HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マンネンタケ科霊芝が腸管免疫に与える影響とその機序に関する研究
Author(s)	窪田, 篤人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13620号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13620
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73841
Type	doctoral thesis
File Information	Atsuhito_Kubota.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

マンネンタケ科霊芝が腸管免疫に与える影響と
その機序に関する研究

窪田　篤人

北海道大学大学院生命科学院
臨床薬学専攻
臨床薬剤学研究室

平成 31 年 3 月

目次

序論 1

第一章　マンネンタケ科霊芝による腸管免疫賦活作用

第一節　緒言 3

第二節　実験材料および実験方法 4

第三節　結果 11

第四節　考察 19

第五節　まとめ 21

第一章　第二章　霊芝の有効成分は Ganoderic acid A である

第一節　緒言 22

第二節　実験材料および実験方法 24

第三節　結果 26

第四節　考察 31

第五節　まとめ 32

第三章　霊芝は酸化ストレス病態モデルに対して有効な防御手段となる

第一節　緒言 33

第二節　実験材料および実験方法 34

第三節　結果 36

第四節　考察 45

第五節　まとめ 47

総括 48

参考文献 50

序論

腸管は食物を消化・吸収する器官である[1)]と同時に、ヒトの免疫の約 60 %を担う巨大な免疫器官でもある[2)]。その表面は粘膜から分泌される粘液に覆われており、異物が上皮細胞へ接着することを妨げている[3)]。さらにこれらの防御機構には常在細菌叢 bacterial flora も含まれる[4)]。

これら腸管免疫を担う主要な成分として、免疫グロブリン immune globrin A (IgA) がある。小腸において IgA は主にパイエル板 Peyer's patch (PP) を介して分泌され、管腔内の微生物や外来抗原の増殖、侵入を防ぐなど粘膜表面の防御に深く関与する[4)]。また、小腸に存在する抗菌ペプチドの α-defensin 5 は小腸陰窩底部に存在するパネート細胞 Paneth cell から分泌され、病原微生物の排除と腸内細菌叢の共生に深く関与する[5)]。近年、これらの物質が炎症性疾患[6)]や感染症[7)]など様々な疾患に深く関与することが報告されている[8-10)]。

近年、セルフメディケーションを指向した試みが増えており[11)]、病態の予防・改善を目的とした食品の探索が盛んに行われている[12)]。食品による健康増進効果への期待は諸外国においても高く[13)]、本邦でも利用を希望する者が多い。しかし、食品が直接曝露される腸管に注目した報告は非常に少なく、科学的エビデンスは乏しい[14)]。

我々はこれまでに複数の食品が腸管免疫を賦活する可能性を見出してきた (Table 1)。その中でもマンネンタケ科のキノコである霊芝はほかの食品とは異なる挙動を示している。また、臨床的な需要が高いにも関わらず[13)]、腸管免疫に与える影響についての報告はほとんどない。

Table 1. Food activates IgA production of PP cells

	LPS -			LPS +		
	IgA (ng/mL)	S.D		IgA (ng/mL)	S.D	
control	37.364	3.961		62.339	8.424	
Reishi	42.276	2.474		76.511	5.435	**
EPA	58.452	11.783	**	84.519	17.860	*
DHA	48.824	6.840	*	120.576	35.422	**
GABA	51.837	4.915	*	109.814	12.909	**
5-OP	43.628	4.422		66.666	5.705	

Rats received a single oral administration of reagent, and PP cells were cultured with or without LPS (100 μg/mL) for 72 h. Table (n = 3-5) show mean with standard deviation for more than two independent experiments. *, **; significantly differences (vs controls) were calculated by Student's t test (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

食品を摂取した際の効果を調査し、エビデンスとしての質を高めるためには、まず以下の点が必要と推察される。

1) 実験動物へ直接的に経口投与し、その効果を確認する

2) その有効成分を推定する

3) 病態に対する影響を確認する

そこで本研究では実験動物に対し、霊芝を直接経口投与した際の腸管免疫を評価することを目的とした。指標は IgA や rat α-defensin 5 (RD-5) とした。また、霊芝有効成分を同定するため、含有量の多いガノデリン酸に注目して種々検討を行った。

第二章　マンネンタケ科霊芝による腸管免疫賦活作用

第一節　緒言

マンネンタケ科のキノコである霊芝は古くから日本、中国などで使用されてきた食品である。また、最近のオーストラリアにおける補完代替療法に関する研究では、霊芝の利用を希望する患者が多いことも指摘されており、極東アジアに限らない需要が報告されている [13)]。霊芝には抗腫瘍効果や慢性肝炎、高血圧、ならびに高血糖の改善効果 [15)]、リンパ球増殖を調節するなどの免疫調節効果を有すること等が報告されている [16)]。

しかし、免疫賦活作用を期待して利用されるにも関わらず、霊芝が腸管免疫に与える影響について不明な点が多いのが現状である。当研究室では、これまでに霊芝がヒト小腸様モデル細胞として汎用される caco-2 細胞に与える影響について検討してきたが、 *in vivo* での検討は行われていない。したがって、*in vivo* 評価系を用いて霊芝が腸管免疫に与える影響を明らかにすることは、食品として摂取される霊芝が実際にヒトへ与える影響を推察する一助となることが想定される。小腸における RD-5 やラットパイエル板初代培養系は、腸管免疫を評価する指標として、それぞれ利用されている [17, 18)]。そこで本章では、これらの評価系を用いて霊芝の腸管免疫賦活作用について詳細な検討を行った。RD-5 は mRNA 量をリアルタイム PCR によって、パイエル板初代培養系は上清中の IgA 等を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) を用いることで評価した。また、その機序について免疫関連遺伝子の自然欠損系を使用して考察したので以下に詳述する。

第二節　実験材料および実験方法

ｉ) 使用薬物・試薬

マンネンタケ科霊芝は北海道霊芝株式会社様より提供頂いた。本研究で用いた霊芝の形状、加工に関する情報は Yajima らの報告の通りであり [19]、Leader Food Dryer ST-30A (Kuroda Industry Co. Ltd.) を用いて乾燥後に粉砕し、これを飲用水に懸濁した後、ゾンデ管を用いて強制経口投与した。

その他使用した主な試薬と購入先を以下に示す。

試薬名	購入先
Lipopolysaccharide	富士フイルム和光純薬
RPMI-1640 培地	富士フイルム和光純薬
StemSure® 10mmol/l 2-メルカプトエタノール溶液(×100)	富士フイルム和光純薬
アガロース S	富士フイルム和光純薬
エタノール(99.5)	富士フイルム和光純薬
塩化ナトリウム	富士フイルム和光純薬
セボフルラン	ナカライテスク
リン酸水素二ナトリウム	ナカライテスク
リン酸二水素カリウム	ナカライテスク
塩化カリウム	関東化学

その他の試薬は Sigma-Aldrich、富士フイルム和光純薬、ナカライテスク等の特級および生化学用のものを用いた。

ⅱ) 使用動物

実験動物は 7 週齢 Wistar 雄性ラット、7 週齢 C3H/HeJ, C3H/HeN 雄性マウス (ホクドー) を使用した。全てのラット (190-220 g) 及びマウス (20-25 g) は 23 ± 2 ℃、湿度 60 ± 10%の環境下で飼育された。明暗サイクルは 12 時間であり、新鮮水道水、ローデントダイエット EQ (5L37) は自由摂食とした。経口投与はゾンデによって、ラットは 1 mL / kg、マウスは 0.1 mL / kg の用量で行った。本検討におけるすべての動物実験は国立大学法人北海道大学　動物実験に関する規定に則り行われた。

ⅲ) パイエル板初代培養系

パイエル板の初代培養系は Takano らの報告に従った[20]。セボフルランにより麻酔した Wistar 雄性ラットを断頭、瀉血することで安楽死させた。その後、小腸を摘出し、滅菌 PBS(-)内に保存した。すべてのパイエル板を切除した後、1 型コラゲナーゼ溶液(1 mg / mL)内でそれらを細断し、37℃で 1 時間インキュベートした。次に 40 μm メッシュのセルストレーナーで濾し、コラゲナーゼ溶液を遠心(1,500×g, 5 min)し、溶液を吸引抜去した。細胞が 2.0×10^6 細胞 / mL になるよう RPMI-1640 培地(5% FBS、50 μM 2-メルカプトエタノール、1%ペニシリン及びストレプトマイシン)で調製し、LPS の添加、非添加に分け 24 穴プレートで培養し、72 h 後に上清を回収した。

ⅳ) 細胞生存率

パイエル板初代培養系細胞の生存率は 0.4% トリパンブルー(BIO-RAD)を用いた。パイエル板初代培養系細胞懸濁液 10 μL をトリパンブルー溶液と等量混合し、TC20™ 全自動セルカウンター (BIO-RAD) を使用して細胞数及び細胞生存率を測定した。

ⅴ) IgA 及び TNF-α の測定

パイエル板初代培養系細胞の上清から ELISA を使用しラット及びマウス IgA (Life Diagnostics, Inc、Immunology Consultants Laboratory, Inc) 、ラット TNF-α (Life Technologies, Carlsbad) を測定した。ELISA 用プレートにサンプルを 100 μL 入れ、45 min 室温でインキュベートした。各種溶液を除いた後、Wash buffer を 200 μL 入れ、直ちに除去することを 5 回繰り返した。その後に Enzyme conjugate を 100 μL 入れ 45 min 室温でインキュベートした。先述の Wash を再度行い、TMB Reagent を 100 μL 入れ 20 min 遮光し室温でインキュベートした。反応停止液を 100 μL 入れた後、450 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。

ⅵ) DNA 抽出法

ソムノペンチルによる麻酔下で断頭、瀉血することで安楽死させたラットから小腸を摘出し、空腸、回腸をそれぞれ 3 cm 切除した。内容物を滅菌 PBS (-) で洗浄後、ホモジナイズした。ISOGEN Ⅱ 1 mL を加えて激しくボルテックスし、RNase free 水として DEPC 水を 0.4 mL 加え転倒混和した。室温で 15 min 静置した後、12,000 ×g で 15 min 遠心を行い、上清を製品の指示に従い回収した。等容量のイソプロパノールを加え転倒混和し、室温で 10 min 静置し

た後、12,000 ×g で 8 min 遠心分離を行った。その後、アスピレーターを使用し上清を抜去、0.5 mL の 75% エタノールを加え 8,000 ×g で 3 min 遠心し再度エタノールを除去することを 2 回繰り返した。これによって得られた沈殿を 10-30 µL の RNase free 水で溶解し RNA 溶液とした。その後、以下の式を用いて total RNA 濃度を算出した。

Total RNA concn. = O.D. 260 nm × Dilution rate × 40 (ng / µL)

その後逆転写反応を ReverTra Ace (Toyobo) を用いて行った。Table 2 に示す反応液を調製し、30℃ にて 10 min、その後 42℃ にて 60 min、最後に 99℃ にて 5 min の条件で反応させた。

Table 2 Composition of reaction sokution for reverse transcription

Component	Volume
5 × RT Buffer	2 µL
dNTP Mix (10 mM each dNTP)	1 µL
Random primer (150 ng / µL)	0.5 µL
ReverTra Ace	0.5 µL
Template RNA (1 µg)	Variable
Nuclease-free water	Variable
Total volume	10 µL

ⅶ) Real time PCR 法

Table 3 に示した塩基配列およびプロダクトサイズのプライマーを使用し、それぞれの mRNA 量を KAPA SYBR Fast qPCR kit (KAPA Biosystems) を用いた Real time PCR 法で定量した。反応及び検出には LightCycler 480 II System

(Roche Diagnostics) を使用した。Table 4 に示す反応液を調製し、Chart 1 の条件で反応させた。

Table 3 Primer List

Gene	GenBank Accession No.	Sequences Product	size (bp)
Rat DEFA 5 (RD-5)	NM_1013053	Forward: 5′ -GCA GGT GGA AGC TGA ACC TA-3′ Reverse: 5′ -ATG GGG CTT CCG TAT CTC TT-3′	222
Rat SOD 1	NM_017050	Forward: 5′ -TGC AGG ACC TCA TTT TAA TCC T-3′ Reverse: 5′ -TCC AGC ATT TCC AGT CTT TGT A-3′	247
Rat SOD 2	NM_017051	Forward: 5′ -AAT GCC GCC TGC TCT AAT C-3′ Reverse: 5′ -TGG CTA ACA TTC TCC CAG TTC-3′	164
Rat SOD 3	NM_012880	Forward: 5′ -TCT TGT TCT GCA ACC TGC TAC-3′ Reverse: 5′ -GTG TCG CCT ATC TTC TCA ACC-3′	121
Rat TLR4	NM_019178	Forward: 5′ -AGA CAT CCA AAG GAA TAC TGC AA-3′ Reverse: 5′ -GCC TTC ATG TCT ATA GGT GAT GC-3′	178
Rat TNF-α	NM_012675	Forward: 5′′ -CTGAACTTCGGGGTGA-3′′ Reverse: 5′′ -GGCTTGTCACTCGACTTTTGAGA-3′′	122
Rat beta-actin	NM_031144	Forward: 5′ -CTA TCG GCA ATG AGC GGT TC-3′ Reverse: 5′ -GAG GTC TTT ACG GAT GTC AAC G-3′	134

Table 4 Component of reaction solution for real time PCR

Component	Volume
Master mix	5 µL
Primer mic (5 µM each)	0.4 µL
Template DNA	2 µL
Nuclease-free water	2.4 µL
Rox Low	0.2 µL
Total volume	10 µL

