

【小動物】 原著

機能性食品（アガリクスタケ、タモギタケ、ヤマブシタケ、アラビノキシラン、サメ軟骨およびサメ抽出脂質）の摂取がマウス LM 8 Dunn 骨肉腫移植腫瘍の成長に及ぼす効果

木戸 伸英¹⁾、高木 哲¹⁾、島田健次郎²⁾、
奥村 正裕¹⁾、廉澤 剛¹⁾、藤永 徹¹⁾

1) 北海道大学獣医外科学教室、2) 協和発酵工業株式会社

要 約

LM-8 マウス骨肉腫高肺転移株細胞を C3H/HeN マウス背部皮下への移植前 3 週間、各種機能性食品を混和した飼料を給餌し、その後さらに 6～7 週間給餌した。一方、対照群は飼料のみを給餌した。実験 1 のアガリクスタケ、タモギタケ、ヤマブシタケおよびアラビノキシラン投与群 (n = 6) では、対照群に比べて移植腫瘍の成長に明瞭な効果はみられなかった。実験 2 のサメ軟骨およびサメ抽出脂質投与群 (n = 10) では、移植腫瘍および転移腫瘍の成長抑制傾向がみられ、その効果はサメ抽出脂質投与群でやや強い傾向がみられた。実験 3 のサメ抽出脂質投与群 (n = 7) では、移植腫瘍組織内の血管数が有意に減少すると共に、実験 2 より明確に腫瘍成長抑制傾向がみられた。以上の結果、サメ抽出脂質は抗腫瘍効果性の新しい機能性食品として検討に値すると考えられた。

緒 言

近年、腫瘍治療法として補完・代替医療が注目を集めている。他の治療法との併用も可能であることから、利用者の数が急増している^[8]。補完・代替医療の中で、生物学的活性を有する機能性食品は、効果や作用機序について多くの研究がなされている。特に、アガリクス茸やサメ軟骨は、注目を集めている機能性食品である^[3]。

しかしながら、このような機能性食品を臨床の現場で獣医師や医師達が積極的に使用を勧めることは少ない^[8]。なぜならば、機能性食品の効果に不明瞭な点が多いためである。近年、動物の腫瘍疾患においても機能性食品の使用が急増しており、腫瘍症例に対する機能性食品の有用性が報告されている^[6]ものの、科学的に論証された報告は多いとはいえない。したがって、それら多様な機能性食品の効果、および多くの腫瘍細胞に及ぼす効果を明確にし、作用機序を明らかにすることは、獣医領域においても重要な課題である。

以上のことから、本実験では機能性食品による移植腫瘍成長抑制効果について検討した。実験1では、免疫賦活化作用を有するといわれるアガリクスタケ、タモギタケ、ヤマブシタケおよびアラビノキシランについて、実験2では、血管新生抑制作用を有するといわれるサメ軟骨およびサメ抽出脂質について検討した。実験3では、有効性が示唆されたサメ抽出脂質について、さらに血管新生能についても検討を加えた。

材料および方法

1. 供試動物および腫瘍細胞

供試動物は、C3H/HeN マウス（日本クレア(株)、東京）5週齢の雄を用いた。

移植腫瘍細胞は、C3H マウスに移植後の肺転移腫瘍より分離されたLM8 Dunn 骨肉腫高肺転移株細胞^[1]であり、理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行より購入した。

2. 供試物質および給餌法

供試した6種類の機能性食品は、アガリクスタケ、タモギタケ、ヤマブシタケ、アラビノキシラン、サメ軟骨およびサメ抽出脂質であり（表1）、いずれも協和発酵工業株式会社（東京）より供与された。供試物質は、10日分の供試物質と粉末マウス飼料（CE-2、日本クレア(株)、東京）をビニール袋内で20回攪拌して密封し、冷暗所内で保存した。

試験群では、1日の規定量の供試物質と粉末マウス飼料（6.7g/1匹/1日）とを混和した試験飼料を、対照群では同量の粉末マウス飼料のみを給餌皿にのせて自由給餌した。

