

【原 著】

マウス低酸素脳虚血障害に対する霊芝菌糸体培養培地抽出物の保護効果

Protective Effects of a Water-Soluble Extract from Culture Medium of *Ganoderma lucidum* Mycelia against Neuronal Damage after Hypoxia-Ischemia in Mice

岡崎真理¹, 岩田直洋¹, 堀内重紀¹, 神内伸也¹, 鈴木史子², 飯塚 博², 日比野康英^{1,*}
 Mari OKAZAKI¹, Naohiro IWATA¹, Shigenori HORIUCHI¹, Shinya KAMIUCHI¹,
 Fumiko SUZUKI², Hiroshi IIZUKA², Yasuhide HIBINO^{1,*}

¹ 城西大学薬学部医療栄養学科生体防御学講座

² 野田食菌工業株式会社

【要 旨】

脳虚血では、局所における過剰の活性酸素種の産生によりアポトーシスが誘発される。本研究では、酸化ストレスによる神経障害に対する霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER) の保護効果について、培養細胞およびマウス脳虚血モデルを用いて検討した。

PC12 細胞に H₂O₂ 処理を行い、誘発される細胞死に対する WER の作用を MTT assay および TUNEL 法により評価した。また、マウスに WER (1 g/kg) を単回または 7 日間経口投与した後、低酸素脳虚血処置を行い、神経症状、脳梗塞巣体積およびアポトーシスの評価を行った。

PC12 細胞を用いた実験において、WER は H₂O₂ 処理後の細胞生存率を上昇させ、アポトーシス陽性細胞数を減少させた。WER を 7 日間経口投与したマウス群では、対照群と比較し、虚血後の神経症状の改善が認められ、また脳梗塞巣体積およびアポトーシス陽性細胞数が有意に減少した。これらの結果から、WER は酸化ストレスによるアポトーシスを抑制し、脳虚血障害に対して保護作用を示すことが示唆された。

【キーワード】

神経保護作用, 霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER), 脳虚血, 酸化ストレス, アポトーシス

はじめに

脳梗塞時の虚血性脳障害メカニズムには、酸化ストレスの関与が大きいことが知られている¹⁾。虚血の中心部では、血流の著しい減少による酸素および ATP の欠乏により、神経細胞が数分以内に不可逆的壊死に陥るが、虚血周辺部のペナンプラ領域では、虚血または再灌流時に発生する活性酸素種 (ROS) や活性酸化窒素種 (RNOS) などのフリーラジカルが増加し、酸化障害によるアポトーシスが引き起こされることが報告されている²⁾。ペナンプラ領域の神経細胞は、早期薬物治療によって保護あるいは回復が可能であることから、近年、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ている³⁾。特に、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ついての報告がこれまでにも数多くなされている⁴⁾。

霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER) は、サルノコシカケ科に属する別名マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) の菌糸体を固形培地に接種し、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、滋養強壮を目的とした健康食品として用いられている。マンネンタケあるいはその成分は非常に広範な生理学的活性を有しており、免疫調節作用⁵⁾や抗悪性腫瘍作用⁶⁾、抗ウ

受理日: 2008 年 5 月 8 日

* 〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1 Tel: 049-271-7285 Fax: 049-271-7284 E-mail: seitai@josai.ac.jp

イルス作用⁷⁾, コレステロール低下作用⁸⁾, 血糖降下作用⁹⁾などが実験的に証明されている。また, 抗酸化作用¹⁰⁾についてもいくつかの報告がある。WER には, マンネンタケ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含まれており, これらの多様な成分が WER の生物学的活性を修飾していると考えられるが^{11,12)}, 活性の全体像は明らかではない。当研究室では, WER が糖尿病ラットの酸化ストレス状態を緩和し, 一過性脳虚血による脳梗塞巣を顕著に減少させることを報告しているが¹³⁾, WER の神経細胞保護の作用メカニズムについては明らかではない。

そこで本研究では, まず神経成長因子 (NGF) により分化させた PC12 細胞に過酸化水素 (H_2O_2) 処理を行い, 酸化ストレスによって誘導されるネクローシス/アポトーシスに対する WER の効果を MTT assay および TUNEL 染色により評価した。また, マウスに低酸素脳虚血 (H/I) 処置を行い, 体内酸化ストレス度, 神経症状, 脳過酸化脂質含量, 梗塞巣体積に対する WER の単回 (acute) および慢性 (chronic) 投与の影響を検討するとともに, ペナンブラ領域の一部である海馬 CA1 野および大脳皮質体性感覚野の神経細胞のアポトーシスに対する WER の作用を組織化学的手法 (TUNEL 染色および Cleaved Caspase-3 の免疫染色) により検討した。

材料・方法

1. 実験材料

本研究では, WER として野田食菌工業 (株) において製造された「MAK」を使用した。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 μ m) にて濾過滅菌し, 濾液の凍結乾燥品を WER とした。

