

カイコ冬虫夏草による
マウス脳機能改善効果に関する研究

2010. 3

岩手大学大学院
連合農学研究科
寒冷圏生命システム学専攻
(岩手大学)

対馬 正秋

目 次

序 論	1
第一章 カイコ冬虫夏草の熱水抽出物が有する脳機能向上作用	8
I. 材料と方法	11
1. 供試試料	11
2. <i>P. tenuipes</i> 熱水抽出物 (PTE) の調製	11
3. 実験動物	16
(1) マウス	16
(2) 薬物の調製	16
(3) D-gal 誘導老化モデルマウスの作製	17
(4) カイコ冬虫夏草熱水抽出物 (PTE) の投与	17
4. ステップスルー型受動的回避実験	18
(1) 装置	18
(2) 手順	18
5. モリス水迷路実験	19
(1) 装置	19

(2) 手順	20
6. 統計解析	20
II. 結 果	25
1. 実験動物の体重, 飲料水, 摂食量および排泄量の推移	25
2. ステップスルー型受動的回避実験	25
3. モリス水迷路実験	25
III. 考 察	36
IV. 摘 要	39
第二章 カイコ冬虫夏草熱水抽出物による脳機能向上の作用機構	40
I. 材料と方法	41
1. RT-PCR による記憶関連遺伝子の発現解析	41
(1) マウス脳からの Total RNA の抽出	41

(2) 逆転写反応	42
(3) PCR 反応	42
(4) アガロースゲル電気泳動	43
2. 脳老化誘導マウスの海馬切片の組織化学的研究	43
(1) マウス脳の切片の作製	43
II. 結果	45
1. RT-PCR による ChAT の遺伝子発現の比較	45
2. 海馬切片の組織化学的研究	45
III. 考 察	49
IV. 摘 要	53
総合考察	54
引用文献	61

序 論

昆虫は人類誕生よりはるか以前、約 4 億 5 千万年前から地球上に存在していたと考えられ、大きな気候変動などの環境変化があつたにもかかわらず、種類と個体数において最も繁栄している生物である。現在種名が付いている昆虫は 100 万種近く存在し、全動物種の約 8 割を占め、毎年、世界各地で 3,000 種もの新昆虫が発表され続けている。また、これまで日本からは約 3 万種の昆虫類が記録されているが、実数はおそらく 10 万種を超える種類の昆虫類が存在すると見込まれている（梅谷, 2004）。人類は膨大な昆虫の中でも有用昆虫を古くから生活の中に取り入れてきた。その証拠として、南アフリカ共和国のナタル・ドラケンスベルグやトグワナダムなどで見つかった、ヒトが野生ミツバチの巣を採る様子が描かれた 2 万年ほど前の洞窟の壁画が最も古いものである。その他には、紀元前 6,000 年前のスペインのアラーニャやアルタミラなどの洞窟壁画でも同様の絵が残されている（三橋, 2010）。さらに 1926 年、中国山西省夏県西陰村にある紀元前 2,500~2,000 年頃のヤンシャオ期（仰韶期）の遺跡から、一端が切り取られた繭が発見され、これは蛹を取り出して食していたのではないかと考えられている（三橋, 2010）。また、中国では、3,000 年前あたりから昆虫は薬用昆虫として利用されており、カイコ（*Bombyx mori*）幼虫は薬として、セイヨウミツバチ（*Apis mellifera*）やラックカイガラムシ（*Laccifer lacca*）は医用としてそれぞれ用いられている（三橋, 2010）。

昆虫資源に関する薬理学的研究は、主にアジアや中南米の伝統薬に関するものが多い（Gan *et al.*, 2006; Wahrendorf and Wink, 2006）。特に、近年中国・韓国では絹糸の製造過程で不要とされているカイコの蛹から、いくつかの生理活性物質に関する研究報告がなされている。カイコ蛹のエタノール抽出物には強壮効果があることや（Ryu *et al.*, 2002）、ヒトの健康に有効な *n*-3 系脂肪酸が豊富に含有されていること（Pereira *et al.*,

2003), 中国の紫陽産のカイコ蛹に含有される高セレンウムアミノ酸がヒト肝癌細胞 (SMMC-7721) に対し効果的に細胞増殖抑制活性を示すこと (Hu *et al.*, 2005) が示唆されている。

一方、日本においては、島根県津和野町(旧日原町)や福島県棚倉町のようなかつて養蚕が盛んだった地域での新たな産業振興のために、栽培技術はそれぞれ異なるものの、カイコ蛹を宿主とした冬虫夏草の人工栽培による生産が行われており、新たな生理活性機能を見いだすための研究も並行して進められている(鈴木, 2005)。

冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) (Berkelley Saccardo) は、昆虫にとりつく昆虫病原菌類の一つであり、分類学上は、子囊菌類 (*ascomycetes*) のバツカクキン科 (*Clavicipitaceae*)、コルディセプス(ノムシタケ)属 (*Cordyceps* genus) (又は冬虫夏草属ともいう) に属す。“コルディセプス”とは「棍棒」を意味するラテン語であり、“シネンシス”は同じく「中国(支那)の」を指す(金城, 1999)。昆虫に寄生する真菌類は数多く自然界に棲息しており、*Cordyceps* 属だけでも全世界で約 500 種、日本では約 300 種類以上が知られている。宿主昆虫の種類も多種多様で、カメムシ目 (*Hemiptera*)、チョウ目 (*Lepidoptera*)、コウチュウ目 (*Coleoptera*)、ハチ目 (*Hymenoptera*)、バッタ目 (*Orthoptera*)、トンボ目 (*Odonata*)、ハエ目 (*Diptera*) など多岐にわたる。広義の解釈ではこれらの昆虫寄生菌(子実体 fruit body を形成するもの)を冬虫夏草 (vegetable wasps and plant worms) と呼ぶことが多いが、狭義の解釈では、昆虫綱 (*Insecta*)、チョウ目 (*Lepidoptera*)、コウモリガ上科 (*Hepialoidea*)、コウモリガ科 (*Hepialidae*) に属するコウモリガ(中国名、蝙蝠蛾; *Hepialus armoricanus Oberthur excrescens* Butler) (Ma *et al.*, 2007; Li *et al.*, 1998) を宿主とした中国のチベット自治区、青海省、四川省、貴州省、甘肅省、雲南省をはじめ、ネパールやブータンの標高 3,000 から 4,000 メートルの高山地帯に棲息する *C. sinensis* のみをいう。中国ではこのような昆虫の成虫や幼虫に寄生する菌全体を総称して「虫草」

と呼ぶ。本論文では、現在の日本での冬虫夏草の用語の使用実態に合わせて、虫草を「冬虫夏草」として表記することとする。なお、日本に棲息しているコウモリガの学名は *Endoclita excrescens* Butler (清水大典, 1979; 北島ら, 2006) であり、中国名の蝙蝠蛾とは生物学上同一のガではないと考えられる。

日本では、1607年(慶長12年)、中国の李時珍(りじちん)の著書「本草綱目」が長崎に渡来し、徳川家康公に献じられ、これが江戸時代を通じて医薬の原点となり、この本によって冬虫夏草の名が国内に流布された(梅谷, 2004)。

