

アクリルアミドの細胞毒性および熱ショックタンパク質誘導に関する研究

齋藤 清人

鈴鹿医療科学大学大学院 保健衛生学研究科 医療画像情報学専攻

(指導教員：具 然和)

【研究目的】

生体におけるストレス応答についてはこれまで広く研究されており、ストレス応答の一般的な特徴としてあげられるのが熱ショックタンパク質 (heat shock proteins: 以下 HSPs とする) の誘導である。この HSPs は、様々な環境ストレス (熱ショック、放射線、重金属、アミノ酸類似体や異常タンパク質の蓄積など) によって誘導されることから広義には「ストレスタンパク質」とも呼ばれている。この HSPs は分子シャペロンとして機能し、新生タンパク質の折畳み、オルガネラへのタンパク質輸送など細胞内のさまざまな機能を制御しているだけでなく、変性タンパク質の再生および分解などを手助けしストレスなどによるダメージから生体を防護するように働く内因性の防御因子の 1 つであると考えられている。最近では HSPs が細胞外でも検出され危険信号 (Danger signal) として免疫系を活性化することが分かってきている。

本研究では近年、食品危害物質 (化学的ストレス) として生体への影響について懸念されているアクリルアミドに注目し、*In Vitro* におけるアクリルアミドの細胞毒性およびストレス応答に伴う HSPs の誘導について調査することでアクリルアミドの細胞レベルにおける生体影響について検討した。また、ストレス応答や HSPs の機能解析および生物学的意味についても検

討を行い、基礎研究にデータを資することを目的とした。

【研究方法】

細胞は HeLa 細胞を使用した。細胞はアクリルアミドを含む培養液中で培養することで曝露処理を行った。アクリルアミドの細胞毒性は、細胞の形態学的変化および生存率について検討を行った。各濃度のアクリルアミドで 24 時間曝露処理した後、位相差顕微鏡により細胞形態を観察し、そのときの細胞生存率をトリパンブルー色素排除試験により算出した。また、細胞毒性がみられたアクリルアミド濃度においては、アガロース電気泳動による DNA の断片化と Protease assay によるカスパーゼ活性の測定を行った。

アクリルアミドによる HSPs 誘導は、HSPs の発現量および熱ショック転写因子 (HSF1) の活性化について検討を行った。HSPs の発現量については、ウェスタンブロット法により Hsp70, Hsp40 および Hsp27 について検出した。HSF1 の活性化については、HSF1 のリン酸化、HSF1 granules (顆粒) の形成および DNA 結合能について解析を行った。HSF1 のリン酸化は、ウェスタンブロット法を用いて HSF1 のリン酸化に伴うバンドシフトを検出し、HSF1 granules の形成については、HSF1 に特異的な蛍光抗体を用いた免疫蛍光染色により観察を行った。HSF1 の DNA 結

合能は、熱ショックエレメント (HSE) をプローブ DNA として Electrophoretic mobility shift assay により、HSF1-DNA 複合体の形成を確認した。また、このときのアクリルアミドによる HSPs の誘導が HSE のコンセンサス配列に依存的なものであるかを確認するためレポーターアッセイによりプロモーターの転写活性の測定を行った。コンストラクトにはルシフェラーゼ遺伝子上流に、Human Hsp40 遺伝子のプロモーターを接続したものを使用した。そのプラスミド DNA を細胞にトランスフェクションしたのち、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイを行った。転写活性の測定はアクリルアミド曝露処理した細胞を溶解液により溶解したのち、細胞溶解液に基質を加えルミノメーターで発光を測定しプロモーターの転写活性を評価した。

細胞外への HSPs 放出については、培養およびアクリルアミド曝露処理後の培養液のみを回収した後、培養液を遠心濃縮器により濃縮しサンプルとした。サンプルはウェスタンブロット法により種々の HSPs について検出した。

【研究結果】

HeLa 細胞に対するアクリルアミドの細胞毒性は、1mM 以上の比較的高濃度で顕著に認められた。また、そのときの細胞毒性による細胞の変性（細胞死）は不可逆的なものであり、その細胞死の過程はアポトーシス経路ではなくネクローシスのような壊死性のものであった。