3. 実験方法

1) 実験1：アガリクスタケ、タモギタケ、ヤマブシタケまたはアラビノキシランの給餌効果

供試マウスは、対照群6匹および各試験群6匹の計30匹を用いた。試験期間中は、試験群には約335mg/匹/日の供試物質を混和した試験飼料を自由給餌とした。

2) 実験2：サメ軟骨またはサメ抽出脂質の給餌効果

供試マウスは、対照群10匹および各試験群マウス10匹の計30匹を用いた。試験期間中は、サメ軟骨投与群は約335mg/匹/日、サメ抽出脂質投与群は約30mg/匹/日の供試物質を混和した試験飼料を自由給餌とした。

3) 実験3：サメ抽出脂質の給餌効果

供試マウスは対照群6匹および試験群マウス7匹の計13匹であった。試験期間中は、サメ抽出脂質投与群は約30mg/匹/日の供試物質を混和した試験飼料を自由給餌とした。

各実験とも、給餌試験開始後21日目に、腫瘍細胞 1.0×10^6 個/匹をマウス背部皮下に接種し、実験1では試験開始後42日間、実験2および3では試験開始後49日間、体重および移植腫瘍体積を計測した。その後マウスを安楽殺し、病理組織学的検索のために肺および移植腫瘍を採材した。

4. 腫瘍体積測定法

腫瘍移植後2～3日毎に移植腫瘍体積の推移を記録した。計測は、最大径（Lmm）、直行する短径（Wmm）および高さ（Hmm）をノギスで計測し、以下の計算式^[7]から算出した。

$$\text{移植腫瘍体積}(\text{mm}^3) = W \times L \times H \times \pi / 6$$

5. 肺転移腫瘍面積の評価法

ヘマトキシリンエオジン染色標本による肺組織切片の中から、任意の切片3枚を抽出した。これらについて、画像解析ソフト（Scion Image, Scion Co., Frederick, Maryland, USA）を用いて肺組織全体と肺転移腫瘍との面積を算出した。算出された面積から、肺組織における肺転移腫瘍面積の割合を、以下の計算式を用いて算出した。

$$\text{肺転移腫瘍面積の割合}(\%) = (\text{肺転移腫瘍の合計面積}(\text{mm}^2)) / (\text{肺組織全体の合計面積}(\text{mm}^2)) \times 100$$

6. 腫瘍内の血管数の評価法

腫瘍内の毛細血管数を計測するため、血管内皮細胞の抗第Ⅷ因子抗体（ダコ・ジャパン、京都）を用いた免疫組織学的染色標本において、100倍の視野で非壊死領域における腫瘍細胞が観察可能な部位を無作為に選択した。同視野をさらに400倍の視野で無作為に10か所を選択して血管数の総数を集計した。同様の操作を腫瘍の部位を変えて3回行い、その平均値を腫瘍単位面積当たり

表1 供試物質と製造方法

供試物質名	製 造 方 法
アガリクスタケ	アガリクスの子実体を約60℃で熱風乾燥した粉砕末
タモギタケ	タモギタケの子実体を約60℃で熱風乾燥した粉砕末
ヤマブシタケ	ヤマブシタケの子実体を凍結乾燥した粉砕末
アラビノキシラン	非遺伝子組み換えトウモロコシの種皮をアルカリ抽出してヘミセルロース溶液で抽出後、精製乾燥した粉砕末
サメ軟骨	ヨシキリサメの軟骨をミンチし、凍結乾燥した超微粉砕末
サメ抽出脂質	ヨシキリサメの肉を凍結乾燥し、粉砕して100%エタノール抽出後、β-サイクロデキストリンに包接した粉末。 リピット15%、β-サイクロデキストリン85%

の血管数として算出した。

7. 統計学的解析法

実験1および実験2では、分散分析の後に多重比較として Tukey-kramer 検定を行った。実験3では、分散分析を行い対応のない t 検定を行った。

各々の検定において $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. 実験1：アガリクスタケ、タモギタケ、ヤマブシタケおよびアラビノキシラン給餌群における移植腫瘍体積の推移 (図1)