50 ℃　1 min
↓
95℃　5 min
↓
95 ℃　3 sec
↓
58 ℃　10 sec
↓
72 ℃　1 sec

40 cycles

Chart 1 Procedure for real time PCR

ⅷ) RT-PCR 法

Table 3 で示した遺伝子の発現は KAPATaq Extra PCR kit (KAPA Biosystems) を用いた RT-PCR 法で確認した。逆転写後の cDNA を用い Table 5 に示す反応液を調製し、Chart 2 に示す条件で反応を行った。反応には iCyclerTM (BIO-RAD) を使用した。PCR 産物を 2% agarose gel にアプライし、TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM acetic acid, 1mM EDTA) 中でサブマリン電気泳動装置 MARINE22 (Wako) を用いて電気泳動を行った。泳動終了後、遮光下においてゲルを ethidium bromide で染色し、LAS-1000UVmini (FUJIFILM) でバンドを観察した。

Table 5 Composition of reaction solution for RT-PCR

Component	Volume
cDNA (1 µL / 10 µL)	0.5 µL
Nuclease-free water	6.05 µL
KAPATaq Extra buffer	2 µL
25 mM $MgCl_2$	0.6 µL
dNTP Mix (10 mM each dNTP)	0.2 µL
KAPATaq Extra DNA Polymerase (5U / µL)	0.05 µL
Primer mix (5 µL)	0.6 µL
Total volume	10 µL

viii) 統計解析

統計学的有意差は、一元配置分散分析（ANOVA）を行い、次いで Tukey 検定あるいは Dunnett 検定を用いて算出、判定した。 差は、$p < 0.05$ で統計的に有意であるとした。

第三節　実験結果

第一項　霊芝はラットパイエル板からの IgA 分泌を上昇させる

まず初めに、霊芝がラットパイエル板初代培養系細胞からの IgA 分泌に与える影響を検討した。

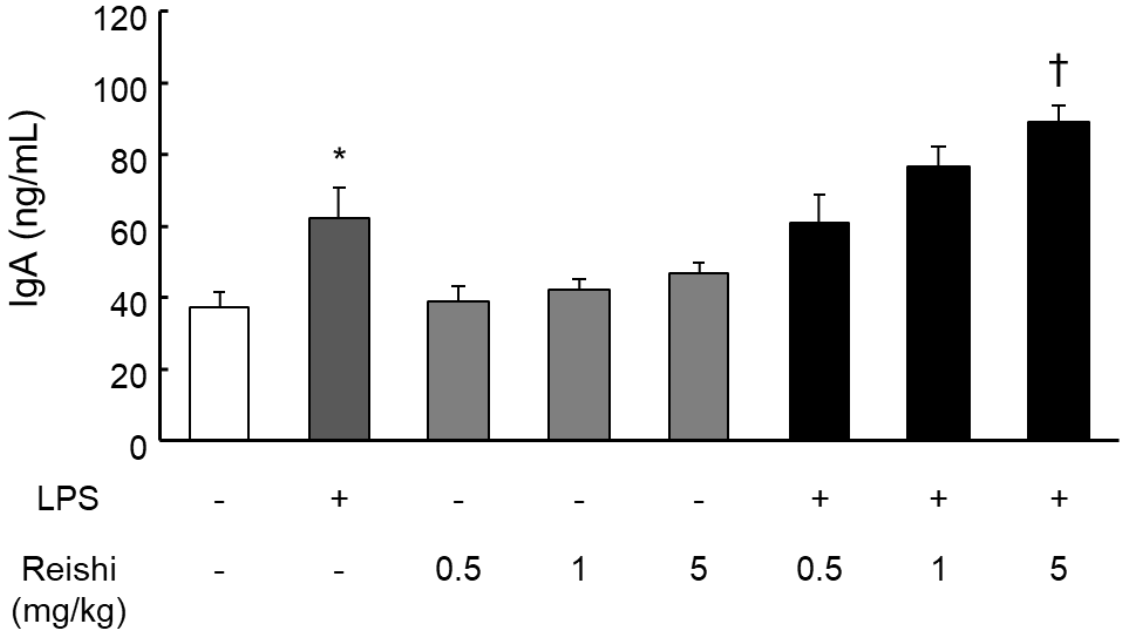


Fig. 1. Effects of Reishi on IgA production in cultured rat PP cells in the absence or presence of LPS.

Rats received a single oral administration of Reishi (0.5, 1, and 5 mg / kg), and PP cells were cultured with or without LPS (100 μg / mL) for 72 h. The column (n = 5) show the mean with standard deviation for more than two independent experiments. *, †; significantly differences (vs *; Reishi and LPS - groups, †; Reishi – and LPS + groups) were calculated by Tukey's test (*: $p < 0.05$; †: $p < 0.05$).

その結果、霊芝は LPS 添加群のみ投与量依存的に IgA 分泌を上昇することが示された(Fig.1)。そこで、霊芝投与群におけるパイエル板の細胞生存率を検討した。

Table 6. PP cell viability

	control	Reishi 1 mg/kg	Reishi 5 mg/kg
mean	100.00	95.77	96.92
S.D	6.35	9.86	9.16

その結果、パイエル板の細胞生存率に有意差は認められなかったことから、霊芝の IgA 分泌亢進に細胞生存率は関与していないことが示唆された(Table 6)。従って霊芝の IgA 分泌亢進には、細胞生存率以外のシグナルが関与する事が考察された。

次に、霊芝が腸管免疫に与える影響を明らかにすることを目的に、空腸、回腸における RD-5 mRNA 量の変動をリアルタイム PCR で測定した。

第二項　霊芝は空腸、回腸の RD-5 mRNA 量を上昇させる

霊芝が腸管免疫に与える影響を明らかにする目的で、霊芝経口投与 24 h 後の空腸、回腸 RD-5 mRNA 量を測定した。

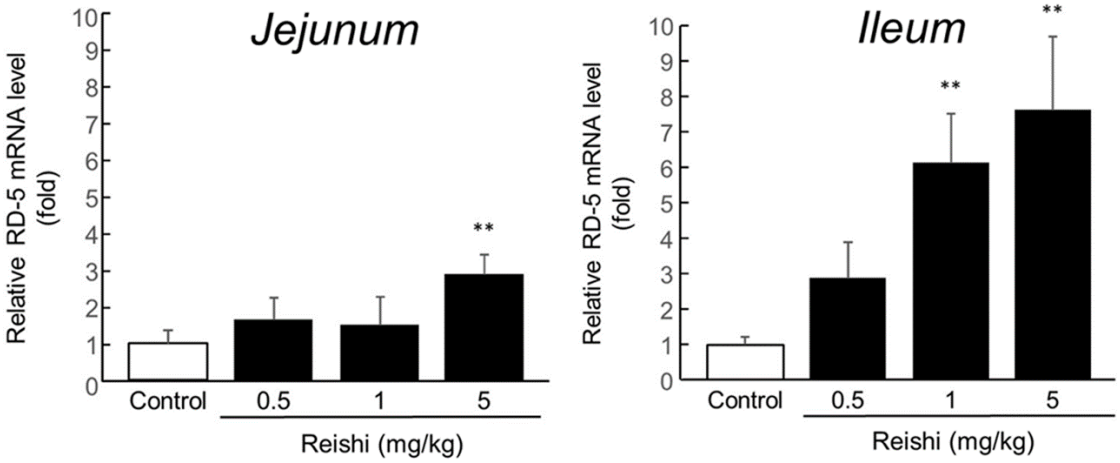
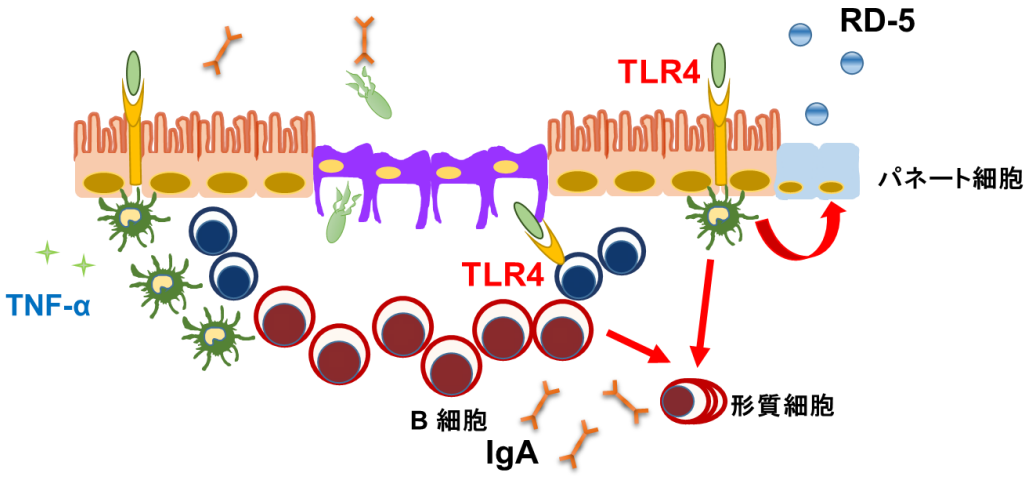


Fig. 2. Effect of Reishi on RD-5 mRNA levels in the rat jejunum and ileum.

RD-5 mRNA levels in the rat ileum after a single oral administration of Reishi (0.5-5 mg / kg). The column (n = 5) show mean with standard deviation for more than two independent experiments. *, **; significantly differences (vs controls) were calculated by Dunnett's test (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

その結果、霊芝の経口投与は空腸、回腸 RD-5 mRNA 量を投与量依存的に上昇させ、その傾向は特に回腸において顕著であった。Paneth 細胞の発現が空腸に比べ回腸に多いことが報告されている[21]ことから、霊芝による RD-5 mRNA 量の上昇が回腸でより顕著であった理由は、Paneth 細胞の分布によるものであると考察した。



IgA の分泌や RD-5 mRNA 量の発現に関与する要因の 1 つに Toll like receptor 4 (TLR4) がある。IgA は TLR 4 で感作された樹状細胞や T 細胞より分泌亢進のシグナルを受け、RD5 もまた、同様に樹状細胞からの調節を受けることが報告されている [22, 23]。そこで、次に霊芝が TLR 4 の発現に及ぼす影響を明らかにすることともに、その下流に存在し炎症に関連する腫瘍壊死因子 (TNF-α)[24] についても検討を行った。

第三項　霊芝の腸管免疫賦活作用には TLR4 が関与する

霊芝の腸管免疫賦活作用に TLR4 が関与するかを明らかにする目的で、空腸、回腸、パイエル板における TLR4 mRNA 量の変化を測定した。

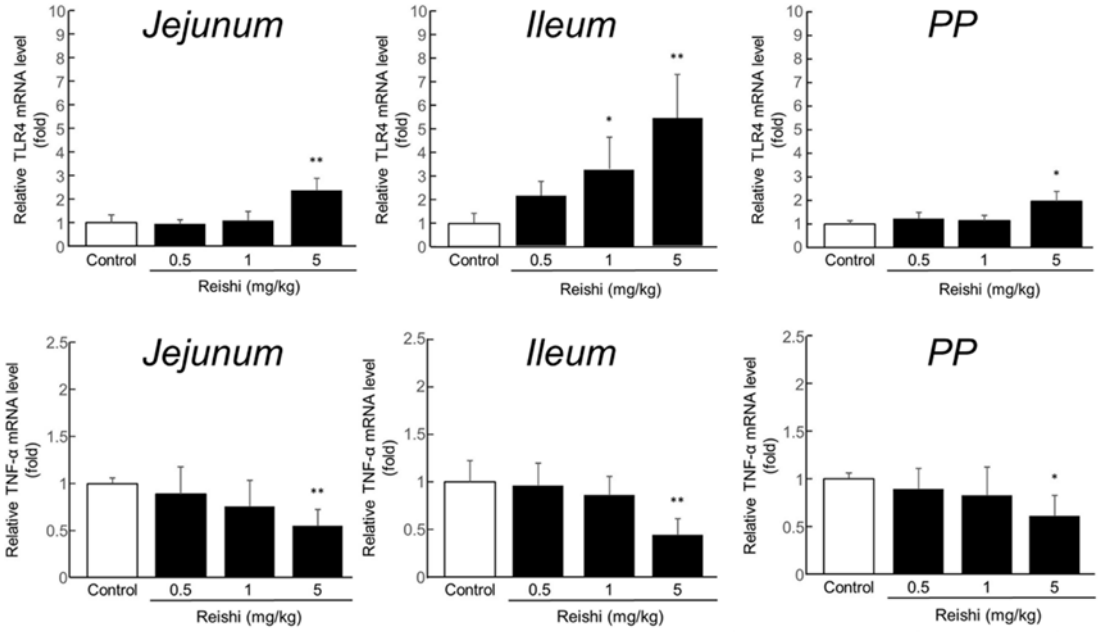


Fig. 3. Effect of Reishi on TLR4, TNF-α mRNA levels in the rat jejunum, ileum, and PP cells.

TLR4, TNF-α mRNA levels in the rat ileum after a single oral administration of Reishi (0.5-5 mg / kg). The column (n = 5) show mean with standard deviation for more than two independent experiments. *, **; significantly differences (vs controls) were calculated by Dunnett's test (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

その結果、空腸、回腸、パイエル板のいずれにおいても TLR4 mRNA 量が上昇し、その傾向は回腸において顕著であった(Fig. 3) 。この結果は RD-5 mRNA 量の傾向と一致することから、霊芝の腸管免疫賦活作用に TLR4 が関与するこ

とが示唆された。

TLR4 の過剰な発現は炎症を誘導することが報告されている [25]。そこで、霊芝の安全性を確認する意味も含め、空腸、回腸、パイエル板それぞれにおけるTNF-α mRNA 量を測定した。その結果、空腸、回腸、パイエル板のいずれにおいても mRNA 量の増加は確認されなかった(Fig. 3)。

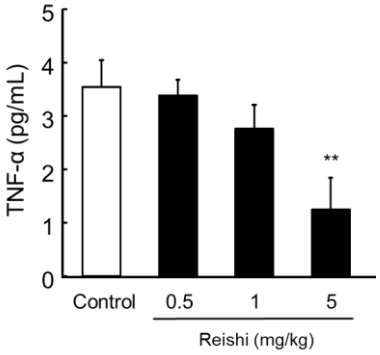


Fig. 4. Effect of Reishi on TNF-α secretion from PP cells.

