

鶏卵漿尿膜法（CAM 法）を利用した血管新生抑制を有する食品成分の探索

静岡県立大学食品栄養科学部・准教授 熊澤 茂則

■ 緒 言

固形腫瘍の増大には栄養成分や酸素の供給が必要であり、そのために腫瘍は局所的な血管網の伸長（血管新生）を誘導することが近年明らかにされている。この血管新生を制御して癌を抑制・退縮させる治療法の開発が進められ、その成果として抗 VEGF 抗体 Avastin が進行性大腸癌患者に約 5 か月の延命効果を持つことが示された。この薬剤は 2007 年に日本においても癌治療薬として承認されている。

一方で、血管新生阻害薬の開発・臨床試験の過程で、いくつかの問題点も浮上してきている。大きな問題点として、進行癌では血管新生誘導能が強く阻害薬の作用も強くする必要があるので、臨床段階で実際に効果を示す薬剤が少なく、また副作用も強く出ることが挙げられる。逆に考えると、癌が小さい段階での微弱な血管新生を抑制できれば、弱い抑制作用でも効果があり、副作用も少ない可能性が高い。すなわち、血管新生の抑制は進行癌の治療よりも、癌の予防または再発防止としての利用法が有効であると考えられる¹⁾。

このような背景から、我々は腫瘍血管新生抑制作用を有する食品やその含有成分の探索を進めてきた。そして、ミツバチの生産物であるプロポリスなどに活性を見出すとともに、いくつかの活性成分を同定してきた²⁾。これらの研究においては、*in vitro* のアッセイ系として、ヒト血管内皮細胞を用いた血管新生モデルを主に利用してきた。このアッセイは、血管内皮細胞をコラーゲンゲル中で培養することで毛細血管様管腔構造を形成させ、その形態変化および分子レベルでの変化を観察するものである。また、*in vivo* のアッセイでは、マウス背部皮下法を用いてきた。この方法は、腫瘍細胞を封入したチャンバーをマウスの背部皮下に埋め込み、この細胞から分泌される血管新生因子によって血管新生を誘導させた後、マウスの餌に血管新生抑制活性があると考えられる食品やその成分を混ぜて与え、新生血管抑制活性を評価するものである。

これらのアッセイ法は、血管新生抑制活性を評価するためには優れた方法である。しかし、*in vivo* のマウス背部皮下法は、実験コストと動物を使うことの煩雑さの点から、それほど頻繁には実施できないという問題点があった。そこで我々は、鶏の受精卵をアッセイに用いる鶏卵漿尿膜法（chorioallantoic membrane assay 法：CAM 法）の導入を検討してきた。CAM 法とは、鶏卵の胚の成長に伴う漿尿膜上で起こる生理的な血管新生に対する阻害効果を調べるアッセイ法である。CAM 法は、これまで用いてきた動物（マウス）の系と比較して鶏卵を用いることで被験物質質量が少なく済むため、一次スクリーニングにも適していると思われる。このようなことから、本研究では、食品やその含有成分に対して CAM 法を適用し、新たな血管新生抑制活性成分を見出すことを目的とした。

■ 方 法

(1) CAM 法の確立

CAM 法の構築にあたっては、様々な試行錯誤を繰り返し、以下のような評価法を確立することができた。この方法を用いて試料の活性を評価した。

- 0 日目 養鶏場から有精鶏卵を搬入、静置。
- 1 日目 有精鶏卵を消毒後、インキュベータにて 37.6°C で培養。
- 5 日目 試料添加準備。有精鶏卵に穴を開けて卵白を一部除去し、再び 39°C で培養。
- 6 日目 試料添加。卵殻および卵殻膜を大きく取り除き、シリコンリングを乗せ、試料をリング内に添加。再び 39°C で培養。
- 7 日目 リング位置の調整。
- 8 日目 活性の判定。卵殻を取り除き、イントラリポスを注入し、次の基準によって、血管新生抑制活性を評価。

判定	point
-	0 point(血管新生なし)
±	1 point(わずかに抑制が見られる)
+	2 point(CAM 上の毛細血管が一部抑制されている)
++	3 point(CAM 上の毛細血管が完全に抑制されている)
+++	4 point(太い血管にも抑制が出ている)