漢方薬の材料や健康補助食品素材としての冬虫夏草の科学的知見はまだ少ない段階であるが(Choi *et al.*, 2004)、これまでの冬虫夏草の生理活性に関する研究例として、*Cordyceps* とその生産物が糖尿病、心血管疾患や癌や代謝病を防ぎ、または、それらの疾病の進行を遅延させるのに有効な栄養剤として広く利用されている(Paterson, 2008)。このほかにも、サナギタケ *Cordyceps militaris* の水抽出物による抗酸化作用(Yamaguchi *et al.*, 2000)、免疫調節作用(Kuo *et al.*, 2001)、*in vivo*でのインシュリン抵抗性の減少とインシュリン分泌物の増加作用(Choi *et al.*, 2004)、*C. sinensis*の熱水抽出による抗高脂血症効果(Koh *et al.*, 2003)、抗腫瘍活性(Bok *et al.*, 1999)、抗炎症作用(Rao *et al.*, 2007)のほか、メシマコブ(*Phellinus linteus*)のプロテオグリカン複合物による抗腫瘍活性(Nakamura *et al.*, 2004)などが報告されている。なお、冬虫夏草が抗加齢や脳機能向上効果を有することはあまり知られていないものの、Jiら(2009)は、*C. sinensis*熱水抽出物がD-galactoseの皮下注射により脳老化を誘導したマウスの学習・記憶能力を向上させる可能性があることを示唆している。

先に述べた島根県や福島県では、ハナサナギタケ(*Paecilomyces tenuipes*) (= *Isaria tenuipes* 又は *Isaria japonica* ともいう)の菌を用いた冬虫夏草栽培に取り組んでいる。*P. tenuipes*は、子囊菌類のバツカク菌科の *Cordyceps* 属に属し、カイコの幼虫に寄生する菌であることから、カイコ蛹との組み合わせによる冬虫夏草の人工栽培が近年日本

で商業化されている（鈴木, 2005）。しかしながら、市販されている *Cordyceps* 属や *Paecilomyces* 属の冬虫夏草の多くの商品は無性種の菌糸培養から調製されたものが多く（Hamburger, 2007）、さらには、*P. tenuipes* の薬理効果に関する研究報告は *Cordyceps* に比べ圧倒的に少ない。

これまで知られている *P. tenuipes* の生理活性成分としては、宿主（カイコ蛹）と子実体の混合粉末の酢酸エチル抽出物中から単離された環状ヘキサデプシペプチド Beauvericin がラット肝癌細胞増殖抑制効果を有すること（藤田, 2008）や、宿主（カイコ蛹）から分離した子実体を材料とし、60%エタノール抽出、5%メタノール抽出、熱水抽出の過程を経て得られたハナサナギン（3,4-ジグアニジノブタノイル-DOPA）が、フリーラジカル（DPPH）消去活性やスーパーオキシドアニオン消去能を有すること（Sakakura *et al.*, 2005 ; 2009）などが挙げられる。しかしながら、*P. tenuipes* が老化関連の疾病に伴い低下する哺乳類の脳機能を改善するという薬理効果についてはいまだ報告されていない。

現在の日本では、第二次世界大戦後と比較して男女ともに平均寿命が 20 年も延びるとともに、少子化による若年層人口の減少から、人口構成は高齢化が顕著になっている。WHO によると、現在、世界の認知症患者数は 2,400 万人、国内では約 200 万人いるといわれており、その約 50%がアルツハイマー病（AD）、他の 30%が血管性認知症であり、残りの 20%がレビー小体を伴う認知症や前頭側頭型認知症などの種々の認知症疾患が含まれている（荒井, 2006）。脳血管性認知症の有病率や罹患率は治療法や予防法などの進歩に伴い年々減少傾向にあるが、AD は確実に増加傾向にある（築地ら, 2009）。AD は一度発症すると持続的に進行し、3~8 年のうちに半数の患者が死亡する予後不良の疾患であるが、この AD の発症を 5 年遅らせることが可能であれば AD の有病率を 50%減少でき、10 年遅らせられれば発症率を 75%減少させることができる（瓦林ら, 2008）。そのため、寿命延長に伴い生きている間に精力的に活動できる健康寿命の延長

や生活の質（Quality of life ; QOL）の低下をいかに抑制するかが社会の重要な課題となっている（鈴木ら, 2006）.

これまで、我々の研究グループでは、グルタミン酸受容体阻害剤（MK-801）投与により一時的な認知障害を起こしたマウスを用い、カイコシルクのフィブロインタンパク質を酸加水分解して得られたカイコシルクパウダーが脳老化誘導マウスの学習・記憶機能向上効果を有することや（大内ら, 2001）、キイロスズメバチ（*Vespa simillima*）の成虫体のペプチド様の抽出物が長期記憶を高めること（Fujiwara *et al.*, 2007）を報告した。さらには、D-galactose の投与により不可逆的に脳老化誘導を発生させたマウスを用い、オーストラリア産ハリナシミツバチのプロポリス熱水抽出物がこのマウスの学習・記憶能力向上効果を有することを報告してきた（吉田, 2010）.

認知症発症の予防方法で最も重要な点は食生活であり、進行を遅らせることによる発症予防である（井口, 2008）。我が国では、冬虫夏草は滋養強壯の効果が期待できるとして広く使われているが、年々、チベット産の冬虫夏草である *C. sinensis* は高価で入手が困難になっている。その原因としては、冬虫夏草自体の知名度の高まりによる需要増加のほかに、チベット現地の農民、商社、地元政府との間での収穫を巡る暴動がたびたび発生し、大きな社会問題に発展していることも一因である。さらには、冬虫夏草の乱獲による生態系の乱れや環境そのものの破壊も急速に進んでいるという。それらのことも影響し、偽物の冬虫夏草が世界市場に流通され、人体への安全性の面で危惧される状況になっている。そのため、完全なトレーサビリティと科学的安全性が担保された機能性食品としての冬虫夏草が渴望されている。

本研究では、それらトレーサビリティと安全性の確保ができるよう、福島県の養蚕農家で用いられている実用品種のカイコ蛹を宿主とし、福島県内の山岳地帯で採取された *P. tenuipes* の菌株を接種して人工培養された冬虫夏草の子実体ならびに宿主全体を用いた。この冬虫夏草からの有効成分の抽出方法は、経口摂取を前提とするため、*n*-ヘキ

サン、酢酸エチル、アセトンなどの有機溶媒系を用いた逐次抽出は採用せず、熱水抽出法のみを用いた。

本研究は、カイコを特異的に宿主として昆虫体内で培養された冬虫夏草 *P. tenuipes* の熱水抽出物が、脳老化誘導マウスの脳機能低下を防ぐことを示唆した成果であり、第一章では、冬虫夏草の熱水抽出物の調製と、抽出物を摂取したマウスの記憶・学習能を行動薬理実験系で評価し、第二章として前章のマウスの脳組織を用いた記憶関連遺伝子の発現解析と組織化学的な解析を通じ、脳機能改善効果の作用機構の解明に取り組んだ。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、終始懇切なる御指導や御鞭撻を賜った農学部 農学生命課程 応用昆虫学研究室 教授 鈴木幸一博士, ならびにご助言とご校閲を賜った農学部 共生環境課程 准教授 小藤田久義博士, 帯広畜産大学 地域環境学研究部門 植物生産学分野 教授 倉持勝久博士, 山形大学農学部 生物生産学科 教授 安田弘法博士, そして東京薬科大学薬学部 医療衛生薬学科 教授 立川英一博士に深甚なる感謝の意を表します.

