

## 焼成シジミ貝殻粉末の生物活性

佐々木甚一<sup>1)</sup>、 呂昌龍<sup>2)</sup>、 他<sup>2)</sup>

- 1) (元) 弘前大学医学部保健学科 検査技術科学
- 2) 中国医科大学 免疫研究所

### [目的]

青森県には日本海側に河口を持つ十三湖があり良質の大和シジミを産出する。そのシジミエキスに肝臓機能の改善効果があることは動物実験で既に確認した<sup>1)</sup>。さらに、焼成したシジミの貝殻粉末が「肝臓に効く」との言い伝えがあり、それが民間伝承として現在も利用されてきている。

焼成シジミ貝殻のカルシウムに肝臓機能の改善効果があるとするれば、カルシウムの生物活性に新たな機能を付与することになり、また廃棄物としてこれまで捨てられてきた未利用資源のリサイクルにも繋がり研究テーマとしては意義が大きい。

焼成シジミ貝殻について、焼成温度と結晶構造の関係、肝臓の機能に対する作用、およびその作用機序を解明するために実験を行ったところ、カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末にこれまで報告されていない幾つかの新しい生物活性が認められ、「多機能性カルシウム」である可能性が出てきた。

### [実験材料と方法]

1) 貝殻の焼成条件と X 線回折：十分に洗浄したシジミ貝殻を自然乾燥させ、プログラム温度調節器付恒温器（いすゞ製作所、AT-E58）で 105、250、500、750、900℃で 2 時間焼成した。焼成貝殻を振動ミル（川崎重工業、T-100）で粉碎後 45 μm の篩で分別し実験試料とした。試料中の主成分である CaCO<sub>3</sub> の結晶構造は X 線回折装置（島津製作所、XD-610）で角度 2θ を 25～45° まで測定し解析した。

2) LEC ラットへの投与実験：カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末（*Corbicula japonica calcite*）の肝臓への作用実験は 4 週令の雌 LEC ラット（400g、1 群；5 匹）を用いて行った。LEC ラットは 4～8 カ月令において肝炎を自然発症し、急性期のステージを生き延びたものは慢性期に移行しその後肝がんを発症するモデルである。粉末の 7mg、14mg/ml（蒸留水）をカテ

ーテルで 3 カ月間連日経口投与した。対照群には蒸留水を投与した。定期的に血清を分離して GOT (AST)、GPT (ALT)、TBil (Total bilirubin) 成分は FUJI DRI-CHEM (富士メチカルシステム) で、IAP (Immunosuppressive acidic protein) 量は免疫反応 (細菌化学研究所製、仙台) で測定した。

また、焼成シジミ貝殻粉末の 7、14mg の二種類を 4 カ月間の経口投与し LEC ラットの生存率を調べた。

3) 焼成シジミ貝殻粉末の培養肝細胞への影響: C57BL/6 マウス (1 群: 5 匹) に粉末を 1mg/0. 1ml/日 (蒸留水) をカテーテルで経口的に 5 日間連続投与した。翌日、肝細胞を調整し、10%非働化 FBS・RPMI 1640 培地 (Sigma, USA) で細胞培養して経時的に MTS 法で細胞の生存率を調べた。

またアルコール投与実験 (脂肪肝実験) では、10%アルコールの 1 ml を 12 日間連続投与した後に肝細胞を調整し、細胞培養して MTS 法で細胞の生存率を調べた。

4) 焼成シジミ貝殻粉末の NK 細胞の活性化作用、サイトカイン産生誘導能: 同上マウス (1 群: 5 匹、7 群) に粉末を 1mg/0. 5ml/日 (蒸留水) を 12 日間、カテーテルで連日経口投与した。投与中止後、一週間にわたり連日各群のマウスの脾細胞を 10%非働化 FBS・RPMI 1640 培地 (Sigma, USA) で調整して 48 時間細胞培養した。その後 Yac-1 細胞を標的にして (脾細胞と Yac-1 の細胞比 100: 1)、LDH (lactase dehydrogenase) 法 (Sigma, USA) で NK 活性を測定した。また培養上清中のサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-2、IFN- $\gamma$ ) 量は ELISA Kit (R&D, USA) で測定した。これらに用いた動物実験はいずれも大学の動物倫理委員会の認可を受けて行った。

