



# 動脈硬化モデルラットの血栓形成に対する 椎茸菌糸体培養培地抽出物(LEM)の効果

## Effect of a water-soluble extract from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM) on thrombus of atherosclerosis model rat.

柏木 まり<sup>1</sup>, 須賀 健太<sup>1</sup>, 岩田 直洋<sup>1</sup>, 神内 伸也<sup>1</sup>, 久保田 真<sup>2</sup>, 飯塚 大<sup>2</sup>,  
岡崎 真理<sup>1</sup>, 日比野 康英<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>城西大・薬, <sup>2</sup>野田食菌工業(株)

### 目的

血栓症は、アテローム性動脈硬化などによって狭窄した血管に血栓が詰まることで引き起こされる病態である。また、我が国の死因の上位にある心疾患や脳血管疾患の発症に深く関わっていることから、血栓形成を予防することはこれら疾患の発症を抑制することにも繋がると考えられる。

椎茸菌糸体培養培地抽出物(LEM)は、椎茸菌糸体をバガスと脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、子実体発生直前に培地ごと破碎し、熱水抽出、噴霧乾燥したものである。LEMは、これまでに抗酸化作用や血圧上昇抑制効果など多くの生理活性が報告されているが、抗血栓作用については明らかになっていない。

本研究では、LEMの継続的な摂取による抗血栓効果を *in vitro* および *in vivo* により評価することにした。

### 方法

#### <試料>

椎茸菌糸体培養培地抽出物は、野田食菌工業(株)において製造された「LEM」を使用した。LEMは、椎茸菌糸体をバガスと脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、子実体発生直前に培地ごと破碎し、熱水抽出、噴霧乾燥したものである。



#### <評価・解析方法>

##### 1. フィブリン凝塊に関する評価

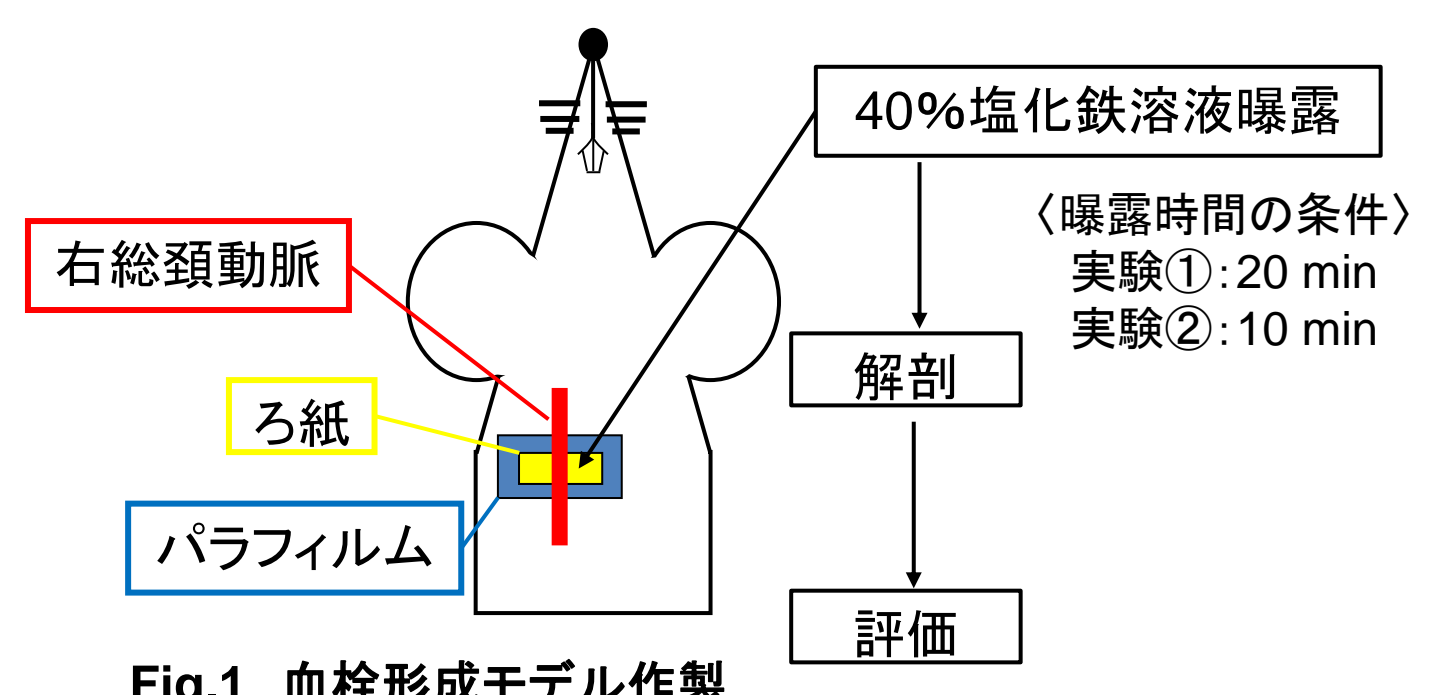
1.5 ml チューブ内に60 mM Tris-HCl(pH 7.4)、2.5 mM CaCl<sub>2</sub>、各サンプル、ヒト血漿由来のフィブリンノーゲン(7.5%)およびトロンビン(2.5 U/mL)を37°Cで1時間反応させた後、生成されたフィブリン重量を測定した。