Rats received a single oral administration of Reishi (0.5, 1, and 5 mg / kg). The column (n = 5) are given as the means with standard deviation of more than two independent experiments.

また、パイエル板初代培養細胞の TNFα 分泌をELISA を用いて測定した結果、同様に増加は確認されなかった(Fig. 4)。従って、霊芝の経口投与は TLR4 mRNA 量を上昇させるが、過剰な炎症を誘導しないことが示唆された。

以上の結果を受け、霊芝の腸管免疫賦活作用に TLR4 が関与するかを詳細に明らかにすべく、自然欠損系を用いた検討を行った。

第四項　霊芝の腸管免疫賦活作用は TLR4 自然欠損系では観察されない

C3H/HeJ マウスはエンドトキシンである LPS に対して高い耐性を有するマウスである。その理由は LPS の受容体である TLR4 をコードする遺伝子のうち 712 番目のプロリンがヒスチジンに変異しているためである事が報告されている[26)]。そこで我々は TLR4 自然欠損系である C3H/HeJ と野生型である C3H/HeN マウスを使用し、霊芝のパイエル板初代培養系細胞の IgA 分泌に与える影響を検討した。

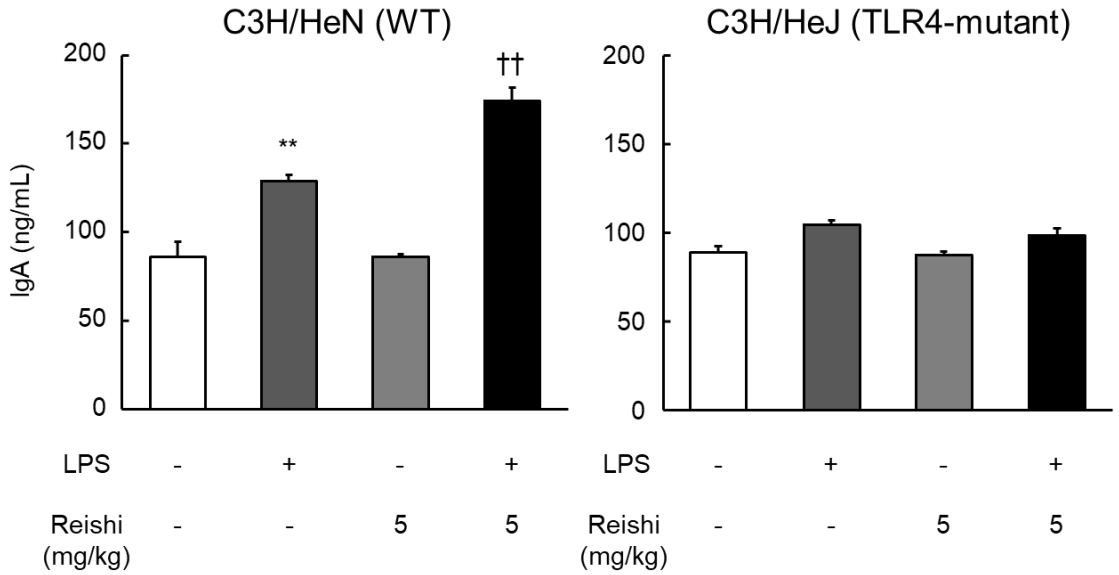


Fig. 5 Effect of Reishi on IgA production in cultured mouse PP cells in C3H/HeN (WT) and C3H/HeJ (TLR4 mutant) mice.

C3H mice received a single oral administration of Reishi (5 mg / kg), and PP cells were cultured with or without LPS (100 μg / mL) for 72 h. The column (n=3) show the mean with standard daviation for more than two independent experiments. **: significantly different from the LPS(-) and Reishi(-) at $p < 0.01$. ††: significantly different from the LPS(+) and Reishi(-) at $p < 0.01$.

その結果、野生型である C3H/HeN マウスでは LPS の添加により IgA 分泌は有意に上昇し、霊芝の経口投与はその上昇をさらに増大させた(Fig. 5)。しかし、自然欠損系である C3H/HeJ マウスでは LPS の添加、及び霊芝の経口投与による IgA 分泌の上昇は認められなかった(Fig. 5)。従って、霊芝の腸管免疫賦活作用には TLR4 が関与していることが示された。

第四節　考察

霊芝は補完代替療法として本邦や中国のみならず、諸外国でも注目を集めている。したがって、霊芝が腸管免疫に与える影響を明らかにすることは、食品を利用したセルフメディケーションに関するエビデンスを構築する観点から極めて重要である。そこでまず腸管免疫に与える影響を明らかにすべく、ラットパイエル板初代培養細胞を構築し、LPS の有無による IgA 分泌の影響を確認した。その結果、LPS の刺激によりラットパイエル板初代培養細胞からの IgA 分泌は有意に上昇した(Fig. 1)。

霊芝の経口投与は、ラットパイエル板初代培養細胞からの IgA 分泌を TLR4 のリガンドである LPS 添加群においてのみ有意に増加させた(Fig. 1)。
また、IgA と同様に腸管免疫の主要な防御因子であり、腸内細菌叢との共生に関与する RD-5 についても霊芝経口投与後 mRNA 量が有意に上昇することが示された(Fig. 2)。その上昇は空腸に比べ、回腸において顕著であったが、その理由は RD-5 を産生する Paneth 細胞が回腸に多いことに起因すると考えられる。IgA 及び RD-5 の上昇は異物からの防御に重要であり、霊芝の経口投与は腸管免疫を賦活することが示唆された。

Ahmadi らは霊芝が炎症に関与する細胞であるヒト末梢血由来単球の CD40/CD80 の発現やマウス腹腔マクロファージの NO 産生に影響を与えることを報告し[27, 28]、Gupta らは霊芝の抗原性に関する報告をしている[29]。また、パイエル板や Paneth 細胞に関わるシグナルとしては TLR4 が知られている。空腸、回腸、パイエル板における TLR4 mRNA 量を検討したところ、霊芝経口投与群では Control 群に比べ特に回腸で TLR4 mRNA 量が顕著に上昇する事が明らかとなった。これは、先述の RD-5 mRNA 量の結果と一致するこ

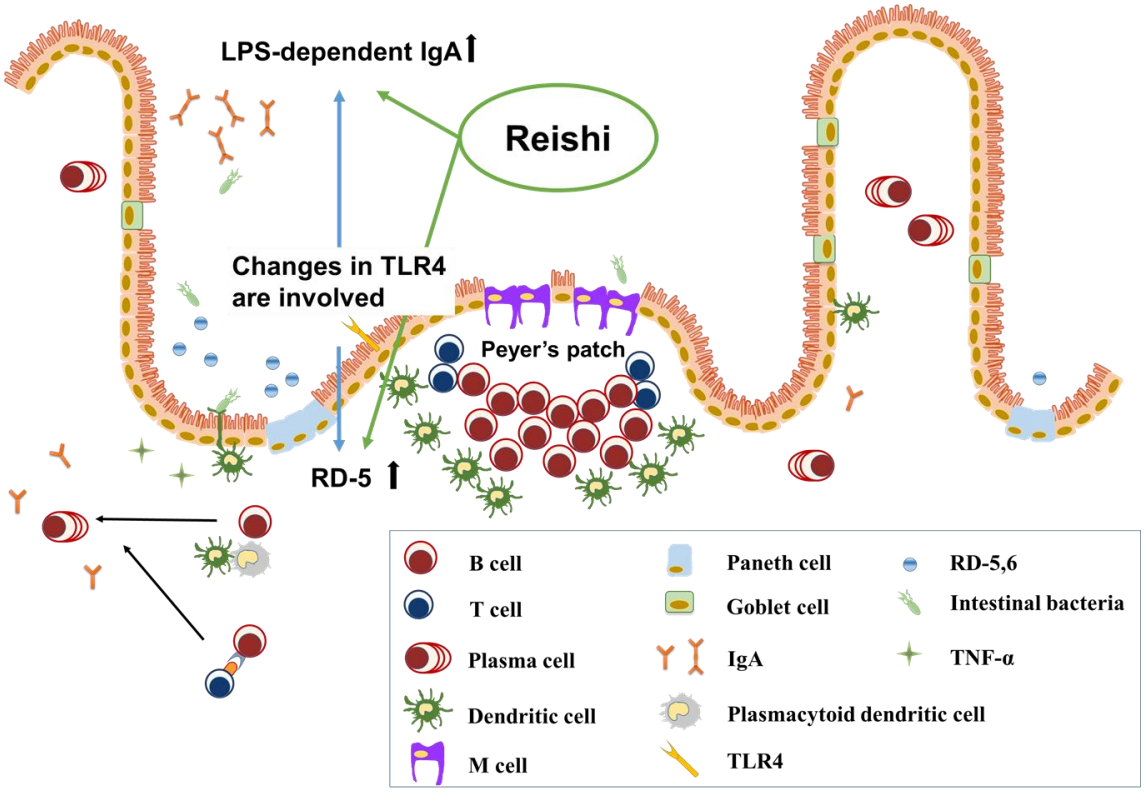
とから霊芝の腸管免疫賦活作用に TLR4 が関与することが示唆された。TLR4 は過剰な炎症を誘導することが知られていることが、炎症性サイトカインである TNF-α について検討を行ったところ、空腸、回腸、パイエル板のいずれにおいても霊芝による有意な上昇は確認されず(Fig. 3)、パイエル板初代培養細胞からの TNF-α 分泌も上昇は確認されなかった(Fig. 4)。従って霊芝は過剰な炎症を誘導せず、腸管免疫を賦活することが示唆され、セルフメディケーションを指向する上において過剰な炎症を誘導する可能性は低いと考える。

Park らは食品が TLR4 経路を介して樹上細胞の成熟を促すこと C3H/HeJ マウスを使用して報告している [30]。そこで TLR4 の関与を詳細に明らかにすべく、TLR4 の自然欠損系である C3H/HeJ マウスを用いた検討を行った。その結果、野生型 TLR4 である C3H/HeN マウスではラットと同様の LPS 添加群のみ IgA 分泌上昇が確認された(Fig. 5)が、自然欠損系である C3H/HeJ マウスではパイエル板初代培養細胞からの IgA 分泌上昇はいずれの群においても確認されなかった(Fig. 5)。よって、霊芝の腸管免疫賦活作用は TLR4 が関与することが示された。

近年、食品による免疫賦活を指向した試みが多数行われており、本邦において特定保健用食品として認可された例も存在する。今回使用された霊芝の投与量はアメリカ食品衛生局(FDA)が定めるヒト等価換算により求めた場合、約 1 mg / kg の投与量である。成人男性の場合、約 60 mg であり一般的に使用される量から逸脱しない。今後は霊芝の有効性をヒトにおいても確認し、セルフメディケーションに資するエビデンス構築の一助としたい。

第五節　まとめ

霊芝の有効性については様々な検討が行われているものの、直接経口摂取することで免疫に与える影響の報告は少なく、特に腸管免疫の重要な指標である IgA や α-defensin 5 に注目した報告はない。そこで本章では、霊芝を直接経口投与した際の腸管免疫に与える影響を詳細に検討した。その結果、霊芝は IgA 分泌や RD-5 mRNA 量を上昇させ、その機序には TLR4 が関与することを TLR4 自然欠損系により明らかとした。また、TLR4 の関与により過剰な炎症が誘導される可能性は低いことも併せて示された。霊芝は食品として摂取されることから、投与量を食品として摂取する量から逸脱することなく設定し、霊芝の有効性の一端を明らかとした。このことは、霊芝をセルフメディケーションに利用する上で有効な知見になり得ると考える。



第三章　霊芝の有効成分は Ganoderic acid A である

第一節　緒言

第一章において霊芝の経口投与が腸管免疫を賦活させることが明らかとなった。霊芝の有効成分は β-D グルカン等が報告されているが、Yajima らは、その他の有効成分として霊芝固有の成分であるガノデリン酸を報告している[19]。ガノデリン酸はラノステロール由来のトリテルペンであり、複数の種類が存在する。その中でも最も多く含まれるのはガノデリン酸 A (GA-A) (Fig. 6) であり、一般的に約 0.1-0.2 % 程度含まれる。

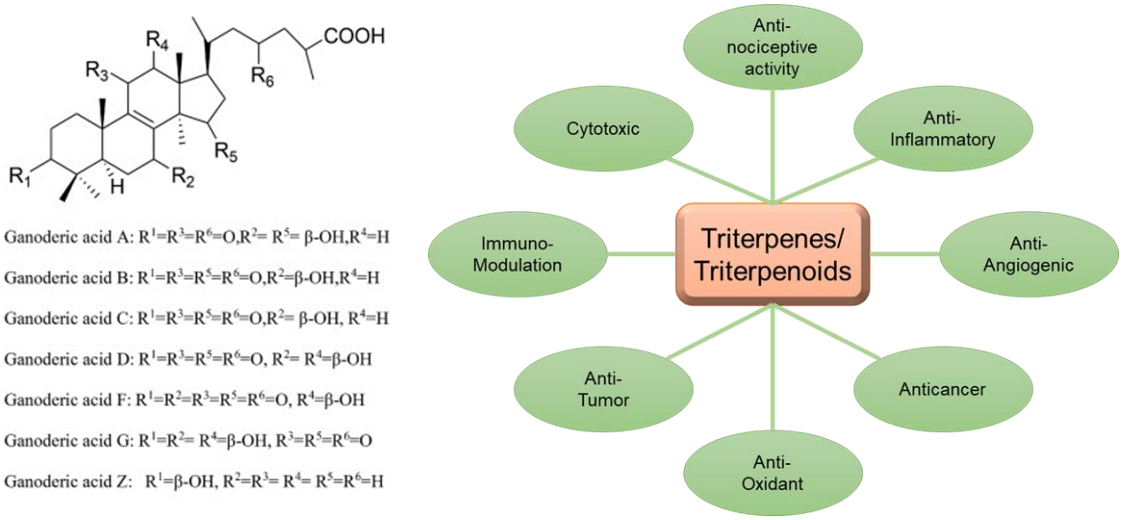


Fig. 6. Pharmacologically active compounds of G. luxidum and their pharmacological properties and Structural formula of ganoderic acid A.

