

## 【原 著】

## マウス低酸素脳虚血障害に対する椎茸菌糸体培養培地抽出物の保護作用

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

玄 美燕<sup>1</sup>, 岡崎真理<sup>1</sup>, 岩田直洋<sup>1</sup>, 神内伸也<sup>1</sup>, 鈴木史子<sup>2</sup>, 飯塚 博<sup>2</sup>, 日比野康英<sup>1,\*</sup>  
 Meiyuan XUAN<sup>1</sup>, Mari OKAZAKI<sup>1</sup>, Naohiro IWATA<sup>1</sup>, Shinya KAMIUCHI<sup>1</sup>,  
 Fumiko SUZUKI<sup>2</sup>, Hiroshi IIZUKA<sup>2</sup>, Yasuhide HIBINO<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 城西大学薬学部医療栄養学科生体防御学講座

<sup>2</sup> 野田食菌工業株式会社

## 【要 旨】

脳梗塞急性期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く、また血流の再開による過剰の活性酸素種の産生により脳細胞にアポトーシスが誘発される。本研究では、虚血性脳障害に対する椎茸菌糸体培養培地抽出物(LEM)の保護効果について、マウス低酸素脳虚血(H/I)モデルを用いて検討した。

LEMを0.5%または1%の割合で混合した飼料を、マウスに14日間自由摂取させた後、一侧の総頸動脈結紮および低酸素負荷によるH/I処置を行い、体内酸化ストレス度、神経症状、脳梗塞巣体積、および脳細胞のアポトーシスを評価した。

LEM摂取群では、対照群と比較し、H/I後の体内酸化ストレス度の上昇が抑制された。また、虚血障害による神経症状が軽減し、脳梗塞巣体積および海馬、皮質の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、LEMは酸化ストレスを抑制し、虚血性脳障害に対して脳保護作用を示すことが示唆された。

## 【キーワード】

脳保護作用、椎茸菌糸体培養培地抽出物(LEM)、低酸素脳虚血、酸化ストレス、アポトーシス

## はじめに

近年、種々の食用キノコ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の健康食品が数多く開発されている。椎茸菌糸体培養培地抽出物(LEM)は、椎茸(*Lentinus edodes*)の菌糸体を、砂糖キビ搾汁残渣であるバガスと脱脂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年近い実績をもつ。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<sup>1,2)</sup>、抗腫瘍作用<sup>3,4)</sup>、免疫調節作用<sup>5,6)</sup>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<sup>7)</sup>や、慢性肝炎患者<sup>8)</sup>に対して有効性を示す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ラット四塩化炭素肝障害に対する防御効果を示し、その作用機序として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が示唆されている<sup>9)</sup>。LEMは、スーパーオキシドジスムターゼ様活性やラジカル消去活性、過酸化脂質産生抑制作用などの抗酸化作用<sup>10,11)</sup>を有することが報告されており、LEMの多様な生理活性のメカニズムの一部に少なからずその抗酸化作用の寄与が推察され、糖尿病や高血

受理日: 2011年7月20日

\* 〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台1-1 城西大学薬学部医療栄養学科生体防御学講座 Tel: 049-271-7285 Fax: 049-271-7284  
 E-mail: seitaib@josai.ac.jp