##### 2. 実験動物

SDラット(8週齢、♂)にLEM(1 g/kg/day)を2週間経口投与(LEM群)、Vehicle群には水を投与した。また、動脈硬化モデルとしてNO阻害剤であるL-NAME(1 g/L)を2週間自由飲水で与えた(L-NAME群)、L-NAME群にLEMを2週間投与した群(L-NAME+LEM)を作製した。

##### 3. 血栓形成モデル作製

ラットを麻酔下にて頸部正中部分を切開し、右総頸動脈を露出させた。頸動脈下にパラフィン(20×6 mm)、濾紙(10×5 mm)を敷き、40%塩化鉄溶液を10 μl添加し、実験①では20分間、実験②では10分間曝露させることで血栓を形成させた。塩化鉄曝露後、生理食塩水にて洗浄した後に頸動脈を摘出した。一方、塩化鉄無処置群をnonとした。



##### 4. 血栓重量の測定

塩化鉄曝露後に右総頸動脈を摘出し、血栓重量を測定した。血栓重量は、採取した血管の長さを統一して算出した。

##### 5. 組織評価

摘出した右総頸動脈を用いて凍結ブロックを作製した。その後、血管の冠状切片(10 mm)を作製しヘマトキシリン・エオジン(HE)染色した。

##### 6. 血小板凝集率の測定

腹部大動脈から全血(血液:クエン酸ナトリウム=9:1)を採取し、遠心後、多血小板血漿(PRP)を採取した。沈殿物をさらに遠心し、乏血小板血漿を採取した。その後、PRPにCollagenを添加し、5分間の血小板凝集をヘマトレーサー804(LMS株式会社, Tokyo, Japan)を用いて測定した。