また, 実験を進める上で福島県産カイコ冬虫夏草と, その貴重な成分データをご提供して下さるとともに, 培養技術についてご助言を賜った東白農産企業組合 鈴木文夫氏・須藤眞廣氏・影山新吉氏, ならびに脳切片の病理解析をお引き受けくださった農学部獣医学課程 准教授 御領政信博士に心よりお礼申し上げます.

さらに, 直接的な実験の御指導を賜った, 農学部学術研究員 山本圭一郎氏, そして常に励まし合い, 支えとなった応用昆虫学研究室諸氏, 本課程への社会人入学をするにあたり私のわがままを受け入れてくれた岩手大学地域連携推進センターの同僚達, そして愛する家族に深く感謝いたします.

第一章 カイコ冬虫夏草の熱水抽出物が有する脳機能向上作用

アルツハイマー病 (AD) 型認知症では、記憶に深く関係する海馬や、理解、言語、記憶などの思考回路を司る大脳皮質の特定領域でニューロンが脱落・変性していることが以前より報告されている (Zeisel *et al.*, 1981; Coyle *et al.*, 1983). 文脈学習・記憶とは、ある事象を、それがいつどのような場面で生じたのかという時間的文脈の中で覚えるためのワーキング・メモリーであり、常にリセットが可能な動的な記憶である (久保田, 2007). 一方、空間記憶・学習とは、空間的な手がかり情報を利用する空間認識力とその記憶をいい、現在の周囲状況の把握のために、過去に経験した類似の周囲状況を想起し、視覚、嗅覚や聴覚などのあらゆる感覚系を総動員して、自らの周囲状況地図の修正を繰り返していくための手がかりとしての目標物体を認識する能力であり、自己の移動行動による周囲の状況の変化を確認する能力の高さを示す.

In vivo における脳の記憶・学習能を評価するためにマウスやラットが用いられ、その主な実験法としては、受動的回避実験、能動的回避実験、迷路実験などの行動実験が挙げられる。これらは、記憶・学習能を評価する際に必須の実験法である。特定の行動測定には混交要因が存在する。空間記憶の実験であるモリス水迷路の場合は、水泳能力やプラットフォームに登る動機づけの強度や逃避戦略などが混交要因となる。水泳能力などの混交要因に障害がある場合には、モリス水迷路で空間記憶を評価することは困難となる。したがって、1種類の行動態様の測定のために異なる混交要因をもつ複数の行動実験を用いることが必要とされる。

従来、脳老化誘導マウスの作出のために、一時的かつ可逆的に AD 様の症状を引き起こす作用をもつスコポラミンが用いられていた (Chen *et al.*, 2008). しかし、これらの脳神経系疾患の病態モデルマウスは、本来の老化のメカニズムである加齢に伴う神経

原線維変化とそれに伴う神経細胞脱落が海馬傍回で引き起こされているわけではない。

そこで、本研究室では、本来の老化に伴う認知低下メカニズムに近い D-galactose (以下 D-gal) 誘導性脳老化モデルマウスを作出し、行動実験をおこなっている。このモデルマウスを用いた研究としては 2000 年代に入ってから中国を中心に採用されており、50~100 mg/kg の D-gal を長期間皮下注射することで脳老化が進行することが報告されている (Wei *et al.*, 2005)。D-gal 誘導性脳老化マウスへのこれまでの研究への適用例としては、ランの一種であるアオチドリ (*Coeloglossum viride var. bracteatum*) のメタノール抽出物 (Dan *et al.*, 2006) や、フラボノイドのケルセチン (Lu *et al.*, 2006)、*C. sinensis* の熱抽出物 (Ji *et al.*, 2009)、オーストラリア産ハリナシミツバチプロポリスの熱水抽出物 (吉田, 2010) を投与し、脳機能が回復していることが示唆されている。

本研究室ではこれまで、宿主に実用品種のカイコ (錦秋×鐘和) 蛹と小石丸、菌株にハナサナギタケ (*Paecilomyces tenuipes*) とコナサナギタケ (*Paecilomyces farinosus*) を用い、これらの組み合わせで得られた 4 組の冬虫夏草の子実体とその宿主をそれぞれ粉末にし、有機溶媒と水による逐次抽出をおこない、得られたそれぞれの画分について、がん細胞増殖抑制活性試験、免疫賦活活性試験、抗炎症活性試験、抗酸化活性試験を実施し、宿主と菌種の組み合わせによる活性状況に大きな違いを見出し、小石丸を宿主とした場合の活性が優れていることを報告した (藤田, 2008)。

本研究では、トレーサビリティの観点から、福島県内の養蚕農家で用いられている実用品種のカイコ (錦秋×鐘和) 蛹を宿主とし、菌株には同じく福島県内の山岳地帯で採取された *P. tenuipes* を感染させて人工培養した冬虫夏草の子実体ならびに宿主がミックスされた粉体を用いた。また、冬虫夏草が経口摂取する機能性食品として使用されている実態を踏まえ、熱水抽出法による有効成分抽出を選択した。

本章では、このカイコ冬虫夏草熱水抽出物 (PTE) を D-gal 誘導性脳老化モデルマウスに経口投与し、*in vivo* での脳神経系への影響の評価を目的とし、文脈学習・記憶

能を分析するためのステップスルー型受動的回避実験 (McGaugh and Landfield, 1970; Zhang *et al.*, 1994) と, 空間学習・記憶能を分析するためのモリス水迷路実験 (Morris, 1981) の2種の行動実験による機能解析をおこなった.

I. 材料と方法

1. 供試試料

供試試料である冬虫夏草として、東白農産企業組合（福島県棚倉町）より提供されたハナサナギタケ *P. tenuipes* 粉末を実験に用いた。具体的には、ハナサナギタケは福島県の山中で採集され（Fig. 1A）、Sato ら（2002）の方法を改良した培地により培養した。これを、乾繭の工程で得られる乾燥したカイコ実用品種（錦秋×鐘和）の蛹に感染させ、65 日間、25°Cの暗室で培養した（Fig. 1B）。得られた子実体ならびに宿主の蛹を凍結乾燥させた後、粉砕した。本研究に用いた冬虫夏草粉体のロットの 100 g 中に含まれる各種成分を Table 1 および Table 2 に示した。

2. *P. tenuipes* 熱水抽出物(PTE)の調製

P. tenuipes 粉体 (63 g) に 8 倍量 (W/V) (500 mL) の MQ を加え、105°C, 60 分間オートクレーブ (BS-245, トミー精工) することで抽出液を得た。抽出液を 10,000 × g 4°C, 10 分間遠心分離し、上清を定性濾紙 (No.2 ADVANTEC) で濾過し回収した。残渣に再び 8 倍量の MQ を添加し、同条件で 2 回目の抽出をおこなった。上清を回収し、1 回目の抽出で得られた上清と混合し、吸引濾過でろ液を回収した。これを凍結乾燥機 (EYELA A3S, 東京理化機器) で凍結乾燥することで得られた粉末を、*P. tenuipes* 熱水抽出物 (PTE) とし、使用するまで-80°Cの超低温槽 (ULT-790-5A, REVCO) で保存した。