5) 脂質に対する焼成シジミ貝殻粉末の作用: 同上の条件下で C57BL/6 マウスにサンプルを経口的に投与して血清を分離し、中性脂肪 (TG)、総コレステロール (TC) 値を Auto-analyzer で測定した。また TC は HDL、LDL 値についても測定した。

6) 有意差検定: 実験結果の統計処理は Student's T test (Windows 16. 0, SPSS) で行った。

## [結果]

1) 焼成シジミ貝殻粉末の X 線回折: シジミ貝殻を 105、250℃で 2 時間焼成した場合の  $\text{CaCO}_3$  の結晶構造はアラゴナイ型であり、500℃ではカルサイト型、750、900℃ではライム型に変化した。参考として使用したアサリ貝殻、ホタテ貝殻でも上記条件下の焼成では、基本的には同様の構造変化を示した (表 1)。

表 1 焼成シジミ貝殻粉末の X 線回折<sup>2)</sup>

貝の種類	焼成条件 (温度、焼成時間)		結晶構造
<i>Corbicula japonica</i> (ヤマトシジミ)	105°C	2	CaCO <sub>3</sub> (Aragonite)
	250	"	CaCO <sub>3</sub> (Aragonite)
	500	"	CaCO <sub>3</sub> (Calcite)
	750	"	CaO (Lime)
	900	"	CaO (Lime)
<i>Ruditapes philippinarum</i> (アサリ)	105°C	"	CaCO <sub>3</sub> (Aragonite)
	250	"	CaCO <sub>3</sub> (Aragonite)
	500	"	CaCO <sub>3</sub> (Calcite)
	750	"	CaO (Lime)
	900	"	CaO (Lime)
<i>Japanese scallop</i> (ホタテ)	105°C	"	CaCO <sub>3</sub> (Calcite like)
	250	"	CaCO <sub>3</sub> (Calcite like)
	500	"	CaCO <sub>3</sub> (Calcite)
	750	"	CaO (Lime)
	900	"	CaO (Lime)

2) LEC ラットへの各種焼成貝殻粉末の投与実験: 貝殻の種類、結晶構造 (カルサイト型とアラゴナイト型) の違いによる生物活性の差異を調べるために予備実験をおこなった。各種の貝殻粉末の 14mg を 1 ヶ月間 LEC ラットに連日経口投与し、GOT、GPT、TBil 値を調べたところ、シジミ貝殻粉末のカルサイト型の投与群がもっとも肝機能のマーカー値が低く、肝機能改善効果が期待できたために以降の実験ではカルサイト型・シジミ貝殻粉末を実験に使用した (表 2)。また、カルサイト型の投与量を検討するため、7、14mg の二種類を 4 カ月間の経口投与し LEC ラットの生存率を調べたところ、14mg 投与群では 80%、7mg 投与群と対照群はそれぞれ 60% の成績を得た (図表提示なし)。14mg 投与群において、投与後 3 カ月目の GOT、GPT、IAP 値は、最も低い値であった (図 1)。当モデルの場合、14mg が効果を示す適量であると思われた。

表2 アラゴナイト、カルサイト投与 LEC ラットの酵素値の比較

貝殻 (結晶構造)	TBil (mg/dL)*	GOT (U/L)	GPT (U/L)
Control (Water)	0.75±0.3	268±95	254±136
<i>Corbicula</i> (Aragonite)	1.1±1.0	336±222	309±270
<i>Corbicula</i> (Calcite)	0.54±0.3	232±102	211±180
<i>Japanese scallop</i> (Calcite)	4.2 ±5.3	453±246	404±264

\*TBil: Total bilirubin

Sample (14 mg/ml/mouse) was daily fed to LEC rat by catheter for one month to evaluate their biological activities. *Corbicula japonica* shell calcite-fed rats showed the lowest values of individual liver functions markers.