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も期待される<sup>12)</sup>。

虚血性脳障害は、動脈硬化等が原因で脳に酸素や栄養分を送る動脈が閉塞して生じる脳組織の循環障害であり、その代表的な疾患として脳梗塞がある。脳梗塞発作が生じた際、処置が遅れるほど症状は重篤化し致死的になり、命を取りとめた場合でも半身不随などの後遺症が患者の残りの生涯のQOLを著しく低下させる。脳梗塞発作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<sup>13)</sup>。虚血の中心部では、エネルギー代謝障害による壊死に加え、脳細胞のミトコンドリア機能不全や小胞体ストレス等を介して活性酸素種(ROS)や活性窒素種(RNS)などのフリーラジカルが産生され、DNAや機能性蛋白質の障害の結果、細胞死が引き起こされる<sup>14)</sup>。脳梗塞急性期の主要な治療法として組織プラスミノーゲンアクチベータ(t-PA)による血栓溶解療法が行われているが、血流の再開に伴う様々なフリーラジカルの発生は、虚血周辺領域であるペナンプラ領域の脳細胞にアポトーシスを誘発し、組織障害を増強することが知られている<sup>15,16)</sup>。したがって、虚血再灌流障害には、酸化ストレス制御による脳保護療法が重要であり、様々なラジカル消去薬が開発されているが、現在もより有効な治療薬が求められている<sup>15,16)</sup>。一方、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。そこで、本研究では、長年の実績により安全性が確立され、かつ抗酸化作用をはじめとした優れた生理活性を有するLEMの虚血性脳障害予防改善の可能性について検討を行うこととした。マウスにLEMを経口摂取させ、低酸素脳虚血(H/I)処置による脳障害に対するLEMの効果を、体内酸化ストレス度、神経症状、および梗塞巣体積を測定することにより調査した。さらに、ペナンプラ領域の一部である海馬CA1, CA2野、および大脳皮質性感覺野の神経細胞のアポトーシスに対するLEMの作用を組織化学的手法により検討した。

## 材 料・方 法

### 1. 実験材料

LEMは、野田食菌工業(株)から提供されたものを使用した。椎茸菌糸体ペレットを、バガスと脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、約4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粗濾過した後、メンブランフィルター(0.45 μm)にて濾過滅菌し、濾液の凍結乾燥品を

LEMとした。

### 2. 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 Kwl系雄性マウス(10-12週齢、東京実験動物)を温度23±2°C、湿度55±10%、照度サイクル12時間(明期7:00~19:00)の環境下で1週間予備飼育した後、無作為に3群(各群n=7)に分け、対照群には粉末飼料(CE-2、日本クレア)を、他の2群には0.5%または1%の濃度でLEMを混合した粉末飼料を14日間自由に摂取させた。

### 3. 低酸素脳虚血モデルの作製

H/Iモデルの作製は、以前の報告<sup>17,18)</sup>に従って行った。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%O<sub>2</sub>/92%N<sub>2</sub>)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。擬似手術処置群(sham, n=5)には、頸部の切開と右総頸動脈剥離のみを行った。

### 4. 生体内の酸化ストレス度の測定<sup>18)</sup>

H/I処置前後の生体内酸化ストレス度を、市販のキット(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得た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)にて測定した。

### 5. 神経症状スコアの測定<sup>18,19)</sup>

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。

## 6. 脳梗塞巣体積の測定<sup>17,18)</sup>

梗塞巣体積を評価するために、低酸素ガス負荷 24 時間後にマウスを麻酔下で断頭、脳を摘出し、ステンレス製プ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、梗塞巣体積 (%) = [左半球体積 - (右半球体積 - 梗塞体積)] / 左半球体積 × 100 の式を用いて評価した。

## 7. 細胞染色

LEM の効果を組織化学的に検討するために、クライオスタッフ (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 野および大脳皮質性感覺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。

### 7.1. Dihydroethidium 染色<sup>20)</sup>

ROS の一種であるスーパーオキサイド ( $O_2^-$ ) の産生を、dihydroethidium (DHE, シグマアルドリッヂャパン) 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ジウムプロマイドとなり DNA に結合する。切片に 10 μmol/L の DHE を 37°C で 30 分間反応させ、封入後、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。

### 7.2. Hematoxylin-eosin (HE) 染色<sup>21)</sup>

HE 染色は常法に従って行った。海馬 CA1, CA2 野、および大脳皮質性感覺野において、退色した細胞質と凝集により濃染色された核を指標に細胞死を判定し、計測を行った。Cell death (%) = 死細胞数 / 全細胞数 × 100 として表した。

### 7.3. TUNEL 染色<sup>18)</sup>

神経細胞のアポトーシスについて検討するために、メタノール固定した凍結切片を市販のキット (Apoptosis *in situ* Detection Kit Wako, 和光純薬工業) を用いて TUNEL 染色し、アポトーシス陽性細胞数を計測した。同時にヘマトキシリンによる対比染色を行い、TUNEL-positive cells (%) = TUNEL 陽性細胞数 / 全細胞数 × 100 として表した。