### 結果

#### フィブリン凝塊に与えるLEMの変化

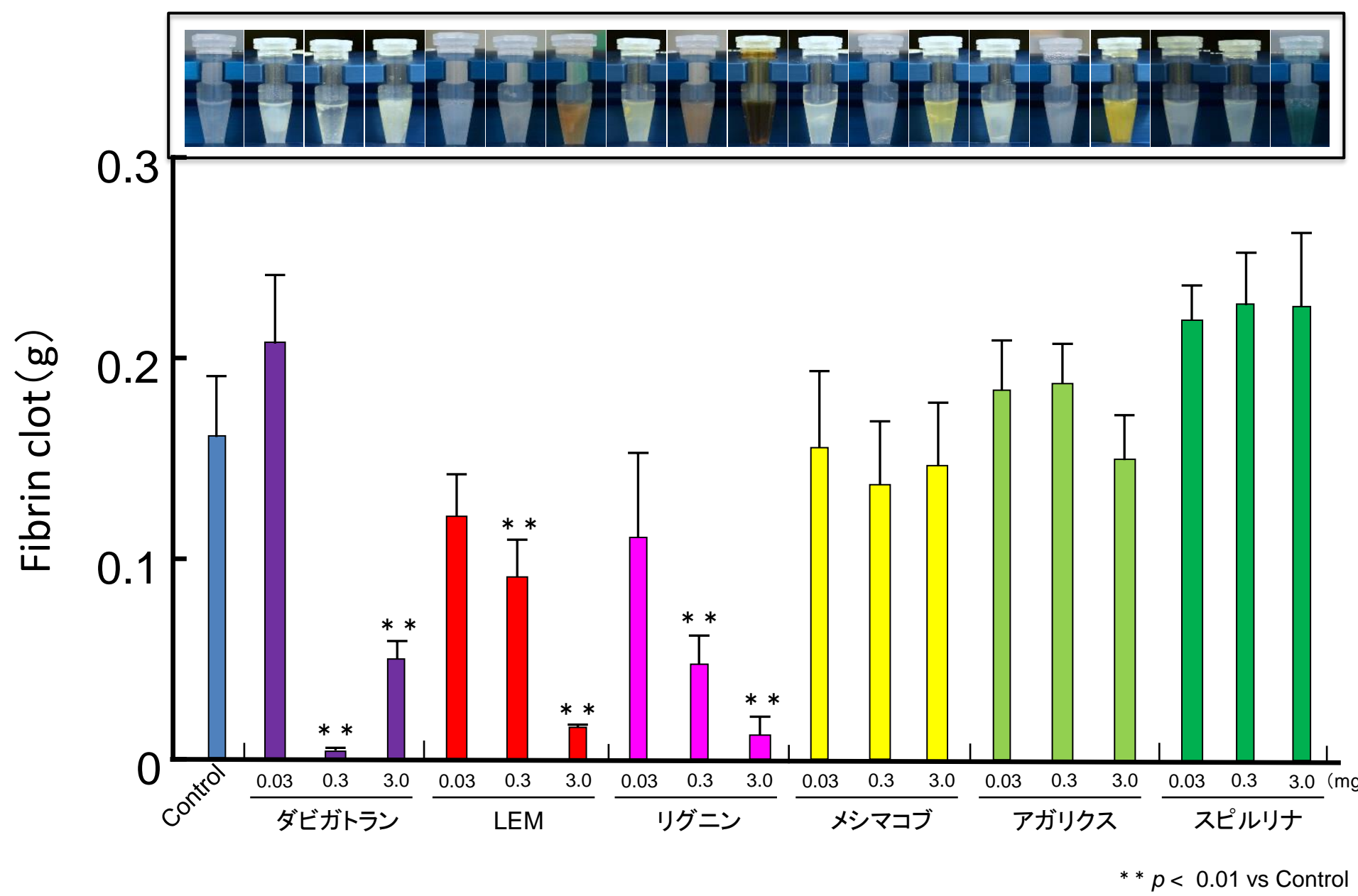


Fig. 2 フィブリン凝塊に対する各サンプルの効果 (*in vitro*)

Controlと比較してLEMでは濃度依存的なフィブリン凝塊重量の減少がみられた。また、リグニン(NACALAI TESQUE, CAS RN® 9005-53-2, CAT 20453)においても濃度依存的な減少が認められた。さらに、トロンビン阻害剤であるダビガトランでも有意な減少が認められた。一方、健康食品として比較対象としたメシマコブ、アガリクス、スピルリナではフィブリン凝塊重量に有意な変化は認められなかった。

#### 血栓形成モデルラットに与えるLEMの影響

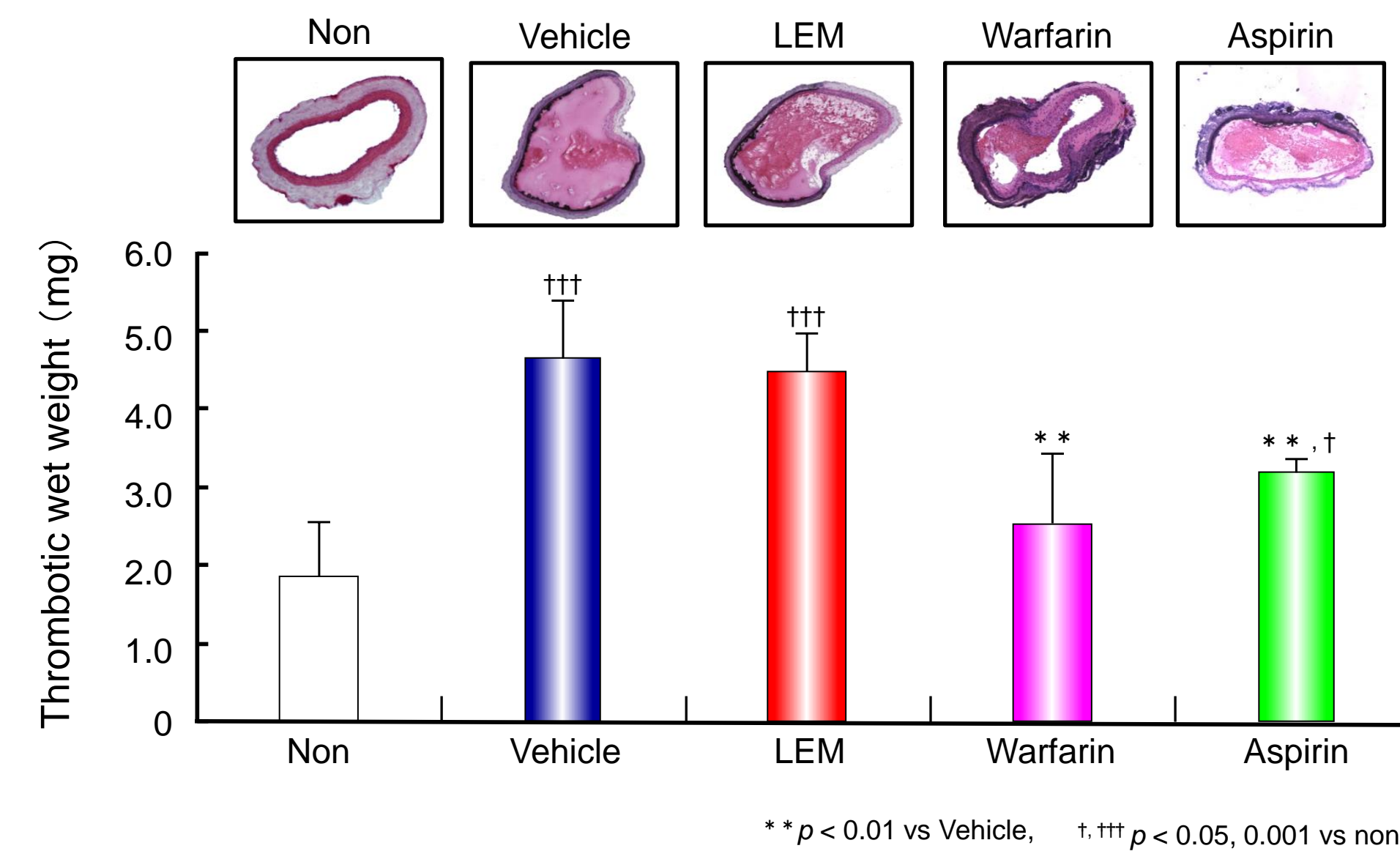


Fig. 4 血栓形成モデルラットに与えるLEMの影響 (*in vivo*)