1 回の試験においては、control および各試料につき、3～11 個の鶏卵を用いた。
 また、各濃度において 3 回の実験を行い、試料の血管新生抑制率を以下の式により算出した。

$$\text{血管新生抑制率(\%)} = \{1 - (\text{Control の換算値} / \text{試料の換算値})\} \times 100$$

(2) フラボノール類の血管新生抑制活性

天然色素(黄色)の一種でもあるフラボノール類は植物中に広く分布しており、様々な生理作用が報告されている。また、日常の食生活の中で野菜や果物などから摂取することができる。今回、4 種類のフラボノール類(galangin, kaempferol, quercetin, myricetin)を用いて CAM 法による血管新生抑制活性の評価系の検討を行った。これらのフラボノールの構造は、図 1 に示した。なお、活性試験においては、retinoic acid を positive control として用い、各フラボノール類は 1～150nmol/egg の濃度の試料を調製して評価に用いた。

(3) パパイアの葉の血管新生抑制活性

パパイア(*Carica Papaya*)はパパイア科の常緑小高木であり、若葉と未成熟の果実は野菜に、成熟した果実は果物として食されている。パパイアの果実は広く利用されていることから、多くの研究が行われているが、葉に関する研究は少ない。パパイアの葉は、オーストラリアの一部の地域で茶として飲まれているが、成分研究はほとんど行われていない。しかし、パパイアの葉抽出物には抗ガン活性があることが報告されている³⁾。我々は、これまでにヒト血管内皮細胞を用いたアッセイ系でパパイア葉の血管新生抑制活性を確認していることから、本研究においては、CAM 法を用いてパパイアの葉の血管新生抑制活性を評価し、活性成分の探索を実施した。すなわち、パパイアの乾燥葉をエタノールによって抽出し、CAM 法による血管新生抑制活性を用いて評価した。さらに、抽出物を分画して活性成分の探索を進め、活性成分を精製して機器分析により構造解析を行った。

■ 結果

(1) フラボノール類の血管新生抑制活性

各フラボノール類の血管新生抑制活性を図 2 に示した。Control では、リングおよびリング周辺においても毛細血管が多数存在するため、全体的に赤みがかっていたのに対し、フラボノール類では 10nmol/egg 以上の濃度において、すべての化合物で活性が確認された。1nmol/egg における血管新生抑制率は quercetin が最も高く 57.8%であった。今回の検討により、各化合物とも濃度依存的な血管新生抑制活性が確認された。

(2) パパイアの葉の血管新生抑制活性

パパイア葉のエタノール抽出物を用いて CAM 法による血管新生抑制活性を調べた結果を図 3 に示した。今回パパイア葉の抽出物を添加した場合、明らかに新生血管の抑制効果があることが観察された(活性評価が+および++)。この活性は、これまでに研究されている天然物の中でもかなり強いものであった。

そこで、パパイアの葉に含まれる活性成分を明らかにするため、パパイアの葉より活性成分の分画を試みた。パパイアの葉 200g を 2L のエタノールで抽出した。この操作を 2 回繰り返し、最終的に 31g の抽出物を得た。このうち 10g を、HP-20(三菱化学製)を用いた吸着樹脂クロマトグラフィーによって分画した。水からメタノールの割合を徐々に増やしていき、最後はアセトンで溶出した。こうして得られた画分について、CAM 法を用いた血管新生抑制活性を調べた。その結果、60% メタノール溶出区分に、活性が集中していることが判明した。

この結果に基づき、60% メタノール溶出区分に含まれる活性成分の探索を進めた。活性成分は複数存在することが確認されたため、含量が多い成分を優先的に精製し、構造解析を実施した。現在もま

だ構造解析は進行中であるが、今のところ3種類の活性成分を単離することができた。そのうち一つは、フラボノイドの一種であるケルセチンの配糖体であることが判明した。残りの二つの化合物は不明であるが、フラボノイドの一種であると予想された。