### 7.4. Cleaved caspase-3 の免疫染色<sup>18)</sup>

メタノール固定した脳切片を市販のブロッキング剤

(ブロックエース<sup>TM</sup>, 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 で一晩作用させた後、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。TUNEL 染色と同様、陽性細胞数をカウントした。

## 8. 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。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。

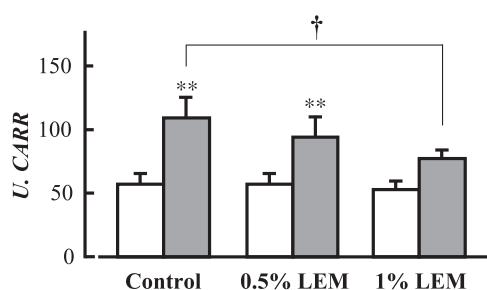
## 結果

### 1. マウスの体重および摂取量に対する LEM の影響

LEM を 0.5% または 1% の割合で混合した粉末飼料を 14 日間、自由に摂取させた結果、これらの群と粉末飼料のみを与えた対照群のマウスの体重および摂食量には有意差は認められなかった。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/日であった。

### 2. 低酸素脳虚血マウスの酸化ストレス度に対する LEM の効果

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 (Fig. 1)。通常の飼料で飼育した対照群では、H/I 処置前 (56.8 ± 8.3 U.CARR) に比べ、H/I 処置 24 時間後の体内酸化ストレス



**Fig. 1** 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 (shaded bar) determined by d-ROMs test. The data are represented as means ± 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, by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

度は有意に増大した ( $109.0 \pm 16.8$  U.CARR). 0.5%, 1% LEM 両群の H/I 処置前の酸化ストレス度は、対照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、 $77.0 \pm 7.0$  U.CARR であり、対照群よりも有意に減少した。またデータは示さないが、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。

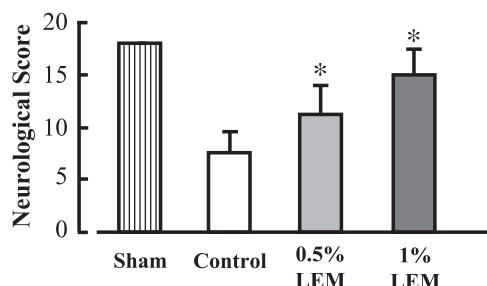
### 3. 低酸素脳虚血による脳障害に対する LEM の保護効果

H/I 処置 24 時間後における対照群の神経症状スコアは  $7.6 \pm 2.0$  であり、症状が全く認められなかった sham 群と比較し有意に低下した。これに対し、0.5% および 1% LEM 群のスコアはそれぞれ  $11.2 \pm 2.8$ ,  $15.0 \pm 2.5$  であり、対照群と比較し、H/I 処置による神経症状の悪化が LEM の用量依存的に有意に抑制された (Fig. 2)。

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 (Fig. 3)。Sham 群の脳には梗塞は確認されなかったが、対照群では、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わたって梗塞巣が形成され、その体積は  $31.9 \pm 9.1\%$  であった。0.5% および 1% LEM 群の梗塞巣の形成は皮質および線条体の一部分に限局しており、梗塞巣体積はそれぞれ  $15.9 \pm 38.4\%$ ,  $10.0 \pm 6.5\%$  であり、対照群と比較し有意な減少が認められた。

### 4. 低酸素脳虚血による脳組織フリーラジカル産生に対する LEM の効果

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 LEM 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 染色を行った (Fig. 4)。その結果、



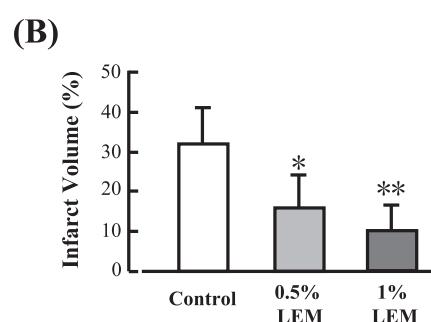
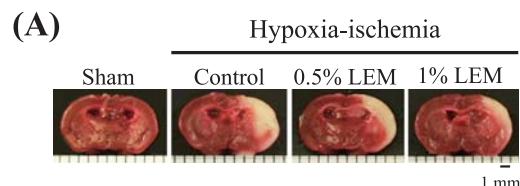
**Fig. 2** Effects of chronic intake of LEM on neurological score determined in the mice 24 hr after H/I. The neurological evaluations consisted of the five tests, spontaneous activity for 3 min, symmetry in the movement of left forelimb and hind limb, floor walking, response to vibrissae touch, and response to side stroking. The score 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  $\pm$  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.