2. PC12 細胞の培養と分化誘導¹⁴⁾

2.1. PC12 細胞 (Japan Health Sciences Foundation) の培養と分化誘導

未分化の PC12 細胞は, poly-D-lysine コートした 60 mm plate (Becton Dickinson Franklin Lakes, New Jersey, USA) に播種し, 10% 非働化馬血清, 5% 非働化牛胎児血清 (以上, Tissue Culture Biologicals, Tulare, CA, USA), $NaHCO_3$ (2 g/L, ナカライテスク), Antibiotic-Antimycotic (100 unit/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin および amphotericin

B (0.25 μ g/mL; GIBCO, Grand Island, NY, USA)) を添加した RPMI 1640 培地 (GIBCO) を加え, 37°C, 5% CO_2 インキュベーター内で培養した。80% コンフルエント状態に達した時点で, 細胞をトリプシン処理し, プレートあたり 2×10^6 個となるように再度播種した。

神経細胞への分化誘導は, 神経成長因子 (NGF, 50 ng/mL; Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel) を無血清培地に添加して 3 日間培養することによって行った。それぞれの実験について, NGF により分化させた PC12 細胞に WER を 1 時間添加し, その後 WER の存在下で 100 μ M の H_2O_2 (和光純薬工業) を 1 時間作用させた。

2.2. MTT assay による細胞生存率の測定¹⁴⁾

poly-D-lysine コートした 24-well plate (Becton Dickinson) に 5×10^4 個/well の PC12 細胞を播種し, 2 日後に NGF を添加した。分化させた PC12 細胞に WER および H_2O_2 処理した後, 無血清培地にて 24 時間培養した後の細胞生存率を MTT ((3,4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay により評価した。0.25 mg/mL MTT (和光純薬工業) を含む無血清培地を 3 時間作用させた後, dimethyl sulfoxide (DMSO) を加えて micro mixer で細胞を溶解し, 570 nm および 630 nm の吸光度を測定した。細胞を播種しない well に同様の操作を行い測定した吸光度値を blank として差し引いた。

2.3. TUNEL 染色によるアポトーシスの測定¹⁵⁾

poly-D-lysine コートした 6-well plate (Becton Dickinson) に PC12 細胞を 2.5×10^5 個/well で播種し, 24 時間後に NGF を添加し, 分化させた PC12 細胞に WER および H_2O_2 処理して培地を取り除き, 無血清培地にて 24 時間培養後, トリプシン処理して細胞を回収した。回収した細胞懸濁液を 2×10^6 cells/mL に調製し, その 60 μ L を, 浮遊細胞収集バケツを用いて 1000 rpm, 3 分間遠心しアミノシランコートスライドグラス (松浪硝子工業) に接着させた。スライドグラス上に接着させた細胞を 4% ホルマリンで 10 分間固定し, 市販のキット (Apoptosis *in situ* Detection Kit Wako, 和光純薬工業) を用いてアポトーシス陽性細胞を染色した。アポトーシス陽性細胞染色後にマイヤー・ヘマトキシリン (和光純薬工業) にて対比染色を行った。結果は, 200 μ m² の全細胞数とアポトーシス陽性細胞数をカウントし, Apoptosis index (%) = (アポトーシス陽性細胞数/全細胞数) \times 100 として表した。

3. 実験動物

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」および「城西大学動物実験規定」に従って行った。C57BL/6J Kwi 系雄性マウス（10–12 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）および水を自由に摂取させ飼育した。1 週間の予備飼育後，WER (1 g/kg) および対照として蒸留水を胃ゾンデにて単回（低酸素脳虚血処置における総頸動脈閉塞処置 1 時間前）あるいは慢性（1 日 1 回 7 日間）経口投与した。

4. 低酸素脳虚血モデルの作製

H/I モデルの作製は，Qi らの方法¹⁶⁾により行った。マウスをハロタン（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 ($8\%\text{O}_2/92\%\text{N}_2$) 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，マウスをケージに戻し，餌および水が自由に摂取できる環境で 24 時間飼育した。擬似手術処置群 (Sham operation, $n=2$) には，頸部の切開および右総頸動脈剥離のみを行ったマウスを用いた。

5. 生体内の酸化ストレス度の測定

H/I 処置前後の生体内酸化ストレス度を，d-ROMs (Reactive Oxygen Metabolites) テストキット (Diacron International, Grosseto, Italy) を用いて血中のヒドロペルオキシド濃度を指標として測定した¹⁷⁾。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血し，得られた 10 μL の血漿をキット付属の酢酸緩衝液に加えて混和し，20 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) にて測定した。

6. 神経症状スコアの測定^{18,19)}

低酸素ガス負荷の 24 時間後に，自発運動 (3 分間)，反対側前後肢の麻痺，歩行状態，感覚毛 (髭) に触れた時の反応，反対側体幹部に触れた時の反応，の各項目について，0：高度障害，1：中等度障害，2：軽度障害，3：障害のない状態，の 4 段階でマウスの神経症状をスコア化し，これらの合計を用いて評価を行った。

