

マイタケのフリーラジカル消去作用および プレ動物実験による有用性の検討

樋口行人・尾崎正若*

Maitake (*Grifora frondosa*) quenched DPPH, superoxide anion and hydroxyl radical by electron spin resonance analysis and was administered to a rat as the pre-experiment

by

Yukito HIGUCHI and Masayori OZAKI*

1. 緒言

マイタケ (*Grifora frondosa*) はサルノコシカケ科マイタケ属に属し、ブナ・ミズナラの根元や枯幹上に発生する美味なキノコである。これを見つけると舞って喜んだことからマイタケと名づけられたとの説もある。各種食用キノコ類には、フリーラジカル消去作用が確認されている¹⁾が、マイタケに関する研究は歴史が浅く、マイタケのフリーラジカル消去作用に関する報告は学術誌では未だない。フリーラジカルとは、分子または原子の最外殻電子軌道に不対電子をもつ不安定な物質を総称したもので、発癌、動脈硬化、炎症、老化等を引き起こす原因の一つとされている。我々は以前に柿渋より分離したカキタンニン²⁻⁴⁾や漢方方剤の黄連解毒湯^{5,6)}および七物降下湯⁷⁾を脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) に投与した結果、血圧上昇を抑制しえないにもかかわらず、脳卒中の発症を抑制し、有意な延命効果を示したことを報告した。この効果の作用機序として、各種タンニンや生薬の強力なフリーラジカル消去作用が示唆されている。今回、マイタケの健康食品としての有用性について、フリーラジカル消去作用の面から検討するとともに、プレ動物投与実験による飲水量および体重の変化を観察したので報告する。

*長崎大学名誉教授 (前長崎大学医学部薬理学第二教室)

2. 方法

2・1 試料および試薬

マイタケ粉末は株式会社フルヤキノコ園（美祢）より提供された乾燥粒を、ミキサーを用いて粉末とした。1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, St Louis, MO, USA)、5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性

