

## SHRSP の脳卒中に対するシイタケ-フラクトオリゴ糖 混合物 (SK-204) の作用

大塚 正道<sup>a</sup>, 篠塚 和正<sup>\*b</sup>, 平田 五一<sup>a</sup>, 国友 勝<sup>b</sup>

<sup>a</sup>滋賀県製薬株式会社中央研究所, <sup>b</sup>武庫川女子大学薬学部薬理学講座

### Effect of Shiitake (*Lentinus edodes*)-Fructo-oligosaccharide Mixture (SK-204) on Cerebral Stroke in SHRSP

MASAMICHI OTSUKA,<sup>a</sup> KAZUMASA SHINOZUKA,<sup>\*b</sup> GOICHI HIRATA<sup>a</sup> and  
MASARU KUNITOMO<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Central Research Institute, Shigaken Pharmaceutical Industries Co. Ltd., 879 Taki, Koga-cho,  
Koga-gun, Shiga 520-34, Japan

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's  
University, 11-68, Koshien Kyuban-cho, Nishinomiya, Hyogo 663, Japan

(Received November 5, 1996)

The effect of a mixture (SK-204) of wet-heated dried shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) and fructo-oligosaccharide (7:3) on the stroke was studied by assaying its effect on the platelet and fibrinogen levels in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). Administration of SK-204 for 10 weeks suppressed the bleeding and significantly inhibited the decreasing of platelet, which were observed in the control SHRSP rats. These results suggested that SK-204 may suppress or cure of early stage of and mild incidence of stroke, because the number of platelet may be useful for preventing the development of stroke before the onset of its clinical symptoms.

**Keywords**—Shiitake (*Lentinus edodes*); stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP); number of platelet; preventive effect

シイタケ (*Lentinus edodes*) は本草綱目に、「気を益し、飢えず、風を治し、血を破る。」(呉瑞)<sup>1)</sup>との記載があり、古来から健康維持に寄与するといわれている。近年に至り、シイタケには抗腫瘍、抗ウイルス、抗コレステロールなどの薬理活性物質、さらに食物繊維や種々の栄養素、ミネラル、酵素などが含まれていることが報告されている<sup>2,3)</sup>。我々もこれまでに、干しシイタケを主成分とする SK-204 (湿熱処理干しシイタケとフラクトオリゴ糖の混合物) の薬理作用について検討し、血圧上昇抑制作用、脳出血抑制作用<sup>4)</sup>および高脂血症改善作用<sup>5)</sup>など循環器系疾患に有効な作用を有することを明らかにした。さらに、前報<sup>6)</sup>において、ラットの乳酸誘発肺血栓に対し予防効果を示すことも報告している。このようなことから、SK-204は脳卒中に対しても予防作用を有することが推察される。脳卒中は脳血管障害の総称で、脳出血、クモ膜下出血および脳梗塞などを含む<sup>7)</sup>。本邦における脳血管障害の発症件数は多く、今後高齢化が進むことを考えあわせると、より適確な予防、治療法および臨床検査法の早急な確立が望まれる。

そこで今回は、脳卒中に対する SK-204の予防効果の有無を明らかにする目的で、病理学的にヒトと極めて類似しているとされる脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (Stroke-

Prone Spontaneously Hypertensive Rat; SHRSP)<sup>8)</sup>を用いて、主として血小板など血液凝固系因子に対する影響について検討した。

#### 実験材料および方法

##### 1. 供試飼料

シイタケの中毒疹<sup>9)</sup>を予防するために干しシイタケ (大分県杵築市 (株) オーエスケイ製) を高圧蒸気滅菌器で湿熱処理し、乾燥した後、粉碎および篩過して、シイタケ粉碎物を得た。本粉碎物とフラクトオリゴ糖を7:3の割合で混合してSK-204を製した。このような混合物とすることによって賦形剤を添加することなく乾式造粒法による顆粒化が可能であり、かつ飛散性、かさ密度および湿潤性などが改善され、物性的向上がみられた。本SK-204を10%の割合でSP飼料粉末 (船橋農場) に加えたものをSK飼料とした。また対照飼料としては、SK-204に多く含まれる繊維様成分の影響を考慮して、セルロース粉末 (ナカライテスク) を10%の割合でSP飼料粉末に混合したものを用いた。