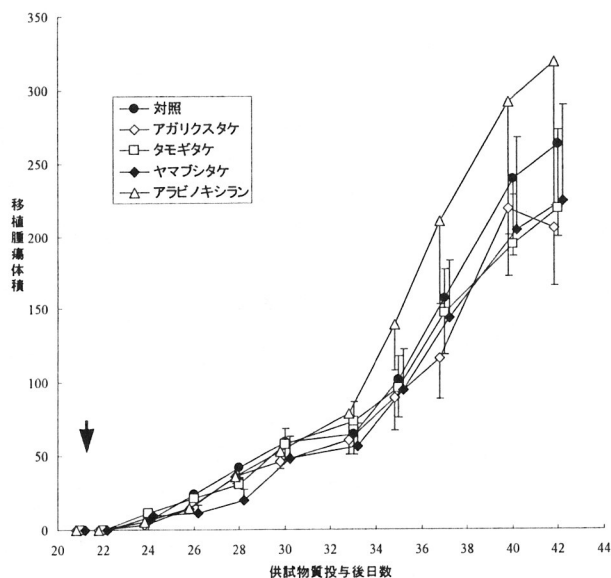


図1 供試物質投与後のマウス移植腫瘍の体積の推移

- ↓：供試物質投与開始後21日目に腫瘍細胞 (1.0×10^6 個/匹) を移植した。
- 移植腫瘍体積の計測は、腫瘍移植後2～3日毎に行った。
- 平均値±標準誤差 (n = 6)。

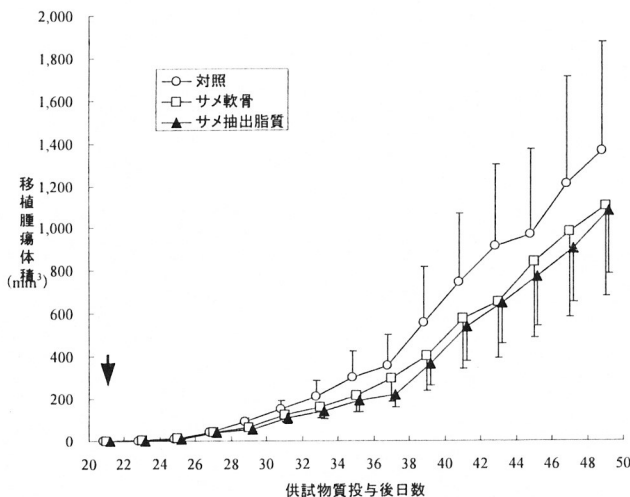


図2 供試物質投与後のマウス移植腫瘍の体積の推移

- 平均値±標準誤差 (n = 10)。

対照群と供試物質投与の4群との間で、移植腫瘍体積の推移にそれぞれ有意差は認められなかった。

2. 実験2：サメ軟骨およびサメ抽出脂質給餌群における移植腫瘍体積の推移および肺転移腫瘍面積の割合

1) 移植腫瘍体積の推移 (図2)

対照群に比べてサメ軟骨およびサメ抽出脂質投与群で移植腫瘍体積が小さい傾向が認められたが、3群間に有意差は認められなかった。

2) 肺転移腫瘍面積の割合 (表2)

対照群に比べてサメ軟骨およびサメ抽出脂質投与群で転移腫瘍面積の割合が少ない傾向が認められたが、3群間に有意差は認められなかった。

肺の組織学的所見では、対照群の全てのマウスで明確な転移腫瘍が観察された。一方、サメ軟骨投与群では、転移腫瘍が観察されないマウスが2匹、サメ抽出脂質投与群では3匹存在した。

3. 実験3：サメ抽出脂質給餌群における効果

1) 移植腫瘍体積の推移 (図3)

対照群に比べてサメ抽出脂質投与群では、移植腫瘍体積が小さい傾向が認められたが、有意差は認められ

表2 実験2における肺転移腫瘍面積の割合

肺転移腫瘍面積の割合 (%)	
対 照	34.9±5.5
サ メ 軟 骨	31.6±7.8
サ メ 抽 出 脂 質	30.3±7.6

- 画像解析ソフトを用いて肺組織における肺転移腫瘍面積の割合を算出した。
- 肺転移腫瘍面積の割合 (%) = (肺転移腫瘍の合計面積 (mm²)) / (肺組織全体の合計面積 (mm²)) × 100。
- 平均値±標準誤差 (n = 10)。