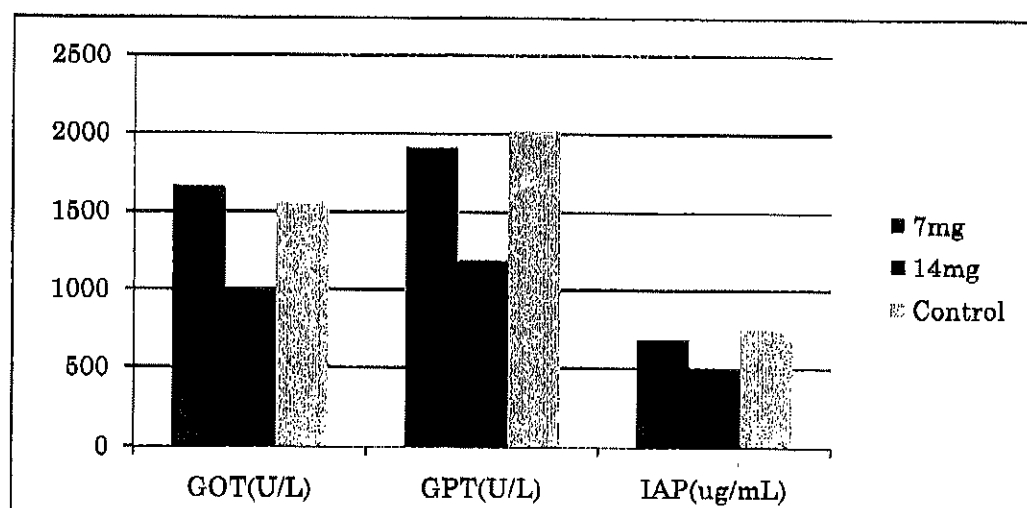


図1 カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末の3カ月間投与 LEC ラットの肝機能マーカー値

3) カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末の培養肝細胞への影響：焼成シジミ貝殻粉末を投与したマウスの肝細胞の生存率は、対照ラットの肝細胞に比較して高かった (図 2-1)。特に1%液 0.5ml (5mg) の投与群において、生存細胞率は培養時間とともに上昇し 36 時間において対照に対し 300%と最高値を示した。一方、5% (25mg) 投与群は 1%投与群より生存率は低かったが、対照群に比して 24 時間値は 200%と高い値を示した。