アクリルアミドによる HSPs の誘導は 10mM の濃

度で認められ、その程度は無処理の Control 細胞と比較して各 HSPs において約 2 倍程度の増加であった ($p < 0.05$)。HSF1 の活性化についても 10mM のアクリルアミド曝露後 8 時間でリン酸化に伴う HSF1 のバンドシフトが認められると共に、HSF1 の活性化に典型的な HSF1 顆粒および HSF1-DNA 複合体の形成が認められた。また、レポーターアッセイにおいても、プロモーターにおける転写活性の増加が確認された。このことよりアクリルアミドによる HSPs の合成・誘導は、HSF1 の活性化に伴う転写誘導によるものであることが確認された。また、アクリルアミド処理による細胞死に伴って培養液中への HSPs 放出が認められた。

【結論】

本研究において高濃度のアクリルアミドは不可逆的な細胞死を引き起こし、その細胞死の過程において HSF1 の活性化に伴う HSPs の誘導・合成が認められた。また、その後起こるネクローシスのような壊死性の細胞死により細胞外への HSPs 放出が確認された。

本来、この HSPs の誘導はストレスを受けて生じた細胞が HSPs を合成し、次にくる致命的な状況から細胞を防護するように考えられてきた。しかし、本実験では不可逆的な細胞死の過程において HSPs の誘導・合成が開始されという現象が観られた。この現象の生物学的意味としては、より多くの HSPs を Danger signal として細胞外へ放出し伝えるためではないかと考えられる。

各種グルカンの抗がん作用及び免疫増強効果に関する研究

金 松蘭

鈴鹿医療科学大学大学院 保健衛生学研究科 医療画像情報学専攻

(指導教員：具 然和)

研究目的

癌治療法のひとつである放射線治療において問題となるのは、放射線ならびに抗癌剤併用による副作用である。本研究では、副作用のない天然物質を単独又は併用し、食欲、体調を戻し、患者自身の自然治癒力増強の有無に着目した。従って、本研究では、*Macro-glucan*, *Agaricus*, *AHCC* の免疫賦活作用、抗酸化作用および抗腫瘍効果のメカニズムについて検討した。

研究方法

本研究に用いた *Macro-glucan* は、パン酵母由来の $\beta 1, 3/1, 6$ グルカン製品（米 *Immudyne* 社製）、*placebo* はパン酵母由来の $\beta 1, 3/1, 6$ グルカンを除いた製品（米 *Immudyne* 社製）、*AHCC* は(株)アミノアップ社の *AHCC* (*IMUNO MEDIC*)、*Agaricus* は協和エンジニアリング(株)社の仙生露エキスゴールドである。*Macro-glucan* は 200mg/kg、*AHCC* は 750mg/袋であり 3袋 / 1日とし 2250mg/kg、*Agaricus* は 100ml/袋を凍結乾燥し 100ml 相当 /kg とした。本実験では、以下の項目を調べた。腫瘍成長抑制への影響、腫瘍体積および腫瘍抑制率算出、マウス末梢血液中における血球数への影響、ケミルミネッセンス法による抗酸化測定血清 SOD 活性、T リンパ球への影響、NK 細胞活性、血清 IL2, IL12, INF- γ , TNF- α などを検討した。

研究結果

macro-glucan, *Agaricus*, *AHCC*, *placebo* の持つ抗腫瘍作用、抗酸化作用、免疫賦活作用に着目し、生体における抗腫瘍効果のメカニズムが免疫増強であることを検討するために、抗腫瘍効果、血球細胞増強、抗酸化効果および T-cell におけるサブセット解析、NK 細胞活性、TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-12 について検討したところ、以下のことが確認された。*Agaricus*, *AHCC* および *macro-glucan* 投与により、白血球数、リンパ球数、単球数の増加、T リンパ球のサブセットにおいて *Agaricus* および *macro-glucan* 投与により、ヘルパー T 細胞、キラー T 細胞およびサブプレッサー T 細胞の増加が観察されたことから、免疫能活性が認められた。*AHCC* には、NK-cell の増強とキラー T 細胞およびサブプレッサー T 細胞の増加が観察されたことから、免疫能活性が認められた。

考察

Agaricus, *AHCC* および *macro-glucan* 投与により、抗酸化能およびフリーラジカルスカベンジング作用が認められたことから、放射線防護効果が期待できる。*Agaricus*, *AHCC* および *macro-glucan* 投与により、腫瘍成長抑制が示唆され、そのメカニズムは免疫増強によるマクロファージの活性と TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-12 の増加と NK 細胞活性であると示唆された。今後ますます癌治療において免疫療法が注目されるであ

