薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
116 (2) 169-173 (1996)

実験的肺血栓ラットに対するシイタケ-フラクトオリゴ糖
混合物 (SK-204) の影響

大塚正道,^a 篠塚和正,^{*,b} 平田五一,^a 国友 勝^b
滋賀県製薬株式会社中央研究所,^a 武庫川女子大学薬学部^b

Influences of a Shiitake (*Lentinus edodes*)-Fructo-oligosaccharide
Mixture (SK-204) on Experimental Pulmonary
Thrombosis in Rats

Masamichi OTSUKA,^a Kazumasa SHINOZUKA,^{*,b}
Goichi HIRATA,^a and Masaru KUNITOMO^b

Central Research Institute, Shigaken Pharm. Ind. Co. Ltd.,^a 879 Taki,
Koka-cho, Koka-gun, Shiga, 520-34 Japan and Department of
Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Mukogawa Women's University,^b 11-68,
Koshien Kyuban-cho Nishinomiya
Hyogo, 663 Japan

(Received August 11, 1995)

Effects of the mixture (SK-204) consisting of dried shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) treated with wet-heating and fructo-oligosaccharides (7:3) on the experimental models of pulmonary thrombosis induced by lactic acidosis in rats were evaluated. Chronic oral administration (10 weeks) of SK-204 significantly prevented the thrombus formation on this thrombosis model. However, decreases in the numbers of platelet and fibrinogen level by lactate were not changed by SK-204. These results suggest that SK-204 have an anti-thrombotic action, which is due to neither the inhibition of platelet aggregation nor coagulation, but probably due to the promotion of fibrinolysis and thrombolysis.

Key words—shiitake (*lentinus edodes*); lactic acidosis-induced pulmonary thrombosis; anti-thrombotic effect; rat

緒 言

明の呉瑞の著『日用本草』(1620)に「椎茸は気を益し、飢えず、風を治し、血を破る」との記載があり、¹⁾ シイタケ (*Lentinus edodes*) には健康維持に寄与するような薬理効果が古くから知られていたものと考えられる。最近、抗腫瘍多糖類や抗ウイルス性核酸、脱コレステロール作用物質など種々の薬理活性物質がシイタケに含まれていることが報告¹⁾され始めている。我々もこれまでの研究により、SK-204 (湿熱処理干しシイタケ粉碎物とフラクトオリゴ糖の混合物) には、便秘改善作用²⁾に加えて、血圧上昇抑制及び脳出血抑制作用、³⁾ さらに高脂血症改善作用⁴⁾があることを明らかにしており、SK-204 が循環器系疾患に有効である可能性を示唆してきた。

近年増加している脳梗塞や心筋梗塞など閉塞性動脈疾患は血管障害が主な成因であり、血小

板凝集, 血液凝固が促されることにより血栓や塞栓が形成し, 末梢組織の酸素欠乏, 栄養障害による壊死を引き起こすと考えられている. したがって末梢血管における血栓形成機構の抑制がこのような疾患の予防に役立つことが予想される. このような薬効を有する食品を追究する中で, 干しシイタケの水抽出物に血小板凝集抑制作用のあることが *in vivo*, *in vitro* の実験により報告されている.⁵⁾ したがって, 干しシイタケには抗血栓作用を有する可能性が推察されるが, このような報告は見当たらない. そこで本研究では, 実験的末梢循環障害モデルの1つである乳酸誘発肺血栓ラットを用いて, 干しシイタケを原材料とする SK-204 の影響について検討した.

実験材料及び方法

1. 供試飼料 シイタケによる中毒疹⁶⁾の発症予防のため, 干しシイタケ ((株) オーエスケイ) にオートクレーブで湿熱処理 (121°C, 15 分) を施し, 80°C で乾燥した後, 粉碎して粒径 355 μm 以下のシイタケ粉碎物 (Autoclave-dried *Lentinus edodes*; ADLe) を製した. この ADLe にフラクトオリゴ糖 (FO, 明治製菓) を 7:3 の割合で混合し SK-204 とした. SK-204 は, 乾式造粒法により, 賦形剤を使用することなく, 顆粒化が可能となり, かつ本顆粒はかさ密度, 飛散性等が改善され, 製剤時並びに服用時の物性的向上がみられた.