A



B

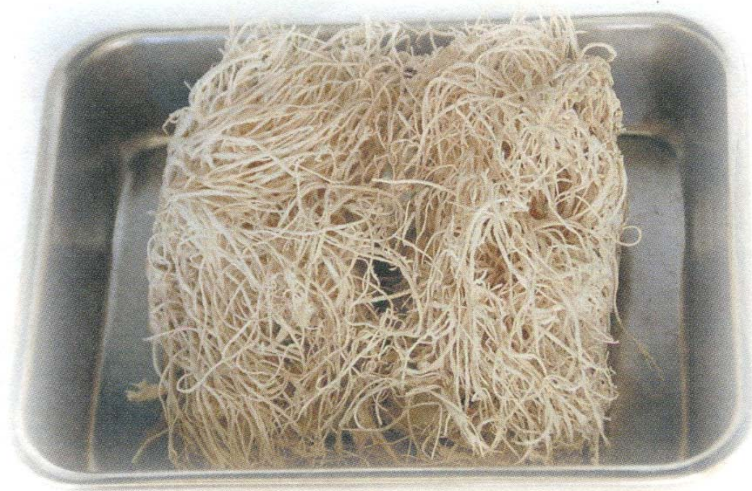


Fig. 1 Photographs of *Paecilomyces tenuipes* found in a mountain field (A), and artificial culture of *P. tenuipes* with dried and dead pupae of the silkworm *Bombyx mori* as a host (B). These photographs were given by Tohaku Nosan Corporate Union, Fukushima Japan.

Table 1. The amino acid composition in *Paecilomyces tenuipes*.

	Content g/100g [*]	Content ratio %
Arg	3.19	7.40
Lys	2.86	6.63
His	1.01	2.34
Phe	2.06	4.78
Tyr	2.47	6.00
Leu	2.62	6.08
Ile	1.64	3.80
Met	1.03	2.39
Val	2.11	4.89
Ala	2.16	5.01
Gly	2.14	4.96
Pro	3.31	7.68
Glu	4.73	10.97
Ser	1.85	4.29
Thr	2.03	4.71
Asp	4.67	10.83
Trp	0.63	1.46
(Cys) ₂	0.78	1.81
Free arginine	1.65	3.83
Free Tryptophan	0.01	0.02
Free aspartic acid	0.16	0.37
Total of amino acids	43.11	100

* Each content was equivalent to one hundred g.

Except for Tryptophan, other all are based on amino acid automated analysis.

Tryptophan was analyzed by the high-speed liquid chromatograph method.

These data was given by Tohaku Nosan Corporate Union, Fukushima Japan (Japan Food Research Laboratories Foundation; Analysis number, #105030683; Analysis day, April 15, 2005).

Table 2. Nutrition content in *Paecilomyces tenuipes*.

	Content /100g *	detection limit	note	analysis method
calorie	392 kcal		*1	
protein	65.0 g		*2	Kjeldahl method
lipid	10.3 g			acis decomposing method
carbohydrate	2.5 g		*3	
dietary fiber	14.7 g			enzyme-gravimetric method
Na	66.6 mg			atomic absorption photometer
moisuture	2.6 g			Normal pressure heating drying method
ash content	4.9 g			direct incineration method
P	1.00 g			ICP emission spectrometry
Fe	7.17 mg			ICP emission spectrometry
Ca	180 mg			ICP emission spectrometry
K	1.07 g			atomic absorption photometer
Mg	474 mg			ICP emission spectrometry
Cu	1.74 mg			atomic absorption photometer
Zn	23.0 mg			ICP emission spectrometry
Mn	2.54 mg			ICP emission spectrometry
Se	24 ug			fluorometry
I	none detected	0.5 mg/100 g		gas chromatography
total Cr	none detected	0.05 mg/100 g		ICP emission spectrometry
thiamin (vitamin B ₁)	0.14 mg		*4	HPLC
riboflavin (vitamin B ₂)	2.45 mg			HPLC
vitamin B ₆	0.59 mg		*5	micrological assay
vitamin B ₁₂	none detected	0.03 ug/100 g	*6	micrological assay
vitamin D	26.1 ug			HPLC
vitamin D(Int. Unit)	1,040 IU			
vitamin E(α-tocopherol equiv.)	1.2 mg		*7	
α-tocopherol	1.1 mg			HPLC
β-tocopherol	none detected	0.1 mg/100 g		HPLC
γ-tocopherol	0.6 mg			HPLC
δ-tocopherol	0.3 mg			HPLC
folic acid	0.93 mg		*8	micrological assay
pantothenic acid	4.32 mg		*9	micrological assay
niacin	10.2 mg		*10	micrological assay
mannitol	0.48 g			HPLC
β-glucan	4.5 g			enzyme method
ergosterol	333 mg			HPLC

* Each content was equivalent to one hundred g.

These data were given by Tohaku Nosan Corporate Union, Fukushima Japan (Japan Food Research Laboratories Foundation; Analysis number, #105030683; Analysis day, April 15, 2005).

Table 2. Cont. -

Note:

- *1: The energy conversion coefficient by a nutrition labeling standard (2003 Ministry of Health, Labour and Welfare notification No. 176): protein: 4, lipid: 9, carbohydrate:4, dietary fiber: 2.
- *2: Nitrogen and a protein conversion factor: 6.25.
- *3: The energy conversion coefficient by a nutrition labeling standard (2003 Ministry of Health, Labour and Welfare notification No. 176): 100-(moisture+ protein+lipid+ash content+ dietary fiber).
- *4: As thiamine hydrochloride.
- *5: Use strain: *Saccharomyces cerevisiac* (*S. uvarum*) ATCC 9080.
- *6: Use strain: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*L. leichmannii*) ATCC 7830.
- *7: α -tocopherol 1 mg, β -tocopherol 2.5 mg, γ -tocopherol 10 mg and δ -tocopherol 1001 mg were α -tocopherol Eq 1 mg, respectively.
- *8: Use strain: *Lactobacillus rhamnosus* (*L.sasei*) ATCC 7469.
- *9: Use strain: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8041.
- *10: Use strain: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8041.

3. 実験動物

(1) マウス

生後 5 週齢の C57BL/6J 雄マウス (体重 21.24 ± 0.94 g) を日本 SLC より購入し, Normal Control (NC), Aging Control (AC), PTE x 5 mg/(kg-day), PTE x 25 mg/(kg-day) の 4 群に分け, 1 ケージあたり 5 ~ 6 頭を環境制御された部屋 {室温: 23~25 °C, 明暗周期: 照明 12 時間 (照明点灯時間: 07:00~19:00), 消灯 12 時間} で集団飼育した. 実験は飼育室で 19:00 から 23:00 の時間帯に実施した. 10 日間の馴化期間の後, 全試験期間中, 全てのマウスは標準食 (MEQ, オリエンタル酵母社) が与えられ, 毎日体重を記録した. 行動実験時以外は食餌と水は自由摂取により与えられ, それらの水と餌は隔日計測し, 排泄量 (床敷の重量) を週に 2 回計測した. マウスの個体識別は, ケージ番号と耳穿孔器によるマーキングの組み合わせによりおこなった. 本研究は, 動物愛護法並びに実験動物のケア及び使用に関するガイドラインに従うとともに, 岩手大学動物実験委員会で許可されおこなわれた.

(2) 薬物の調製

20 ml 容のバイアルに 70%エタノールを吹きかけ, 60°Cの乾熱乾燥機の中にアルミホイルを敷き, その上で滅菌した. その後, 秤量した D-gal (Sigma 社)をバイアルに入れ, 生理食塩水 (扶桑薬品工業社) で 100 mg/kg になるように調整した.

