

エゾシカ幼角抽出エキスが抗腫瘍活性に及ぼす影響

辻井弘忠・末成美奈子

信州大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

要 約

エゾシカ幼角抽出エキスが *in vitro* において癌細胞増殖抑制効果を示すことを、以前の研究で示した。本研究は、エゾシカ幼角抽出エキスが *in vitro* 及び *in vivo* において抗腫瘍活性に及ぼす影響を調べることを目的として以下の実験を行った。

実験1：化学発癌剤 (*N*-Nitrosodimethylamine) で悪性化させた正常マウス胎児細胞に、エゾシカ幼角抽出エキス10 μ g/mlを添加することで、マウス胎児細胞の細胞増殖を阻害することなく、エゾシカ幼角抽出エキスが化学発癌剤による発癌抑制効果を示すことが判明した。

実験2：肉腫細胞の移植によって癌化させたマウスに、エゾシカ幼角抽出エキスを発癌後8日間経口投与することで、エゾシカ幼角抽出エキスが、肉腫形成や臓器肥大化に対して抗腫瘍活性を示すことが判明し、発癌に対する治療効果がみられた。

また、エゾシカ幼角抽出エキスを癌移植前8日間経口投与することでも同様の抗腫瘍活性を示したことから、エゾシカ幼角抽出エキスには発癌に対する予防効果もみられた。

これらのことから、エゾシカ幼角抽出エキスは *in vitro* と *in vivo* の両方において抗腫瘍活性を示した。これらのことから、発癌に対して治療効果と予防効果の両方を有していることがわかった。

キーワード：ニホンジカ、エゾシカ、抗腫瘍活性、幼角、鹿茸

緒 論

ニホンジカ (*Cervus nippon*) の一種である中国の梅花鹿 (*Cervus nippon mantchuricus* Swinhoe) の幼角は漢方薬として薬事法で鹿茸 (*Cornu Cervi Parvum*) として古くから強壯、保健薬として常用されている¹⁾。鹿茸は、角化していない幼角を採取し、2~3時間水で煮沸し、茸内の血液を洗い出した後、風乾室内で約30日間乾燥させたものである²⁾。

鹿茸の70%アルコールによる抽出エキスから製剤が開発され、パントクリ、鹿茸精、ローギオン等と呼ばれ、心臓機能の回復や腎機能の促進、消化器系の機能促進、筋肉の疲労回復などに効果を有し、多数の作用が臨床医薬として利用されている。しかし、同じニホンジカに属し、日本国内に生息するエゾシカやホンシュウジカの幼角は鹿茸として薬事法で認められていないのが現状である。

一方、国内では尾瀬を筆頭にシカの食害が問題としてあげられており、森林環境を守る上でもこれら

エゾシカやホンシュウジカの新たな活用方法の開発が必要とされている。そこで本研究では、新たな国内の鹿の副産物の利用拡大を目的とし、エゾシカの幼角を用いて抗腫瘍活性を検討した。

筆者ら³⁾は、エゾシカ幼角抽出エキスが、*in vitro* における癌細胞増殖抑制効果を有していることを報告した。継代培養している子宮頸癌由来 HeLa cells にエゾシカ幼角抽出エキスを添加して培養したところ、癌細胞増殖抑制効果がみられ、その効果はシカ幼角の下部から上部に向かって増大することも明らかにした。

本実験では、*in vitro* における癌細胞増殖抑制効果の結果をもとに、マウス胎児細胞を用いた *in vitro* における発癌抑制効果と、マウスを用いた *in vivo* における抗腫瘍活性について調べるために、以下の実験を行った。

実験1：エゾシカ幼角抽出エキスのマウス胎児細胞に対する発癌抑制効果の検討

実験2：エゾシカ幼角抽出エキスのマウスに対する抗腫瘍活性の検討

受領日 2005年1月31日

採択日 2005年2月14日

材料及び方法

1, 鹿幼角エキスの作製

鹿幼角はカルタン株式会社より提供されたニホンジカ的一种であるエゾシカ幼角と鹿茸(中国梅花鹿幼角)を用いた。エキスの作製法は木島ら⁴⁾の方法に従い、鹿幼角を細切後、乾燥重量10gを70%アルコール100mlで室温24時間、3回浸出した。その後、ロータリーエバポレータ(ヤマト科学株式会社)を用いて40°Cで減圧濃縮を行い、真空凍結乾燥後(Refrigeration For Science. Inc.), エキスとした。

2, 供試動物

実験に用いたマウスは、当研究室で系統飼育しているICRマウス(日本エスエルシー株式会社)を使用した。これらの動物の飼育管理および取り扱いについては信州大学農学部動物実験ガイドラインに従って行った。飼育条件は室温20±1°C, 明期12時間, 暗期12時間(点灯06:00, 消灯18:00)の光条件下で飼育し、市販の固形飼料(ラボMRブリーダー; 日本農産工業)と水は不断給餌で飼育した。マウスは生後約20日で離乳し雌雄を分け、8~10週齢の未経産のものを実験に供した。