GA-A は様々な作用を有することが報告されており(Fig. 6)、Koyama らは抗侵害刺激効果を[31]、Radwan らは免疫調節作用を有することを報告している[32]。これらを踏まえると霊芝の腸管免疫賦活作用に GA-A が関与している可能性が推察される。

しかしながら、一般に使用される霊芝と等量の GA-A を経口投与した検討は無く、特に Paneth 細胞から分泌される α-defensin 5 に及ぼす影響は明らかにされていない。加えて第一章で霊芝の腸管免疫賦活作用に TLR4 が関与していることから、GA-A が主成分である場合、これらの影響も同様である可能性が推察される。

よって本章では GA-A が豊富に含まれる画分を霊芝から抽出したものと購入した GA-A そのものを使用し、霊芝による腸管免疫賦活作用の有効成分を明らかにすることを目的とし種々検討を行った。

第二節　実験材料及び方法

ⅰ) 使用薬物・試薬

第一章　第二節　ⅰ) で述べた。

ⅱ) 使用動物

第一章　第二節　ⅱ) で述べた。

ⅲ) パイエル板初代培養系

第一章　第二節　ⅲ) で述べた。

ⅳ) ELISA

第一章　第二節　ⅴ) で述べた。

ⅴ) DNA 抽出法

第一章　第二節　ⅵ) で述べた。

ⅵ) RT-PCR, Real time PCR 法

第一章　第二節　ⅶ) で述べた。

ⅶ) 統計解析

第一章　第二節　ⅷ) で述べた。

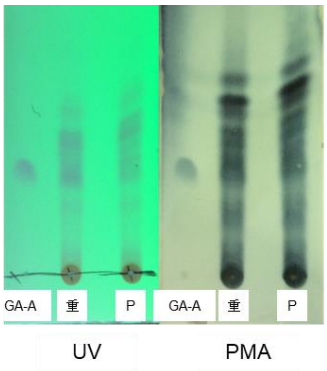
viii) 霊芝抽出法

GA-A を豊富に含む画分を北海道科学大学薬学部　鈴木夏子　准教授及び鈴木裕治　講師からご提供いただいた。

霊芝乾燥粉末（50.04 g）を超音波処理し、99.5%エタノール (400 mL) で抽出し、90 分間撹拌後、40℃で得られた混合物を漏斗でろ過し、30℃で減圧濃縮することで粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、カラムを Hexan-AcOEt (80:20) → (0:100) のグラジエントにより溶出し、各種画分を得た。さらに GA-A を豊富に含む CHCL3-MeOH (50:1) で溶出された画分が得られた。

霊芝抽出物に含まれる GA-A は薄層クロマトグラフィーにより確認した。

Fig.7 の通り行い GA-A の含有が確認された。



TLC プレート：Merck, PLC Silica gel 60 F_{254}, 1 mm
UV 波長：254 nm
呈色試薬：PMA (リンモリブデン酸)
展開溶媒：Chloroform / MeOH = 10 / 1
GA-A：Ganoderic acid A
P：Product
重：Ganoderic acid A + Product

Fig. 7. GA-A in Reishi extract by TLC

第三節　実験結果

第一項　霊芝抽出物は腸管免疫を賦活する

まず初めに、霊芝抽出物をラットへ経口投与し、IgA 分泌を測定した。

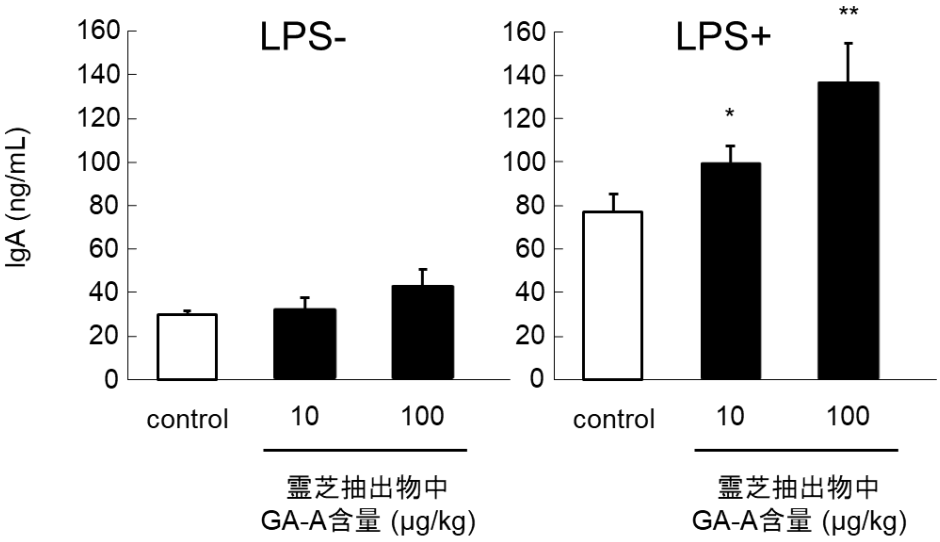


Fig. 8. Effects of Reishi-extract on IgA production in cultured rat PP cells in the absence or presence of LPS.

Rats received a single oral administration of Reishi-extract for GA-A (10, 100 μg / kg), and PP cells were cultured with or without LPS (100 μg / mL) for 72 h. The column (n = 3) show mean with standard deviation for more than two independent experiments. *; significantly differences (vs controls of LPS -), †; significantly differences (vs controls of LPS +) were calculated by Dunnett's test (*: $p < 0.05$).

その結果、GA-A を豊富に含む霊芝抽出物の経口投与は、第一章で示した霊芝の結果と同様に LPS 添加群においてのみパイエル板初代培養系細胞からの

IgA 分泌を有意に上昇させた(Fig. 8)。また、腸管免疫を評価するために RD-5, TLR4 mRNA 量を検討した。

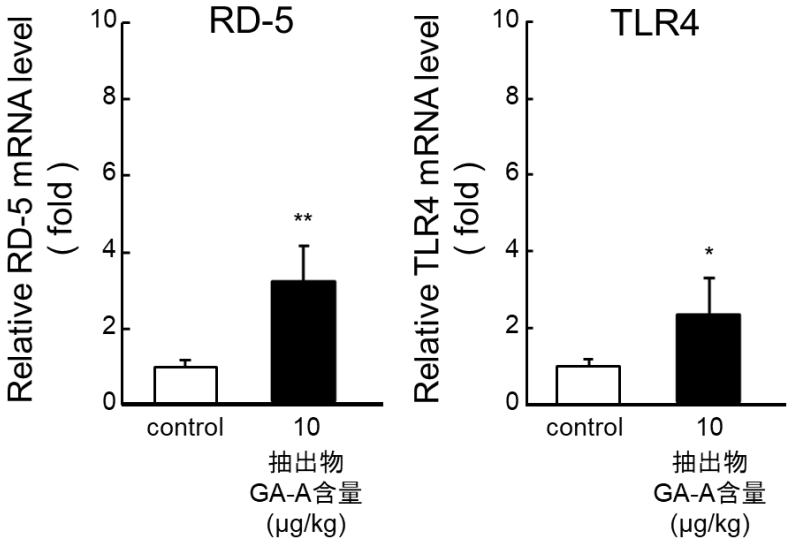


Fig. 9. Effect of Reishi-extract on RD-5 mRNA levels in the rat ileum.

RD-5, TLR4 mRNA levels in the rat ileum after a single oral administration of Reishi-extract for GA-A. The column (n = 5) show mean with standard deviation for more than two independent experiments. *, **; significantly differences (vs controls) were calculated by Dunnett's test (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

その結果、霊芝と同様に霊芝抽出物はラット回腸における RD-5, TLR4 mRNA 量を有意に上昇させた(Fig. 9)。従って GA-A を豊富に含む霊芝抽出物の経口投与は腸管免疫を賦活することが示唆され、その傾向は霊芝と同様であった。そのため、さらに GA-A 原末を使用し、GA-A の関与を詳細に明らかにするために種々検討を行った。

第二項　GA-A は腸管免疫を賦活する

GA-A 原末の経口投与が腸管免疫に与える影響を検討した。

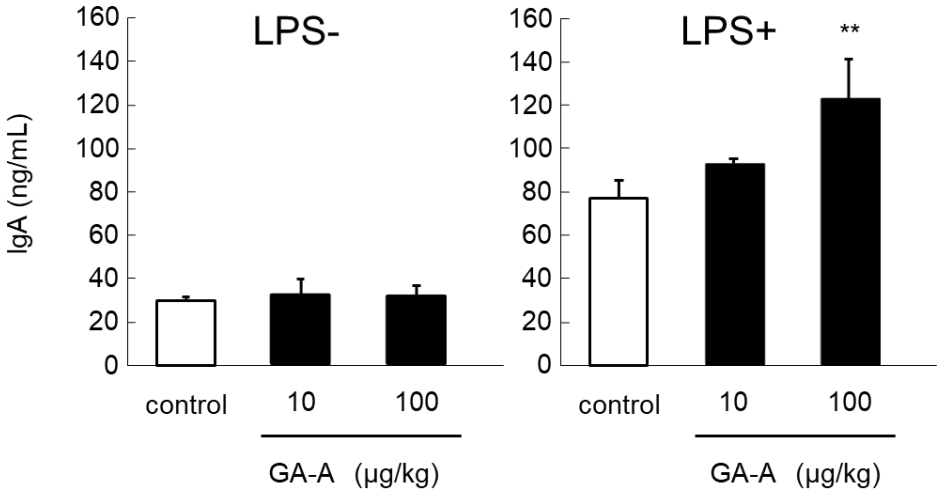


Fig. 10. Effects of GA-A on IgA production in cultured rat PP cells in the absence or presence of LPS.

Rats received a single oral administration of GA-A (10, 100 μg / kg), and PP cells were cultured with or without LPS (100 μg / mL) for 72 h. The column (n = 3) show mean with standard deviation for more than two independent experiments. *; significantly differences (vs controls of LPS -), †; significantly differences (vs controls of LPS +) were calculated by Dunnett's test (*: $p < 0.05$).

GA-A 原末の経口投与は、パイエル板初代培養細胞からの IgA 分泌を LPS 添加群のみ有意に増加させた(Fig. 10)。この傾向は霊芝及び抽出物と同様の結果であった。次に RD-5, TLR4 mRNA 量について検討した。

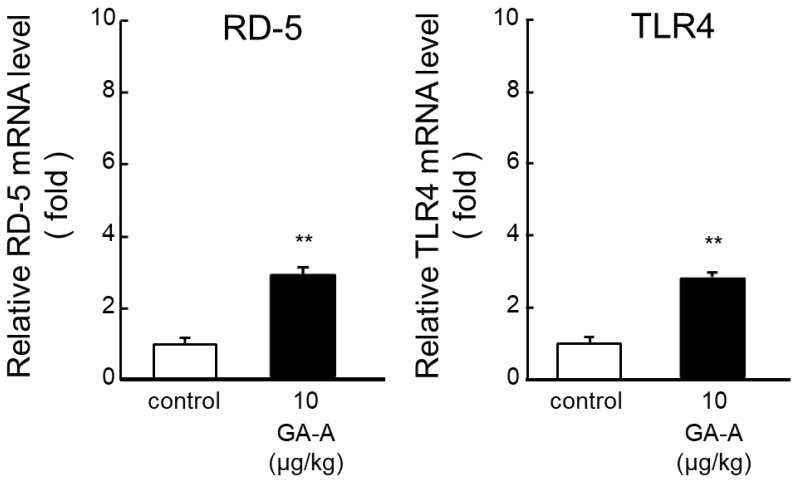


Fig. 11. Effect of GA-A on RD-5 mRNA levels in the rat ileum.