ろう。よって、癌治療における癌に特異的な免疫療法の基礎研究として資することができた。

ラット間葉系幹細胞の培養と分化観察に関する研究

暮木 実智弘

鈴鹿医療科学大学大学院 保健衛生学研究科 医療画像情報学専攻

(指導教員：長谷川武夫)

1. 目的

ラット間葉系幹細胞の初代培養

2. 方法・細胞培養

ラットから大腿骨を摘出し、クリーンベンチ内で、骨髄液をシリンジにて押し出し、培養ボトルに播種、24時間静置後、ボトル底面に付着した細胞を45日間培養した。培地交換は基本的には1日1回午前中に行った。

3. 検定・結果

細胞集団は、1シャーレ中に十数個所見があった。45日間培養した結果、細胞自体は細胞分裂をすることではなく、日を追うにつれて、細胞から樹状突起らしいものを伸ばし近隣の細胞と接合して行った。細胞観察の結果から神経細胞ではないかと判断し、神経細胞特有の性質である好銀性を利用したボディアノ神経組織染色を行った。細胞が黒く着色したことから、このラット間葉系幹細胞は神経細胞に分化したことが確かめられた。

4. 結語

ラット間葉系幹細胞は単純培養の結果、分化して神経細胞になることが判った。今後、この神経細胞はグリア細胞か、ニューロン細胞かを確認する事によって、ラット間葉系幹細胞の分化メカニズムの解明につながると考える。

脳卒中リハビリテーションの治療成績向上を目的とした新しいシステムの開発と効果検証に関する研究

永井 将太

鈴鹿医療科学大学大学院 保健衛生学研究科 医療画像情報学専攻

(指導教員：河村 徹郎)

【はじめに】

今後のリハビリテーション（以下、リハビリ）医療において、在院日数の短縮は、社会構造的ならびに医療経済的側面から見ても、極めて重要な命題となる。しかし、多くの施設で行われている現状のリハビリシステムのままで安易に在院日数を短縮することは、患者の到達度（治療成績）の低下を招きかねない。そこで、「最短の期間で最高の到達度」を実現する新しいリハビリ医療のあり方が求められている。

以上を考慮して、我々は、最短期間で最高到達度を達成可能とする「統合的高密度リハビリ病棟」プログラム、すなわち、The Full-time Integrated Treatment program (FIT program) を開発した。

このシステムの中核概念は、空間と情報の統合・共有と、多量（毎日）で高密度（1日中）な訓練にある。ソフトウェアとして、療法士の勤務・治療体制、データベース、患者・家族教育があり、そのソフトウェア機能を保証するハードウェアとして「訓練室一体型病棟」がある。

今回は、この新しいリハビリシステム FIT program の有効性を検証する目的で、旧来のリハビリプログラムの治療成績と比較を行った。

【対象および方法】

藤田保健衛生大学七栗サナトリウムに入院し FIT program の治療を受けた脳卒中片麻痺患者（以下、FIT 群）を対象とし、比較のために FIT program 開始前に同院に入院し旧来のシステムで治療を受けた脳卒中片麻痺患者（以下、Pre-FIT 群）を対照群とした。両群間のばらつきをある程度おさえるために、初回発作でtent上に一側性の病変をもち、訓練に支障きたす重篤な併存症のない、発症から入院までの期間（以下、発症後期間）が3ヶ月以内で、入院時のFIMの運動項目合計点（以下、FIM-M）が80点以下の初回入院患者のみを採用し、Pre-FIT 群 92 名、FIT 群 113 名を最終的な対象とした。

患者基本情報として、年齢、性別、診断名、麻痺側、発症後期間、入院期間、転帰先を、ADL 評価として Functional Independence Measure (FIM) を、運動機能評価として Stroke Impairment Assessment Set (SIAS) の麻痺側運動機能項目を評価した。

FIM に関しては入・退院時に測定し記録した。この記録より運動項目合計点（以下、FIM-M）、認知項目合計点（以下、FIM-C）、退院時 FIM 得点から入院時 FIM 得点を引いた利得（以下、それぞれ FIM-M-gain, FIM-C-gain）を算出した。また、FIM-gain を在院日数で割った FIM 改善効率（以下、それぞれ FIM-M-

efficiency, FIM-C-efficiency, 単位：点 / 日) を算出した。

【結果】

両群で、年齢、性別、診断名、麻痺側、入院時 SIAS には差を認めなかった。入院時 FIM-M ならびに FIM-C には両群に差を認めなかったが、退院時 FIM-M は Pre-FIT 群に比べ FIT 群で有意に高かった。また、FIT 群では在院日数が有意に短く、自宅退院がやや多い傾向にあった。FIM-M-gain, FIM-M-efficiency, FIM-C-efficiency に関しては FIT 群の方が有意に高かった。