対照群では H/I 処置により海馬 CA1, CA2 野および大脳皮質性感覚野において多数の DHE 陽性細胞が認められたが、LEM 摂取群では陽性細胞数が用量依存的に有意に減少した。

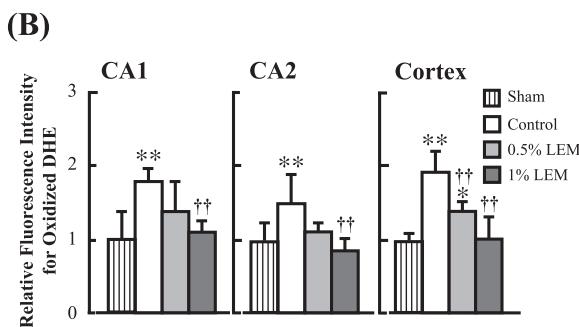
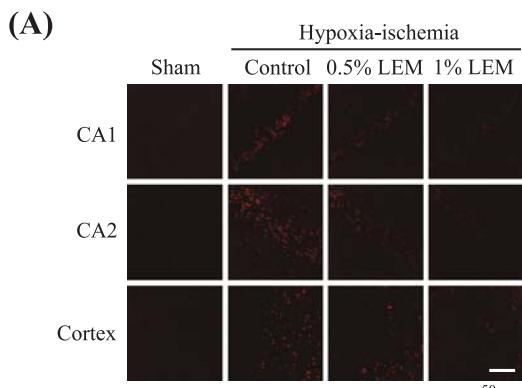
### 5. 低酸素脳虚血によるアポトーシスに対する LEM の効果

H/I 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 染色にて検討を行った (Fig. 5)。その結果、対照群では H/I 処置により海馬 CA1, CA2 野および大脳皮質性感覚野において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、対照群と比較し、0.5% LEM 群および 1% LEM 群においては、死細胞数が用量依存的に有意に抑制された。

神経細胞のアポトーシスに対する LEM の効果を TUNEL 染色により評価した (Fig. 6)。その結果、対照群では H/I 処置により海馬 CA1, CA2 野および大脳皮質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。さらに、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



**Fig. 3** (A) Representative data of triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining from the mice of sham operated, control H/I ( $H_2O$ ), H/I with chronic ingestion of LEM. Scale bar = 1 mm. (B) 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. 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, by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

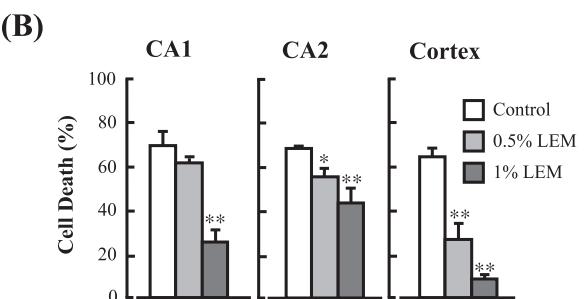
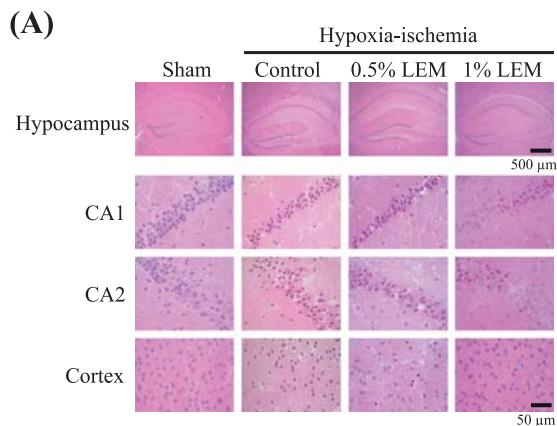


