用が関与している反応であると考えられた。

一方、グルタチオンの増強作用は、有害物質の解毒や肝保護作用に非常に有用であると考えられており、グルタチオン増強作用により薬物の解毒が促進されると薬理作用は減弱することが予想される。そこで我々は、カキ肉エキス投与によりDexの薬効に対する影響について、ラットのカラゲニン誘発足蹠浮腫モデルを用いて検討を行った。カラゲニン足蹠浮腫モデルは、代表的な急性炎症モデルであり、各種抗炎症薬の薬効評価に繁用されている¹⁸⁻²⁰⁾。検討の結果、カキ肉エキス投与においてDexの抗炎症作用に関して、特に影響を及ぼさないことが示された。

以上のことより、カキ肉エキスはDexによるコルチコステロン濃度の低下を抑制することが本検討により明らかとなった。また、抗炎症作用に対しても阻害を示さないことより、ステロイドの副作用軽減に対して有効である可能性を示した。今後は、副腎における形態学的変化やコルチコステロンの上流であるACTHやCRHなどのホルモンの動きを確認することにより、詳細なメカニズム解明が望まれる。

参考文献

- 1) 杉田浩一, 平宏和, 田島眞, 安井明美 (2008) 日本食

- 品大事典, 医歯薬出版株式会社, 東京: pp. 415-416.
- 2) Yoshikawa T, Naito Y, Masui K, Fujii T, Boku Y, Nakagawa S, Yoshida N, Kondo M (1997) Free radical-scavenging activity of *Crassostrea gigas* extract (JCOE). *Biomed Pharmacother.* 51(8): 328-332.
 - 3) Gaté L, Schultz M, Walsh E, Dhalluin S, Nguyen Ba G, Tapiero H, Tew KD (1998) Impact of dietary supplement of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) on glutathione levels and glutathione S-transferase activity in rat tissues. *In Vivo.* 12(3): 299-303.
 - 4) Tapiero H, Gate I, Dhalluin S, Nguyen Ba G, Soupramanien V, Kouyate J, Tew KD (1998) The antioxidant effects of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) on human volunteers. *In vivo.* 12, 305-309.
 - 5) Tapiero H, Tew KD (1996) Increased glutathione exin cells induced by *Crassostrea gigas* extract (JCOE). *Biomed Pharmacother.* 50, 149-153.
 - 6) 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.
 - 7) 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, *微量栄養素研究*, 30, 41-43.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 安田仁, 光岡ちほみ, 山崎則之, 岡林佐知, 櫻庭峻, 山之内智彦, 田原宏輔, 石田達也, 松井博之, 松田芳和 (2018) 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), *微量栄養素学会誌*, 35, 1-5.
 - 11) 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.
 - 12) Dean O, Giorlando F, Berk M (2011) N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci.* 36(2): 78-86.
 - 13) Prevatto J. P., Torres R. C., Diaz B. L., Silva P. M. R., Martins M. A., Carvalho V. F (2017) Antioxidant Treatment Induces Hyperactivation of the HPA Axis by Upregulating ACTH Receptor in the Adrenal and Downregulating Glucocorticoid Receptors in the Pituitary. *Oxid Med Cell Longev.* 10.
 - 14) 吾郷由希夫, 田熊一敏, 松田敏夫 (2009) うつ病と副腎皮質ステロイドホルモン受容体, *日薬理誌*, 134, 304-308.
 - 15) Suwanjang W, Abramov AY, Govitrapong P, Chetsawang B (2013) Melatonin attenuates dexamethasone toxicity-induced oxidative stress, calpain and caspase activation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 138: 116-122.
 - 16) Suwanjang W, Abramov AY, Charngkaew K, Govitrapong P, Chetsawang B (2016) Melatonin prevents cytosolic calcium overload, mitochondrial damage and cell death due to toxicly high doses of dexamethasone-induced oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Int.* 97: 34-41.
 - 17) 福田卓, 春松慎, 松井博之, 松田芳和 (2012) かき肉エキスによるラット海馬中総グルタチオン増強効果 *微量栄養素研究* 29: 106-109.
 - 18) 津田恭介, 野上寿 (2008) 薬効の評価 (1), 株式会社人書館, 東京: 258-268.
 - 19) M Di Rosa (1972) Biological properties of carrageenan, *J Pharm Pharmacol.* 24(2), 89-102.
 - 20) 岡田信行, 岡崎豊, 和田育夫, 田中康仁, 福田保, 川面博, 辺見善一 (1975) 局所性抗炎症ステロイド 9 α -fluoro-11 β , 17, 21-trihydroxy-16 β -methylpregna-1, 4-diene-3, 20-dione-17-benzoate (Betamethasone-17-benzoate, MS-1112) の薬理学的研究 (第1報) 抗炎症作用ならびにその他の薬理作用, *日薬理誌*, 71, 231-252.