

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

岩田直洋¹, 岡崎真理¹, 笠原知里¹
神内伸也¹, 鈴木史子², 飯塚博²
日比野康英^{*,1}

(2007年6月4日受付; 2007年12月19日受理)

要旨: 糖尿病は体内の酸化ストレスを増大させ、一過性脳虚血による脳障害を増悪させることが報告されている。本研究では、ストレプトゾトシン糖尿病態 (DM) ラットを用い、一過性脳虚血処置による脳障害に対する霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER) の効果を検討した。正常血糖 (non-DM) および DM ラットに、WER (1 g/kg) または蒸留水を1日1回2週間経口投与した後、体内の酸化ストレス度、脳組織中の過酸化脂質含量および抗酸化酵素活性を測定した。また、ラットに中大脳動脈閉塞/再灌流 (MCAO/Re) 処置を行い、神経症状の評価および脳梗塞巣体積の測定を行った。その結果、DM ラットでは体内の酸化ストレス度の上昇、脳組織中の過酸化脂質含量の増加および抗酸化酵素活性の低下がみられた。WER を投与した DM ラットでは、これらの値が正常レベルに維持されていた。さらに、DM ラットでは、non-DM 群と比較し、MCAO/Re 後の神経症状の悪化および脳梗塞巣体積の顕著な増大が認められたが、WER の投与により、脳障害の増悪がほぼ完全に抑制された。以上の結果から、WER は糖尿病における酸化ストレス状態を改善し、一過性脳虚血に対して強い脳保護効果を示すことが明らかになった。

キーワード: 霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER), 一過性脳虚血, ストレプトゾトシン糖尿病態ラット, 酸化ストレス, 中大脳動脈閉塞/再灌流 (MCAO/Re)

生活習慣病の一つである脳血管関連疾患は、その患者数が年々増加し、現在、わが国におけるおもな死亡原因の第三位を占めるに至っている。神経細胞は虚血に対してきわめて脆弱であり、一過性の脳虚血によっても神経細胞死が引き起こされることが知られている¹⁾。また、虚血後の再灌流時に発生する活性酸素種 (ROS) や活性酸化窒素種 (RNOS) などによる酸化ストレスが引き金となり、神経細胞にアポトーシスが誘導されるという知見がある²⁾。一方、近年大きな社会問題となっている糖尿病は、虚血性心疾患や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の危険因子であり、その血管傷害メカニズムに高血糖状態によって引き起こされる酸化ストレスの増大が関与することが示唆されている³⁾。糖尿病患者が脳梗塞を併発した場合、障害が増悪することが知られており⁴⁾、酸化ストレスが病態悪化の一因であると推察されるが、その詳細はいまだ明らかではない。

霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER) は、霊芝 (マンネンタケ) 菌糸体をバガスおよび米糠の混合固形培地に接種し、一定期間培養後、子実体発生直前に培地とともに

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。WER の生理活性については、これまでに免疫賦活作用⁵⁾、血糖上昇抑制作用⁶⁾ 等が確認されているが、WER の糖尿病態における酸化ストレスや、一過性脳虚血誘発脳障害に対する予防・改善効果については明らかでない。

そこで本研究では、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病態ラットを用い、体内の酸化ストレス度や抗酸化力、脳組織中の過酸化脂質含量、および脳内抗酸化酵素 (スーパーオキシドジスムターゼ: SOD およびカタラーゼ: CAT) 活性に対して、WER の長期経口投与が及ぼす効果について検討した。さらに、糖尿病において生じた虚血性脳疾患に対して WER が保護効果を示すか否かについて、中大脳動脈閉塞/再灌流 (MCAO/Re) 処置を施した一過性脳虚血モデルを用いて検討した。

実験方法

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

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: seitaib@josai.ac.jp)

¹ 城西大学薬学部医療栄養学科生体防衛学講座 (350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1)

² 野田食菌工業株式会社 (278-0051 千葉県野田市七光台 295)

「MAK」を WER として使用した。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4カ月間培養後、子実体発生直前に培地ごとと破碎し、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、濾液の凍結乾燥品を WER 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」および城西大学生命科学研究センターの「動物実験に関するガイドライン」に従って行った。Sprague-Dawley 系雄性ラット（4週齢、東京実験動物（株））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））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、ラットに STZ（和光純薬工業（株）、60 mg/kg）を腹腔内投与し、1週間後の血糖値が 300 mg/dL 以上の個体をさらに4週間飼育し、糖尿病態（DM）ラットとして実験に用いた。STZ は 50 mM クエン酸緩衝液（pH 4.5）に用時溶解し使用した。また、同様に、クエン酸緩衝液のみを投与し、同様に飼育したものを正常血糖（non-DM）ラットとした。

上記の non-DM および DM ラットに、WER（1 g/kg）および対照として蒸留水を1日1回、2週間、胃ゾンデを用いて経口投与した4群を用いて実験を行った。

3. 生体内の酸化ストレス度および抗酸化力の測定

酸化ストレス度の測定は、d-ROMs（Reactive Oxygen Metabolites）テストキット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⁷⁾。2週間の経口投与処置終了時に、ラットの尾静脈から得られた 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）にて測定した。抗酸化力測定は、BAP（Biological Antioxidant Potential）テストキットを用いて行った。三価鉄イオン試薬に呈色液を 50 μL 加えて混和し、血漿を 10 μL 加えて二価鉄に還元される作用を F.R.E.E. にて測定した。2種類のキットおよび F.R.E.E. は Diacron International（Grosseto, Italy）より代理店（Wismer-ll）を通じて購入した。