**Fig. 4** (A) Representative data of DHE staining in the hippocampus, the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex area from the mice of sham operated, control H/I, H/I with chronic LEM ingestion. Scale bar = 50  $\mu$ m. (B) Effects of chronic intake of LEM on the level of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

色を行い、陽性細胞数を測定した(Fig. 7). 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 群では対照群と比較し、陽性細胞数が用量依存的に有意に減少していることが確認された。

### 考 察

本研究において、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モデルマウスを用い、LEM の 2 週間摂取の効果を検討したところ、用量依存的な脳保護効果が認められ、その有用性が明らかとなった。LEM は H/I 処置による体内酸化ストレスの増大を有意に軽減し、脳梗塞巣体積を減少させた。また、虚血ペナントラ領域である海馬 CA1, CA2 野および大脳皮質体性



**Fig. 5** (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 LEM-treatment. Scale bars = 500 and 50  $\mu$ m. (B) Effects of chronic LEM ingestion on the number of cell death 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. 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, by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

感覚野においてフリーラジカルである  $O_2^-$  産生を抑制し、脳細胞のアポトーシスを抑制した。これらのことより、LEM 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となった。

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/日) 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/日) 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。

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<sup>13)</sup>。 $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  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。脳は酸素消費率が高く ROS の

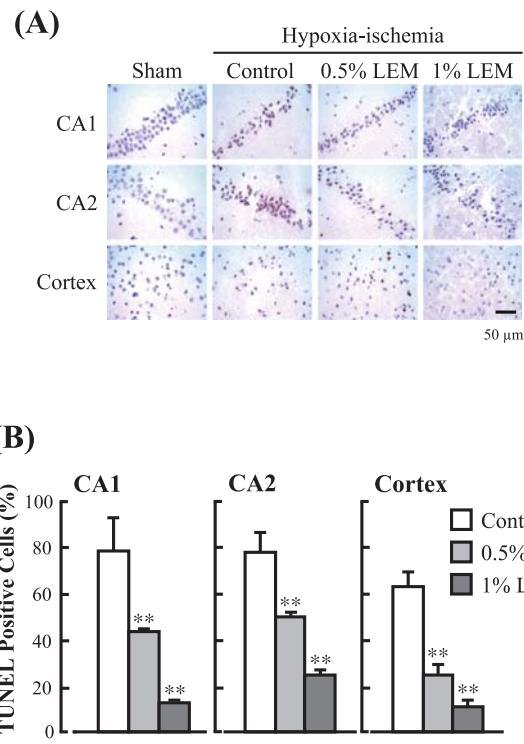


Fig. 6 (A) Representative data of TUNEL staining in the hippocampus, CA1, CA2 of the hippocampus, and the somatosensory area of the cortex from the mice of sham operated, control H/I, H/I with LEM-treatment. Scale bar = 50  $\mu$ m. (B) Effects of chronic intake of LEM on the number of TUNEL positive 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. The data are represented as means  $\pm$  S.D. from 4 mice in each group. \*\*,  $P < 0.01$  compared with the respective control group, by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

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<sup>22,23</sup>。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一方、梗塞周辺部のペナンブラ領域では、酸化障害によるアポトーシスによる遅発性細胞死が誘発され、梗塞巣の拡大が徐々に進行する<sup>15,16</sup>。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。このように、脳梗塞急性期における酸化ストレス障害は、病態の進展への関与が大きいことから、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重要視されており、エダラボンを代表とするフリーラジカル消去薬

