

エゾジ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

辻井弘忠・末成美奈子
信州大学農学部応用生命科学科

要 約

エゾジカ幼角抽出エキスの *in vitro* での HeLa 細胞に対するガン細胞増殖抑制効果について調べた。幼角エキスは70%アルコールで浸出し、凍結乾燥により作製した。その結果、エゾジカ幼角抽出エキスには HeLa 細胞に対するガン細胞増殖抑制効果があることがわかった。エゾジカ幼角と鹿茸（中国梅花鹿幼角）抽出エキスとの HeLa 細胞に対するガン細胞増殖抑制効果の差はみられなかった。また、エゾジカ幼角抽出エキスのガン細胞増殖抑制効果は濃度依存的に増加した。エゾジカ幼角の部位別効果は、幼角の上部にいくほど効果が大きかった。これらのことから、エゾジカ幼角抽出エキスには *in vitro* において HeLa 細胞に対するガン細胞増殖抑制効果があることが判明した。

キーワード：ニホンジカ，エゾジカ，ガン細胞増殖抑制効果，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*) として古くから強壮，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，水中で2～3時間煮沸し，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。成分はリン酸カルシウム，炭酸カルシウム，脂質などが含まれており，エストロゲンが含まれているとの報告もあるが²⁾，まだ明らかにはなっていない部分も多い。また，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，パントクリン，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，消化器官系の機能促進，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ながら，日本国内に生息するエゾジ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ジ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，エゾジカの幼角を用いてガン細胞増殖抑制効果を調べるために以下の実験を行った。

実験1：エゾジカ幼角抽出エキスの HeLa 細胞に対するガン細胞増殖抑制効果

実験2：エゾジカ幼角の部位別によるガン細胞増殖抑制効果

実験3：エゾジカ幼角と鹿茸（中国梅花鹿幼角）の抽出エキスのガン細胞増殖抑制効果

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の一環であるエゾジカ幼角と鹿茸（中国梅花鹿幼角）を用いた。鹿幼角を細切し，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，40°Cで減圧濃縮し凍結乾燥後，エキスとした。また，エゾジカ幼角の部位別の効果を調べる実験では，鹿幼角を，上部・中部・下部に分離して各々のエキスを作製した。

2. HeLa 細胞の培養法

子宮頸癌由来の HeLa 細胞（大日本製薬）を medium 199 (Sigma) に10%ウシ胎児血清 (Filtron pty ltd) を添加した培養液を用いて，37°C，5%CO₂ in air 条件下で培養を行った。継代培養している HeLa 細胞を3.5cm dish (iwaki) に 5×10^4 cells/ml に調製して，鹿幼角抽出エキスを添加した培養液を用いて培養した。HeLa 細胞は細胞増殖曲線が最大となる培養4日目³⁾において，生存

細胞数を測定することにした。培養4日目にHeLa細胞を、浮遊している死滅細胞を除外後、Ca-free PBSで洗浄し、2%EDTA (nacalai) を含むトリプシン480u (wako) で生存接着細胞を浮遊させ、1500rpmで5分間遠心後、生存細胞数を血球計算盤で計測し抑制効果を算出した。細胞の生死数をエオシンで計測し、これらの死細胞数を差し引いた。

実験1：エゾジカ幼角抽出エキスのHeLa細胞に対するガン細胞増殖抑制効果

エゾジカ幼角抽出エキスのHeLa細胞に対するガン細胞増殖抑制効果を調べるために、幼角抽出エキスを0, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のいずれかを添加して培養を行い、添加4日目の生存細胞数を調べた。

実験2：エゾジカ幼角の部位別(上・中・下部)による効果

エゾジカ幼角の部位別抽出エキスのHeLa細胞に対する効果を比較するために、エゾジカ幼角の各部位のエキスを0, 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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3：エゾジカ幼角と鹿茸(中国梅花鹿幼角)との抽出エキスの *in vitro* における効果

エゾジカ幼角と鹿茸(中国梅花鹿幼角)抽出エキスのHeLa細胞に対する効果を比較するために、エゾジカ幼角と鹿茸のエキスを各々0, 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加して培養を行い、添加4日目に生存細胞数を調べた。