(3) D-gal 誘導老化マウスモデルの作製

D-gal の投与は、脳やアンチエイジング薬研究のための老化モデルとして使われている。老化の原理は解明されていないが、マロンジアルデヒドの増加、グルタチオンペルオキシダーゼとスーパーオキシドジスムターゼの減少による脳内の酸化ストレスが示唆されており (Gong *et al.*, 1991 ; Li *et al.*, 1995 ; Ho *et al.*, 2003), これらの酸化ストレスは脳老化の重要なファクターの 1 つと考えられている (Droge, 2003). 本研究では、D-gal による脳老化誘導のための事例 (Wei *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2009) を参照し、Fig. 2 に示すスケジュールで実験をおこなった。AC 群, PTE x 5 mg/(kg-day)群, PTE x 25 mg/(kg-day)群の 3 群のマウスに対しては、脳の老化誘導を目的として濃度 100 mg/kg の D-gal を 8 週間、皮下注射した。一方、対照区として NC 群には生理食塩水を 8 週間、皮下注射した。注射期間中は全 4 群とも同様の餌と水を与えた。

(4) カイコ冬虫夏草熱水抽出物 (PTE) の投与

D-gal を投与された上記 2 つの PTE 群は、行動実験終了時まで投与濃度が 5 及び 25 mg/(kg-day)になるよう PTE を蒸留水に溶解させたものを経口自由摂取させた。この濃度は、毎日測定した体重を元に正確に算出した。一方、NC 群と AC 群には水を経口自由摂取させた。

4. ステップスルー型受動的回避実験

(1) 装置

装置（小原医科産業）は、逆台形型の明室と暗室（明室：上面 100 × 130 mm, 底面 42 × 130 mm, 高さ 90 mm, 暗室：上面 100 × 160 mm, 底面 42 × 160 mm, 高さ 90 mm）から構成されている。両室の床は、ともに直径 2.0 mm のステンレス棒が 6.0 mm 間隔で並べられており、暗室の床だけが通電される。それらの部屋は、実験者が自由に開閉できる仕切りドア（ギロチンドア）で接続されている。獲得試行は、マウスを白色蛍光灯（15 W）で照らされた明室に入れ、ギロチンドアを開いて開始した。また、暗室内の入り口には入室を検知するための赤外線センサーがあり、入室時間の計測や電気刺激発生トリガーに用いた。

(2) 手順

本実験の前にマウスの異常個体を選別するために、前獲得試行をおこなった。ステップスルー型受動的回避実験は、暗い場所に進むというマウスの負の走行習性を利用したものであるため、明室におかれたマウスが 60 秒以上明室に留まるようであれば、異常個体と判断し、実験に使用しなかった。この前獲得試行では、仕切りドアを開けたままマウスを明室に入れ、暗室に入るまでの時間を測定した。

実験 1 日目に前獲得試行をおこない、その後獲得試行をおこなった。獲得試行は、仕切りドアを閉めた状態でマウスを明室に入れ、30 秒後に仕切りドアを開け、マウスが暗室に入るまでの時間（反応潜時）を測定した。マウスの後ろ足が暗室に入った、ま

たは暗室の中の赤外線センサーに反応した時点で、仕切りドアを閉め、0.3 mA の電気刺激を 4 秒間与えた。

実験 2 日目（獲得試行から 24 時間後）に再生試行をおこなった。再生試行は獲得試行と異なり、電気刺激は与えない。それ以外の操作は、獲得試行と同様におこなった。反応潜時は最大 180 秒として計測した。

5. モリス水迷路実験

(1) 装置

装置は、Fig. 4 に示した円筒形プール（直径 100 cm、深さ 30 cm）を床上 80 cm にセットした。このプールに深さ 20 cm まで水（25 ± 1°C）を入れ、透明なプラットフォーム（直径 10 cm、高さ 19 cm）が水面下 1 cm に沈むようにセットした。プラットフォームが水泳中のマウスに見えないように、市販の白色ポスターカラーでプールの水を白濁させ、プール水面の真上 100 cm の位置に設置し、全てのクワドラントをカバーする写真を白黒 CCD カメラで自動記録した。コンピュータとカメラは連動しており、マウスの水泳軌跡を 0.5 秒間隔で保存した。水泳軌跡の記録と画像解析は、NIH (The U.S. National Institute of Health)により開発され公開されている NIH Image を元にしたソフトウェア、Image WMH 2.08 と Image WM 2.12（小原医科産業）を使用した。

(2) 手順

モリス水迷路実験は 9 日間、毎日夜間の同じ時間から開始した。1 日目にマウスをプールに馴れさせるため、各々 1 回ずつ 1 分間泳がせた。その際、プラットフォームに高さ 10 cm の目印をセットし、マウスにプラットフォームの存在を認識させた。また、マウスをプールに入れる際、コンピュータに指示されたマウス投入地点からプールの壁向きに入水させ、実験者は速やかにマウスから見えない位置に退避した。マウスが 60 秒以内にプラットフォームに到達したとき、その場で 15 秒間安置した後救出した。60 秒間の水泳でプラットフォームに到達できなかった場合、実験者の手でマウスをプラットフォーム上に移動させ、その時点から 15 秒間安置した後救出した。

2 ～ 8 日目は、マウスにプラットフォームの位置を記憶させるトレーニングをおこなった。トレーニングはマウス 1 頭につき連続して 1 日に 4 回おこなった。トレーニングの方法は、1 日目の操作と同様におこない、プラットフォームに到達した時間を記録した。なお、60 秒で到達できなかった場合は、到達時間を 60 秒と記録した。

9 日目にプローブテストをおこなった。プローブテストは、プールからプラットフォームを取り除き、マウスを 60 秒間泳がせ、本来プラットフォームがあった場所を横切った回数 (Crossing)、平均水泳速度、そして、各クワドラント(円形のプールの 4 分円)の各ドメイン内での滞在率 (滞在時間) を測定した。また、プローブテストは 1 頭につき、1 回ずつおこなった。

6. 統計解析

マウスの体重等、ステップスルー型受動的回避実験、モリス水迷路実験において、JMP[®] 8 (SAS Institute Inc.) を用いて、分散分析 (ANOVA) をおこなった。事後検定に

は Tukey-Kramer test を用い, その他の行動実験スコアは Dunnett's test を用いて検定をおこなった. なお, $P < 0.05$ の場合, 統計的に有意差があるとした.

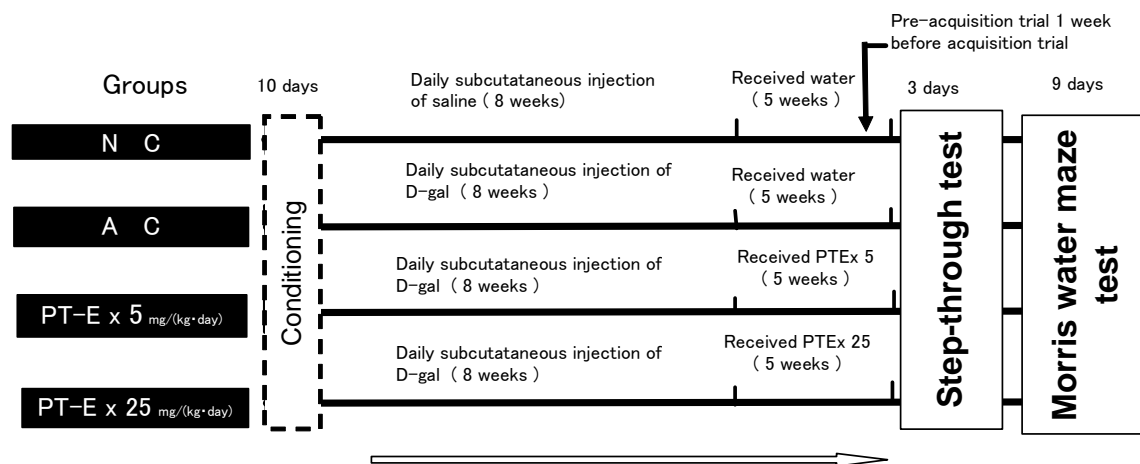


Fig. 2. Experimental schedule of behavioral studies performed by step-through passive avoidance and Morris water maze tests. Brains were promptly dissected and used for assay after the two behavioral studies.