4. 脳組織中の過酸化脂質含量の測定

脳組織中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⁸⁾⁹⁾。2週間の経口投与終了後、ラットの脳を摘出し、皮質、線条体+海馬、小脳、および脳幹の4部位に分画し、それぞれの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を含む 1.15% 塩化カリウム溶液を加え、ホモジナイザーで粉碎した。プロテアーゼインヒビターは 1 $\mu\text{g/mL}$ Pepstatin A, 1 $\mu\text{g/mL}$ Leupeptin, 10 mM

phenylmethanesulfonyl fluoride（以上、和光純薬工業（株））、1 $\mu\text{L/mL}$ Trasylol（Bayer Medical）を用いた。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% ブチルヒドロキシトルエン（BHT）酢酸溶液、1.5 mL の 0.8% 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid（Sigma Aldrich）、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（株））と pyridine（和光純薬工業（株））の混合物（15:1（v/v））を 5.0 mL 加えて十分混和し、3,000 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（ $\mu\text{mol/mg protein}$ ）は、 $(A - A_0) / 156,000 \times (5.8 / 10^3) \times (10^2 / 3) \times 10^6$ の計算式から算出した。それぞれの組織のタンパク質含量は Lowry 法により測定した。

5. 総グルタチオン量の測定

脳組織中の総グルタチオン（GSH）量の測定は、Total Glutathione Quantification Kit（（株）同仁化学研究所）を用いて測定した。脳を4部位に分画後、脳湿重量を測定し、湿重量 100 g に対して 0.5 mL の 5% スルホサリチル酸を加え、ホモジナイザーで粉碎した。粉碎後、8,000 rpm、 4°C 、10 分間遠心し、上清を測定試料として用いた。測定試料の総グルタチオン量は、GSH 標準溶液の発色 10 分後による pseudo-end point method によって作成した検量線から求め、 $\mu\text{mol/L}$ で表した。

6. 抗酸化酵素活性の測定

6.1 SOD 活性の測定 脳組織中の SOD 活性は、SOD Assay Kit-WST（（株）同仁化学研究所）を用いて測定した。各脳部位の湿重量に対して4倍量のスクロース緩衝液（0.25 mol/L スクロース、10 mmol/L トリス塩酸緩衝液（pH 7.4）、1 mmol/L EDTA）を加え、ホモジナイザーで粉碎した。粉碎後、78,000 rpm、 4°C 、60 分間遠心し、上清を測定試料として用いた。測定試料の SOD 活性を検量線から算出し、unit/mg protein で表した。

6.2 CAT 活性の測定 脳組織中の CAT 活性は、過酸化水素（ H_2O_2 ）の減少から算出した⁹⁾¹⁰⁾。10%（w/v）の脳組織ホモジネート 60 μL を 1.94 mL の 0.05 M リン酸緩衝液（pH 7.0）に混和し、1.0 mL の 0.059 M 過酸化水素を添加した。その直後から4分間の吸光度（240 nm : A_{240} ）の変化を10秒ごとに測定した。最初の1分間の測定値を用いて減少勾配を求め、unit/mg protein = $(A_{240} / \text{min} \cdot 1,000) / (43.6 \text{ mg enzyme/mL reaction mixture})$ より CAT 活性を算出した。

7. 中大脳動脈閉塞脳虚血モデルの作製

中大脳動脈の閉塞（MCAO）は、Nakada *et al.*¹¹⁾ の

方法に従って行った。ラットをハロタン（武田薬品工業（株））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，右総頸動脈から内頸動脈分岐部を露出し，総頸動脈と外頸動脈，さらに内頸動脈の翼口蓋枝を結紮した。先端を丸くした4-0外科用ナイロン糸製の塞栓糸を右総頸動脈から内頸動脈を経て中大脳動脈起始部まで挿入し，血管を閉塞した。切開部を縫合した後，ヒーティングパッドと赤外線ランプによって，ラットの体温を37°Cに保温した。MCAO処置から120分後，ラットを再度ハロタン麻酔し，塞栓糸をゆっくりと引き抜き，血液を再灌流（Re）させた。その後，切開部を縫合し，餌および水が自由に摂取できる環境で24時間飼育した。また，擬似手術処置（Sham operation）群には，塞栓子を挿入しない以外はすべてMCAO/Reと同じ処置を行った。

8. 神経症状スコアの測定

MCAO処置から120分および再灌流24時間後に，以下の評価基準に基づき，神経症状をスコア化した¹²⁻¹⁴⁾。

0：障害のない状態

1：前足に握力の低下などがみられる状態

2：尾懸垂時に自発的な回転運動がみられる軽度障害

3：自発的な回転運動がみられる中度障害

4：自発的な行動ができず，かつ意識の低下がみられる高度障害

5：死亡

9. 脳梗塞巣体積の測定

神経症状スコアを測定した後，ラットをジエチルエーテル麻酔下，断頭し，摘出した脳組織を，ステンレス製ブレインマトリックスを用いて，2 mm厚に薄切し，脳切片を作成した。梗塞巣体積を評価するために2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, 和光純薬工業(株))を含むPBS (pH 7.4) 中で脳切片を37°C, 15分間インキュベートした。TTC染色した切片を4% paraformaldehyde (和光純薬工業(株))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。白色部分を脳梗塞領域とし，画像解析ソフト (Scion Image 1.62) を用いて各切片の吻側および尾側の両面の梗塞面積を計測し，平均の梗塞面積と切片厚2 mmを用いて体積を算出した。各切片の体積を合計し，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 の式から梗塞巣体積を評価した¹²⁻¹⁴⁾。