Non(塩化鉄無処置)群と比較して塩化鉄曝露処置群で血栓重量が有意に増加し、血管が閉塞したことが確認された。LEM群では、Vehicle群と比較して有意な差はみられなかったが、ポジティブコントロールであるWarfarin群、Aspirin群で顕著な血栓重量の抑制が認められた。

#### 実験②

使用動物:SDラット(7週齢、♂) 群分け: L-NAME群(1 g/L, 2 weeks, 自由飲水)  
飼料:CE-2  
L-NAME + LEM群(1 g/kg BW/day, p.o.)  
L-NAME + Warfarin群(0.2 mg/kg BW, p.o.)  
L-NAME + Aspirin群(20 mg/kg BW, p.o.)

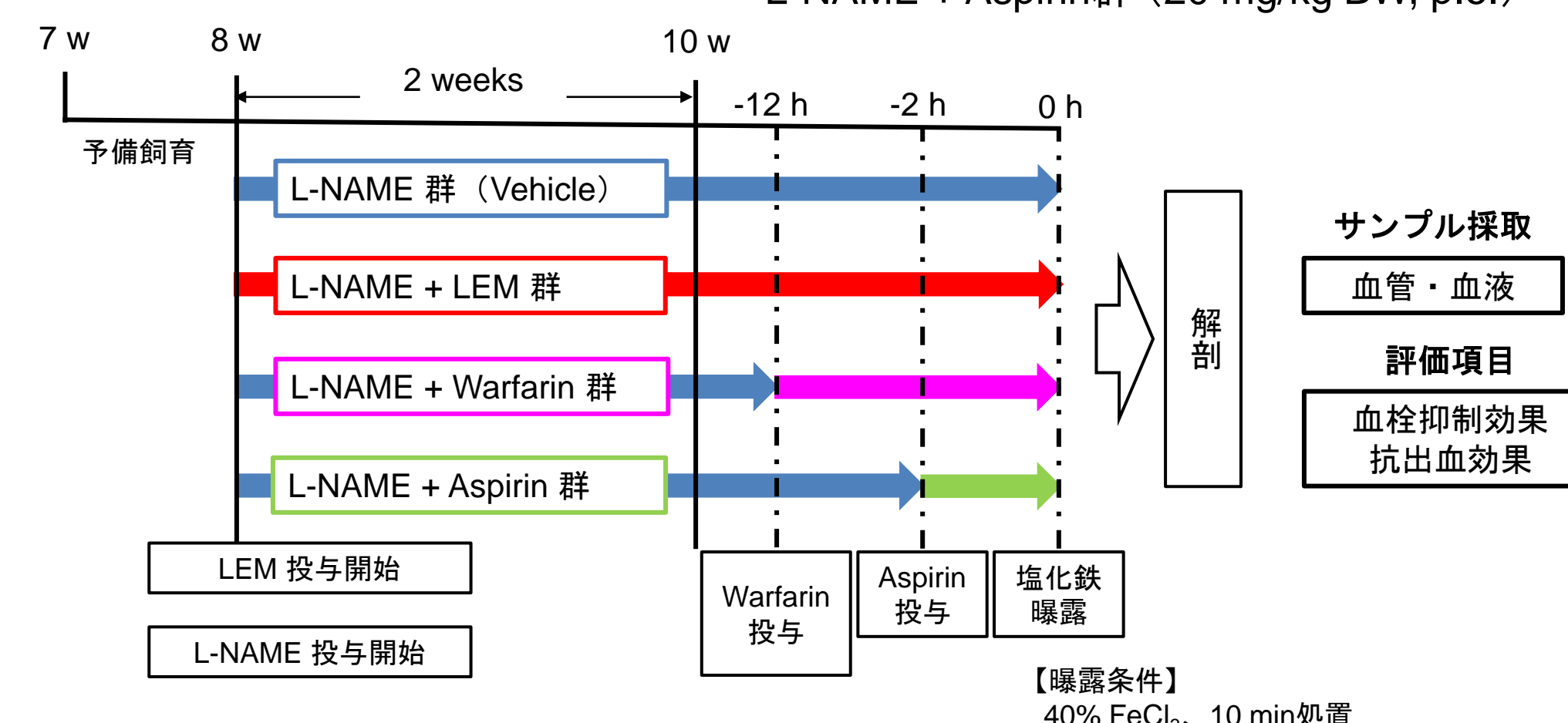


Fig. 6 実験② 動脈硬化モデル

L-NAME群にはL-NAME水を2週間自由飲水させ、動脈硬化モデルを作製した。また、L-NAME処置に加え、LEMを胃ゾンテを用いて経口投与させたL-NAME + LEM群を作製した。