7. 脳梗塞巣体積の測定^{16,20)}

梗塞巣体積を評価するために，低酸素ガス負荷の 24 時

間後にマウスを麻酔下で断頭，脳を摘出し，ステンレス製ブレインマトリックスを用いて 2 mm 厚の脳切片を作製した後，2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, 和光純薬工業) を含む PBS (pH 7.4) 中で 15 分間 37°C の暗所にてインキュベートした。TTC 染色した切片を 10% formaldehyde で浸漬固定し，デジタルカメラにより染色画像を撮影した。画像解析ソフト (Scion Image 1.62, Scion Corporation, Frederick, MD, USA) を用いて各片の吻側および尾側の両面の梗塞面積を計測し，梗塞面積と切片厚 2 mm を用いて体積を算出した。梗塞巣体積 (%) = $\{[\text{左半球体積} - (\text{右半球体積} - \text{梗塞体積})]\} / \text{左半球体積} \times 100$ の式から梗塞巣体積を評価した。

8. 脳組織の過酸化脂質含量の測定

脳組織の過酸化脂質含量は，チオバルビツール酸 (TBA) 法を用いて測定した^{20,21)}。低酸素ガス負荷の 24 時間後に脳を摘出し，組織サンプルに対して 10% (w/v) になるようにプロテアーゼインヒビター (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Pepstatin A, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin, 10 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (以上，和光純薬工業)，1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Trasylol (Bayer Medical, Land Nordrhein-Westfalen, Germany)) を含む 1.15% 塩化カリウム溶液を加え，ポリロンホモジナイザーで粉碎した。キャップ付き試験管に 0.2 mL の 10% (w/v) 組織ホモジネートおよび 0.2 mL の 8.1% SDS, 1.5 mL の 20% 酢酸緩衝液 (pH 3.5)，0.05 mL の 0.8% ブチルヒドロキソトルエン (BHT) 酢酸溶液，1.5 mL の 0.8% 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)，0.7 mL の蒸留水を順に分注し，十分混和した後， 5°C で 60 分間静置した。続いて 95°C で 60 分間煮沸した後，流水で 10 分間速やかに冷却して室温に戻し，1.0 mL の水，および 1-butanol (ナカライテスク) と pyridine (和光純薬工業) の混合物 (15:1 (v/v)) を 5.0 mL 加え，十分混和し，3000 rpm，室温の条件下で 10 分間遠心し，有機層 (上層) の吸光度 (532 nm) を測定した。試料 1 g あたりの赤色色素量 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ tissue) は， $(A-A_0)/156000 \times 5.8 / 10^3 \times 10^2 / 3 \times 10^6$ の計算式から算出した。

9. 組織染色

9.1. TUNEL 染色

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 WER の効果を組織化学的に検討するために，クライオスタット (CM3050S, Leica, Bensheim, Germany) にてマウス脳の冠状切片 (8 μm 厚) を作製し，TUNEL 染色 (Apoptosis *in situ* Detection Kit Wako, 和光純薬工業) およびヘマトキシリンによる対比染色を行った。海馬 CA1 および大脳皮質体性感覚野の一定領域 (150 $\mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$) の

TUNEL 陽性細胞数をカウントした。

9.2. Cleaved caspase-3 の免疫染色²²⁾

マウス脳の冠状切片 (8 μm 厚) を作製し、市販のブロッキング剤 (1:4; ブロックエースTM, 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 $^{\circ}\text{C}$ で一晩作用させた後、2 次抗体 (1:200; Cy3 conjugated affinity purified secondary antibody, Chemicon International, Temecula, CA, USA) を室温で 2 時間作用させ、封入した後、蛍光顕微鏡で観察した。TUNEL 染色と同様、CA1 および大脳皮質体性感覚野の一定領域 (150 μm ×150 μm) の陽性細胞数をカウントした。

10. 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、一元配置分散分析後、Tukey 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。

結 果

1. PC12 細胞における WER の保護効果

NGF により神経細胞に分化させた PC12 細胞を用いて、MTT assay を行った。PC12 細胞を 100 μM H_2O_2 で 1 時間処理することにより、酸化ストレスによる細胞死が引き起こされ、細胞生存率は $50.9 \pm 5.3\%$ となった。一方、WER を処理した PC12 細胞の生存率は濃度依存的に上昇し、1000 ng/mL で最大となった (図 1)。また、同様の条件で誘発したアポトーシスについて TUNEL 染色による解析を行った結果、WER はアポトーシス陽性細胞数を濃度依存的に減少させ、100 ng/mL から有意なアポトーシス抑制効果を示した (図 2)。

2. 低酸素脳虚血マウスの酸化ストレス度に対する WER の効果

蒸留水または WER を単回 (acute) あるいは 7 日間 (chronic) 投与したマウス各群において、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 (図 3)。蒸留水単回投与群では、H/I 処置前 (117.7 ± 3.0 U.CARR) に比べ、H/I 処置 24 時間後の体内酸化ストレス度 (133.5 ± 4.2 U.CARR) が有意に増大した。WER 単回投与群においても同様の酸化ストレス度の変化が見られ、蒸留水投与群との差は認められなかった (図 3A)。これに対して、WER を 7 日間経口投

