

靈芝菌糸体培養培地抽出物中の抗酸化活性成分の探索と
脳保護効果に関する研究

玄 美燕

目 次

総論の部

諸言	1
第 1 章 マウスの虚血性脳障害に対する菌糸体抽出物の脳保護効果	6
第1節 正常マウスの H/I 障害に対する LEM の脳保護作用	7
第2節 肥満・2 型糖尿病モデルマウスの H/I 障害に対する MAK の脳保護作用	18
第3節 本章の小括および考察	29
第 2 章 肥満・2 型糖尿病モデルマウスの H/I 障害に対する MAK の脳保護作用メカニズムの解析	31
第1節 H/I 障害のメカニズムと H/I 障害メカニズムにおける MAK の作用様式 (H/I による酸化ストレスおよび ER ストレスを介した脳障害メカニズム)	32
第2節 肥満・2 型糖尿病モデルマウスの H/I 障害の悪化メカニズムの解析 (H/I による脳障害悪化に及ぼす慢性 ER ストレスの関与)	39
第3節 本章の小括および考察	46
第 3 章 抗酸化活性を指標とした MAK 中の活性成分の探索と同定	48
第1節 活性成分の探索および同定	48
第2節 同定された成分の活性評価	55
第3節 本章の小括および考察	58
第 4 章 抗酸化活性成分による神経細胞および脳保護作用の評価	59
第1節 神経細胞保護作用の評価 (<i>in vitro</i>)	59
第2節 脳保護作用の評価 (<i>in vivo</i>)	63
第3節 本章の小括および考察	68

考察 69

総括 79

謝辞 81

実験の部

第 1 章 82

第 2 章 88

第 3 章 92

第 4 章 99

引用文献 103

本論文で使用した略語一覧

略語	英語表示
ATF6	Activating transcription factor 6
ATP	Adenosine triphosphate
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2 protein
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CA1	Cornu ammonis 1
CA2	Cornu ammonis 2
CHOP	C/EBP homologous protein
¹³ C-NMR	Carbon nuclear magnetic resonance
CREB	cAMP response element binding protein
CRTC2 (TORC2)	CREB-regulated transcription coactivator 2
<i>db/db</i> mice	Diabetes mice
DCFH-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DHE	Dihydroethidium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
d-ROMs	Diacron-reactive oxygen metabolites
EC ₅₀	50% effective concentration
EI	Electron ionization
ER stress	Endoplasmic reticulum stress
FAB	Fast atom bombardment
FBS	Fetal bovine serum
GPx	Glutathione peroxidase
GRP78	Glucose-regulated protein 78
HE	Hematoxylin and eosin
¹ H- ¹ H COSY	Correlation spectroscopy
H/I	Hypoxia/ischemia
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
¹ H-NMR	Proton nuclear magnetic resonance
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HPLC	High performance liquid chromatography
HS	Horse serum
HSP70	Heat-shock protein 70
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
IC ₅₀	50% inhibitory concentration

略語	英語表示
IRE1	Inositol requiring 1
LC/MS	Liquid chromatography/mass spectrometry
LEM	Water-soluble extract of <i>Lentinus edodes</i> mycelia
MAK	Water-soluble extract of <i>Ganoderma lucidum</i> mycelia
MCAO/Re	Middle cerebral artery occlusion/reperfusion
MPLC	Medium pressure liquid chromatography
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NGF	Nerve growth factor
O ₂ ⁻	Superoxide anion
PBS	Phosphate-buffered saline
PERK	PRKR-like endoplasmic reticulum kinase
RNOS	Reactive nitrogen oxide species
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
STZ	Streptozotocin
TLC	Thin-layer chromatography
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase- mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labelling
<i>U.CARR</i>	Unit CARR (1 CARR U = 0.08 mg H ₂ O ₂ /dL)
UCP-2	Uncoupling protein-2
UPR	Unfolded protein response
VC	Vitamin C
VE	Vitamin E

総論の部

総論の部

緒言

脳血管疾患（脳卒中）は、日本人の死亡原因の第4位を占め、「寝たきり」となる率が最も高い疾患である¹⁾。高齢社会に伴う生活習慣病の増加により、その患者数は増加しており、完治が困難なことや再発率が高いことなどから治療はもとより予防の重要性が増している²⁾。脳血管疾患には、Fig. 1に示したように血管が損傷して生じる出血性脳血管障害と、血管の閉塞や狭窄により血流が遮断されて生じる虚血性脳血管障害があり、後者の罹患率は非常に高い。

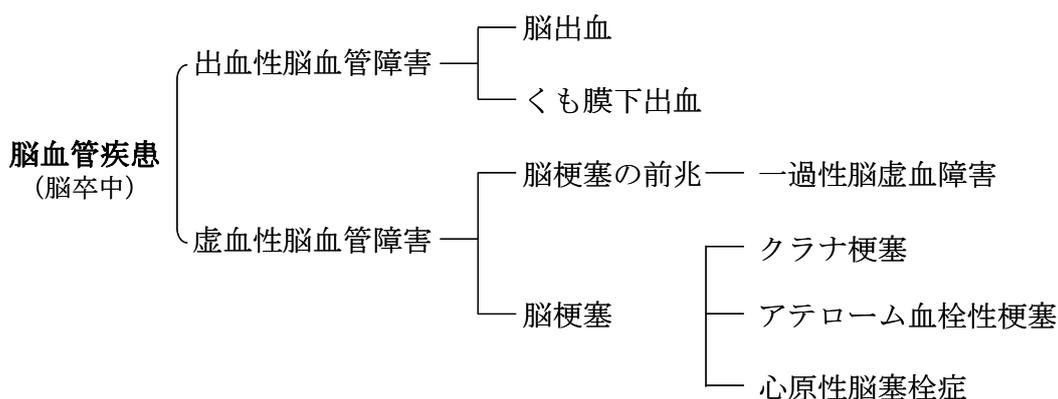


Fig. 1 Cerebrovascular disease

一過性脳虚血は、24時間以内に解消する可逆的な脳血流の閉塞を特徴とするが、虚血および再灌流時に発生する酸化ストレスが引き金となり、神経細胞死を誘導する³⁾。通常、脳梗塞が発生した場合、急性期の主要な治療法として組織プラスミノゲンアクチベータ（t-PA）による血栓溶解療法が行われるが、血流の再開に伴うフリーラジカルの発生によって2次障害を生じる^{4,5)}。このように、虚血性脳障害の発生・進展メカニズムには、酸化ストレスの関与が大きいことが知られている⁶⁾。

再生能や防御機構が極めて低い脆弱な脳の虚血中心部では、血流の著しい減少による酸素およびATPの欠乏によって、神経細胞が数分以内に不可逆的壊死に陥る。虚血周辺部位のペナンプラ領域では、虚血に加えて血流の再開によって過剰に生成した活性酸素種（ROS）や活性酸化窒素種（RNOS）などのフリーラジカルが、生体内の標的分子に作用して脂質の過酸化反応、蛋白質の変性、酸化的DNA損傷などを誘起してアポトーシスを誘導する⁷⁾。特に、抗酸化酵素の含有量が少ない海馬CA1領域の錐体細胞や小脳のプルキンエ細胞などが選択的に障害されやすく、酸化ストレスに対して脆弱であることも知られている^{8,9)}。

一方、ペナンプラ領域の神経細胞死は、早期薬物治療が可能であることから、酸化ストレスの軽減を目的とした抗酸化物質による神経保護療法が注目されており¹⁰⁾、中でも虚血性脳障害に対する抗酸化成分を含有する天然物の保護効果については、これまでに多くの報告がなされている¹¹⁻¹³⁾。また、近年の生活習慣病の増加を背景に、抗酸化作用を謳った健康食品が氾濫しているが、個々の科学的検証は充分でなく、高い安全性と臨床的有用性を持ち合わせた健康食品は数少ない。これらのことを背景として本研究の第1章では、抗酸化作用をはじめとした優れた生理活性を有する菌糸体抽出物の椎茸菌糸体培養培地抽出物（LEM）¹⁴⁾と靈芝菌糸体培養培地抽出物（MAK）¹⁵⁾の虚血性脳障害に対する予防・改善効果の可能性について検討した。

糖尿病は、脳梗塞の危険因子の一つであるとともに、肥満を伴う2型糖尿病は、日本の糖尿病患者数の95%を占めており、食生活の欧米化によって日々増加している生活習慣病である。肥満や2型糖尿病態時の脳では、酸化ストレスの増加に伴い虚血性脳障害が悪化することが報告されている^{16,17)}。また、糖尿病患者では非糖尿病群と比較して2.5～3.6倍の確率で脳梗塞を発症しやすく¹⁸⁾、再発率の上昇や予後の不良をきたすことが報告されている¹⁹⁾。今回用いた菌糸体抽出物の

MAKは、すでに、正常マウスにおける虚血性脳障害に対して脳保護作用が認められること¹⁵⁾、さらに、肥満を伴う2型糖尿病マウスに対して血糖上昇抑制作用を示し、インスリン抵抗性を改善することも報告されている²⁰⁾。そこで、肥満・2型糖尿病態マウスの虚血性脳障害に対するMAKの脳保護効果について検討することにした。

これまでに、糖尿病の併発による脳障害の悪化には、糖代謝異常によるROS産生の増加が原因の一つであるとの報告がある。高血糖に起因する酸化ストレスの亢進は、糖尿病における細小血管や大血管の合併症の危険因子として脳虚血障害を更に悪化させる要因と考えられる²¹⁾。さらに、近年、虚血性脳障害には小胞体（ER）ストレスの関与が知られるようになり、肥満・2型糖尿病の併発による虚血性脳障害の悪化にはERストレスが影響する可能性が示唆された^{22, 23)}。しかし、その詳細なメカニズムは明らかになっていないことから、第2章では、肥満を伴う2型糖尿病態時の虚血性脳障害の悪化にERストレスが重要な役割を果たすと仮定し、脳障害悪化の詳細なメカニズムについて解析するとともにMAKによる脳保護作用の一つにERストレスの抑制が寄与しているか否かを検討することにした。

病態の改善や予防効果を図ることを目的とした本研究計画では、MAKの有効成分の探索が不可欠となり、活性本体が同定できれば、機能性食品や治療を目的とした新たな医薬品開発にも貢献できる点で意義あるものと考えた。すでに、MAKには、霊芝の菌糸体成分に加え水溶性リグニンをはじめとした菌糸細胞による固形培地の分解物や菌糸体の自己消化成分等が多数含まれ、これらの多様な成分がMAKの生物学的活性を示すものと考えられている^{24, 25)}。これまでに、霊芝子実体中の多数の多糖類およびトリテルペノイドに抗酸化作用があること、この作用にはフリーラジカル消去能、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）

やグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の活性上昇などが関与していることが報告されている²⁶⁻³⁰⁾。そこで、これまでに MAK に含有する成分研究と肥満・2型糖尿病における脳保護作用に関する研究は全くなされていないことから、国内外での研究状況を総合的に考慮して本研究計画を立案し、遂行することに獨創性があるものと考えた。そこで、第3章では、抗酸化活性を指標とした MAK 中の有効成分を探索・同定することを目的とした。MAK の強い抗酸化作用により、正常マウスはもとより肥満・2型糖尿病の虚血性脳障害に対して脳保護効果が明らかとなれば、MAK の摂取が一次および二次予防に極めて有効となり、おのずと有効成分の探索とその活性成分作用メカニズム解析にも学術的な意味が生じると考えている。従って、第4章では、単離した有効成分の神経細胞や動物モデルに対する保護作用について検討した。

MAK には、強い抗酸化作用を持つ多糖類およびトリテルペノイドなどの抗酸化活性成分の存在を予測している。MAK のこのような活性成分が体内酸化ストレスを軽減し、虚血性脳障害の早期段階で過剰産生される ROS や RNOS などを減少させ、アポトーシス経路の活性化を抑制することで病態の進展を抑制できるものと考えられる。

脳梗塞や癌など死因の上位を占める疾病や、糖尿病などの慢性疾患の根治は難しく、また、これらの病因は食生活をはじめとする生活習慣に大きく依存する。つまり、食生活を改善し、食品や食品成分の機能を有効に活用した疾病の予防あるいは疾病の発症を見過ごさないようにする初期の治療が今後益々重要になるものと考えられる。

本研究において、MAK の機能性食品としての有用性が評価できれば、今後、医薬品に匹敵する効果を持つ食品でありながら脳障害の軽減が期待できる機能性食品として、さらに疾病の予防にも利用することが十分に期待できる。さら

に、活性本体が明らかになれば、治療を目的とした新薬開発にも寄与できるものと考えて、研究を進めることにした。

以下に、虚血性脳障害のメカニズムと本研究の目的をChapterごとに記載した。

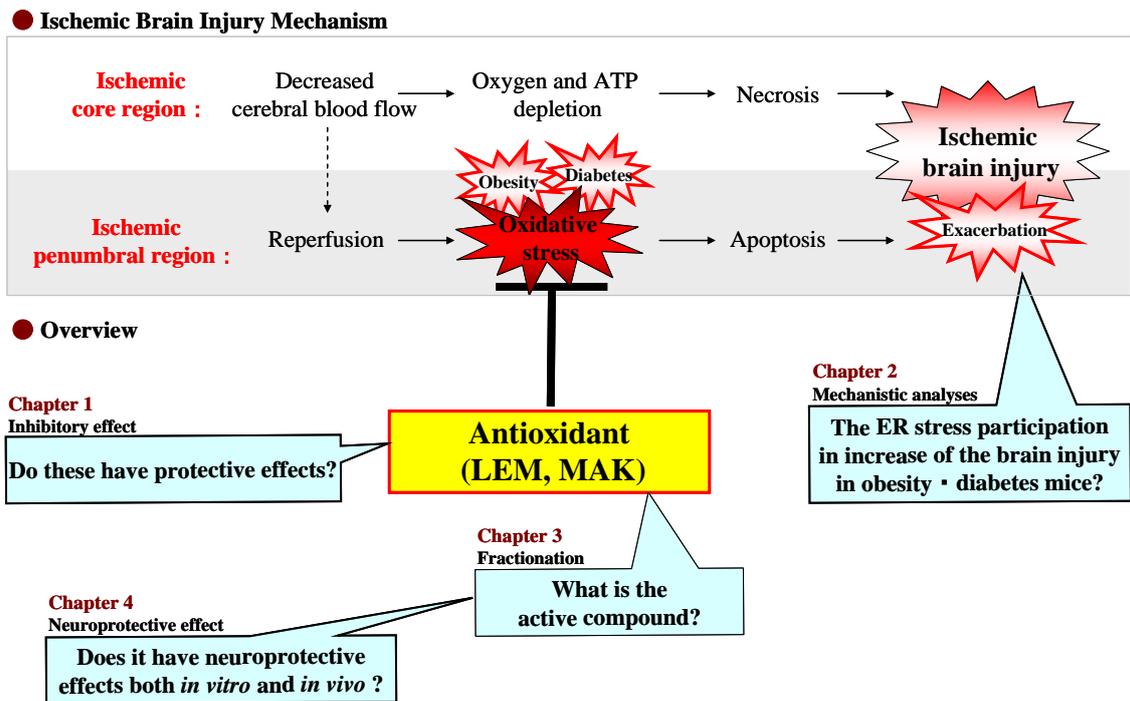


Fig. 2 Ischemic brain injury mechanism reported and overview of the experiment

第1章 マウスの虚血性脳障害に対する菌糸体抽出物の脳保護効果

虚血性脳障害は、虚血または再灌流時に増大する酸化ストレスによって脳細胞のアポトーシスを誘導する。虚血周辺領域の細胞死は、早期薬物治療によってその進行を防ぐことが可能であることから、酸化ストレスの軽減をターゲットとした抗酸化物質による神経保護療法が注目され、これまでに抗酸化活性を有する天然物による脳保護効果に関していくつか報告されている¹⁰⁻¹³。

近年、様々な食用キノコ（椎茸、霊芝など）の生理活性が注目され、これらを原料とした生活習慣病対策用の健康食品が数多く開発されている。そこで、第1章では、強い抗酸化活性を有する椎茸菌糸体培養培地抽出物（LEM）と霊芝菌糸体培養培地抽出物（MAK）の有効性について検討した。

現在、健康食品として用いられているLEMとMAKは、バガスと脱脂した米糠の混合固形培地に椎茸の菌糸体を接種させたLEMあるいは霊芝の菌糸体を接種させたMAKを約3.5ヶ月間培養後、子実体発生直前に、菌が繁茂した状態で培地ごと粉碎し、熱水抽出、凍結乾燥させたものである。これまでの椎茸や霊芝に関する報告には、子実体を用いた実験報告が多いものの、子実体は採取した地域や時期などによって品質が一定でないことから、効果にばらつきが多いことが報告されている。一方、LEMやMAKは一定の培地と由来が明確となっている菌糸体を用いて、コントロールされた条件下で培養されており、品質が安定していることが特徴である。これらの抽出物には、菌糸体成分に加え、菌糸体による培地の分解物や菌糸体の自己消化成分など多種類の成分が含まれ、これらの多様な成分が様々な生物学的活性を示すと考えられる。

これまでに、MAKとLEMには多様な生理活性が明らかとなっているが、その中でも両抽出物には強い抗酸化活性が認められており、これらの活性を比較したところ、DPPHフリーラジカル消去能はMAKとLEMで同程度であるものの、スーパーオキシドアニオン（ O_2^- ）消去能はLEMに比べMAKが1.5倍強いことが分かった。

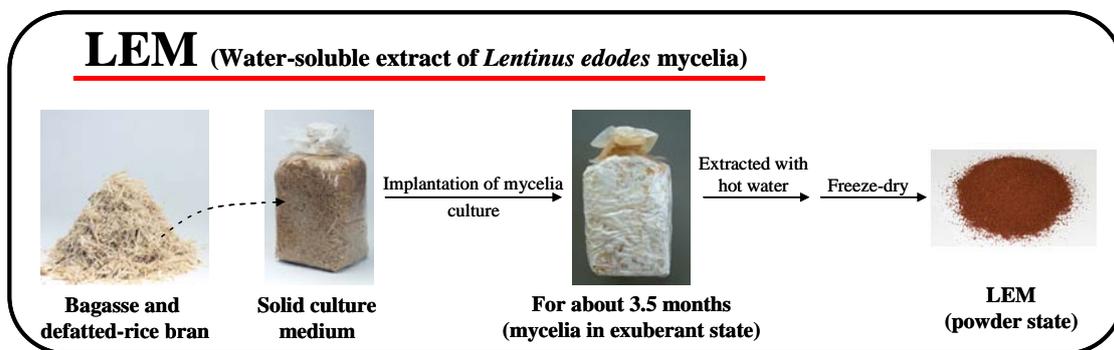
そこで、第1節では、LEMによる脳保護作用を正常マウスを用いて検討し、第2節では、酸化ストレスの増加を伴う肥満・2型糖尿病モデルマウスに対し

て LEM よりも抗酸化能が強い MAK の脳保護作用について検討した。

第 1 節：正常マウスの H/I 障害に対する LEM の脳保護作用¹⁴⁾

椎茸菌糸体培養培地抽出物 (LEM) は、椎茸 (*Lentinum edodes*) の菌糸体を砂糖キビ搾汁残渣であるバガスと脱脂した米糠からなる固形培地に接種し、一定期間培養後、子実体発生直前に培地と共に熱水抽出・凍結乾燥したもので、健康食品としてすでに 40 年近い実績がある。

Preparation Method of LEM

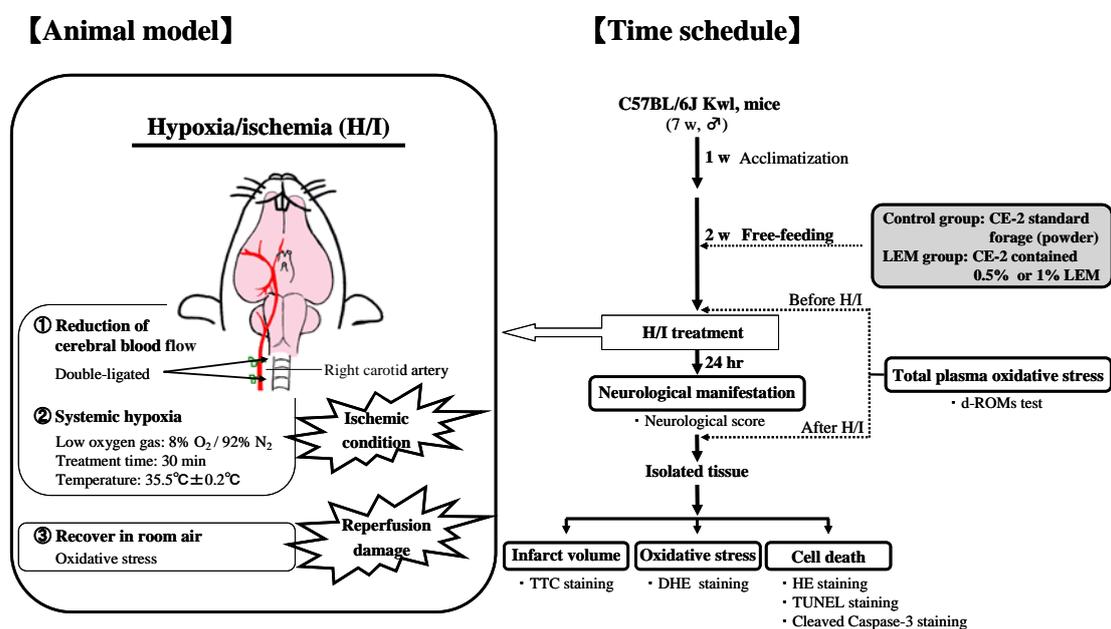


LEM に関する基礎研究は数多く、これまでに抗ウイルス作用^{31, 32)}、抗腫瘍作用^{33, 34)}、免疫調節作用^{35, 36)}など様々な生理活性が明らかにされている。また、肝障害に対する効果についてはすでに臨床研究が行われており、LEM の摂取が薬剤性肝障害患者³⁷⁾や、慢性肝炎患者³⁸⁾に対して有効であることが報告されている。また、LEM はラジカル性肝障害モデルである四塩化炭素処置ラットの肝障害に対する防御効果を示し、その作用機序にはフリーラジカル消去による肝ミトコンドリアの脂質過酸化抑制作用が関与することが報告されている³⁹⁾。加えて、LEM には SOD 様活性やラジカル消去能、過酸化脂質産生抑制能などの抗酸化作用^{40, 41)}を有することが報告されており、LEM の多様な生理活性の発現メカニズムに少なからず抗酸化作用の寄与が推察され、糖尿病や高血圧、動脈硬化による虚血性疾患などの生活習慣病に対する予防・改善効果が期待される⁴²⁾。

そこで第 1 節では、正常マウスの虚血性脳障害モデルにおける酸化ストレス障害に対する LEM の脳保護効果を評価することにした。

実験の手順を Scheme 1 に示した。正常マウスとして C57BL/6 Kwl 系雄性マウスを用いた。本研究では、虚血性脳障害モデルとして低酸素脳虚血 (H/I) 障害モデルを用いた。左図に示すように、H/I 処置は、右総頸動脈の結紮により脳の血流を低下させ、さらに、低酸素負荷 (8% O₂ / 92% N₂ 低酸素、35.5°C で 30 分間負荷) により脳虚血時の酸素欠乏状態を再現した後、通常の空気に戻すことによって酸化ストレスによる再灌流障害を誘発した。

Scheme 1 Experimental Protocol



LEM を 0.5% または 1% (w/w) で混合した粉末飼料を 14 日間、自由に摂取させた結果、通常の粉末飼料のみを与えた Control 群のマウスの体重および摂食量と比べて、両パラメーターには有意差は認められなかった (Tables 1 & 2)。因みに、0.5%、1% LEM 投与群の平均体重あたりの LEM 摂取量は、それぞれ約 0.75 および 1.5 g/kg body weight/day であった。

Table 1 Influence of Mice Body Weight during LEM Intake

		Body weight (g)		
Day	Group	Control	0.5% LEM	1% LEM
	1		20.49 ± 0.68	20.49 ± 1.04
4		21.00 ± 0.41	21.27 ± 1.37	21.40 ± 0.78
8		21.52 ± 0.33	21.66 ± 1.78	21.75 ± 0.95
11		22.38 ± 0.39	22.25 ± 1.69	22.65 ± 0.89
15		23.20 ± 0.41	22.96 ± 1.44	23.31 ± 1.01

Table 2 Influence of Feed Intake during LEM Intake

		Feed intake (g)		
Day	Group	Control	0.5% LEM group (LEM contend)	1% LEM group (LEM contend)
	1		2.98 ± 0.05	2.91 ± 0.03 (14.55 ± 0.15 mg)
3		3.15 ± 0.02	3.15 ± 0.05 (15.75 ± 0.25 mg)	3.21 ± 0.01 (32.10 ± 0.10 mg)
6		3.09 ± 0.15	3.22 ± 0.02 (16.10 ± 0.10 mg)	3.19 ± 0.16 (31.90 ± 1.60 mg)
9		3.14 ± 0.10	3.32 ± 0.16 (16.60 ± 0.80 mg)	3.41 ± 0.13 (34.10 ± 1.30 mg)
11		3.14 ± 0.09	3.45 ± 0.17 (17.25 ± 0.85 mg)	3.54 ± 0.04 (35.40 ± 0.40 mg)
14		3.17 ± 0.21	3.50 ± 0.29 (17.50 ± 1.45 mg)	3.30 ± 0.53 (33.00 ± 5.30 mg)

また、今回用いた LEM の投与量は、動物実験に用いられている LEM の標準的投与量の範囲内 (0.3~2.7 g/kg body weight/day) であった。一方、これはヒトを対象とした研究における投与量 (約 25~60 mg/kg body weight/day) の数十倍にあたるが、通常、実験動物に薬物投与を行う場合は、ヒトの 10 倍量を目安とすることから、妥当な量であると考えられる。

また、低酸素脳虚血マウスの体内酸化ストレス度に対する LEM の効果を血中ヒドロペルオキシド濃度を指標とした d-ROMs テストにより測定した。Control 群では、H/I 処置前 (56.75 ± 8.34 U.CARR) に比べ、H/I 処置 24 時間後の体内酸化ストレス度が有意に増大した (109.00 ± 16.79 U.CARR)。一方、0.5%、1% LEM 両群の H/I 処置前の酸化ストレス度は、Control 群と差はなかったが、H/I 処置 24 時間後の 1% LEM 群の酸化ストレス度は、Control 群よりも有意に減少 (77.00 ± 7.00 U.CARR) した。またデータは示さないが、擬似手術群である Sham 群においては、擬似手術 24 時間後における体内酸化ストレス度の増大は認められなかった (Fig. 3)。

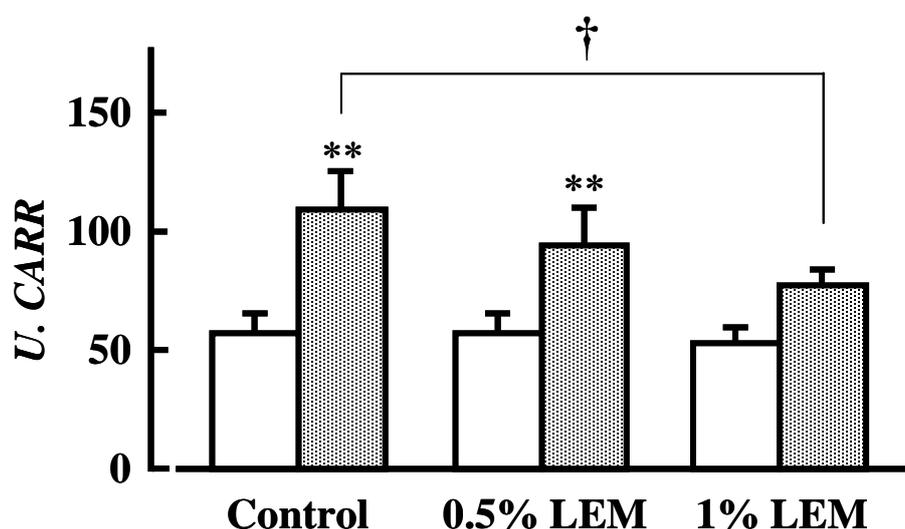


Fig. 3 Effects of chronic intake of LEM on total plasma oxidative stress in the mice before H/I (open bar) and 24 hr after H/I (dotted bar) determined by d-ROMs test. The data are represented as means \pm S.D. from 4-7 mice in each group. ** $P < 0.01$ compared with each before H/I, paired t -test. † $P < 0.05$ compared with the control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

低酸素脳虚血による脳障害に対する LEM の保護効果について、H/I 処置 24 時間後に Table 12 (実験の部参照 p. 84) に示した六つの項目に沿って神経症状を評価した。H/I 処置 24 時間後における Control 群 (7.60 ± 1.95) の神経症状スコアは、症状が全く認められなかった Sham 群 (18.00 ± 0) と比べて有意に低下した。これに対し、0.5% LEM (11.20 ± 2.77) および 1% LEM (15.00 ± 2.45) 群では、Control 群と比較して H/I 処置による神経症状の悪化が有意に抑制された (Fig. 4)。

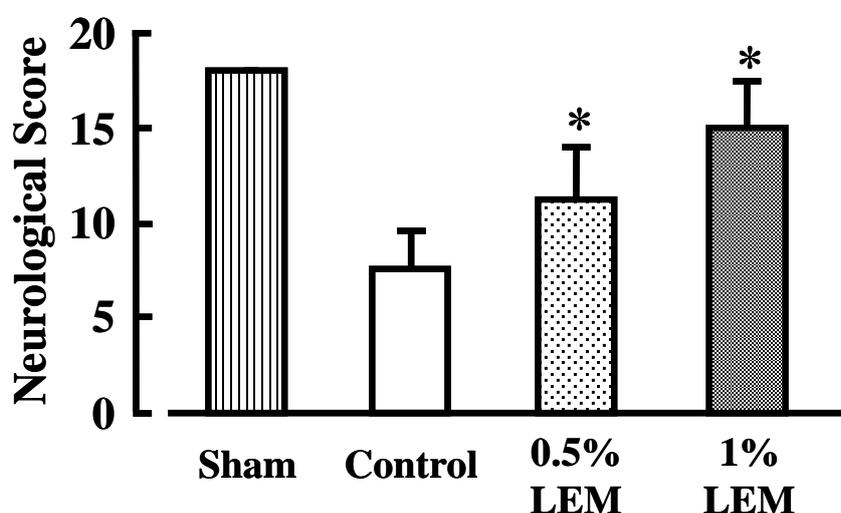


Fig. 4 Effects of chronic intake of LEM on neurological score determined in the mice 24 hr after H/I. The neurological evaluations consisted of the five tests, spontaneous activity for 3 min, symmetry in the movement of left forelimb and hind limb, floor walking, response to vibrissae touch, and response to side stroking. The score for each mouse was the sum of all five individual test scores (Table 12). The maximum neurological score of a normal mouse with no deficit is 18. The data are represented as means \pm S.D. from 4-7 mice in each group. * $P < 0.05$ compared with the control group, Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney U test.