#### 実験①

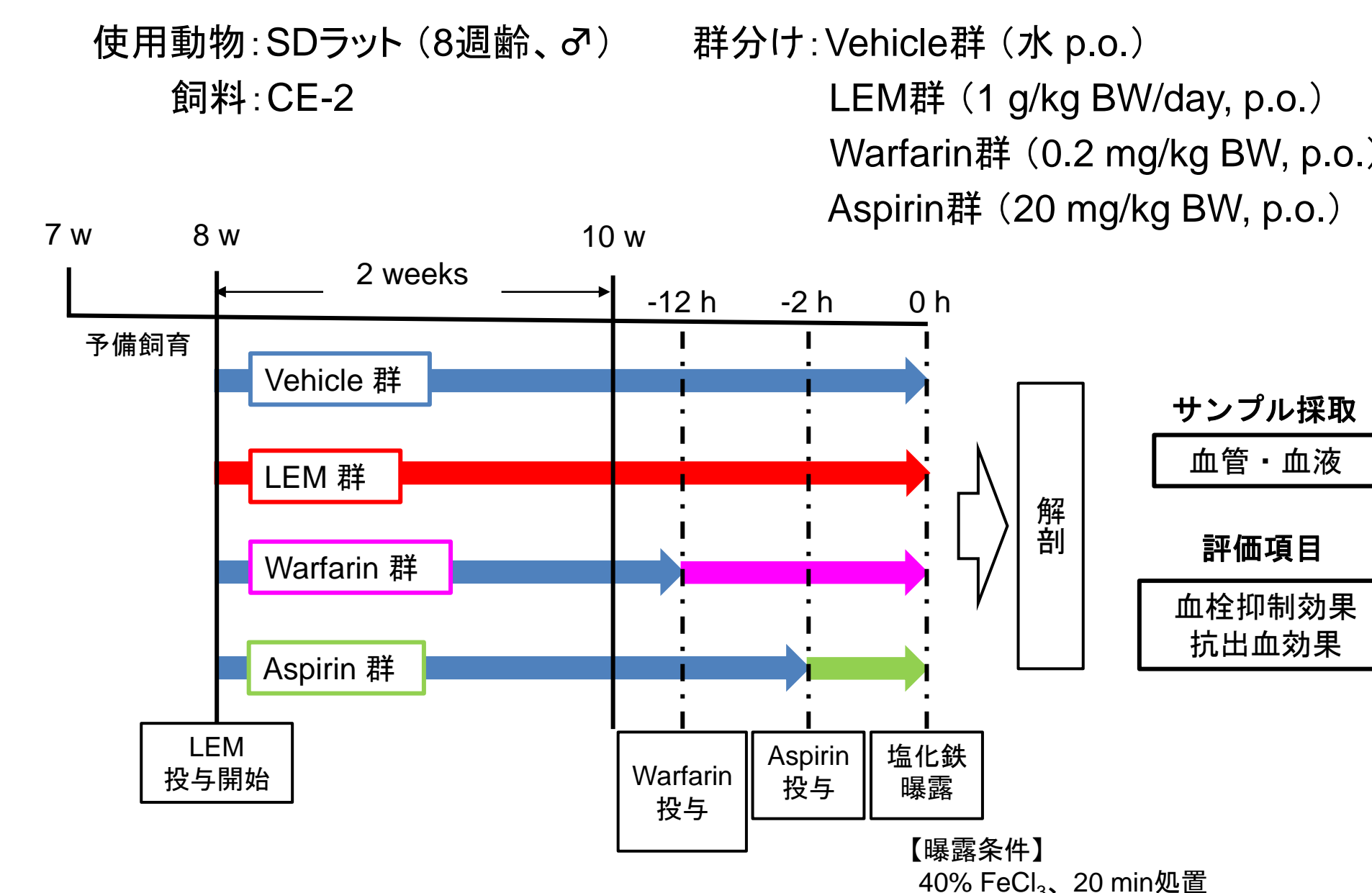


Fig. 7 実験① 正常モデル

LEMを1日1回胃ゾンテを用いて経口投与し、Vehicle群には水を投与した。また、塩化鉄曝露処置12時間前に胃ゾンテを用いてWarfarin、2時間前にAspirinを単回経口投与し、それぞれ、Warfarin群、Aspirin群を作製した。