3, マウス胎児細胞の初代培養法

マウス胎児細胞の初代培養はBerwaldらの方法等⁵⁾を参考にして行った。妊娠10日目の雌マウスから胎児を子宮から無菌的に摘出し、細切した。10%FBSを添加したmedium 199を添加し、1200rpm, 5minの遠心を3回繰り返し洗浄した。その後、胎児細胞を4well multidish (Nalge Nunc International K.K.)に播種し、37°C, 5%CO₂条件下で培養を行った。培養液の交換は2回/週行った。

1回の実験には、同腹から摘出した胎児を用い、コンタミネーションを防ぐために、各胎児細胞ごとに培養を行った。また、実験には培養4日目までに完全に接着し、コンフルエントになった細胞のみを正常細胞として用いた。

4, マウス胎児細胞の悪性化

細胞の悪性化は黒木らの方法等⁶⁾を参考にして行った。培養しているマウス胎児細胞に、ニトロソ化合物系化学発癌剤である*N*-Nitrosodimethylamine (nacalai tesque co. ltd)を添加し悪性化(transformation)した。

細胞の悪性化は、セルシートの崩壊や、配列の乱れ、細胞死、細胞の重なり合いによる飽和密度の増加によって判断した。

5, マウス胎児細胞を用いた発癌抑制効果の算出

培養したマウス胎児細胞に*N*-Nitrosodimethylamineを添加し、悪性化を行うのと同時に、エゾシカ幼角抽出エキスを添加した培養液を添加して培養を行った。コントロール群には培養液のみを添加した。培養4日目にマウス胎児細胞を、浮遊死滅細胞を除去後、PBSで洗浄し、2%EDTAを含むtrypsinで生存接着細胞を浮遊させ、1500rpm, 5min遠心後、生存細胞数を血球計算盤で計測し、発癌抑制効果を算出した。

6, マウスの癌化

マウスの癌化はマウス固形肉腫細胞であるsarcoma 180(大日本製薬株式会社)を用いて行った。

10%FBSを添加したMEM-E(Minimum Essential Medium-Earle; GIBCO)を用いて、Sarcoma 180を37°C, 5%CO₂条件下で培養を行った。培養しているsarcoma 180をマウス1匹につき1×10⁶cellsになるようにPBS 0.1mlに懸濁して浮遊させ、21Gの注射針を用いてマウス腹腔内に投与した。

実験には、6週齢の雌マウス20匹を用い、マウスの癌化は体重増加や腹部の膨張、肉腫の有無等により判断した。

7, マウスを用いた抗腫瘍活性の算出

sarcoma 180を投与し癌化させたマウスに、蒸留水0.2mlに懸濁したエゾシカ幼角抽出エキスを胃ゾンデを用いて強制経口投与を行った。

エゾシカ幼角抽出エキスの投与は庄治ら⁷⁾の方法に従い、500mg/kgを1日1回、投与期間中毎日行った。コントロール群には溶媒の蒸留水のみを与えた。Sarcoma 180移植8日目頃から腹部の腫れや脱毛等の症状が見られたので、移植8日目を発症日とした。

Sarcoma 180投与後16日目に、マウスから心臓・肺・肝臓・腎臓・卵巣・子宮を摘出し、臓器重量を計測した。また、マウス体内に形成された肉腫を摘出し個数と重量、そして体積をノギス(mitutoyo)により計測し、抗腫瘍活性を算出した。

8, 統計分析

データは平均±標準誤差で表した。統計分析はFisher's PLSDを用いて行い、P<0.05で有意差とした。

実験は以下の2つを行った。

実験1: エゾシカ幼角抽出エキスのマウス胎児細胞に対する発癌抑制効果の検討

in vitro 培養のマウス胎児細胞に、化学発癌剤と鹿幼角抽出エキスを添加し、鹿幼角抽出エキスのマ

ウス胎児細胞に対する発癌抑制効果を検討した。

① エゾシカ幼角抽出エキスの正常マウス胎児細胞に対する効果の検討

正常マウス胎児細胞にエゾシカ幼角抽出エキスを各々 0, 10, 100, 1000 μ g/ml添加して培養を行い、添加4日目に生存細胞数を調べた。

② 正常マウス胎児細胞の化学発癌剤による悪性化の検討

正常マウス胎児細胞に *N*-Nitrosodimethylamine を各々 0, 100, 1000 μ g/ml添加して培養を行い、添加4日目に生存細胞数の計測および細胞の顕微鏡観察を行った。

③ エゾシカ幼角抽出エキスの正常マウス胎児細胞に対する発癌抑制効果の検討

マウス胎児細胞に化学発癌剤である *N*-Nitrosodimethylamine 100 μ g/mlを添加して悪性化し、さらにエゾシカ幼角抽出エキスを各々 0, 10, 100, 1000, 10000 μ g/ml添加して培養を行い、添加4日目に生存細胞数を調べた。