次に、H/I 処置 24 時間後の脳を TTC 染色し、梗塞巣体積を測定した結果、Sham 群の脳には梗塞は確認されなかったが、Control 群 ($31.94 \pm 9.10\%$) では、H/I 処置により右半球の皮質、線条体および海馬の広範囲に梗塞巣が形成された。0.5% LEM ($15.88 \pm 8.37\%$) および 1% LEM ($9.98 \pm 6.45\%$) 群の梗塞巣の形成は、皮質および線条体の一部分にのみ認められ、Control 群と比較して有意に減少した (Fig. 5)。

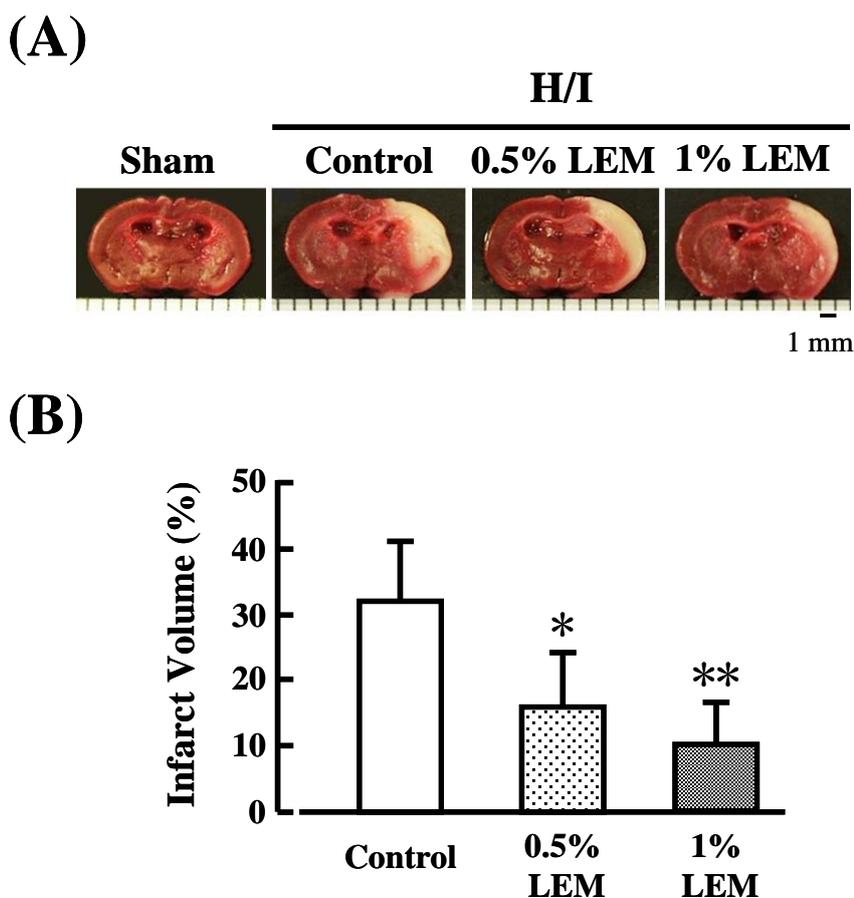


Fig. 5 Effects of chronic intake of LEM on infarction volume in the mice brain determined in the mice 24 hr after H/I by TTC staining. (A) Representative data of triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic ingestion of LEM. Scale bar = 1 mm. (B) The data are represented as means (% of control) \pm S.D. from 4-7 mice in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

H/I 処置によって誘発された脳実質における O_2 産生に対する LEM の影響を組織化学的に検討するため、マウス脳冠状切片の DHE 染色を行った。その結果、Control 群では H/I 処置によって海馬 CA1、CA2 野および大脳皮質体性感覚野に多数の DHE 陽性細胞が認められたが、LEM 摂取群では陽性細胞数が有意に減少した (Fig. 6)。

また、低酸素脳虚血によるアポトーシスに対する LEM の効果を免疫染色により評価した。

まず、H/I 処置によって誘発された脳細胞障害に対する LEM の保護効果を HE 染色により検討した。その結果、Control 群では H/I 処置によって海馬 CA1、CA2 野および大脳皮質体性感覚野に濃縮染色された核を有する死細胞が多数認められた。しかし、Control 群と比較し、0.5% LEM 群および 1% LEM 群においては、死細胞数が有意に抑制された (Fig. 7)。

さらに、神経細胞の細胞死に対する LEM の効果を TUNEL 染色により評価した。その結果、Control 群では H/I 処置により海馬 CA1、CA2 野および大脳皮質体性感覚野において多数の TUNEL 陽性細胞が認められたが、これと比較し、LEM 群では TUNEL 陽性細胞数が有意に減少した (Fig. 8)。

また、アポトーシスを促進するカスパーゼ系の活性化の指標として、Cleaved Caspase-3 の免疫染色を行い、陽性細胞数を測定した。Cleaved Caspase-3 陽性細胞は、TUNEL 陽性細胞の分布とほぼ一致し、TUNEL 染色の結果と同様に LEM 群では Control 群と比較し、陽性細胞数が有意に減少した (Fig. 9)。

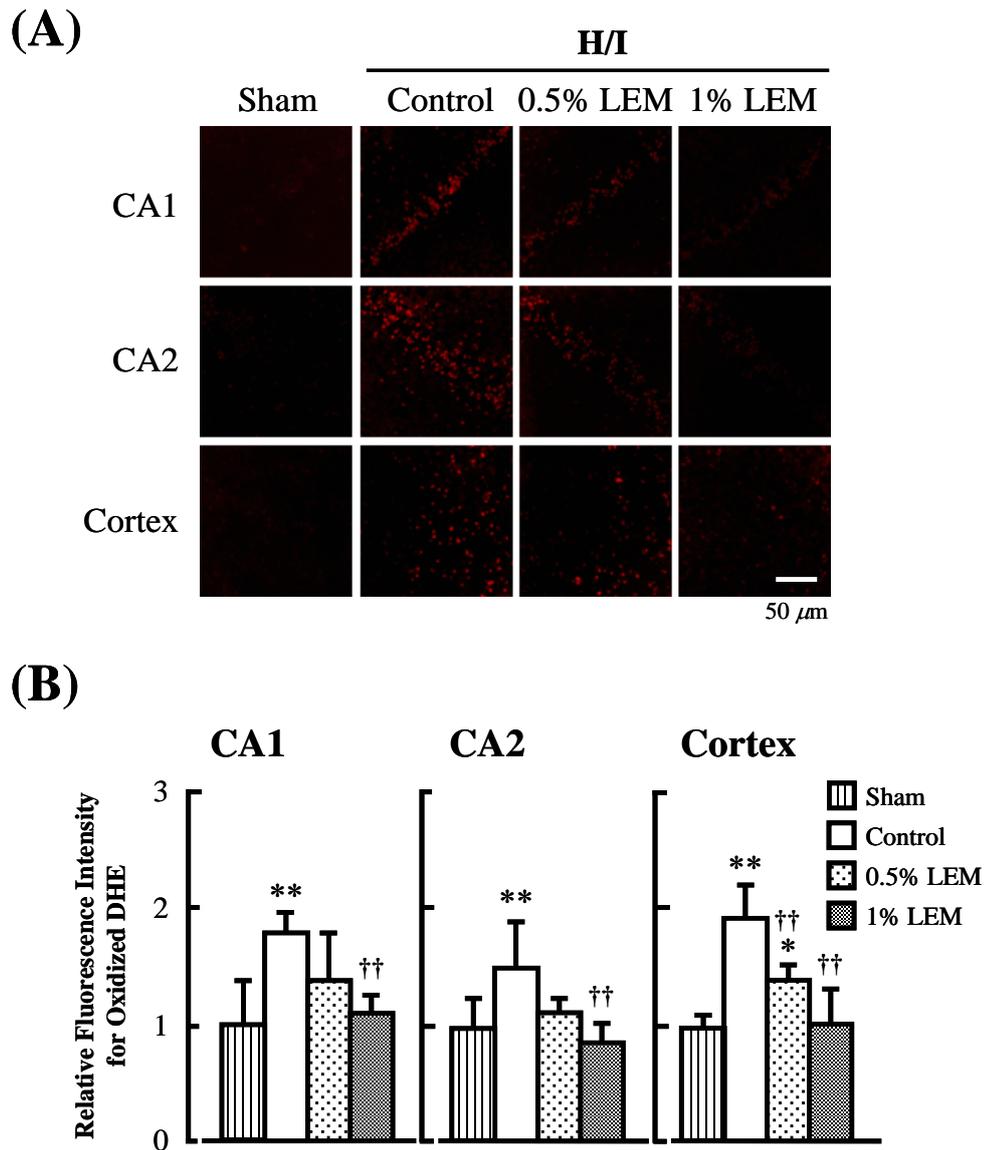


Fig. 6 Effects of chronic intake of LEM on the level of superoxide production in the mice brain tissue determined 24 hr after H/I by DHE staining. (A) Representative data of DHE staining in the hippocampus, the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic LEM ingestion. Scale bar = 50 μ m. (B) The values of fluorescence intensity of each group are represented as means \pm S.D. (n = 4-7) relative to those of their respective sham groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the respective sham group. $\dagger\dagger$ $P < 0.01$ compared with the respective control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

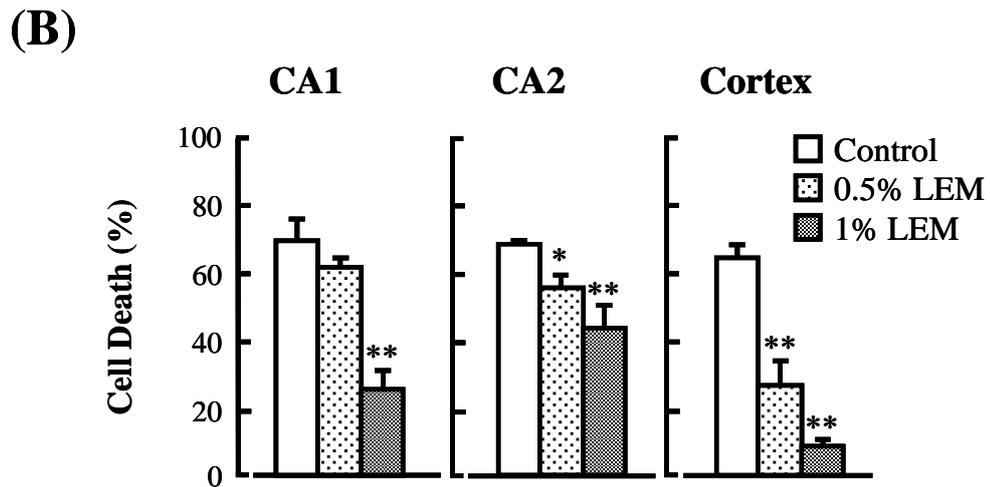
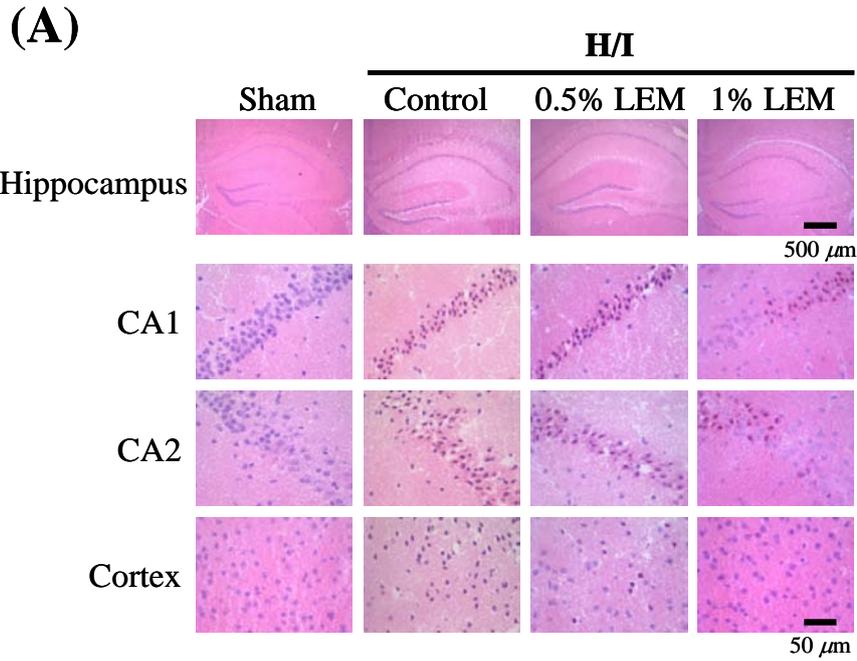


Fig. 7 Effects of chronic LEM ingestion on the number of cell deaths in the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area of the mice brain determined 24 hr after H/I by HE staining. (A) Representative data of HE staining in the hippocampus, the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic LEM ingestion. Scale bars = 500 and 50 μm . (B) The data are represented as means \pm S.D. from 4 mice in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the respective control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

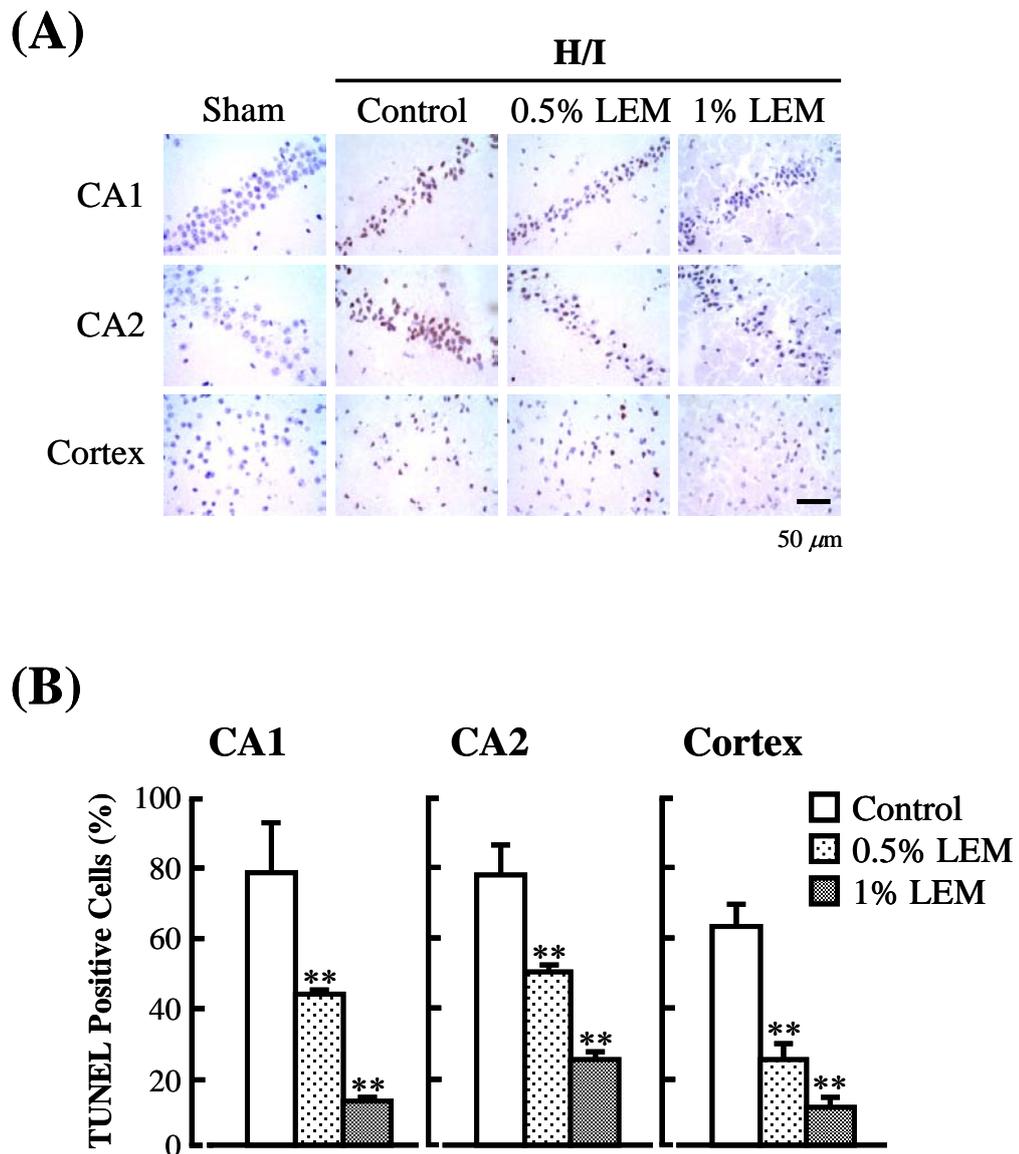


Fig. 8 Effects of chronic intake of LEM on the number of TUNEL positive cells in the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area in the mice brain determined 24 hr after H/I by TUNEL staining. (A) Representative data of TUNEL staining in the hippocampus, CA1, CA2 of the hippocampus, and the somatosensory area of the cortex from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic LEM ingestion. Scale bar = 50 μ m. (B) The data are represented as means \pm S.D. from 4 mice in each group. ** $P < 0.01$ compared with the respective control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

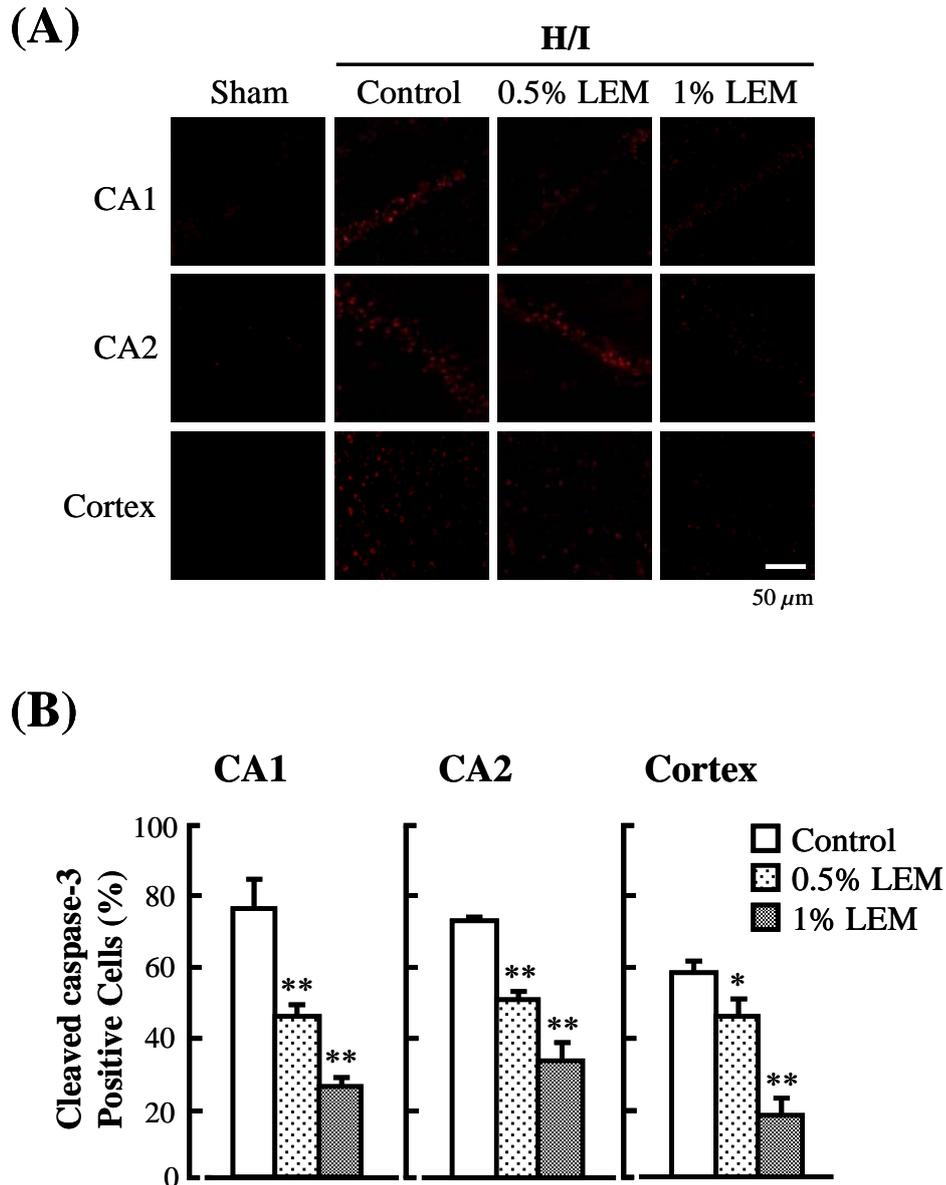


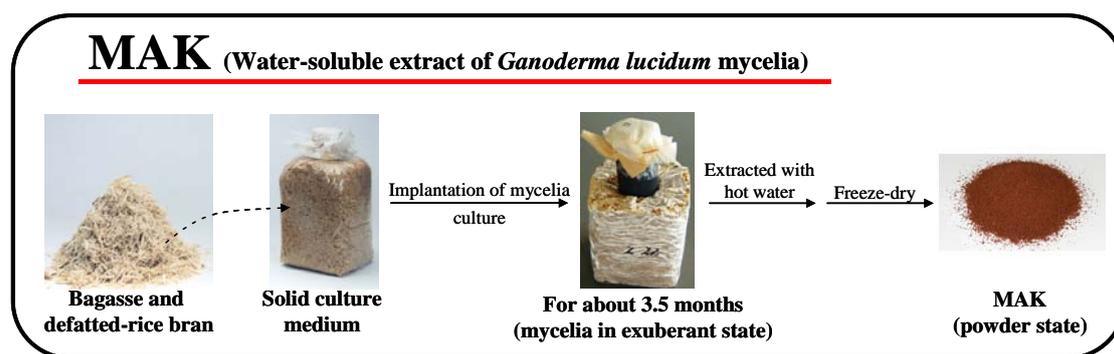
Fig. 9 Effects of chronic intake of LEM on the number of cleaved caspase-3 positive cells in the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex in the mice brain determined 24 hr after H/I by immunostaining of cleaved caspase-3. (A) Representative data of cleaved caspase-3 immunostaining in the hippocampus, the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic LEM ingestion. Scale bar = 50 μm . (B) The data are represented as means \pm S.D. from 4 mice in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the respective control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

第2節：肥満・2型糖尿病モデルマウスのH/I障害に対するMAKの脳保護作用

糖尿病は、虚血性脳障害の危険因子の一つであり、脳梗塞の発症率と共に再発率を上昇させることが知られている。特に、肥満を伴う2型糖尿病は、日本の糖尿病患者数の約95%を占めており、酸化ストレスを誘導する肥満や糖尿病の併発は、脳障害を更に悪化させる点で問題視されている^{16,17)}。

霊芝には、非常に広範な生理作用に影響をおよぼす成分が含まれ、これまでに薬理的効果として免疫賦活作用⁴³⁾、抗腫瘍作用⁴⁴⁾など多くの報告がある。霊芝菌糸を由来とする霊芝菌糸体培養培地抽出物(MAK)は、LEMに比べて抗酸化活性が強く、すでに、正常マウスにおける虚血性脳障害に対して脳保護作用が認められることが報告されている¹⁵⁾。さらに、2型糖尿病モデルマウスに対して血糖上昇抑制効果を示し、インスリン抵抗性を改善することが明らかとなっている²⁰⁾。また、抗酸化作用を有していることも明らかになっており、ストレプトゾトシン(STZ)によって誘導した1型糖尿病態モデルラットにおいて、上昇した酸化ストレスを緩和し、中大脳動脈閉塞/再灌流(MCAO/Re)処置による脳梗塞巣を顕著に減少させる⁴⁵⁾。しかし、2型糖尿病モデルマウスにおける虚血性脳障害に対するMAKの脳保護効果については明らかではない。

Preparation Method of MAK

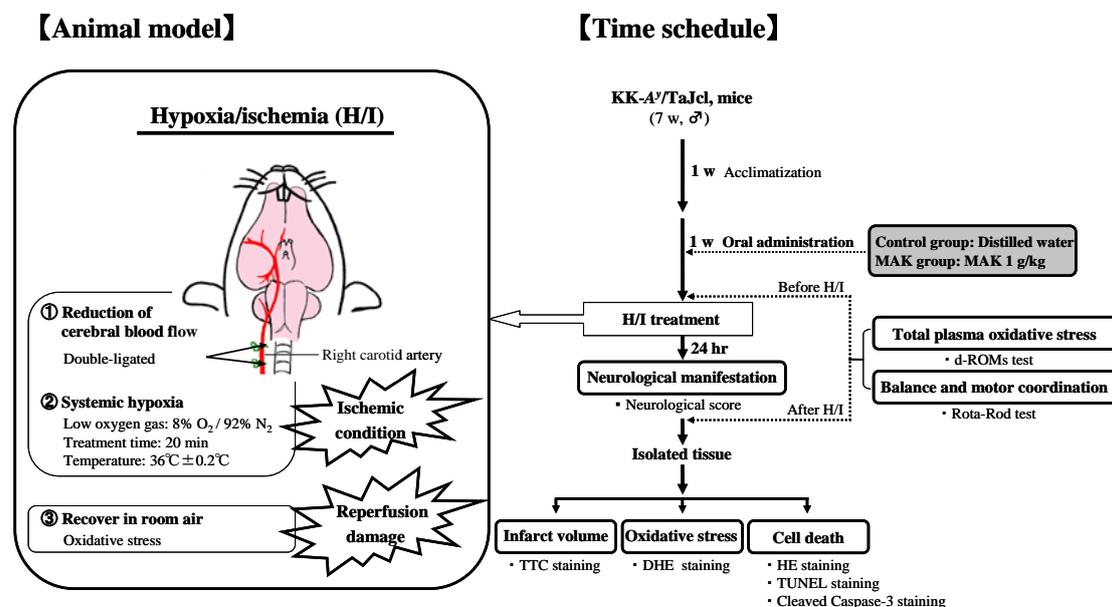


そこで第1章、第2節では、肥満・2型糖尿病モデルマウスのH/I障害におけるMAKの脳保護作用について評価することを目的とした。

実験の手順をScheme 2に示した。肥満・2型糖尿病モデルマウスとしてKK-A^y/TaJcl系雄性マウス(KK-A^yマウス)を用いた。H/I障害モデルの作製は、

第 1 節の正常マウスによる H/I モデル作製と同様な手技で行った。ただし、KK-A^y マウスの場合は、H/I 処置による障害が重篤化して死亡率が高くなるため、低酸素負荷ガラス容器内の温度を 36.0°C に維持し、負荷時間を 20 分とした。

Scheme 2 Experimental Protocol



マウスの体重および摂取量に対する MAK の影響を測定した。MAK 1 g/kg body weight/day を 1 週間毎日経口投与した結果、MAK 群あるいは水を投与した Control のマウス群間で体重 (Table 3) および摂食量 (Table 4) に有意な差は認められなかった。

Table 3 Influence of Mice Body Weight during MAK Intake

Group	Body weight (g)		
	1 Day	4 Day	7 Day
H/I	37.16 ± 1.28	37.78 ± 1.56	38.38 ± 1.46
MAK+ H/I	37.00 ± 1.32	37.31 ± 1.34	37.57 ± 1.41
Control-Sham	37.27 ± 1.66	37.52 ± 1.64	38.00 ± 1.65
MAK-Sham	36.88 ± 1.02	37.46 ± 1.14	37.97 ± 1.25

Table 4 Influence of Feed Intake during MAK Intake

Group	Feed intake (g)		
	1 Day	4 Day	7 Day
H/I	5.99 ± 0.80	6.37 ± 0.65	6.29 ± 0.57
MAK+H/I	5.98 ± 0.68	6.05 ± 0.65	5.84 ± 0.63
Control-Sham	5.93 ± 0.70	6.03 ± 0.52	6.40 ± 0.66
MAK-Sham	6.18 ± 0.66	6.17 ± 0.62	6.06 ± 0.92

高血糖状態は、糖化による内在性抗酸化酵素の活性が低下すると共に糖化反応に伴い活性酸素種の産生が増加する⁴⁶⁻⁴⁸⁾。さらに、慢性的な酸化ストレスは非酵素的抗酸化成分を枯渇させると考えられている^{49, 50)}。そこで、低酸素脳虚血マウスの体内酸化ストレス度に対する MAK の効果を、血中ヒドロペルオキシド濃度を指標とした体内酸化ストレス度を d-ROMs テストにより測定した。MAK を投与した Sham 群では、低酸素負荷前は Control 群との間で差は認められなかったが、低酸素負荷後は体内酸化ストレス度が有意に抑制された (Fig. 10A)。H/I 処置後では、水投与の Control 群では、H/I 処置前 (128.33 ± 23.94 U.CARR) に比べ、H/I 処置 24 時間後 (168.29 ± 27.46 U.CARR) の体内酸化ストレス度が有意に増大した。これに対して、MAK 群の H/I 処置前は Control 群との間で差はなかったが、H/I 処置 24 時間後 (136.29 ± 36.31 U.CARR) では、Control 群より有意に減少した (Fig. 10B)。

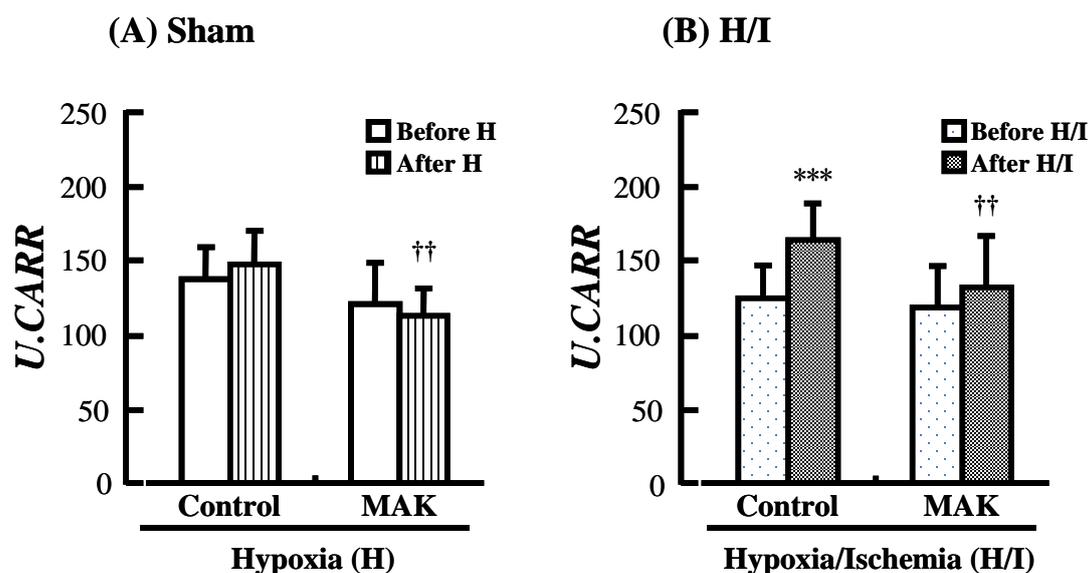


Fig. 10 Effects of chronic intake of MAK on total plasma oxidative stress in the mice before H/I and 24 hr after H/I determined by d-ROMs test. The data are represented as means \pm S.D. from 8-21 mice in each group. *** $P < 0.001$ compared with each before H/I, paired t -test. $\dagger\dagger$ $P < 0.01$ compared with the control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

H/I処置による脳障害に対するMAKの保護効果を、H/I処置24時間後に Table 12（実験の部参照 p. 84）に示した六つの項目について神経症状を評価した。その結果、Control-Sham 群、MAK-Sham 群では、神経症状の悪化は観察されなかった。これに対して、H/I 処置により症状の悪化が認められたが、H/I 処置 24 時間後における Control の水投与群 (8.53 ± 5.06) と比較し、MAK 投与群 (15.25 ± 2.46) では神経症状の悪化が有意に抑制された (Fig. 11)。

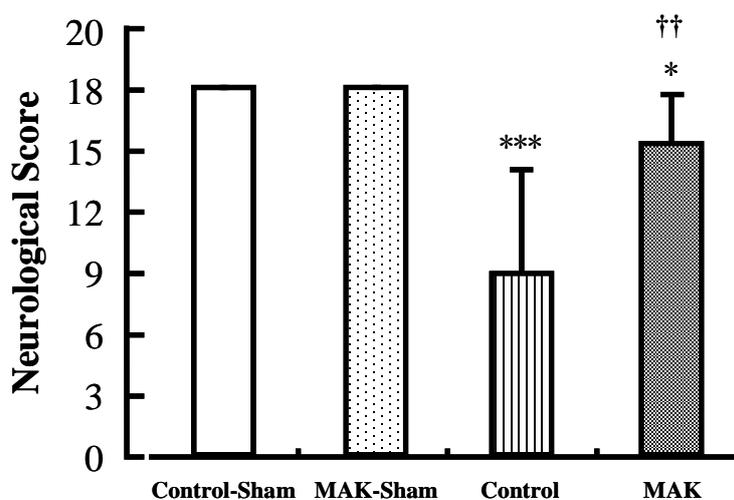


Fig. 11 Effects of chronic intake of MAK (1 g/kg, p.o.) with neurological score determined in the mice 24 hr after H/I. The neurological evaluations consisted of five tests (Table 12). The score for each mouse was the sum of all five individual test scores. The maximum neurological score of a normal mouse with no deficit is 18. The data are represented as means \pm S.D. from 8-21 mice in each group. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with sham group, †† $P < 0.01$ compared with the control group, Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney U test.

また、脳障害に対する MAK の保護効果について、Rota-Rod テストを用いた H/I 処置前後の運動機能を測定した。その結果、Control と MAK のそれぞれ Sham 群との間で、低酸素負荷前後の運動機能に変化は認められなかった (Fig. 12A)。一方、H/I 処置後の Control 群および MAK 群ともに 24 時間後の運動機能が低下したが、Control 群 (72.35 ± 70.66) と比べ、MAK 投与群 (190.77 ± 67.53) では、H/I 処置後の運動機能の低下が顕著に抑制された (Fig. 12B)。

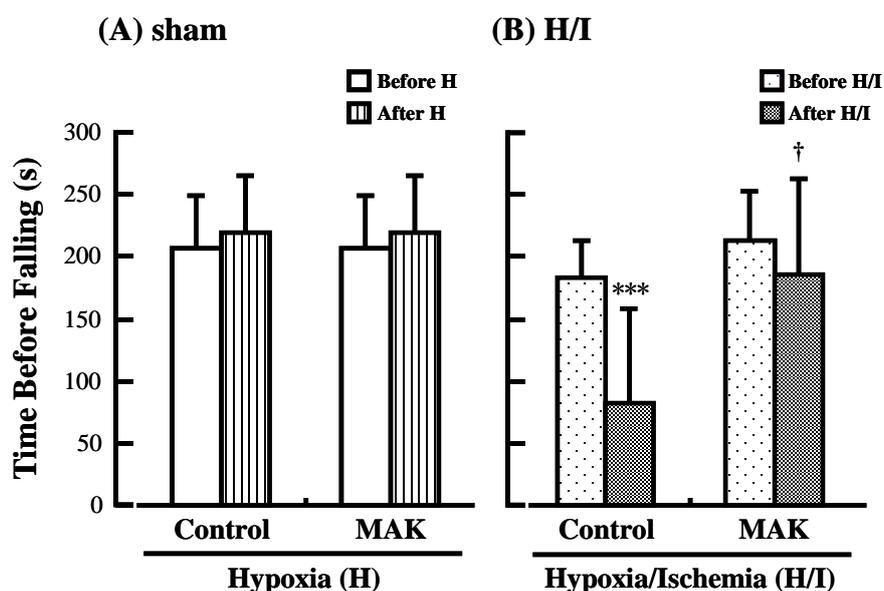


Fig. 12 Effects of chronic intake of MAK assessed for balance and motor coordination assessed in the mice before H/I and 24 hr after H/I. Sham group (A) and H/I group (B). The data are represented as means \pm S.D. from 8-21 mice in each group. *** $P < 0.001$ compared with before H/I, paired t -test. $\dagger P < 0.05$ compared with the control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

次に、H/I 処置 24 時間後に摘出した脳を TTC 染色し、梗塞巣体積を測定した結果、Sham 群の脳には梗塞は確認されなかった。一方、水を投与した Control 群では、H/I 処置により右半球の皮質、線条体、および海馬など広範囲に梗塞巣が形成された。これに対して、MAK を 1 週間投与した群における梗塞巣の形成は皮質の一部にのみ認められ、水投与群 ($30.90 \pm 14.72\%$) と比較して、MAK 投与群 ($8.65 \pm 11.27\%$) では梗塞巣が有意に減少した (Fig. 13)。

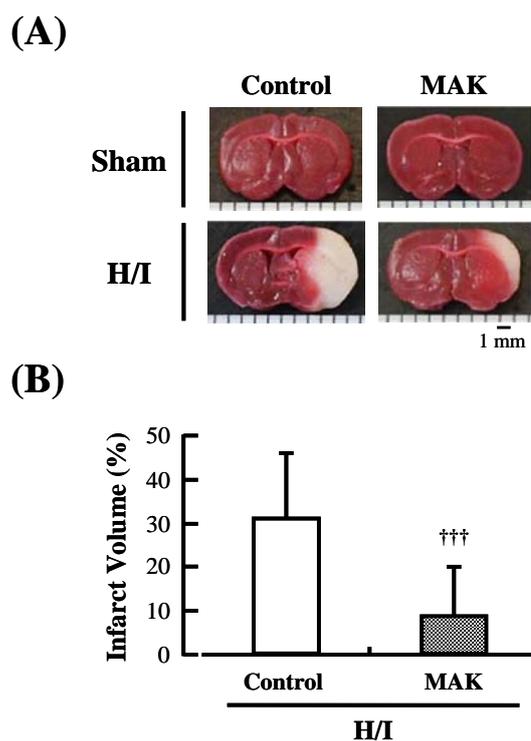


Fig. 13 Effects of chronic intake of MAK on infarction volume in the mice brain determined in the mice 24 hr after H/I by TTC staining. (A) Representative data of triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic ingestion of MAK (1 g/kg, p.o.). Scale bar = 1 mm. (B) The data are represented as means (% of control) \pm S.D. from 16-20 mice in each group. $^{\dagger\dagger\dagger} P < 0.001$ compared with the control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

H/I処置によって誘発された脳実質におけるO₂産生に対するMAKの影響を組織化学的に検討するために、マウス脳冠状切片をDHE染色した。その結果、Control群ではH/I処置によって海馬CA1、CA2野および大脳皮質体性感覚野に多数のDHE陽性細胞が認められたが、MAK群では陽性細胞数が有意に減少した (Fig. 14)。