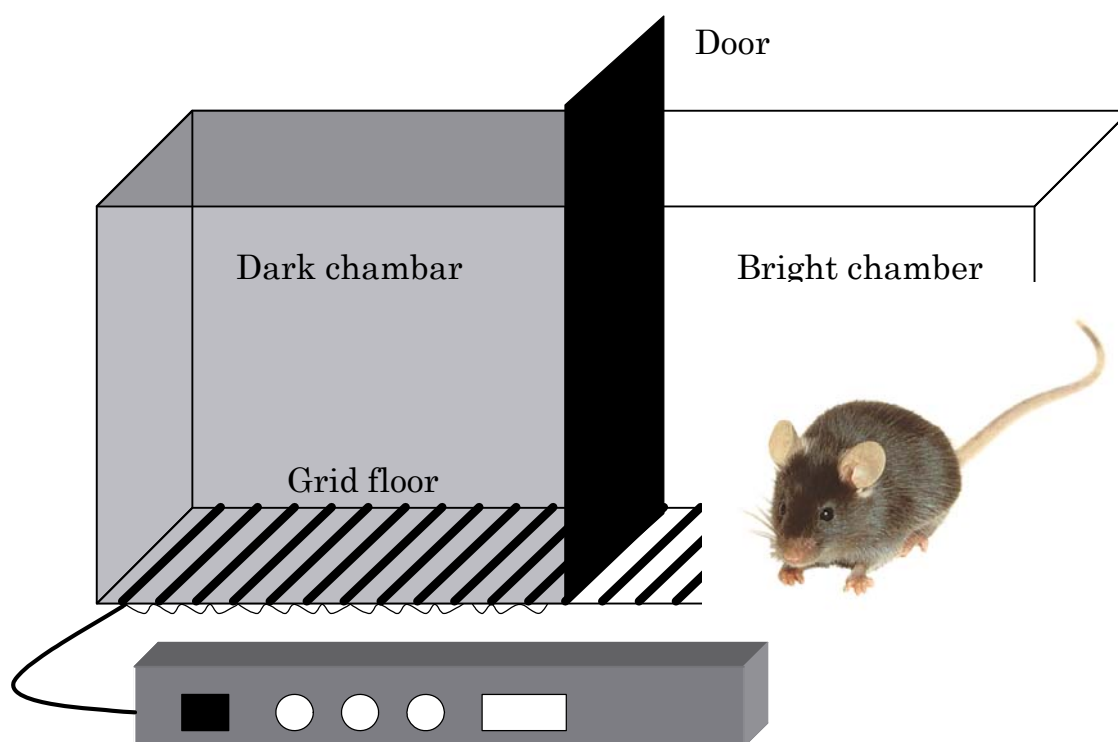


Fig. 3. An equipment of passive avoidance test. The apparatus was a trapezoidal light-dark box, consisting of a light chamber (100 × 130 mm at the top, 42 × 130 mm at the bottom and the height is 90mm) and a dark chamber (100 × 160 mm at the top, 42 × 160 mm at the bottom and the height is 90mm). The floor of both chambers was made of 2.0 mm stainless steel rods spaced 6 mm apart, the floor of the dark chamber could be electrified. The chambers were connected by guillotine door. The training trial was started by placing the animal inside the light chamber and raising the guillotine door. When a mouse entered the dark chamber, the door between the two chambers was closed and foot shock (0.3 mA, 4 sec) was delivered through the grill floor of the dark chamber. The presence of the passive avoidance was 24 h later. The mouse was placed on the illuminated chamber once more and the latency to enter the dark chamber was measured with the cutoff time of 180 sec.

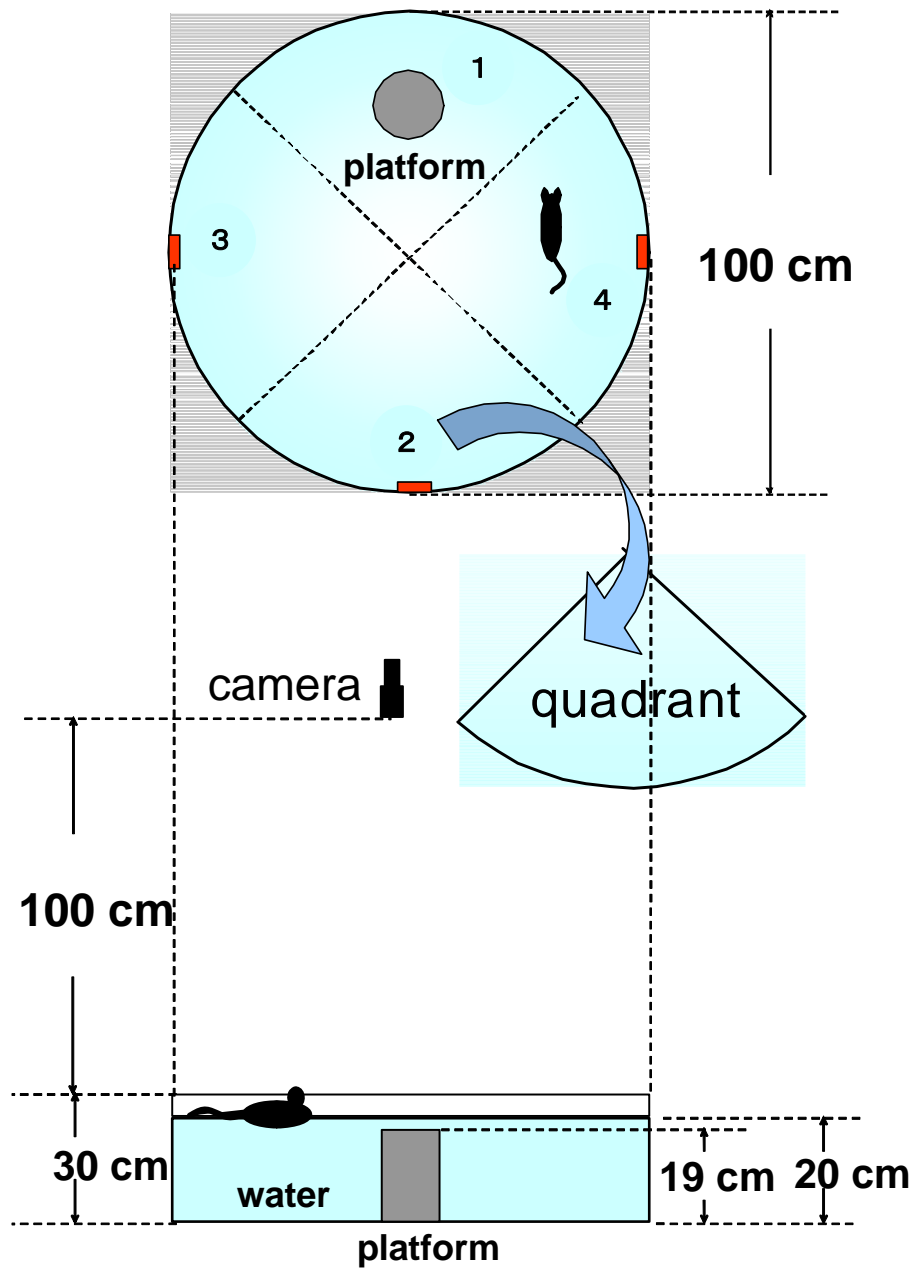


Fig. 4. An equipment of Morris water maze. The water pool was filled to depth of 20 cm, so that the mouse could either escape over the edge of the tank nor balance its tail on the bottom of the task. White paint was added into the water and the temperature controlled at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A video camera was mounted above the tank. Red rectangles indicate start location.