10. 統計処理

データは，平均値±標準偏差として表示し，二元配置分散分析後，Tukeyの多重比較により解析した。検定における有意水準は5%とした。

結 果

1. ラットの体重および血糖値に対する WER の効果

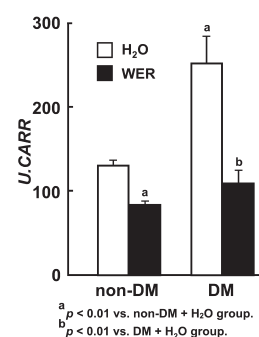
STZ投与後5週間のラット (DM) の体重は，緩衝

表 1 WER 投与がラットの体重および血糖値に与える影響

	Body weight (g)	Blood glucose (mg/dL)
non-DM	406.3±29.3	139.9±17.8
non-DM+WER	406.9±37.0	141.9±24.3
DM	254.4±71.4 ^a	726.3±88.1 ^a
DM+WER	306.0±29.3 ^a	561.7±108.9 ^{a,b}

^a $p < 0.01$ vs non-DM group. ^b $p < 0.01$ vs DM group. ($n = 10$).

(A) d-ROMs test



(B) BAP test

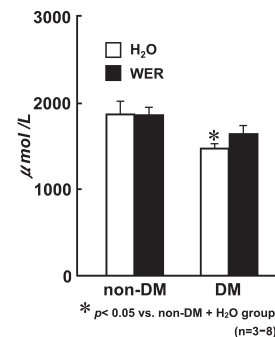


図 1 糖尿病態ラットの体内酸化ストレス度および抗酸化力に対する WER の効果

non-DM および DM ラットに，蒸留水 (H₂O) または WER (1 g/kg) をそれぞれ 1 日 1 回，2 週間経口投与し，尾静脈血を採取した。血漿中の酸化ストレス度 (A) および抗酸化力 (B) をそれぞれ d-ROMs テスト，BAP テストにより評価した。データは平均値±標準偏差で表した ($n = 3-8$)。統計的有意差は，二元配置分散分析後，Tukey の多重比較により解析し， $p < 0.05$ を有意差とした。実験の詳細は，実験方法の項に記した。

液のみを投与した正常血糖ラット (non-DM) と比較して有意に減少し，また，血糖値は上昇した (表 1)。WER (1 g/kg) を 1 日 1 回，2 週間経口投与した DM ラット群 (DM+WER) では，蒸留水を投与した群 (DM) と比べ，高血糖の改善が認められた。WER の投与により，non-DM の体重および血糖値に変化は認められなかった。

2. 糖尿病態ラットの体内酸化ストレス度，抗酸化力に対する WER の効果

蒸留水または WER を投与した non-DM および DM ラット各群において，d-ROMs テストを用い，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測定した (図 1A)。その結果，蒸留水を投与した DM 群の酸化ストレス度 (DM, 252.8±32.9 U.CARR) は，non-DM 蒸留水投与群 (non-DM, 131.0±7.0 U.CARR) の約 2 倍にまで有意に増加していた。これに対して，WER を 2 週間経口投与した DM 群 (DM+

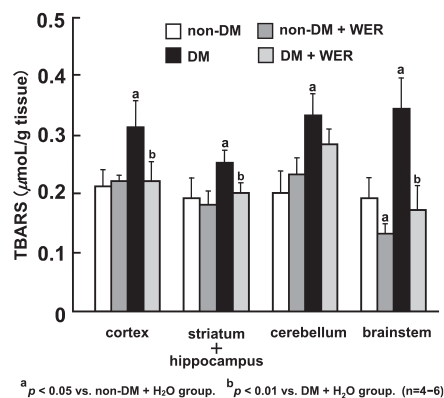


図 2 糖尿病態ラットの脳組織中の過酸化脂質含量に対する WER の効果

non-DM および DM ラットに、蒸留水 (H₂O) または WER (1 g/kg) をそれぞれ 1 日 1 回、2 週間経口投与した後、脳組織を摘出した。脳組織を皮質 (cortex)、線条体+海馬 (striatum+hippocampus)、小脳 (cerebellum)、および脳幹 (brainstem) の 4 部位に分画し、過酸化脂質含量を測定した ($n=4-6$)。実験の詳細は、実験方法の項に記した。

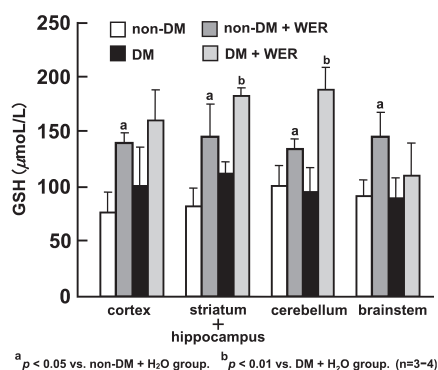


図 3 糖尿病態ラットの脳組織中の GSH 含量に対する WER の効果

図 2 と同様にして得られた脳組織を皮質 (cortex)、線条体+海馬 (striatum+hippocampus)、小脳 (cerebellum)、および脳幹 (brainstem) の 4 部位に分画し、GSH 含量を測定した ($n=3-4$)。実験の詳細は、実験方法の項に記した。