また、低酸素脳虚血による海馬CA1、CA2、大脳皮質におけるアポトーシスに対するMAKの効果を免疫染色により評価した。まず、H/I処置によって誘発された脳細胞障害に対するMAKの保護作用をHE染色によって検討した結果、Control群の海馬CA1、CA2野および大脳皮質体性感覚野に濃縮染色された核を有する細胞が多数認められたのに対して、MAK投与群ではControl群と比較し、その細胞数が有意に減少した (Fig. 15)。

続いて、H/I処置によって誘発される脳細胞の細胞死に対するMAKの抑制効果の評価するためTUNEL染色により評価した。その結果、Control群では、H/I処置によりペナンプラ領域の海馬CA1および大脳皮質体性感覚野に多数のTUNEL陽性細胞が認められたが、MAK投与群では陽性細胞数が有意に減少した (Fig. 16)。

さらに、H/I処置によって誘発された神経細胞のアポトーシスを促進するカスパーゼ系活性化の指標として、Cleaved Caspase-3の免疫染色を行い、陽性細胞数を測定した。その結果、Cleaved Caspase-3陽性細胞は、TUNEL陽性細胞と類似の分布を示し、TUNEL染色の結果と同様に、Control群と比較してMAK群では陽性細胞数が有意に減少した (Fig. 17)。

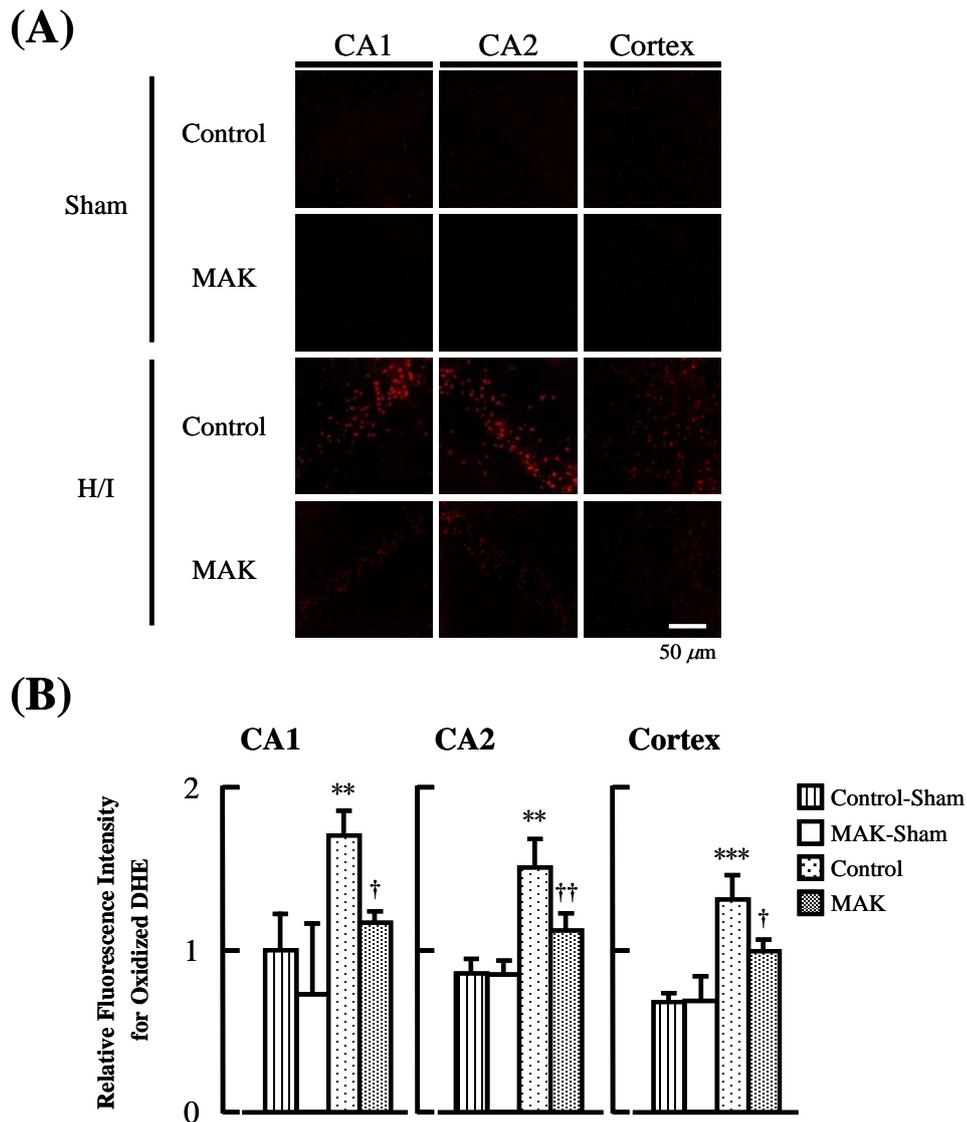


Fig. 14 Effects of chronic intake of MAK on the level of superoxide production in the mice brain tissue determined 24 hr after H/I by DHE staining. (A) Representative data of DHE staining in the hippocampus, the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic MAK (1 g/kg, p.o.) ingestion. Scale bar = 50 μ m. (B) The values of fluorescence intensity of each group are represented as means \pm S.D. (n = 3-5) relative to those of their respective sham groups. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control-sham group, † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ compared with the respective control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

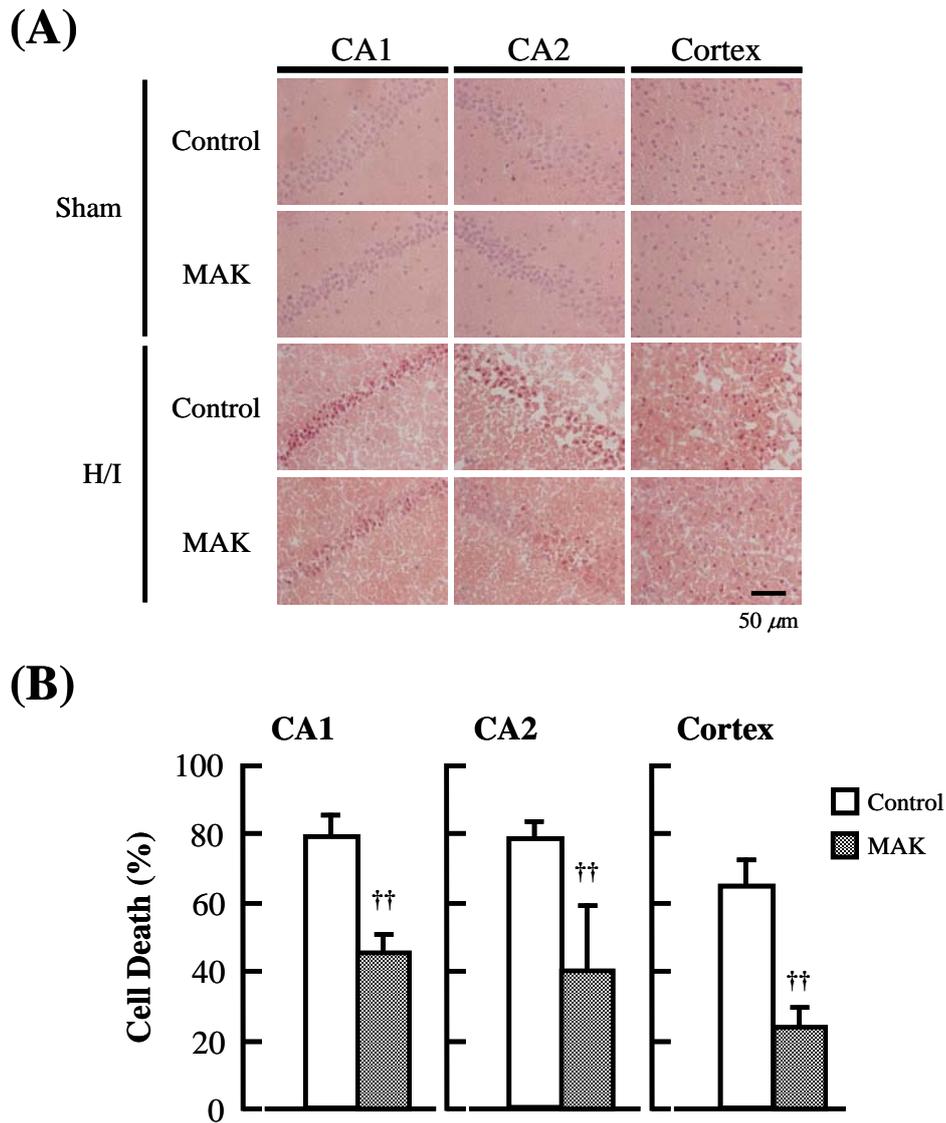


Fig. 15 Effects of chronic intake of MAK on the number of cell deaths in the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area of the mice brain determined 24 hr after H/I by HE staining. (A) Representative data of HE staining in the hippocampus, the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic MAK (1 g/kg, p.o.) ingestion. Scale bar = 50 μ m. (B) The data are represented as means \pm S.D. from 5 mice in each group. ^{††} $P < 0.01$ compared with the respective control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

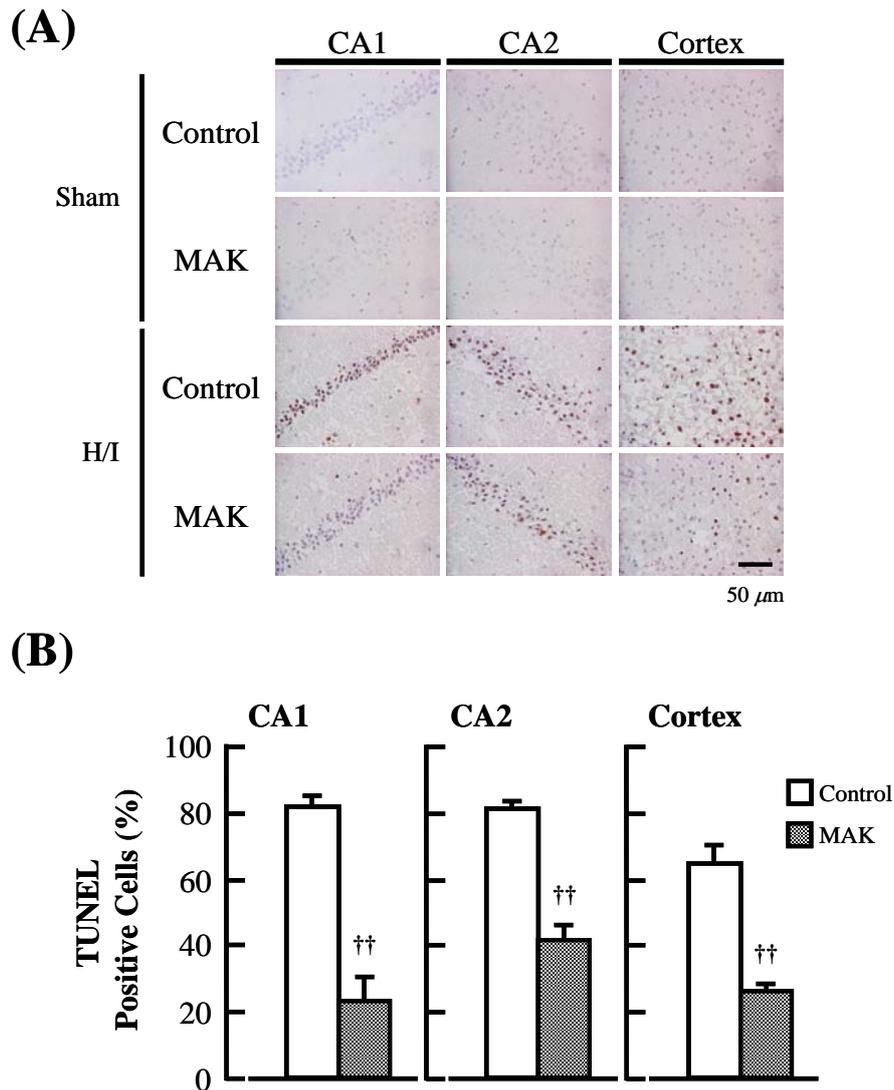


Fig. 16 Effects of chronic intake of MAK on the number of TUNEL positive cells in the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area in the mice brain determined 24 hr after H/I by TUNEL staining. (A) Representative data of TUNEL staining in the hippocampus, CA1 and CA2 of the hippocampus, and the somatosensory area of the cortex area from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic MAK (1 g/kg, p.o.) ingestion. Scale bar = 50 μ m. (B) The data are represented as means \pm S.D. from 5 mice in each group. ^{††} $P < 0.01$ compared with the respective control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

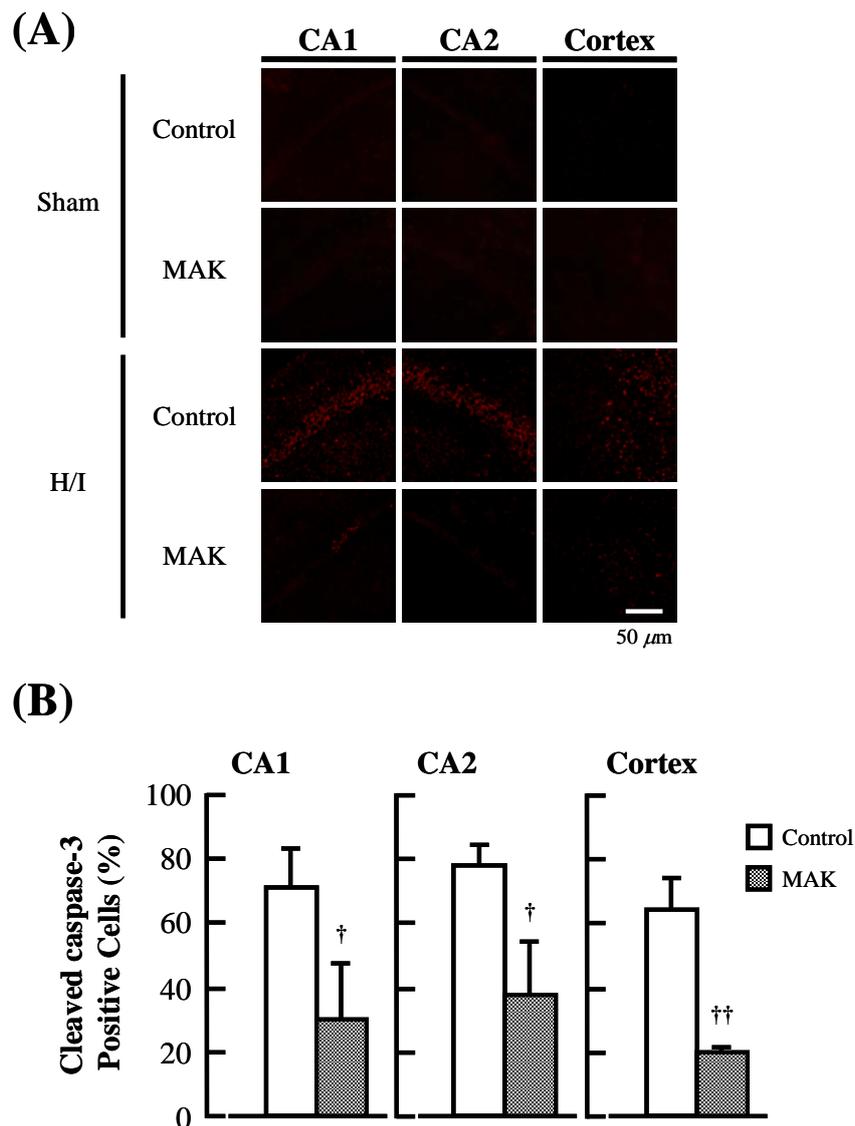


Fig. 17 Effects of chronic intake of MAK on the number of cleaved caspase-3 positive cells in the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex in the mice brain determined 24 hr after H/I by immunostaining of cleaved caspase-3. (A) Representative data of cleaved caspase-3 immunostaining in the hippocampus, the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic MAK (1 g/kg, p.o.) ingestion. Scale bar = 50 μ m. (B) The data are represented as means \pm S.D. from 5 mice in each group. [†] $P < 0.05$, ^{††} $P < 0.01$ compared with the respective control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

第3節 本章の小括および考察

本章では、虚血性脳障害に対して、強い抗酸化活性を有する菌糸体抽出物である LEM と MAK の有効性について検討した。

第1節：正常マウスの H/I 障害に対する LEM の脳保護作用

正常 (C57BL/6J) マウスにおいて、LEM の長期摂取は、H/I 処置による体内酸化ストレス度の増大、神経症状の悪化や脳梗塞巣の増大を改善した。さらに、脳組織での活性酸素種の産生を抑制し、脳細胞のアポトーシスを抑制した。以上の結果から、LEM は正常マウスにおける低酸素脳虚血障害に対して保護効果を示すことが明らかになった。

第2節：肥満・2型糖尿病モデルマウスの H/I 障害に対する MAK の脳保護作用

肥満・2型糖尿病 (KK-A^y) マウスにおいて、MAK の経口投与は、H/I 処置による体内酸化ストレス度の増大や神経症状、運動機能障害を改善し、脳梗塞巣体積を減少させた。さらに、脳組織での活性酸素種の産生を低下させるとともに、アポトーシスを抑制した。以上の結果から、MAK は肥満・2型糖尿病マウスにおける低酸素脳虚血障害に対して保護効果を示すことが明らかになった。

本章の結果から、抗酸化作用を有する菌糸体抽出物の長期摂取は、H/I 処置による脳障害に対して予防あるいは保護に有効であることが明らかになった。しかし、これら菌糸体抽出物による脳保護作用メカニズムと抽出物中の活性本体については、十分に明らかにされていない。

本研究では菌糸体抽出物の脳保護作用メカニズムの解析と抗酸化作用を指標とした活性本体を探索することも目的の一つとしている。そこで、MAK の抗酸化活性が LEM より強いことから、以降の研究は MAK に関して検討することとし、第2章で MAK の H/I 障害に対する脳保護作用様式を、第3章で

MAK 中の有効成分を探索・同定することにした。

第2章 肥満・2型糖尿病モデルマウスのH/I障害に対するMAKの脳保護作用メカニズムの解析

虚血性脳障害の発現には、虚血または再灌流時に増大する酸化ストレスを原因としてアポトーシス関連因子、炎症性関連因子、神経栄養因子、神経成長因子などが複雑に関与する。また、酸化ストレスの増加を伴う肥満や糖尿病の併発は、脳障害を更に悪化させ、その一因に小胞体（ER）ストレスが関与することが報告されている。ERストレスは、低酸素や酸化ストレスなどにより誘導され、糖尿病や肥満は酸化ストレスを増加する危険因子でもある⁵¹⁻⁵⁵。また、肥満はERストレス負荷状態をもたらし、2型糖尿病を進行させることから⁵⁶、近年2型糖尿病マウスで虚血性脳障害が悪化するメカニズムに、ERストレスが重要な役割を果たす可能性が示されたが⁵⁷、その詳細なメカニズムは現在まで明らかになっていない。また、MAKは、肥満・2型糖尿病マウスにおけるH/I障害に対して保護効果を示したが、その作用メカニズムについても明らかになっていない。

そこで本章では、肥満を伴う2型糖尿病の虚血性脳障害の悪化にERストレスが関与すると仮定し、その詳細なメカニズムについて解析するとともにMAKによる保護作用の一つにERストレス抑制が寄与しているか否かを検討することにした（Fig. 18）。

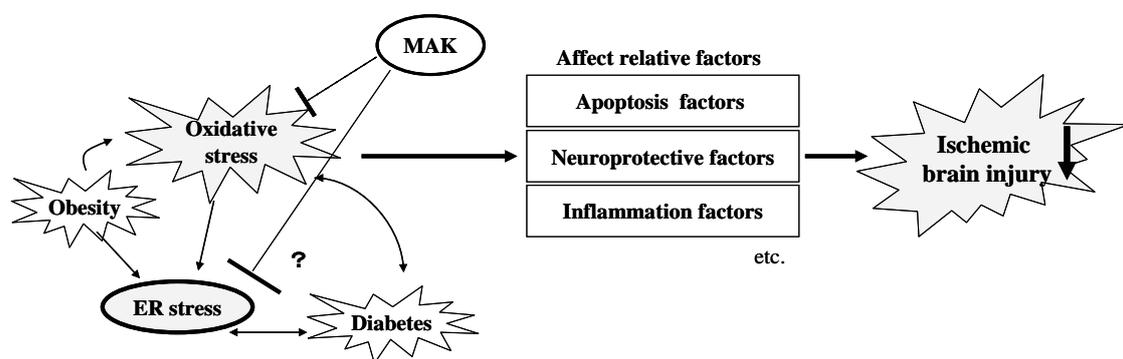


Fig. 18 ER stress augmentation of the ischemia brain injury associated with comorbid type 2 diabetes and accompanying obesity mice. MAK will be effected at an earlier time point in the development of the oxidative stress injury.

第1節 H/I 障害のメカニズムと H/I 障害メカニズムにおける MAK の作用様式

小胞体は、膜蛋白質や分泌蛋白質などの本来の立体構造を形成する機能を担っている。一方、酸化ストレスなどの細胞外からの刺激は、異常な蛋白質が小胞体に蓄積させ、機能障害を起こし小胞体ストレスを誘起する。細胞はその障害を回避し、恒常性を維持するため、細胞防御の機構を誘導する[ER ストレス応答 (UPR)]。Fig. 19 に示すように、小胞体膜には PERK、ATF6、IRE1 の3つのセンサー蛋白質があり、小胞体内に蓄積した異常蛋白質を感知する。いずれも正常時では GRP78 などの小胞体膜内シャペロン蛋白質と結合して不活性状態で存在するが、ER ストレス下では unfolding または異常 folding の蛋白質が増加すると GRP78 などの小胞体分子シャペロンが蛋白質の folding に駆り出され解離し、センサー蛋白質が活性化して次の3つの経路を介してそれぞれ下流へとシグナルを伝達する。①PERK 経路は、新規蛋白質の翻訳を抑制することで、小胞体内にさらなる変性蛋白質合成を抑制する。②ATF6 経路は、折りたたみを助ける分子シャペロン遺伝子の発現を誘導する。③IRE1 経路は、変性蛋白質を小胞体外で除去・分解するなどのストレス応答を生じる。しかし、変性蛋白質が過剰に蓄積し、小胞体ストレスが細胞の回避機能を超えるとアポトーシスが誘導され、神経変性疾患など様々な疾患の原因となることが知られている。

そこで第1節では、ATF6 を介したシャペロン蛋白質遺伝子発現誘導経路が虚血性脳障害に関与すると仮定して検討することにした。

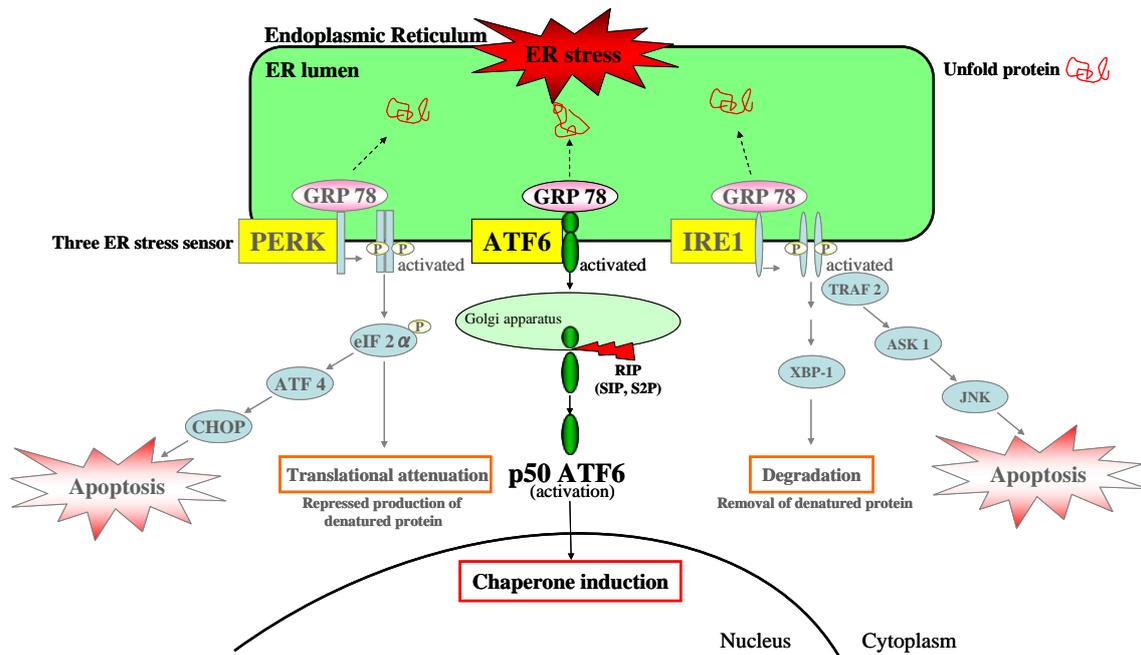


Fig. 19 ER stress and the unfolded protein response (UPR)

Stress to the ER stimulates the activation of the three endoplasmic reticulum (ER) stress receptors, PKR-like ER kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6) and inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) that are involved in the unfolded protein response (UPR). In this study, we pay attention to the ATF6 pathway associated with the ischemic brain injury pathway.

まず、ATF6 のシグナル伝達経路と詳細な脳保護作用経路を推定する上で、脳障害のメカニズムを明らかにするために有用な知見となる Wang らの肝臓での ER ストレス経路⁵⁸⁾を Fig. 20 に示した。空腹時の肝臓では、転写因子 CREB が CREB の転写補助因子 CRTC2 と相互作用することによって糖新生遺伝子の発現が促進して血糖値が上昇する^{59, 60)}。一方、肥満状態では肝臓での糖新生が増加するが、その理由としてインスリン抵抗性を亢進する ER ストレスの慢性的な上昇によると報告されている⁶¹⁾。しかし、急激な ER ストレス下では、転写因子 ATF6 は、CRTC2 との相互作用を介して小胞体品質管理遺伝子群の発現を促進する一方で CREB-CRTC2 の相互作用が低下し、糖新生遺伝子の発現が減少して、肝臓からの糖放出を抑制することで血糖値が低下するものと考えられるものである⁵⁸⁾。

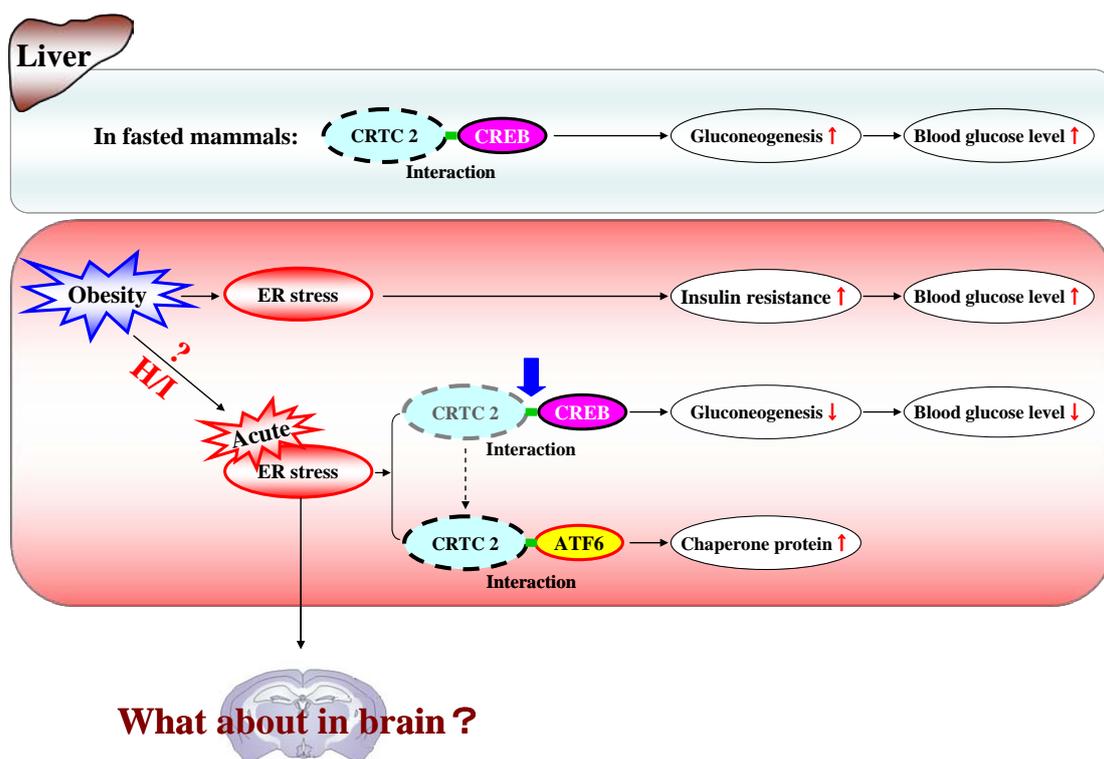


Fig. 20 Role of ER stress in hepatic associated with transcription factor CREB and ATF6: CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis.

KK-A^y マウスにおける H/I 処置前後の血糖値の変化を、Fig. 21 に示した。平常時と比べ、手術による血流が減少する過程では、麻酔や手術などの影響による自律神経の興奮によって一過性に血糖上昇が認められたが、手術 3 時間後の低酸素負荷前では血糖値はほぼ正常値まで回復していた。続いて、H/I 処置後の血糖値は、低酸素負荷前と比べて低酸素負荷直後から有意な低下が認められ、麻酔と血管の剥離のみを行った non-H/I 処置群（血管の閉塞や低酸素負荷をしない群）と比べて顕著に低下した。この血糖値の低下は、Fig. 20 に示した肝臓で報告された機序から判断して、H/I 処置による急激な ER ストレスが誘導されたものと考えられた。

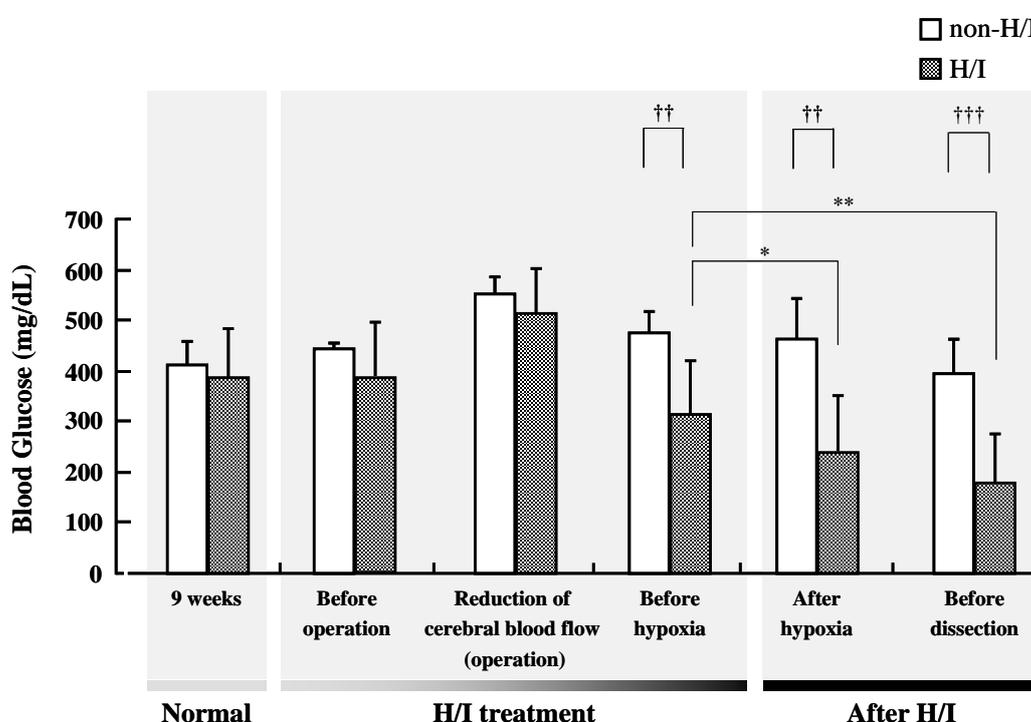


Fig. 21 Blood glucose level assessed in KK-A^y before and after H/I. The data are represented as means \pm S.D. from 22 mice in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with before hypoxia, paired t -test. $\dagger\dagger$ $P < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger$ $P < 0.001$ compared with the respective non-H/I group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

しかし、脳組織において、虚血性脳障害時の ATF6 と CRTC2 の相互作用、およびこの相互作用に依存した脳障害に関する報告はない。

そこで、H/I 処置による ER ストレスと脳障害との関連について検討するこ

とにした。Fig. 22 では、H/I 処置による脳障害メカニズムの仮説 (I) を示した。

Hypothesis (I)

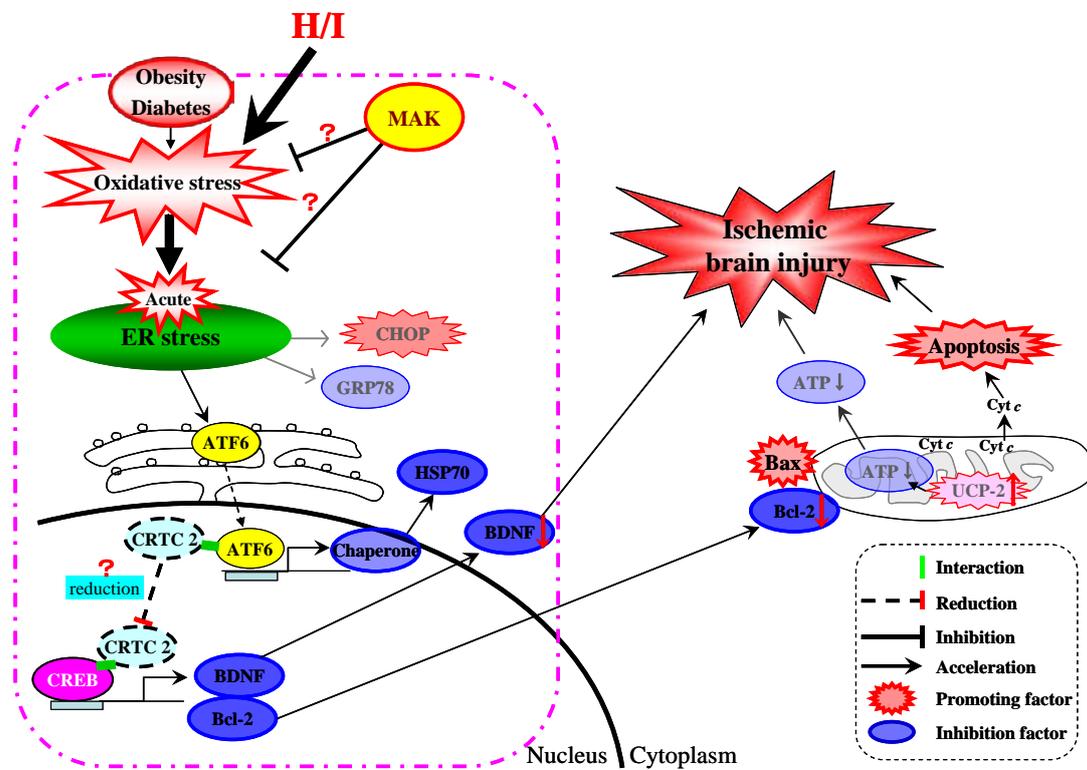


Fig. 22 Hypothesis (I): Mechanism of the hypoxia-ischemia brain injury in obesity and type 2 diabetic mice and protective effect of MAK underlying this mechanism.