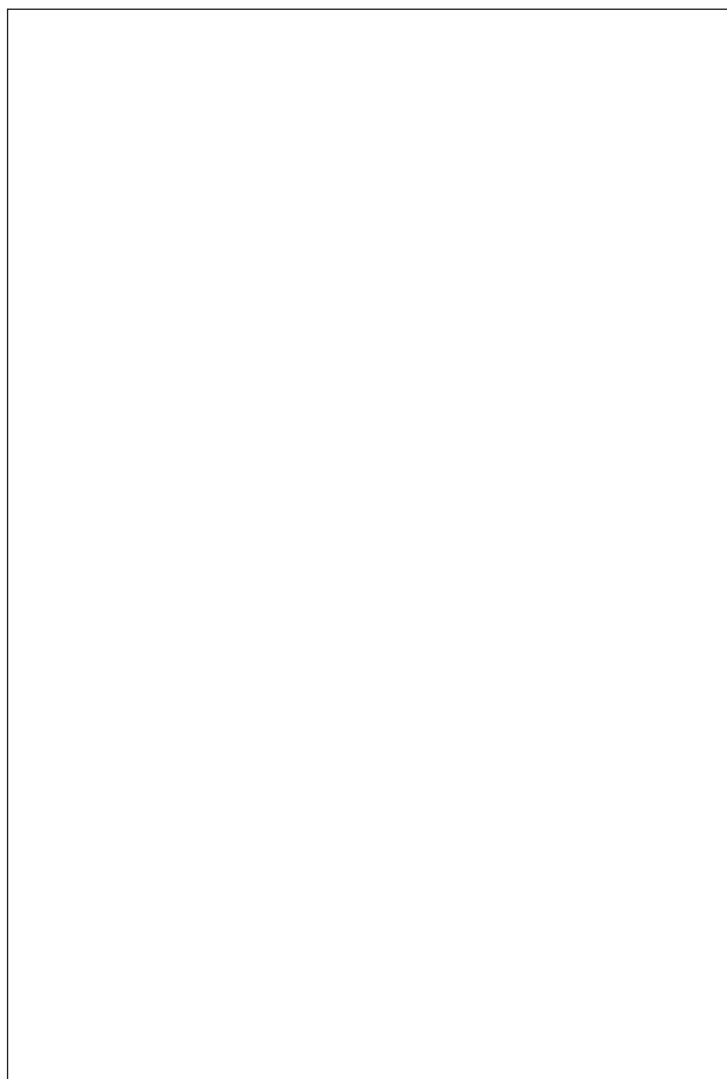


図1 Superoxide anion ラジカルの電子スピン共鳴 (ESR) スペクトル (対照)
* Mn^{2+} ピーク

測定用キット (LM-9303) (以上ラボテック、東京) を用いた。

2・2 実験方法

In vitro における DPPH ラジカル、superoxide anion ラジカルおよび hydroxyl ラジカルに対するマイタケ粉末の作用の測定は、劉と森⁸⁾ および河合ら⁹⁾ の行った方法に従い電子スピンの共鳴 (ESR) 装置 (JES-FEIXG, 日本電子、東京) を用いたスピントラップ法により行った。スピントラップ剤には DMPO を用いた。すなわち superoxide anion ラジカルおよ

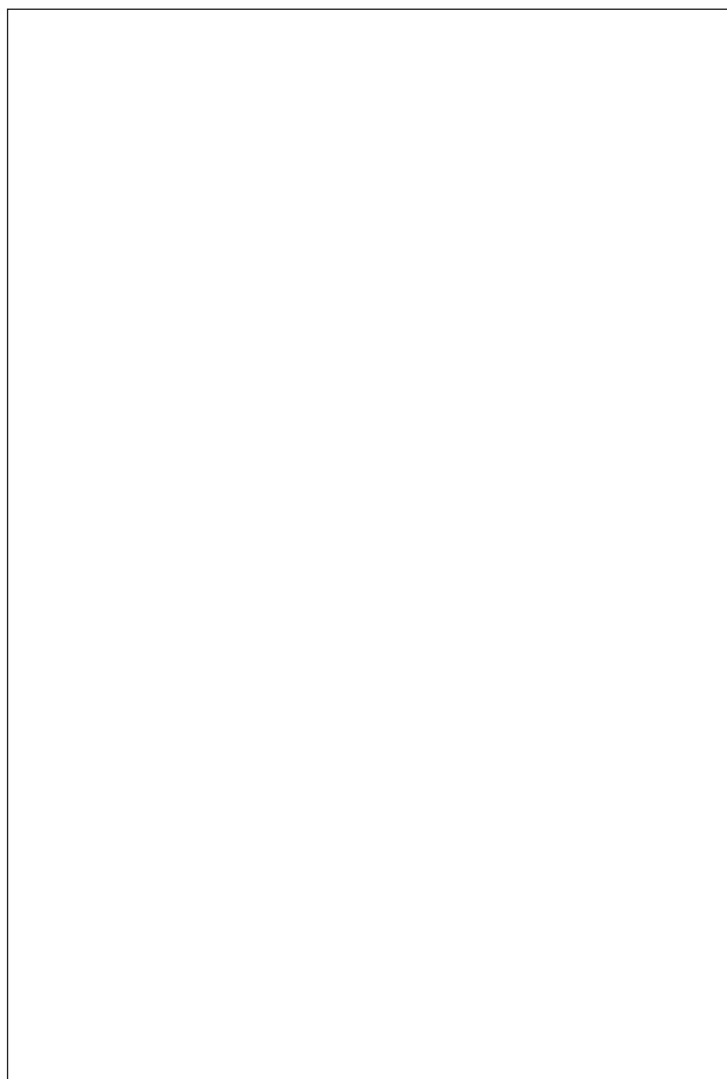


図2 マイタケ粉末最終濃度 1 mg/ml 添加時の superoxide anion ラジカルの電子スピン共鳴 (ESR) スペクトル
* Mn^{2+} ピーク

び hydroxyl ラジカルは DMPO で捕捉し、それぞれ DMPO-OOH、DMPO-OH シグナルを得た (図 1)。フリーラジカル産生系は superoxide anion ラジカル産生にヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (XOD) 系、hydroxyl ラジカル産生に Fenton 反応を用いた。