##### 2. 実験動物および飼育

3週齢の雄性 SHRSP (SHRSP/Izm, SHR 等疾患モデル共同研究会) 12匹および Wistar Kyoto Rat (WKY/

TABLE I. Effects of SK-204 on Changes in Blood Pressure and Body Weight

Group (Diet)	Breeding periods with control and SK-diet (weeks)							
	(Age)	0 (4)	1 (5)	3 (7)	5 (9)	7 (11)	9 (13)	10 (14)
Blood pressure (mmHg)								
WKY (Control diet)		85±2	106±1	117±1	128±1	131±1	135±2	136±1
SHRSP (Control diet)		83±3	131±2 <sup>a</sup>	175±4 <sup>a</sup>	214±3 <sup>a</sup>	229±2 <sup>a</sup>	238±3 <sup>a</sup>	251±5 <sup>a</sup>
SHRSP (SK diet)		84±2	131±2 <sup>a</sup>	170±2 <sup>a</sup>	206±3 <sup>ab</sup>	223±2 <sup>ab</sup>	243±5 <sup>a</sup>	249±4 <sup>a</sup>
Body weight (g)								
WKY (Control diet)		80±2	114±2	175±5	272±5	279±5	293±5	309±5
SHRSP (Control diet)		76±2	116±4	187±5	252±4	271±5	285±5	294±7
SHRSP (SK diet)		75±1	114±2	187±5	247±5	265±6	286±8	290±9

Control diet: 10% cellulose, SK diet: 10% SK-204, Age: weeks old.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  from each value of WKY, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  from each value of control diet SHRSP.Mean±S.E.,  $n=6$ .

Izm, SHR 等疾患モデル共同研究会, WKY) 6 匹を入手し, ラボMR ストック粉末 (ニッチク薬品工業) で 1 週間の予備飼育を行った. 4 週齢に達した SHRSP を血圧および体重の平均値が各群間でほぼ等しくなるように 1 群 6 匹ずつ 2 群に組分けし, その後 10 週間にわたって対照飼料 (対照群) および SK 飼料 (SK 群) を自由に摂取させた. なお, WKY 6 匹も 10 週間にわたって対照飼料を自由摂取させた (WKY 群). 飼育環境は温度  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度  $60 \pm 10\%$ , 明暗は 12 時間周期 (明: 7~19 時) とし, 3 匹毎の群飼育を行い, 各群とも飲水は 1% 食塩水を自由摂取させた. これらのラットは毎日体重を測定するとともに症状, 特に脳卒中の指標とされる攻撃性や過敏性の亢進など神経症状<sup>10)</sup>を毎日観察, 記録した. また, 神経症状を発現したラットについては個別ケージによる飼育に切り替えた. なお, 本実験の計画および実施にあたっては総理府告示「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(1980) に従って行った.

### 3. 血圧測定

ラットを  $35^\circ\text{C}$  の加温箱中で 15 分間加温した後, ホルダーに固定し室温下でカフパルスセンサー (ラット, マウス用非観血式血圧測定装置 MK-1000, 室町機械) を用いて尾動脈収縮期血圧を測定した. 測定は 10 時~15 時の間に実施し, 安静状態時の血圧を 3 回測定してその平均値を血圧値 (mmHg) とした.

### 4. 採血および血液検査

被験飼料 (対照飼料および SK 飼料) の摂取期間 (10 週間) 終了後, ネンプタール麻酔下 ( $40 \text{ mg/kg}$ , i.p.) で腹部大動脈より血液を採取し, 前報<sup>6)</sup>と同様の方法で検査を実施した.

### 5. 臓器重量の測定および脳の病理的観察

採血後, 大脳から小脳および延髄部まで含めた脳, 心臓

および左右両腎臓を摘出し, 氷冷した生理食塩液で洗浄後, 湿重量を測定し, 体重との相対重量 (mg/g) を求めた. 脳は湿重量を測定後, 外観を観察し直ちに 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド液 (ナカライテスク) に浸漬, 固定した. 固定後, 大脳頂葉の乳頭体の位置を中心として前後に等間隔に 5 分割し, 各分割横断面を実体顕微鏡 ( $\times 30$ ) を用いて, 脳卒中病変 (脳出血, 脳軟化) の有無を観察した.