脳において転写因子 CREB は、CRTC2 との相互作用によって、神経栄養因子 *Bdnf*、抗アポトーシス因子 *Bcl-2* などの保護因子を誘導する。H/I 処置による急激な ER ストレスは、小胞体膜蛋白質であり ER ストレスセンサーの ATF6 が活性化して核内に移行し、CRTC2 と結合して小胞体品質管理遺伝子群のシャペロン蛋白質の発現を促進する。同時に、CREB と CRTC2 の相互作用を低下させ、CREB によって誘導される *Bdnf* や *Bcl-2* などの保護因子の発現が減少して脳障害が進行すると考えられる。特に、ミトコンドリアでは、抗アポトーシス因子 *Bcl-2* の減少によってアポトーシス促進因子 *Bax* とのバランスが崩れ機能障害が生じてアポトーシスが誘導される。

このような機序のもとで、MAK の脳保護作用は、脳障害の早期段階の ER

ストレスを抑制するためではないかと考え調査することにした。まず、KK- A^y マウスの H/I 処置 24 時間後に採取した脳皮質のペナンプラ領域を用いて、ER ストレスによって誘導されるシャペロン蛋白質 *Hsp70* の発現量を Real Time RT-PCR 法により解析した。H/I 処置によって Control および MAK の両群において Sham 群と比べて、*Hsp70* の発現が有意に増加した。さらに、ER ストレスのマーカーでアポトーシス促進因子 *Chop* の遺伝子発現は、Sham 群と比べて H/I 処置 24 時間後において変化は認められなかったが、H/I 処置 6 時間後の早期に一過性に発現が増加した。一方、MAK 群では *Chop* の発現が低下する傾向が認められ、H/I 処置による ER ストレスの増大を MAK が抑制すると考えられた (Fig. 23)。

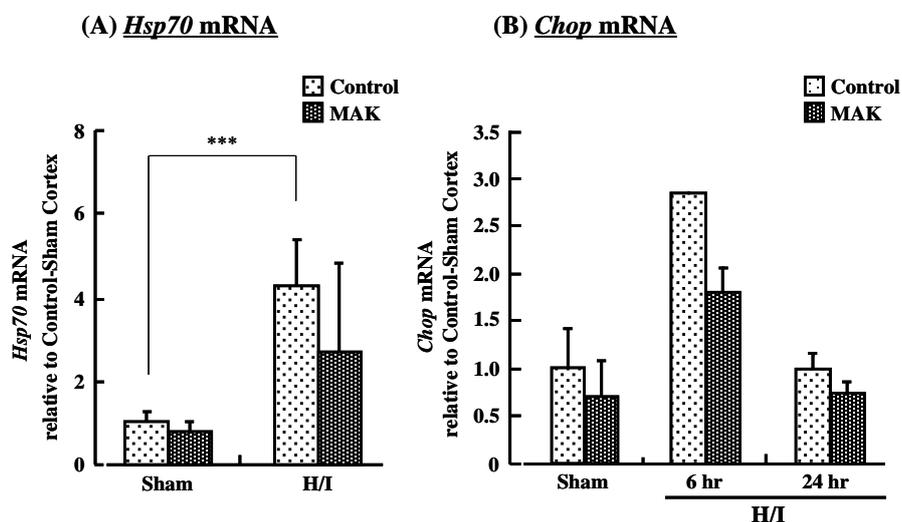


Fig. 23 Expression levels of ER stress-related factors in the brain of penumbral cortex after H/I determined by Real Time RT-PCR analysis. The data are normalized to β -actin and are expressed as means \pm S.D. (n = 6-7) relative to the sham-control group. *** $P < 0.001$ compared with control-sham group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

次に、大脳皮質の虚血周辺部のペナンプラ領域において、CREB によって誘導される *Bdnf* および *Bcl-2* の遺伝子発現量の変化を Real Time RT-PCR 法により検討した。その結果、抗アポトーシス因子である *Bcl-2* の発現量は、Sham 群と比べ H/I 処置によって有意に低下したが、MAK 群ではほとんど変化しな

かった。一方、アポトーシス促進因子 *Bax* の発現量に大きな変化が認められなかったことから、*Bcl-2* と *Bax* の発現量の比は、Sham 群と比べて H/I 処置群で *Bcl-2/Bax* 比が有意に減少し、アポトーシスが亢進していると考えられた。これに対して、MAK 群では、Sham 群と同レベルに維持されていた (Fig. 24A, C, D)。また、*Bdnf* 遺伝子の発現量を検討した結果、H/I 処置 24 時間後、その発現量が有意に減少したが、MAK 群ではその低下が抑制されていた (Fig. 24B)。

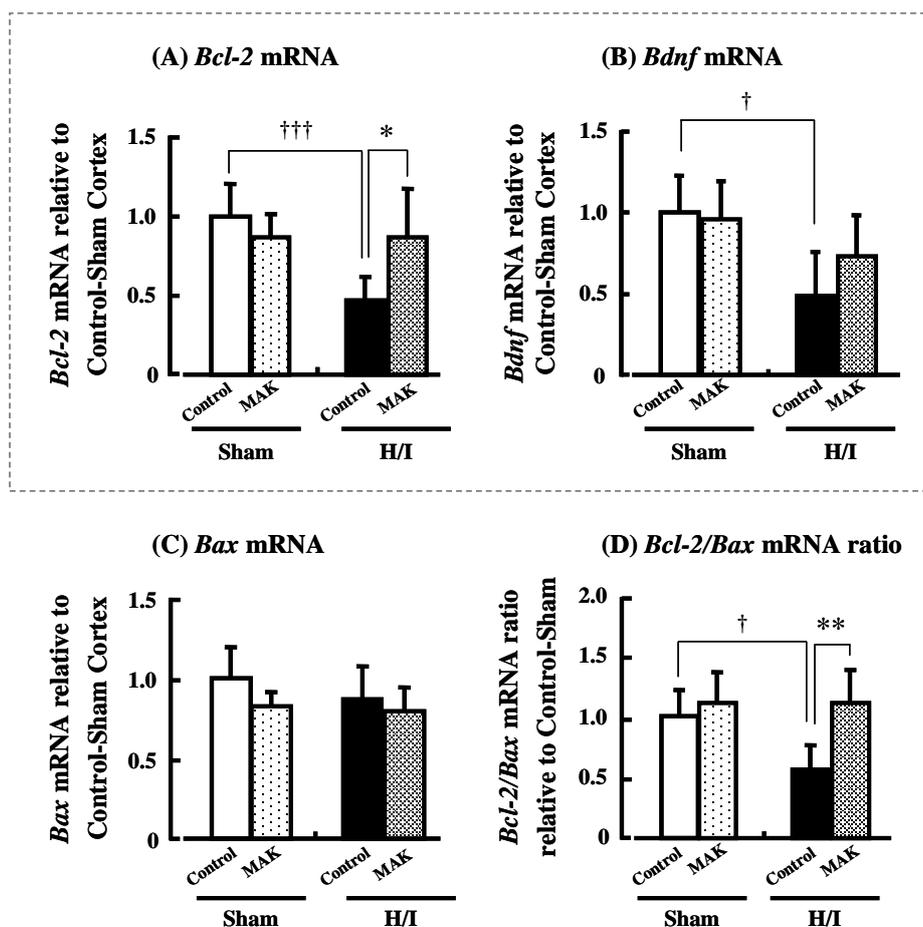


Fig. 24 Expression levels of the transcription factor CREB induced factors (A) *Bcl-2* and (B) *Bdnf* and (C) *Bax* mRNA in the brain of penumbral cortex after H/I determined by Real Time RT-PCR analysis. (D) Show the relation of *Bax* (an apoptosis promoter) to *Bcl-2* (an apoptosis inhibitor) mRNA ratio. The data are normalized to β -actin and are expressed as means \pm S.D. (n = 5-7) relative to the control-sham group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control-H/I group, † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.001$ compared with the control-sham group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

第2節：肥満・2型糖尿病モデルマウスのH/I障害の悪化メカニズムの解析

肥満・2型糖尿病マウスのH/Iモデルにおける脳障害の悪化には、ERストレスの関与が重要な役割を果たすと考え、そのメカニズムをさらに詳細に解析するために仮説（II）を示した（Fig. 25）。

正常マウスでは、H/I処置によってERストレスが誘導され、CRTC2とCREBの相互作用が減少し、BDNFやBcl-2の減少により脳障害が悪化する。一方、CRTC2は転写因子ATF6との相互作用により、HSP70の発現が増加するため脳障害が抑制されると考えられる。

一方、肥満・2型糖尿病では、平常時から慢性的なERストレス状態であることから、推測①：H/I処置時に急激なERストレスが誘発する。その結果、BDNFやBcl-2が正常マウスと比べて急激に低下し、脳障害がさらに悪化する。推測②：急激なERストレスに応じてHSP70の発現も増加するはずであるが、KK-A^yマウスではその発現量が低下している知見が得られており、これが脳障害を悪化させる原因の一つであると考えられる。Hsp70遺伝子発現の低下は、ATF6量の減少によるものと考え、その理由は、肥満・2型糖尿病態では平常時から慢性的なERストレス状態となり、小胞体膜のATF6を核内に移行してシャペロン蛋白質を供給し続ける。そのため、小胞体膜のATF6は欠乏状態となり、急激なERストレスに応答できる量が確保できないことから、シャペロン蛋白質遺伝子群の誘導が困難になると考えるものである。

仮説（II）を証明するため、C57BL/6JマウスとKK-A^yマウスを用いて検討した。

Hypothesis (II)

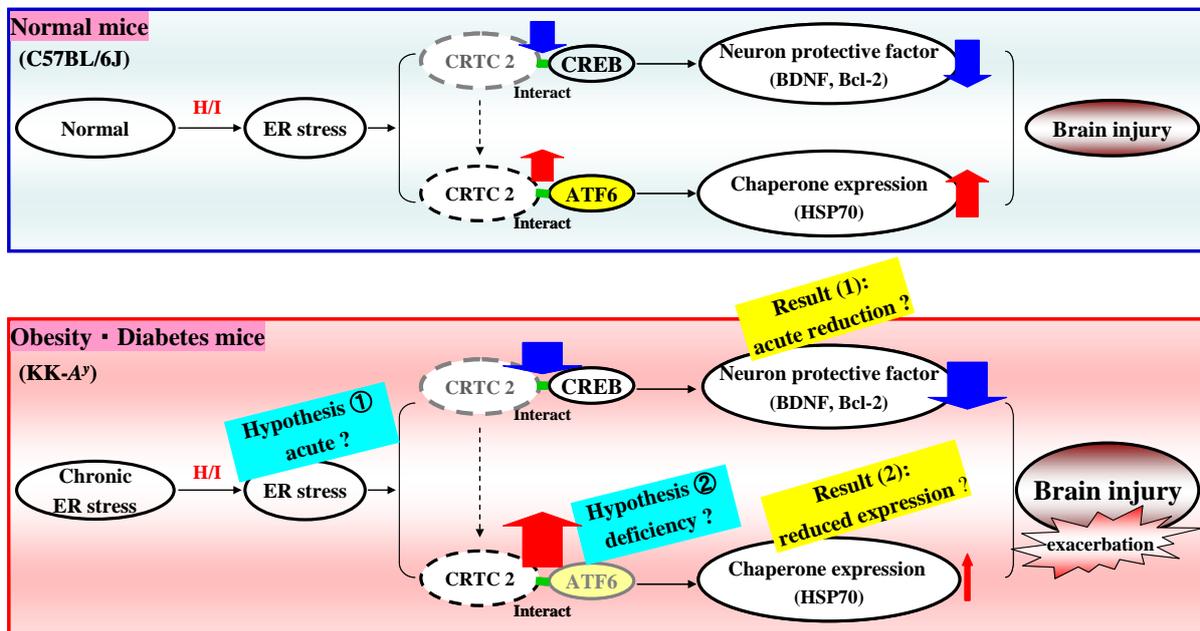


Fig. 25 Hypothesis (II): The aggravating mechanism of the hypoxia/ischemia (H/I) brain injury in obesity and type 2 diabetes mice.

H/I 処置 24 時間後に摘出した脳の梗塞巣体積は、C57BL/6J マウス (2.00 ± 2.00) と比較して KK- A^y マウス (28.50 ± 13.45) では著しく悪化し、広範囲に梗塞の形成が観察された (Fig. 26)。この結果から、正常マウスに比べて肥満・2 型糖尿病マウスで、脳障害が悪化することが確認できた。

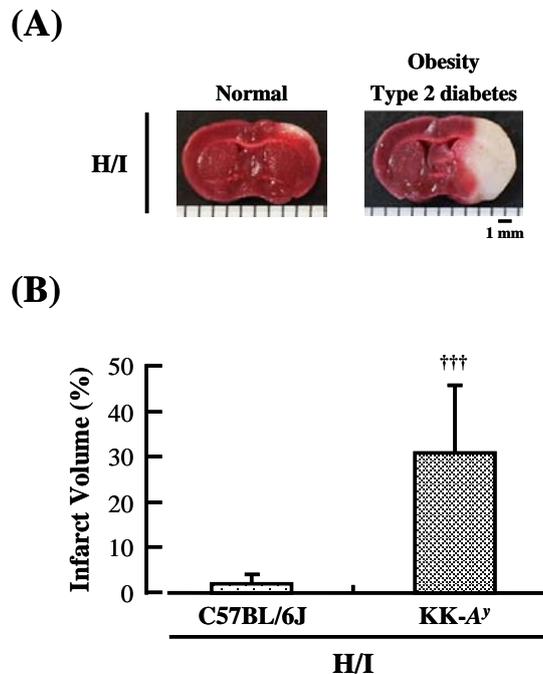


Fig. 26 Infarction volume in the C57BL/6J and KK- A^y mice brain determined in the mice 24 hr after H/I by TTC staining. (A) Representative data of triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining from the mice of H/I treatment. Scale bar = 1 mm. (B) The data are represented as means (% of control) \pm S.D. from 4-20 mice in each group. ††† $P < 0.001$ compared with the normal C57BL/6J group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

そこで、未処置の C57BL/6J マウスと KK- A^y マウスの平常時のパラメータを測定した。その結果、C57BL/6J マウスと比べて、肥満・2 型糖尿病の KK- A^y マウスの体重 (約 1.65 倍) と血糖値 (約 3.11 倍) は有意に増加していた。また、体内酸化ストレスは、C57BL/6J マウス (57.80 ± 9.86) と比べて KK- A^y (128.33 ± 23.94) で約 2.3 倍高かった (Fig. 27)。

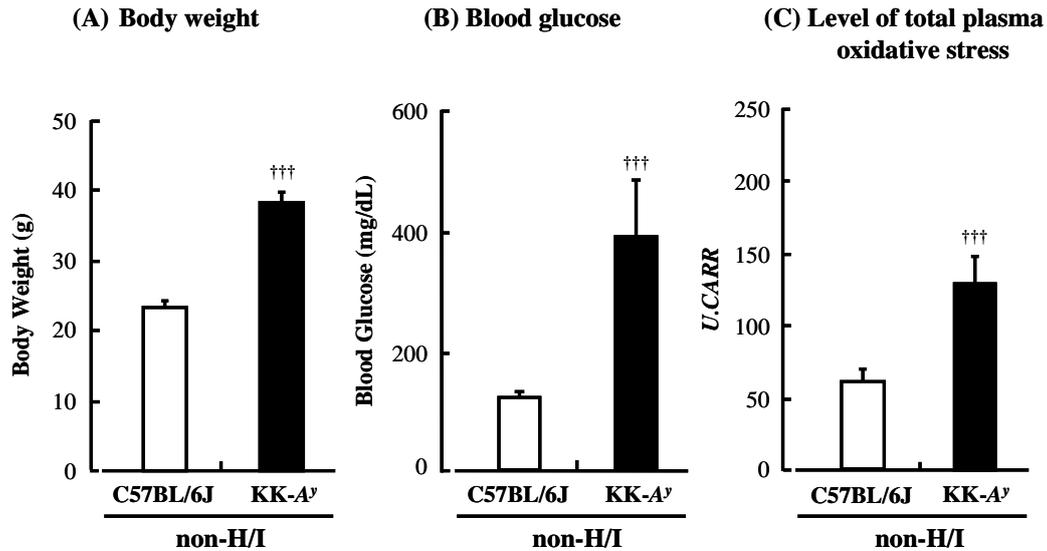


Fig. 27 At the normal time, measurement of physiological characteristic parameters in C57BL/6J and KK-A^y mice. (A) Body weight and (B) blood glucose were measured at 9 weeks old. (C) Level of total plasma oxidative stress determined by d-ROMs test. The data are represented as means \pm S.D. from 6-20 mice in each group. ^{†††} $P < 0.001$ compared with the normal C57B/6J mice, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

ER ストレスは、低酸素や酸化ストレスなどにより生じ、さらに、肥満は ER ストレスを増大することが報告されていることから、KK-A^y マウスでは平常時から ER ストレス状態下にあると考えられる。そこで、平常時の ER ストレス状態を評価するため、ER ストレスマーカーの *Grp78* と *Chop* の遺伝子発現量を Real Time RT-PCR 法により測定した。その結果、平常時の KK-A^y マウスでは、C57BL/6J マウスと比べ *Grp78* (約 1.46 倍) と *Chop* (約 1.4 倍) の遺伝子発現が有意に増加していた (Fig. 28A, B)。また、ER ストレスによって転写因子 CHOP の発現が誘導されることから、CHOP の活性化状態を評価するために、脳の核抽出液中の CHOP 量を解析した。その結果、正常マウスと比べて KK-A^y マウスで CHOP 量が約 2.5 倍増加していた。これらのことから、KK-A^y マウスは慢性的な酸化ストレス状態であると共に、平常時から慢性的な ER ストレス状態であると考えられた (Fig. 28C)。

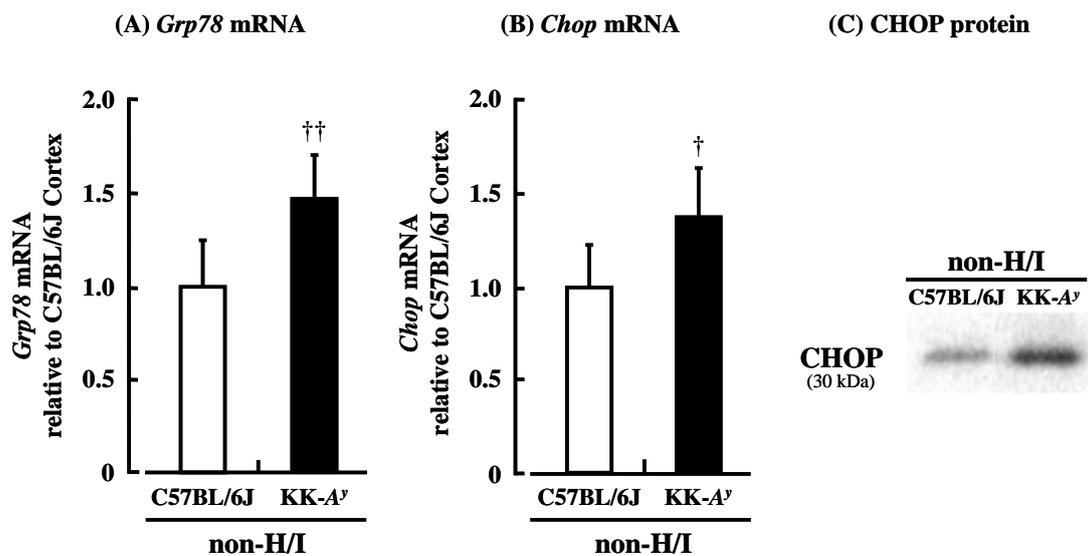


Fig. 28 At the normal time, expression levels of ER stress related factors (A) *Grp78*, (B) *Chop* mRNA and (C) CHOP protein in the brain of cortex time determined in C57BL/6J and KK-A^y mice by Real Time RT-PCR and Western blot analysis. Regarding the mRNA analysis, the data are normalized to β -actin and are expressed as means \pm S.D. (n = 6) relative to the normal C57BL/6J mice non-H/I group. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ compared with the normal C57BL/6J mice non-H/I group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test. Representative Western blot of CHOP in cytoplasm and nucleus extracts from the C57BL/6J and KK-A^y mice cortex.

さらに、障害が悪化する原因として、推測①の H/I 処置による急激な ER ストレスであることを示すために、ER ストレスによって発現が低下する保護因子 *Bcl-2* と *Bdnf* について検討した。その結果、H/I 処置によって C57BL/6J マウスでは、*Bcl-2* と *Bdnf* の両因子の発現が低下する傾向を示し、KK-A^y マウスでは、保護因子の発現が両者ともに顕著に低下 (約 59%) していた (Fig. 29)。

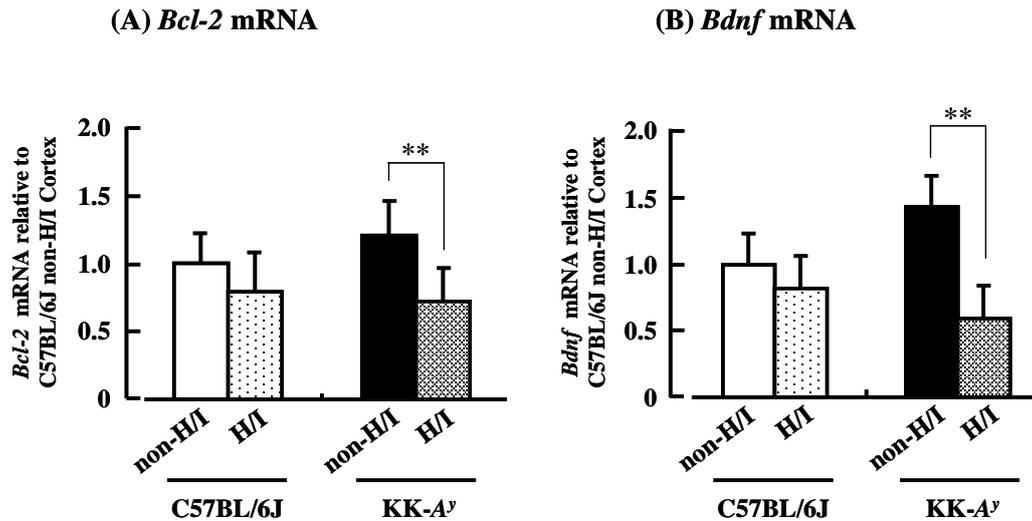


Fig. 29 Expression levels of the transcription factor CREB induced factors (A) *Bcl-2* and (B) *Bdnf* mRNA in the brain of penumbral cortex after H/I determined by Real Time RT-PCR analysis. The data are normalized to β -actin and are expressed as means \pm S.D. (n = 6) relative to the normal C57BL/6J mice non-H/I group. ** $P < 0.01$ compared with KK-A^y mice non-H/I group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

さらに、推測②にもとづいて ATF6 の減少による HSP70 の発現低下を確認するため、H/I 処置 24 時間後の *Hsp70* の発現量を比較した。その結果、H/I 処置後の C57BL/6J マウスでは、*Hsp70* 発現が 30 倍程度増加した。一方、KK-A^y マウスでは H/I 処置による *Hsp70* の発現が 2 倍程度の増加に過ぎず、C57BL/6J マウスに比べ約 10 分の 1 程度と著しく低いことから、これが脳障害悪化の原因と考えられた。また、注目すべきは、平常時 (non-H/I) の *Hsp70* 発現量は、C57BL/6J マウスと比べて KK-A^y マウスで 2 倍程度発現が上昇している点であった (Fig. 30A)。

ATF6は、小胞体に埋め込まれ恒常的に発現している膜結合性転写因子 (90 kDa) であり、小胞体ストレス下では小胞体内に高次構造の異常な蛋白質の蓄積がシグナルとなって、本蛋白質の部分的な分解で活性化する。つまり、小胞体ストレス膜から遊離した細胞質側の転写因子領域 (50 kDa) が核へ移行し、

主として標的遺伝子シャペロン蛋白質などの転写を誘導すると考えられている。そこで、ATF6の活性化状態をWestern blotにより解析した。その結果、平常時と比べて、H/I処置後では、核内のATF6が増加し、さらに、平常時の核内では、正常マウスに比べ、KK- A^y マウスでATF6が約4倍増加していた。また、平常時の細胞質のATF6は、正常マウスに比べて、KK- A^y マウスですでにその存在量は極めて少ないことが確認できた (Fig. 30B)。

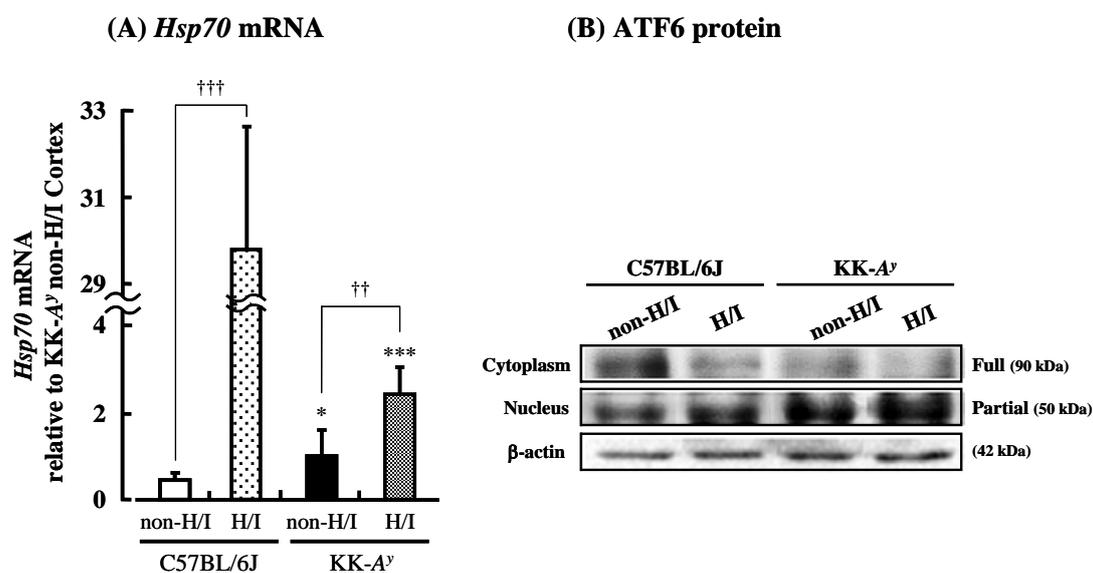


Fig. 30 (A) Expression levels of ER quality control genes *Hsp70* mRNA in the brain of penumbral cortex after H/I determined by Real Time RT-PCR analysis. The data are normalized to β -actin and are expressed as means \pm S.D. (n = 6-7) relative to the KK- A^y mice non-H/I group. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with their respective normal mice groups, $\dagger\dagger$ $P < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger$ $P < 0.001$ compared with their respective non-H/I groups, one-way analysis of variance followed by Tukey's test. (B) ATF6 protein in the brain cortex at the normal time and nuclear translocation after the H/I in C57BL/6J and KK- A^y mice. Representative Western blot of inactive ATF6 (90 kDa) in cytoplasm extract and the transcriptionally active ATF6 (50 kDa) in the nucleus extract.

第3節 本章の小括および考察

第1節：H/I 障害のメカニズムと H/I 障害メカニズムにおける MAK の作用様式

肥満・2型糖尿病における低酸素脳虚血障害には、ER ストレスが関与し、仮説（I）の経路に沿ってアポトーシスが誘導される可能性が示唆された。

第2節：肥満・2型糖尿病モデルマウスの H/I 障害の悪化メカニズムの解析

① 肥満・2型糖尿病態における脳障害の悪化

- ・正常（C57BL/6J）マウスと比べ、肥満・2型糖尿病（KK-*A^y*）マウスで脳障害が著しく悪化することが確認できた。

② 仮説（II）：脳障害の悪化における慢性的な ER ストレスの関与

- ・肥満・2型糖尿病マウスの体内酸化ストレスは正常マウスに比べて約2.3倍高く、平常時から慢性酸化ストレスやER ストレスが亢進している可能性が示唆された。
- ・推測①の通り、H/I 処置時に *Bcl-2* や *Bdnf* などの神経細胞保護因子の発現が、正常マウスに比べて急激に減少した。
- ・推測②の通り、H/I 処置後、シャペロン蛋白質遺伝子群の発現量が正常マウスに比べて少ないことから、慢性 ER ストレスにより ATF6 が欠乏状態となり、ストレスに対応できる量のシャペロンが確保できない可能性が示唆された。

本章の結果から、肥満・2型糖尿病モデルマウスの H/I 障害には、仮説（I）の ER ストレス経路を経由する可能性が示唆された。これに対して、MAK は酸化ストレスの軽減と共に ER ストレスを減少させ、脳障害を軽減すると

考えられる。また、脳障害の悪化には、仮説（Ⅱ）の慢性的な ER ストレスが起因していると考えられた。

第 1 章および第 2 章により、MAK は虚血性脳障害による酸化ストレスのみならず ER ストレスを軽減して脳障害を軽減する可能性が示唆されたが、活性本体は明らかになっていないため、第三章でその活性成分の探索を行うことにした。

第3章 抗酸化活性を指標とした MAK 中の活性成分の探索と同定

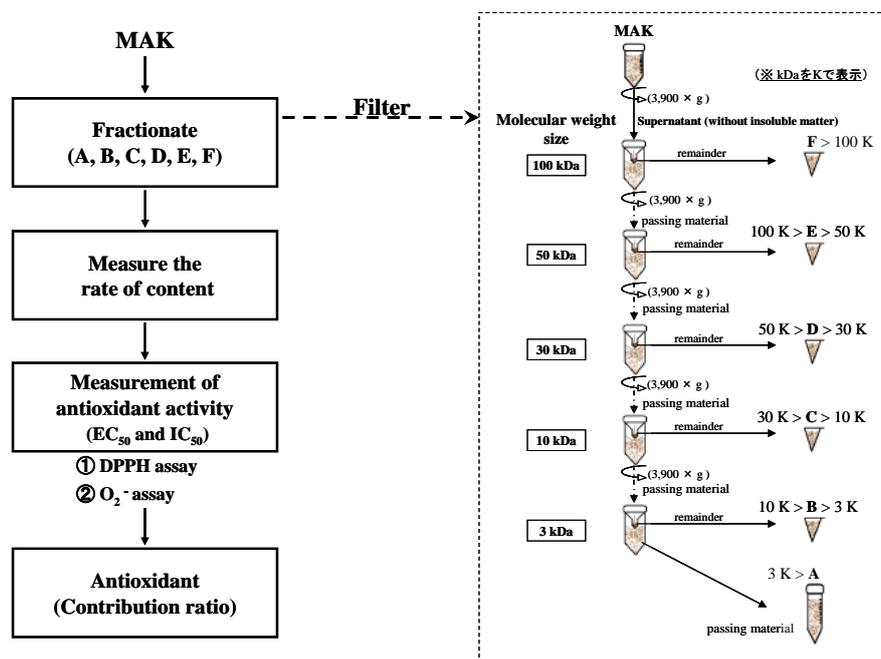
MAK は、H/I 処置による体内酸化ストレスの増加を抑制し、脳梗塞巣体積を顕著に減少させた。また、虚血ペナンプラ領域において活性酸素種の産生を抑制し、脳細胞のアポトーシスを抑制した。これらのことから、MAK の持続的な摂取は H/I 処置による酸化ストレスを軽減させることにより、脳障害を軽減する可能性が強く示唆された。

しかし、MAK 中の活性成分は明らかではないことから、本章では、抗酸化活性を指標とした MAK 中の有効成分を探索・同定することを目的とした。

第 1 節：活性成分の探索および同定

実験概要を Scheme 3 に示した。MAK の抗酸化作用がどの成分によるものであるかを明らかにするため、分子ふるいフィルターを用いて A~F の 6 つに分離し、各画分の含有量と抗酸化活性を測定した。抗酸化活性は、ラジカルである DPPH フリーラジカル消去能とスーパーオキシドアニオン (O_2^-) 消去能からそれぞれ各画分の 50% 消去能 (EC_{50}) あるいは 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を算出した。また、各画分の含有率から MAK 中の抗酸化寄与率を算出して評価した。

Scheme 3 Experimental Overview



まず、分子量 3 kDa 以下の低分子画分 A から分子量 100 kDa 以上の高分子画分 F までを調製し、各画分の含有量を測定した。その結果、低分子画分の含有率が 74.68% と最も高かった (Table 5)。

Table 5 Content of Each Fraction

	Low molecular			High molecular		
Fraction	A	B	C	D	E	F
Molecular weight (kDa)	~3	3~10	10~30	30~50	50~100	100~
Content rate (%)	74.68	11.04	5.84	1.95	1.62	4.87

また、各画分の抗酸化能を DPPH フリーラジカル消去能と O₂ 消去能を用いて測定し、DPPH フリーラジカル消去能を EC₅₀ で、O₂ 消去能を IC₅₀ で示した。その結果、DPPH と O₂ 消去能ともに低分子画分 A と高分子画分 F で抗酸化能が高かった。さらに、MAK 中の各画分の抗酸化寄与率も低分子 A と高分子画分 F で大きいことが明らかになった (Fig. 31)。

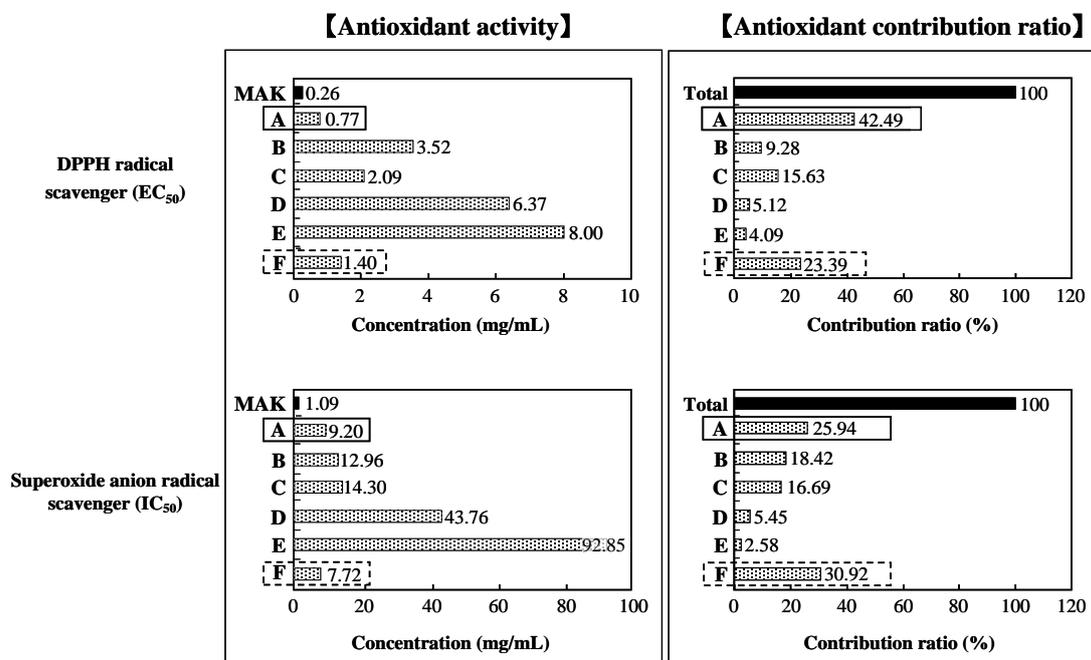


Fig. 31 Antioxidant activities and contribution ratio in MAK of each fraction

そこで、活性成分の同定を行うにあたり、低分子の含有量（74.68%）が最も多いことなどから、本研究では、分子量が 3 kDa 以下の低分子画分（3 K と略）から抗酸化活性成分を探索することにした。