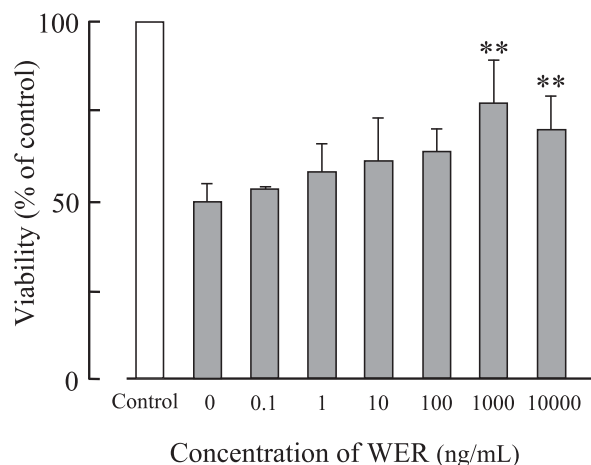


図 1 Measurement of viability of H_2O_2 -treated differentiated PC12 cells by MTT assay. Differentiated PC12 cells were pretreated with different concentrations of WER for 1 h before 100 μM H_2O_2 treatment. The data are represented as means \pm S.D. from 4–7 independent experiments in each group. **, $P < 0.01$ compared with that of differentiated PC12 cells treated with only 100 μM H_2O_2 , one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

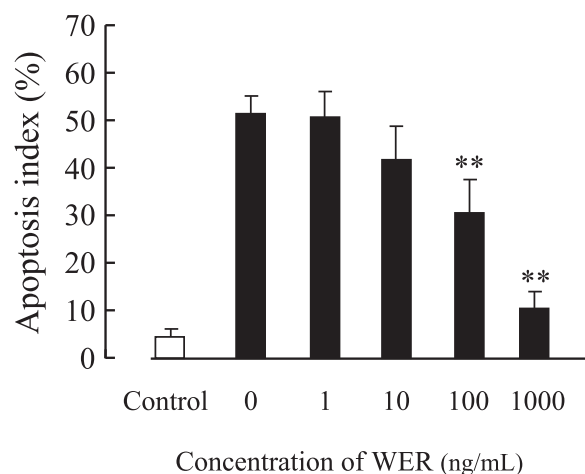


図 2 Detection of apoptosis in differentiated PC12 cells by TUNEL staining. Differentiated PC12 cells were pretreated with different concentrations of WER for 1 h before 100 μM H_2O_2 treatment. The data are represented as means \pm S.D. of "apoptotic index" (number of positively stained apoptotic cells/total number of cells counted $\times 100\%$) from three independent experiments in each group. **, $P < 0.01$ compared with that of differentiated PC12 cells treated with only 100 μM H_2O_2 , one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

与した群 (109.3 ± 15.1 U.CARR) における H/I 処置前および 24 時間後の酸化ストレス度は、それぞれ 101.8 ± 9.0 , 112.5 ± 9.7 U.CARR であり、H/I 処置による酸化ストレス度の増大が認められず、また、蒸留水投与群と比較し低酸素負荷 24 時間後の酸化ストレス度が有意に減少した (図 3B)。データは示さないが、Sham 群においては、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ず、また WER 投与による影響も見られなかった。

3. 低酸素脳虚血による脳障害に対する WER の保護効果 H/I 処置 24 時間後における WER 単回投与群の神経症

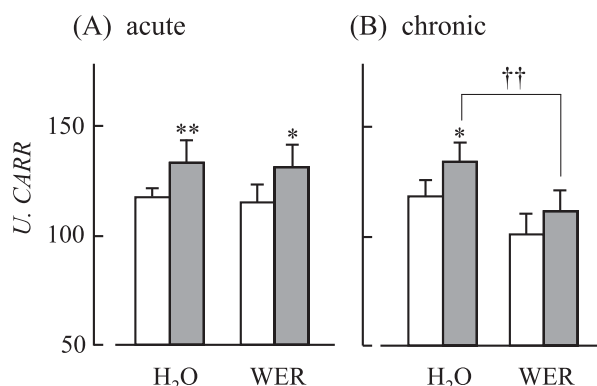


図 3 Acute (A) and chronic (B) effects of WER (1 g/kg, p.o.) on total plasma oxidative stress in the mice before H/I (open bar) and 24 hr after H/I (dotted bar) determined by d-ROMs test. In the acute study, the mice were orally administered with WER or water 1 hr before ligation of the right carotid artery. In the chronic study, the mice were treated with WER or water for 1 week. The data are represented as means±S.D. from 4–7 mice in each group. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$ compared with each before H/I, paired t -test. ††, $P<0.01$ compared with the respective water-treated group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

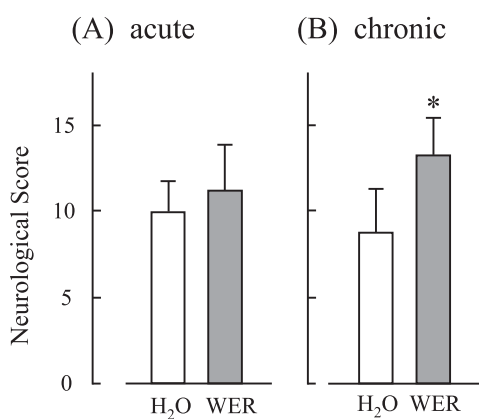


図 4 Acute (A) and chronic (B) effects of WER (1 g/kg, p.o.) on neurological score determined in the mice 24 hr after H/I. The neurological evaluations consisted of the five tests, spontaneous activity for 3 min, symmetry in the movement of left forelimb and hind limb, floor walking, response to vibrissae touch, and response to side stroking. The score to each mouse was summated 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 4–7 mice in each group. *, $P<0.05$ compared with the respective water-treated group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