### 6. 統計処理

体重, 血圧および血液検査値は平均値±標準誤差で示し, 各群間の有意差検定は ANOVA-test (Bonferroni) にて行った. また, ラット各群の異常行動, 異常神経症状の亢進および脳出血, 脳軟化の発症状況については, 各群の全被験ラット数に対する症状の亢進ラットまたは脳出血, 脳軟化ラット数の比 (症状の亢進ラット数/全ラット数, 脳出血および脳軟化ラット数/全ラット数) で示し, 有意差検定は Fisher の直接確率計算法<sup>11)</sup>によった.

なお, 両検定とも 5% 未満の危険率の場合を有意差ありと判定した.

## 結 果

### 1. 摂食量, 体重および血圧

1 個体当りの全実験期間中における飼料摂取量は 3 群ともほぼ等しく (WKY 群: 1,113 g, 対照群: 1,143 g, SK 群: 1,092 g), また各群の体重平均値も 3 群間に有意の差は認められなかった (TABLE I). 実験開始時の血圧平均値は 3 群間に有意の差は認められなかった. しかし, 被験飼料および食塩水摂取 1 週以後 (5 週齢) には SHRSP の血圧は 2 群とも WKY 群に比べて有意に上昇していた. また, SK 群の血圧は対照群に比べて, 被験飼料摂取 5 週 (9 週齢) から 7 週 (11 週齢) の期間中, その差は極めて小さ

TABLE II. Effects of SK-204 on Platelet Number, Prothrombin Time and Fibrinogen Level

Group (Diet)	Platelet ( $\times 10,000/\text{mm}^3$ )	Prothrombin time (s)	Fibrinogen (mg/dl)
WKY (Control diet)	60.7 $\pm$ 1.9	13.7 $\pm$ 0.4	197 $\pm$ 20
SHRSP (Control diet)	22.9 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	13.3 $\pm$ 0.4	188 $\pm$ 11
SHRSP (SK diet)	31.0 $\pm$ 3.2 <sup>ab</sup>	13.1 $\pm$ 0.5	187 $\pm$ 12

Control diet: 10% cellulose, SK diet: 10% SK-204.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  from each value of WKY, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  from each value of control diet SHRSP.Mean $\pm$ S.E.,  $n = 6$ .

いものの有意に低い値を示した (TABLE I).

## 2. 脳, 心臓および腎臓重量

実験終了時における脳および腎臓の相対重量は3群の間で有意差は認められなかったが, 心臓についてはSHRSPの2群はWKY群に比べて有意な増加を示した. なお, SK群と対照群との間には有意な差は認められなかった.

## 3. 血液検査結果

実験終了時において, SHRSPの2群の血小板数はWKY群に対して有意に減少していた. しかし, SK群における血小板数の減少は対照群に比べ軽度であった. また, プロトロンビン時間およびフィブリノーゲン値については3群の間に有意差はみられなかった (TABLE II).

## 4. ラットの行動および症状

対照群は被験飼料摂取第10週後半において, 立毛, 攻撃性, 過敏性, 自発運動の抑制, 歩行時の傾斜等の症状, 行動異常が約半数の個体に観察されたがSK群には殆ど観察されなかった (TABLE III).

## 5. ラット脳の肉眼的, 病理的所見

脳剖検時およびホルマリン固定脳の外観観察では, 3群とも大きな異常は認められなかった. さらに, 脳の分割横断面を実体顕微鏡によって観察した結果, 対照群において脳出血に由来すると考えられる著明な痕跡が6例中2例に

認められ, 他の4例に軽度な痕跡が観察された. また, SK群には6例中2例に軽度な痕跡が認められたが, WKY群にはそのような痕跡は観察されなかった. なお, 3群のいずれのラットにおいても脳軟化は確認されなかった (TABLE III).

## 考察および結論

我々は, すでにSK-204の乳酸誘発肺血栓に対する作用をラットを用いて検討し, 10%SK-204の長期投与により肺血栓形成が抑制されることを報告した<sup>6)</sup>. SK-204にこのような薬理作用が認められたため, さらに脳出血と脳梗塞が両方発症する脳卒中モデルラットSHRSPを用いて, 脳卒中に対するSK-204の作用を検討した.