まず、3 K の抗酸化活性成分の探索を行う前に、活性成分の極性と共に酸性、中性、塩基性の判別、酸、アルカリに対する安定性を確認するために予備実験を行った。Fig. 32 にその流れを示した。50 mL チューブ 5 本に 3 K のサンプル各 40 mg を水に溶解した後、各チューブに水より極性が低い有機溶媒を加え、水層と有機溶媒層を得た。それぞれの極性によって分画した水層と有機溶媒層を同濃度に調製してラジカル消去能を測定し、その結果を Fig. 33 の (A) と (B) に示した。また、分画前の 3 K の抗酸化能を 100% として換算し直し、2 つに分割した水層と有機層の抗酸化寄与率を (A') と (B') に示した。

【Experimental Overview】

① Et₂O / H₂O は上層・下層をそれぞれ新たなチューブに移す。
上層 (Et₂O) は溶媒留去して、MeOH などに置換して assay。
下層 (H₂O) はそのままか、適当な濃度に調製し直して assay。

② EtOAc / H₂O は上層・下層をそれぞれ新たなチューブに移す。
上層 (EtOAc) は溶媒留去して、MeOH などに置換して assay。
下層 (H₂O) はそのままか、適当な濃度に調製し直して assay。

③ n-BuOH / H₂O は上層・下層をそれぞれ新たなチューブに移す。
上層 (n-BuOH) は溶媒留去して、MeOH などに置換して assay。
下層 (H₂O) はそのままか、適当な濃度に調製し直して assay。

④ EtOAc / 0.1N HCl は上層・下層をそれぞれ新たなチューブに移す。
上層 (EtOAc) は芒硝（無水 Na₂SO₄）で乾燥後、溶媒留去して、MeOH などに置換して assay。下層は中和して assay。

⑤ EtOAc / 0.01N NaOH も④と同様

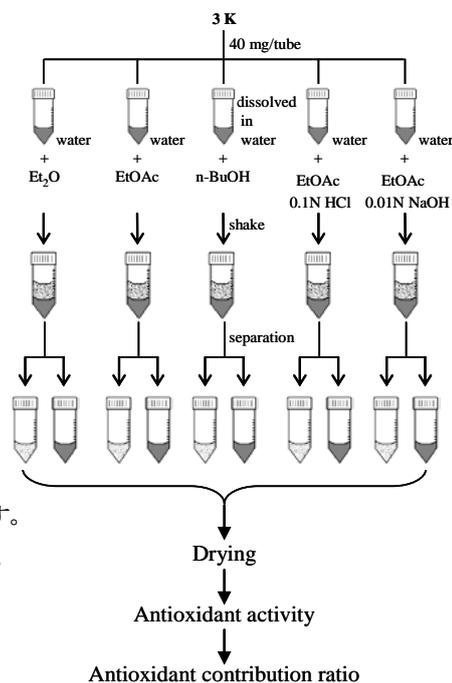


Fig. 32 Preliminary examination

その結果、Fig. 33 に示すように①MAK の抗酸化作用は、単一の成分によるものではなく、複数の成分による作用であった。②有機層より水層の部分で抗酸化能が強いことから、抗酸化活性成分は極性の高いものと判断された。③酸性の官能基を持つ成分である可能性が示唆された。④酸性、塩基性溶媒で活性成分が変化する可能性が推測された。

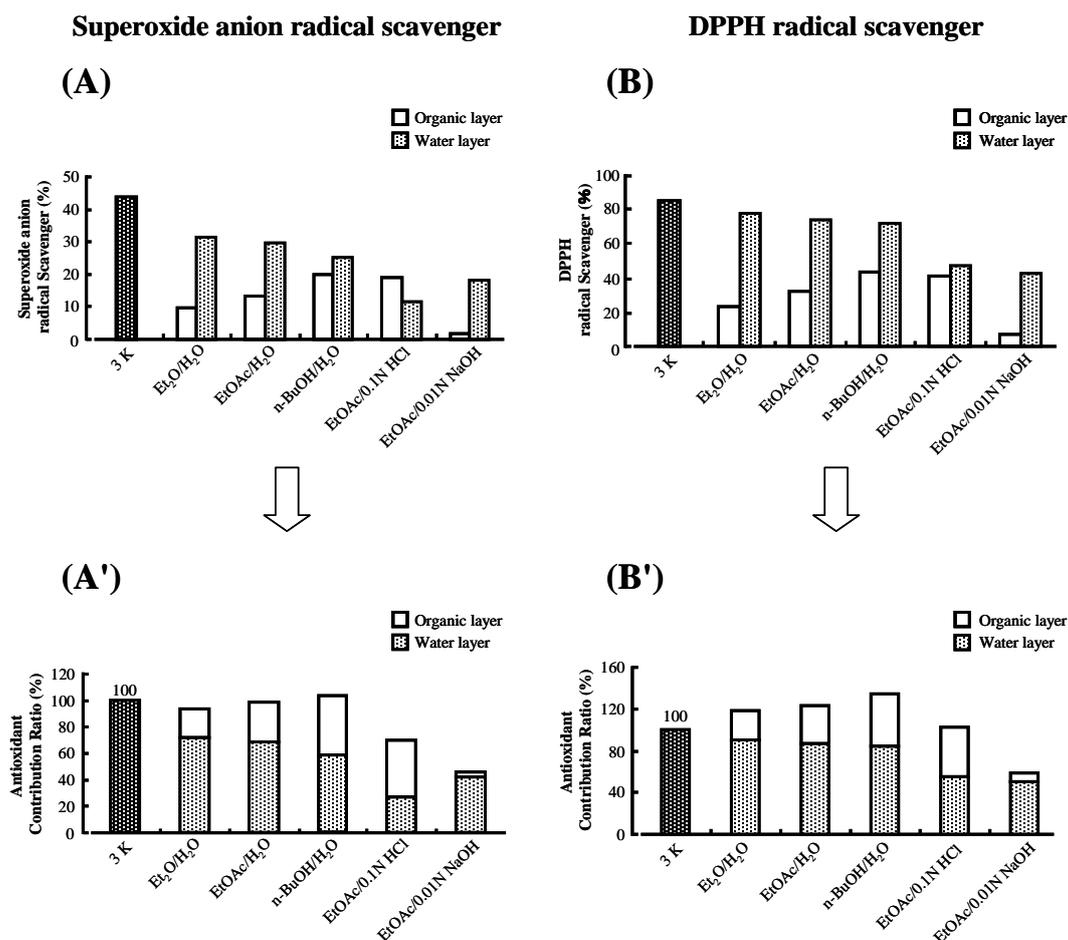


Fig. 33 Result of preliminary experiment

予備実験の結果を踏まえ、3 K の抗酸化活性成分の探索を行った。分画は、各画分の含有量、抗酸化寄与率を評価しながら行った。詳細な分画方法を実験の部に示し、全体の流れを Fig. 34 に示した。まず、加圧濾過装置によって 3 K を大量に分画し、実験に用いた。DIAION HP-20 カラムによって分画し、抗酸化寄与率が 63% である 100% MeOH 溶出物を用いてさらに分画した後、逆層カラム ODS の MPLC を用いて分画し、得られた画分中の抗酸化寄与率が高い画分 B と C に絞って探索を行った。

まず、画分 B を逆層カラムと順層カラムの MPLC で分画し、Compound 1、Compound 2 の 2 つの成分を混合物として得た。また、強い抗酸化寄与率が認められたものの、今回単一成分の同定には至らなかった Fr. B-5-4 と B-5-5 については、今後の検討課題とした。また、画分 B の次に寄与率が高かった画分 C を逆層カラムで分画し、抗酸化寄与率の高い画分 2 から Compound 3 と Compound 4 の計 4 成分を混合物として分離した。

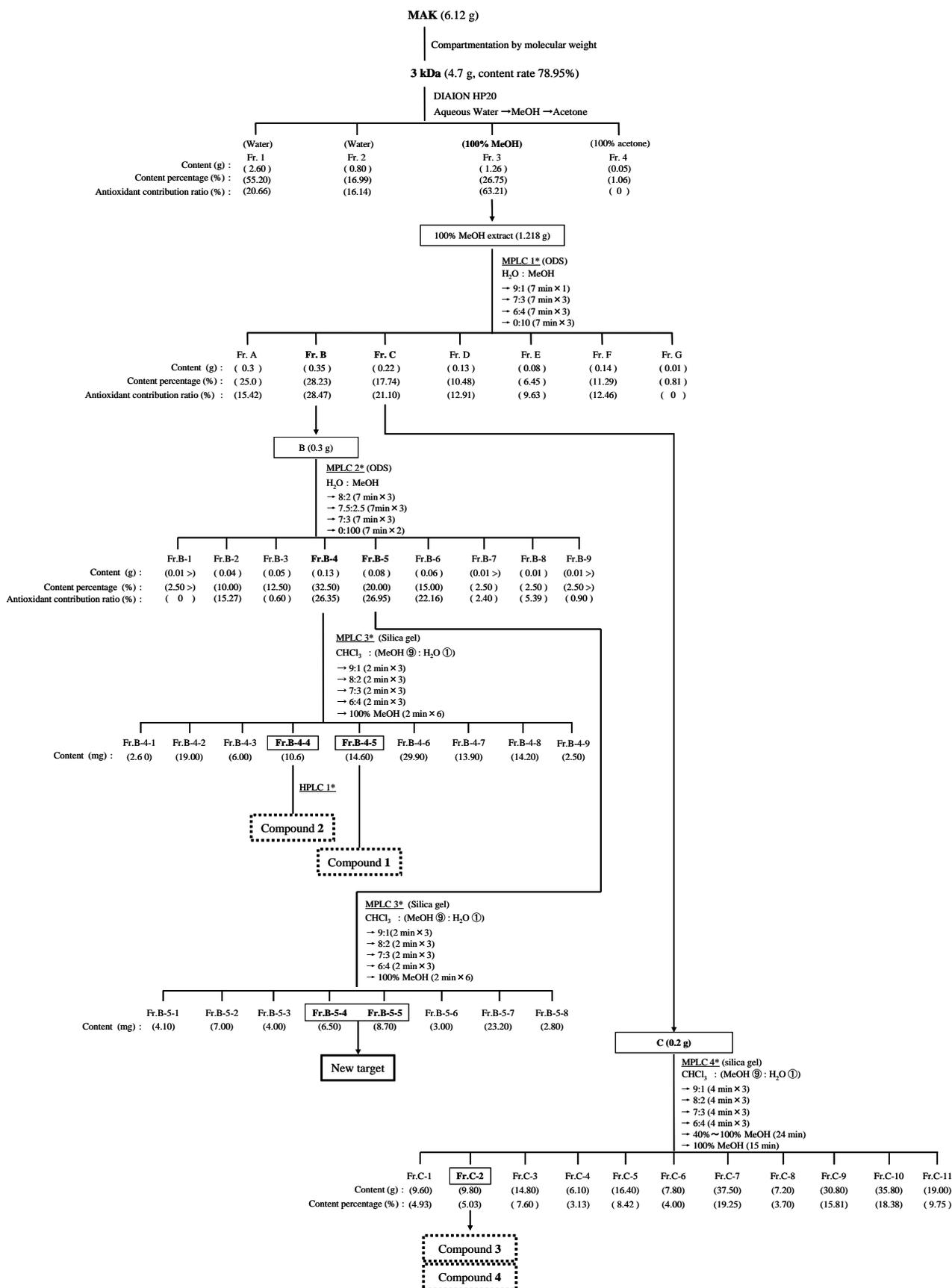
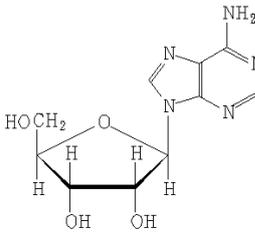
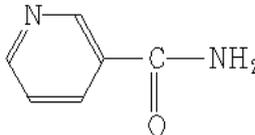
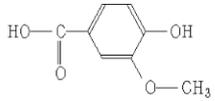
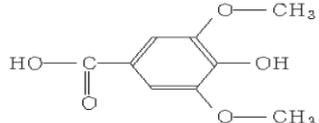


Fig. 34 Fractionation procedure of MAK

単離した化合物は MS-EI、MS-FAB、¹H-NMR、¹³C-NMR、¹H-¹H COSY、DEPT (¹³C)、HMQC、HSQC、HMBC 各種スペクトルを組み合わせ分析し、文献値およびデータベース⁶²⁾のデータと比較することにより同定した。

同定した 4 成分について成分名、分子量、分子式、構造式を Table 6 に示した。分画のフローチャートと各画分の含量 (g)、含有率 (%)、抗酸化寄与率 (%) については Fig. 34 に示した。MAK 中に同定された 4 つの成分は新規化合物ではなかったものの、これら成分の存在について初めて明らかにできた。

Table 6 Compound Information

	Chemical name	Molecular weight	Molecular formula	Structural formula
Compound 1	Adenosine (アデノシン)	267.2	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	9-β-d-arabinofuranosyladenine 
Compound 2	Nicotinamide (ニコチン酸アミド)	122.12	C ₆ H ₆ N ₂ O	3-pyridinecarboxamide 
Compound 3	Vanillic acid (バニリン酸)	168.1	C ₈ H ₈ O ₄	4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid 
Compound 4	Syringic acid (シリンガ酸)	198.17	C ₉ H ₁₀ O ₅	4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid 

第2節：同定された成分の活性評価

まず、MAK 中に同定された4成分について抗酸化活性を評価した。その結果、同濃度に調製して DPPH フリーラジカル消去能を比較した場合、バニリン酸とシリンガ酸は同濃度の MAK と比較して、抗酸化能が強いことが認められた。しかし、アデノシンとニコチン酸アミドには消去能は認められなかった。

また、同一モル濃度下で比較した結果も同様にバニリン酸とシリンガ酸ともに抗酸化活性が見られたが、アデノシンとニコチン酸アミドには認められなかった (Fig. 35)。

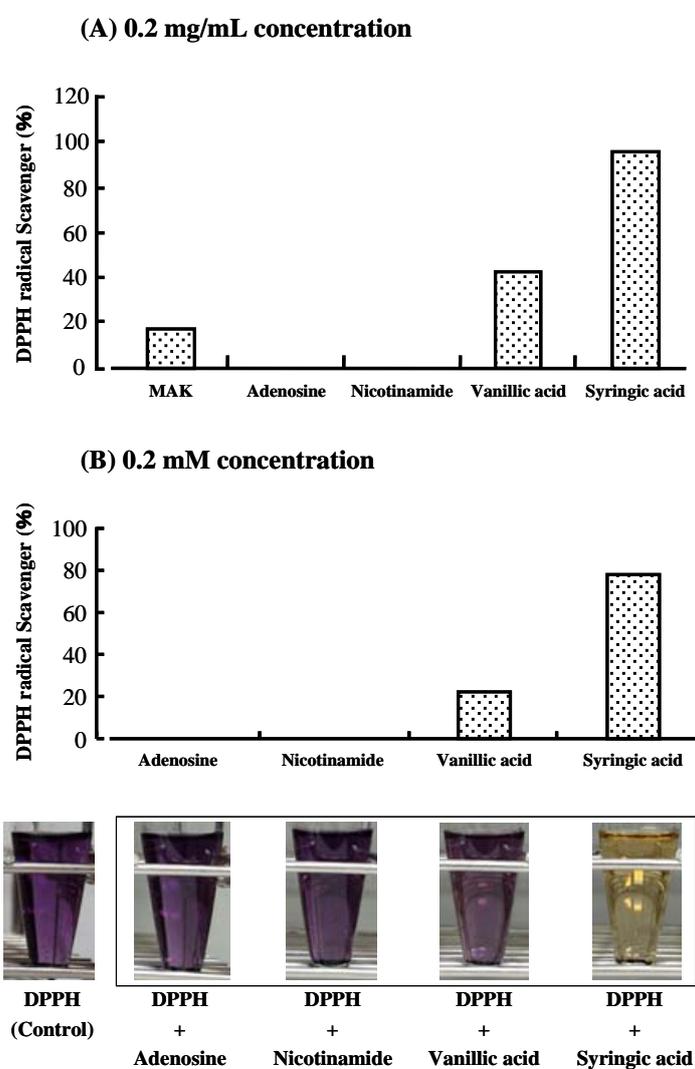


Fig. 35 Antioxidant activities of four components identified from MAK

霊芝の生理活性に関するこれまでの研究では、おもに子実体およびその抽出物を用いたものが大部分であるが、通常、子実体の発生までは相当な時間が必要であり、その摘み取り地域や時期による成分含量のばらつき、或いは抽出率が一定でないこと、さらにはカビなどの微生物の汚染を受けやすいことなどの欠点がある。一方、MAKは霊芝菌糸体のみは無菌的な培養によって得られたものであり、培養条件をコントロールしやすく、安定した品質を維持できることが特徴である。

そこで、抗酸化活性が認められたシリンガ酸とバニリン酸の含有量をLC/MSによって測定した結果をTable 7に示した。その結果、シリンガ酸とバニリン酸は、培地のみからの抽出物と比べMAKと子実体共に含有量が増加(シリンガ酸は約2.4倍~3倍、バニリン酸は約5倍)しており、子実体と比べMAKは3.5ヶ月の培養でほぼ同程度の量が含まれていることが明らかになった。

Table 7 Content of Syringic Acid and Vanillic Acid

Syringic Acid

Extract	Content (mg) / 1 g extract	Content rate (%)	Times (Culture medium extract content for a basis of comparison)
Culture medium (for 3.5 months without mycelia)	0.212	0.021	1
<i>Ganoderma Lucidum mycelia</i>	0.052	0.005	0.25
MAK (grown for 3.5 months with <i>Ganoderma Lucidum mycelia</i>)	0.511	0.051	2.41
<i>Ganoderma Lucidum fruit body</i>	0.644	0.064	3.04

Vanillic Acid

Extract	Content (mg) / 1 g extract	Content rate (%)	Times (Culture medium extract content for a basis of comparison)
Culture medium (for 3.5 months without mycelia)	0.171	0.017	1
<i>Ganoderma Lucidum mycelia</i>	0.048	0.005	0.28
MAK (grown for 3.5 months with <i>Ganoderma Lucidum mycelia</i>)	0.868	0.087	5.08
<i>Ganoderma Lucidum fruit body</i>	0.848	0.085	4.96

一方、抽出物の回収量からシリング酸とバニリン酸の回収量を換算し、Table 8 に示した。その結果、菌が繁茂した状態で培地ごと粉碎して得られた MAK 中のシリング酸量は、培地のみからの抽出物に比べて 3.02~3.41 倍、バニリン酸は 6.36~7.18 倍多く含有することが明らかになった。

Table 8 Recovery Rate of Syringic Acid and Vanillic Acid

Syringic Acid

Extract	Content (mg)/ 1 g extract	Extracted volume (g)/ one culture medium	Content (mg) / one culture medium extract	Times (Culture medium extract content for a basis of comparison)
Culture medium (grow for 3.5 months without mycelia)	0.212	16.20	3.434	1
MAK (culture medium of <i>Ganoderma Lucidum</i> mycelia)	0.511	21.60 ± 1.30	11.038 ± 0.664	3.02~3.41

Vanillic Acid

Extract	Content (mg)/ 1 g extract	Extracted volume (g)/ one culture medium	Content (mg) / one culture medium extract	Times (Culture medium extract content for a basis of comparison)
Culture medium (grow for 3.5 months without mycelia)	0.171	16.20	2.770	1
MAK (culture medium of <i>Ganoderma Lucidum</i> mycelia)	0.868	21.60 ± 1.30	18.749 ± 1.128	6.36~7.18

続いて、シリング酸とバニリン酸の抗酸化活性を DPPH フリーラジカル消去能 (EC₅₀) により評価し、positive control として脳保護薬のエダラボン (Edaravone; ラジカル消去薬)、ビタミンC、ビタミンEと比較した結果を Table 9 に示した。その結果、シリング酸はバニリン酸より強い抗酸化活性を示した。また、エダラボンの作用を 1 とした場合、シリング酸の抗酸化能はビタミン E より約 6 倍強く、ビタミン C より若干弱いものの、脳梗塞急性期の治療薬として使用されているエダラボンに匹敵していることが明らかとなった。

Table 9 Scavenging Effect of the Free Radical

Sample	Mw (g/L)	DPPH radical scavenger (EC ₅₀)		Times (Edaravone for a basis of comparison)
		(mg/mL)	(mM)	
Edaravone	174.2	0.008	0.043	1
Syringic acid	198.17	0.006	0.032	1.35
Vanillic acid	168.1	0.136	0.809	0.05
Vitamin C	176.13	0.004	0.025	1.72
Vitamin E	430.7	0.114	0.266	0.16

第3節 本章の小括および考察

第1節：活性成分の探索および同定

分子サイズによる分画から、MAK 中には抗酸化活性成分が複数含まれていることが明らかになった。特に、3 kDa 以下の低分子と 100 kDa 以上の高分子画分の抗酸化寄与率が高いことが認められた。そこで、約 75% (w/w) が 3 kDa 以下であることから、低分子画分から活性成分を探索することにした。

第2節：同定された成分の活性評価

MAK の 3 kDa 以下の低分子画分からアデノシン、ニコチン酸アミド、シリンガ酸、バニリン酸の4つの成分が同定された。その中で、シリンガ酸とバニリン酸に抗酸化活性が認められた。

本章の結果から、MAK の強い抗酸化作用は複数の抗酸化成分によるものと考えられる。本章で同定された成分のうち、特にシリンガ酸は脳梗塞急性期のラジカル消去薬として使用されているエダラボンの抗酸化能に匹敵していた。そこで、第4章ではシリンガ酸にターゲットを当てて、神経細胞や動物モデルに対する保護作用について検討することにした。

第4章 抗酸化活性成分による神経細胞および脳保護作用の評価

酸化ストレスの軽減をターゲットとして、抗酸化成分を含有する天然物の脳保護効果が注目され、さらにその成分の探索と活性成分による神経細胞保護作用の報告がこれまでに数多くなされている^{26,63)}。

第3章では、MAK からアデノシン、ニコチン酸アミド、バニリン酸、シリング酸の4成分が同定され、そのうちバニリン酸とシリング酸に抗酸化活性があることが明らかになった。バニリン酸およびシリング酸の抗酸化作用は以前から報告されており、ラジカル性肝障害モデルである四塩化炭素処置ラットに対して肝保護作用を示すことが報告されている⁶⁴⁾。しかし、虚血性脳障害とER ストレスに関する報告はなされていない。そこで本章では、虚血性脳障害に対するMAKの脳保護作用にMAKの含有成分であるバニリン酸とシリング酸が寄与しているか否かを明らかにすることにした。また、シリング酸はバニリン酸より強い抗酸化活性を示すことから、本章ではシリング酸に注目し、神経細胞や動物モデルに対する保護作用について検討した。

第1節：神経細胞保護作用の評価 (*in vitro*)

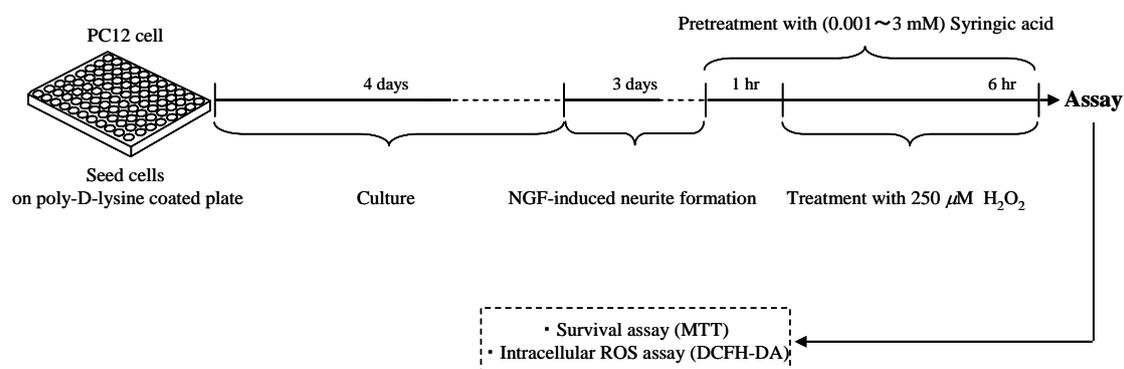
神経細胞に対する保護作用を *in vitro* で検討する方法として、ラット副腎髄質褐色細胞種由来 PC12 細胞を用いた手法がよく用いられている。PC12 細胞は、神経成長因子 (NGF) の添加によって球形の細胞が扁平になり神経軸索様の突起を形成し、交感神経様細胞へと分化する⁶⁵⁾。また、酸化ストレス擬似モデルとして、ROS の一種である H_2O_2 を用いた方法は、神経細胞保護作用を検討する研究において多く用いられている^{66,67)}。

そこで第1節では、PC12 細胞を用いて、 H_2O_2 処置による酸化ストレスに対するシリング酸の神経細胞保護作用について検討することにした。

実験の手法を Scheme 4 に示した。未分化の PC12 細胞を poly-D-lysine コートしたディッシュに播種し、4日間培養後、神経成長因子によって3日間神経突起を伸張して交感神経細胞様に分化させた後、アッセイに用いた。シリング

酸 (0.001, 0.01, 0.1, 1, 3 mM) を添加した 1 時間後に 250 μM H_2O_2 処置することによって酸化ストレスを誘導した。その後、細胞生存率および細胞内活性酸素種の産生を評価した。

Scheme 4 Experimental Protocol



まず、保護作用を検討する前に、シリンガ酸の細胞毒性を MTT アッセイにより評価した。シリンガ酸 (濃度 0.001 mM~3 mM) の存在下で 2 日間培養した結果、0.001 mM~1 mM までは細胞に対する毒性は認められなかった。しかし、3 mM 添加によって生存率が有意に減少した。このことから、PC12 細胞に対してシリンガ酸の 1 mM までは毒性は示さないことが明らかになった (Fig. 36)。

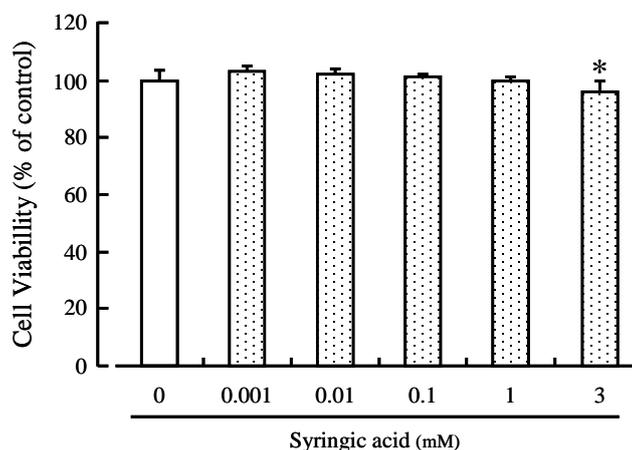


Fig. 36 PC12 cells viability under concentrations from 0.001 to 3 mM of syringic acid. Each independent experiment was carried out in 8 wells. All data were mean \pm S.D. relative to those of their non-treatment group. There is no statistical difference among them just without 3 mM. * $P < 0.05$ compared with the non-treatment group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

続いて、酸化ストレス処理による細胞死に対するシリング酸の効果を MTT アッセイにより評価した。その結果、シリング酸無添加 (0 mM) では、250 μ M H_2O_2 処理 6 時間により細胞生存率 ($62.24 \pm 10.44\%$) が有意に低下した。これに対して、 H_2O_2 処理 1 時間前にシリング酸を添加した群では、濃度依存的に生存率が増加傾向を示し、0.1 mM ($90.44 \pm 13.62\%$)、1 mM ($102.54 \pm 13.93\%$)、3 mM (89.59 ± 23.20) の濃度下で細胞死を有意に抑制した (Fig. 37)。

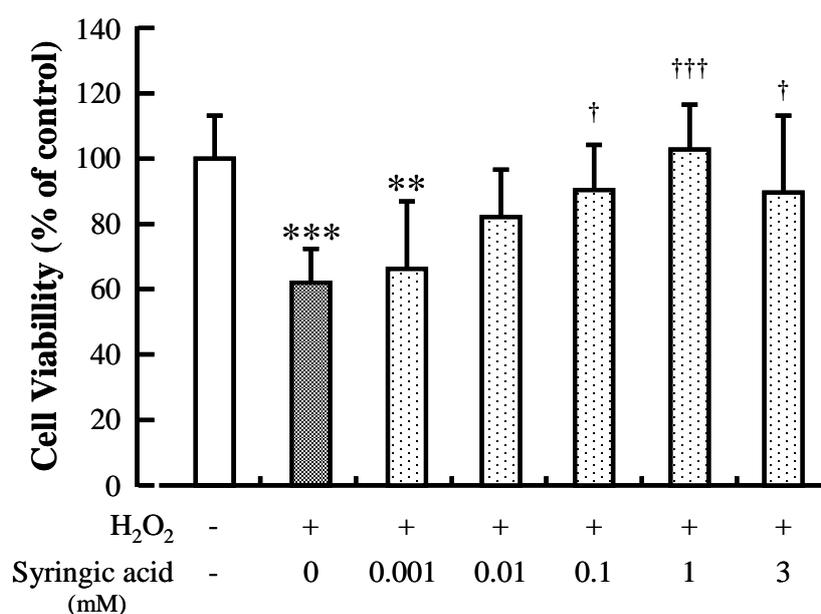


Fig. 37 Protective effect of syringic acid on the PC12 cells injury induced by H_2O_2 . 0.001~3 mM syringic acid was preincubated for 1 hr followed by 250 μ M H_2O_2 treatment for 6 hr. Cell viability was measured by MTT assay. The data are represented as means \pm S.D. (n = 8) relative to those of their non-treatment group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the non-treatment group, † $P < 0.05$, ††† $P < 0.001$ compared with the only H_2O_2 treatment group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

酸化ストレス処理による細胞内 ROS の産生抑制作用を、DCFH-DA 染色により評価した。H₂O₂ 処理により増加した細胞内活性酸素種の産生に対して、シリンガ酸は濃度依存的に抑制した (Fig. 38)。以上の結果から、シリンガ酸は、神経培養細胞における酸化ストレスに対して保護効果を示すことが明らかになった。

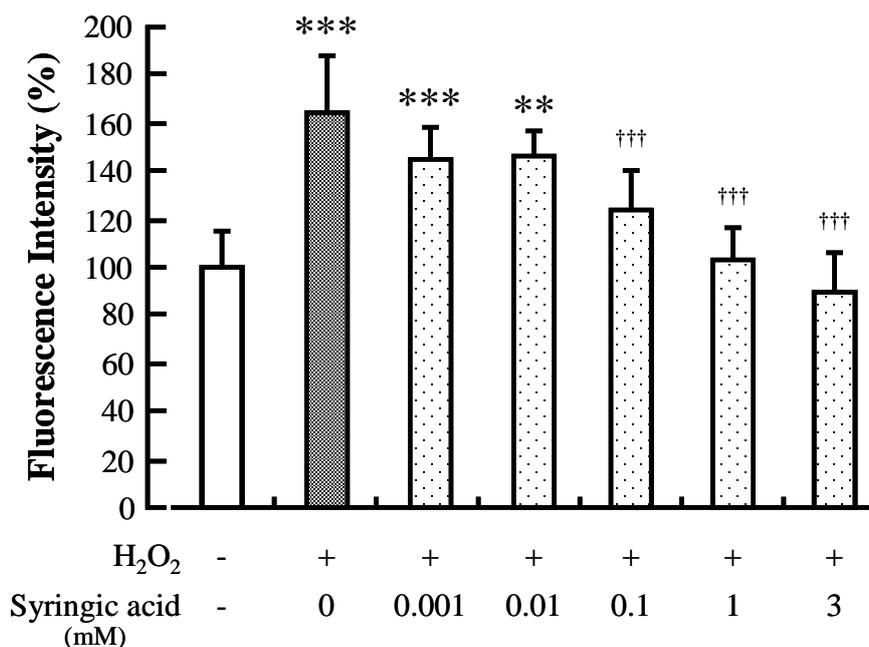


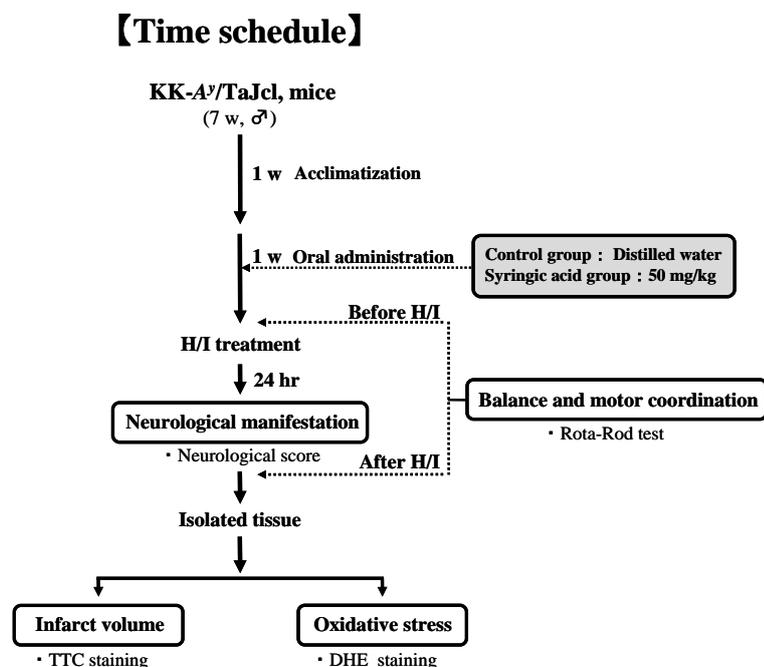
Fig. 38 Effect of syringic acid on the level of ROS production in the PC12 cells subcellular induced by H₂O₂. 0.001~3 mM syringic acid was preincubated for 1 hr followed by 250 μ M H₂O₂ treatment for 6 hr. The ROS content of the PC12 cells subcellular was measured after H₂O₂ treatment by DCFH-DA assay. The values of fluorescence Intensity of each group are represented as means \pm S.D. (n = 8) relative to those of their non-treatment group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the non-treatment group, ††† $P < 0.001$ compared with the only H₂O₂ treatment group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

第 2 節：脳保護作用の評価 (*in vivo*)

PC12 細胞における酸化ストレスに対して、シリンガ酸に保護効果が認められたことから、第 2 節では肥満・2 型糖尿病モデルマウスの H/I 障害に対するシリンガ酸の脳保護作用を検討することにした。

実験の手法を Scheme 5 に示した。KK-*A*^y マウス (8 w, ♂) にシリンガ酸 (50 mg/kg body weight/day) を 7 日間経口投与した後、H/I 処置を行った。Control 群には同容量の蒸留水を投与した。24 時間後に神経症状と運動機能障害を評価して、摘出した脳の梗塞巣体積、脳組織中のフリーラジカル産生量を測定した。

Scheme 5 Experimental Protocol



マウスの体重および摂取量に対するシリンガ酸の影響を測定した。シリンガ酸 50 mg/kg body weight/day を 1 週間経口投与した結果、シリンガ酸と Control 群との間に体重 (Table 10) および摂取量 (Table 11) に有意な差は認められなかった。

Table 10 Influence of Mice Body Weight during Syringic Acid Intake

Group	Body weight (g)		
	1 Day	4 Day	7 Day
Sham	37.27 ± 1.66	37.52 ± 1.64	38.00 ± 1.65
H/I	37.16 ± 1.28	37.78 ± 1.56	38.38 ± 1.46
Syringic acid (50 mg/kg/day) + H/I	36.75 ± 1.73	37.49 ± 1.77	37.84 ± 2.02

Table 11 Influence of Feed Intake during Syringic Acid Intake

Group	Feed intake (g)		
	1 Day	4 Day	7 Day
Sham	5.99 ± 0.80	6.37 ± 0.65	6.29 ± 0.57
H/I	5.93 ± 0.70	6.03 ± 0.52	6.40 ± 0.66
Syringic acid (50 mg/kg/day) + H/I	5.79 ± 0.79	5.73 ± 2.37	6.27 ± 1.31

H/I 処置による脳障害に対するシリンガ酸の保護効果を、H/I 処置 24 時間後に Table 12 (実験の部参照 p. 84) に示した六つの項目について神経症状を評価した。その結果、Sham 群では、神経症状の悪化は観察されなかった。これに対して、H/I 処置によって症状の悪化が認められたが、Control の水投与群 (8.28 ± 5.09) と比較し、シリンガ酸投与群 (14.17 ± 2.86) では H/I 処置による神経症状の悪化が顕著に抑制された。因みに、MAK 1 g 中にシリンガ酸は 0.511 mg、バニリン酸は 0.868 mg 含まれており、MAK の 1 g/kg 体重投与とシリンガ酸 50 mg/kg 体重投与で、投与条件が異なることから両群の間で正確な比較はできないが、グラフには MAK 1 g/kg 投与の抑制効果も参考として示した (Fig. 39)。

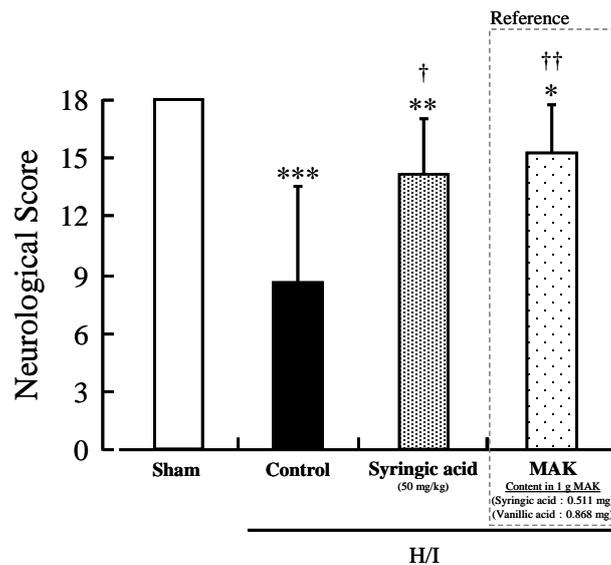


Fig. 39 Effects of chronic intake of syringic acid (50 mg/kg, p.o.) with neurological score determined in the mice 24 hr after H/I. The neurological evaluations consisted of the five tests (Table 12). The score to each mouse was the sum of all five individual test scores. The maximum neurological score of a normal mouse with no deficit is 18. The data are represented as means ± S.D. from 6-21 mice in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the sham group, † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ compared with the H/I treatment control group, Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney U test.