【考察】

FIT program の最大の特徴は、空間的・情報的に高度に統合化された環境で、土日祝日も含めた毎日、1 日中訓練を行うことにある。今回、FIT program の治療成績は、旧来リハビリの治療成績よりも、短い在院期間で、高い FIM 運動項目合計点が得られていた。多量で高密度な訓練により、より早い時期に、より高い効果が得られたといえる。また、自宅復帰率を下げることなく在院日数を短縮しており、非常に効率的なシステムであるといえる。このことから、FIT program は、これからのリハビリ医療の合理的な方向性を示すものと考えられる。

アレルギーと骨代謝及びエストロゲン分泌との関連性

飯田 会衣子

鈴鹿医療科学大学大学院 保健衛生学研究科 医療栄養学専攻

(指導教員：鈴木 郁功)

【目的】

様々なアレルギー疾患の中で、全年齢層において有病率が増加し、社会的にも注目されている疾患に花粉症がある。花粉症はIgE抗体とアレルゲンとの抗原抗体反応が契機となって起こる一連の生体反応であり、特にスギ花粉症は春先に広がり社会現象にもなっている。

また、これからの高齢化社会に向け注目されているものに骨粗鬆症がある。骨粗鬆症は主として加齢現象により骨強度が低下し骨折が起こりやすくなった状態であり、閉経後の女性や高齢者に多くみられる。骨粗鬆症は糖尿病だけでなく、リウマチや痛風といった自己免疫疾患とも関連がある。そこで本研究では、代表的なアレルギー疾患である花粉症と骨粗鬆症及びエストロゲン分泌との関連性に着目した。花粉症モデルラットを作製し、また花粉症であるヒトにおいて血中の骨代謝マーカー、アレルギーマーカー、さらに遺伝子レベルでの解析を試みるため白血球中の骨吸収性 mRNA 発現量を測定し、検討を行った。

【実験方法】

アレルギーと骨代謝及びエストロゲン分泌との関連性について、9週齢目の雄性BN系ラットのControl群以外に低濃度と高濃度のスギ花粉(SBP)をそれぞれ腹腔投与し、これらを花粉症モデルラットとして、SBP low 群、SBP high 群とした(n=6)。対象者は男

性6名から協力を得て、花粉症である人(Model群)とそうでない人(Control群)、3名ずつに群分けを行った。全てのラットは解剖後、骨量、骨代謝マーカー、アレルギーマーカー、白血球中の骨吸収性 mRNA 発現量を測定し、ヒトについては骨代謝マーカーとアレルギーマーカー、白血球中の骨吸収性 mRNA 発現量を測定し、比較検討を行った。

【結果・考察】

アレルギーと骨代謝について、ラット及びヒトの花粉症モデル群においてControl群と比べ骨代謝マーカーの上昇を示したことから、骨代謝回転が高代謝回転となっていたことがわかった。ラットの場合骨形成マーカーが低値、骨吸収マーカーが高値を示し、骨量の低下がみられたことから骨吸収に傾いていたと考えられた。さらに白血球中の骨吸収性 mRNA 発現量の結果では、ラット、ヒトともに花粉症モデル群においてControl群よりも高値を示していた。以上のことより、花粉症は白血球中の骨吸収性 mRNA 発現を亢進させることが明らかになった。

また血中エストラジオールの濃度を測定したところ、ラットの花粉症モデル群はControl群に比べ有意に低値を示した($p < 0.01$)。同様にヒトでも花粉症であるModel群が有意に低値を示し($p < 0.05$)、エストロゲンレセプターの mRNA 発現量もModel群が低値を示した。

以上のことから花粉症はエストロゲンの分泌を抑制

することがわかり、そのことにより骨吸収に傾くものと考えられた。

チャーガの生体防御系を介した抗腫瘍作用に関する研究

上田 佳史

鈴鹿医療科学大学大学院 保健衛生学研究科 医療栄養学専攻

(指導教員：鈴木 郁功)