II. 結 果

1. 実験動物の体重, 飲水量, 摂食量および排泄量の推移

47~149日齢の体重, 飲水量, 摂食量と排泄量の変化を Figs. 5~8に示す. それぞれのグラフにおいて4群間の有意な差は認められなかった.

2. ステップスルー型受動的回避実験

ステップスルー型受動的回避実験により, PTEの文脈学習・記憶に及ぼす影響について調べた (Fig. 9).

獲得試行では, マウスが暗室に入るまでの時間に4つの群で有意な差は認められなかった (Fig. 9). 24時間後の記憶の保持を示す再生試行による反応潜時は, AC群に比べてNCとPTE x 25 mg/(kg-day)群で有意に高かった ($P < 0.05$). しかしながら, AC群に対するPTE x 5 mg/(kg-day)群の間には有意な差が認められなかった ($P > 0.05$).

3. モリス水迷路実験

モリス水迷路試験の訓練試行において, 各群のマウスがプラットフォームに退避するまでに要する平均反応潜時の推移を示した (Fig. 10). 各群の訓練1日目を基準にプラットフォームへの退避の反応潜時が短縮されるか検定したところ, いずれの群においても有意な短縮が見られた. また, 各訓練日における4群間での平均到達時間の比較をおこなったところ, 7日目のPTE x 5 mg/(kg-day)群で有意に到達時間が短いことが示された ($P < 0.001$).

8 日目にプラットフォームを撤去し、プローブテストを実施した。PTE x 5 mg/(kg-day)群は、(プラットフォームがあった地点での) クロッシング回数が AC 群に比較して顕著に増加した($P = 0.0535$) (Fig. 11). なお、4 つの群の平均水泳速度に差異は認められなかった (Fig. 12). さらに、ターゲットクワドラントと他のクワドラントでの滞在時間を比較した (Fig. 13). PTE x 5 mg/(kg-day)群のマウスは、クワドラント 2 ($P < 0.05$)及びクワドラント 4 ($P < 0.001$)と比較し、ターゲットクワドラント 1 の滞在時間が有意に長かった。PTE x 25 mg/(kg-day)群のマウスも、クワドラント 2 ($P < 0.01$) 及びクワドラント 4 ($P < 0.01$)と比較し、ターゲットクワドラント 1 の滞在時間が有意に長かった。しかしながら、NC 及び AC 群のマウスは、ターゲットクワドラント 1 での滞在時間が顕著に長くはなかった。

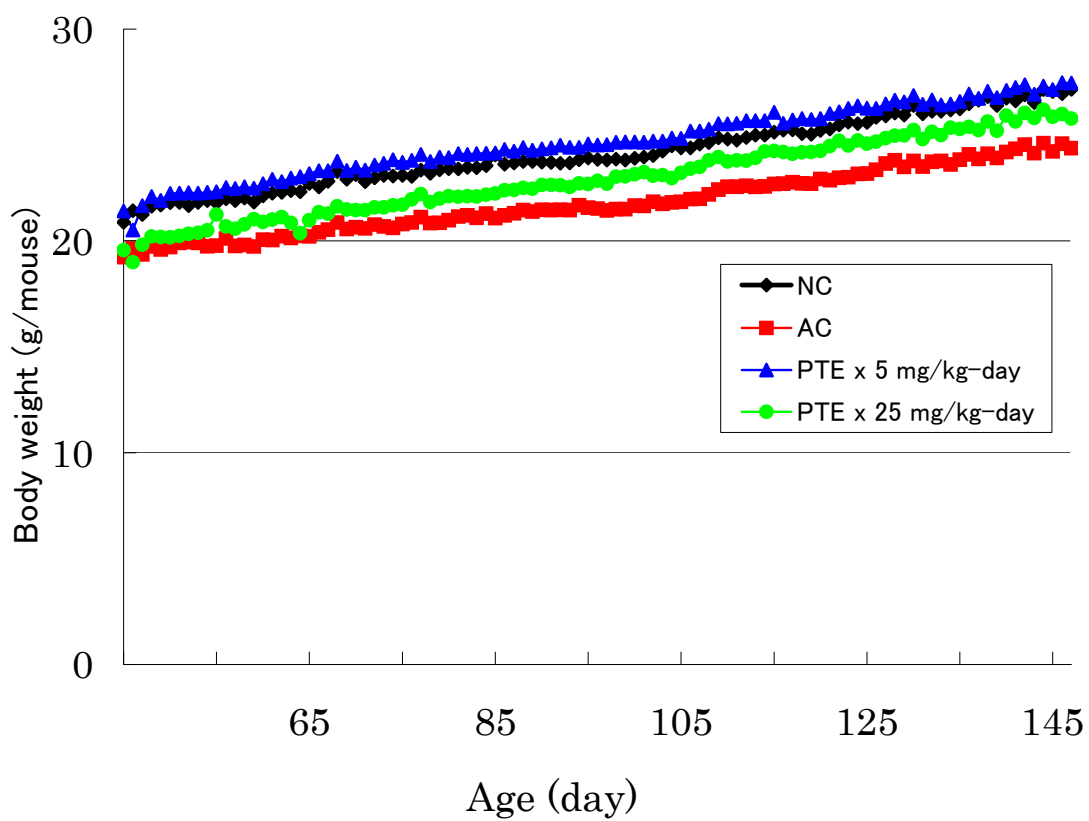


Fig. 5. Mean body weight in four groups mice from 47 to 149 days of ages. It was measured everyday. Weight was not significantly different among four groups by ANOVA ($p < 0.05$).