統計処理は細胞数の計測後の抑制効果についてはFisher's PLSDを用いて行い、 $P < 0.05$ で有意差とした。

結 果

実験1：エゾジカ幼角抽出エキスのHeLa細胞に対するガン細胞増殖抑制効果

エゾジカ幼角抽出エキスのHeLa細胞に対するガン細胞増殖抑制効果の結果を表1に示した。コントロールの無添加区に比べ、エゾジカ幼角抽出エキス50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の添加で細胞増殖は有意に抑制された。また、抽出エキス5 mg以上の添加ではさらに抑制効果は大きく、HeLa細胞の細胞増殖は抽出エキスによって濃度依存的に抑制された。

実験2：エゾジカ幼角の部位別(上・中・下部)によるガン細胞増殖抑制効果の比較

エゾジカ幼角の部位別抽出エキスのHeLa細胞に対するガン細胞増殖抑制効果の結果を表2に示した。全ての添加区において、コントロールの無添加区に比べエキス添加区では、HeLa細胞の細胞増殖が有意に抑制された。また、抽出エキス添加濃度毎に比較してみると、幼角各部位抽出エキスのガン細胞増殖抑制効果の強弱は、エキスの添加濃度を10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にした場合、上部抽出エキスで最も大きなガン細胞増殖抑制効果が見られた。抽出エキスを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した場合では、上部と中部抽出エキスで最も大きく、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加では、中部抽出エキスで最も大きいガン細胞増殖抑制効果が見られた。ガン細胞増殖抑制効果が下部に比べ、上部・中部の幼角抽出エキスで大きいことから、幼角の上部にいくほど効果が大きくなる傾向がみられた。

実験3：エゾジカ幼角抽出エキスと鹿茸(中国梅花鹿幼角)抽出エキスのガン細胞増殖抑制効果の比較

表1 エゾジカ幼角抽出エキスのHeLa細胞に対するガン細胞増殖抑制効果

	エキス添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)							
	0	10	50	100	500	1000	5000	10000
生存細胞数 ($\times 10^4$ cells/ml)	88.6 \pm 9.8 ^a	85.2 \pm 6.2 ^a	66.2 \pm 7.6 ^b	62.0 \pm 8.7 ^b	61.8 \pm 6.0 ^b	37.6 \pm 3.3 ^c	28.8 \pm 5.9 ^d	0.0 \pm 0.0 ^e

異符号間で有意差あり M \pm S D (P < 0.05)

表2 エゾジカ幼角の部位別抽出エキスのHeLa細胞に対するガン細胞増殖抑制効果

エキス添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	10	100	1000
上部	106 \pm 19.4 ^a	67.4 \pm 9.6 ^d	62.2 \pm 5.8 ^d	16.2 \pm 4.0 ^{ef}
中部	106 \pm 19.4 ^a	89.2 \pm 8.5 ^b	70.0 \pm 16.4 ^d	4.8 \pm 1.3 ^f
下部	106 \pm 19.4 ^a	83.6 \pm 4.3 ^{bc}	71.0 \pm 9.2 ^{cd}	24.4 \pm 4.5 ^e

生存細胞数 ($\times 10^4$ cells/ml)

異符号間で有意差あり M \pm S D (P < 0.05)

表3 エゾジカ幼角抽出エキスと中国梅花鹿幼角抽出エキスの HeLa 細胞に対するガン細胞増殖抑制効果

エキス添加濃度 (μg/ml)	0	10	100	1000
エゾジカ	83.4±15.6 ^a	63.4±1.0 ^b	39.6±5 ^c	24.0±10.2 ^d
中国梅花鹿	83.4±15.6 ^a	56.6±13.4 ^b	34.4±4.8 ^{cd}	0.0±0.0 ^e

生存細胞数 (×104cells/ml)

異符号間で有意差あり M±SD (P<0.05)

エゾジカ幼角抽出エキスと鹿茸(中国梅花鹿幼角)抽出エキスの HeLa 細胞に対するガン細胞増殖抑制効果の比較を表3に示した。全ての添加区において、コントロールの無添加区に比べエキス添加区では、HeLa 細胞の細胞増殖が有意に抑制された。また、エゾジカと鹿茸の幼角抽出エキスにおける効果を比較すると、1000μg/ml添加の場合、鹿茸抽出エキスにおいてガン細胞増殖抑制効果が有意に大きく、10、100μg/ml添加の場合、エゾジカ幼角抽出エキスにおいて鹿茸抽出エキスと同等のガン細胞増殖抑制効果がみられた。