実験2：エゾシカ幼角抽出エキスのマウスに対する抗腫瘍活性の検討

癌化させたマウスに鹿幼角抽出エキスを強制経口投与し、臓器重量や肉腫の変化を測定することで、鹿幼角抽出エキスのマウスに対する抗腫瘍活性を検討した。

① マウスの固形肉腫細胞による癌化の検討

6週齢の雌マウスに 1×10^6 cells の sarcoma 180 を移植し、移植16日目に臓器重量および肉腫の形成を調べた。

② エゾシカ幼角抽出エキスによる癌化マウスの臓器肥大化抑制効果の検討

癌化マウスにエゾシカ幼角抽出エキスを各々癌移植前8日間、癌移植後8日目から8日間強制経口投与を行った。癌移植後16日目に臓器重量を調べた。

③ エゾシカ幼角抽出エキスの癌化マウスの肉腫に対する抗腫瘍活性の効果の検討

癌化マウスにエゾシカ幼角抽出エキスを各々癌移植前8日間、癌移植後8日目から8日間強制経口投与を行った。癌移植後16日目に形成された肉腫の個数及び重量を調べた。

結 果

実験1：エゾシカ幼角抽出エキスのマウス胎児細胞に対する発癌抑制効果

エゾシカ幼角抽出エキスの正常マウス胎児細胞に対する発癌抑制効果を図1と図2に示した。

コントロールのエキス無添加区では、培養4日目の生存細胞数が 98.3×10^4 cells/mlであったのに対し、10 μ g/mlのエゾシカ幼角抽出エキス添加区では 82.7×10^4 cells/mlと有意な差はみられず、正常マウス胎児細胞の細胞増殖を阻害しなかった。

また、エゾシカ幼角抽出エキス100 μ g/ml添加区では 69.0×10^4 cells/ml、また1000 μ g/ml添加区では

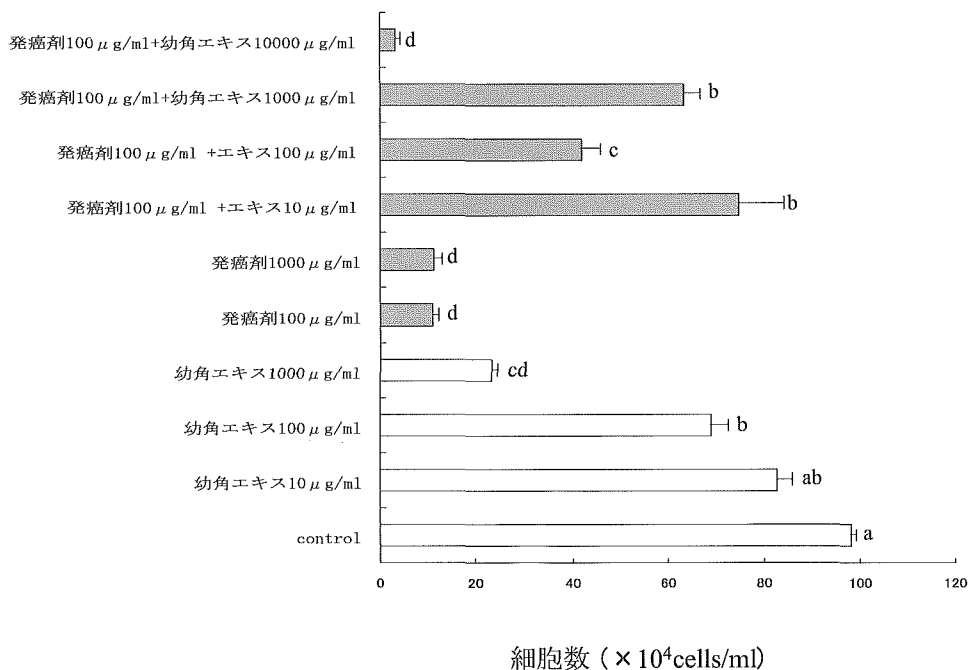
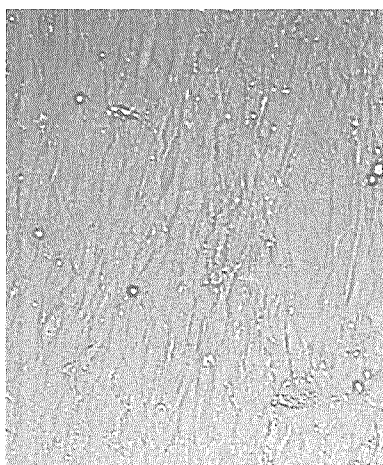
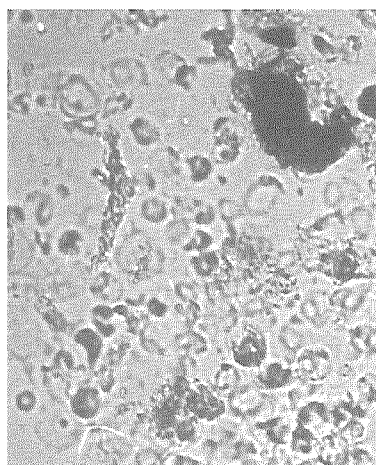