DPPH ラジカルでは、50 μ M DPPH ethanol 溶液 100 μ l にマイタケ粉末溶液 100 μ l を加え攪拌し、60 秒後に掃引を開始した。superoxide anion ラジカルでは SOD 活性測定用キットを使用した。16mM ヒポキサンチン 50 μ l、14M DMSO 30 μ l にマイタケ粉末溶液 50 μ l、4.28M DMPO 20 μ l、0.4units/ml XOD 50 μ l を加え攪拌した。XOD 添加 60 秒後に掃引を開始した。hydroxyl ラジカルでは 1mM FeSO₄、1mM DTPA を 75 μ l、マイタケ粉末溶液 50 μ l、9.2M DMPO 20 μ l、1mM H₂O₂ 75 μ l を加え攪拌した。H₂O₂ 添加 60 秒後に掃引を開始した。ESR 装置は磁場：335.6 \pm 5mT、マイクロ波出力：8.0mW、磁場変調周波数：100kHz、応答時間：0.1 秒、温度：室温、測定感度：2.5 \times 10² (DPPH)、2.0 \times 10³ (superoxide anion ラジカルおよび hydroxyl ラジカル)、掃引時間：1 分の条件で使用した。マイタケの作用はマイタケ粉末各濃度での各ラジカルのスピン濃度で表した。スピン濃度の算出はマイタケと同一条件で、スピン濃度既知の安定ラジカルである 10⁻⁵M 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (4-amino-TEMPO, Sigma) の測定を行い、Mn²⁺ピークを内部指標とした面積値から近似的に強度を比較して算出した。測定は連続 5 回行い平均値で表した。また、蒸留水を用いた場合のスピン濃度を 50% 消去するマイタケ粉末濃度を 50% 抑制値 (IC₅₀) として表した。

ブレ動物実験は、Wistar 系ラット 2 匹を対照例とマイタケ粉末投与例に分け、投与例には 4 週齢より 1mg/ml、7 週齢より 2 mg/ml のマイタケ粉末水溶液を飲料水として自由摂取させ、9 週齢まで観察した。水溶液は沈殿が生じないように回転子付給水瓶にて絶えず攪拌しながら投与した。マイタケ粉末摂取量は毎日、24 時間の水溶液の減少量を測定して求めた。体重は毎週 1 回測定した。飼育条件は明暗 12 時間周期、室温 23 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 55 \pm 5% で行った。飼料は SP 用飼料 (船橋農場, 船橋) を自由摂取させた。

3. 結果

3・1 In vitro におけるフリーラジカル消去作用

マイタケ粉末は 100 μ M の DPPH ラジカル (33.1 \times 10¹⁵ spins/ml) (最終濃度、以下すべて最終濃度) を濃度依存的に消去した。50% 消去する濃度 IC₅₀ は 0.60mg/ml であった。また、ヒポキサンチン-XOD 系において産生された superoxide anion ラジカル (43.5 \times 10¹⁵ spins/ml) を濃度依存的に消去した。IC₅₀ は 0.86mg/ml であった。また、Fenton 反応により産生された hydroxyl ラジカル (24.0 \times 10¹⁶ spins/ml) を濃度依存的に消去した。IC₅₀ は 0.70mg/ml

表 1 DPPH ラジカル、superoxide anion ラジカルおよび hydroxyl ラジカルへのマイタケ粉末の効果

最終濃度 (mg/ml)	DPPH spin adducts ($\times 10^{15}$ spins/ml)	DMPO-OOH spin adducts ($\times 10^{15}$ spins/ml)	DMPO-OH spin adducts ($\times 10^{16}$ spins/ml)
0	33.1	43.5	24.0
0.25	30.6	41.6	20.5
0.50	17.9	29.8	17.9
1.00	8.8	20.2	5.8
2.00	—	13.1	—
IC ₅₀ (mg/ml)	0.60	0.86	0.70