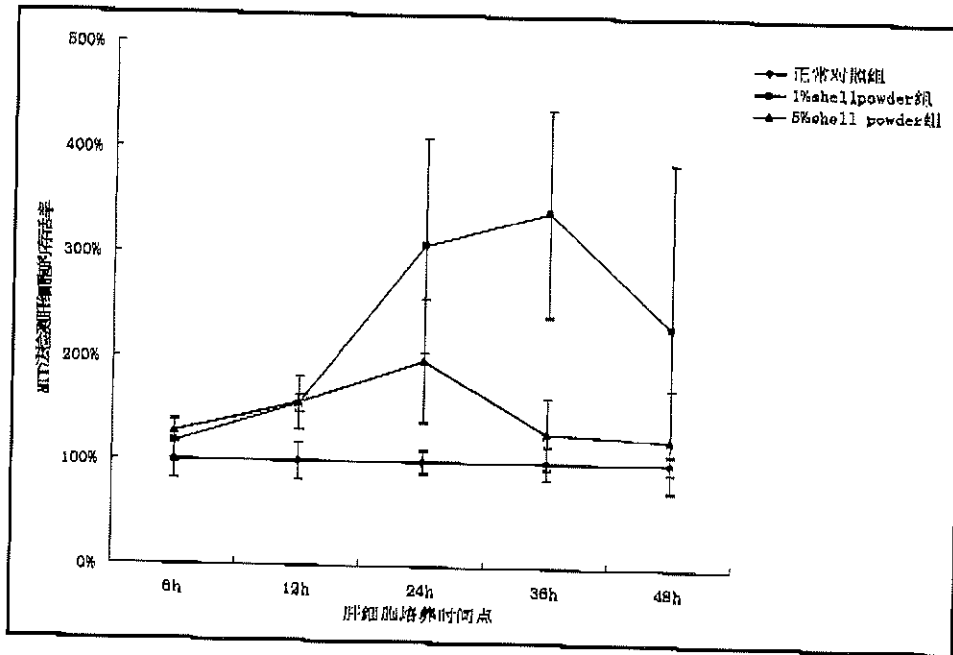


図 2-1

カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末投与マウスの培養における肝細胞の生存率

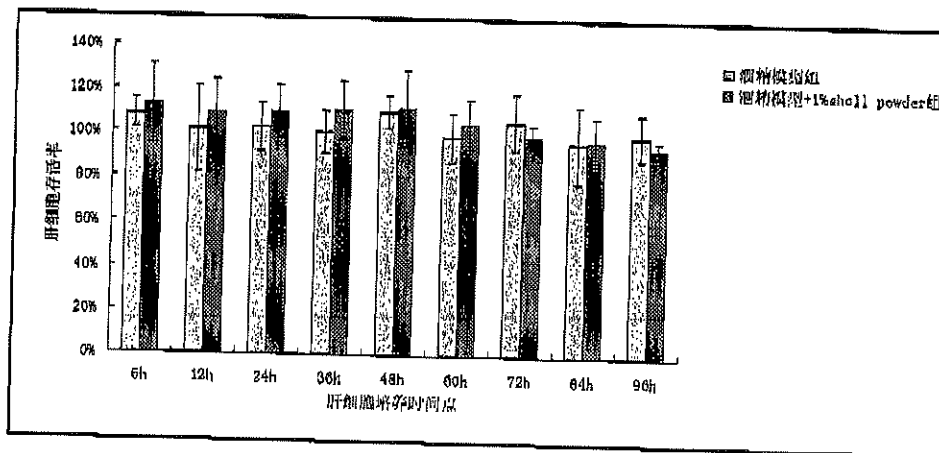


図 2-2

[アルコール+カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末] 投与マウスの培養肝細胞の生存率

脂肪肝のモデルとしてアルコール投与実験を行った。「アルコール+焼成シジミ貝殻粉末」の組み合わせで肝細胞に対する影響を見たのが図 2-2 である。培養 60 時間まで対照であるアルコール単独投与マウスよりも、焼成シジミ貝殻粉末をアルコールと同時に飲ませた群の肝細胞の生存率が高くカルシウム効果があるものと考えられた (図 2-2)。

4) カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末の NK 活性に及ぼす影響；マウス培養脾細胞におけ

るNK細胞の活性化は、焼成シジミ貝殻粉末の投与中止2日後に投与前（対照）の16%から32%と上昇し活性化が見られた（図3）。

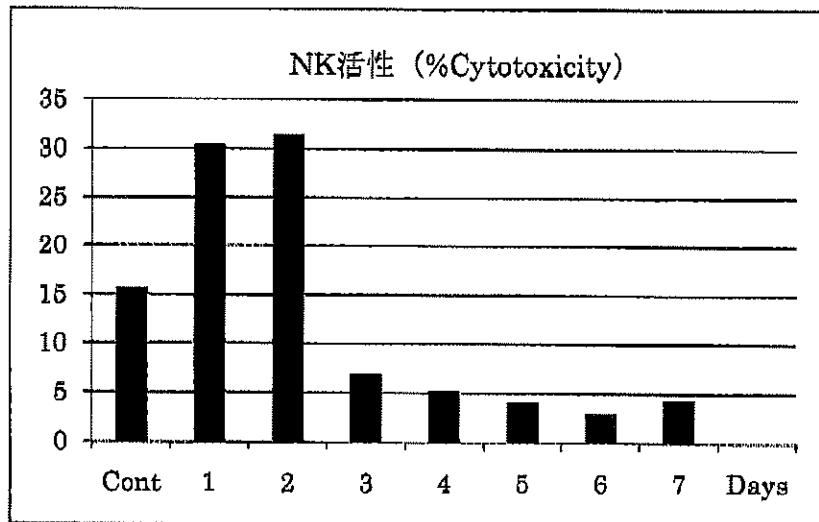


図3 カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末のNK活性に及ぼす影響

また培養脾細胞から産生されるサイトカイン量を測定したところ、カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末の投与を中止した4日後においてTNF- $\alpha$ の産生量は有意に増加した（ $p < 0.05$ ）。IL-2、IFN- $\gamma$ についても有意ではなかったものの産生量が投与を中止した4日後に上昇していた（表3）。