状スコアは 11.2 ± 2.7 であり、対照の蒸留水投与群 (10.0 ± 1.7) との間に有意差はみられなかった (図 4A)。これに対し、WER を慢性投与した群のスコアは 13.2 ± 2.2 であり、蒸留水投与群 (8.8 ± 2.5) と比較し、H/I 処置による神経症状の悪化が有意に抑制された (図 4B)。

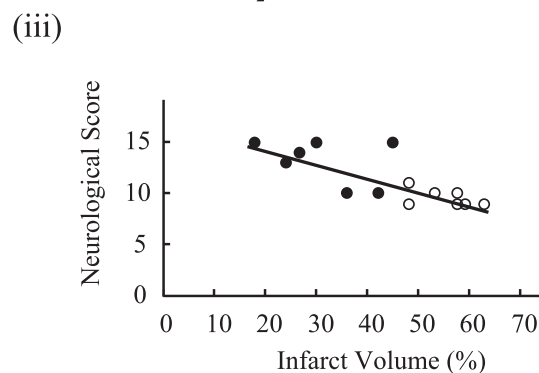
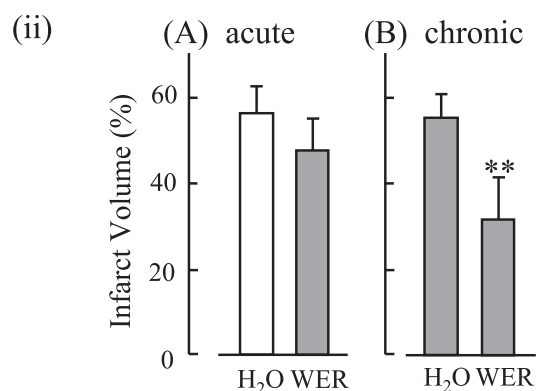
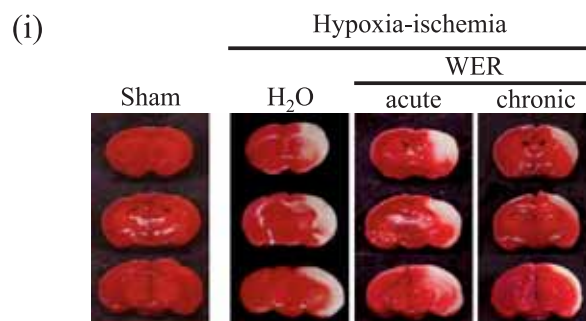


図 5 (i) Representative data of triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining from the mice of sham operated, control H/I (H₂O), H/I with acute WER treatment, or H/I with chronic WER treatment. Scale bar=2 mm. (ii) Acute (A) and chronic (B) effects of WER (1 g/kg, p.o.) on infarction volume in the mice brain determined in the mice 24 hr after H/I by TTC staining. The data are represented as means (% of control) ±S.D. from 4–7 mice in each group. **, $P<0.01$ compared with the respective water-treated group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test. (iii) Relationship between infarction volume and neurological score in chronic H₂O-treated mice (open circle) and WER-treated mice (closed circle).

次に、H/I 処置 24 時間後の摘出脳を TTC 染色し、梗塞巣体積を測定した (図 5)。擬似手術のみを行った Sham 群の脳には梗塞は確認されなかったが、蒸留水投与群 (H_2O) では、30 分間の H/I 処置により同側の皮質、線条体、および海馬の広範囲にわたって梗塞巣が形成され、その体積は $56.4 \pm 6.16\%$ であった。WER 単回投与群においても蒸留水投与群と同様の梗塞巣 ($47.9 \pm 7.50\%$) がみられたが、WER を慢性投与した群における梗塞巣の形成は皮質および線条体の一部分に局限していた。WER 慢性投与群の梗塞巣体積は $31.7 \pm 9.9\%$ であり、蒸留水投与群 ($55.3 \pm 5.63\%$) と比較し有意な減少が認められた。個々のマウスにおいて脑梗塞体積と神経症状との関係をプロットし解析を試みたところ、これらの間には強い負の相関関係 (相関係数: -0.725) が認められた。

さらに、H/I 処置 24 時間後の脳組織中の過酸化脂質含量を測定したところ (図 6)、WER 単回投与群と蒸留水投与群との間に差はなかったが、WER 慢性投与群では蒸留水投与群と比較し有意な過酸化脂質含量の低下が認められた。

4. 低酸素脳虚血によるアポトーシスに対する WER の効果

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 WER の効果を組織化学的に検討するために、慢性投与群のマウス脳の冠状切片を用い、TUNEL 染色を行った (図 7)。その結果、対照群では H/I 処置によりペナンプラ領域である海馬 CA1 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、WER を慢性投与した群では TUNEL 陽性細胞数が有意に減少した。さらに、アポトーシスを促進するカ