WER, 109.3 ± 15.1 U.CARR) は、non-DM 群と同レベルにまで酸化ストレス度の増加が抑制されていた。WER を投与した non-DM 群 (non-DM + WER) においても有意な体内酸化ストレス度の低下が認められた。さらに、BAP テストにより測定した抗酸化力は、non-DM 群 ($1,875.4 \pm 156.1$) と比較し、DM 群 ($1,475.7 \pm 67.1$) で有意に低下していた。一方、DM + WER 群 ($1,649.0 \pm 101.2$) の抗酸化力は、non-DM 群との間に有意な差は認められなかった (図 1B)。

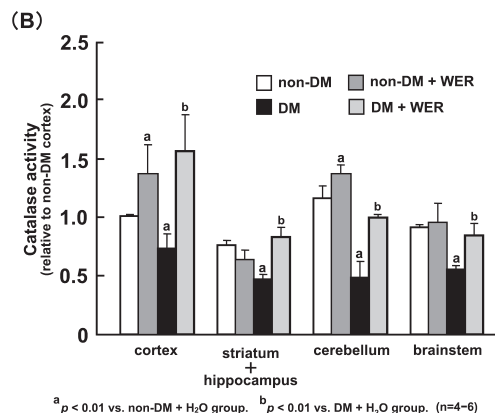
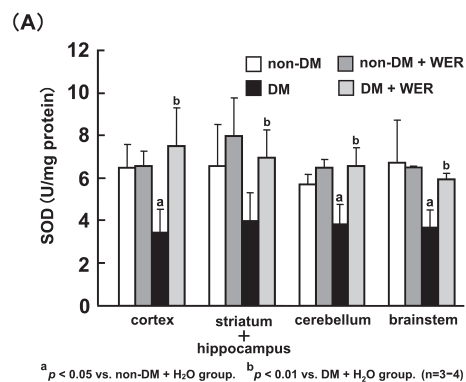


図 4 糖尿病態ラットの脳組織中の抗酸化酵素活性に対する WER の効果

図 2 と同様にして得られた脳組織を皮質 (cortex)、線条体+海馬 (striatum+hippocampus)、小脳 (cerebellum)、および脳幹 (brainstem) の 4 部位に分画し、SOD 活性 (A) および CAT 活性 (B) を測定した ($n=3-6$)。実験の詳細は、実験方法の項に記した。

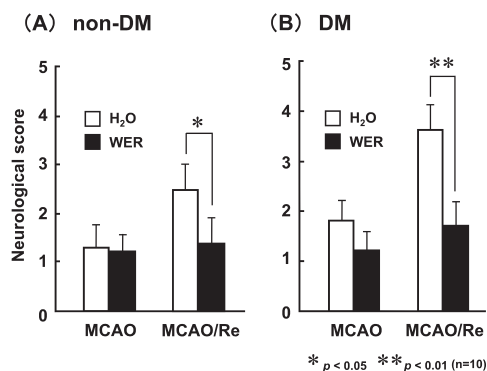


図 5 MCAO/Re 処置ラットの神経症状に対する WER の効果

non-DM (A) および DM ラット (B) に、蒸留水 (H₂O) または WER (1 g/kg) をそれぞれ 1 日 1 回、2 週間経口投与した後、MCAO/Re 処置を行った。MCAO 処置後 2 時間および再灌流後 24 時間における神経症状を 6 段階でスコア化し評価した ($n=3-10$)。実験の詳細は、実験方法の項に記した。