同時に、H/I 処置前後の運動機能を Rota-Rod テストにより評価した。その結果、Sham 群では H/I 処置前後の運動機能に変化は認められなかった。また、すべての群で H/I 処置前の運動機能に異常は見られなかった。一方、Control 群 (72.49 ± 73.14) では、H/I 処置により運動機能が有意に減少したのに対し、シリンガ酸投与群 (155.33 ± 47.12) で顕著に改善された (Fig. 40)。

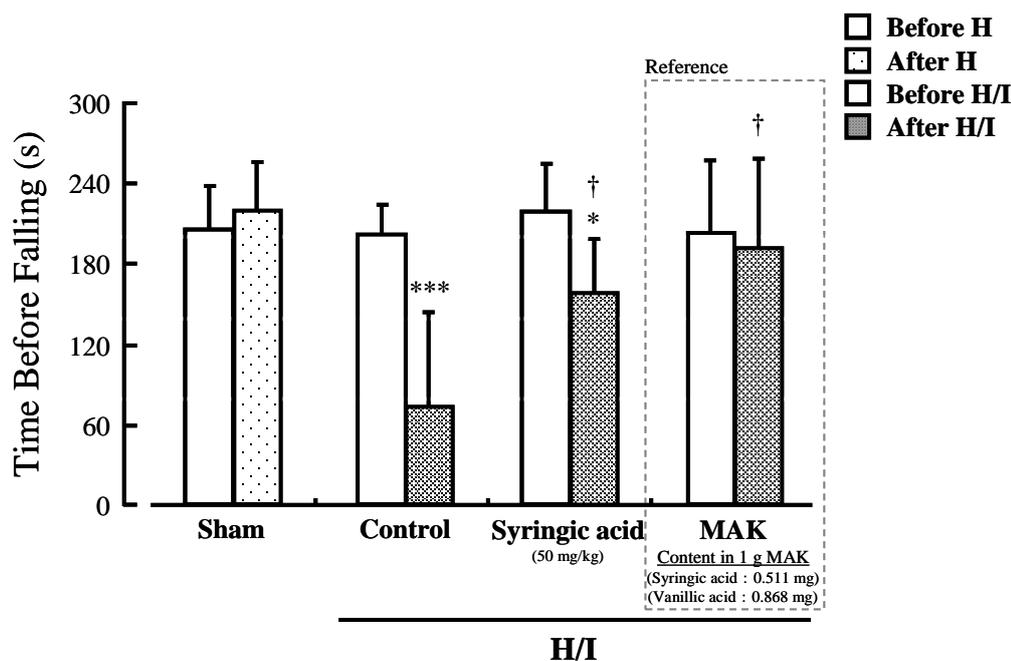


Fig. 40 Effects of chronic intake of syringic acid (50 mg/kg, p.o.) assessed for balance and motor coordination assessed in the mice before H/I and 24 hr after H/I. The data are represented as means \pm S.D. from 6-21 mice in each group. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with each before H/I, paired t -test. † $P < 0.05$ compared with the control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

続いて、シリンガ酸投与による脳梗塞巣形成の抑制効果を評価した。TTC染色によるH/I処置24時間後の梗塞巣体積を測定した結果、Control群(20.44 ± 14.91)に比べ、シリンガ酸投与群(12.51 ± 7.51)では梗塞巣が有意に減少した(Fig. 41)。

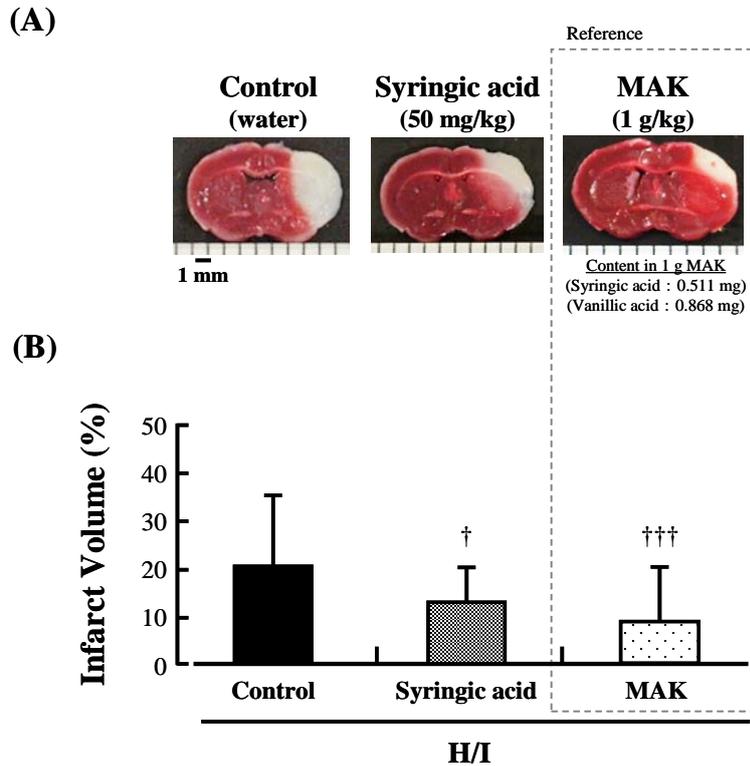


Fig. 41 Effects of chronic intake of syringic acid on infarction volume in the mice brain determined in the mice 24 hr after H/I by TTC staining. (A) Representative data of triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining from the mice of control H/I, H/I with chronic ingestion of syringic acid (50 mg/kg p.o.). Scale bar = 1 mm. (B) The data are represented as means ± S.D. from 16-20 mice in each group. † $P < 0.05$, ††† $P < 0.001$ compared with the control group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

H/Iによって誘発された脳実質における O_2 産生に対するシリンガ酸の影響を組織化学的に検討するために、マウス脳冠状切片の DHE 染色した結果、Control 群では H/I 処置によって海馬 CA1、CA2 野および大脳皮質体性感覚野に多数の DHE 陽性細胞が認められたが、MAK 群では陽性細胞数が減少した (Fig. 42)。

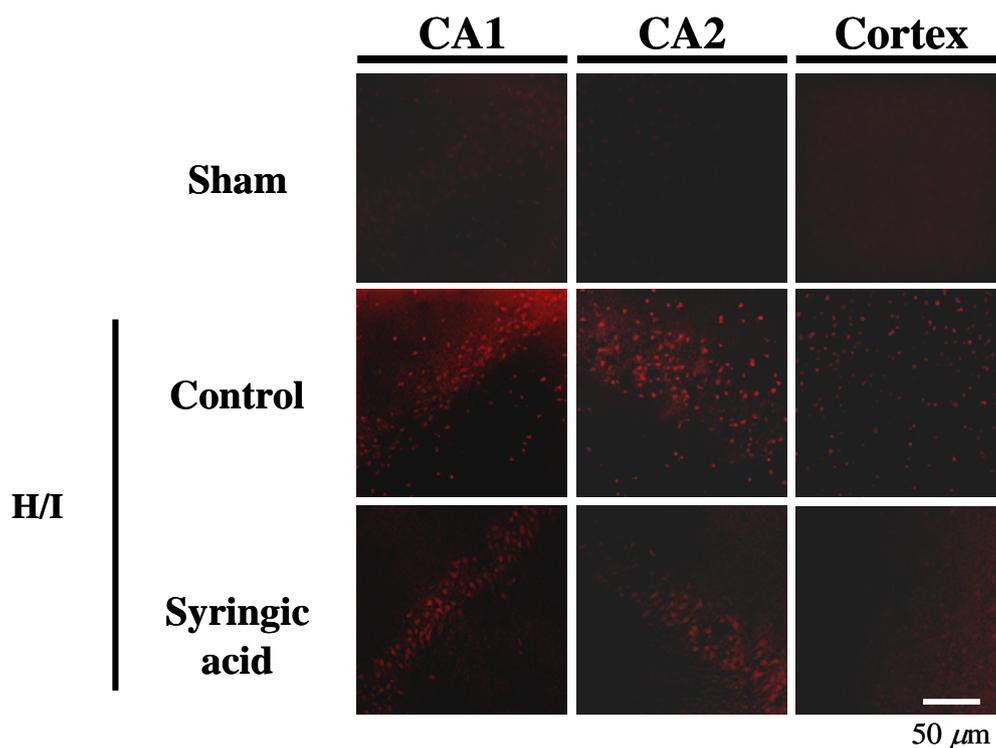


Fig. 42 Effects of chronic intake of syringic acid on the level of superoxide production in the mice brain tissue determined 24 hr after H/I by DHE staining. Representative data of DHE staining in the hippocampus, the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic syringic acid (50 mg/kg, p.o.) ingestion. Scale bar = 50 μ m.

第3節 本章の小括および考察

第1節：神経細胞保護作用の評価 (*in vitro*)

PC12 神経培養細胞にシリंगा酸を 1 時間処置後、擬似酸化ストレス処置として過酸化水素処置を行った。過酸化水素単独処理では細胞の生存率が有意に低下したのに対して、シリंगा酸共存下では、その生存率が濃度依存的に有意に増加した。また、過酸化水素処理により細胞内の ROS 産生を増加させたのに対して、シリंगा酸は濃度依存的に抑制した。以上の結果から、シリंगा酸は、神経培養細胞における酸化ストレスに対して保護効果を示すことが明らかになった。

第2節：脳保護作用の評価 (*in vivo*)

KK-*A^y* マウスにシリंगा酸 (50 mg/kg body weight/day) を 1 週間経口投与後、H/I 処置を行った。その結果、Control 群 (水投与) に比べ、神経症状および運動機能障害が改善し、脳梗塞巣の形成を有意に抑制した。以上の結果から、シリंगा酸は、KK-*A^y* マウスの H/I モデルに対して脳保護効果を示すことが明らかになった。

本章の結果から、MAK 中のシリंगा酸は、H/I 処置における脳障害に対して脳保護作用があることが認められた。しかし、シリंगा酸以外にも抗酸化作用を有する成分の存在が想定され、今後新規化合物の同定とそれらの脳保護効果について検討する必要がある。

考察

本研究の第1章では、頸動脈結紮および一過性低酸素負荷により虚血性脳障害を誘発した低酸素脳虚血（H/I）障害モデルマウスを用いて、菌糸体抽出物（LEM、MAK）の長期摂取による脳保護効果を検討した。

虚血性脳障害の発生・進展メカニズムには、酸化ストレスの関与が大きいことが知られている⁶⁾。脳虚血発作時の脳梗塞巣内では、血流の著しい減少によるエネルギー代謝障害により、脳細胞が数分以内に不可逆的壊死に陥る。また、血流の再開に伴う様々なフリーラジカルの発生は、虚血周辺領域のペナンプラ領域において、酸化障害によるアポトーシスにより遅発性細胞死が誘導され、梗塞巣の拡大が徐々に進行する⁷⁻¹⁰⁾。O₂[•]、H₂O₂、•OHなどのROSは、細胞内のDNA損傷や脂質の過酸化、蛋白質の変性などを誘導し、アポトーシスを引き起こす。脳は、酸素消費率が高くROSの発生しやすい臓器であると共に、フリーラジカル反応を触媒する鉄や細胞膜のリン脂質に含有する多価不飽和脂肪酸が非常に豊富である等の理由から、ROSによるダメージを受けやすいことが知られている⁶⁸⁻⁷⁰⁾。特に、抗酸化酵素の含有量が少ない海馬CA1領域の錐体細胞や小脳のプルキンエ細胞などが選択的に障害されやすく、酸化ストレスに対して脆弱である^{8,9)}。このように、脳梗塞急性期における酸化ストレス障害は、病態の進展への影響が大きいことから、近年、酸化ストレスの軽減をターゲットとした脳保護療法が注目され、エダラボンを代表とするフリーラジカル消去薬の開発が進められてきたが、現在もより有効な治療薬を求めて研究開発がなされている^{4,5)}。

一方、抗酸化成分を含有する天然物の虚血性脳障害に対する保護効果に関する報告がこれまでも数多くなされている¹¹⁻¹³⁾。中でも、抗酸化活性を有する椎茸や霊芝の子実体抽出物が酸化ストレスによる細胞死を抑制することが報告されている^{71,72)}。本研究で用いたLEMやMAKは、担子菌である椎茸または霊芝の菌糸体を固形培地に接種し、子実体発生直前まで一定期間培養した後、培地と共に熱水抽出・凍結乾燥したもので、滋養強壮を目的とした健康食品として用いられている。椎茸や霊芝の生理活性に関するこれまでの研究では、主

に子実体あるいはその抽出物を用いたものが大部分であるが、通常、子実体の発生には相当の時間が必要となり、その摘み取り時間による成分含量のばらつきや抽出率が一定でないこと、さらにはカビなどの微生物の汚染を受けやすいなどの欠点がある。これに対して、LEM や MAK は、人工的に管理された菌糸体のみは無菌的な培養により、安定した品質が維持されている。これまでに、*in vitro* における抗酸化作用評価実験から、子実体と同等の O₂ 消去能、ラジカル捕捉能および過酸化脂質産成抑制能を有することが明らかになっている。

先行研究から、LEM (データ未発表) や MAK¹⁵⁾ は H₂O₂ 処理後の PC12 細胞の生存率を上昇させ、そのメカニズムの一つにアポトーシスの抑制が寄与していることを見出している。この結果は、菌糸体抽出物が培養液中の H₂O₂ 由来の酸化ストレスによる DNA や細胞膜、機能性蛋白質等の障害から細胞を保護するものであることを示唆していた。第一章の結果から、LEM や MAK は H/I 処置による体内酸化ストレスの増大を有意に抑制し、神経障害の悪化や脳梗塞巣体積を減少させた。さらに、虚血ペナンプラ領域の海馬 CA1、CA2 野および大脳皮質体性感覚野において、フリーラジカルの O₂ 産生を抑制し、脳細胞のアポトーシスを顕著に抑制した。これらの *in vivo* 実験から、低酸素脳虚血状態、その後の酸素再供給時に発生する酸化ストレスを菌糸体抽出物が抑制して、脳細胞保護効果を示すことが明らかになった。そこで、その作用メカニズムと活性本体を明らかにするため、第 2 章では菌糸体抽出物の脳保護作用メカニズムの解析、第 3、4 章では、抗酸化作用を指標とした活性本体を探索して、脳保護効果を評価した。また、MAK の抗酸化活性が LEM より強いことから、第 2 章以降は MAK に注目することとし、まず第 2 章において、肥満・2 型糖尿病における H/I 障害のメカニズムについて調査することにした。

第 2 章では、肥満・2 型糖尿病マウスの H/I 障害に対する MAK の保護作用様式とともに、H/I 障害メカニズムについて解析した。その結果、H/I 障害メカニズムに ER ストレスが深く関与していることが明らかとなった。また、MAK は酸化ストレスのみならず ER ストレスを抑制して脳障害を軽減する可能性が示唆された。

虚血性脳障害には、酸化ストレスとともにERストレスが関与すること、さらに、ERの機能障害が酸化ストレス下において早期から生じる現象であることが知られている。通常、再灌流時に産生されるROSやRNOSあるいは、カルシウムの細胞内流入による恒常性の攪乱がERストレスを生じる。特に、神経細胞は神経栄養因子などの分泌蛋白質を盛んに合成することから、機能の亢進した小胞体が豊富に存在して⁷³⁾、このために小胞体機能を起因とするアポトーシスが生じやすいと考えられる⁷⁴⁾。

一方、肥満や糖尿病などの生活習慣病もERストレスと関連し、近年では、ERストレスが肥満、1型/2型糖尿病などの発症・悪化要因となる可能性が明らかになってきた。肥満マウスでは、小胞体ストレスによって、インスリン受容体シグナル伝達が抑制されることでインスリン耐性や糖尿病へと進展させると報告されている⁵⁶⁾。加えて、近年、肥満・2型糖尿病態時の虚血性脳障害の悪化に、ERストレスが重要な役割を果たす可能性が報告されている⁵⁷⁾。しかし、詳細なメカニズムについては未だ明らかになっていないため、本研究では、そのメカニズムについて仮説（I）、仮説（II）を提起してこれにもとづいて解析を行った。同時に、肥満・2型糖尿病態マウスのH/I障害に対して、脳保護効果が認められたMAKの作用様式についても検討した。

Wang らの研究グループによる肝臓の ER ストレス経路⁵⁸⁾ は、脳における経路を推定する上で重要な知見となった。空腹時の肝臓において、転写因子 CREB は、CRTC2 (CREB 転写活性化補助因子) と相互作用することによって肝臓の糖新生の遺伝子発現を誘導し、血糖値を上昇させる。Wang らは、遺伝的な肥満・糖尿病モデルマウス (*db/db* マウス) では、急激な ER ストレスの際に小胞体から核内に移行する活性化した転写因子 ATF6 (ER ストレスセンサー蛋白質) も細胞核内で CRTC2 と相互作用することを明らかにした。つまり、ATF6 と CREB がそれぞれ CRTC2 との相互作用に関わり、両転写因子は CRTC2 を介して競合することになる。そのため、ER ストレスによる ATF6 の活性化は、CREB と CRTC2 の相互作用を阻害すると考えるものである。このため、小胞体ストレス時の肝臓では、ATF6 によって誘導されるシャペロン蛋白質の遺伝子発現が増加する一方で、CREB によって誘導される糖新生遺伝子

の発現が減少して、血糖値が低下すると考えられる。そこで、本研究の血糖値の変化に注目すると、H/I 処置後から血糖値の有意な低下が見られ、Wang らの考えに従えば、脳においても H/I 処置により急激な ER ストレスが誘導されると考えられた。しかし、これまでに、脳組織において、虚血性脳障害時におけるこの経路の存在は証明されていない。そこで、H/I 処置による脳障害メカニズムについて仮説 (I) にもとづいて検討した (Fig. 22)。

脳において、CREB は転写因子として *Bdnf*、*Bcl-2*、*Ngf* などの神経保護因子の発現を誘導する。これまでに、虚血性脳障害では BDNF、*Bcl-2*、NGF などの発現が減少して脳障害が悪化することが報告されており、特に、抗アポトーシス因子の *Bcl-2* の減少により、アポトーシス経路が活性化することから、*Bcl-2* を量的に確保することで変性疾患の治療に応用できるものとして注目されている⁷⁵⁾。

CHOP は ER ストレス下で誘導される転写因子として知られているが、本研究では ER ストレスマーカーとして用いることにした。H/I 処置後、大脳皮質のペナンプラ領域において、*Chop* の発現が増加した。また、H/I 処置による ATF6 の核内移行量が増加し、ATF6 によって誘導されるシャペロン蛋白質の *Hsp70* の遺伝子発現が有意に上昇することが確認できた。一方、MAK 群では *Chop* の発現が低下する傾向が認められた。これらの結果は、H/I 処置により ER ストレスが増大し、MAK がそれを抑制することを示唆していた。一方、CREB によって誘導される神経保護因子 (*Bdnf*、*Bcl-2*) の遺伝子発現は、H/I 処置により有意に減少したことから、H/I 処置によって ATF6 が活性化され、核内に移行して CRTC2 と相互作用することによって、CREB-CRTC2 の相互作用を阻害し、CREB によって誘導される神経細胞保護因子の発現が減少する可能性を強く示唆していた。これに対して、MAK の摂取によって、H/I 処置後も神経細胞保護因子の減少は認められなかった。

第 1 章で示したように、MAK の長期摂取が H/I 障害によって誘発された脳実質の O₂ 産生を有意に抑制したことから、MAK の脳保護作用は、虚血性脳障害の早期段階の酸化ストレスと ER ストレスの軽減により、病態の進展が抑制された結果であると考えられた。

今回得られた結果から、Control 群では CREB によって誘導される *Bcl-2*、*Bdnf* 量が H/I 処置によって顕著に減少したが、MAK 群では、その減少が有意に抑制されていた。今後、H/I 処置後の細胞核内における CRTC2 と ATF6 あるいは CREB との相互作用がどの程度関与しているかについて詳細に検討する必要がある。

肥満・2 型糖尿病マウスの H/I 障害における脳障害の悪化には、急激な ER ストレスが重要な役割を果たすことが明らかになり、そのメカニズムをさらに詳細に解明するために仮説 (II) を設定して検討した (Fig. 25)。その結果、障害の悪化は、慢性的な ER ストレスにも起因することが強く示唆された。

正常マウスでは、H/I 処置によって ER ストレスが誘導され、神経保護因子の減少が脳障害を悪化させる要因の一つと考えられる。一方、肥満・2 型糖尿病マウスは、慢性的な酸化ストレス状態であるとともに平常時から慢性的な ER ストレス状態であることも確認された。従って、H/I 処置によって急激な ER ストレスが惹起された結果、CREB により発現が誘導される *Bcl-2*、*Bdnf* の発現が減少したものと説明できる。

また、CRTC2 は ATF6 との相互作用により、シャペロン蛋白質遺伝子の発現を増加させることで脳障害が抑制されると推定した。シャペロン蛋白質は、虚血環境下で活性酸素による攻撃や ATP の低下によって正常な構造が保たれない蛋白質に結合して、周辺環境が非可逆的に変性するのを阻止し、虚血環境が改善した後に蛋白質の構造を元に戻す役割を担うと考えられる^{58,59)}。1985 年、Nowak らが脳虚血下で HSP70 の発現が亢進していることを報告して以来、数多くの報告がなされ、HSP70 が神経細胞を虚血の影響から保護していると考えられている⁵⁸⁾。今回の結果は、正常血糖マウスでは H/I 障害により *Hsp70* の遺伝子発現が増加したことから、脳保護に作用しているものと考えている。

これに対して、肥満・2 型糖尿病態は、平常時から慢性的な ER ストレス状態であることから ATF6 が常に活性化し、一方で備蓄されるべき ATF6 量が十分ではない状態と考えられる。このために、ひとたび急激な ER ストレスを誘導する H/I 処置を行うと、必要なシャペロン蛋白質が十分確保できないために脳障害が悪化すると考えた。これまでに、*db/db* マウスの肝臓においても、正

常マウスに比べて、ATF6 が欠乏状態であることが報告されていたが、Wang らはこの現象が、肥満状態で生じる慢性的な長期間の ER ストレスにより ATF6 が十分に供給できない結果であると予測した⁵⁸⁾。以上のことから、脳組織において生じる肥満・2 型糖尿病モデルマウスの脳障害の悪化には、慢性的な ER ストレスが起因している可能性が強く示唆された。

本章の結果から、肥満・2 型糖尿病モデルマウスの H/I 障害には、仮説 (I) の ER ストレス経路を経由すると考えられ、MAK は酸化ストレスの軽減と共に ER ストレスを低下させ、その結果脳障害が軽減するものと結論づけた。また、脳障害が悪化する現象は、仮説 (II) の慢性的な ER ストレスにも起因していると考えた。

ところで、MAK の脳保護作用には酸化ストレスと ER ストレスの軽減のほか、虚血時の脳血流増加作用、抗炎症作用等が関与している可能性も考えられる。梗塞領域では炎症反応が惹起されており、フリーラジカル産生を伴う炎症細胞の集積や、炎症性サイトカインによる神経細胞損傷および血管内皮障害が梗塞周辺領域に誘導される⁷⁶⁾。今回データは示さないが、MAK には抗炎症作用⁷⁷⁾も確認されていることから、MAK の抗炎症作用を介した脳保護作用についても今後検討する必要がある。加えて、虚血性脳障害メカニズムには、NMDA 受容体の活性化を介する細胞内 Ca イオン濃度の上昇や NO 産生、血管内皮機能の障害といった様々な因子や機能が関与していることから、今後、MAK の脳保護作用について包括的に解明していく必要があると考えられる。

第 1 章および第 2 章から、MAK は虚血性脳障害による酸化ストレスのみならず ER ストレスを軽減して脳障害を抑制する可能性を示唆していたが、活性本体は明らかになっていないことから、第 3 章ではその活性成分の探索を行うことにした。その結果、MAK 中には複数の抗酸化成分が含まれ、これらの成分が MAK の強い抗酸化活性を示していると考えられた。さらに、MAK から 4 成分を同定したが、このうち抗酸化活性を指標とした評価では、シリンガ酸とバニリン酸の 2 成分に活性が認められ、特に前者はバニリン酸に比べ約 20 倍以上の強い活性を示した。また、MAK 中のそれらの含有量を測定した結果、

長期間培養した子実体中の含量と比べて同程度であることが明らかとなった (Table 8)。

これまでに、霊芝の子実体成分中には多数の多糖およびトリテルペノイドが含まれ、同時にこれらが抗酸化作用を有していることも報告されている。これら成分の作用には、直接的なラジカル消去作用とともに動物個体の SOD や GPx などの抗酸化酵素活性の上昇作用があることが報告されている⁷⁸⁻⁸²⁾。

MAKには、霊芝の菌糸体成分に加え、菌糸体による固形培地の分解物や菌糸体の自己消化成分なども含まれ、その主な物質として多糖類、蛋白質、核酸、微量元素、リグニン、およびリグニンの分解産物であるポリフェノール化合物などがある。リグニンは、高等植物の木化に関与する高分子フェノール性化合物であり、ヒトにとっては生物学的利用性に乏しいと考えられてきた物質である。霊芝など担子菌を含む木材腐朽菌は、ラッカーゼやマンガンペルオキシダーゼなどのポリフェノール分解酵素により、リグニンを分解し利用している。これら酵素反応によるリグニンの低分子化に伴い、リグニン構造に含まれ反応性に富むフェノール性水酸基が遊離状態で露出し、より強い抗酸化活性や生理活性を示す低分子リグニンやリグニン分解物のフェノール性化合物が生じる。MAK中には、菌糸体が固形培地を分解する過程で同様の反応が生じて得られた物質が多く含まれていると考えられる。

Itoらは、椎茸菌糸体培養培地抽出物 (L.E.M.) からシリング酸およびバニリン酸を同定し、ラット四塩化炭素処置による慢性的なラジカル肝障害モデルに対して肝保護作用を示すことを報告している⁸³⁾。今回、同定した成分は新規の化合物ではないが、MAK中に含有することを初めて明らかにした。加えて、ポリフェノール類は、分解の過程における酸化反応によって重合したり、他のフェノール類と結合することから、新規なポリフェノールが産生されている可能性も考えられる。したがって、シリング酸やバニリン酸に加えてMAK中の抗酸化活性成分が、低分子のリグニン様物質やリグニン分解物、テルペノイド等のポリフェノールが虚血障害によって破綻した血液脳関門を通過し、脳内で抗酸化作用を発揮している可能性や、高分子のリグニンや多糖類が生体内抗酸化物質の消費を抑制していることなどが考えられる。

今回、MAKから抗酸化作用を有する成分としてシリング酸とバニリン酸の2つの成分以外に、アデノシンとニコチン酸アミドも同定された。これら成分には、シリング酸やバニリン酸に比べて極だった抗酸化作用は認められなかったが、アデノシンには、抗ウイルス作用⁸⁴⁾、抗炎症作用⁸⁵⁾、さらに虚血性脳障害を抑制することが報告されている⁸⁶⁾。一方、ニコチン酸アミドは、抗酸化活性の存在が先行研究によって報告されているとともに、一過性脳虚血処置によるNF- κ Bの活性化を抑制することで脳保護効果を有することがすでに報告されている⁸⁷⁾。

MAKの単回投与(1 g/kg, p.o.)による効果について検討を行った結果、脳梗塞巣体積の減少傾向が見られたものの、明らかな脳保護作用は単回投与では認められなかった¹⁵⁾。薬物動態や薬力学視点からの検討はまだ行っていないが、これらの結果からMAKの脳保護作用には、含有する抗酸化成分の直接作用だけでなく、長期投与によって生体内で誘導された抗酸化酵素活性の上昇などの間接的な作用も寄与している可能性が考えられる。

以上のことから、MAK中の活性成分の探索は、機能的食品や治療を目的とした新たな医薬品開発にも貢献できる点で意義あるものと考え、シリング酸とバニリン酸以外の抗酸化活性成分を更に探索するとともに薬物動態や薬力学視点からの検討、生体内における抗酸化酵素活性への影響等についても今後検討が必要である。

第3章で示したシリング酸の抗酸化活性は、脳梗塞急性期のラジカル消去薬として使用されているエダラボンに匹敵していたことから、第4章ではシリング酸にターゲットを当て、神経細胞や動物モデルに対する保護作用について検討した。その結果、シリング酸は、神経培養細胞における酸化ストレスを抑制し、さらにKK-A^yマウスのH/I障害に対して脳保護効果を示すことが明らかになった。

シリング酸は、これまでに強い抗酸化作用、抗増殖性作用^{88, 89)}、抗内毒素作用⁹⁰⁾、抗癌作用⁹¹⁾、肝保護作用^{68, 92, 93)}等が報告されているが、虚血性脳障害に対する神経細胞保護効果に関する報告はない。脳は、グリア細胞や血管内

皮細胞など異なった種類の細胞によって構成されているが、中心的存在である神経細胞は虚血に対してとりわけ脆弱である⁶⁾。神経細胞は、エネルギー代謝を血流から供給されるグルコースと酸素に依存しており、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化によって ATP を得ているため、虚血や低酸素状態による障害を受けやすい^{94, 95)}。従って、長時間に及ぼす虚血では脳を構成するすべての細胞が壊死に陥るが、虚血が短時間である場合、神経細胞のみが死に至る⁶⁾。Zhao らは、霊芝子実体から抽出した多糖体が、ラット大脳初代培養細胞における hypoxia/reoxygenation 処置による細胞死を抑制することを報告した⁶³⁾。そこで、本研究では PC12 神経培養細胞を用いて、ROS の一種である過酸化水素を用いた方法で神経細胞に酸化ストレス負荷してシリング酸の効果を検討した。

本研究では、PC12 細胞にシリング酸を 1 時間処置した後、過酸化水素処置を行ったもので、過酸化水素単独処置では細胞の生存率が有意に低下したのに対して、シリング酸共存下では、その生存率が濃度依存的に増加傾向が認められた。また、過酸化水素処置により細胞内の ROS 産生が増加したのに対して、シリング酸処置は有意にこれを抑制した。以上の *in vitro* 実験による結果は、神経培養細胞においてシリング酸が過酸化水素由来の酸化ストレスに対して保護作用を示すことを強く示唆していた。