【目的】

チャーガ（サルノコシカケ科カバノアナタケ：*Fuscoporia oblique*）は、シベリア原生林や北海道の一部において白樺やカバノキ類に自生する希少なキノコの一つである。これはロシアの一部の地域で、お茶代わりに飲まれ、その地域では癌の発生率が低いとされている。また、チャーガは、民間療法として胃潰瘍、悪性腫瘍、慢性胃炎、糖尿病等に使用されている。そこで、チャーガの抗腫瘍作用を検討するとともに、免疫賦活作用や抗酸化作用について検討した。

【実験方法】

試料：チャーガの微粉末 100g に蒸留水 2L を加え、熱水抽出し（90℃, 1 時間）、遠心上清を凍結乾燥した。抗腫瘍作用：雄性 ddY マウスに Ehrlich を皮下または腹腔内投与した。翌日より 10 日間に渡り、チャーガを腹腔内投与または経口投与し、固型癌または腹水癌に対する抗腫瘍効果を調べた。PMN 集積作用：雄性 ddY マウスにチャーガを dose を変えて腹腔内投与し、6 時間後に腹腔細胞を採取した。その塗末標本をディフクイック染色後、顕鏡し、腹腔に占める多形核白血球数を計測し、経時変動について調べた。サイトカイン誘導作用（in vivo）：雄性 ICR マウスにチャーガを静脈内投与（Priming）した 3 時間後に OK-432 加熱死菌体を静脈内投与（Triggering）し、2 時間後に採血し、血清中のサイトカイン（TNF- α , IL-6,

IL-12）量を ELISA で測定した。サイトカイン誘導作用（in vitro）：雄性 ICR マウスのグリコーゲン誘導腹腔マクロファージ（ 2×10^5 /well）にチャーガを添加し、2 時間後（TNF- α , IL-6）または 24 時間後（IL-12）の培養上清を ELISA で測定した。抗酸化作用：In vitro では、DPPH 法を用いて測定した。In vivo では、末梢血液中における SOD 活性を測定した。

【結果・考察】

マウスにチャーガを 10 日間腹腔内投与または経口投与した場合、固型癌の増大が抑制されたり、腹水癌による死亡率が低下し抗腫瘍作用を示した。また、チャーガを腹腔内投与した場合、腹腔に PMN が集積し、静脈内投与すると血中サイトカイン量が増加し、チャーガをグリコーゲン誘導腹腔マクロファージに添加すると培養上清中のサイトカイン量が増加した。またチャーガの抗酸化作用について DPPH 法で調べた結果、ラジカル消去作用が認められ、末梢血液中における SOD 活性値は増加した。以上のことからチャーガには生体防御系を介した抗腫瘍作用があることが示唆された。

ハタケシメジの生体防御系を介した抗腫瘍作用に関する研究

金丸 裕美

鈴鹿医療科学大学大学院 保健衛生学研究科 医療栄養学専攻

(指導教員：鈴木 郁功)

【目的】

ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes* Sing) はキシメジ科シメジ属に属すキノコである。これまで人工栽培は困難とされ、店頭で見かけることも少なかった。近年、人工栽培の技術が確立され、菌触りや味が優れていることから、次第に身近な食材となってきた。これまでに肝障害抑制効果、抗腫瘍効果、抗高脂血症効果、血圧降下効果等が報告されている。今回、ハタケシメジの抗腫瘍効果を検討するとともに、免疫賦活作用や抗酸化作用の係わりを検討した。

【方法】

1. 資料：ハタケシメジ乾燥物 100g に蒸留水 2000ml を加え 60℃ で 2 時間熱水抽出し、5031 × g で 10 分間遠心分離した。抽出液をひだ付き濾紙 (ADVANTEC No. 131) で自然濾過後、濾液を凍結乾燥した。2. 抗腫瘍作用：ddY 系雄性マウスに、Ehrlich 癌細胞を腹腔内または皮下投与した。翌日より 10 日間ハタケシメジを腹腔内投与し、腹水腫または固型癌に対する制癌作用を調べた。3. 免疫賦活作用：ICR 系雄性マウスにハタケシメジを腹腔内投与し、6 時間後に腹腔細胞を採取した。その塗抹標本をディフクイック染色後、顕鏡し、腹腔に占める多形核白血球を計測した。また、ICR 系雄性マウスにハタケシメジを静脈内投与 (Priming) した 3 時間後に OK-432 を静脈内投与 (Triggering) し、2 時間後に採血し、血