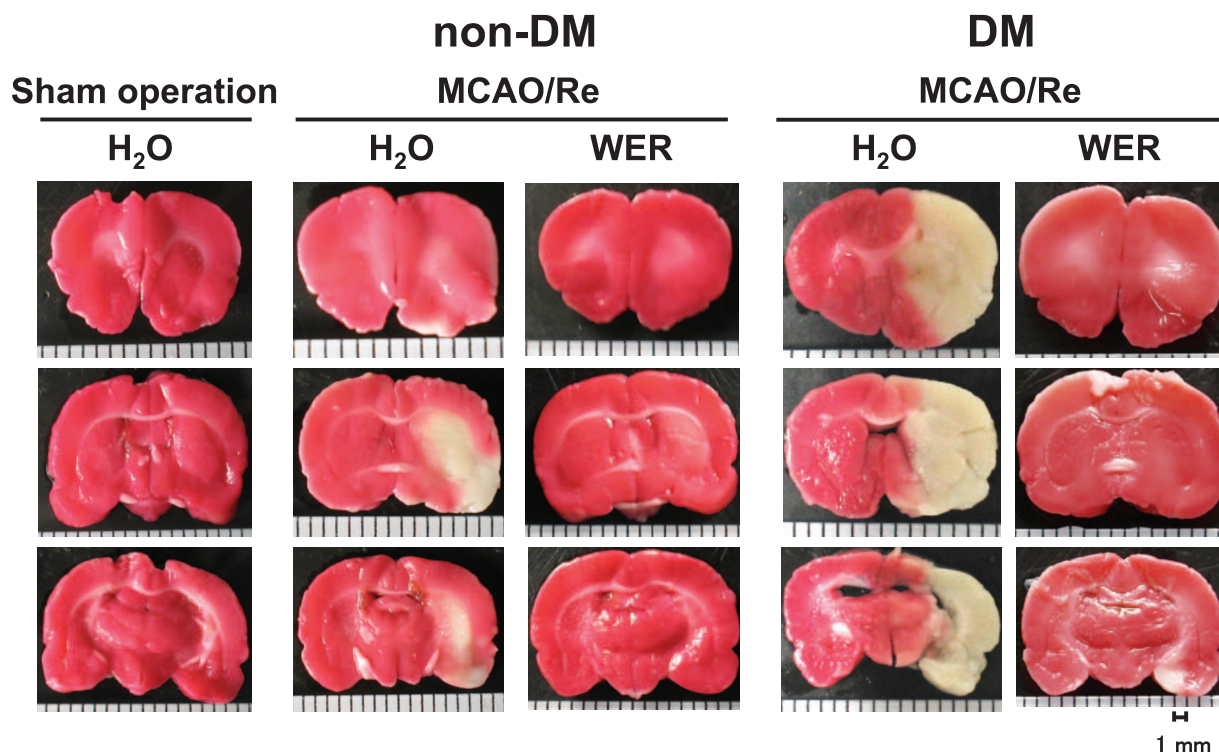


図 6 糖尿病態ラットにおける MCAO/Re 誘発脳梗塞に対する WER の効果

non-DM および DM ラットに、蒸留水 (H₂O) または WER (1 g/kg) をそれぞれ 1 日 1 回、2 週間経口投与した後、MCAO/Re 処置を行った。MCAO/Re 処置の 24 時間後に脳組織を摘出し、TTC 染色を行った。実験の詳細は、実験方法の項に記した。

3. 脳組織中の過酸化脂質および GSH 含量に対する WER の効果

DM 群の脳組織の過酸化脂質含量は、non-DM 群と比べ、分画したすべての脳部位において 1.3 から 2 倍程度に有意に増加していた (図 2)。DM+WER 群では、DM 群と比較し、皮質、線条体+海馬、および脳幹で有意に過酸化脂質含量が低下し、小脳においても低下傾向がみられた。正常血糖群間の比較では、WER 投与群の脳幹において有意な過酸化脂質含量の低下が認められた。一方、脳組織における GSH 含量 (図 3) については、WER は non-DM 群のすべての脳部位において GSH 含量を有意に増加させた。糖尿病による GSH 含量への影響は認められなかった。

4. 脳組織中の抗酸化酵素活性に対する WER の効果

脳組織中の SOD 活性 (図 4A) および CAT 活性 (図 4B) については、DM 群のすべての脳部位において有意な低下が認められた。これらの結果から、糖尿病態の脳組織では、抗酸化酵素の活性低下によって抗酸化能が減弱しており、酸化ストレスが増大していることが示唆された。DM+WER 群では酵素活性の低下が完全に抑制されており、non-DM 群と差は認められなかった。

5. 一過性脳虚血に対する WER の脳保護効果

MCAO 処置から 2 時間後の non-DM 蒸留水投与群の神経症状スコアは 1.3 ± 0.48 であった (図 5A)。WER

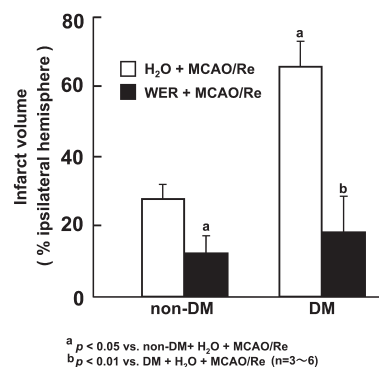


図 7 MCAO/Re により誘発された脳梗塞巣体積に対する WER の効果

non-DM および DM ラットに、蒸留水 (H₂O) または WER (1 g/kg) をそれぞれ 1 日 1 回、2 週間経口投与した後、MCAO/Re 処置を行った。MCAO/Re 処置の 24 時間後に脳組織を摘出し、TTC 染色を行った。得られた画像データから脳梗塞巣体積を算出した ($n=3-6$)。実験の詳細は、実験方法の項に記した。

を投与した non-DM 群のスコアは 1.2 ± 0.38 であり、蒸留水投与群との間に有意差はみられなかった。non-DM 蒸留水投与群の再灌流処置 24 時間後のスコアは 2.5 ± 0.53 と約 2 倍に増大し、再灌流処置による神経症状の悪化が認められた。これに対し、WER を投与した non-

DM 群の再灌流処置後のスコアは 1.4 ± 0.52 であり、再灌流による症状の悪化が抑えられた。一方、蒸留水を投与した DM 群のスコアは 1.7 ± 0.52 であり non-DM 群 (1.3 ± 0.48) と比較し約 1.3 倍であった (図 5B)。さらに、DM 蒸留水投与群における再灌流後のスコアは 3.8 ± 0.67 となり、著しい神経症状の増悪が認められた。この結果から、DM ラットにおいて、一過性脳虚血による障害の度合いが non-DM ラットに比べ増大することが確認された。WER を投与した DM 群の再灌流後のスコアは 1.7 ± 0.50 であり、神経症状の改善が認められた。データは示していないが、WER 投与群の MCAO/Re の前後における体温は蒸留水投与群と差がなかった。