図1 エゾシカ幼角抽出エキスのマウス胎児細胞に対する発癌抑制効果

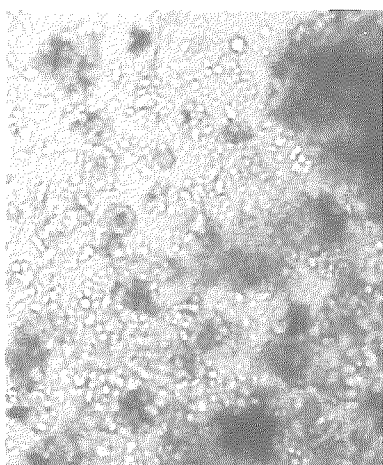
異符号間で有意差あり M \pm SE (P < 0.05)



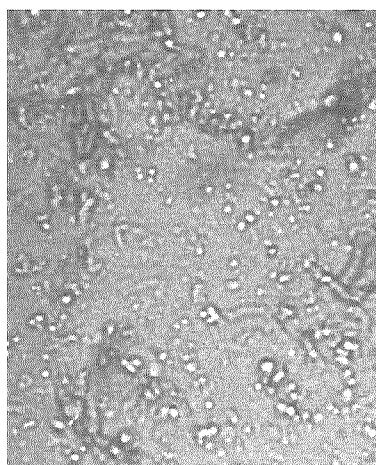
i 正常マウス胎児細胞



ii 発癌剤により悪性化し配列の乱れた細胞



iii 発癌剤により悪性化し細胞の重層化がみられる細胞



iv エキス添加により悪性化が抑制された細胞

図2 エゾシカ幼角抽出エキスの正常マウス胎児細胞に対する発癌抑制効果

23.3×10⁴cells/mlとなり、100, 1000μg/mlエキス添加区における生存細胞数は、エキス無添加区に比べ有意な減少 (P<0.05) がみられ、100, 1000 μg/mlエキス添加では正常マウス胎児細胞の細胞増殖を阻害した。

正常マウス胎児細胞の化学発癌剤による悪性化は、コントロールの発癌剤無添加区の生存細胞数98.3×10⁴cells/mlと比較して、化学発癌剤である *N*-Nitrosodimethylamine 100μg/ml添加区では、11.0×10⁴cells/ml、また1000μg/ml添加区では11.3×10⁴cells/mlとなり、正常マウス胎児細胞数の有意な減少がみられた (P<0.05)。さらに、顕微鏡観察においても細胞の配列の乱れや細胞の重層化など細胞の悪性化が観察された。これらのことから、正常マウス胎児細胞の悪性化には、*N*-Nitrosodimethylamine 100μg/ml添加が適している

と推察され、以後の実験に正常マウス胎児細胞の発癌剤として、*N*-Nitrosodimethylamine 100μg/mlを用いた。

エゾシカ幼角抽出エキスの正常マウス胎児細胞に対する発癌抑制効果は、コントロールの非癌化細胞、つまり発癌剤およびエキス無添加区では、悪性化したエキス無添加区が、11.0×10⁴cells/mlであったのに対し、悪性化したマウス胎児細胞にエゾシカ幼角抽出エキスを添加し培養を行った場合、エキス100 μg/ml添加区では42.0×10⁴cells/mlとなり、生存マウス胎児細胞数の有意な増加がみられた (P<0.05)。また、エキス10μg/ml添加区では74.7×10⁴ cells/ml、エキス1000μg/ml添加区では63.3×10⁴ cells/mlと、100μg/ml添加区よりもさらに大きな悪性化抑制効果がみられた。

実験1より、エゾシカ幼角抽出エキスは、10μg/

ml添加によって、正常マウス胎児細胞の増殖阻害をすることなく、生存細胞数の減少を抑制し悪性を防ぐ効果がみられた。

実験2：エゾシカ幼角抽出エキスのマウスに対する抗腫瘍活性の検討

エゾシカ幼角抽出エキスのマウスに対する抗腫瘍活性を図3と図4、表1に示した。固形肉腫細胞である sarcoma 180を移植後8日目頃から腹部の膨張や脱毛などが観察されたため、移植8日目を癌発症日とした。さらに、移植16日目までには腹部やリンパにおける肉腫も観察された。しかし、sarcoma 180移植0～16日目までのマウス体重変化に差はみられなかった。

sarcoma 180移植後16日目のマウス臓器重量の比体重値は、肝臓で0.95、肺で0.44、腎臓で0.19と、非移植マウスと比較して臓器重量の比体重値は有意に増加した ($P < 0.05$)。しかし、心臓、卵巣、子宮において臓器重量の有意な増加はみられなかった。

また、sarcoma 180移植後16日目のマウス体内には14.67個の肉腫が形成された。肉腫総重量では、非移植マウスと比較して2.53と有意な増加がみられた ($P < 0.05$)。

これらのことから、 1×10^6 cellsの sarcoma 180をマウス腹腔内に投与することでマウスは癌化し、腹部の膨張や肝臓、肺、腎臓の臓器の肥大、肉腫の形成が起こることが推察された。これらの結果から以後の実験では 1×10^6 cellsの sarcoma 180をマウスの癌化に用いることにした。