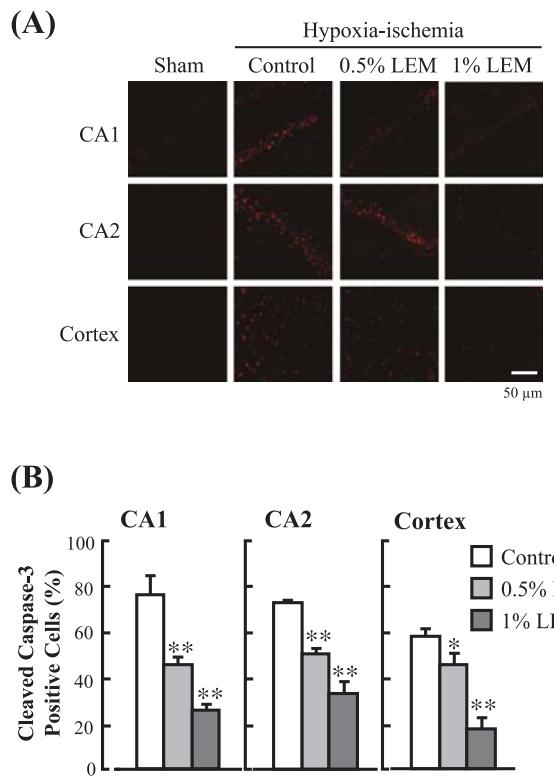


Fig. 7 (A) Representative data of cleaved caspase-3 immunostaining in the hippocampus, the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex from the mice of sham operated, control H/I, H/I with LEM-treatment. Scale bar = 50  $\mu$ m. (B) Effects of chronic intake of LEM on the number 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. 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, by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

の開発が進められてきた<sup>15,16</sup>。また、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<sup>18,24</sup>。

LEM は、担子菌である椎茸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・凍結乾燥したので、人工的に管理された椎茸菌糸体のみの無菌的な培養により、安定した品質が維持されている。当研究室では、*in vitro* における抗酸化作用評価実験から、LEM が  $O_2^-$  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確認している。また、LEM が  $H_2O_2$  処理した PC12 細胞の生存率をビタミン E 誘導体である trolox と同程度上昇させ、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を見出している（データ未発表）。これらの結果は、LEM が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ている。

LEM には、椎茸の菌糸体成分に加え、菌糸体による固体培地の分解物や菌糸体の自己消化成分等も含まれ、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。これまでに、LEM の生理活性成分に関しては、免疫活性化作用の主成分として見出された水溶性リグニン画分 EP3 についての研究が行われている<sup>25)</sup>。また、LEM から抽出されたリグニン様物質が、強いラジカル消去能およびマクロファージ様細胞株の NO 産生抑制作用を示すことが報告されている<sup>2)</sup>。リグニンは、高等植物の木化に関する高分子フェノール性化合物であり、ヒトにとって生物学的利用性に乏しいが、椎茸など胆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る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であるフェノール性化合物が生じる。LEM においても椎茸菌糸体が固体培地を分解する過程で同様の反応が生じていると考えられ、実際に Itoh ら<sup>26)</sup>は、LEM に多く含まれるリグニン分解物であるシリシン酸およびバニリン酸が、ラジカル性肝障害モデルであるラット四塩化炭素肝障害に対して肝保護作用を示すことを報告している。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、LEM の抗酸化作用の活性成分としては、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現している可能性や、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等が考えられるが、その活性本体については今後検討が必要である。

また、データは示さないが、LEM の単回投与（低酸素負荷 30 分前に LEM 1 g/kg を経口投与）による効果について検討を行った結果、脳梗塞巣体積、脳組織における O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生の減少傾向が見られたものの、明らかな脳保護作用は認められなかった。このことから、LEM 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に誘導された抗酸化酵素活性の上昇などの間接的作用も寄与している可能性が考えられる。今後、LEM の抗酸化活性成分の探索と共に生体内の

抗酸化酵素活性への影響等に関しても調査が必要であると考えられる。

LEM の脳保護作用として、酸化ストレスの軽減のほかに、虚血時の脳血流増加作用、抗炎症作用等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<sup>27)</sup>。椎茸子実体には抗炎症作用<sup>28)</sup>が確認されていることから、LEM 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、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が関与していることから、今後、LEM の脳保護作用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 LEM の持続的な摂取は、低酸素脳虚血における酸化ストレスを軽減し、脳保護作用を示すことが明らかになった。今後、LEM の活性本体のスクリーニングを進めるとともに、LEM 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臨床的有効性を明らかにする必要がある。

## 助成源

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金「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