次に、MCAO/Re 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 6, 7)。擬似手術のみを行ったラットの脳には梗塞は確認されなかったが、蒸留水を投与した non-DM 群では、線条体および皮質に梗塞巣が認められた (梗塞巣体積 $27.8 \pm 4.2\%$)。これに対し WER 投与群においては、梗塞巣の有意な減少が認められた ($12.5 \pm 4.9\%$)。このことから、WER は一過性脳虚血による梗塞に対する改善効果を有することが明らかになった。蒸留水を投与した DM 群では、視床や皮質全体に及ぶ著しい梗塞巣の増大が確認され ($65.6 \pm 7.5\%$)、non-DM 群と比較して約 2.4 倍に増加していた。これに対し、WER を投与した DM 群においては、皮質および視床の一部分にのみ梗塞が生じており、梗塞巣の著しい減少が認められた。

考 察

糖尿病における持続的高血糖状態は、体内の酸化ストレスを増大させ、血管を傷害し、動脈硬化から脳梗塞を誘発する危険因子である¹⁵⁻¹⁷⁾。本研究結果より、糖尿病態において、体内の酸化ストレスの増大および抗酸化力の低下、さらに脳組織中の過酸化脂質含量が増加すること、抗酸化酵素の活性が顕著に低下することが明らかとなった。また、DM ラットに一過性脳虚血処置を行った場合、脳障害の著しい増悪が認められた。一方、WER の経口投与は、これら DM ラットにおける酸化ストレスの増大や脳障害に対して著しい改善・抑制効果を示した。これらのことから、WER の長期摂取は糖尿病態における脳内の酸化ストレスを軽減し、一過性脳虚血に対する脳保護効果をあらわす可能性が示された。

スーパーオキシドアニオン (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) などの活性酸素種 (ROS) は、DNA の損傷や脂質の過酸化、タンパク質の変性などを誘導し、生体にとって有害な反応を引き起こす。これら ROS は、糖尿病をはじめとした多くの疾患に関与するとの報告があり³⁴⁾、疾病予防やその改善効果を目的とした酸化ストレスの軽減に注目が集まっている。ROS によってもたらされる種々の毒性に対して、生体内では SOD, CAT, グルタチオンペルオキシ

ダーゼといった抗酸化酵素などの内因性の ROS 除去機構の存在が知られている一方、抗酸化食品の摂取による外因性の ROS 除去も酸化ストレスの軽減に重要であると考えられている⁷⁻¹⁰⁾。WER 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有しており、生理活性として、これまでに免疫調節作用⁵⁾や抗腫瘍作用¹⁸⁾¹⁹⁾などが報告されている。当研究室においても、マウスにおける糖負荷後の血糖上昇抑制作用⁶⁾を明らかにしている。また、*in vitro* における抗酸化作用評価実験から、WER が O_2^- 消去能、ラジカル捕捉能およびビタミン C と同等かそれ以上の過酸化脂質生成抑制作用を有することを明らかにしており (未発表データ)、*in vivo* においても酸化ストレスに対する保護効果を示す可能性が想定されたことから、本実験を計画した。

d-ROMs による結果から、WER の長期投与により、STZ 誘発糖尿病態モデルラットの体内で増大した酸化ストレスが有意に低下することが明らかになった。また、WER には高血糖の改善効果も認められたが、その機序としては、食後過血糖抑制作用に加え、フリーラジカルの除去や過酸化脂質産生抑制による膵臓ランゲルハンス島 β 細胞や肝臓・腎臓などの保護作用など¹⁰⁾²⁰⁾が考えられるが、その詳細は不明である。さらに、脳組織において、過酸化脂質量の増大、SOD および CAT 活性の低下が認められた。これまでに、糖尿病態では血中のビタミン C やビタミン E などの減少によって生体内の抗酸化力が低下し、 O_2^- や H_2O_2 が産生誘導されることによってタンパク質の非酵素的糖化修飾が増加することが報告されている²¹⁾²²⁾。また、糖化反応に伴って ROS が産生されることも知られていることから、糖尿病態での SOD や CAT 活性の低下は、 O_2^- や H_2O_2 などの ROS 産生増大に起因していると考えられる。これまでに、赤ワイン¹⁰⁾やルチン²⁰⁾、熱帯性薬用植物である *Scoparia dulcis* のエキス²³⁾などによって STZ 誘発糖尿病態ラットにおける抗酸化酵素活性低下が抑制されたとの報告がある。今回の WER の効果について、マンネンタケ由来のテルペン類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揮している可能性があるが、その活性本体については今後検討が必要である。

ラットに MCAO/Re 処置を行った結果、閉塞時より再灌流時に著しい神経症状スコアの上昇が認められたことから、再灌流処置が神経症状悪化に深く関与していることが示唆された。今回用いた MCAO/Re による脳障害は、ヒトの臨床でみられる中大脳動脈の局所閉塞症状に類似していることが知られている²⁴⁾。一過性脳虚血による脳障害は、おもに虚血の持続時間および脳血流の減少に依存しているが²⁵⁾²⁶⁾、酸化ストレスもまた障害に大きく関与していることが知られており、特に虚血後の再