#### 血小板凝集に与えるLEMの影響

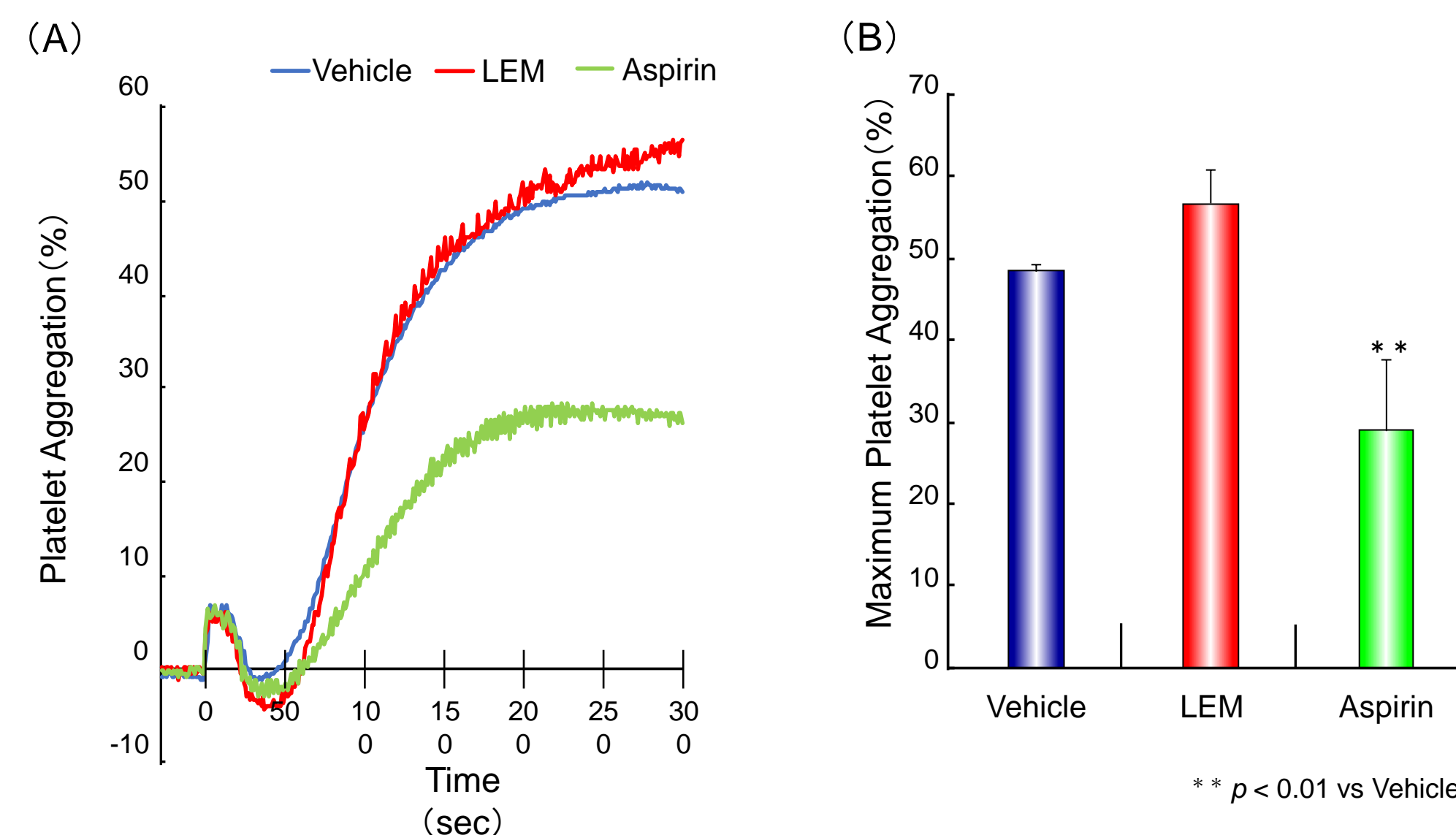


Fig. 5 血小板凝集に与えるLEMの影響 (*in vivo*)

(A)5分間のPRP凝集曲線、(B)最大血小板凝集率を示す。Vehicle群と比較して、ポジティブコントロールのAspirin群では有意な凝集率の減少が確認されたが、LEM群では変化は認められなかった。