スピン濃度の算出はすべて連続 5 回測定し、平均値で表した。

であった (表 1)。図 1 に対照 DMPO-OOH シグナル、図 2 にマイタケ粉末濃度 1mg/ml の DMPO-OOH シグナルを示す。

3・2 プレ動物実験

対照例とマイタケ粉末投与例 2 匹に、飲水量、体重に明らかな差は認められなかった。観察終了時の体重は、対照例 305.6g (増加分 268.4g)、マイタケ粉末投与例 319.4g (増加分 274.6g) であった。飲水量の平均は、対照例 49.6ml/day、マイタケ粉末投与例 57.7ml/day であった。マイタケ粉末投与例の観察期間中平均マイタケ粉末摂取量は、0.42g/kg/day であった。

4. 考察

In vitro における ESR 装置を用いた実験からマイタケ粉末のフリーラジカル消去作用が確認された。マイタケ粉末は DPPH ラジカル、superoxide anion ラジカルおよび hydroxyl ラジカルの 3 種のラジカルすべてを濃度依存的に消去した。我々が酸素を消費する生命体である以上、通常大気中にある酸素は生体内で電子還元され、superoxide anion ラジカルとなる。これはさらに反応性に富む hydroxyl ラジカルの生成を促し、生体内脂質過酸化を開始するとされている¹⁰⁻¹²⁾。近年、スピントラップ剤 DMPO の開発により反応性の高い superoxide anion ラジカルおよび hydroxyl ラジカルが ESR 法により検出できるようになり、シイタケ (*Lentinus edodes*) から他の食用キノコでは、フリーラジカル消去作用が報告されている¹⁾。以前に我々は、七物降下湯の SHRSP における脳卒中予防効果はフリーラジカル消去作用に起因する可能性を報告した⁷⁾。発癌、動脈硬化、炎症、老化等の様々な疾患にフリーラジカルが関与すると考えられており、フリーラジカル消去作用がある食品を摂取することが、疾患発症予防に有効であると考えられる。

機能的食品としてのキノコの研究は盛んで、シイタケのエリタデニン^{13,14)}等生理活性物質が明らかになっているものも多いが、マイタケは動物実験において、血圧降下作用および血漿コ

レステロール低下作用^{15,16)}、耐糖能改善作用¹⁷⁾が報告されているものの、これらの生理活性物質は未だ明確でない。体重増加抑制作用も報告されており¹⁷⁾、ある実験系では、正常ラットよりも体重が減少する疾患モデルラットでさらに体重が減少するとされ（私信）、機能的健康食品としてはやや疑問な面もある。今回の実験では、マイタケのフリーラジカル消去作用が諸疾患の予防、改善の一端を担っている可能性に加え、例数の少ないプレ実験ではあるが、水道水に代えてマイタケ粉末水溶液を与えても、飲水量、体重ともに減少しないことを明らかにした。本実験の自由摂取によるマイタケ粉末摂取量 0.42g/kg/day は、ラットの代謝回転の面からも、また我々の既報^{7,18)}の実験と比しても常識的な値であり、このことはマイタケの機能的健康食品としての有用性を示唆している。今後、様々な実験系への応用が考えられ、生理活性物質も明らかになるであろう。Nishina らは PC12 細胞培養実験からマイタケの神経活性化作用、さらにその生理活性物質はリゾホスファチジルエタノラミン (lysophosphatidylethanolamine) であり、作用機序は MAP キナーゼカスケードの活性化であると報告している¹⁹⁾。近年、フリーラジカル消去作用をもつ食品成分の代表例であるポリフェノールでも、動物投与実験により抗酸化酵素の発現が高まるとの報告²⁰⁾があり、マイタケにおいてもフリーラジカル消去作用そのものだけでなく、遺伝子発現レベルへの影響も考えられるため今後詳細な検討を行いたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門の森昭胤教授および同部門の方々に実験実施にあたって様々なご指導をいただいた。ここに記し感謝の意を表します。