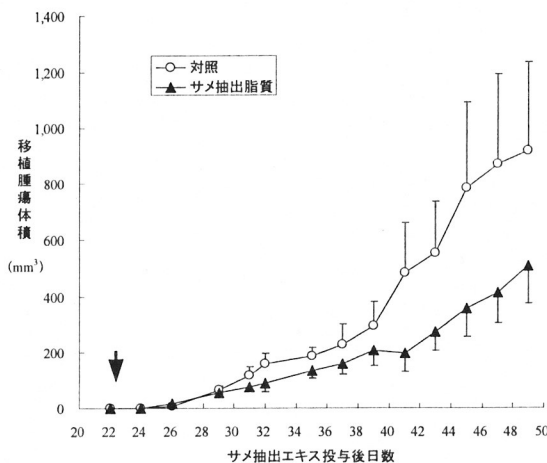


図3 サメ抽出脂質投与後のマウス移植腫瘍の体積の推移

- 平均値±標準誤差 (対照; n = 6, サメ抽出脂質; n = 7)。

なかった。

2) 肺転移腫瘍面積の割合 (表 3)

対照群と比べてサメ抽出脂質投与群では、転移腫瘍面積の割合が少ない傾向が認められたが、有意差は認められなかった。

肺の組織学的所見は、対照群では肺転移腫瘍がほとんどみられないマウスが 1 匹、サメ抽出脂質投与群では肺転移腫瘍が観察されないマウスが 2 匹存在した。

3) 移植腫瘍内血管数 (表 4)

対照群と比べてサメ抽出脂質投与群では血管数が少なく、両群間に有意差が認められた。

考 察

実験 1 では、対照群の 2 匹のマウスで一端成長した腫瘍が消失したため、対照群の移植腫瘍の平均値が低くなり、対照群の移植腫瘍の成長が結果的に抑制された (図 1)。また、アラビノキシラン投与群では移植腫瘍体積および移植腫瘍重量が他の群より明らかに大きい傾向がみられた。これは、アラビノキシラン投与群の 1 匹のマウスの移植腫瘍が異常に増大したことによると思われるが、その理由は不明である。この結果、アガリクスタケ、タモギタケおよびヤマブシタケ投与群では、移植腫瘍の成長が促進されたとは判断できなかった。

実験 2 では、対照群に比べてサメ軟骨およびサメ抽出脂質投与群では、移植腫瘍の成長に抑制傾向がみられた。実験 3 においては、サメ抽出脂質が、実験 2 よりも明瞭に移植腫瘍および転移腫瘍の成長抑制効果の傾向が強いことが示された。これらの結果は、サメ軟骨およびサメ抽出脂質が血管新生抑制作用を有するためと考えられ

る^[2,5]。その結果として、移植腫瘍および肺転移腫瘍は対照群と比べてサメ軟骨とサメ抽出脂質投与群で腫瘍の成長抑制傾向がみられた (図 2・3、表 2・3) と考えられる。移植腫瘍内の血管数は、対照群に比べてサメ抽出脂質投与群では、有意に少ないことが示された (表 4)。その結果として、サメ抽出脂質投与群では、対照群よりも移植腫瘍および肺転移腫瘍の成長が抑制される傾向 (図 3、表 2・3) がみられたのではないかと考えられる。

また、腫瘍細胞が非常に少ない段階では、サメ軟骨およびサメ抽出脂質がその成長を抑制する可能性が考えられる。これは、実験 3 での肺転移腫瘍の組織学的所見から評価することができた。これらは、サメ軟骨あるいはサメ抽出脂質による血管新生抑制効果あるいは免疫賦活化作用^[4]のため、移植腫瘍および転移腫瘍の初期段階での成長が抑制されたものと考えられる。また、サメ成分給餌マウスでは肺転移したマウスが少ない傾向がみられた。さらに、移植腫瘍での血管新生抑制効果のため、移植腫瘍から血管へ侵入して肺へ遊走する腫瘍細胞の数が対照群と比較して供試物質投与群では少ないと考えられる。この作用は、サメ抽出脂質の方がサメ軟骨より強いものと推察される。

本研究では、供試物質が機能性を有するとはいえ食品であり、薬効を有する薬品には位置づけられておらず、作用発現が弱くて非速効性であるということと、一方で供試腫瘍細胞が悪性度の強い細胞株^[1]であるという、相対立する要因のため、統計学的に明瞭な腫瘍成長抑制効果を示すことができなかったと思われる。特に、実験 1 で試験した茸などの有効性を検討する上で、供試腫瘍の悪性度から考えてこの実験系の適性を考慮する必要があったかもしれない。すなわち、LM8 Dunn 骨肉腫細胞と C3H/HeN マウスは同系移植 (isograft) の関係にあり、茸類の腫瘍抑制効果の本態といわれる免疫効果が発揮されなかった可能性がある。