Zhou らは、霊芝子実体から抽出した多糖類が、ラットの一過性脳虚血モデル (MCAO/Re) において誘導されたアポトーシスを抑制し、脳梗塞巣を改善することも報告している²⁶⁾。本研究の *in vivo* 評価では、KK-A^y マウスに対するシリング酸 (50 mg/kg) の 1 週間経口投与は、H/I 処置後の虚血ペナンプラ領域の海馬 CA1、CA2 野、大脳皮質体性感覚野において O₂ 産生を抑制した。さらに、神経症状や運動機能障害を改善し、脳梗塞巣の形成を有意に抑制した。以上の *in vivo* 実験による結果から、シリング酸は、脳の虚血部位においても有効に働き、虚血また再灌流時における酸化ストレスを低下させ、脳保護効果を示すことが明らかになった。

シリング酸の分子量は、198.17 と比較的小さく、脳保護薬として使用されているエダラボン (Mw 174.2) とほぼ同等ではあるが、脂溶性ではないため無

処置マウスの血液脳関門の透過については現在までのところ不明である。しかし、低酸素脳虚血の誘発によって血液脳関門への破綻が少なからず透過に影響することが報告されていることから、このような状況下での透過については、その可能性を秘めている⁹⁶⁾。いずれにしても、経口投与による代謝の影響も不明であることから脳移行性については今後の課題である。

以上より、H/I処置における脳障害に対して、MAKに含有するシリンガ酸が脳保護作用の一因となっていることが明らかになった。しかし、シリンガ酸以外にも抗酸化作用を有する成分の存在が想定され、今後新規化合物の同定とそれらの脳保護効果について検討する必要がある。

これまでに抗酸化作用を有する健康食品による脳保護作用については数多く報告がなされているものの、これらを疾病の予防や初期の治療に適切かつ有効に活用されているとは言い難い。本研究において、MAKの機能性食品としての有用性が評価でき、今後、医薬品に匹敵する効果を持つ食品でありながら脳障害の軽減が期待できる機能性食品として、さらに疾病の予防に利用することも十分に期待できると考える。さらに、活性成分の同定とその作用メカニズムを解明する意義は、脳梗塞治療を目的とした新たな医薬品開発にも貢献できると考えるものである。

総括

虚血周辺部であるペナンプラ領域の神経細胞死は、酸化ストレスによる影響が大きいことから、その軽減をターゲットとした抗酸化物質による脳保護療法に注目し、本研究では、抗酸化作用を有する菌糸体抽出物の低酸素脳虚血障害に対する保護効果を検討した。また、肥満・2型糖尿病の併発による脳障害悪化の機序と菌糸体抽出物の保護作用について、酸化ストレスとともにERストレスとの関与を検討した。さらに、抗酸化活性を指標とした活性本体の探索を行い、同定された成分の抗酸化活性評価と細胞および動物モデルに対する神経細胞保護作用について検討した。

本研究において、以下の諸点を明らかにすることができた。

1. 虚血再灌流時に過剰産生する酸化ストレスによる神経細胞死に対して、抗酸化作用を有する菌糸体抽出物のLEMあるいはMAKの長期摂取は脳保護効果を示した。その作用メカニズムの一端として、酸化ストレスの軽減によるアポトーシスの減少が考えられた。
2. 肥満・2型糖尿病マウスのH/I処置による脳障害メカニズムにはERストレスが関与し、MAKの脳保護作用メカニズムには酸化ストレスとともにERストレスの低下が関与することが明らかになった。また、肥満・2型糖尿病モデルマウスにおいて生じるH/I障害の悪化には、慢性的なERストレスが起因する可能性が強く示唆された。
3. MAK中には多数の抗酸化活性成分が含まれていることが明らかとなり、今回同定された4成分の中で、シリング酸とバニリン酸に抗酸化作用が確認された。特に、シリング酸のDPPHフリーラジカル消去能はVCと同程度の作用を示し、脳梗塞急性期の治療薬として使用されているエダラボンの効果に匹敵していた。

4. シリンガ酸は、*in vitro* および *in vivo* 実験において、酸化ストレスを抑制して脳保護作用を示すことが明らかになった。

本研究では、虚血性脳障害のメカニズムに加えて肥満・2型糖尿病における脳障害の増悪メカニズムの解明により、神経障害の発生予防や治療方針を決定する上で有益な情報を得ることができた。さらに、食品・食品成分による病態の改善や予防効果を図ることを目的とした本研究計画では、MAK 中の活性本体の情報も必要であると考えて、その有効成分の一部について明らかにすることができたが、今後も未知の活性成分を探索することは機能性食品の評価に加えて新たな医薬品開発にも寄与できる点で今後も継続していく必要があると考える。

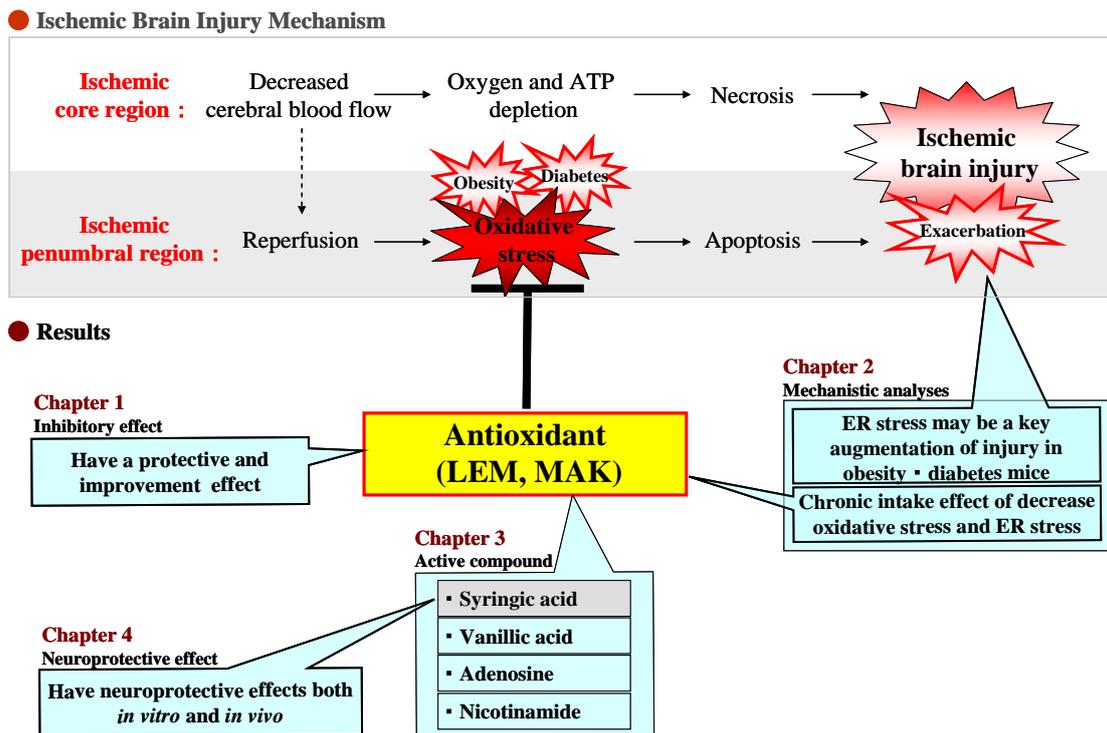


Fig. 43 Conclusion

謝辞

本研究に際し、脳研究に向けて価値あるテーマを与えていただくと共に終始ご指導並びにご鞭撻を賜りました 城西大学大学院薬学研究科 生体防御学講座 教授 日比野 康英先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました 同大学院薬学研究科 薬品作用学講座 准教授 岡崎 真理先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、**MAK** 中の有効成分の探索および同定にあたりご協力頂きました 同大学院薬学研究科 生薬学講座 教授 白瀧 義明先生、および **HPLC**、**NMR**、**MS** などの測定、成分同定の細部に亘ってご指導頂きました 城西大学薬学部 生薬学研究室 助教 鈴木 龍一郎先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始ご指導並びにご助言を賜りました 同大学院薬学研究科 生体防御学講座 助教 神内 伸也先生、城西大学薬学部 生体防御学研究室 助手 岩田 直洋先生に深謝の意を表します。

本論文の審査並びに貴重なご意見をいただきました 同大学院薬学研究科 薬物療法学講座 教授 津田 整先生、同大学院薬学研究科 分子栄養学講座 教授 松本 明世先生に謹んで感謝申し上げます。

実験の部

実験の部

第1章 マウスの虚血性脳障害に対する菌糸体抽出物の脳保護効果

1. 実験材料

本研究では野田食菌工業（株）において製造された「LEM」と「MAK」を使用した。

椎茸菌糸体また霊芝菌糸体ペレットを、バガス（砂糖キビ搾汁残渣）と脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、約 3.5 ヶ月間培養後、子実体発生直前に培地ごと破碎し、蒸留水に懸濁、熱水抽出した。抽出物を珪藻土上で濾過した後、メンブランフィルター（0.45 μm ）にて濾過滅菌し、濾液の乾燥品（粉末）をそれぞれ LEM および MAK として実験に用いた。椎茸菌糸体培養培地抽出物を LEM として第 1 節で、第 2 節では霊芝菌糸体培養培地抽出物を MAK として使用した。

2. 実験動物

第 1 節：C57BL/6J Kwl 系雄性マウス（7 週齢, 東京実験動物）を温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照度サイクル 12 時間（明期 7:00~19:00）の環境下、固形飼料（CE-2; 日本クレア株式会社）および水を自由に摂取させ飼育した。1 週間予備飼育後、無作為に 3 群に分け、対照群には粉末飼料（CE-2）を、他の 2 群には 0.5% または 1%（w/w）で LEM を混合した粉末飼料を 14 日間自由に摂取させた（Scheme 1）。

第 2 節：KK-A^y/TaJcl 系雄性マウス（7 週齢、日本クレア）を温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照度サイクル 12 時間（明期 7:00~19:00）の環境下、固形飼料（CE-2）および水を自由に摂取させ飼育した。1 週間予備飼育後、無作為に Control-Sham 群、Control 群、MAK-Sham 群、MAK 群の 4 つにそれぞれ群分けした。MAK（1 g/kg body weight/day）の経口投与は、胃ゾンデを用いて 7 日間行った。Control 群には同量の蒸留水を投与し、実験に

使用した。体重と摂取量は経口投与 1 日目、4 日目、7 日目に測定した (Scheme 2)。

すべての動物実験は、総理府の「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」に従うとともに、本研究計画の動物実験委員会による審査結果に基づいた学長承認を得て、「城西大学動物実験規定」に従って実施した。

3. 低酸素脳虚血 (H/I) 障害モデルの作製^{15,97)}

第 1 節：正常血糖マウスである C57BL/6J Kwl 系雄性マウス H/I 障害モデルの作製は、マウスをハロタン (2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane, 武田薬品工業) で麻酔 (導入：5%，維持：1.5%) し、仰臥位に固定後、頸部を正中切開した。右総頸動脈を迷走神経より剥離、二重結紮し、最後に切開部を縫合した。総頸動脈結紮 3 時間後、マウスをガラス容器に入れ、低酸素ガス (8% O₂/92% N₂) を 30 分間負荷した。この間、水浴と赤外線ランプによってガラス容器内を 35.5°C に保温した。その後、マウスを通常大気中のケージに戻して擬似的な再灌流状態を誘発し、餌および水が自由に摂取できる環境で 24 時間飼育した。擬似手術処置 (Sham, n=6) 群には、頸部の切開と右総頸動脈剥離のみを行った後、低酸素負荷を行った (Scheme 1)。

第 2 節：肥満・2 型糖尿病マウスである KK-A^y/TaJcl 系雄性マウス (KK-A^y マウス) H/I モデルの作製は、第 1 節の正常マウスの H/I 障害モデル作製と同様な手技で行った。ただし、KK-A^y マウスの場合は、H/I 処置による障害が悪化し死亡率が高いため、低酸素負荷条件が正常マウスの H/I モデル作製条件と異なり、負荷中のガラス容器内温度を 36.0°C に維持し、20 分間とした (Scheme 2)。

4. 生体内の酸化ストレス度の測定⁹⁸⁾

H/I 処置前後の生体内酸化ストレス度を、d-ROMs テスト (Diacron International, Grosseto, Italy) を用いて測定した。総頸動脈の結紮前および低

酸素負荷 24 時間後に、マウスの尾静脈から採取した 10 μL の血漿サンプルをキット付属の酢酸緩衝液に加えて混和し、10 μL 呈色クロモゲン (N,N ジエチルパラフェニレンジアミン) を加え、活性酸素・フリーラジカル自動分析装置 (F.R.E.E. : Free Radical Elective Evaluator, Diacron International) にて血中ヒドロペルオキシド濃度を指標として測定した。ストレス度数の単位は 1 CARR U とし、0.08 mg/dL の過酸化水素に相当する。

5. 神経症状スコアの測定 ^{15, 98, 99)}

H/I処置24時間後に、神経学的に①自発運動、②前後肢の麻痺、③歩行状態、④橋渡り、⑤感覚毛 (髭) に触れた時の反応、⑥横腹をつついた時の反応の計6項目について各マウスの神経症状をスコア化し、これらの合計値を用いて評価した (Table 12)。このスコアは、正常で最大18となり、数値が低いほど症状が悪化していることを表す。

Table 12 Neurological Scoring System

	Scores			
	0	1	2	3
Spontaneous activity, 3 min	No movement	Slight movement	Touches 1-2 sides of the cage	Touches 3-4 sides of the cage
Symmetry of movement, right forelimb and hind limb	Total asymmetry	Near-total asymmetry	Mild asymmetry	Complete symmetry
Floor walking	No walking	Walks only in circles	Curvilinear path	Straight path
Beam walking	Falls off the beam	Hugs the beam	Stands on the beam	Walks on the beam
Response to vibrissae touch		No response	Weak response	Symmetrical response as compared to unaffected side
Side stroking		No response	Weak response	Symmetrical response as compared to unaffected side

6. 運動機能障害の測定 ^{100, 101)}

Single Lane Rota-Rod テスト装置 MK-630B (室町機械株式会社) を用いて、H/I 処置直前 (手術前) と H/I 処置 24 時間後 (解剖前) のマウスの運動機能の評価した。直径 4 cm の回転軸上にマウスを乗せ、4-40 rpm で回転させてマウスを強制歩行させ、落下までの時間を測定した。H/I 処置 5 および 2 日前に練習を行った (5 回/日)。H/I 処置前および H/I 処置 24 時間後に各 3 回測定を行い、その平均値で評価した。

7. 梗塞巣体積の測定^{15, 97, 102)}

H/I 処置 24 時間後にハロタン麻酔下でマウスの脳を摘出し、ブレインマトリックスを用いて 1 mm 厚の脳切片を作製した。梗塞巣体積を評価するため 2% 塩化トリフェニルテトラゾリウム [2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), Sigma] を含む PBS (pH 7.4) 中で脳切片を 37°C、20 分間保湿した。TTC 染色した切片は、4% パラホルムアルデヒド (Paraformaldehyde, Wako) で固定し、梗塞巣をデジタルカメラ (E-330, OLYMPUS) を用いて染色画像を撮影した。染色されなかった白色部分を脳梗塞領域とし、画像解析ソフト (Scion Image 1.62) を用いて各サンプルの吻側および尾側の両面の梗塞面積を計測し、梗塞巣体積を次の式を用いて評価した。梗塞巣体積 (%) = [左半球体積 - (右半球体積 - 梗塞体積)] / 左半球体積 × 100

8. 組織染色

摘出したマウス脳を 4% CMC (Carboxymethyl cellulose sodium salt in DW, Leica) 凍結包埋剤を使用し、試料凍結装置 (UT-2000, FINETEC) を用いて、凍結ブロックを作製した。クライオスタット (CM3050S, Leica, Bensheim, Germany) にてマウス脳の凍結冠状切片 (8 μm 厚) を作製し、海馬 CA1、CA2 野および大脳皮質体性感覚野の一定領域の神経細胞障害について、各種染色法を用いて評価した (Fig. 44)。

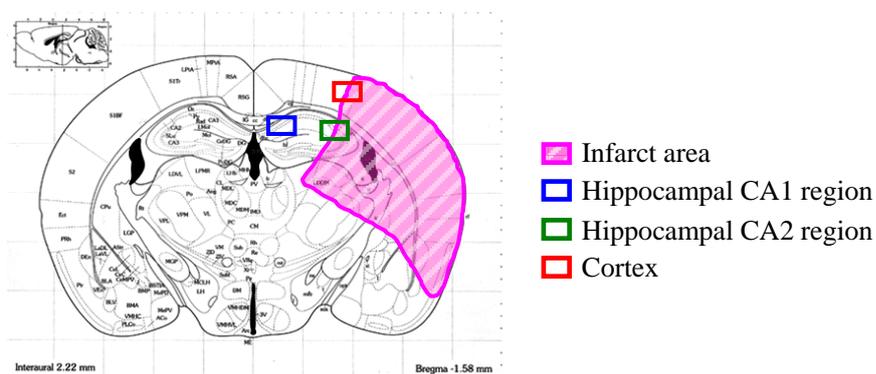


Fig. 44 Staining region of mouse brain

Show interaural 5.70 mm, Bregma-1.58 mm in mouse brain section. Cell death in the hippocampus, the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area of the mice brain determined 24 hr after H/I by using the HE Staining, TUNEL staining, Cleaved caspase-3 staining.

8.1. DHE 染色¹⁰³⁾

ROSの一種である O_2^- の産生を、dihydroethidium (DHE, Sigma) を用いた蛍光染色にて検討した。[DHEは、 O_2^- により酸化されエチヂウムブロマイドとなりDNAに結合する。] 8 μm 厚の冠状切片を作製後、スライドガラスにマウントした。その後、10 $\mu\text{mol/L}$ のDHEを作用させ、遮光した加湿ケース内で37°C、30分間インキュベートした。80%グリセリンで封入した後、共焦点レーザー走査顕微鏡 (IX81, OLYMPUS) にて観察した (Ex: 488 nm, Em: 574-595 nm)。DHEの蛍光強度をFV10-ASWソフトを用いて数値化し、各群の強度をSham群に対する相対値で表した。

8.2. HE 染色¹⁰⁴⁾

H/Iによって誘発された神経細胞のアポトーシスを組織化学的に検討するために、8 μm 厚の冠状切片を作製した。切片をスライドガラス上にマウントした後、メタノールで約2分間固定し、10 mMのPBS (7.75 mM Na_2HPO_4 , 1.90 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 145 mM NaCl) に浸した。ヘマトキシリン溶液 (Hematoxylin, サクラファインテックジャパン) に1分間浸して細胞核を染色した後、エオジン溶液 (Eosin, サクラファインテックジャパン) に10秒間浸し、細胞質を染色した。ゼラチンで封入後、光学顕微鏡 (BX51W1, OLYMPUS)、CCDカメラ (DP-50, OLYMPUS)、画像解析ソフト (Lumina Vision, 三谷) を使用して解析した。海馬CA1、CA2野および大脳皮質体性感覚野の一定領域の濃縮染色された核を有する細胞数を計測した。それぞれの領域のHE-positive cells は、 $\text{HE-positive cells (\%)} = \text{HE-positive 細胞数} / \text{全細胞数} \times 100$ で表した。

8.3. TUNEL 染色¹⁵⁾

H/Iによって誘発された神経細胞のアポトーシスに対する抑制効果を組織化学的に検討するために、マウスの脳冠状切片 (8 μm) を作製し、100%メタノールで固定後、TUNEL染色キット (Apoptosis *in situ* Detection Kit, Wako) を用いてアポトーシス陽性細胞を染色した。同時にヘマトキシリ

ンによる対比染色を行った。HE 染色時と同様に検鏡し、CA1、CA2 野および大脳皮質体性感覚野の TUNEL 陽性細胞数を計測した。 $TUNEL\text{-positive cells}(\%) = TUNE \text{ 陽性細胞数} / \text{全細胞数} \times 100$ で表した。

8.4. Cleaved caspase-3 の免疫蛍光染色^{15, 105)}

アポトーシスを促進するカスパーゼ系活性化の指標として、Cleaved caspase-3 の免疫染色を行った。マウスの脳冠状切片 (8 μm 厚) を作製し、ブロッキング剤 (1:4 ; ブロックエース™, 大日本住友製薬) で 2 時間処理し、1 次抗体 (1:100 ; Cleaved caspase-3 Rabbit mAb, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA) を 4°C で一昼夜作用させた後、2 次抗体 (1:100 ; Cy3 conjugated affinity purified secondary antibody, Chemicon International, Temecula, CA, USA) を室温で 2 時間作用させた。80% グリセリンで封入した後、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。前述の染色と同様、海馬 CA1、CA2 野および大脳皮質体性感覚野の一定領域の陽性細胞数を計測した。 $Cleaved \text{ caspase-3-positive cells}(\%) = Cleaved \text{ caspase-3 陽性細胞数} / \text{全細胞数} \times 100$ で表した。

9. 統計処理

データは、平均値 \pm 標準偏差として表示し、統計学的有意差は、Tukey-Kramer 法の多重比較により解析した。同一個体における H/I 処置前後の比較には、paired *t*-test を用いた。神経症状スコアに関しては、Kruskal-Wallis test による解析の後、Mann-Whitney *U* test を行った。検定における有意水準は 5% とした。

第2章：肥満・2型糖尿病モデルマウスの H/I 障害に対する MAK の脳保護作用メカニズムの解析

1. Total RNA 抽出および Real Time RT-PCR による遺伝子発現量の測定¹⁰⁶⁾

摘出した脳皮質ペナンプラ領域の組織片は、RNA later (Qiagen) に1昼夜4°Cにて浸潤し、-80°Cで保存した。Total RNA 抽出は、RNeasy micro Kit (Qiagen) を用いた。逆転写反応は、Prime Script™ RT reagent Kit (Takara Bio) により、500 ng の Total RNA を鋳型として 5 × Prime Script™ buffer (20 μL)、Prime Script™ RT Enzyme Mix (0.5 μL)、Oligo dT Primer (0.5 μL)、Random 6 mers (0.5 μL) 存在下で Mastercycler (Eppendorf; 37°Cで15分間、85°Cで5秒間、4°C維持) で反応させ cDNA を合成し、使用時まで-80°Cで保存した。

mRNA の定量には、SYBR premix Ex Taq (Takara Bio) を用いた。5 μL の 10 ng cDNA、0.8 μL の 10 pmol Target gene specific primers (Takara Bio)、10 μL の SYBR premix Ex Taq、4.2 μL の dH₂O を加え、iCycler thermal cycler (Bio-Rad) により Real Time RT-PCR を行った。反応条件は、95°Cで10秒間処理した後、95°Cで5秒、アニーリング温度は 60°Cで34秒として40サイクル行い蛍光量を検出した (*Hsp70* のみアニーリング温度が 66.2°Cで行った)。H/I 処置後に、虚血周辺部のペナンプラ領域におけるアポトーシス関連因子の発現量について検討した。各遺伝子のプライマー配列は Table 13 に示した。

RNA 発現量は、*β-actin* 量を内部標準として増幅サイクル数から各群の相対比で表し評価した。

Table 13 Sequences of PCR Primers Used (mouse)

Target gene		Sequence (5'–3')
<i>β-actin</i>	Forward	5' -CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'
	Reverse	5' -ATGGAGCCACCGATCCACA-3'
<i>Hsp70</i>	Forward	5' -CGCTCGAGTCCTATGCCTTCA-3'
	Reverse	5' -TCCTGGCACTTGTCCAGCAC-3'
<i>Bcl-2</i>	Forward	5' -GTGTTCCATGCACCAAGTCCA-3'
	Reverse	5' -AGGTACAGGCATTGCCGCATA-3'
<i>Bax</i>	Forward	5' -CAGGATGCGTCCACCAAGAA-3'
	Reverse	5' -GTTGAAGTTGCCATCAGCAAACA-3'
<i>Bdnf</i>	Forward	5' -TCAAGTTGGAAGCCTGAATGAATG-3'
	Reverse	5' -CTGATGCTCAGGAACCCAGGA-3'
<i>Chop</i>	Forward	5' -AATAACAGCCGGAACCTGAGGA-3'
	Reverse	5' -ACTCAGCTGCCATGACTGCAC-3'
<i>Grp78</i>	Forward	5' -GAACACTGTGGTACCCACCAAGAA-3'
	Reverse	5' -TCCAGTCAGATCAAATGTACCCAGA-3'

2. 細胞質および細胞核画分の調製^{107, 108)}

マウス脳の皮質ペナンプラ領域を 10 (w/v) になるように homogenization buffer [20 mM HEPES (pH 7.9), 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 4 μg/mL pepstatin A, and 4 μg/mL leupeptin] を加え、ホモジナイザーで粉砕した。4°C で 40 分間 105,000 × g で遠心した上清を細胞質画分とした。また、沈殿画分は、extraction buffer [20 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 20% glycerol, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 4 μg/mL pepstatin A, and 4 μg/mL leupeptin] で再懸濁し、30 分間氷上で静置した後、4°C で 20 分間 15,000 × g で遠心した上清を核画分とした。

3. Western blot 法による細胞外蛋白質および細胞内シグナルの解析^{107, 108)}

電気泳動用サンプルは、10~30 μg の細胞質および核画分のサンプルに、2 \times SDS サンプル緩衝液 [100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, 4% 2-mercaptoethanol, 0.1% bromphenol blue] を等量加えて調製した。電気泳動は、Mini PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad) を用いて、10~12% SDS-ポリアクリルアミドゲルにより行った。泳動後、セミドライブロットティング装置 (Bio-Rad) を用いて、100 mA で 1.5 時間、蛋白質を PVDF メンブタン (MILLIPORE) に転写した。続いて、メンブタンを 5% スキムミルク含有の PBS-T 溶液 (137 mM NaCl, 8.10 mM Na_2HPO_4 , 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 0.1% Tween 20) で一昼夜もしくは 1.5 時間ブロッキングした。一次抗体は、5% スキムミルク含有 PBS-T 溶液で希釈し、室温で 1 時間反応させた。メンブタンを PBS-T 溶液で 5 分 \times 5 回、室温で洗浄後、二次抗体は、5% スキムミルク含有 PBS-T 溶液で希釈し、室温で 1 時間反応させた。メンブタンを PBS-T 溶液で 5 分 \times 5 回洗浄した後、ECL もしくは ECL plus detection reagents (Amersham Biosciences) を用いて、X 線フィルム (Amersham Biosciences) に露光もしくは Light-Capture II (ATTO) で可視化した。使用した各蛋白質の抗体と濃度について Table 14 に示した。

Table 14 Antibody Information

Primary Antibody	Concentration	Secondary Antibody	Concentration
ATF6	1 : 100 (IMGENEX)	Anti-HRP conjugated donkey anti-mouse IgG Antibody	1 : 2000 (GE Healthcare)
β -actin	1 : 10,000 (Sigma)	Anti-HRP conjugated donkey anti-mouse IgG Antibody	1 : 10,000 (GE Healthcare)

4. 血糖値の測定

血糖値は、電極式血糖値測定器（デキスターZII，バイエルメディカル）によって、MAK 投与前、MAK 投与 1 週間後の血糖値をマウスの尾静脈血を用いて測定した。また、総頸動脈閉塞前（手術前）、総頸動脈閉塞直後（手術直後）、低酸素負荷前（手術 3 時間後）、低酸素負荷 24 時間後の各サンプルについても同様に測定した。血糖値測定ステップを Fig. 45 に示した。

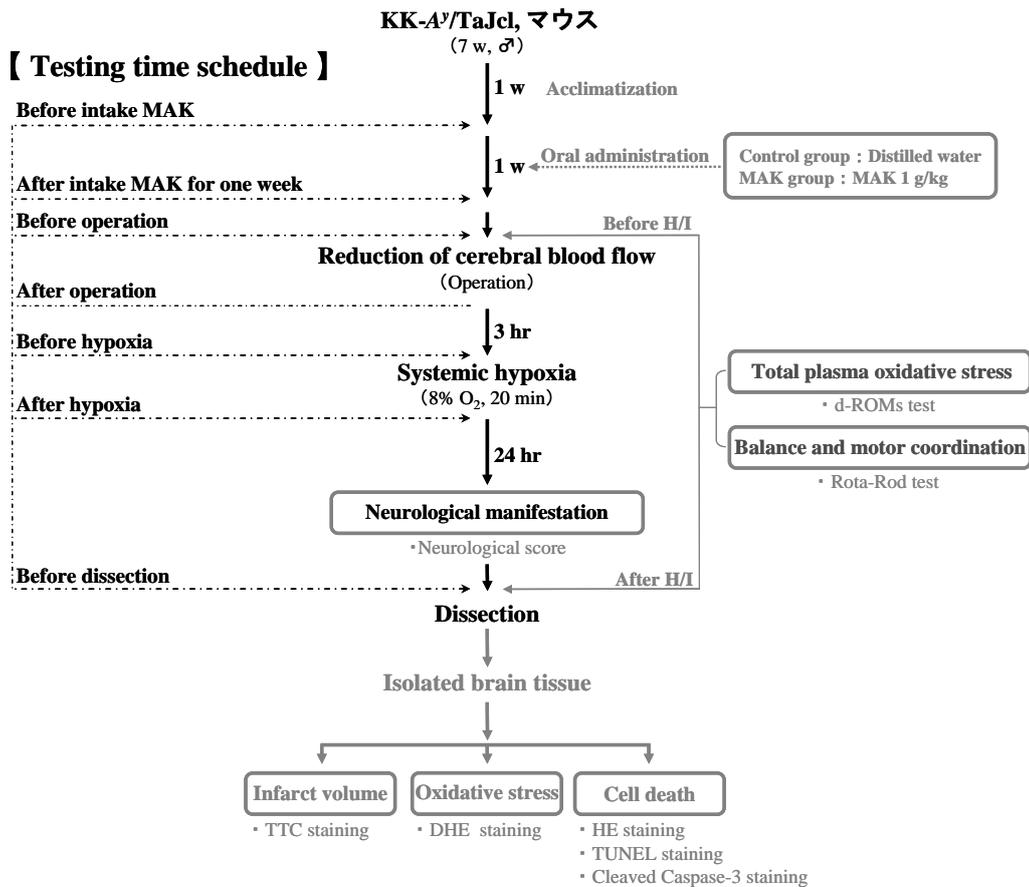


Fig. 45 Schedule of blood glucose testing

5. 統計処理

データは、平均値 ± 標準偏差として表示し、統計学的有意差は、Tukey-Kramer 法の多重比較により解析した。同一個体における H/I 処置前後の比較には、paired *t*-test を用いた。検定における有意水準は 5% とした。

第3章 抗酸化活性を指標とした MAK 中の活性成分の探索と同定

1. 材料

霊芝菌糸体培養培地抽出物 (MAK) については第 1 章に記した。

2. 成分の探索

2.1 分子ふるいによる分画 (small scale)

分画分子量が 3 kDa (3 K)、10 kDa (10 K)、30 kDa (30 K)、50 kDa (50 K)、100 kDa (100 K) のアミコンウルトラ遠心式フィルター (Amicon[®] Ultra-15, MILLIPORE) を用いて、分子量による分画を行った。各画分は、次の A~F で示した。3 K > A、10 K > B > 3 K、30 K > C > 10 K、50 K > D > 30 K、100 K > E > 50 K、F > 100 K。

MAK 原液 (10 mg/mL~50 mg/mL) を 3,900 × g で 15 分遠心して不溶性物質を沈殿させ、上清を回収した。その後、アミコンウルトラ遠心式フィルターのサンプルリザーバーに 12 mL を加えて、3,900 × g、25°C で遠心した。フィルターユニットに濃縮液が約 250~500 μL 残存するまで遠心 (himac CR20G, HITACHI) した後、フィルターユニットから濃縮液 (用いたフィルターのサイズより大きい分子) または、サンプルバイアルから溶液 (用いたフィルターのサイズより小さい分子) を回収して、凍結乾燥 [少量凍結乾燥; FREEZE DRYER (VC-36s), TAITEC] した (Scheme 3)。

2.2 3 kDa 以下の低分子画分 (3 K) の大量調製

加圧濾過装置 (攪拌式セル 8000, MILLIPORE) を用いて、MAK 3 kDa 以下の成分 (3 K と記) を調製した。大量の MAK 原液を 5 g/L (MillQ) 濃度に調整して、3,900 × g で 15 分遠心後、上清のみを回収した。その後、この上清をメンブレンフィルター (限界濾過ディスク PLBC, ウルトラセル再生セルロース, 3 kDa NMWL 63.5 mm, MILLIPORE) をセットしたタンクに (約 800 mL) 注入し、窒素ガス 0.2~0.3 MPa (Max; 0.48 MPa) で加圧濾過した。得られた溶出画分を回収し、凍結乾燥 (大量凍結乾燥; FREEZE DRY SYSTEM, FZ-12PV, LABCONCO, 朝日ライフサイエンス株式会社) した。

2.3 活性成分の分布と分離・分画

3 K 活性成分の極性や酸性、中性、塩基性の判別、酸、アルカリに対する安定性を評価した。50 mL チューブ 5 本に 3 K のサンプル各 40 mg を水に溶解させた後、各チューブに水より極性が低い有機溶媒を入れ、水層と有機溶媒層を得た。それぞれの極性によって分画した水層と有機溶媒層の抗酸化活性を比較・評価した (Fig. 32)。

3 K の分画には、吸着カラム (DIAION HP-20 イオン交換樹脂, 三菱化学)、逆相カラム (ODS)、順相カラム (Silica gel) の MPLC (YFLC AI-580, YAMAZEN)、HPLC (Waters) クロマトグラフィーによる種々の分画方法を組み合わせて行うとともに、各画分の含有量、抗酸化寄与率を評価しながら活性成分を探索した。

MAK 6.12 g から前記した方法によって 3 K を 4.7 g 得た。得られた 3 K を水に溶解した後、DIAION HP-20 にアプライして、水、メタノール (Wako)、アセトン (Wako) で順に溶出させ、Fr. 1 (2.6 g)、Fr. 2 (0.8 g) Fr. 3 (1.26 g) Fr. 4 (0.05 g) を得た。各フラクションの抗酸化活性を評価し、抗酸化寄与率が最も高いメタノール溶出物 Fr. 3 (1.26 g, 抗酸化寄与率 63.21%) について MPLC-1* の条件で分画を行い、Fr. A (0.3 g)、Fr. B (0.35 g)、Fr. C (0.22 g)、Fr. D (0.13 g)、Fr. E (0.08 g)、Fr. F (0.14 g)、Fr. G (0.01 g) を得た。各フラクションの抗酸化能と抗酸化寄与率が最も高い Fr. B (0.35 g, 抗酸化寄与率 28.47%) を MPLC-2* の条件で分画し、Fr. B-1~Fr. B-9 を得た。その中で Fr. B-4 (0.13 g, 抗酸化寄与率 26.35%)、Fr. B-5 (0.08 g, 抗酸化寄与率 26.95%)、Fr. B-6 (0.06 g, 抗酸化寄与率 22.16%) に抗酸化活性が認められた。Fr. B-4 (0.13 g) について、MPLC-3* の条件により Fr. B-4-1~Fr. B-4-9 を得た。Fr. B-4-5 から Compound 1 を単離した。Fr. B-4-4 (10.6 mg) について HPLC-1* の条件により分画し Compound 2 を混合物として単離した。また、抗酸化寄与率が Fr. B に続いて高い Fr. C (0.22 g) については MPLC-4* の条件により Fr. C-1~Fr. C-11 を得、そのうち Fr. C-2 から Compound 3、Compound 4 を混合物として得た (Fig. 34)。