本 SK-204 を 10% の割合で, 基本飼料 (ラボ MR ストック粉末; ニッチク薬品工業) に混合したものを SK 飼料とし, また同様にセルロース粉末 (ナカライテスク) を 10% の割合で基本飼料に混合したものを対照飼料とした.

2. 実験動物及び飼育 4 週齢の Wistar 雄性ラット (日本エス・エル・シー) を購入し, 基本飼料で一週間の予備飼育を行った. 5 週齢に達したラットを体重の平均値が各群間でほぼ等しくなるように 1 群 4 匹ずつ 3 群に組分けし, その後 10 週間にわたって被験飼料 (基本飼料, 対照飼料及び SK 飼料) を摂取させた. 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, 水は自由に摂取させた. なお本実験の計画及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」に従って行った.

3. 実験的肺血栓モデルの作成及び血栓数の計測 肺血栓モデルの作成は Tomikawa らの方法^{7,8)} に準じて行った. すなわち, 被験飼料の摂取期間終了後, ネンブタール麻酔下 (40 mg/kg, i.p.) で, 0.7 M の乳酸 (ナカライテスク) を含む生理食塩水を 7 ml/kg/h の流速で大腿静脈より 2 時間にわたって持続注入し, その後直ちに腹部大動脈より血液を採取, 被験試料とするとともに全肺を摘出し 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド溶液 (ナカライテスク) に浸漬, 固定した. 固定後, 定法によりパラフィン包埋し, 各葉の一定部位を切り出し, 薄切標本を作成した後, ヘマトキシリン・エオジン染色及びアザン・マロリー染色を施した.

血栓形成の判定はアザン・マロリー染色標本を用い, 赤血球, フィブリン及び血小板の混在した凝集塊を指標として, 各葉における凝集塊の数を一標本に付き一切片で顕微鏡下 ($\times 100$) で計測した.

4. 血液検査 血小板数の計測は, EDTA (1 mg/ml 血液) を添加した血液を被験試料とし, Sysmex CC-780 型 (東亜医用電子) を用いて行った. また, 3.8% クエン酸ソーダを添加した血液より得た血漿を被験試料として, シンプラスチン (ワーナー・ランバート-三共社製) によりプロトロンビン時間を, またコアガチェックフィブリノーゲン (日本テクニコン社製) 及びクロテック II 型 (ハイランド社製) を用いてフィブリノーゲン値を測定した.

5. 統計処理 体重, 肺血栓数及び血液検査値は平均値 $\pm$ 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。なお、5% 以下の危険率の場合を有意差ありと判定した。

結 果

1. 体重及び摂餌量

本実験開始時における 3 群の体重の平均値は、101—102 g であった (Table 1)。被験飼料の 10 週間摂取終了後における SK 飼料群及び対照飼料群の体重は基本飼料群に比べてやや減少する傾向が認められたが、3 群間で有意な差はなかった。また総食餌摂取量も 3 群間でほぼ同程度であった。

2. 肺血栓

Table 2 は各群における肺血栓数を各部位ごとに示したものである。生理食塩液のみを持続注入した基本飼料群の肺標本には血栓はまったく認められなかった。一方、乳酸を持続注入した対照飼料群の肺標本には左肺及び右肺の各葉において数多くの血栓が観察されたが、SK 飼料群の肺血栓数は副葉を除いてすべての部位において有意に減少していた。また、肺の総血栓数においても対照飼料群に比べ SK 飼料群で有意に減少していた。このような乳酸によって誘発された肺の血栓は細気管支周囲に分布している比較的大い血管に多く認められた。