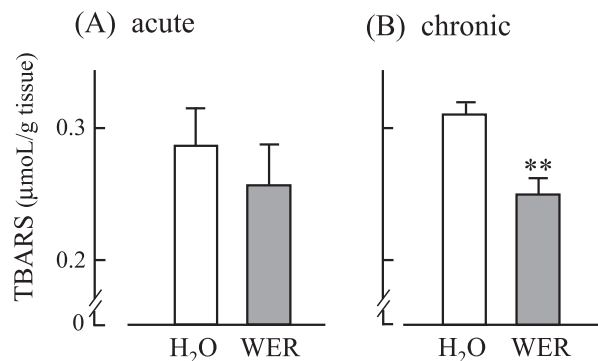


図 6 Acute (A) and chronic (B) effects of WER (1 g/kg, p.o.) on lipid peroxidation in the mice brain tissue determined 24 hr after H/I by TBARS assay. The data are represented as means \pm S.D. from 4 mice in each group. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ compared with the respective water-treated group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

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 (図 8)。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 WER を慢性投与した群では蒸留水投与群と比較し、陽性細胞数が有意に減少していることが確認された。

考 察

本研究結果より、マウスに対する WER (1 g/kg) の 7 日間経口投与により、H/I 処置による体内酸化ストレスの増大および脳組織中の過酸化脂質産生が抑制され、脑梗塞巣体積が減少することが明らかとなった。さらに、

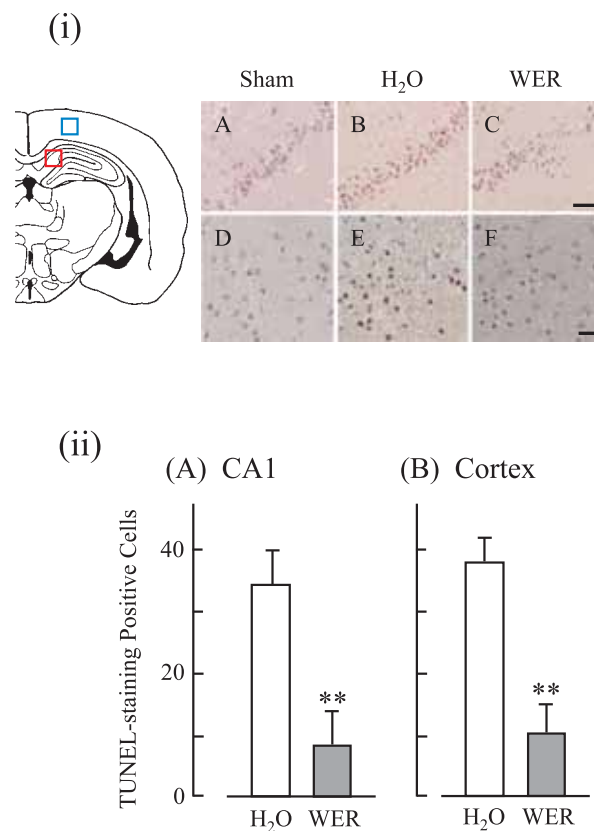


図 7 (i) Representative data of TUNEL staining in the CA1 area (red square in the brain map) of the hippocampus from the mice of sham operated (A), control H/I (B), H/I with chronic WER treatment (C), and the somatosensory area of the cortex (blue square in the brain map) from the mice of sham operated (D), control H/I (E), H/I with chronic WER treatment (F). Scale bar = 50 μm. (ii) Chronic effects of WER (1 g/kg, p.o.) on the number of TUNEL positive cells in the CA1 area of the hippocampus (A) and the sensori-motor cortex region (B) in the mice brain determined 24 hr after H/I by TTC staining. The data are represented as means \pm S.D. from 3 mice in each group. **, $P < 0.01$ compared with the water-treated group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

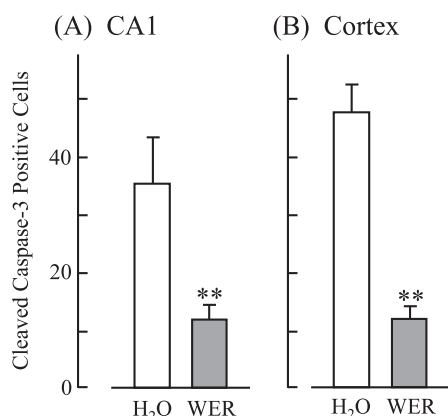


図8 Chronic effects of WER (1 g/kg, p.o.) on the number of cleaved caspase-3 positive cells in the CA1 area of the hippocampus (A) and the somatosensory area of the cortex (B) in the mice brain determined 24 hr after H/I by immunostaining. The data are represented as means±S.D. from 3 mice in each group. **, $P<0.01$ compared with the water-treated group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

WER はペナンプラ領域である海馬 CA1 および大脳皮質体性感覚野において神経細胞のアポトーシスを抑制した。酸化ストレスによって誘発されるアポトーシスに対する WER の抑制効果は、PC12 細胞を用いた *in vitro* 実験からも裏付けられた。今回、データは示さないが、WER を粉末飼料に 0.5% の濃度で混合し、7 日間自由摂取させた場合（摂取量から換算して 0.7~0.8 g/kg/日）においても、同様の脳保護効果が認められた。これらのことより、WER の持続的な摂取は一過性脳虚血による酸化ストレスを軽減し、脳保護効果を示すことが明らかになった。