考 察

日本におけるガン死亡者数は、平成14年度の厚生労働省によれば30万4286人、総死亡の31%を占めている⁴⁾。主な死因の年次推移をみると、悪性新生物つまりガンは一貫して上昇を続け、昭和56年以降死因順位第1位となり、全死亡者のおよそ3人に1人は悪性新生物で死亡したことになる。また、今後のガン罹患将来推計では、男性では2015年には肺ガンが胃ガンを追い抜き、ガン罹患の1位を示すことが予想され、女性では2005年までに大腸ガンが胃ガンを追い抜き、ガン罹患の1位になると予想される⁵⁾。また、発ガン因子としては食物の寄与率が最も高く35%、次いで喫煙が30%を占めるという報告があ

る⁶⁾。これらのことから、生活習慣改善によるガン予防が重要であることがわかる。

一方、木島ら⁷⁾の報告により、エゾジ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が示唆された。本実験の結果はエゾジカ幼角を摂取することでガンの増殖を抑制できる可能性を示唆している。

さらに、鹿幼角の水抽出物には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、モルヒネによって引き起こされた嘔吐などの副作用の原因となるシナプス後部のドーパミン受容器過敏を抑制する効果がマウスで報告されており^{8,9)}、モルヒネ投与によって引き起こされた副作用の予防および治療にも役立つかもしれない。

今回の結果は、未利用資源であるエゾジカ幼角の HeLa 細胞に対するガン細胞増殖抑制効果が見られたことにより、これからのガン治療への大きな可能性を示した。また、ガンの治療時における副作用を抑えるサポータティブケアの効果があることから総合的なガン治療薬としての可能性があるといえる。今後、さらにエールリッヒ腹水ガンをマウスに投与し、ガン化させたマウスにエゾジカ幼角抽出エキスを投与することで、エゾジカ幼角の *in vivo* におけるガン細胞増殖抑制効果を調べる予定である。

参 考 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, 増野和彦. 栽培に用いる系統および培地組成がヤマブシタケ (*Hericium erinaceum*) 子実体収量と子実体熱水抽出物エキスの細胞毒性活性に及ぼす影響. 信州大学農学部 AFC 報告. 第1号. 2003.
- 4) 厚生労働省統計情報部. 人口動態統計. 2002.
- 5) 富永祐民・青木國雄・花井彩・栗原登. がん統計白書. 篠原出版. 東京. 1999.
- 6) Doll R, Peto R. The cause of cancer. J Natl Cancer Inst. 66: 1192-1308. 1981.
- 7) 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.
- 8) Kim HS, Lim HK, Park WK. Antinarcotic effect of the velvet antler extract on morphine in mice. J Ethnopharmacol. Jul; 66(1): 41-9. 1999.
- 9) Kim HS, Lim HK. Inhibitory effects of velvet antler water extract on morphine-induced conditioned place preference and DA receptor supersensitivity in mice. J Ethnopharmacol. Jul; 66(1): 25-31. 1999.

**Cytotoxic activities of young velvet antler extracts
from Ezojika (*Cervus nippon yesoensis*)**

Hirotsada TSUJII and Minako SUENARI

Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture,
Shinshu University

Summary

This study was conducted to estimate the inhibitory effect of the young velvet antler extract from Ezojika (*Cervus nippon yesoensis*) on increase of cancer cells. Young velvet of Ezojika antler extracts was added to growing HeLa cells, and shown to have an inhibitory effect, and this effect increased with extracts concentration.

Furthermore, effect of adding extracts from the head of Ezojika velvet antler to HeLa cells was significantly higher when compared with that of extracts from bottom of velvet.

On the other hand, velvet antler extracts from Ezojika and Rokujiyo of china deer (*Cervus nippon mantchuricus Swinhoe*) inhibited cancer cells growth equally.

From the above results, it is presumed that young Ezojika velvet antler extracts may be useful for prevention of cancer in human.

Key word : Nihonjika (*Cervus nippon*), Ezojika (*Cervus nippon yesoensis*), cell toxicity, young velvet antler, velvet