本実験においては, 対照群(SHRSP)の血小板数はWKY群に比べ40%以下に激減したがプロトロンビン時間およびフィブリノーゲン値は, WKY群とほぼ同等値であった. SHRSPの基本病変は脳動脈, 特に穿通枝動脈の壊死であり, これが破綻すれば脳出血となるか, 血栓を伴って脳梗塞を発症するといわれている<sup>8)</sup>. 本実験の対照群ラットにおいては, 脳出血の程度が軽度の個体が多いことから, 激減した多量の血小板は脳出血に伴う一次止血の他, 病理的に明確に観察されなかった一次血栓 (血小板血栓) の形成, すなわち, 血管壁の損傷に伴って消費された可能性が推定される. また, 軟化巣が明確に認められなかった要因として, 形成血栓が微細であり, 形成範囲も広範ではなかったため, 著しい循環不全に至らず, 脳梗塞, 脳軟化が顕著に形成されなかったのではないかと推察される. なお, 病理標本においては重篤な出血, 脳浮腫に伴う脳重量の増加も観察されず, さらに実験終了時における体重減少や神経的異常症状なども他の報告<sup>10)</sup>と比較して軽度であったことを考えあわせると対照群の脳卒中の程度は軽症と評価される. また, 血液凝固系因子については有意な低下が認められなかった. すなわち, 血小板血栓の生成 (第一相) のみで凝固カスケードの活性化 (第二相) は認められず, 本対照

TABLE III. Effects of SK-204 on Behavior and Intracerebral Bleeding

Group (Diet)	Behavior			Pathological observation		
	Abnormal <sup>1</sup>	Normal	Ratio <sup>3</sup>	Abnormal <sup>2</sup>	Normal	Ratio <sup>3</sup>
WKY (Control diet)	0	6	0/6	0	6	0/6
SHRSP (Control diet)	4	2	4/6 <sup>a</sup>	6	0	6/6 <sup>a</sup>
SHRSP (SK diet)	0	6	0/6 <sup>b</sup>	2	6	2/6 <sup>b</sup>

Control diet: 10% cellulose, SK-diet: 10% SK-204.

<sup>1</sup> Number of aggressive and/or nervous rats.<sup>2</sup> Number of rats that observed intracerebral bleeding.<sup>3</sup> Number of abnormal rats/number of tested rats.<sup>a</sup>  $p < 0.05$  from each value of WKY, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  from each value of control diet of SHRSP.

Fisher's exact method.

群に発症した脳卒中は発症初期のものと考えられる。

一方、SK群は脳内に軽度の出血の痕跡が6例中2例にみられたのみであり、血小板数は対照群より有意に多かった。この理由としては、1) SK-204が骨髓幹細胞から血小板への分化/増殖に対し促進的に作用する可能性が考えられ、また2) SK-204が血小板凝集能に対し抑制的に作用する可能性も考えられる。実際、干しシイタケ水抽出液中には guanosine-5'-monophosphate またはその類似物が存在し、血小板凝集を特異的に抑制するということが報告されている<sup>12)</sup>。さらに、3) SHRSPの脳出血・脳梗塞の原因が脳動脈特に穿通枝動脈の壊死・破綻であること<sup>8)</sup>を考え併せると、SK-204の作用機作として脳動脈壊死に対する抑制作用も考えられ、結果的に血小板の消費が抑制されるという可能性も推察される。

高血圧のSHRSPは血圧を下げることにより、脳循環血流量が正常に回復し、脳卒中の発症率が低下するといわれている<sup>13)</sup>。実際に、SK-204には降圧作用のあることが報告されており<sup>4)</sup>、本実験においても、弱いながらも有意な降圧効果を観察している。ところで、SK-204の構成成分であるフラクトオリゴ糖は、ヒトの血圧を低下させ、多量摂取でラットの体重や血清中トリグリセライド量を低下することが報告されている<sup>14, 15)</sup>。本実験におけるフラクトオリゴ糖の投与量は少なく、またフラクトオリゴ糖が消化吸収されにくい糖であることも報告<sup>16)</sup>されているが、SK-204の作用にフラクトオリゴ糖が寄与するという可能性も否定できない。さらに、特定のタンパク質、アミノ酸、ミネラルなどが、降圧作用を示さない程度の投与量で脳卒中の予防効果を示すことが報告されているが<sup>17)</sup>、このような物質がシイタケ中にも存在することが認められている<sup>2, 3)</sup>。従って、SK-204の有効成分の解析は今後検討すべき重要な課題であると思われる。