#### 動脈硬化モデルラットの血栓形成に与えるLEMの影響

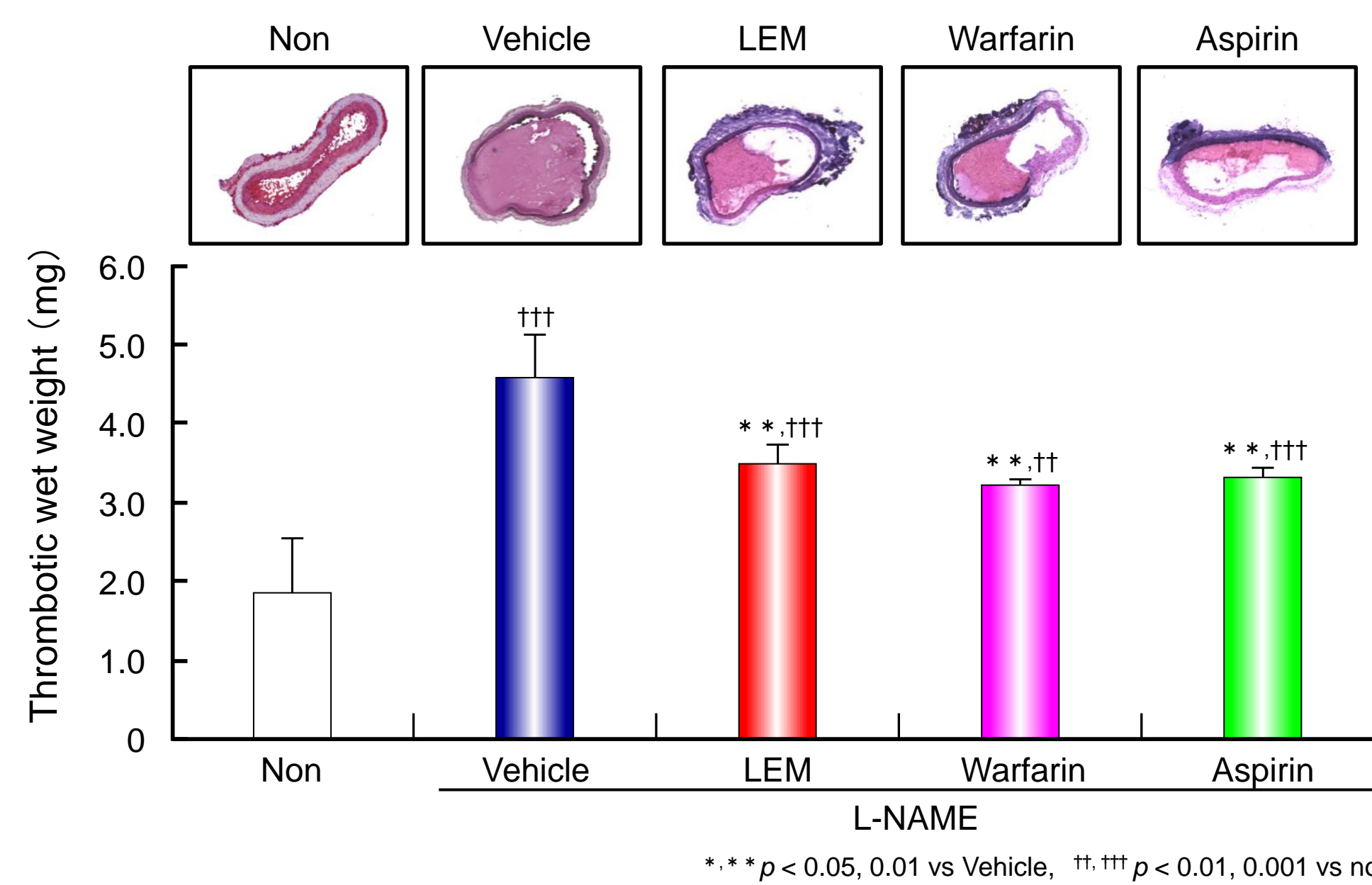


Fig. 7 動脈硬化モデルラットの血栓形成に与えるLEMの影響 (*in vivo*)

Non群と比較して塩化鉄曝露処置したL-NAME群で有意な高値を示した。しかし、L-NAME群(Vehicle)と比較して LEM摂取によって血栓重量の有意な減少が認められた。また、ポジティブコントロールであるL-NAME + Warfarin群やL-NAME + Aspirin群でも血栓重量の有意な減少が認められた。