3. 血液検査値

血液検査の各値を Table 3 に示す。血小板数及びフィブリノーゲン値は乳酸投与処置により有意に低下したが、SK 飼料群と対照飼料群の値はほぼ同じであった。また、プロトロンビン時間にも 3 群間で差が認められなかった。

なお、基本飼料群の血液検査値は、いずれも予試験的に SK 飼料を 10 週間摂取させたラット

Table 1. Changes in Body Weight and Food Consumption

Group	Body weight ^{a)}		Total food consumption for 10 weeks ^{b)} (g)
	Before	After	
Basal diet (Labo MR)	102 ± 2	297 ± 10	1152
Control diet (10% cellulose)	102 ± 2	278 ± 10	1191
SK diet (10% SK-204)	101 ± 3	282 ± 9	1091

a) Mean ± S.E., n = 4. b) Mean, n = 4.

Table 2. Effects of SK-204 on Thrombus Formation Following Infusion of 0.7 M Lactate

Group	Thrombosis number					Total
	Left lung	Right lung				
		Anterior lobe	Middle lobe	Inferior lobe	Accessory lobe	
Basal diet* (Labo MR)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Control diet** (10% cellulose)	8.3±2.1 ^{a)}	4.0±0.5 ^{a)}	5.8±1.5 ^{a)}	8.8±1.2 ^{a)}	5.5±2.7 ^{a)}	32.3±3.9 ^{a)}
SK diet** (10% SK-204)	3.0±0.7 ^{b)}	1.8±0.9 ^{b)}	2.0±1.2 ^{b)}	3.5±1.1 ^{a,b)}	3.8±1.7	14.0±5.1 ^{a,b)}

* treated without lactate, ** treated with lactate. (Mean ± S.E., n = 4). a) $p < 0.05$ from basal diet group, b) $p < 0.05$ from control diet group.

Table 3. Effects of SK-204 on Platelet Number, Prothrombin Time and Fibrinogen Level Following Infusion of 0.7 M Lactate

Group	Platelet ($\times 10000/\text{mm}^3$)	Prothrombin time (s)	Fibrinogen (mg/dl)
Basal diet* (Labo MR)	75.4 $\pm$ 5.1	13.5 $\pm$ 0.5	167.0 $\pm$ 7.6
Control diet** (10% cellulose)	56.7 $\pm$ 2.5 ^{a)}	15.1 $\pm$ 0.8	119.3 $\pm$ 14.5 ^{a)}
SK diet** (10% SK-204)	56.5 $\pm$ 11.5	15.5 $\pm$ 0.6	110.0 $\pm$ 3.8 ^{a)}

*treated without lactate, **treated with lactate. (Mean $\pm$ S.E., $n=4$). a) $p < 0.05$ from basal diet group.

の血液検査値とはほぼ同等値であった。したがって、SK-204 自身は血小板数やフィブリノーゲン値に対し影響しないと考えられる。

考 察

血管内での血栓の形成は、心筋梗塞や脳梗塞など重篤な疾患につながることが多い。その予防、治療には抗血栓薬として、現在アスピリン、ヘパリン、ウロキナーゼ等が用いられているが、副作用の少ないより優れた予防法の確立が望まれている。我々はこれまで、SK-204 には抗高血圧作用、脳出血予防及び抗コレステロール作用等のあることを報告し、循環器系疾患の予防、改善に有効である可能性を示唆してきた。今回は SK-204 の血栓症に関する前臨床薬理学的知見を得る目的で、乳酸誘発肺血栓モデルラットの血栓形成に及ぼす影響について検討した。