エゾシカ幼角抽出エキスによる癌化マウスの臓器肥大抑制効果は、マウス固形肉腫細胞である Sarcoma 180の移植によって癌化したマウスにエゾシカ幼角抽出エキスを経口投与し、移植後16日目のマウスの臓器重量の比体重値を、癌化した幼角エキス非投与マウスの臓器重量の比体重値と比較した。

癌発症後8日間幼角エキス投与を行ったマウスの臓器重量において、肝臓では、幼角エキス非投与群



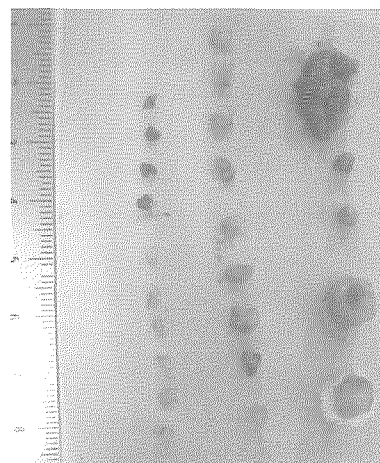
i 腹部の腫瘍



ii 皮下にできた腫瘍

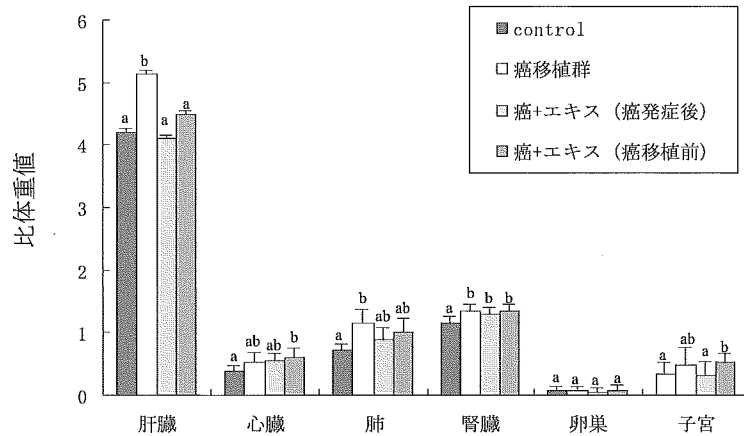


iii 肝臓にできた腫瘍



iv マウス1個体から採取した腫瘍

図3 マウスの固形肉腫細胞による肉腫の形成



各臓器毎に control と比較した。

異符号間で有意差あり $M \pm SE$ ($P < 0.05$)

図4 エゾシカ幼角抽出エキスによる癌化マウスの臓器肥大化抑制効果

表1 エゾシカ幼角抽出エキスの癌化マウスの肉腫に対する抗腫瘍活性

	肉腫個数 (個)	肉腫重量 (比体重値)
癌非移植群	0.00 ± 0.00^a	0.00 ± 0.00^A
エキス非投与群	14.67 ± 6.57^b	2.53 ± 1.10^B
癌移植前 8 日間 エキス投与群	6.67 ± 1.76^{ab}	0.48 ± 0.23^A
癌発症後 8 日間 エキス投与群	0.33 ± 0.33^a	0.07 ± 0.07^A

異符号間で有意差あり $M \pm SE$ ($P < 0.05$)

が5.14であるのに対し、幼角エキス投与群は4.11と有意に減少した ($P < 0.05$)。また、幼角エキス投与群は、癌非移植群4.19と肝重量は同等であった。このことから sarcoma 180による肝臓の肥大化を幼角エキスが抑制した。

また、肺では幼角エキス非投与群が1.15であるのに対し、幼角エキス投与群では0.90と減少し、幼角エキスの臓器肥大化抑制傾向がみられた。

腎臓では、幼角エキス投与における有意な臓器肥大化抑制効果はみられなかった。

また、癌移植前 8 日間幼角エキス投与を行ったマウスでは、肝臓は幼角エキス非投与群が5.14であるのに対し、幼角エキス投与群は4.48と有意に減少した ($P < 0.05$)。また、幼角エキス投与群は、癌非移植群4.19と肝重量は同等であった。このことから sarcoma 180による肝臓の肥大化を幼角エキスが抑制した。

また、肺では幼角エキス非投与群が1.15であるのに対し、幼角エキス投与群では1.02と減少しており、

幼角エキスの臓器肥大化抑制傾向がみられた。

腎臓では、幼角エキス投与における有意な臓器肥大化抑制効果はみられなかった。

これらのことから、エゾシカ幼角抽出エキスは癌発症のどの時期に投与しても sarcoma 180によるマウス臓器の肥大化抑制効果を有することがわかった。特に、肝臓において肥大化は癌非移植群と同程度まで完全に抑制された。

さらに、癌移植後16日目にエゾシカ幼角抽出エキスの癌化マウスの肉腫に対する抗腫瘍活性について、癌発症後 8 日間幼角エキス投与後の形成肉腫個数を比較してみると、幼角エキス非投与群では14.67個であるのに対し、幼角エキス投与群では0.33個と有意に減少し ($P < 0.05$)、癌非移植群と同程度まで肉腫の形成を抑制した。

形成された肉腫の総重量の比体重値による比較では、幼角エキス非投与群が2.53であるのに対し、幼角エキス投与群では0.07と有意に減少しており ($P < 0.05$)、癌非移植群と同程度まで肉腫の形成を抑制した。