#### 動脈硬化モデルラットの血小板凝集に与えるLEMの影響

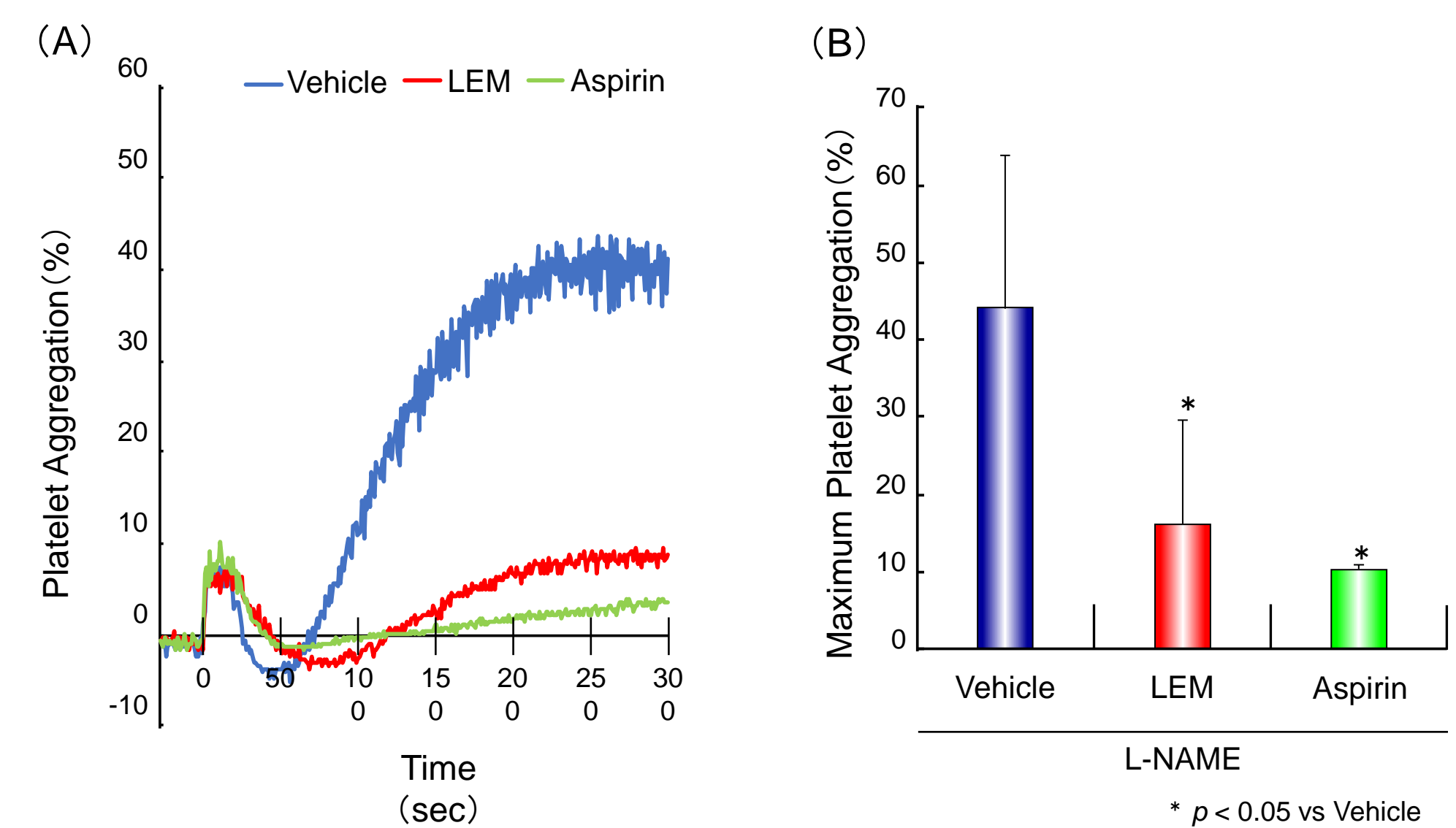


Fig. 8 動脈硬化モデルラットの血小板凝集に与えるLEMの影響 (*in vivo*)

(A)5分間のPRP凝集曲線、(B)最大血小板凝集率を示す。L-NAME群(Vehicle)と比較して、ポジティブコントロールのL-NAME + Aspirin群では有意な凝集率の減少が認められた。また、L-NAME + LEM群においてもL-NAME + Aspirin群と同程度の効果が認められた。

### 結果・考察

本研究は、椎茸菌糸体培養培地抽出物(LEM)の抗血栓効果を明らかにすることを目的に行った。フィブリン凝塊試験では、トロンビンの作用によりフィブリンノーゲンから生成されるフィブリン凝塊の形成に対して、LEM添加時の効果を薬剤あるいは他の食品と比較検討した。その結果、生理食塩水添加によるControlでは、フィブリン凝塊が形成されたのに対してLEM添加によって濃度依存的にこれを抑制した。また、メシマコブやアガリクスなど他のキノコと比較して、その抑制は顕著であった。

LEMは、*in vitro*において抗血栓作用を有する可能性が示唆されたため、次にラットの塩化鉄曝露による血栓形成モデルを用いてLEMの作用を評価した。塩化鉄曝露血栓形成モデルは、塩化鉄の酸化反応により血管の外側から内側へと血管全層の細胞壊死を引き起こし、血管内皮の恒常性を崩壊させる。血管内皮の傷害は、内皮組織化に存在する血管中膜のコラーゲンが露出し、急性の血小板血栓を誘発する。本モデルは臨床における動脈血栓形成と極めて類似しているため、本研究で用いた。その結果、正常ラットにおいてLEMの投与は、血栓重量、血小板凝集いずれにおいてもVehicle群と有意な差は認められなかった。

そこで血栓形成が生じやすい動脈硬化病変に類似したモデルとして、一酸化窒素(NO)合成阻害剤であるL-NAME処置ラットを用いて同様の検討を行った。(NO)は、正常な血管においてL-アルギニンから内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)によって合成され、血管を弛緩させることが知られているが、血管内皮細胞から放出されるNOには血小板の活性化を抑制する作用も有することから血管内における血栓形成を抑制する働きも担っている。一方、動脈硬化発生時には、血管内皮細胞障害が生じているため血管内皮由来のNOが不活性化され、血管収縮反応が増強することで高血圧状態を呈する。L-NAME処置した動脈硬化モデルラットにおいてLEMの投与は、Vehicle群と比較して血栓重量や血小板凝集を有意に減少させることが認められた。

以上の結果から、LEMは血管内皮障害などの動脈硬化病変発症時に抗血栓効果を発揮するとともに、その効果の一因にコラーゲン誘発性血小板凝集能の抑制およびフィブリン凝塊抑制作用が関与していることが示唆された。従って、LEMは抗血栓作用の優れた食品であるとともに日頃から摂取することにより、血栓形成を原因とする疾患の予防に貢献できる可能性が考えられる。今後は、LEMによるコラーゲン誘発性血小板凝集経路の詳細なメカニズム解析を行うとともに、血液凝固因子活性測定装置を用いてフィブリン凝塊に関する血液凝固線溶系因子活性の測定や血管内皮細胞に対する効果についても検討する必要がある。

#### 助成源

本研究は、独立行政法人日本学術振興会学術研究助成基金助成金「血栓性脳梗塞の予防を目的とした機能性食品の探索と抗血栓薬併用時の相互作用解析」(課題番号:18K05538)により実施した。

#### 日本薬学会第142年会 利益相反(COI)の開示

私の今回の演題に関連して、開示すべき利益相反は以下のとおりです。  
② 研究費または奨学金(指定寄附金) ; あり  
(野田食菌工業株式会社)