脳梗塞における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^{1,2)}。特に、ROS などのフリーラジカルは細胞膜や DNA などに損傷を与え、虚血後の二次的な梗塞拡大に寄与していると考えられている。脳梗塞患者では、赤血球のマロンジアルデヒド含量が増加すること、また血中の SOD や GPx 活性が低下すること、さらにこれらの程度が病態の重症度と有意に相関することが報告されている²³⁾。また、これまでの数多くの基礎研究により、スーパーオキシドアニオン (O_2^-)、 H_2O_2 、ヒドロキシラジカル ($\bullet OH$) などの ROS は、細胞における DNA の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ことが明らかになっている^{1,2)}。このような研究結果を踏まえ、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近年注目されてきた。特に、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ついての報告がこれまでも数多くなされている

る^{4,24)}。マンネンタケについても、そ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との報告がなされている^{10,25)}。WER は、マンネンタケ菌糸体を固形培地に接種し、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、滋養強壮を目的とした健康食品として用いられている。マンネンタケの生理活性に関するこれまでの研究では、主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、子実体の発生には相当の時間が必要であり、その摘み取り時期による成分含量のばらつきや抽出効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、WER は霊芝菌糸体のみの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することが可能である。WER には、マンネンタケ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体による固形培地の分解物や菌糸体の自己消化成分等も含まれており、当研究室では、*in vitro* における抗酸化作用評価実験から、WER がマンネンタケの子実体と同等の O_2^- 消去能、ラジカル捕捉能および過酸化脂質生成抑制能を有することを明らかにしている（未刊行）。

今回、WER は H_2O_2 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としてアポトーシスの抑制が寄与していることが明らかになった。この結果は、WER が培養液中の H_2O_2 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ことを示唆した。Zhao ら²⁵⁾ は、マンネンタケ子実体から抽出した多糖体が、ラット大脳皮質初代培養細胞において hypoxia/reoxygenation 処置による細胞死を抑制することを報告している。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。脳における虚血の中心部では、血流の著しい減少による酸素および ATP の欠乏から神経細胞が数分以内に不可逆的壊死に陥るが、周辺部の軽度〜中等度の虚血領域であるペナンプラ領域では、虚血または再灌流時に発生する ROS 等による酸化障害や細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性の破綻によるアポトーシスや遅発性神経細胞死が引き起こされる^{22,26)}。本実験において、マウスに対する WER の 7 日間経口投与は、H/I 処置後の体内酸化ストレスおよび脳組織中の過酸化脂質産生を抑制し、脳梗塞巣体積を減少させ、また、ペナンプラ領域における神経細胞のアポトーシスを抑制した。In vivo 実験によるこれらの結果は、脳の虚血部位においても WER の抗酸化作用が有効に働き、低酸素脳虚血状態およびその後の酸素再供給

時における酸化ストレスが抑制され、脳細胞保護効果が現れることを示した。脳組織は酸化ストレスに対して特に脆弱であるが、その理由として、酸素消費量が多く ROS の発生しやすい臓器であると共に、細胞膜を構成するリン脂質に含まれる多価不飽和脂肪酸が非常に豊富であり、ROS によるダメージを受けやすいことがあげられる^{27,28)}。また、抗酸化酵素の存在量が少ないこと、 H_2O_2 から $\bullet OH$ を形成するフリーラジカル反応を触媒する鉄が豊富であること²⁸⁾なども原因となっている。WER の抗酸化作用の活性成分としては、マンネンタケ由来のテルペノイドやペプチドなどの比較的低分子の成分が血液脳関門を通過し脳内で抗酸化作用を発現している可能性や、リグニンなどの高分子成分などが生体内抗酸化物質の消費を抑制している可能性などが考えられるが、その活性本体については今後検討が必要である。

WER の脳保護作用として、酸化ストレスの軽減のほかに、他のメカニズム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。マンネンタケには抗炎症作用²⁹⁾が確認されていることから、WER の抗炎症作用を介した脳保護作用についても今後さらに検討が必要である。また、マンネンタケの抽出物が培養マクロファージにおける誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 発現の抑制作用³⁰⁾を有することが報告されているが、脳虚血時の NO 産生に対する WER の作用は未だ明らかではない。脳虚血の病態には、イオンチャネルや NOS、血管内皮機能といった様々な因子が関与しており、神経細胞、グリア細胞、および血管内皮細胞を含めた作用機序の包括的解明を進めていく必要があると考えられる。

結 論

以上、本研究結果から、マウスにおける WER の持続的な経口投与は、低酸素脳虚血における酸化ストレスを軽減し、脳細胞保護作用を示すことが明らかになった。今後、病態の改善や予防効果を有する WER 成分のスクリーニングを進めるとともに、WER の作用メカニズムの詳細について解明し、疾患の一次予防に対する有効性を明らかにしたいと考えている。

助成源

本研究の一部は、独立行政法人日本学術振興会科学研究費補助金「肥満および糖尿病による中枢性呼吸機能障

害に関する基礎的研究」(課題番号: 16790450)、「糖尿病による中枢神経障害の分子メカニズムと新規抗酸化食品の改善効果」(課題番号: 19590700)により実施された。