■ 考 察

現在、血管新生を抑制する活性に関する研究は、抗ガン成分探索の面から大きな注目を集めている。今回、鶏卵の漿尿膜を用いるCAM法の構築を検討し、安価で簡便な*in vivo*アッセイ評価系を確立することができた。この評価系を用いて各種フラボノールを評価したところ、濃度依存的な活性データを得ることができた。このことは、本評価系を用いて*in vivo*におけるスクリーニングが可能となることを示したものであると言える。そこで、この活性評価系の応用としてパパイヤ葉の抽出物の血管新生抑制活性を調べたところ、パパイヤ葉は*in vivo*において顕著な血管新生活性を有していることが明らかとなった。この結果から、CAM法は標品の評価だけでなく、天然物のような混合物においても、*in vivo*における血管新生抑制活性を評価できることが確認された。また、この結果はこれまで伝承的に言われていたパパイヤ葉の抗ガン活性を科学的に説明できるデータにもつながるものである。

さらに、パパイヤ葉の抽出物中の活性成分を探索したところ、いくつかの活性成分を単離することができた。それらの活性成分は機器分析による解析により、フラボノイド配糖体であることが予想された。現在も構造解析は進行中であるが、今回、パパイヤの葉より、このような活性成分が得られたことは新たな発見であった。活性成分の同定ができれば、これまで廃棄されていたパパイヤの葉の有効利用につながることも期待される。今後、血管新生抑制メカニズムの解明を行い、最終的には食品としての日常的な摂取を通して、特に癌の治療・予防や再発防止に利用されることを目標としたい。

■ 要 約

鶏卵の漿尿膜を用いるCAM法の構築を検討し、安価で簡便な*in vivo*血管新生抑制活性評価系を確立することができた。そして、食品に含まれる代表的な4種類のフラボノール類を用いてCAM法を用いた活性評価を実施し、この評価系の有用性を確認した。そして、この評価法を、パパイヤ(*Carica Papaya*)の葉の抽出物の活性評価に応用し、パパイヤ葉抽出物に強い血管新生抑制活性があることを見出した。さらに、パパイヤ葉中の活性成分の単離、精製を進め、活性成分はフラボノイド配糖体であることも明らかにした。以上のように、本研究では、簡便な*in vivo*血管新生抑制活性試験の評価系を立ち上げただけでなく、その方法を天然物にも応用し、顕著な成果を得ることができた。

■ 文 献

1. Folkman, J., 1995, Clinical application of research on angiogenesis, *N. Engl. J. Med.*, 333, 1757-1763.
2. Ahn, M.-R., Kunimasa, K., Kumazawa, S., Nakayama, T., Kaji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H., Ohta, T., 2009, Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis, *Mol. Nutr. Food Res.*, 53, 643-651.
3. Nakamura, Y., 2008, Molecular targets for cancer chemoprevention by dietary isothiocyanate, *Foods Food Ingr. J. Jpn.* 213, 910-915.