以上の結果を総合的に考察すると、SK-204は軽症の脳卒中に対し抑制（予防）作用を有することが示唆された。本実験の脳卒中は発症初期の段階と考えられるが、血中血小板数の減少が顕著であることから、脳卒中の早期診断に血中血小板数の臨床検査が有用であると考えられる。実際に Okuma ら<sup>18)</sup>は SHRSP において血小板の消費が増加し、その寿命が短縮していることを見だし、血小板が脳卒中の発症の予知・診断に有用である可能性を示唆している。

また最近、Tomita ら<sup>19)</sup>及び Ikeda ら<sup>20)</sup>は SHRSP の血小板機能に変化していることを報告している。

近年、脳卒中は軽症化しているとの報告<sup>21)</sup>があるが、SK-204はこのような軽症脳卒中に対し有効であるかもしれない。また脳卒中の早期診断に血中血小板数もしくは機能の臨床検査が有用との示唆は有意義であると考えられる。

## 引用文献

- 1) 木村康一, “新註校訂国譯本草綱目 第8冊”, 春陽堂書店, 東京, 1975, p. 191.
- 2) 水野 卓, “キノコの化学・生化学”, 水野 卓, 川合正允, 学会出版センター, 東京, 1992, p. 229.
- 3) 細谷憲政 (監修), “最新食品標準成分表”, 調理栄養教育公社, 東京, 1987, p. 189.
- 4) 大塚正道, 久保孝夫, 日本栄養・食糧学会誌, **48**, 109 (1995).
- 5) 大塚正道, 久保孝夫, 日本栄養・食糧学会誌, **48**, 225 (1995).
- 6) 大塚正道, 篠塚和正, 平田五一, 国友 勝, 薬誌, **116**, 169 (1996).
- 7) 栗山良紘, “からだの科学 増刊 脳卒中”, 尾前照雄編, 日本評論社, 東京, 1994, p. 2.
- 8) 家森幸男, “疾患モデル動物”, 木村修一, 家森幸男編, 建帛社, 東京, 1994, p. 75.
- 9) 立花隆夫, 日本病院薬剤師会雑誌, **28**, 1161 (1992).
- 10) 高橋昌哉, B. Fritz-Zieroth, 山口基徳, 小川 博, 田中友世, 笹川祐成, 筑後孝章, 太田善夫, 岡本耕造, 日薬理誌, **100**, 21 (1992).
- 11) 立川 清, “治療効果の統計的判定”, 図書刊行会, 東京, 1979, p. 124.
- 12) 早川道彦, 葛谷文男, 日本老年医学会雑誌, **22**, 151 (1985).
- 13) 家森幸男, “脳血管と心血管”, 勝沼英字, 折茂 肇編, 共立出版社, 東京, 1989, p. 59.
- 14) 奥 恒行, 日本栄養学雑誌, **44**, 291 (1986).
- 15) 秦 苒哉, 原 勉, 及川孝光, 山本 実, 広瀬信義, 長島勉, 島浜慶嗣, 中島久美子, 渡辺 昭, 山下光夫, 老年医学, **21**, 156 (1983).
- 16) 奥 恒行, “転移糖と栄養”, 細谷憲政, 福場博保編, 第一出版, 東京, 1984, p. 110.
- 17) 家森幸男, 奈良安雄, 池田克己, 菅井隆二, 村上梅司, 日本栄養・食糧学会誌, **48**, 307 (1995).
- 18) M. Okuma, Y. Yamori, *Stroke*, **7** (1), 60 (1976).
- 19) T. Tomita, M. Ikeda, Y. Inoue, T. Mitsubori, K. Umegaki, *Hypertension*, **14** (3), 304 (1989).
- 20) M. Ikeda, K. Umegaki, N. Takeshita, M. Mitsubori, T. Tomita, I. Tomita, *Thrombosis Res.*, **56** (3), 441 (1989).
- 21) 藤島正敏, 山口武典, 福内靖男, 早川 徹, 脳と循環, **1**, 14 (1996).