文献

- 1) 平松 緑、枝松 礼、河野雅弘、森 昭胤：食用キノコの活性酸素消去作用。ESR とフリーラジカル，西川弘恭、吉川敏一編，pp155-159，日本医学館，東京（1989）
- 2) Uchida S, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Nonaka G, Nishioka I, Niwa M and Ozaki M: Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. *Med Sci Res* 15, 831-832 (1987)
- 3) Uchida S, Ohta H, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Nonaka G, Nishioka I, Niwa M, Akashi T and Ozaki M: Active oxygen free radicals are scavenged by condensed tannins. In *Plant flavonoids in Biology and Medicine II*, Edited by Cody V, Middleton E Jr, Harborne J B and Beretz A, pp135-138, Alan R Liss Inc, New York (1988)
- 4) Uchida S, Ohta H, Niwa M, Mori A, Nonaka G, Nishioka I and Ozaki M: Prolongation of life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) ingesting persimmon tannin. *Chem Pharm Bull* 38, 1049-1052 (1990)
- 5) Ozaki M, Ohta H, Uchida S, Yamashita K and Sekine I: Effects of Oren-gedoku-to (TJ-15),

- Choto-san (TJ-47) and Zokumei-to (TJ-8007) on blood pressure and hypertensive lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. In *Recent Advances in the Pharmacology of KAMPO (JAPANESE HERBAL) MEDICINES*, Edited by Hosoya E and Yamamura Y, pp219-226, Excerpta Medica, Auckland (1987)
- 6) 内田真嗣、太田 尚、丹羽正美、尾崎正若、枝松 礼、平松 緑、森 昭胤: 黄連解毒湯の脳卒中易発症ラットに対する延命効果とラジカル消去作用. *Neurosciences* 15, 271-273 (1989)
 - 7) 樋口行人、山下樹三裕、谷山紘太郎、佐竹元吉、尾崎正若: 七物降下湯の脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) の脳卒中予防とフリーラジカル関連酵素活性に対する効果. *日薬理誌* 108, 13-22 (1996)
 - 8) 劉 健康、森 昭胤: 羅漢果のフリーラジカル消去作用および抗過酸化効果. *基礎と臨床* 27, 3159-3166 (1993)
 - 9) 河合元子、松浦新吾郎、森 昭胤: 万田酵素のフリーラジカル消去作用について. *基礎と臨床* 28, 393-397 (1994)
 - 10) Pederson T C and Aust S D: The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation promoted by xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 52, 1071-1078 (1973)
 - 11) Tien M, Svingen B A and Aust S D: Superoxide dependent lipid peroxidation. *Fed Proc* 40, 179-182 (1981)
 - 12) 吉川敏一、高橋周史: 抗酸化食品による疾患の予防. *Foods Food Ingredients J Jpn* 163, 11-18 (1995)
 - 13) Kamiya T, Saito Y, Hashimoto M and Seki H: Structure and synthesis of lentysine, a new hypocholesterolemic substance [Lentinus edodes]. *Tetrahedron Lett* 53, 4729-4732 (1969)
 - 14) Chibata I, Okumura K, Takemiya S and Kotera K: Lentinacin: a new hypocholesterolemic substance in Lentinus edodes. *Experientia* 25, 1237-1238 (1969)
 - 15) Kabir Y, Yamaguchi M and Kimura S: Effect of Shiitake (Lentinus edodes) and Maitake (Grifola frondosa) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 33, 341-346 (1987)
 - 16) Kabir Y, Kimura S and Tamura T: Dietary effect of Ganoderma lucidum mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J Nutr Sci Vitaminol* 34, 433-438 (1988)
 - 17) 堀尾拓之、大鶴 勝: 実験的糖尿病発症ラットにおいてマイタケ投与が耐糖能および尿糖排泄に及ぼす効果について. *栄食誌* 48, 299-305 (1995)
 - 18) Higuchi Y, Ono K, Sekita S, Onodera H, Mitsumori K, Nara Y and Satake M: Preventive effects of Shichimotsu-koka-to on renal lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 21, 914-918 (1998)
 - 19) Nishina A, Kimura H, Sekiguchi A, Fukumoto R H, Nakajima S and Furukawa S: Lysophosphatidylethanolamine in Grifola frondosa as a neurotrophic activator via activation of MAPK. *J Lipid Res* 47, 1434-1443 (2006)
 - 20) Negishi H, Xu J W, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y and Yamori Y: Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 134, 38-42 (2004)