- 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.
- 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.
- 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.
- Morinaga H, Tazawa K, Tagoh H, et al. An in vivo study of hepatic and splenic interleukin-1 beta mRNA expression follow-

- ing oral PSK or LEM administration. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85(12): 1298–1303.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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<sup>®</sup>) 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.
- 9) 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護効果. *新薬と臨床*. 2001; 50(7): 655–664.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Siesjö BK. Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit Care Med* 1988; 16(10): 954–963.
- 14) Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6(5): 667–672.
- 15) 阿部康二. 脳梗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.
- 16) 島津智一, 古屋大典. 脳保護療法. *Prog Med* 2007; 27: 289–293.
- 17) 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.
- 18) 岡崎真理, 岩田直洋, 堀内重紀ら. マウス低酸素脳虚血障害に対する靈芝菌糸体培養培地抽出物の保護効果. *日本補完代替医療学会誌*. 2008; 5(2): 153–162.
- 19) 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.
- 20) Dayal S, Aming E, Bouligier T, et al. Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke* 2004; 35: 1957–1962.
- 21) 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.
- 22) Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1991; 71(4): 1185–1195.
- 23) Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001; 18(9): 685–716.
- 24) 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.
- 25) Suzuki H, Iiyama K, Yoshida O, et al. Structural characterization of the immunoactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Agric Biol Chem* 1990; 54(2): 479–487.
- 26) Itoh A, Isoda K, Kondoh M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(6): 983–987.
- 27) 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. *日本薬理学雑誌*. 2009; 134: 202–206.
- 28) Yu S, Weaver V, Martin K, et al. The effects of whole mushrooms during inflammation. *BMC Immunol* 2009; 10: 12.

## ABSTRACT

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

Meiyan XUAN<sup>1</sup>, Mari OKAZAKI<sup>1</sup>, Naohiro IWATA<sup>1</sup>, Shinya KAMIUCHI<sup>1</sup>, Fumiko SUZUKI<sup>2</sup>, Hiroshi IIZUKA<sup>2</sup>, Yasuhide HIBINO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Immunobiochemistry, Department of Clinical Dietetics & Human Nutrition,*

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University*

<sup>2</sup> *Noda Shokukinkogyo Co. Ltd.*

**Objective:** *Lentinus edodes* (Shiitake) is a very popular mushroom in Asian cuisine. The water-soluble extract from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM), which is commercially available as a nutritional supplement, is prepared by hot-water treatment from a solid medium composed of bagasse and defatted-rice bran overgrown for about 4 months with its mycelia. LEM was previously reported to have antioxidant activity and to suppress various oxidative damages. In this study, the neuroprotective effects of 2-week intake of LEM on cerebral ischemic damage induced by hypoxia/ischemia (H/I) followed by reoxygenation in mice were examined.

**Method:** Male C57BL/6J mice were divided into three groups, fed for two weeks with the control laboratory powder chow, 0.5% LEM-contained chow, or 1% LEM-contained chow, respectively. Cerebral ischemic damage was induced in the mice by H/I (i.e., unilateral ligation of the carotid artery and exposure of 8%O<sub>2</sub> for 30 min). Twenty-four hours after H/I, total plasma oxidative stress, neurological deficits, cerebral infarction volume were evaluated in each group. Furthermore, the number of apoptotic cells in ischemic penumbra, the hippocampal CA1 and CA2, and the somatosensory area of the cortex, were analyzed by TUNEL staining and cleaved caspase-3 immunostaining.

**Results:** The infarct area assessed 24-h after H/I was extended to the corpus striatum and cortex in the control mice. Treatment of LEM dose dependently improved plasma oxidative stress, neurological deficits, and cerebral infarction volume. Moreover, LEM decreased the levels of dihydroethidium activity as an index of super oxide production and the number of apoptotic cells in ischemic penumbra.

**Conclusion:** These results show that chronic intake of LEM relieves the hypoxia-induced cerebral ischemic injury, which may be attributed to the antioxidant effects of LEM.

**Key words:** Neuroprotection, Water-soluble extract of *Lentinus edodes* mycelia (LEM), Hypoxia-ischemia, Oxidative-stress, Apoptosis