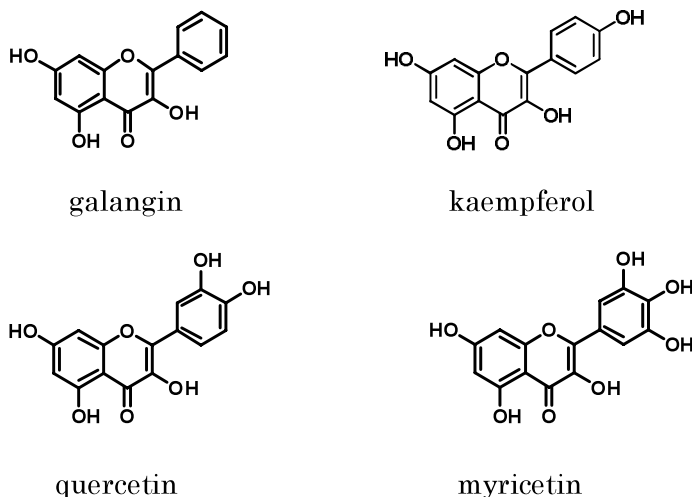


図1 CAM法によって血管新生抑制活性を評価したフラボノール類

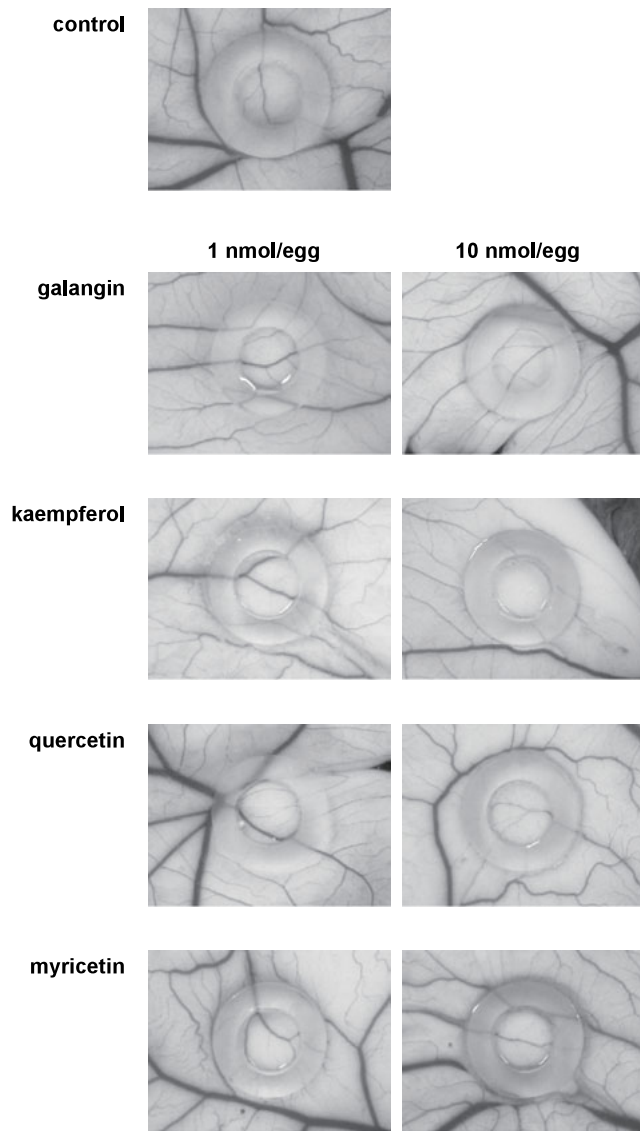


図2 CAM法を用いた各フラボノール類の血管新生抑制活性

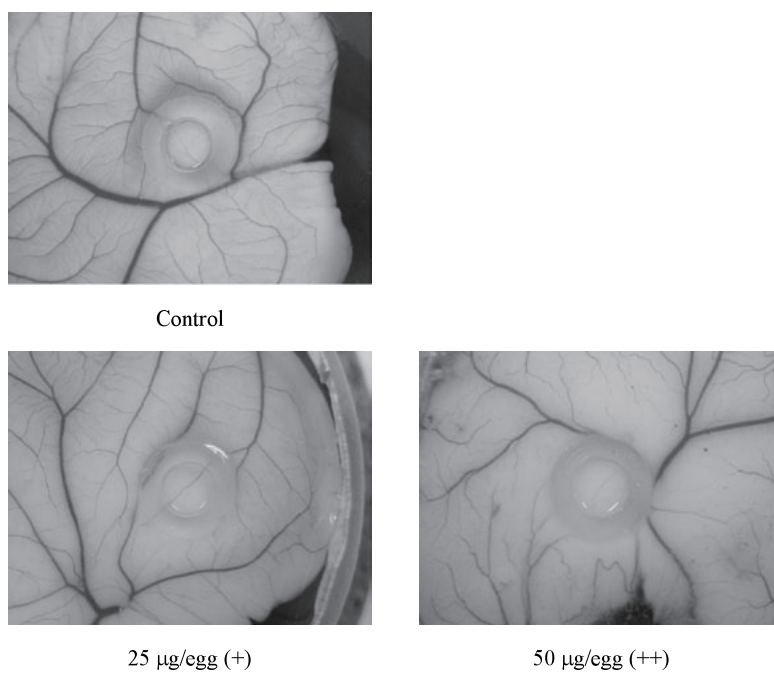


図3 CAM法によるパパイア葉抽出物の血管新生抑制活性