また、癌移植前 8 日間幼角エキス投与後の形成肉腫個数を比較してみると、幼角エキス非投与群では14.67個に対し、幼角エキス投与群では6.67個と形成肉腫個数が減少し、肉腫形成抑制効果がみられた。

形成された肉腫の総重量の比体重値による比較では、幼角エキス非投与群が2.53であるのに対し、幼角エキス投与群では0.48と有意に形成肉腫重量が減少しており ($P < 0.05$)、癌非移植群と同程度まで肉腫形成を抑制した。

これらのことから、エゾシカ幼角抽出エキスは、sarcoma 180によるマウス肉腫への抗腫瘍活性効果

がみられた。また、エゾシカ幼角抽出エキスの投与時期は癌発症後だけでなく、癌移植前の投与においても肉腫形成抑制効果があった。

実験2より、エゾシカ幼角抽出エキスは、マウス固形肉腫細胞であるSarcoma 180の移植によって癌化したマウスにおいて、肝臓、肺、そして腎臓では癌による臓器肥大化を抑制する治療効果があり、また肝臓と肺においては、癌による臓器肥大化を阻害する予防効果があった。

さらに、エゾシカ幼角抽出エキスは、癌移植によってマウス体内に形成される肉腫に対し、治療薬と予防薬の両方の効果がみられた。

考 察

実験1において、エゾシカ幼角抽出エキスのマウス正常細胞に対する影響から、エゾシカ幼角抽出エキスの *in vitro* における正常細胞への安全性を評価した。その結果、エゾシカ幼角抽出エキス10 μ g/ml添加では、正常細胞の増殖を阻害せず、細胞の形態観察からも悪影響はみられなかった。しかし、エキス濃度が100 μ g/ml、1000 μ g/mlと増加するにつれ、正常細胞のエキス濃度依存的に細胞増殖の阻害がみられた。このことから、エゾシカ幼角抽出エキスの過剰投与による副作用はみられるが、低濃度の添加であれば安全であると思われる。

また、正常マウス胎児細胞の癌化にはN-ニトロソ化合物であるN-Nitrosodimethylamine (DMN)を用いた。N-ニトロソ化合物はヒトの生活環境中に多量ではないが広範囲に存在し、環境中で比較的容易に生成される。そして魚類からヒトに至るまで広い動物種に対して癌原性を示し、中でも胎児は母体に比べ著しく感受性が高いことから化学発癌剤として注目されている^{8,9)}。また、N-ニトロソ化合物は臓器特異的に発癌させる特徴を有しており、DMNはマウス臓器に対して肝臓、肺、腎臓に、臓器特異的に作用することが知られている¹⁰⁾。本実験では臓器発育前のマウス胎児細胞に対してDMNを用いたため、臓器特異性はみられなかったが、*in vitro* における発癌の指標となる細胞の悪性化(悪性形質転換:malignant transformation)の特徴が観察された。一般的に組織培養における悪性化の主

な指標としては、①接触阻止(contact inhibition)の喪失:細胞が不規則に配列し、方向性を示さない(criss-cross)状態。②飽和密度の増加:栄養要求や膜の変化によって細胞が重なり合い(piling up)、飽和密度が増加する状態。③増殖性の変化:life spanの延長、等があげられる。これらの特徴のうち、接触阻止の喪失は悪性化の前段階から現れ始め、その後、悪性化したことによる細胞の重なり合い等の飽和密度の増加が観察される。さらに、何代も継代培養を行うと無制限の増殖能を獲得した細胞が出現し始める。実験1において、マウス胎児細胞に対する発癌抑制効果の検討をみるため、短期間培養において接触阻止の喪失および飽和密度の増加が観察された細胞をもって悪性化と判断した。

エゾシカ幼角抽出エキスを、発癌剤とともに正常マウス胎児細胞に添加することで、マウス胎児細胞の悪性化を抑制することができたことから、エゾシカ幼角抽出エキスは *in vitro* における発癌を抑制する効果がみられた。DMNにおける発癌機構は、DMNが水酸化、脱アルキル化、加水分解等の活性化を受けカルボニウムイオン(CH₃⁺)となり、一分子的求核性置換反応(R⁺という中間体が生じ、この非電子中心とY⁻という求核中心が反応する機構。R⁺はカルボニウムイオン(R-CH₂) Yは塩基中のO、N、リン酸基、糖など。)によってDNAのグアニン塩基をメチル化し、7-メチルグアニンを作ると考えられている(図5)^{11,12)}。また、アルキルトランスフェラーゼやグリコシラーゼのようなアルキル化したDNAを修復する酵素の存在も知られている。エゾシカ幼角抽出エキスが、細胞レベルの発癌をどのような経路によって抑制しているのか、本実験から判断することはできないが、これらの経路に関係しているのかもしれないと推察した。