RD-5, TLR4 mRNA levels in the rat ileum after a single oral administration of GA-A. The column (n = 5) show mean with standard deviation for more than two independent experiments. *, **; significantly differences (vs controls) were calculated by Dunnett's test (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

その結果、GA-A の経口投与は回腸の RD-5, TLR4 mRNA 量を有意に増加させ、霊芝及び抽出物と同様の傾向を示した(Fig. 11)。従って霊芝による腸管免疫賦活作用の有効成分の 1 つが GA-A であることが強く示唆された。そこで、TLR4 の関与を詳細に明らかにすべく、TLR4 自然欠損系を使用し検討を行った。

第三項　GA-A の腸管免疫賦活作用は TLR4 自然欠損系では観察されない

GA-A が TLR4 自然欠損系の IgA 分泌に及ぼす影響を明らかにするため、C3H/HeJ, HeN マウスに GA-A を経口投与し、パイエル板初代培養細胞の IgA 分泌を測定した。

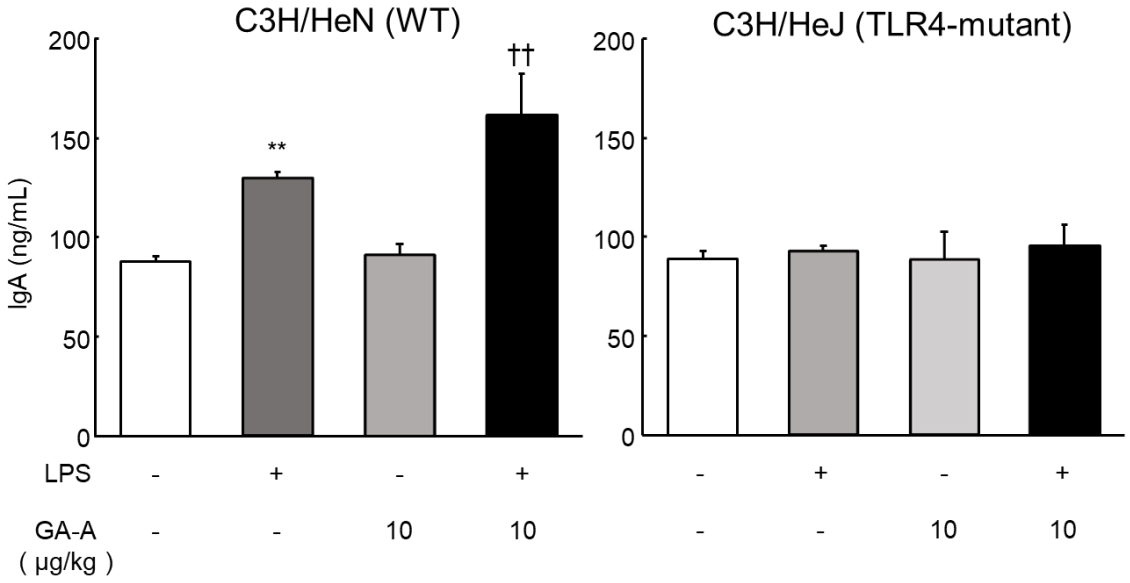


Fig. 12. Effect of GA-A on IgA production in cultured mouse PP cells in C3H/HeN (WT) and C3H/HeJ (TLR4 mutant) mice.

Effect of GA-A on IgA production in cultured mouse PP cells in the absence or presence of LPS for 72 h in C3H/HeN (WT) and C3H/HeJ (TLR4 mutant) mice. C3H mice received a single oral administration of GA-A (10 μg / kg), and PP cells were cultured with or without LPS (100 μg / mL). The column (n = 3) show the mean with standard daviation for more than two independent experiments. **: significantly different from the LPS(-) and GA-A(-) at $p < 0.01$. ††: significantly different from the LPS(+) and GA-A(-) at $p < 0.01$.

その結果、GA-A の経口投与は野生型 TLR4 である C3H/HeN マウスのパイエル板初代培養細胞上清中 IgA を LPS 添加群のみ有意に上昇させた。一方

で、TLR4 自然欠損系である C3H/HeJ マウスでは上昇が観察されなかった (Fig. 12)。以上の結果は霊芝経口投与による影響と傾向が一致することから、霊芝による腸管免疫賦活作用の有効成分は GA-A であることが示された。

第四節　考察

霊芝は様々な成分を含有している。その中でも霊芝固有の成分であり、最も含有量の多い成分はガノデリン酸群であることが報告されている[19, 31)]。しかし、霊芝の有効成分としてどの程度寄与するかについての報告は少ない。

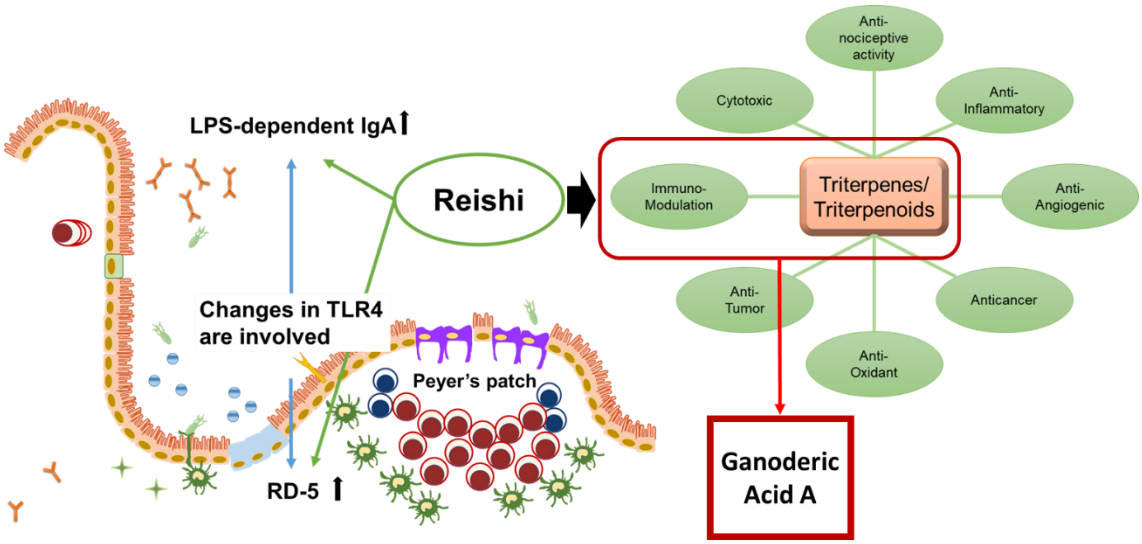
本検討では、霊芝の腸管免疫賦活作用が認められた投与量 5 mg / kg を指標に、一般的な含有量とされる 0.1-0.2% として 10 μg / kg を投与量として設定した。また、霊芝から GA-A が豊富に含まれる画分を抽出することで試薬と霊芝の効果を比較する際の補助的な情報を得た。

その結果、霊芝抽出物はパイエル板初代培養系細胞において LPS 添加群のみ IgA 分泌を上昇させ(Fig. 8)、かつ回腸の RD-5, TLR4 mRNA 量を有意に上昇させた(Fig. 9)。これは、先述した霊芝の結果と同様の傾向を示していたことから、霊芝の有効成分として GA-A が関与していることが示唆された。

GA-A を直接経口投与した結果、霊芝や抽出物と同様にパイエル板初代培養細胞からの IgA 分泌を上昇させ(Fig. 10)、回腸の RD-5, TLR4 mRNA 量を有意に上昇させた(Fig. 11)。さらに TLR4 自然欠損系での検討では、野生型のみ LPS 添加群の IgA 分泌を有意に上昇させ、自然欠損系では上昇が観察されなかった(Fig. 12)。このことは、霊芝の検討と同様の結果であり、霊芝の腸管免疫賦活作用に GA-A が関与することが示された。また、有効成分の機序については TLR4 が関与することも併せて示された。GA-A は TLR4 に関連する因子である NF-κB を調節することが報告されている[33)]。従って、これらの影響は GA-A による NF-κB 調節作用が関与していることが考察される。

第五節　まとめ

本章では霊芝の腸管免疫賦活作用に、霊芝固有の成分である GA-A が関与していることを明らかとした。GA-A は IgA 分泌や RD-5 mRNA 量を有意に上昇させ、その機序には TLR4 が関与しており、その傾向は霊芝と同様であった。また、今回投与された GA-A は先に示した霊芝の投与量から算出したものであり、ヒトが常用する量を逸脱しない。そのため、GA-A はセルフメディケーションに有効な可能性が示された。今後は食品-薬物間相互作用など安全性に関するエビデンス構築が必要となると考える。



第三章　霊芝は酸化ストレス病態モデルに対して有効な防御手段となる

第一節　緒言

酸化ストレスは多くの疾病に関与する病態である。小腸酸化ストレスモデルの 1 つに小腸虚血再灌流 (ischemia reperfusion: I/R) モデルがある[34)]。小腸 I/R は小腸移植やイレウス、壊死性腸炎などによって生じる一過性の虚血とその後の再灌流による酸化ストレスをモデル化したものである。そこで発生した活性酸素が炎症を誘導し、腸管粘膜バリア機能を障害することが報告されている[34)]。腸管粘膜バリア機能の障害は、バクテリアルトランスロケーションを誘導することで全身性の障害を引き起こすことが知られている[35)]。これまでに当研究室の Sato らが小腸 I/R による障害を食品成分である Caffeic acid が抑制することを報告している[36)]。しかし、小腸 I/R による障害が腸管免疫に与える影響についての知見は十分ではない。これらの障害は酸化ストレスによる障害が局所に留まらず、全身に派生する。Bowser らは腸管の炎症による障害を保護する重要性について酸化ストレスの側面から報告しており、これらの障害を是正することは患者の生命の質(QOL)を改善する意味でも重要である[37)]。

そこで本章では、酸化ストレスモデルである小腸 I/R が腸管免疫に与える影響を明らかにするとともに霊芝及びその有効成分である GA-A が障害に与える影響を種々検討した。

第二節　実験材料及び実験方法

ⅰ) 使用薬物・試薬

第一章　第二節　ⅰ) で述べたものに加え、ソムノペンチルを共立製薬株式会社より購入した。

ⅱ) 使用動物

第一章　第二節　ⅱ) で述べた。

ⅲ) パイエル板初代培養系

第一章　第二節　ⅲ) で述べた

ⅳ) ELISA

第一章　第二節　ⅴ) で述べた。

ⅴ) DNA 抽出法

第一章　第二節　ⅵ) で述べた。

ⅵ) RT-PCR, Real time PCR 法

第一章　第二節　ⅶ) で述べた。

ⅶ) 統計解析

第一章　第二節　ⅷ) で述べた。

viii) 小腸虚血再灌流モデル

実験動物を Ogura らの既報に準拠[34]して Sham (偽処置) 群、I/R 群、I/R + Reishi 投与群の 3 群に分けて検討を行った。ソムノペンチルを用いて麻酔下の動物にソムノペンチル（ペントバルビタール）を投与した後、腹部を 5 cm 正中切開した。小腸を体外へ露出させ、側副血行路を結紮、上腸間膜動脈を 30 min クリッピングすることで虚血処置を行った。その後、クリッピングを外して 1 h 再灌流を行い、直ちに断頭・瀉血した。Sham 群ではクリッピングを行わず同様の処置を行った。

ix) 組織染色

小腸 I/R 後、回腸を 3 cm 摘出し、内容物を PBS (-) で洗浄後に 10 % 中性緩衝ホルマリン溶液中に固定した。固定化した組織をパラフィンに埋め込み、切片化したものをヘマトキシリン-エオシン（HE）染色を行った。組織サンプルは光学顕微鏡下で観察、撮影、評価した。

第三節　結果

第一項　小腸 I/R モデルは腸管免疫を低下させる。

まず初めに既報に基づき小腸 I/R モデルを作製した[34)]。

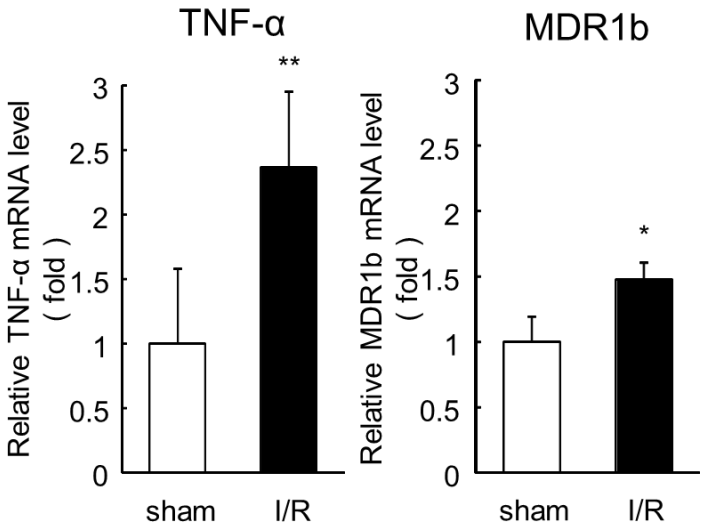


Fig. 13. TNF-α and MDR1b mRNA levels in the rat ileum.

The column (n = 5) show mean with standard deviation for more than two independent experiments. **; significantly differences (vs **; sham-operated groups) were calculated by Student's t test (*: $p < 0.05$).