本実験で用いた肺血栓モデルは Tomikawa らによって報告された方法によるもので、乳酸の持続的注入により肺に著しい血栓の形成が認められ、この肺血栓モデル形成の初期には血小板凝集が、後期にはフィブリンが関与することが明らかにされている。⁷⁾ 本実験においても著しい肺血栓形成とともに有意な血小板数の減少及びフィブリノーゲン値の低下を認めている。このような抗血栓モデルラットにおいて、SK-204 は肺血栓の数を有意に減少させた。このことは SK-204 中には抗血栓作用を有する物質の存在することが示唆される。林らは乳酸による血栓形成がアセチルサリチル酸及びヘパリンにより抑制されることから、血小板凝集及び血液凝固の亢進がこの血栓形成に関与していると考えている。⁹⁾ 一方、シイタケ水抽出液中には Guanosine-5'-monophosphate (GMP) 又はその類似物質が存在し、血小板凝集を特異的に抑制することが報告されている。⁵⁾ これらの知見と本実験結果を考えあわせると、SK-204 の抗血栓作用にはシイタケ中のこのようなヌクレオチドもしくはその誘導体の血小板凝集抑制作用が関与していると推察される。しかしながら本実験において、乳酸処理により生じた血小板減少及びフィブリノーゲン値低下に対し、SK-204 が血栓形成数を半減させたにもかかわらず、なんら影響を示さなかった。このことは、SK-204 が血小板凝集や血液凝固の発現過程を抑制しているとは考え難いことを示している。恐らく SK-204 はウロキナーゼ、¹⁰⁾ 薬用人参¹¹⁾ やサフラン¹²⁾ での報告に見られるように線溶系の発現過程に影響し、これを促進しているという可能性が考えられる。シイタケ子実体や菌糸体からはある種のペプチダーゼやプロテアーゼなどの蛋白分解酵素の存在が発見されており、^{13,14)} 線溶系の活性化に関与しているかもしれない。このような酵素あるいはそれ以外の血栓溶解系を活性化する物質の特定は今後の大きな課題と考えられる。

以上の結果より、シイタケとフラクトオリゴ糖の混合物である SK-204 には乳酸により誘発される肺血栓に対し、予防効果のあることが明らかにされた。この作用機序としては血小板凝

集抑制, 血液凝固抑制, 血栓溶解促進の3つが関係することが考えられるが, 本実験の結果からは血栓溶解系を促進している可能性が示唆された. 今後はSK-204の血栓溶解系に及ぼす影響に焦点を絞り, その抗血栓作用の機序をさらに解明するとともに, 脳血栓形成に対する作用についても検討を進める必要があると考えられる.

引用文献

- 1) 水野 卓, “キノコの化学・生化学,” 初版, 水野 卓, 川合正允編, 学会出版センター, 東京, 1992, pp. 229—235.
- 2) 大塚正道, 日本栄養食糧学会誌, **47**, 307 (1994).
- 3) 大塚正道, 久保孝夫, 日本栄養食糧学会誌, **48**, 109 (1995).
- 4) 大塚正道, 久保孝夫, 日本栄養食糧学会誌, **48**, 225 (1995).
- 5) 早川道彦, 葛谷文男, 日本老年医学会雑誌, **22**, 151 (1985).
- 6) 立花隆夫, 日本病院薬剤師会雑誌, **28**, 1161 (1992).
- 7) Tomikawa M., Ogawa H., Abiko Y., *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **31**, 86 (1974).
- 8) Tomikawa M., Ashida S., Kakihata K., Abiko Y., *Thrombo. Res.*, **12**, 1157 (1978).
- 9) 林 元英, 鈴木常正, 池田眞一, 久保山昇, 応用薬理, **24**, 859 (1982).
- 10) Tomikawa M., *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **34**, 145 (1975).
- 11) 松田秀秋, 久保道德, 薬誌, **103**, 1269 (1983).
- 12) 西尾 孝, 奥川 斉, 加藤 篤, 橋本庸平, 松本克彦, 藤岡晨宏, 生薬, **41**, 271 (1987).
- 13) 橋本洋一, 蛋白質核酸酵素, **28**, 1224 (1983).
- 14) Terashita T., Oda K., Kono M., Murao S., *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2293 (1985).