灌流はフリーラジカルを発生させ、アポトーシスやネクロシスによる神経細胞死を引き起こす¹⁾²⁾。現在、世界初の脳保護薬として用いられている edaravone は、脳虚血カスケードや再灌流時の複数のステップで効果を発揮するラジカル消去薬である²⁷⁾。脳組織は酸化ストレスによる影響が大きい、その理由として、脳の酸素消費量が全体の20%を占め、ROSの発生しやすい臓器であるとともに、多価不飽和脂肪酸が非常に豊富な組織で、ROSによるダメージに著しく感受性が高いことがあげられる²⁸⁾²⁹⁾。また、抗酸化酵素の存在量が少ないこと、 H_2O_2 から $\cdot OH$ 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なども原因となっている²⁹⁾。今回の MCAO/Re の実験結果では、non-DM ラットと比較し DM ラットにおいて神経症状の顕著な増悪が生じたが、高血糖状態においては、虚血時および再灌流時の ROS 産生が亢進することが報告されており³⁰⁾、糖尿病態における酸化ストレスの増大および再灌流時に産生される ROS が脳障害の悪化に大きく寄与していると考えられる。WER の経口投与は、DM ラットにおいて増悪した再灌流後の神経症状を著しく改善し、さらにこの改善効果は、梗塞画像や梗塞体積から得られた結果とも一致していた。以上の結果より、WER は、糖尿病態における酸化ストレスを低下させ、一過性脳虚血障害に対する強い脳保護作用を示すことが明らかになった。

近年の海馬および皮質における caspase-3 の活性や TUNEL 染色などの実験結果から、糖尿病態における神経細胞死にアポトーシスが関与していることが明らかとなっている³¹⁾³²⁾。しかしながら、糖尿病態とアポトーシスとの関連についての詳細は未だ解明されていない。また、いくつかの研究において、マンネンタケの抽出物が培養マクロファージにおける iNOS 発現の抑制作用³³⁾や、抗炎症作用³⁴⁾、神経保護作用³⁵⁾を有することが報告されているものの、WER の活性成分や作用機序は未だ明らかではない。したがって、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 の作用メカニズムについても解明する必要があると考えられる。今後、糖尿病態における一過性脳虚血誘発神経細胞死および食品・食品成分の神経細胞保護作用の詳細なメカニズムを解析することにより、疾患の一次予防に対する食品・食品成分の有効性を明らかにしたいと考えている。

本研究を実施するにあたり、MCAO の実験手技をご指導いただいた富山化学工業株式会社 中田恭史博士ならびに中川昌也博士に深く感謝する。また、本研究は文部科学省科学研究費補助金「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) および「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。

文 献

- 1) Siesjö BK (1988) Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit Care Med* **16**: 954-63.
- 2) Choi DW (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* **6**: 667-72.
- 3) Baynes JW (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**: 405-12.
- 4) Vinik A, Flemmer M (2002) Diabetes and macrovascular disease. *J Diabetes Complicat* **16**: 235-45.
- 5) 中川育也, 日比野康英, 大橋康宏, 菅野延彦(1999) 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* **13**: 513-5.
- 6) 白井達洋, 岡崎真理, 神内伸也, 鈴木史子, 飯塚博, 日比野康英 (2007) 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* **60**, 249-55.
- 7) Cornelli U, Terranova R, Luca S, Cornelli M, Alberti A (2001) 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* **131**: 3208-11.
- 8) Shah ZA, Gilani RA, Sharma P, Vohora SB (2005) Cerebroprotective effect of Korean ginseng tea against global and focal models of ischemia in rats. *J Ethnopharmacol* **101**: 299-307.
- 9) Tirkey N, Kaur G, Vij G, Chopra K (2005) Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys. *BMC Pharmacol* **5**: 15.
- 10) Montilla P, Barcos M, Munoz MC, Bujalance I, Munoz-Castaneda JR, Tuncz I (2005) Red wine prevents brain oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Biol* **30**: 539-44.
- 11) Nakada Y, Yokoyama O, Komatsu K, Komada K, Yotsuyanagi S, Niikura S, Nagasaka Y, Namiki M (2000) Effects of aniracetam on bladder overactivity in rats with cerebral infarction. *J Pharmacol Exp Ther* **293**: 921-8.
- 12) Kaundal RK, Shah KK, Sharma SS (2006) Neuroprotective effects of NU1025, a PARP inhibitor in cerebral ischemia are mediated through reduction in NAD depletion and DNA fragmentation. *Life Sci* **79**: 2293-302.
- 13) Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**: 84-91.
- 14) Kusaka I, Kusaka G, Zhou C, Ishikawa M, Nanda A, Granger DN, Zhang JH, Tang J (2004) Role of AT1 receptors and NAD(P)H oxidase in diabetes-aggravated ischemic brain injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**: 2442-51.
- 15) 柏木厚典, 山岸昌一 (2004) 食後高血糖と酸化ストレス. *血管医学* **5**, 509-14.
- 16) 山岸昌一, 今泉 勉 (2003) 糖尿病と血管新生. *Thrombosis and Circulation* **11**: 227-32.
- 17) 渡辺琢夫, 山本靖彦, 櫻井 繁, 竹内正義, 米倉秀