清中のサイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-12) 量を ELISA で測定した。

【結果および考察】

Ehrlich 腹水癌に対するハタケシメジの効果は、生理食塩水を投与したネガティブコントロール群と比べて生存率に有意な差は見られず、延命効果は認められなかった。一方、ポジティブコントロールとして用いたシスプラチン群は実験終了後の 31 日目まで生存率は 70% であった。この実験系でシスプラチンが有効であるのは、腹腔内に投与された癌細胞とシスプラチンが直接混ざり合い、シスプラチンの DNA 合成阻害作用により癌細胞の増殖が止められたからである。ハタケシメジはこの実験系では有効でなかったことから、シスプラチンのような癌細胞に対する直接的な作用はないことが推察された。

Ehrlich 固型癌に対するハタケシメジの効果を検討した結果、ネガティブコントロール群として生理食塩水を投与した場合には、固型癌は経時的に増殖した。ポジティブコントロール群としてシスプラチンを投与した場合には、固型癌の増殖がある程度抑えられ、腫瘍が小さくなっているもの、癌組織が検出されなかった完全治癒例もあった。検体群としてハタケシメジを投与した場合には、シスプラチン以上に強く作用し腫瘍の大きさがごま粒大のものもあり、完全治癒例は 4 例あった。腫瘍重量は移植後 45 日目のネガティブコントロール群 $8.3 \pm 4.0\text{g}$ に対して $2.3 \pm 4.3\text{g}$ であ

り、有意に抗腫瘍効果が認められ、抑制率は72.9%で有意で ($P < 0.01$) あった。ハタケシメジは腹水癌に対して抑制作用を示さなかったが固型癌に対して非常に強い抑制作用を示した。

ハタケシメジの腹腔 PMN 集積作用についての結果は、ハタケシメジを腹腔内投与すると3時間目以降、経時的に PMN が集積した ($P < 0.01$)。また、ハタケシメジを投与してからの測定時間を6時間に固定した場合、ハタケシメジ 0.01mg 投与群では有意差はなかったが、0.1mg, 1mg 投与群は有意に PMN が集積することが判明した。PMN は、生体防御系において、最初に活躍する白血球である。単癌マウスにハタケシメジを投与しても、PMN の活性化作用が起きている可能性は十分に考えられる。Ehrlich 固型癌に対してハタケシメジが抑制効果を示したのは、投与されたハタケシメジが PMN の活性化を促し、血流を介して移

植局部にたどり着いた活性化された PMN がその部位で貪食処理し、固型癌の増殖が抑制されたものと考えられる。

ハタケシメジのサイトカインの誘導作用の検討は、マウスにハタケシメジを静脈内投与すると、TNF- α , IL-6, IL-12 誘導の Priming 作用が認め認められ血中に TNF- α が産生された。

ハタケシメジが TNF- α , IL-6, IL-12 誘導の Priming 作用を示したことから、ハタケシメジは PMN だけではなくマクロファージにも作用することが示唆された。TNF- α は癌細胞に直接攻撃できるので、固型癌に対する抗腫瘍作用に寄与しているのかもしれない。また、マクロファージが TNF- α を産生するような状況では、産生されたサイトカインが他の免疫系細胞を活性化することにより、抗腫瘍効果を示す可能性を示唆した。

ホルモン補充における骨代謝の動態およびエストロゲン過剰状態の生体への影響

酒井 香江

鈴鹿医療科学大学大学院 保健衛生学研究科 医療栄養学専攻

(指導教員：鈴木 郁功)

【目的】

閉経後骨粗鬆症に有効とされるエストロゲンは、閉経後骨粗鬆症の治療だけでなく更年期障害の予防や治療にも用いられ、閉経後女性の QOL 維持に極めて重要な役割を果たしているといえる。さらに近年、健康志向が高まる中で、エストロゲン補充のための大豆イソフラボン等、閉経後の女性のための健康食品やその他環境ホルモンに汚染された食品などから、エストロゲン様作用をもった物質を多く摂取する機会が増えているにもかかわらず、エストロゲンを過剰に摂取した場合の骨代謝やその他の生体に対する影響は詳細に研究されていない。そこで、結合型エストロゲン製剤を用いてエストロゲン濃度変化における骨代謝への影響を検討した。