このモデルにおいて、回腸の TNF-α, multi drug resistance 1b (MDR1b) mRNA 量を測定したところ I/R 群において既報[38, 39)]と同様に上昇した(Fig. 13)。また、この際の小腸絨毛を HE 染色で検討した。

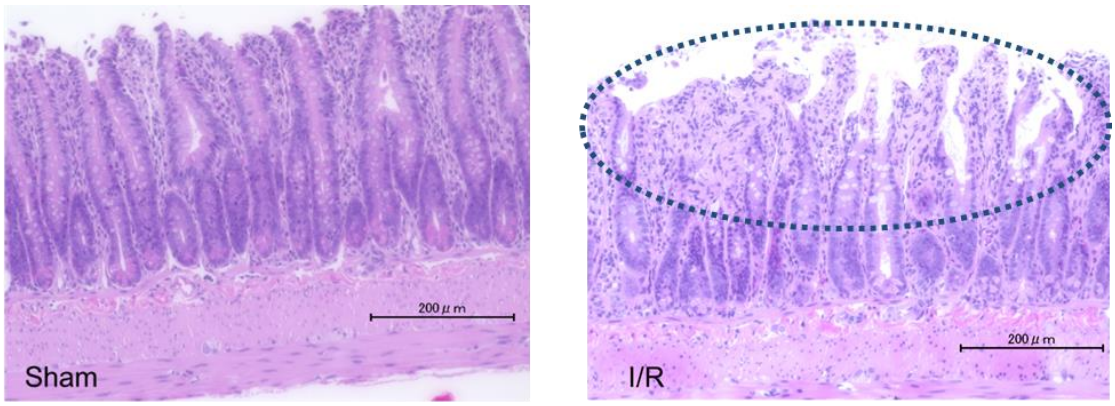
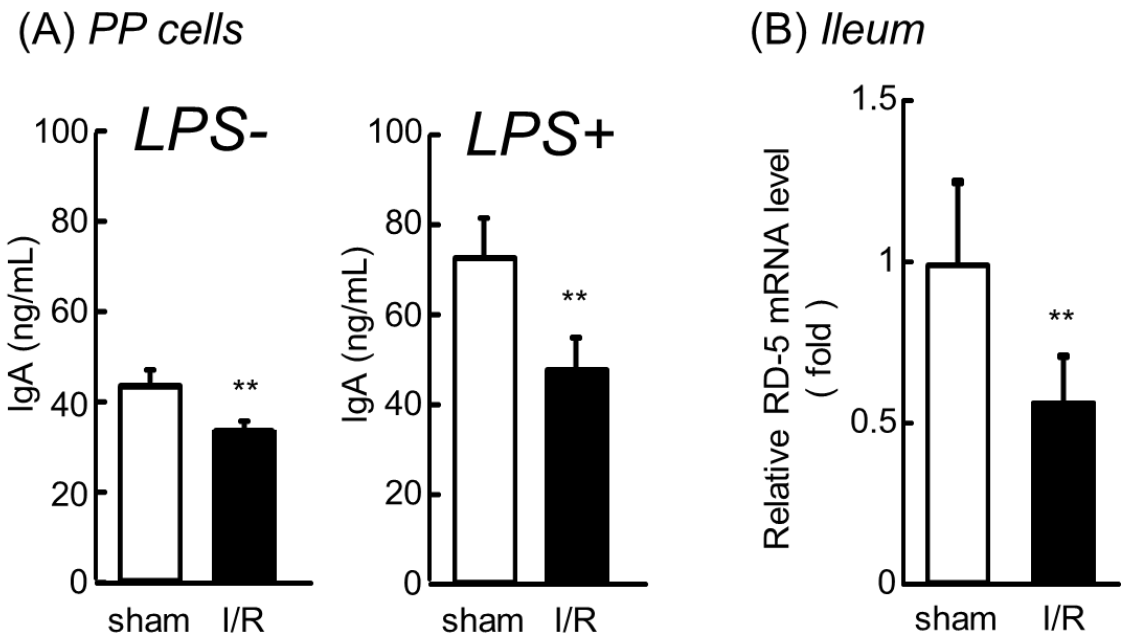


Fig. 14. Hematoxylin and eosin staining of sham-operated ileum , I/R-treated ileum pretreated. Images represent typical data.

その結果、Sham 群に比べ I/R 群では小腸絨毛の脱落が顕著に観察された(Fig. 14)。さらに絨毛陰窩底部に存在する複数の顆粒を含む細胞が Paneth 細胞[40]であるが、小腸 I/R により減少傾向にあることが観察された(Fig. 14)。そこで次に小腸 I/R が腸管免疫に与える影響を明らかにするべく、パイエル板初代培養細胞からの IgA 分泌及び回腸 RD-5 mRNA 量を検討した。



Bar graphs (n = 5). *, **; significantly differences (vs sham) were calculated by Dunnett's test (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

Fig. 15. Effect of intestinal I/R for IgA production in cultured rat PP cells, and for RD-5 mRNA levels in the Rat Ileum.

(A) IgA production in cultured rat PP cells. (B) RD-5 mRNA levels in the rat ileum. The column (n = 5) show mean with standard deviation for more than two independent experiments. **; significantly differences (vs **; sham-operated groups) were calculated by Student's t test (*: $p < 0.05$).

その結果、小腸 I/R は Sham 群に比較してパイエル板初代培養細胞からの IgA 分泌が LPS 非依存的に減少し(Fig. 15 A)、回腸における RD-5 mRNA 量も有意に減少した(Fig. 15 B)。RD-5 mRNA 量の結果は HE 染色の結果と一致したことから、小腸 I/R による障害は腸管免疫を低下させることが明らかとなった。

第二項　霊芝は酸化ストレスによる腸管免疫低下を抑制する

第一項で述べた小腸 I/R による腸管免疫の低下に対し、霊芝がどのような影響を与えるかについて検討を行った。

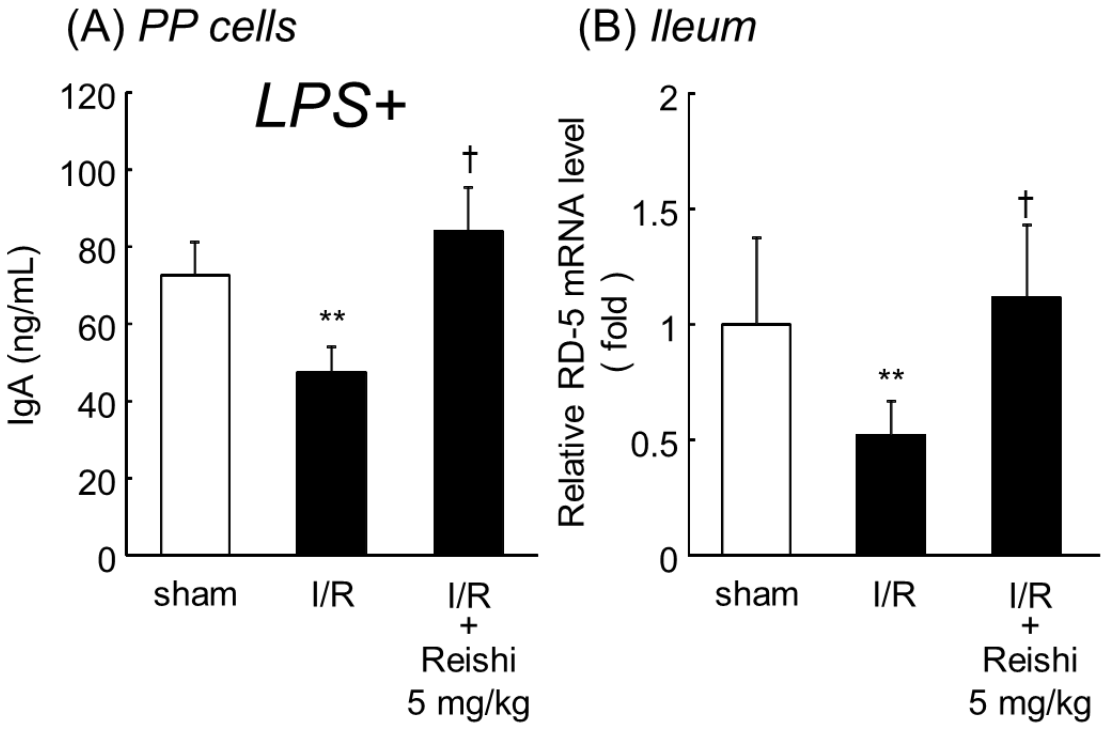


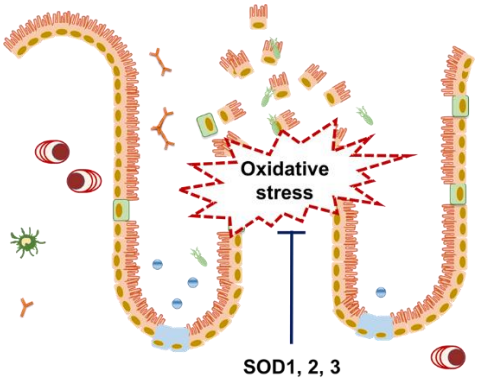
Fig. 16. Effect of Reishi on Intestinal I/R-Induced IgA production in cultured rat PP cells.

(A) IgA production in cultured rat PP cells. (B) RD-5 mRNA levels in the rat ileum. The column (n = 5). Rats received a single oral administration of Reishi 5 mg/kg. *, †; significantly differences (vs *; sham-operated groups, †; I/R groups) were calculated by Tukey's test (*: $p < 0.05$; †: $p < 0.05$).

その結果、I/R 処置 24 h 前に霊芝を経口投与した I/R + Reishi 5 mg/kg 群では I/R 群で有意に減少したパイエル板初代培養細胞からの IgA 分泌(Fig. 16 A)や回腸 RD-5 mRNA 量が有意に回復した(Fig. 16 B)。以上の結果から、霊芝は小腸 I/R による腸管免疫の低下を抑制することが示唆された。

第三項　腸管免疫の低下抑制の機序に SOD が関与する

霊芝が小腸 I/R による腸管免疫の低下を抑制したことから、その機序を明らかにすべく、我々はスーパーオキシドジスムターゼ(SODs)に注目した。



SODs は細胞内に発生した活性酸素を除去する酵素であり [41)]、酸化ストレスモデルに対して防御的に作用することが報告されている [42)]。SODs にはいくつかのサブタイプがあり、SOD1 は細胞内、SOD2 はミトコンドリア内、SOD3 は細胞外に存在する。そこで小腸 I/R 時や霊芝併用時に、SODs が変化するかを検討した。

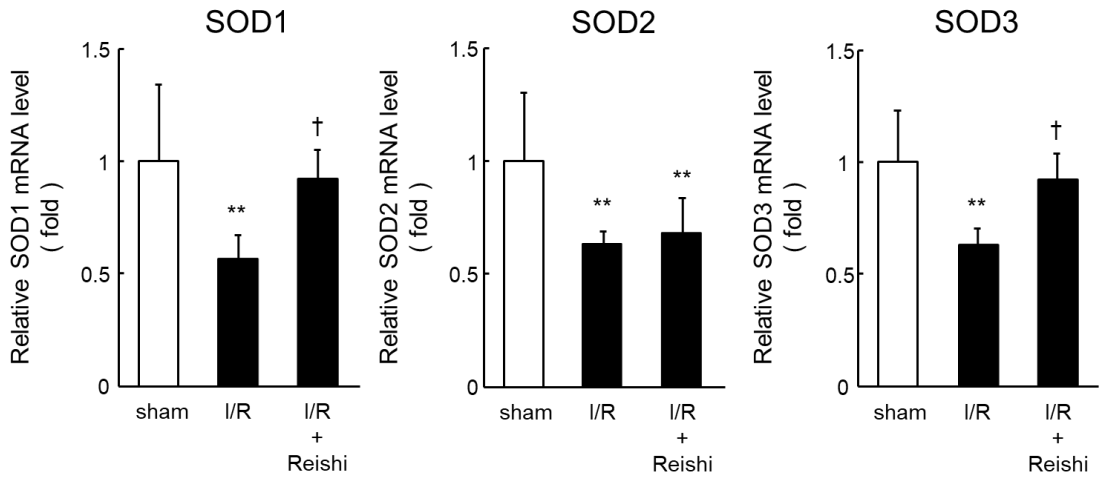


Fig. 17. Effect of Reishi on intestinal I/R-induced Sods mRNA levels in the rat ileum.

Sods mRNA levels in the rat ileum after a single oral administration of Reishi 5 mg/kg. The column (n = 5) show mean with standard deviation for more than two independent experiments. *, **, †; significantly differences (vs *,**; sham-operated groups, †; I/R groups) were calculated by Tukey's test (*: $p < 0.05$; †: $p < 0.05$).

Sham 群と比較して I/R 群では回腸の SODs mRNA 量は有意に減少した(Fig. 17)。霊芝併用群では SOD2 mRNA 量に影響を与えないものの、SOD1, 3 mRNA 量は I/R 群に比較して霊芝併用群で有意に回復した(Fig. 17)。以上の結果から、小腸 I/R による腸管免疫の低下を霊芝が抑制した機序の１つに SOD1, 3 が関与する可能性が示された。

第四項　GA-A は小腸 I/R による腸管免疫の低下を抑制する

さらに霊芝が小腸 I/R による腸管免疫の低下を抑制した有効成分を明らかにすべく、第二章で霊芝の腸管免疫賦活作用に関わる有効成分の１つであることが示された GA-A を用いて検討を行った。

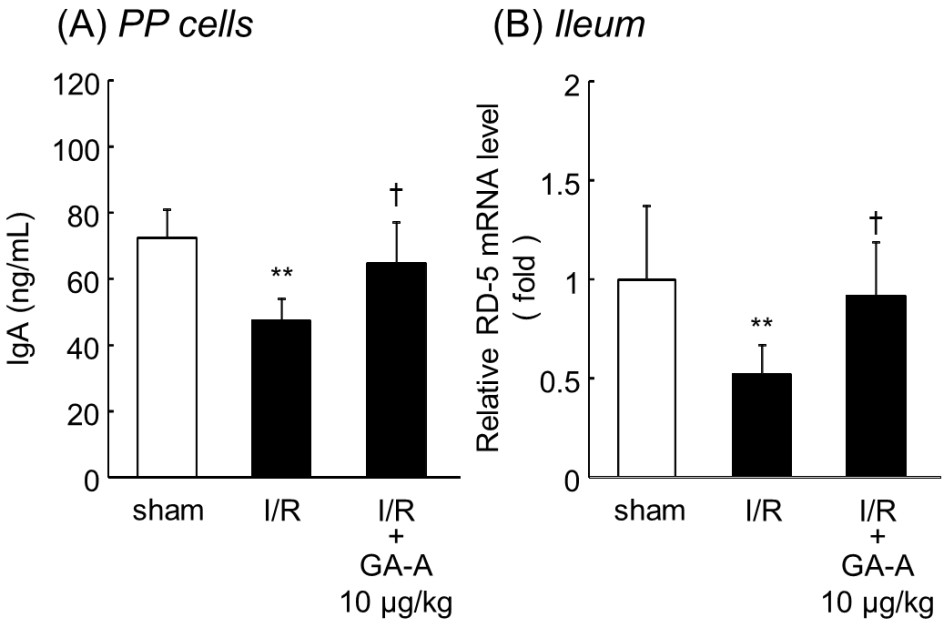


Fig. 18. Effect of GA-A on Intestinal I/R-Induced IgA Production in Cultured Rat PP Cells, and on RD-5 mRNA Levels in the Rat Ileum

(A) IgA production in cultured rat PP cells. (B) RD-5 mRNA levels in the rat ileum. The column (n = 5). Rats received a single oral administration of GA-A (10 μg/kg. *, †; significantly differences (vs *; sham-operated groups, †; I/R groups) were calculated by Tukey's test (*: $p < 0.05$; †: $p < 0.05$).