表3 カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末投与マウスの脾細胞培養液中に産生されたサイトカイン

投与中止後日数	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)
Control	27.78 $\pm$ 13.41	15.42 $\pm$ 1.26	12.59 $\pm$ 1.80
Exp. Group			
1	31.86 $\pm$ 10.37	13.33 $\pm$ 1.22	10.72 $\pm$ 1.56
2	25.53 $\pm$ 8.79	13.54 $\pm$ 1.82	12.11 $\pm$ 1.01
3	29.46 $\pm$ 9.78	13.25 $\pm$ 1.26	11.77 $\pm$ 0.69

4	47.29±6.53*	16.06±1.14	14.51±0.60
5	25.08±11.98	12.67±1.12	13.39±2.18
6	33.31±9.22	12.88±1.04	14.63±1.01
7	26.92±6.96	13.49±1.13	13.04±1.44

\*p<0.05 (against control value)

Shell calcite (1.0 mg/0.1 ml DDW/mouse/day) was fed to animals for 5 d by catheter.

From day 6th animals were sacrificed each day for cytokine analyses.

さらに焼成シジミ貝殻粉末を投与したマウスから血液を採取し血清中の IFN- $\gamma$  を測定したところ、脾細胞培養液中の測定結果と同じく投与を中止した4日後にピーク値が認められた(図 4)。

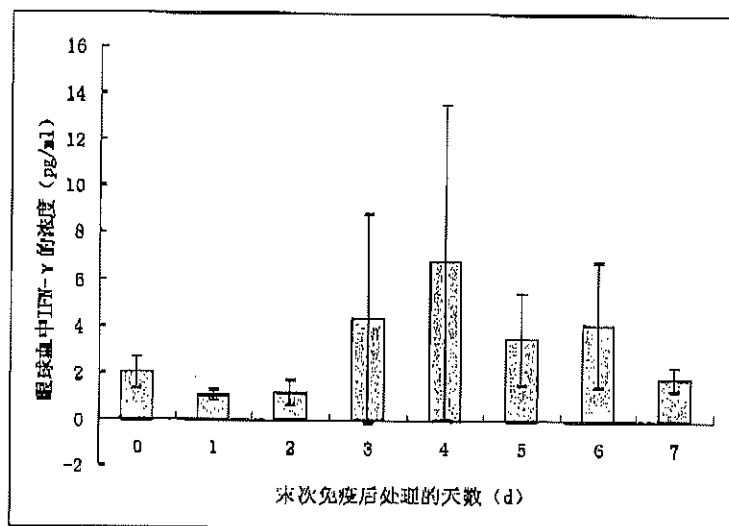


図4 カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末投与マウスの血清中における IFN- $\gamma$  値

5) 脂質に対するカルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末の作用：焼成シジミ貝殻粉末を投与したマウスの血清の中性脂肪 (TG)、総コレステロール (TC) 値 ( $p<0.05$ ) は、投与しない対照群に比較して共に低値を示した。しかし、アルコール投与モデル群の実験では、焼成シジミ貝殻粉末投与群とアルコール単独投与群との間に TC, TG 値の差はなかった。また、アルコールを投与したマウスの TG, TC はアルコールを投与しない群に比べて有意 ( $p<0.05$ ) に上昇しており、アルコールの脂質上昇作用が示された (図 5)。