【方法】

6 週齢の雌 SD 系ラットに、Sham 群には偽手術、その他全てのラットに卵巣摘出手術 (OVX) を施した。Sham, Model, E0.01, E0.1, E1 に群分けを行い、Sham, Model には蒸留水、E0.01, E0.1, E1 にはそれぞれ 0.01, 0.1, 1mg/kg の結合型エストロゲン製剤を 12 週間毎日強制経口投与した。

ラットの体重、骨量変化の測定を行い、解剖時に臓器重量を測定した。さらに投与終了後の血清を用い

て、オステオカルシン (OC)、エストラジオール、RANKL、尿中デオキシピリジノリン (Dpd) 濃度を ELISA 法で測定した。また投与終了後の血液から分離した白血球中の各種サイトカインの mRNA の発現の検出も行った。

【結果・考察】

脛骨、大腿骨の骨量と子宮重量はエストロゲン投与群において、濃度依存的に増加し、一方体重増加傾向は全ての群で同じであった。骨代謝マーカーの OC や Dpd 値はエストロゲン投与群においてその投与濃度依存的に低下した。また、E0.01, E0.1 群では破骨細胞活性化の作用を示す血中 RANKL 値が低下するのに対して、E1 群では高値を示し、白血球における RANKL mRNA も高値であることから、破骨細胞が活性化していることが推測された。さらに、骨芽細胞で骨吸収に関与していると報告されているサイトカインの mRNA が、白血球においても同様にエストロゲンにより抑制される働きを示した。さらにこれらの mRNA 発現は E1 群で 20 ～ 200 倍の高発現になっていることが明らかになった。

以上のことから、エストロゲン投与により骨吸収が低下するとそれにカップリングし骨形成も低下し、骨代謝が低代謝回転になり骨量増加に働くことが確認できた。しかし、その濃度が高濃度になった場合、本研

究において骨量は増加傾向を示したが、エストロゲンを正常な濃度で投与した場合と比較して、血中 RANKL 量、白血球における RANKLmRNA 発現量が高く、破骨細胞が活性化されていることが考えられた。またこの時、白血球において、骨吸収促進性サイトカインの mRNA が過剰に発現したことから、さらに長

期間エストロゲン過剰状態が続くことで、骨破壊に間接的な影響を及ぼすと考えられた。したがってエストロゲンを高濃度で摂取することは骨に対する影響だけでなく、生体内において感染や炎症を伴う疾患の誘因となる可能性が示唆された。

ハタケシメジの機能性に関する基礎研究

卯川 裕一

(指導教員：具 然和)

近年、担子菌類の様々な生理活性が注目され、免疫賦活、降コレステロール抗血栓、血圧降下、老人性痴呆症改善など多岐にわたる有効な成分が証明されつつあり、新しい医薬品の開発や機能性食品の素材として注目されている。本論文では、近年人工栽培化に成功したキノコ、ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*, 以下 LD) の生理機能を探索することを目的として、抗腫瘍効果、血圧降下作用と降コレステロール効果の研究に着手した。

① LD の抗腫瘍活性

LD 子実体熱水抽出物中の多糖は 89.2% の腫瘍抑制率を示し、LD 投与群のみに完全に腫瘍が退縮しているマウスがみられた。以上の結果から LD の抗腫瘍活性は他の食用キノコと比較して優れていることが示された。

そこで、LD から抗腫瘍多糖を精製し、その構造解析を行った。イオン交換クロマトグラフィー (Q-SepharoseFF)、ゲル濾過クロマトグラフィー (Toyopearl HW-55S) により 11 画分に分画した。得られた多糖の Sarcoma180 固型ガン移植マウスに対する抗腫瘍活性を調べた結果、どの画分にも活性が認められたが、中でも IV-1 は 10mg/kg の投与量で腫瘍抑制率 97.1%、完全退縮率 90%、生存率 100% と極めて高い抗腫瘍活性が認められた。

抗腫瘍活性を有する多糖の平均分子量、構成糖の組成は、IV-1 では分子量が約 30 万であり、得られた多糖の中で分子量は最も大きく、主構成糖は Glc

(84.4%) で、少量の Fuc, Man, 約 10% の Gal を含む β -1,6-分岐 β -1,3-グルカンであった。一方、III-2, IV-3, V-2 は Glu が 97% 以上からなる β -1,3-分岐 β -1,6-グルカンであった。