実験2において、マウスに固形肉腫として知られるsarcoma 180を移植し、*in vivo* におけるエゾシカ幼角抽出エキスの抗腫瘍活性を検討した。Sarcoma 180は腹水型、固形型の両方でマウス可植性腫瘍として広く用いられており、薬剤に感受性が高いといわれている。Sarcoma 180をマウス腹腔内へ移植することで、腹腔内やリンパ腺等における肉腫の形成がみられ、また肝臓、肺、腎臓において臓器

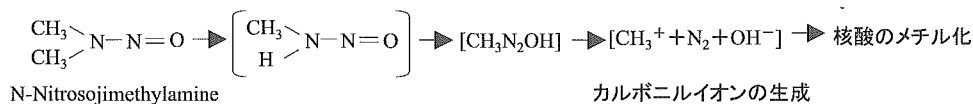


図5 N-Nitrosodimethylamine の代謝

肥大化がみられた。Enticknap¹³⁾は1000例の癌を分析し、局所のリンパ腺と肝臓と肺が転移が最も起こりやすい場所であることを報告している。この結果は本実験の結果と一致した。また、癌の疾患モデルにおける前癌変化として、肉眼的に正常と異なった黄白色の結節が観察される肝臓の結節性肥大や、肺の結節性肺胞上皮増殖や気管支上皮の乳頭状増殖、腎臓における異型細胞増殖巣等が知られている¹⁴⁾。これらのことも本実験の結果と一致した。また、癌が発症すると圧迫による重要な器官の働きの障害や、浸潤による全身の活動能力低下、貧血、衰弱、栄養不良、閉塞、感染等が起こり死亡する。実験に用いた sarcoma 180移植マウスにおいても、移植後約36日目で死亡したが、肉腫形成以外に浸潤等が観察された。

エゾシカ幼角抽出エキスのマウスへの投与は胃ゾンデによる強制経口投与によって行った。一般的に薬物の投与効果は、経口投与に比べ腹腔内投与で効果が高いといわれているが、将来ヒトへの応用を目的としているため、日常生活の中で摂取しやすい経口投与を用いて実験を行った。

エゾシカ幼角抽出エキスを癌発症後のマウスに投与したところ、肉腫形成と臓器肥大化の両方において抗腫瘍活性がみられ、治療薬としての可能性が示唆された。また、癌移植前にエゾシカ幼角抽出エキスを投与したところ、同様のマウスに対する抗腫瘍活性がみられた。このことから、エゾシカ幼角抽出エキスの予防薬としての効果も有することが示唆された。

また、木島ら³⁾は、エゾシカ幼角抽出エキスには、発ガンプロモーターの阻害作用のあることを報告している。本実験の結果の癌に対する抑制効果と同様と推察した。

癌の予防として免疫力増強や抗酸化作用等、いくつかの経路が考えられるが、本実験のエゾシカ幼角抽出エキスが *in vivo* において、どのような機構で癌を抑制しているのか、不明である。しかし、森浦ら¹⁵⁾は肝過酸化脂質量を調べることで抗酸化作用を評価し、鹿茸には抗酸化作用はみられなかったと報告している。また、庄司ら¹⁶⁾は鹿茸には抗体産生や補体活性化作用がみられることから、免疫調節作用を有していることを報告している。これらのことからエゾシカ幼角抽出エキスは、生体内の免疫力を増強させることで、癌を抑制している可能性が推察された。

さらに、モルヒネは癌患者の痛み止めの効果を有

するが、シナプス後部のドーパミン受容器過敏による嘔吐などの副作用も有する。Hack-Seang Kimら¹⁷⁾は、マウスにおいて、鹿幼角の水抽出物がモルヒネの副作用に対する効果として、モルヒネの痛み止め効果を損なわずに、モルヒネの副作用を抑制すると報告しており、癌治療におけるモルヒネ投与により引き起こされる副作用の予防および治療に有効であることが推察された。

近年、癌治療において、アガリクス等の代替療法に関する情報が氾濫し、癌患者の45%が代替療法を利用しているといわれている。しかし、医者をはじめとする専門家達の多くは、臨床効果ははっきりしないことや副作用が明らかでないことから、代替療法を疑問視している^{18,19)}。たしかに、動植物による生薬は、天然物であることから品質に差が生じることが多く、鹿茸も動物種や組織部位によってアミノ酸、核酸塩基類、有機酸などの一般的成分の含量や組成比が異なると推察される。橋本ら²⁰⁾は、成分分析による品質評価法とDNA分析による起源判定法を報告しており、DNA分析で製剤中に配合されている鹿茸を確認することができると報告している。また、Hemmings S. J.ら²¹⁾によって、ラットを用いた *in vivo* 実験においてラットの成長における影響や代謝の指標としての血漿グルコースレベル、肝臓ダメージのインジケータとしてアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) と γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -GT) の血漿レベルを調べることによって、鹿幼角抽出物に、成長阻害や代謝阻害等の副作用がないことを報告している。

本実験の結果は、未利用資源であるエゾシカ幼角の *in vitro* における発癌抑制効果、そして *in vivo* における抗腫瘍活性がみられたことにより、これからの癌治療への大きな可能性を示した。また、癌の治療時における副作用を抑えるサポートケアの効果があることから、さらに研究をすすめることによって、副作用のない総合的な癌治療薬としての可能性があるといえる。

引用文献

- 1) 稲垣 勲・嶋野 武・嶋田玄彌・長沢元夫. 生薬学. 227-228. 南江堂. 東京. 1966.
- 2) 東京生薬協会. 新常用和漢生薬集. 142. 南江堂. 東京. 1973.
- 3) 辻井弘忠・末成美奈子. エゾシカ幼角抽出エキスの *in vitro* におけるガン細胞増殖抑制効果. 信州大学農学部 AFC 報告. 2: 83-86. 2004.