参 考 文 献

- 1) Siesjö BK. Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit Care Med* 1988; 16(10): 954-963.
- 2) Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6(5): 667-672.
- 3) 島津智一, 古屋大典. 脳保護療法. *Progr Med* 2007; 27: 289-293.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Liu J, Yang F, Ye LB, et al. Possible mode of action of antitumor activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. *J Ethnopharmacol* 2004; 95(2-3): 265-272.
- 8) Hajjaj H, Macé C, Roberts M, et al. Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(7): 3653-3658.
- 9) Zhang HN, Lin ZB. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25(2): 191-195.
- 10) Wong KL, Chao HH, Chan P, et al. Antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* in acute ethanol-induced heart toxicity. *Phytother Res* 2004; 18(12): 1024-1026.
- 11) 白井達洋, 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.
- 12) 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傷害活性の増強. *Biotherapy*. 1999; 13: 513-515.
- 13) 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.
- 14) Koh SH, Kim SH, Kwon H, et al. Epigallocatechin gallate protects nerve growth factor differentiated PC12 cells from oxidative-radical-stress-induced apoptosis through its effect on phosphoinositide 3-kinase/Akt and glycogen synthase kinase-3. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 118(1-2): 72-81.
- 15) Wu Y, Shang Y, Sun S, et al. Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3 β /caspase-3 mediated signaling pathway. *Apopto-*

- sis 2007; 12(8): 1365–1375.
- 16) 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.
- 17) Cornelli U, Terranova R, Luca S, et al. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the D-Roms test as a marker of oxidative stress. *J Nutr* 2001; 131(12): 3208–3211.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) Tirkey N, Kaur G, Vij G, et al. Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys. *BMC Pharmacol* 2005; 5: 15.
- 22) Rizk NN, Rafolsb J, 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.
- 23) Gaetani P, Pasqualin A, Rodriguez YB, et al. Oxidative stress in the human brain after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1998; 89(5): 748–754.
- 24) Jiang J, Wang W, Sun YJ, et al. Neuroprotective effect of curcumin on focal cerebral ischemic rats by preventing blood-brain barrier damage. *Eur J Pharmacol* 2007; 561(1-3): 54–62.
- 25) 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.
- 26) Li ZG, Britton M, Sima AA, et al. Diabetes enhances apoptosis induced by cerebral ischemia. *Life Sci* 2004; 76(3): 249–262.
- 27) Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1991; 71(4): 1185–1195.
- 28) Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001; 18(9): 685–716.
- 29) Akihisa T, Nakamura Y, Tagata M, et al. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chem Biodivers* 2007; 4(2): 224–231.
- 30) Woo CW, Man RY, Siow YL, et al. *Ganoderma lucidum* inhibits inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Mol Cell Biochem* 2005; 275(1-2): 165–171.

ABSTRACT

Protective Effects of a Water-Soluble Extract from Culture Medium of *Ganoderma lucidum* Mycelia against Neuronal Damage after Hypoxia-Ischemia in Mice

Mari OKAZAKI¹, Naohiro IWATA¹, Shigenori HORIUCHI¹, Shinya KAMIUCHI¹, Fumiko SUZUKI²,
Hiroshi IIZUKA², Yasuhide HIBINO¹

¹ *Laboratory of Immunobiochemistry, Department of Clinical Dietetics & Human Nutrition,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University*

² *Noda Shokukinkogyo Co. Ltd.*

Objective: In this study, the neuroprotective effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia (WER) on oxidative stress-induced injury were examined using H₂O₂-treated PC12 cells. Additionally, we investigated both the acute and chronic effects of WER on brain necrosis and apoptosis induced by hypoxia/ischemia (H/I) followed by reoxygenation in mice.

Methods: Viability and apoptosis index of H₂O₂-treated PC12 cells were determined by 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl (MTT) assay and TUNEL staining, respectively. H/I in mice was induced by unilateral ligation of carotid artery and exposure of 8%O₂ for 30 min. Twenty-four hours after H/I, neurological deficits, cerebral infarction volume, and apoptosis level were evaluated.

Results: WER-pretreated PC12 cells showed an increased viability evaluated by MTT assay compared to untreated cells. TUNEL staining indicated that WER induced a concentration-dependent decrease of the number of apoptotic cells. In the mouse model of H/I, acute (pre-H/I) treatment of WER (1 g/kg, p.o.) did not affect neurological deficits, total plasma oxidative stress, cerebral lipid peroxidation, and infarction volume assessed 24-h after reoxygenation. However, chronic treatment of WER (1 g/kg, p.o., for 7 days) significantly improved these parameters compared with distilled water-treated mice. Moreover, chronic treatment of WER decreased the levels of apoptosis in two brain areas, the sensori-motor cortex and the CA1 of the hippocampus, analyzed by TUNEL and cleaved caspase-3 immunostaining.

Conclusion: These results show that daily intake of WER relieves the cerebral ischemic injury, which may be attributed to decrease of oxidative stress.

Key words: Neuroprotection, Water-soluble extract of *Ganoderma lucidum* mycelia (WER), Ischemia, Oxidative-stress, Apoptosis