② LD と免疫増強効果の作用機序と放射線照射時の免疫賦活効果

IV-1 の投与によりマクロファージの食食指数 [K] が、陽性対照である PS-K の食食指数 [K] よりも有意に増大した。また、腹腔マクロファージ数も IV-1 の投与で対照群と比較して有意に増大し、その値は PS-K を上回っていた。さらに C3 陽性蛍光細胞の割合は IV-1 の投与により 5.4% (対照群) から 49.2% まで 10 倍近くにまで増加した。以上の結果から、LD 多糖の腹腔内投与により免疫機能が上昇し、抗腫瘍効果に結びついているものと結論付けた。

次に LD 熱水抽出物の経口投与による放射線照射時の血球細胞に対する影響についてマウスを用いて調べた。その結果、LD の投与で、X 線照射による白血球、リンパ球、単球などの減少を抑制する効果が認められた。さらに担ガン状態でも LD の投与と X 線照射を併用することで、抗腫瘍効果、延命効果、免疫増強効果が増大した。また、母体マウスに放射線を照射した時の胎児に対する催奇形成と LD 投与の影響について調べた結果、1Gy 単独照射群と LD + 1Gy 照射群で胚死亡率と奇形発生率の減少が認められたことから LD の放射線防護効果が示唆された。

さらに、LD は抗酸化活性を有し、放射線の副作用

である血球数低下を単独よりもさらに強く抑止していることが明らかとなった。さらに T リンパ球サブセット解析から照射前で特に LD 投与群で CD3・CD4 doublepositive の細胞数が増加しており、照射 10 日後では照射により C 群の CD3・CD4 doublepositive は減少したが、LD によりその減少が抑制されていた。

③ LD の血圧降下作用

8 種類の食用キノコから得られた冷水抽出物 (CWE) の ACE 阻害活性について比較したところ、LD が阻害率 100% で、9 種類のキノコの中で最も高かった。また CWE, 熱水抽出物 (HWE) のプロテアーゼ処理で ACE 阻害活性が激減したことから、ACE 阻害活性成分は高分子ではなく低分子のオリゴペプチドであることが明らかとなった。さらに、CWE のペプシン分解物, HWE のペプシン分解物およびトリプシン分解物の ACE 阻害活性が高く、LD を摂取した時、胃もしくは小腸内で消化を受けて生成された ACE 阻害活性ペプチドによって血圧上昇が抑制される可能性があることがわかった。また、CWE のペプシン処理物, HWE のペプシンおよびトリプシン処理物に、処理前よりも高い ACE 阻害活性が認められ、LD についてもその ACE 阻害活性ペプチドの関与が示された。また、SHR を用いた血圧降下実験では、LD を 2 % もしくは 10 % 混合した飼料で飼育した SHR で有意な血圧の低下がみられ、ACE 阻害活性の結果が *in vivo* でも証明された。

④ LD の降コレステロール効果

コレステロールを 0.5 % 含む飼料に LD 子実体なら

びに各種抽出物を添加してラットに 3 週間投与し、血清脂質濃度、肝臓脂質含量、胆汁酸に及ぼす影響について検討した。その結果、血清総コレステロールにおいては LD 子実体投与群と HWE 投与群で有意に低値を示した。肝臓コレステロールにおいても LD 子実体と各種抽出物投与群で低値を示した。

一般に、食物繊維は血清コレステロールを低下する働きがあり、その機構は主に糞中への胆汁酸排泄促進によるものだと考えられている。本研究においても、糞重量と胆汁酸の糞中排泄量が増加したことから、LD のコレステロール低下作用は、食物繊維の作用が大きいと考えられる。加えて、高コレステロール食すなわち、コレステロール食 (0.5 %) とコール酸ナトリウム 0.125 % を含む飼料においても、子実体粉末投与群と熱水抽出画分投与群で血清脂質レベル、肝臓脂質レベルが共に低値を示し、中でも、子実体粉末投与群では、糞重量と胆汁酸量が増加したことから、LD に含まれる食物繊維がコレステロール低減作用に大きな働きを示していることがわかった。さらに、コレステロール無添加飼料においても、コレステロール-7 α ヒドロキシラーゼの活性が子実体粉末投与群で有意に高値を示した。

以上、本研究で LD の抗腫瘍、高血圧予防ならびに降コレステロール効果を示した。その他、抗糖尿病効果やアレルギー疾患に対する治療効果も証明されており、LD は多彩な生理機能を有した機能性食品として開発が期待できるものと考えられる。