この相対する要因への対策として、本実験では供試物質の投与量を給餌飼料重量の 5% と増やし、さらに投与期間を延長させた。投与量については、機能性食品は投与濃度に依存して移植腫瘍の成長抑制効果が強くなるといわれている^[9,12]。一方、供試飼料中の 30% に機能性食品を混和しても、副作用等みられないとする報告がある^[10]。さらに、本実験は自由給餌であったため、供試物質の 1 日あたりの必要量より多い量を、給餌飼料に混和しておく必要があった。今回の自由給餌方法では投与資料は毎日全て摂取されたが、個々のマウスの摂取量に

表 3 実験 3 における肺転移腫瘍面積の割合

		肺転移腫瘍面積の割合 (%)
対	照	32.2 ± 12.3
サ	メ 抽 出 脂 質	17.3 ± 4.5

• 平均値 ± 標準誤差 (対照; n = 6、サメ抽出脂質; n = 7)。

表 4 実験 3 における移植腫瘍組織内血管数

		移植腫瘍組織内血管数 (個)
対	照	87.5 ± 4.4
サ	メ 抽 出 脂 質	55.4 ± 8.6 *

• 血管内皮細胞の抗第Ⅳ因子抗体を用いた免疫組織学的標本を観察した。
 • 100倍の視野で非壊死領域における腫瘍細胞が観察できる部位を無作為に選択し、同視野をさらに400倍の視野で無作為に10か所選択して血管数の総数を集計した。
 • 同様の操作を3回行いその平均値を算出した。
 • 平均値 ± 標準誤差 (対照; n = 6、サメ抽出脂質; n = 7)。
 • $p < 0.05$ で有意差あり (* : $p < 0.05$)。

については不明である。しかし、結果には示さなかったが、計測体重の推移から考えて、それぞれのマウスの飼料摂取量に特に差があったとは考えられなかった。投与期間については、腫瘍移植前から機能性食品の給餌を開始する方が、移植腫瘍の成長抑制効果が強いことが示されている^[11]。このような観点から、供試物質を混和した飼料を腫瘍細胞接種の3週間前から給餌した。しかし、これらの効果は明確ではなかった。

本研究の結論として、供試腫瘍細胞の悪性度が強いにもかかわらず、サメ抽出脂質には移植腫瘍および肺転移腫瘍の成長抑制傾向がみられ、さらに血管新生抑制効果がみられた。これらの所見を総合判断すると、サメ抽出脂質は機能性食品としての有効性があるものと判断された。

引用文献

- [1] Asai T, Ueda T, Itoh K, Yoshioka K, Aoki Y, Mori S, Yoshikawa H : *Int. J Cancer*, 76, 418-422 (1998)
- [2] Davis FP : 私信 (2003)
- [3] Ernst E, Cassileth BR: *Eur J Cancer*, 35, 1608-1613 (1999)
- [4] Feyzi R, Hassan ZM, Mostafaie A : *Int Immunopharmacol*, 3, 921-926 (2003)
- [5] Gonzalez RP, Leyva A, Moraes MO: *Pharm Bull*, 24, 1097-1101 (2001)
- [6] 廉澤 剛, 奥村正裕, 島田健次郎, 藤永 徹: *小動物臨床*, 120, 101-109 (2001)
- [7] Horsman MR, Alsner J, Overgaard J : *Acta Oncol*, 37, 441-445 (1998)
- [8] Hyodo I, Eguchi K, Nishina T, Endo H, Tanimizu M, Mikami I, Takashima A, Imanishi J : *Cancer*, 97, 2861-2868 (2003)
- [9] Ito H, Shimura K, Itoh H, Kawade M : *Anticancer Res*, 17, 277-284 (1997)
- [10] Matsumoto K, Ito M, Yagyū S, Ogino H, Hirono I : *Cancer Lett*, 58, 87-90 (1991)
- [11] Oshiman K, Fujimiya Y, Ebina T, Suzuki I, Noji M : *Planta Med*, 68, 610-614 (2002)
- [12] Takaku T, Kimura Y, Okuda H : *J Nutr*, 131, 1409-1413 (2001)