- 4) 木島孝夫. 鹿幼角等の生活習慣病に対する効果調査. 鹿資源利用開発調査研究補助事業 平成11年度報告書. 86-96. 全日本養鹿協会. 2000.
- 5) Berwald Y., Sachs L.. In vitro transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer. Inst. Oct.*; 35 (4): 641-61. 1965.
- 6) Kuroki T., Sato H.. Transformation and neoplastic development in vitro of hamster embryonic cells by 4-nitroquinoline-1-oxide and its derivatives. *J. Natl. Cancer Inst.* 41 (1): 53-71. 1968.
- 7) Shoji M., Oguni Y., Sasaki T., Sugimoto C., Sato H., Ogura T., Morishita S., Yamada H., Takeya K., Itokawa H.. Pharmacological studies of reirokusan which contains velvet horn and red ginseng: effect on immune responses. *Natural Medicines.* 50 (3): 232-242. 1996.
- 8) 谷村顕雄. 化学の領域. 129: 135. 1980.
- 9) 大田邦夫, 山本 正, 杉村 隆, 菅野春夫. 癌の科学1 癌の生物学. 213. 南江堂. 東京. 1980.
- 10) 吉村英敏. 毒性学—その生化学的側面. 288-296. 講談社. 東京. 1979.
- 11) 大田邦夫, 山本 正, 杉村 隆, 菅野春夫. 癌の科学2 環境と発癌. 149. 南江堂. 東京. 1979.
- 12) R. J. C. Harris. 新・ガンの知識. 136-137. 岩波書店. 東京. 1976.
- 13) Enticnap J. B.. An analysis of 1,000 cases of cancer with special reference to metastasis. *Guys. Hosp. Rep.* 101 (4): 273-279. 1952.
- 14) 伊藤信行, 立松正衛. 化学的発癌の寄与するもの—癌の疾患モデルとは何か. 蛋白質 核酸 酵素. 23 (6): 469-479. 1978.
- 15) Moriura T., Mtsuda H., Kubo M.. Study on anti-fatigue effect of animal crude drugs and foods by monitoring the antioxidative effects. *Natural Medicines.* 52 (2): 195-199. 1998.
- 16) Shoji M., Oguni Y., Suzuki T., Sugimoto C., Sato H., Ogura T., Morishita S., Yamada H., Takeya K., Itokawa H.. Pharmacological studies of reirokusan which contains velvet horn and red ginseng: effect on immune responses. *Natural Medicines.* 50 (3): 232-242. 1996.
- 17) Kim H. S., Lim H. K., Park W. K.. Antinarcotic effect of the velvet antler extract on morphine in mice. *J. Ethnopharmacol.* Jul; 66 (1): 41-9. 1999.
- 18) 黒木登志夫, 珠 玖洋. 最先端の癌研究と治療の新展開. *Experimental Medicine.* 22 (14): 1918. 2004.
- 19) 近藤 誠. 「治るがん」と「治らないがん」—医者が隠している「がん治療」の現実. 252-262. 講談社. 東京. 1998.
- 20) 橋本品夫. 動物生薬及び生薬製剤の理化学的品質評価法に関する研究. *Bunseki Kagaku.* 49 (9): 715-716. 2000.
- 21) Hemmings S. J., Song X.. The effects of elk velvet antler consumption on the rat: development, behavior, toxicity and the activity of liver gamma glutamyltranspeptidase. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 138 (1): 105-112. 2004.

Antitumor activities of young velvet antler extracts of Ezoshika (*Cervus nippon yesoensis*)

Hirotsada TSUJII and Minako SUENARI

Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University

Recently we have reported elsewhere on *in vitro* cytotoxic activities of young velvet antler extracts of Ezoshika (*Cervus nippon yesoensis*) on the increase of cancer cells.

The present study was undertaken to investigate the antitumor activities of young velvet antler extracts from Ezoshika. Young velvet antler extracts of Ezoshika were added to growing mouse embryonic cells, which were malignantly transformed by carcinogen *in vitro*, and shown to have an inhibitory effect on the carcinogen.

Also, to evaluate the *in vivo* antitumor activity of velvet antler extracts on *in vivo* incidence and development of sarcoma, mice were implanted with sarcoma 180, and velvet antler extracts administered p. o. once a day for 8 days. Treatment with velvet antler extracts suppressed the development of tumors.

From these results, it is presumed that velvet antler extracts may be useful for the prevention and therapy of cancer.

Key word : Nihonjika (*Cervus nippon*), Ezoshika (*Cervus nippon yesoensis*), antitumor activity, young velvet antler, velvet