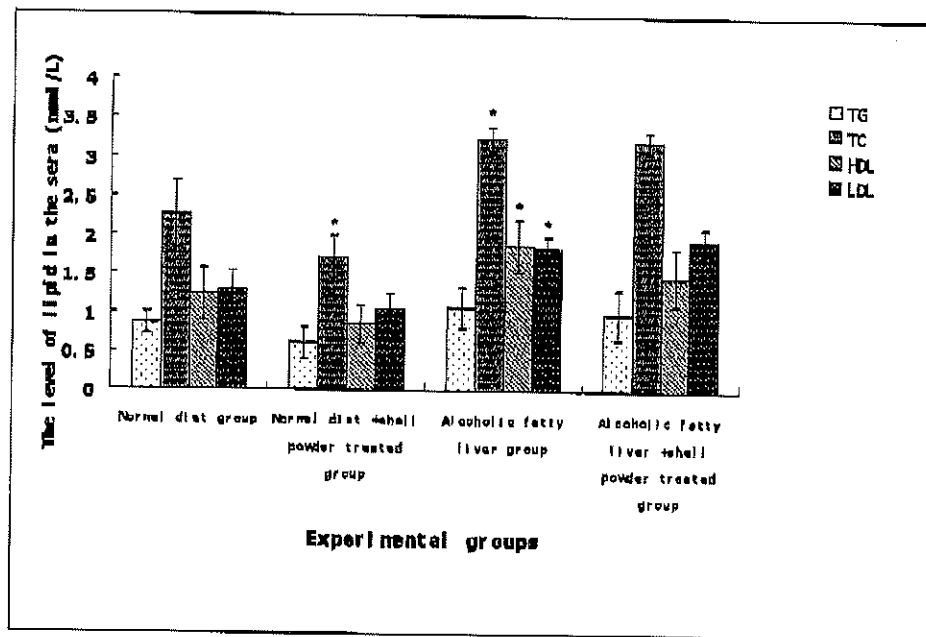


図5 カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末を投与したマウス血中脂質への影響

### [考察]

カルシウムは骨形成や細胞内の情報伝達に重要な役割のあることは知られているが、その他の生理機能についての報告はほとんどない。カルシウムに関して「焼いたシジミ貝殻が肝臓に効く」との言い伝えが青森県にある。これはカルシウムが持つ新たな生理機能として興味があるが、科学的な根拠がこれまでに提示されていない。

それを確認すべく実験を行ったところ、焼成シジミ貝殻粉末に肝機能改善効果があることが分かった。カルシウムの持つこの作用は「カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末(CaCO<sub>3</sub>)」であることが必要条件であり、シジミ貝殻粉末のアラゴナイト型、また、ホタテ、アサリの焼成貝殻・カルサイトにはその作用が見られず、焼成シジミ貝殻粉末に特有の作用であることも分かった。

カルシウムはこれまでは、骨との関係、またはカルシウム摂取量などについて主に論じられ、肝機能との関連性などは指摘されておらず、それゆえ肝臓に対する作用機序などについても全く不明であった。今回、私たちが「カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末」を用いて取り組んだ動物実験において次のことが明らかとなった。

- ①カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末 (CaCO<sub>3</sub>) の経口投与で肝機能が改善効果。
- ②作用機序として肝細胞の増殖促進作用 (壊れた細胞の修復作用もあるかも知れない)。
- ③NK細胞の活性化、サイトカイン産生亢進など免疫系細胞を活性化作用。
- ④中性脂肪、コレステロールを下げる作用。



カルシウム（カルサイト型・焼成シジミ貝殻粉末）の新しい生理作用を提示したのは我々が初めてである。カルシウムの結晶構造の変化がどのようなプロセスで生物機能に影響するのかが今後の研究課題である。

それに関連し、最近、「鉄」についての興味ある報告を目にした。これまで鉄は高温で処理・加工していたが、低温で処理すると表面の構造が高温処理と異なり（構造変化）、それに伴って鉄の強度が増す（機能変化）ことが分かったというものである。これなどはカルシウムの構造と生物機能との関連を考える上で示唆に富む現象であると思われる。

#### [文献]

- 1) 伊藤雄幸・他：シジミエキスの肝炎予防効果. BCG・BRM 療法研究会会誌. 28:57-61, 2004.
- 2) 青森県産業技術開発センター：キープロジェクト 研究報告書. Vol. 4: 1-9, 1999.