以下に MPLC および HPLC における分離条件を示す (カラム, 溶出溶媒系,

溶出時間, 保持時間など)。

MPLC-1* : ODS Inject column (Cat. No. W917, M size, YAMAZEN), ODS column (ULTRA PACK, ODS-SM, 50 μm , 120 \AA , Size B 26 \times 300 mm, YAMAZEN), Water : MeOH [9:1 (7 min), 7:3 (7 min \times 3), 6:4 (7 min \times 3), 100% MeOH (7 min \times 3)]

MPLC-2* : ODS Inject column (Cat. No. W917, M size, YAMAZEN) , ODS column (ULTRA PACK, ODS-SM, 50 μm , 120 \AA , Size B 26 \times 300 mm, YAMAZEN), Water : MeOH [8:2 (7 min \times 3), 7.5:2.5 (7 min \times 3), 7:3 (7 min \times 3), 100% MeOH (7 min \times 2)]

MPLC-3* : Silica gel Hi-Flash column (Cat.No.W003, Silica gel 40 μM 60 \AA , Volume 14 g, size M, 20 \times 75 mm), Silicagel Inject column (Lot. No. L20802, size S), CHCl_3 :(MeOH ⑨ : Water ①)[(9:1 (2 min \times 3), 8:2 (2 min \times 3), 7:3 (2 min \times 3), 6:4 (2 min \times 3), 100% MeOH (2 min \times 6)]

HPLC-1* : Column (YMC-Pack R&D ODS-A 250 \times 20.0 mm), Solvent [A water, B MeCN, A: 98% (5 min) \rightarrow 0% (50 min) \rightarrow 0% (65 min)], Flow rate : 7.0 mL/min, Detector : UV 254/220 nm, Column temperature : 30 $^\circ\text{C}$, Fraction size : 7.0 mL/tube

MPLC-4* : Silica gel Hi-Flash column (Cat.No.W005, Silica gel 40 μM 60 \AA , Volume 45 g, size 2 L, 26 \times 150 mm), Silicagel Inject column (Lot. No. L00301, size 2S) CHCl_3 : (MeOH ⑨ : Water①) [(9:1 (4 min \times 3), 8:2 (4 min \times 3), 7:3 (4 min \times 3), 6:4 (4 min \times 3), 40%~100% MeOH (24 min), 100% MeOH (15 min)]

2.5 成分分析

2.5.1 測定機器

単離した化合物は EI-MS、FAB-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 、DEPT (^{13}C)、HMQC、HSQC、HMBC 各種スペクトルデータを組み合わせて分析し、文献値およびデータベース⁶²⁾のデータと比較することにより同定した。含有量測定は LC/MS を用いた。

質量分析には JEOL JMN700 (JEOL 日本電子会社)、NMR 測定は 400 MHz Agilent-400 MR-vnmrs 400 spectrometer (Agilent)、LC/MS は 4000 QTRAP® (AB SCIEX) システムで、LC/MS のポンプは LC-20 AD、auto sampler は SIL-20 AC、カラムオーブンは CTO-20 AC、検出器 SPD-20 A を用いた。HPLC のポンプは 600 Pump (Waters)、UV 検出器は 2489 UV/visible Detector (Waters)、コントローラは 600 Controller (Waters) を用いた。

薄層クロマトグラフィーは、シリカゲル (Silica gel 60 F₂₅₄, MERCK) と ODS (HPTCL Silica gel 60 RP-18 WF₂₅₄S, MERCK) を使用した。NMR 用重溶媒は、methanol-d₄ (重水素化率 99.8%, Wako) を使用した。

2.5.2 化合物の物理的性質

Compound 1 : 本化合物は、EI-MS、FAB-MS により分子量が 267.2 と推定した。¹H-NMR、¹³C-NMR、¹H-¹H COSY、DEPT (¹³C) 各種 NMR データを文献値と比較したところ化合物はアデノシン (C₁₀H₁₃N₅O₄) であることが明らかとなった。TLC の R_f 値および色調は標品と一致した。

Compound 2 : 本化合物は、Fr. B-4-4 中のメイン成分であり、EI-MS により分子量が 122.12 と推定した。¹H-NMR、EI-MS のデータ分析と文献値と比較することにより Compound 2 はニコチン酸アミド (C₆H₆N₂O) であることが明らかとなった。TLC の R_f 値および色調は標品と一致した。

Compound 3、4 : NMR と LC-MS の分析により Compound 3 と 4 は類縁体であり、単離が困難であることが分かった。¹H-NMR、¹³C-NMR および LC/MS の分析により、Compound 3 は分子量が 168.1 であるバニリン酸 (C₈H₈O₄)、Compound 4 は分子量が 198.17 であるシリンガ酸 (C₉H₁₀O₅) と同定した。

2.5.3 標準品

アデノシン (Adenosine, Lot. EPH0855, Wako)、ニコチン酸 (Nicotinamide, Lot. LAK5362, Wako)、バニリン酸 (Vanillic acid, Lot. MKBC5912V, Sigma)、シリング酸 (Syringic acid, Lot. 10097437, Wako) を用いた。

3. 抗酸化活性成分の含有量測定

LC-MS の測定条件によって、MAK 中のバニリン酸とシリング酸の含有量を測定した。市販の標準品の濃度とイオン量から検量線を作成し、イオン量から含有量を算出した。シリング酸とバニリン酸ともに Standard 濃度は 0、100、200、400、800、1600 ng/mL とした。また、MAK、子実体、菌糸体、菌糸を植菌していない培地抽出物から、それぞれシリング酸とバニリン酸の含有量を測定した。

LC/MS の測定条件

● LC conditions

Column : 2.0φX 150 mm PEGASIL ODS SP100-3 (Senshu Pak)

Solvent :

A 0.1% formic acid aq, B acetonitrile contained formic acid at 0.1%

B 5% (0 min)→ 5% (3 min)→ 30% (10 min)→ 100% (15 min)→

100% (30 min)

Flow rate : 0.2 mL/min

Column temperature : 40°C

Injection volume : 1 μL

● *MS conditions*

For syringic acid

Scan type : MRM (m/z 196.933/ m/z 120.800)
Polarity : Negative
Ion source : Turbo spray
Cur : 30
IS : - 4500
Temp. : 300
GS1 : 40
GS2 : 60
ihe : ON
CAD : 6
DP : - 55
EP : - 10
CE : - 24
CXP : - 5

For vanillic acid

Scan type : MRM (m/z 166.913/ m/z 151.800)
Polarity : Negative
Ion source : Turbo spray
Cur : 10
IS : - 4500
Temp. : 500
GS1 : 30
GS2 : 50
ihe : ON
CAD : 8
DP : - 55
EP : - 10
CE : - 18
CXP : - 27

4. 抗酸化活性の評価

4.1 DPPH フリーラジカル消去能の測定

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) は 525 nm 付近に最大吸収があり、特有の紫色をもつ有機ラジカルである。抗酸化活性成分により DPPH のフリーラジカルが捕捉されるため、吸光度の低下から抗酸化能を評価した。

4.1.1 DPPH による評価^{109, 110)}

DPPH 試料および検体は、最終的に 50%エタノールに溶解した。その後、遮光した試験管に 0.1 mg/mL DPPH 溶液を分注後、1 mL の検体を添加し、よく混合した。25°Cの水浴で 30 間分保温し、525 nm で吸光度を測定した。Control として DPPH 溶液に 50%エタノールを、Blank は 50%エタノールに検体を混合した溶液を用いた。DPPH フリーラジカル消去能は、次の式から算出した。消去能 (%) = $\{1 - (A_i - A_j) / A_c\} \times 100\%$
(A_i = DPPH + 検体, A_j = 50%エタノール + 検体, A_c = DPPH + 50%エタノール)

4.1.2 DPPH の噴霧による評価^{111, 112)}

100%エタノールに 0.04%の DPPH を溶解した溶液を調製し、遮光して 4°Cで保存した。各検体を展開した TLC プレートに 0.04%の DPPH 溶液を噴霧した。抗酸化活性成分による DPPH 試薬の紫色の退色から抗酸化作用部位を観察した。乾燥したプレートを写真撮影し、データ解析に用いた。

4.2 スーパーオキシドアニオン (O₂⁻) 消去能の測定^{113, 114)}

O₂ 産生系として、3.6 mMのHypoxanthine溶液 (100 mM KH₂PO₄, 0.054 mM EDTA, 3.6 mM Hypoxanthine) を使用時にKH₂PO₄ buffer (0.1 M KH₂PO₄, 0.05 mM EDTA, pH 7.5) によて0.72 mMに希釈し、Xanthine Oxidase (x-4500, Sigma) 酵素溶液は100 μg/mL (約0.1 unit) に調製した。発光試薬のMPEC (2-Methyl-6-p-methoxyphenylethyl imidazopyrazinone, ATTO) は、100%メタノールにて0.45 mMに調製し、ストック溶液 (-30°Cで遮光保存) とし、実験直前に蒸留水にて750 μMに調製して実験に用いた。

96穴のプレート[ELISA用プレート (黒), S MS-8496 K]にKH₂PO₄ buffer を170 μL、100 μg/mL Xanthine Oxidase溶液を60 μL、750 μM MPECを10 μL、検体を10 μL、0.72 mM Hypoxanthine基質溶液を添加し、10秒後に発光測定装置 (Wallac 1420 ARVO sx, PerkinElmer) にセットして、1分間に100回測定した発光積算値を算出した。検体を加えない発光量を基準(100%)とし、検体を加えて減少する発光量を抗酸化能の指標とした。消去能は、次の式から算出した。消去能 (%) = { 1 - (b)/(a) } × 100% (a ; 検体を添加しない状態の発光積算値, b ; 検体を添加した場合の発光積算値)

抗酸化活性の比較対照物質として、L (+) -アスコルビン酸[L(+)-Ascorbic Acid, Lot. LTN7625, Wako]とエダラボン (3-Phenyl-3methyl-5-pyrazolone, Lot. DPH0472, Wako) を用いた。

第4章 抗酸化活性成分による神経細胞および脳保護作用の評価

第1節 神経細胞保護作用の評価 (*in vitro*)

1. 試薬

シリンガ酸 (Syringic acid, 98 + %) は Alfa Aesar 社製を用いた。実験に用いたシリンガ酸は、DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Wako) により 300 mM の濃度に調製して、1.5 mL の遮光チューブに分注して冷凍保存した。使用直前に希釈し (DMSO ≤ 1%)、濾過滅菌 (Cellulose Nitrate 0.45 μ m filter, DISMIC-25, ADVANTEC) して実験に用いた。

2. PC12 細胞の培養と分化誘導⁶⁵⁾

未分化のラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞 (HS 研究資源バンク) は、poly-D-lysine コートした 100 mm dish (Becton, Dickinson and Company) に播種し、10% 非働化馬血清 (HS, Tissue Culture Biological)、5% 非働化牛胎児血清アルブミン (FBS, Cell Culture Bioscience)、24 mM NaHCO₃、Antibiotic-Antimycotic [100 unit/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 0.25 μ g/mL amphotericin B (GIBCO)] を添加した RPMI1640 培地 (GIBCO) で、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。PC12 細胞を播種し、ディッシュに接着させた後、低血清培地 (0.1% HS, 0.05% FBS) に 50 ng/mL の神経成長因子 (NGF : Nerve growth factor, コスモ・バイオ) を含む条件下で 3 日間培養し、神経突起を伸張して交感神経細胞様に神経細胞を分化させた。

3. MTT assay による生存率の測定⁶⁷⁾

神経細胞へ分化させた PC12 細胞に、低血清培地 (0.1% HS, 0.05% FBS) で 0.25 mg/mL に調製した MTT [(3,4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide, Wako] を添加した。4 時間後に培地を取り除き、600 μ L/well の DMSO を加え、10 分間 Micro mixer (E-36, TAITEC) で溶解させ、540 nm と 630 nm の吸光度を Wallac 1420 ARVOsx を用いて測定した。数値の算出は、細胞を播

種していない well の吸光度を blank として、540 nm の値から 630 nm の値を減じて算出した。

4. シリンガ酸の毒性評価¹¹⁵⁾

Poly-D-lysine コートした 96 well plate (Becton Dickinson) に PC12 細胞を 1×10^4 cells 播種して 4 日間培養した。DMSO に溶解した 300 mM シリンガ酸を、培養培地 (10% HS, 5% FBS を含む) を用いて 0.001、0.01、0.1、1、3 mM に希釈して添加した。シリンガ酸の存在下で 2 日間培養後、MTT assay により生存率を評価した。

5. H₂O₂ 処置による細胞生存率の評価^{66, 67)}

Poly-D-lysine コートした 96 well plate (Becton Dickinson) に PC12 細胞を 5×10^3 cells 播種し、5 日後に低血清培地 (0.1% HS, 0.05% FBS を含む) で 50 ng/mL に調製した NGF を 3 日間添加した。3 日後に NGF を含む培地を取り除き、神経細胞へ分化させた PC12 細胞に、低血清培地に溶解したシリンガ酸 (0.001, 0.01, 0.1, 1, 3 mM) 100 μ L を 1 時間添加した。その後、30% H₂O₂ (Wako) を低血清培地で 750 μ M に希釈し、各 well (シリンガ酸を含む培地 100 μ L) に 50 μ L を加え、6 時間 H₂O₂ (最終濃度が 250 μ M) 処置することによって酸化ストレスを誘導した。その後、MTT assay により生存率を評価した。

6. 酸化ストレス処理による細胞内活性酸素種の産生評価 (DCF-DA 染色)^{116, 117)}

PC12 細胞を 96 well plate に播種後、前述のように神経細胞へ分化させた。H₂O₂ 添加 1 時間前にシリンガ酸 (0.001, 0.01, 0.1, 1, 3 mM) を添加し、続いて 250 μ M H₂O₂ を 6 時間処置することによって酸化ストレスを誘導した。その後、培地を除き、低血清培地で調製した 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma) を 10 μ M/well となるように加えて 37°C、30 分間保温した。続いて培地を除去後に PBS を 100 μ L 加え、10 分間混和した。マルチラベルプレートカウンター (Wallac 1420 ARVO sx, PerkinElmer) にて

蛍光（励起波長 485 nm, 蛍光検出 535 nm）を測定した。無処置群を 100%として蛍光強度から酸化ストレスを評価した。

第 2 節：脳保護作用の評価 (*in vivo*)

1. 実験材料

第 4 章の第 1 節で用いたシリンガ酸を使用した。経口投与に用いたシリンガ酸 (10 mg/mL) は、蒸留水に溶解し (NaOH により pH 8.4 に調整)、1 日投与量ごとに分注して、冷凍保存した。使用直前に溶解し、室温に戻してからマウスに 50 mg/kg body weight/5 mL を投与した。

2. 実験動物

第 1 章の第 2 節と同様な条件で KK-*A*^y マウスを使用した。1 週間予備飼育後、シリンガ酸 (50 mg/kg body weight/day) を 7 日間経口投与した。Control 群には同量の蒸留水を投与した (Scheme 5)。

3. KK-*A*^y マウスの低酸素脳虚血モデルの作製

第 1 章の第 2 節と同様に行った。KK-*A*^y マウスの右総頸動脈結紮 3 時間後、マウスをガラス容器に入れ、低酸素ガス (8% O₂/92% N₂) を 20 分間負荷した。この間、水浴と赤外線ランプによってガラス容器内を 36°C に維持した。その後、マウスを通常大気中のケージに戻して擬似的な再灌流状態を誘発した。H/I 処置 (手術前) 1 時間前に 1 回シリンガ酸 (50 mg/kg body weight) を経口投与し、H/I 処置を行った。

4. 神経症状スコアの測定

第 1 章と同様の方法で評価した。

5. 運動機能障害の測定

第 1 章と同様の方法で評価した。

6. 梗塞巣体積の測定

第 1 章と同様の方法で評価した。

7. 脳組織中 O_2 産生の測定 (DHE 染色)

第 1 章と同様の方法で評価した。

引用文献

1. 平成 24 年人口動態統計 厚生労働省
2. 内山真一郎. 脳血管疾患 特集 ストップ・ザ生活習慣病 各種 疾患と生活習慣病. 臨床と研究 2009; 86(9): 118-1122.
3. Saito A, Maier CM, Narasimhan P, et al. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 2005; 31(1-3): 105-116.
4. 阿部康二. 塞に対する脳保護療法の到達点. 医学のあゆみ 2009; 231(5): 530-534.
5. 島津智一, 屋大典. 護療法 *Prog Med* 2007; 27: 289-293.
6. Siesjö BK. Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit Care Med* 1988; 16(10): 954-963.
7. Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6(5): 667-672.
8. 芝崎太, 内野博之. 虚血による神経細胞死とカルシニューリン・シクロフィリン. *Biotherapy* 2004; 18(2): 115-125.
9. Siesjö BK, Katsura K, Zhao Q, et al. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. *J Neurotrauma* 1995; 12(5): 943-956.
10. 島津智一, 古屋大典. 脳保護療法. *Prog Med* 2007; 27: 289-293.
11. Zhang Y, Wang X, Wang X, et al. Protective effect of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi on cerebral ischemia injury. *J Ethnopharmacol* 2006; 108(3): 355-360.
12. Kim DH, Kim S, Jung WY, et al. The neuroprotective effects of the seeds of *Cassia obtusifolia* on transient cerebral global ischemia in mice. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(7): 1473-1479.
13. Ban JY, Kang SW, Lee JS, et al. Korean red ginseng protects against neuronal damage induced by transient focal ischemia in rats. *Exp Ther Med* 2012; 3(4):

- 693-698.
14. Xuan MY, Okazaki M, Iwata N, et al. Protective effects of a water-soluble extract from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia against neuronal damage after hypoxia-ischemia in mice. *Jpn J Comp Alter Med* 2011; 8(2): 99-107.
 15. Okazaki M, Iwata N, Horiuchi S, et al. Protective Effects of a Water-Soluble Extract from Culture Medium of *Ganoderma lucidum* Mycelia against Neuronal Damage after Hypoxia-Ischemia in Mic. *Jpn J Comp Alter Med* 2008; 5(2): 153-162.
 16. Tureyen K, Bowen K, Liang J, et al. Dempsey and Raghu Vemuganti Exacerbated brain damage, edema and inflammation in type-2 diabetic mice subjected to focal ischemia. *J Neurochem* 2011; 116(4): 499-507.
 17. Sakata A, Mogi M, Iwanami J, et al. Female type 2 diabetes mellitus mice exhibit severe ischemic brain damage. *J Am Soc Hypertens* 2011; 5(1): 7-11.
 18. Charradi K, Elkahoui S, Karkouch I, et al. Grape seed and skin extract prevents high-fat diet-Induced brain lipotoxicity in rat. *Neurochem Res* 2012; 37(9): 2004-2013.
 19. 森克仁. 糖尿病 インターベンション時代の脳卒中学(上). 訂第2版. 大阪, 日本臨牀社. 2006; 667-680.
 20. Kamiuchi S, Hatta Y, Miyazato A, et al. Hypoglycemic effects of water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia in type 2 diabetic mice. *Jpn J Comp Alter Med* 2010; 7(1): 35-42.
 21. 藤井雅一, 井口登與志. 酸化ストレス亢進と糖尿病性血管障害. *Angiology Frontier* 2009; 8(1): 47-55.
 22. Qi X, Okuma Y, Hosoi T, et al. Edaravone protects against hypoxia/ischemia-induced endoplasmic reticulum dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311(1): 388-393.
 23. Srinivasan K, Sharma SS. Augmentation of endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia/reperfusion injury associated with comorbid type 2 diabetes. *Neurol Res* 2011; 33(8): 858-865.

24. 臼井達洋, 岡崎真理, 神内伸也ら. 霊芝菌糸体培養培地抽出物の糖負荷後の血糖上昇抑制効果と食後過血糖改善薬との併用効果. 日本栄養・食糧学会誌 2007; 60(5): 249-255.
25. 中川育也, 日比野康英, 大橋康宏ら. マンネンタケ (霊芝) 菌糸体培養基より得られるヘテロ多糖・蛋白質画分 (MTP2) によるマウス脾細胞の障害活性の増強. *Biotherapy* 1999; 13: 513-515.
26. Zhou ZY, Tang YP, Xiang J, et al. Neuroprotective effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cerebral ischemic injury in rats. *J Ethnopharmacol* 2010; 131(1): 154-164.
27. Wu YL, Wang DN. A new class of natural glycopeptides with sugar moiety-dependent antioxidant activities derived from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *J Proteome Res* 2009; 8(2): 436-442.
28. Zhu M, Chang Q, Wong LK, et al. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytother Res* 1999; 13(6): 529-531.
29. Sun J, He H, Xie BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Agric Food Chem* 2004; 52(21): 6646-6652.
30. You YH, Lin ZB. Antioxidant effect of *Ganoderma* polysaccharide peptide. *Yao Xue Xue Bao* 2003; 38(2): 85-88.
31. Yamamoto Y, Shirono H, Kono K, et al. Immunopotentiating activity of the water-soluble lignin rich fraction prepared from LEM: the extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61(11): 1909-1912.
32. Kawano M, Thet MM, Makino T, et al. DNA microarray analysis of signaling pathway in macrophages stimulated by lignin-carbohydrate complex from *Lentinus edodes* mycelia (LEM) extract. *Anticancer Res* 2010; 30(7): 2567-2576.
33. Hibino Y, Konishi Y, Koike J, et al. Productions of interferon-gamma and nitrite are induced in mouse splenic cells by a heteroglycan-protein fraction from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Immunopharmacology* 1994; 28(1): 77-85.

34. Morinaga H, Tazawa K, Tagoh H, et al. An in vivo study of hepatic and splenic interleukin-1 beta mRNA expression following oral PSK or LEM administration. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85(12): 1298-1303.
35. Kojima H, Akaki J, Nakajima S, et al. Structural analysis of glycogen-like polysaccharides having macrophage-activating activity in extracts of *Lentinula edodes* mycelia. *J Nat Med* 2010; 64(1): 16-23.
36. Shen J, Tanida M, Fujisaki Y, et al. Effect of the culture extract of *Lentinus edodes* mycelia on splenic sympathetic activity and cancer cell proliferation. *Auton Neurosci* 2009; 145(1-2): 50-54.
37. 螺良英郎, 西本光廣, 西井一雅. 肺結核の化学療法で併発した薬剤性肝障害に対するシイタケ菌糸体抽出物顆粒の使用経験. *Prog Med* 1999; 19(8): 128-134.
38. 東口高志, 伊藤彰博, 児玉佳之ら. C型慢性肝炎に対する *Lentinus edodes* mycelia-enriched diet (L·E·M[®])の有効性および安全性に関する臨床的研究. *生物試料分析* 2008; 31(3): 204-214.
39. 寺田弘, 大原豊実, 山口康代ら. 椎茸菌糸体抽出物の四塩化炭素肝障害に対する防御効果. *新薬と臨床* 2001; 50(7): 655-664.
40. 織田真智子, 大島佳奈, 東野英明ら. 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) に対する椎茸菌糸体抽出物の作用. *新薬と臨床* 2003; 52(1120): 52-60.
41. 中村リサ, 渡邊愛子, 猪木彩子ら. 生体内脂質過酸化に及ぼすシイタケ菌糸体抽出物 (L.E.M) の影響. *日本栄養・食糧学会誌* 2005; 58(4): 217-223.
42. Yamada T, Oinuma T, Niihashi M, et al. Effects of *Lentinus edodes* mycelia on dietary-induced atherosclerotic involvement in rabbit aorta. *J Atheroscler Thromb* 2002; 9(3): 149-156.
43. Zhu XL, Lin ZB. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on proliferation and cytotoxicity of cytokine-induced killer cells. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26(9): 1130-1137.
44. Gao Y, Gao H, Chan E, et al. Antitumor activity and underlying mechanisms

- of ganopoly, the refined polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*, in mice. *Immunol Invest* 2005; 34(2): 171-198.
45. 岩田直洋, 岡崎真理, 笠原知里ら. 糖尿病態ラットの一過性脳虚血誘発脳障害に対する霊芝菌糸体培養培地抽出物の保護効果. *日本栄養・食糧学会誌* 2008; 61(3): 119-127.
 46. Li PA, Liu GJ, He QP, et al. Production of hydroxyl free radical by brain tissues in hyperglycemic rats subjected to transient forebrain ischemia. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(9-10): 1033-1040.
 47. Wei J, Quast MJ. Effect of nitric oxide synthase inhibitor on a hyperglycemic rat model of reversible focal ischemia: detection of excitatory amino acids release and hydroxyl radical formation. *Brain Res* 1998; 791(1-2): 146-156.
 48. Iwata N, Okazaki M, Kasahara C, et al. Protective effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma Lucidum* mycelia against neuronal damage after cerebral ischemia/reperfusion in diabetic rats. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science* 2008; 61(3): 119-127.
 49. 田港朝彦. 糖尿病酸化ストレス, 抗酸化ビタミン. *臨床栄養* 2000; 97: 578.
 50. Kennedy L, Baynes JW. Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia* 1984; 26(2): 93-98.
 51. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54(6): 1615-1625.
 52. Hawkins BT, Lundeen TF, Norwood KM, et al. Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia* 2007; 50(1): 202-211.
 53. Ceretta LB, Réus GZ, Abelaira HM, et al. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 302682.
 54. Radhika P, Annapurna A, Rao SN. Immunostimulant, cerebroprotective & nootropic activities of *Andrographis paniculata* leaves extract in normal &

- type 2 diabetic rats. *Indian J Med Res* 2012; 135(5): 636-641.
55. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114(12): 1752-1761.
 56. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306(5695): 457-461.
 57. Srinivasan K, Sharma SS. Augmentation of endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia/reperfusion injury associated with comorbid type 2 diabetes. *Neurol Res* 2011; 33(8): 858-865.
 58. Wang Y, Vera L, Fischer WH, et al. The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature* 2009; 460(7254): 534-537.
 59. Dentin R, Liu Y, Koo SH, et al. Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature* 2007; 449(7160): 366-369.
 60. Koo SH, Flechner L, Qi L, et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 2005; 437(7062): 1109-1111.
 61. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306(5695): 457-461.
 62. SDBS-Web http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=jp
 63. Zhao HB, Lin SQ, Liu JH, et al. Polysaccharide extract isolated from *Ganoderma lucidum* protects rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury. *J Pharmacol Sci* 2004; 95(2): 294-298.
 64. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(6): 983-987.
 65. 小泉信一. PC12 細胞での分化と生存維持に関する神経成長因子受容体下流シグナル. *医学のあゆみ* 2000; 192: 759-763.
 66. Huang CL, Lee YC, Yang YC, et al. Minocycline prevents paraquat-induced cell death through attenuating endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. *Toxicol Lett* 2012; 209(3): 203-210.

67. Pan C, Giraldo GS, Prentice H, et al. Taurine protection of PC12 cells against endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress. *J Biomed Sci* 2010; 17(Suppl 1): S17.
68. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1991; 71(4): 1185-1195.
69. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001; 18(9): 685-716.
70. Cui K, Luo X, Xu K, et al. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28(5): 771-799.
71. Kuppasamy UR, Chong YL, Mahmood AA, et al. *Lentinula edodes* (Shiitake) mushroom extract protects against hydrogen peroxide induced cytotoxicity in peripheral blood mononuclear cells. *Indian J Biochem Biophys* 2009; 46(2): 161-165.
72. Yang Q, Wang S, Xie Y, et al. HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. *Int J Biol Macromol* 2010; 46(2): 167-172.
73. Fawcett DW. In *The Cell*. London: W.B. Saunders Company, Philadelphia 1982; 318-319.
74. Tajiri S Yano S. Brain ischemia/reperfusion and endoplasmic reticulum stress. Presented by medical online. *医学のあゆみ* 2006; 216(12): 872-876.
75. Takata K, Kitamura Y, Kakimura J, et al. Increase of bcl-2 protein in neuronal dendritic processes of cerebral cortex and hippocampus by the antiparkinsonian drugs, talipexole and pramipexole. *Brain Res* 2000; 872(1-2): 236-41.
76. 北川一夫. 脳梗塞：炎症の制御を標的とした治療戦略の可能性. *日本薬*

- 理学雜誌 2009; 134: 202-206.
77. Yu S, Weaver V, Martin K, et al. The effects of whole mushrooms during inflammation. *BMC Immunol* 2009; 10: 12.
 78. You YH, Lin ZB. Protective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23(9): 787-791.
 79. Wu Y, Wang D. A new class of natural glycopeptides with sugar moiety-dependent antioxidant activities derived from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *J Proteome Res* 2009; 8(2): 436-442.
 80. Zhu M, Chang Q, Wong LK, et al. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytother Res* 1999; 13(6): 529-531.
 81. Sun J, He H, Xie BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Agric Food Chem* 2004; 52 (21): 6646-6652.
 82. You YH, Lin ZB. Antioxidant effect of *Ganoderma* polysaccharide peptide. *Yao Xue Xue Bao* 2003; 38(2): 85-88.
 83. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(6): 983-987.
 84. Miwa N, Kurosaki K, Yoshida Y, et al. Comparative efficacy of acyclovir and vidarabine on the replication of varicella-zoster virus. *Antiviral Res* 2005; 65(1): 49-55.
 85. da Rocha Lapa F, da Silva MD, de Almeida Cabrini D, et al. Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a mouse model of pleurisy: evidence for the role of adenosine A2 receptors. *Purinergic Signal* 2012; 8(4): 693-704.
 86. Gomes CV, Kaster MP, Tomé AR, et al. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808(5): 1380-1399.
 87. Chen TY, Lin MH, Lee WT, et al. Nicotinamide inhibits nuclear factor-kappa B translocation after transient focal cerebral ischemia. *Crit Care Med* 2012;

- 40(2): 532-537.
88. Kampa M, Alexaki VI, Notas G, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* 2004; 6(2): R63-R74.
 89. Hirota A, Taki S, Kawaii S, et al. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward the cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64(5): 1038-1040.
 90. Liu Y, Fang J, Lei T, et al. Anti-endotoxic effects of syringic acid of radix isatidis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003; 23(2): 206-208.
 91. Guimarães CM, Gião MS, Martinez SS, et al. Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against DNA oxidative damage. *J Food Sci* 2007; 72(1): C039-C043.
 92. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2009; 32(7): 1215-1219.
 93. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(6): 983-987.
 94. Rizk NN, Rafols JA, Dunbar JC. Cerebral ischemia-induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats: effects of insulin and C-peptide. *Brain Res* 2006; 1096(1): 204-212.
 95. Li ZG, Britton M, Sima AA, et al. Diabetes enhances apoptosis induced by cerebral ischemia. *Life Sci* 2004; 76(3): 249-262.
 96. Strbian D, Durukan A, Pitkonen M, et al. The blood-brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 2008; 153(1): 175-181.
 97. Qi X, Okuma Y, Hosoi T, et al. Edaravone protects against hypoxia/ischemia-induced endoplasmic reticulum dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311(1): 388-393.

98. Tsubokawa T, Jadhav V, Solaroglu I, et al. Lecithinized superoxide dismutase improves outcomes and attenuates focal cerebral ischemic injury via antiapoptotic mechanisms in rats. *Stroke* 2007; 38(3): 1057-1062.
99. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats: Statistical Validation. *Stroke* 1995; 26(4): 627-634.
100. Höger J, Patterson D, Höger H, et al. Mice transgenic for reduced folate carrier: an animal model of Down syndrome? *Amino Acids* 2009; 36(2): 349-357.
101. Sunyer B, Patil S, Frischer C, et al. Strain-dependent effects of cognitive enhancers in the mouse. *Amino Acids* 2008; 34(3): 485-495.
102. Shah ZA, Gilani RA, Sharma P, et al. Cerebroprotective effect of Korean ginseng tea against global and focal models of ischemia in rats. *J Ethnopharmacol* 2005; 101(1-3): 299-307.
103. Dayal S, Arning E, Bottiglieri T, et al. Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke* 2004; 35(8): 1957-1962.
104. Bian Q, Shi T, Chuang DM, et al. Lithium reduces ischemia-induced hippocampal CA1 damage and behavioral deficits in gerbils. *Brain Res* 2007; 1184: 270-276.
105. Rizk NN, Rafols JA, Dunbar JC. Cerebral ischemia-induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats: effects of insulin and C-peptide. *Brain Res* 2006; 1096(1): 204-212.
106. Liu K, Mori S, Takahashi HK, et al. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J* 2007; 21(14): 3904-3916.
107. Aragno M, Mastrocola R, Medana C, et al. Up-regulation of advanced glycated products receptors in the brain of diabetic rats is prevented by antioxidant treatment. *Endocrinology* 2005; 146(12): 5561-5567.
108. Meldrum DR, Shenkar R, Sheridan BC, et al. Hemorrhage activates myocardial NFkappaB and increases TNF-alpha in the heart. *J Mol Cell*

- Cardiol 1997; 29(10): 2849-2854.
109. Ku CS, Mun SP. Antioxidant properties of monomeric, oligomeric, and polymeric fractions in hot water extract from *Pinus radiata* bark. Wood Sci Technol 2008; 42(1): 47-60.
 110. Victor N. Enujiugha, Justina Y, et al. DPPH Radical Scavenging Capacity of Phenolic Extracts from African Yam Bean (*Sphenostylis stenocarpa*). Food and Nutrition Sciences 2012; 3(1): 7-13.
 111. BLOIS S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature 1958; 181: 1199-1200.
 112. 阿部尚樹. かびの生産する抗酸化物質 Bisorbicillinoids 類に関する生物有機化学的研究. Nippon Nōgeikagaku Kaishi 2002; 76(9); 814-821.
 113. Chidambaram U, Pachamuthu V, Natarajan S, et al. In vitro evaluation of free radical scavenging activity of Codariocalyx motorius root extract. Asian Pac J Trop Med 2013; 6(3): 188-194.
 114. Hama S, Uenishi S, Yamada A, et al. Scavenging of hydroxyl radicals in aqueous solution by astaxanthin encapsulated in liposomes. Biol Pharm Bull 2012; 35(12): 2238-2242.
 115. Zhou W, Qin KM, Shan JJ, et al. Improvement of intestinal absorption of forsythoside A in weeping forsythia extract by various absorption enhancers based on tight junctions. Phytomedicine 2012; 20(1): 47-58.
 116. 久保田芳美, 湯浅 (小島) 明子, 湯浅勲. 緑茶抽出物におけるヒト肝ガン細胞の増殖抑制効果におよぼす ROS 産生の役割. 生活科学研究誌 2003; 2: 1-9.
 117. Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Asqhari M, et al. Protective effect of Nigella sativa extract and thymoquinone on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death. Cell Mol Neurobiol 2010; 30(4): 591-598.