- 人, 山本 博 (2002) 高血糖による細胞内酸化ストレス増強機序. *Diabetes Frontier* **13**: 164-8.
- 18) Lu H, Kyo E, Uesaka T, Katoh O, Watanabe H (2003) A water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia suppresses azoxymethane-induction of colon cancers in male F344 rats. *Oncol Rep* **10**: 375-9.
- 19) Kubo N, Myojin Y, Shimamoto F, Kashimoto N, Kyo E, Kamiya K, Watanabe H (2005) Protective effects of a water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia and *Agaricus blazei murill* against X-irradiation in B6C3F1 mice: increased small intestinal crypt survival and prolongation of average time to animal death. *Int J Mol Med* **15**: 401-6.
- 20) Kamalakkannan N, Stanely Mainzen Prince P (2006) Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem* **293**: 211-9.
- 21) 田港朝彦 (2000) 糖尿病, 酸化ストレス, 抗酸化ビタミン. *臨床栄養* **97**, 578.
- 22) Kennedy L, Baynes JW (1984) Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia* **26**: 93-8.
- 23) Pari L, Latha M (2004) Protective role of *Scoparia dulcis* plant extract on brain antioxidant status and lipidperoxidation in STZ diabetic male Wistar rats. *BMC Complement Altern Med* **4**: 16.
- 24) Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M (1976) Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke* **7**: 46-53.
- 25) Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjö BK (1992) Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res* **89**: 67-78.
- 26) Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981) Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **1**: 53-60.
- 27) 渡辺俊明, 田中正彦, 渡邊和俊, 高松康雄, 戸部昭広 (2004) 脳保護剤 (フリーラジカル消去剤) エダラボンの研究開発. *YAKUGAKU ZASSHI* **124**: 99-111.
- 28) Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC (1991) Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* **71**: 1185-95.
- 29) Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* **18**: 685-716.
- 30) Li PA, Liu GJ, He QP, Floyd RA, Siesjö BK (1999) Production of hydroxyl free radical by brain tissues in hyperglycemic rats subjected to transient forebrain ischemia. *Free Radic Biol Med* **27**: 1033-40.
- 31) Rizk NN, Rafols J, Dunbar JC (2006) Cerebral ischemia-induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats: Effects of insulin and C-peptide. *Brain Res* **1096**: 204-12.
- 32) Li ZG, Britton M, Sima AA, Dunbar JC (2004) Diabetes enhances apoptosis induced by cerebral ischemia. *Life Sci* **76**: 249-62.
- 33) Woo CW, Man RY, Siow YL, Choy PC, Wan EW, Lau CS, O K (2005) *Ganoderma lucidum* inhibits inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Mol Cell Biochem* **275**: 165-71.
- 34) Akihisa T, Nakamura Y, Tagata M, Tokuda H, Yasukawa K, Uchiyama E, Suzuki T, Kimura Y (2007) Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chem Biodivers* **4**: 224-31.
- 35) Zhao HB, Lin SQ, Liu JH, Lin ZB (2004) Polysaccharide extract isolated from *Ganoderma lucidum* protects rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury. *J Pharmacol Sci* **95**: 294-8.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **61** : 119-127 (2008)

Original Paper

Protective Effects of a Water-soluble Extract from Culture Medium of *Ganoderma lucidum* Mycelia against Neuronal Damage after Cerebral Ischemia/Reperfusion in Diabetic Rats

Naohiro Iwata,¹ Mari Okazaki,¹ Chisato Kasahara,¹ Shinya Kamiuchi,¹
Fumiko Suzuki,² Hiroshi Iizuka,² and Yasuhide Hibino^{*,1}

(Received June 4, 2007 ; Accepted December 19, 2007)

Summary : Diabetes mellitus (DM) has been shown to enhance oxidative stress, leading to aggravation of cerebral ischemic injury following stroke. In this study, we examined the effects of daily administration of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia (WER) on total plasma oxidative stress, antioxidant capacity and activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in the brain of rats with streptozotocin (STZ)-induced diabetes. We also investigated whether WER ameliorates the exacerbation of neuronal damage induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by reperfusion in a diabetic state. Male SD rats were treated with STZ (60 mg/kg, i.p.) and housed for 5 weeks for induction of an experimental diabetic state. WER (1 g/kg) was then administered orally for an additional 2 weeks. DM rats had increased oxidative stress and decreased plasma antioxidant capacity in comparison with non-DM rats. Furthermore, the activity of antioxidant enzymes was decreased in the DM rat brain. DM rats treated with WER showed normal levels of all these parameters. The diabetic state markedly aggravated MCAO/reperfusion-induced neurological deficits and cerebral injury assessed by infarct volume. Treatment with WER markedly improved both of these parameters in diabetic rats. These results show that daily intake of WER relieves the exacerbation of cerebral ischemic injury in a diabetic state, and that this may be attributable to amelioration of augmented oxidative stress.

Key words : *Ganoderma lucidum*, diabetic mellitus, middle cerebral artery occlusion, oxidative stress

* Corresponding author (E-mail: seitaib@josai.ac.jp)

¹ Department of Clinical Dietetics and Human Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

² Noda Shokukinkogyo Co. Ltd., 295 Nanakohdai, Noda, Chiba 278-0051, Japan