その結果、GA-A は小腸 I/R により腸管免疫の指標である IgA や RD-5 の低下を抑制することが示された(Fig. 18)。その傾向は霊芝と一致したため、抑制の機序を明らかにすべく SODs mRNA に関して検討を行った。

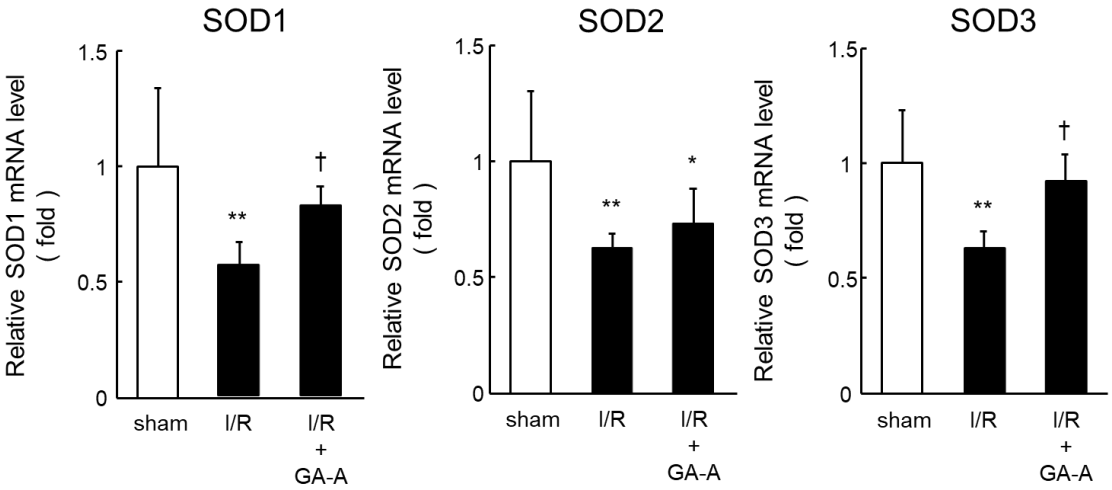


Fig. 19. Effect of GA-A on Intestinal I/R-Induced Sods mRNA Levels in the Rat Ileum.

Sods mRNA levels in the rat ileum after a single oral administration of GA-A 10 μg/kg. The column (n = 5) show mean with standard deviation for more than two independent experiments. *, **, †; significantly differences (vs *,**; sham-operated groups, †; I/R groups) were calculated by Tukey's test (*: $p < 0.05$; †: $p < 0.05$).

その結果、GA-A は小腸 I/R による SODs の低下に対して SOD1, 3 mRNA 量を有意に回復させることが明らかとなった(Fig. 19)。以上の結果は霊芝と同様の傾向を示したことから、霊芝が小腸 I/R による腸管免疫の低下を抑制した有効成分の 1 つは GA-A であることが示された。

第五項　霊芝及びその有効成分は小腸 I/R による絨毛の脱落を抑制する

第一から四項までの結果から、霊芝及び GA-A の経口投与が小腸 I/R による絨毛の脱落に対して有効である可能性が考えられた。そこで次に、回腸の HE 染色による検討を行った。

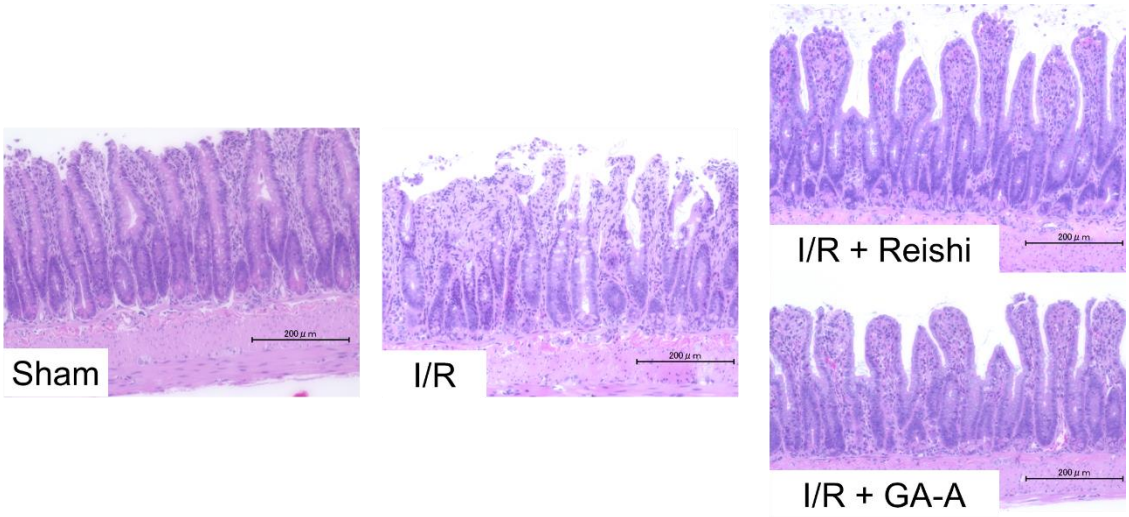


Fig. 20. Hematoxylin and eosin staining of I/R-treated ileum, I/R-treated ileum pretreated with Reishi (5 mg/kg) and GA-A (10 μg/kg) via oral administration. Images represent typical data.

その結果、小腸 I/R 時に霊芝及び GA-A の併用することで絨毛の脱落が抑制された(Fig. 20)。また、絨毛陰窩底部に存在する Paneth 細胞の減少が抑制された事も併せて観察され、霊芝(Fig. 16) 及び GA-A (Fig. 18) の結果とも一致した。

以上の結果より、霊芝及び GA-A は酸化ストレスモデルである小腸 I/R による腸管免疫の低下を抑制することが示され、絨毛の脱落を抑制することも併せ

て示された。その傾向は一致したことから、霊芝が与えた一連の有効成分が GA-A であることが強く示された。

第四節　考察

酸化ストレスは様々な病態に関与する。近年、本邦の指定難病である炎症性腸疾患などにも酸化ストレスが関与することが報告されている[43]。小腸 I/R は一過性の虚血、再灌流により生じる活性酸素が炎症を誘導し、小腸移植やイレウス、壊死性腸炎などを模した酸化ストレスモデルである[34]。小腸 I/R モデルが腸管免疫に与える影響は知見が十分ではなかったが[37]、本検討において腸管免疫を低下させることが明らかとなった(Fig. 14, 15)。特に腸内細菌叢との共生に関与する IgA 及び RD-5 の減少は本検討が世界に先駆けて報告している[44]。これら腸管免疫の低下に対して食品の有効性を検証することは、セルフメディケーションに関する有効なエビデンスとなり得ると考える。

霊芝は腸管免疫賦活作用を有し[45]、小腸 I/R による腸管免疫の低下に対して、抑制的に働くことが示された(Fig. 16)。その機序として活性酸素の除去に関与する酵素であり、I/R による障害を抑制することが報告されている SOD1, 3[42]の減少が有意に抑制されたことが関与していることが示唆され(Fig. 17)、その作用に関する有効成分は GA-A であることも示された(Fig. 18, 19)。これらの結果は霊芝が *in vitro* において抗酸化作用を示すこと[46]や GA-A の抗腫瘍効果に酸化ストレスが関与すること[47]を支持する結果であった。また、組織染色の結果から霊芝を事前に投与することで小腸 I/R による絨毛の脱落を抑制することが示され(Fig. 20)、小腸陰窩底部に存在する Paneth 細胞の減少も抑制されることが併せて示された。特にその結果が mRNA の結果と一致することから、霊芝及びその有効成分である GA-A は酸化ストレス病態に対して有効なセルフメディケーションとなる可能性が示された。

有効成分の 1 つが明らかになったことは、これら酸化ストレス病態に対する新しいアプローチの開発にも繋がり、セルフメディケーションのみならず新規治療法の探索にも有効な知見であると考える。

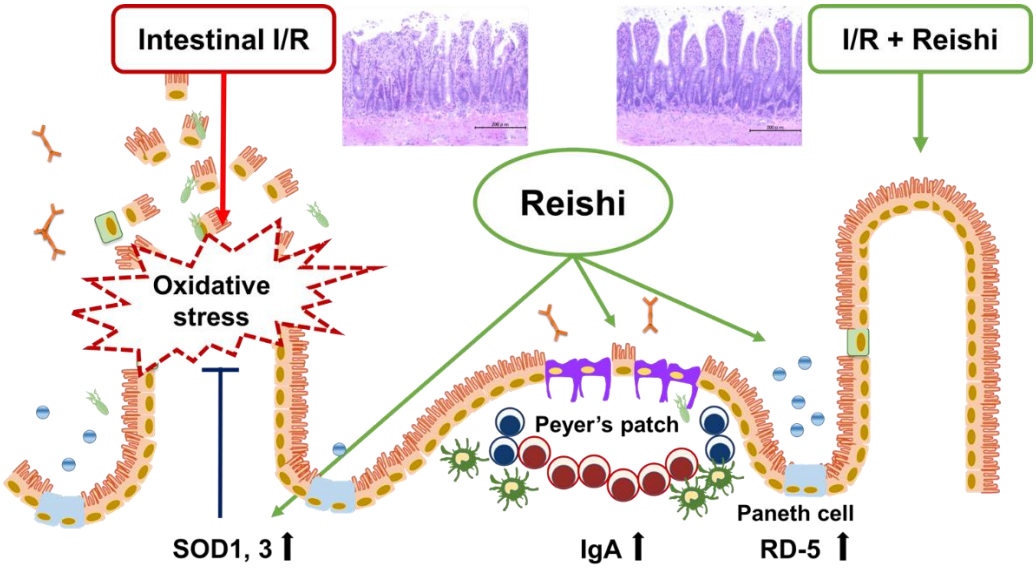
今後は霊芝に含まれる他のガノデリン酸が同様の効果を示すかを検証し、創薬や臨床応用へ向けた検討が必要であると考える。

第五節　まとめ

霊芝は腸管免疫を賦活させることを第一章で、その有効成分の１つが GA-A であることを第二章で述べた。本章では霊芝の病態モデルに対する検討を行い、小腸酸化ストレスモデルに対して軽減効果を有することが明らかとなった。また、その有効成分の１つが GA-A であることも示され、セルフメディケーション及び新規治療法に有用な知見を得ることが出来た。

今回使用した霊芝及び GA-A の濃度はヒトが常用する量から逸脱せず、今後はヒトにおける有効性についての知見を求める必要があると考える。

食品による病態の改善を目指した検討は近年増加している。しかし、患者らの要望が多い食品に関する検討は少なく、特に霊芝に関しては本検討が世界に先駆けて有効性の一端を明らかとした。その機序が SOD1, 3 である可能性が示されたことも含め、今後は様々な酸化ストレス病態に対する有効性について検討するための第一歩となる知見であると考える。



総括

霊芝は本邦のみならず、諸外国においても利用を希望する患者が多い食品である。しかし、直接摂取した際のエビデンスは少なく、多くの報告はヒトが摂取するには過剰な量を投与した検討であり、特に腸管免疫については報告が乏しいのが現状であった。

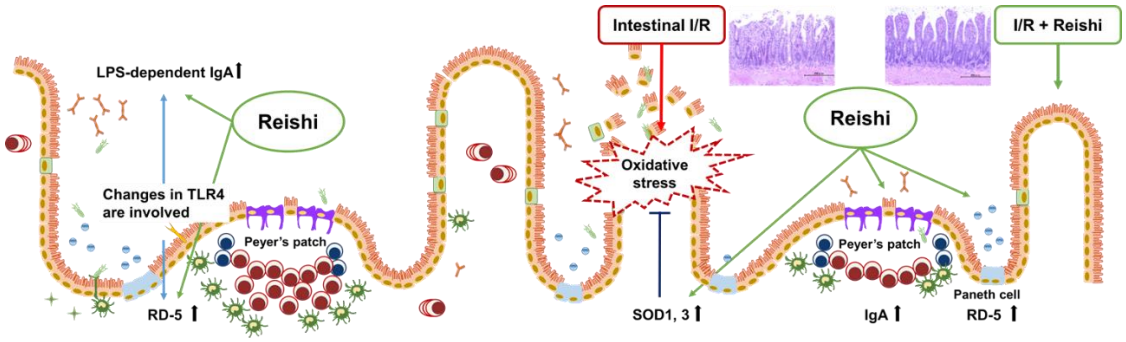
そこで我々は腸管免疫を指標に通常摂取される投与量において、霊芝の影響を評価することで、霊芝の有効性の一端を明らかにすることを目的とした。腸管免疫の重要な指標であり、異物の排除に重要な IgA と、炎症性腸疾患との関連が示唆され、腸内細菌叢の維持に関与する α-defensin 5 に注目し種々検討を行った。その結果、霊芝は rat IgA や α-defensin 5 を上昇させ、腸管免疫賦活作用を示すことを明らかとした。その機序には TLR4 が関与し、過剰な炎症を惹起する可能性が考えられたが、TLR4 の下流に存在する炎症性サイトカイン TNF-α を誘導しないことも併せて示した。

我々は、この腸管免疫賦活作用に関与する成分として、霊芝固有の成分でありラノステロール由来のトリテルペンであるガノデリン酸群に注目した。その中でも含有量が多い GA-A について検討を行った結果、GA-A は霊芝と同様に腸管免疫賦活作用を示し、有効成分の一端を明らかにした。

当研究室は酸化ストレスモデルが腸管粘膜バリア機能を障害し、食品成分がその障害を抑制することを明らかにしている。しかし、酸化ストレスモデルが腸管免疫に与える影響については知見が乏しく、食品が与える影響についても報告が少ないのが現状である。そこで、小腸酸化ストレスモデルである小腸 I/R が腸管免疫に与える影響を検討すると共に、霊芝が小腸 I/R に与える影響を検討した。その結果小腸酸化ストレスモデルは腸管免疫を低下させることを

明らかにし、霊芝がそれらの障害に対して抑制的に働くことを明らかにした。また、その機序には SOD1, 3 が関与していることを示した。

本検討は霊芝が腸管に与える影響について、免疫と酸化ストレスの側面からアプローチを試みたものである。その結果、霊芝の有効性の一端を明らかにし、セルフメディケーションに有用な知見を得ることが出来たと考える。



参考文献

1) Deitch EA, Xu D, Qi L, Berg R. Elemental diet-induced immune suppression is caused by both bacterial and dietary factors. JPEN J. Parenter. Enteral Nutr., 17, 332–336. 1993.

2) Mayer L. The role of the epithelium in mucosal immunity. Res. Immunol., 148, 498–504. 1997.

3) Strobel S, Mowat AM. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. Immunol Today. 173-181. 1998.

4) Reboldi A, Cyster JG. Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier. Immunol Rev. 230-245. 2016.

5) Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. Nat. Rev. Microbiol., 9, 356–368. 2011.

6) Van Limbergen J, Geddes K, Henderson P, Russell RK, Drummond HE, Satsangi J, Griffiths AM, Philpott DJ, Wilson DC. Paneth cell marker CD24 in NOD2 knockout organoids and in inflammatory bowel disease (IBD). Gut. 353-354. 2015.

7) Bel S, Pendse M, Wang Y, Li Y, Ruhn KA, Hassell B, Leal T, Winter SE, Xavier RJ, Hooper LV. Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection of the intestine. Science. 1047-1052. 2017.

8) Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, Prifti E, Vieira-Silva S, Gudmundsdottir V, Pedersen H, Arumugam M, Kristiansen K, Voigt AY, Vestergaard H, Hercog R, Costea PI, Kultima JR, Li J, Jørgensen T, Levenez F, Dore J; MetaHIT consortium, Nielsen HB, Brunak S, Raes J, Hansen T, Wang J, Ehrlich SD, Bork P, Pedersen O. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. Nature. 262-266. 2015.

9) Gülden E, Wong FS, Wen L. The gut microbiota and Type 1 Diabetes. Clin Immunol. 143-153. 2015.

10) Kumari R, Palaniyandi S, Hildebrandt GC. Microbiome: An Emerging New Frontier in Graft-Versus-Host Disease. Dig Dis Sci. 2018. Epub ahead of print

11) Rahmawati R, Bajorek BV. Self-medication among people living with hypertension: a review. Fam Pract. 147-153. 2017.

12) Cheifetz AS, Gianotti R, Luber R, Gibson PR. Complementary and Alternative Medicines Used by Patients With Inflammatory Bowel Diseases. Gastroenterology. 415-429. 2017.

13) Brooks SL, Rowan G, Michael M. Potential issues with complementary medicines commonly used in the cancer population: A retrospective review of a tertiary cancer center's experience. Asia Pac J Clin Oncol. ajco.13026. 2018.

14) Locquet M, Honvo G, Rabenda V, Van Hees T, Petermans J, Reginster JY, Bruyère O. Adverse Health Events Related to Self-Medication Practices Among Elderly: A Systematic Review. Drugs Aging. 359-365. 2017.

15) Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds. Biotechnol Annu Rev. 265-301. 2007.

16) Habijanic J, Berovic M, Boh B, Plankl M, Wraber B. Submerged cultivation of Ganoderma lucidum and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF-α, IL-12, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17. N Biotechnol. 85-95. 2015.

17) Cunha DM, Koike MK, Columnbeiro DF, Columnbeiro HV, Hamasaki MY, Coelho Neto GT, Machado MC, da Silva FP. Increased intestinal production

of α-defensins in aged rats with acute pancreatic injury. Exp Gerontol. 215-219. 2014.

18) Camps-Bossacoma M, Pérez-Cano FJ, Franch À, Untersmayr E, Castell M. Effect of a cocoa diet on the small intestine and gut-associated lymphoid tissue composition in an oral sensitization model in rats. J Nutr Biochem. 182-193. 2017.

19) Yajima Y, Miyazaki M, Okita N, Hoshino T. Production of Ginkgo leaf-shaped basidiocarps of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom Ganoderma lucidum (higher Basidiomycetes), containing high levels of α- and β-D-glucan and ganoderic acid A. Int J Med Mushrooms. 175-182. 2013.

20) Takano F, Yahagi N, Yahagi R, Takada S, Yamaguchi M, Shoda S, Murase T, Fushiya S, Ohta T. The liquid culture filtrates of Paecilomyces tenuipes (Peck) Samson (=Isaria japonica Yasuda) and Paecilomyces cicadae (Miquel) Samson (=Isaria sinclairii (Berk.) Llond) regulate Th1 and Th2 cytokine response in murine Peyer's patch cells in vitro and ex vivo. Int Immunopharmacol. 903-916. 2005.

21) Becerril A, Castillo-Robles G, González-Hernández M, Villanueva I. Influence of high-calorie (cafeteria) diets on the population of Paneth cells in the small intestine of the rat. Eur J Morphol. 201-207. 2005.

22) Levast B, De Monte M, Melo S, Chevaleyre C, Berri M, Salmon H, Meurens F. Differences in transcriptomic profile and IgA repertoire between jejunal and ileal Peyer's patches. Dev Comp Immunol. 102-106. 2010.

23) Menendez A, Willing BP, Montero M, Wlodarska M, So CC, Bhinder G, Vallance BA, Finlay BB. Bacterial stimulation of the TLR-MyD88 pathway modulates the homeostatic expression of ileal Paneth cell α-defensins. J Innate Immun. 39-49. 2013.

24) Nattermann J, Du X, Wei Y, Shevchenko D, Beutler B. Endotoxin-mimetic effect of antibodies against Toll-like receptor 4. J Endotoxin Res. 257-264. 2000.

25) Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling C, Tak PP, Gay RE, Gay S, Kyburz D. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. Arthritis Rheum. 3684-3692. 2008.

26) Karahashi H. Amano F. Lipopolysaccharide (LPS)-induced cell death of C3H mouse peritoneal macrophages in the presence of cycloheximide:

different susceptibilities of C3H/HeN and C3H/HeJ mice macrophages. J Endotoxin Res. 33-39. 2006.

27) Ahmadi K, Riazipour M. Ganoderma lucidum induces the expression of CD40/CD86 on peripheral blood monocytes. Iran J Immunol. 87-91. 2009.

28) Ahmadi K, Riazipour M. Effect of Ganoderma lucidum on cytokine release by peritoneal macrophages. Iran J Immunol. 220-226. 2007.

29) Gupta SK, Pereira BM, Singh AB. Ganoderma lucidum: partial characterization of spore and whole body antigenic extracts. J Investig Allergol Clin Immunol. 83-89. 2000.

30) Park MJ, Ryu HS, Kim JS, Lee HK, Kang JS, Yun J, Kim SY, Lee MK, Hong JT, Kim Y, Han SB. Platycodon grandiflorum polysaccharide induces dendritic cell maturation via TLR4 signaling. Food Chem Toxicol. 212-220. 2014.

31) Koyama K, Imaizumi T, Akiba M, Kinoshita K, Takahashi K, Suzuki A, Yano S, Horie S, Watanabe K, Naoi Y. Antinociceptive components of Ganoderma lucidum. Planta Med. 224-227. 1997.

32) Radwan FF, Hossain A, God JM, Leaphart N, Elvington M, Nagarkatti M, Tomlinson S, Haque A. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and lymphoma growth by a natural triterpenoid. J Cell Biochem. 102-114. 2015.

33) Thyagarajan A, Jiang J, Hopf A, Adamec J, Sliva D. Inhibition of oxidative stress-induced invasiveness of cancer cells by Ganoderma lucidum is mediated through the suppression of interleukin-8 secretion. Int J Mol Med. 657-664. 2006.

34) Ogura W, Itagaki S, Kurokawa T, Noda T, Hirano T, Mizuno S, Iseki K. Protective effect of lutein on ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. Biol Pharm Bull. 1764-1766. 2006.

35) Ozban M, Aydin C, Cevahir N, Yenisey C, Birsen O, Gumrukcu G, Aydin B, Berber I. The effect of melatonin on bacterial translocation following ischemia/reperfusion injury in a rat model of superior mesenteric artery occlusion. BMC Surg. 15-18. 2015.

36) Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. Int J Pharm. 136-138. 2011.

37) Bowser JL, Phan LH, Eltzschig HK. The Hypoxia-Adenosine Link during Intestinal Inflammation. J Immunol. 897-907. 2018.

38) Ikemura K, Yamamoto M, Miyazaki S, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M. MicroRNA-145 post-transcriptionally regulates the expression and function of P-glycoprotein in intestinal epithelial cells. Mol Pharmacol. 399-405. 2013.

39) Naito Y, Katada K, Takagi T, Tsuboi H, Kuroda M, Handa O, Kokura S, Yoshida N, Ichikawa H, Yoshikawa T. Rosuvastatin reduces rat intestinal ischemia-reperfusion injury associated with the preservation of endothelial nitric oxide synthase protein. World J Gastroenterol. 2024-2030. 2006.

40) Geller SA, Thung SN. Morphologic unity of Paneth cells. Arch Pathol Lab Med. 476-479. 1983.

41) Younes M, Mohr A, Schoenberg MH, Schildberg FW. Inhibition of lipid peroxidation by superoxide dismutase following regional intestinal ischemia and reperfusion. Res Exp Med (Berl). 9-17. 1987.

42) Yang B, Chen Y, Long YH, Fan X, Liu KX, Wang XB, Zhou J. Intestinal and Limb Ischemic Preconditioning Provides a Combined Protective Effect in the Late Phase, But not in the Early Phase, Against Intestinal Injury Induced by Intestinal Ischemia-Reperfusion in Rats. Shock. 596-603. 2018.

43) Pereira C, Grácio D, Teixeira JP, Magro F. Oxidative Stress and DNA Damage: Implications in Inflammatory Bowel Disease. Inflamm Bowel Dis. 2403-2417. 2015.

44) **Kubota A**, Kobayashi M, Sarashina S, Takeno R, Yasuda G, Narumi K, Furugen A, Takahashi-Suzuki N, Iseki K. Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Attenuates Ischemia Reperfusion-Induced Alterations in Intestinal Immunity. Biol Pharm Bull. 1874-1878. 2018.

45) **Kubota A**, Kobayashi M, Sarashina S, Takeno R, Okamoto K, Narumi K, Furugen A, Suzuki Y, Takahashi N, Iseki K. Reishi mushroom Ganoderma lucidum Modulates IgA production and alpha-defensin expression in the rat small intestine. J Ethnopharmacol. 240-243. 2018.

46) Hsieh TC, Wu JM. Suppression of proliferation and oxidative stress by extracts of Ganoderma lucidum in the ovarian cancer cell line OVCAR-3. Int J Mol Med. 1065-1069. 2011.

47) Thyagarajan A, Jiang J, Hopf A, Adamec J, Sliva D. Inhibition of oxidative stress-induced invasiveness of cancer cells by Ganoderma lucidum is mediated through the suppression of interleukin-8 secretion. Int J Mol Med. 657-664. 2006.

謝辞

本研究を遂行する機会を与えて頂き、学位論文を作成するにあたり終始ご懇篤なご指導・ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室　井関　健教授に厚く御礼申し上げます。

また、本論文の副査としてご審査を賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬物動態解析学研究室　菅原　満准教授、同研究室　武隈　洋准教授、ならびに北海道大学病院薬剤部　小林　正紀准教授に深く感謝致します。

さらに研究の遂行にあたり多くのご助言、ご助力を賜りました北海道科学大学薬学部　鈴木　夏子准教授、鈴木　裕治講師、北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室　鳴海　克哉助教、古堅　彩子助教に謹んで感謝致します。

日本薬科大学在学時に進学に向けた基礎をご指導頂いた日本薬科大学　櫻田誓教授、高野　文英教授に厚く御礼申し上げます。

研究ができる環境の維持など本研究を遂行するにあたり多くの面でご助力いただきました臨床薬剤学研究室のすべての方々に心から感謝致します。また、ご多忙な中、多くの面でご支援頂いた旭川十仁薬局代表取締役社長　野田　敏彦博士を始めスタッフの皆様と潰瘍性大腸炎を抱えながらの研究に終始ご配慮下さったすべての医療従事者の方々へ心より御礼申し上げます。

最後に心身両面で支えて下さった家族、友人ら大切な方々に深く感謝の意を示します。