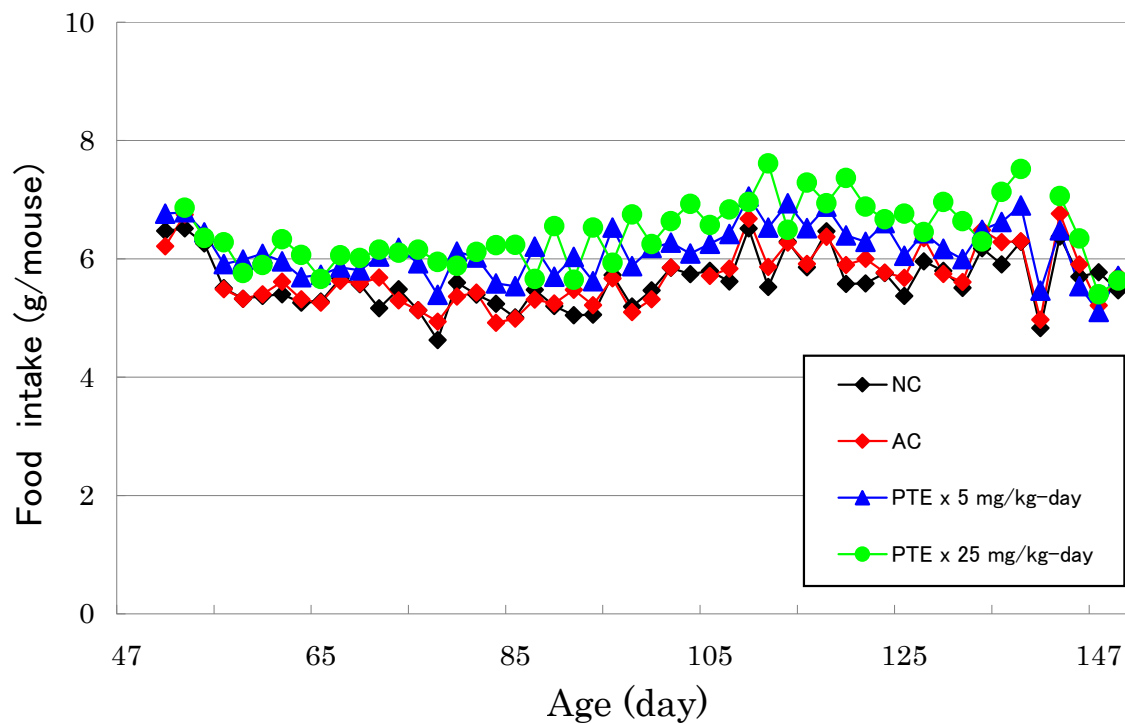


Fig. 6. Mean daily food intake in four groups mice from 47 to 149 days of ages. Consumption was measured every other day. Food intake was not significantly different among four groups by ANOVA ($p < 0.05$). Consumption was measured every other day.

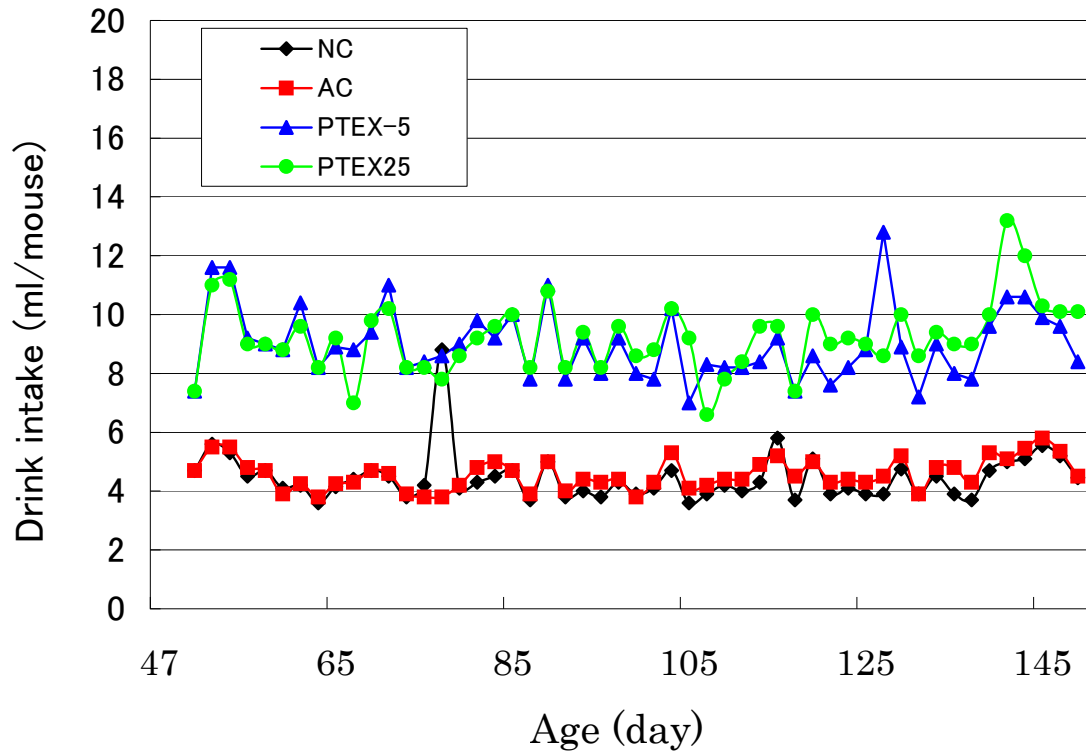


Fig. 7. Mean daily drink intake in four groups mice from 47 to 149 days of ages. Consumption was measured every other day. Drink intake was not significantly different among four groups by ANOVA ($p < 0.05$).

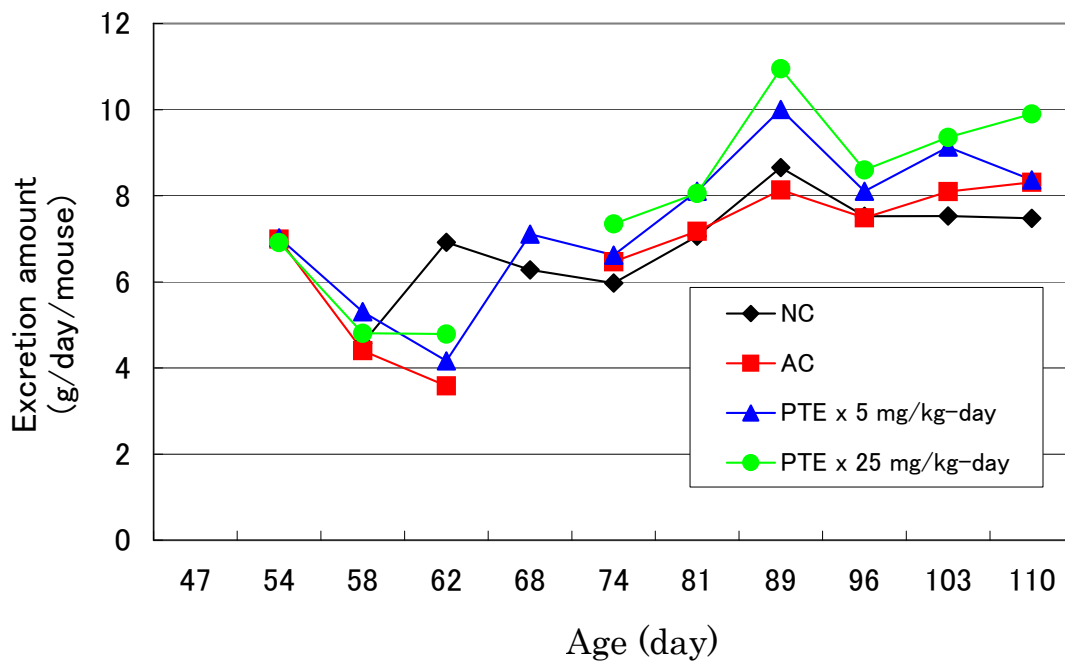


Fig. 8. Mean daily excretion amount in four groups mice from 49 to 149 days of ages. Elimination was measured every third days. Excretion amount was not significantly different among four groups by ANOVA ($p < 0.05$). Elimination was measured every third day.

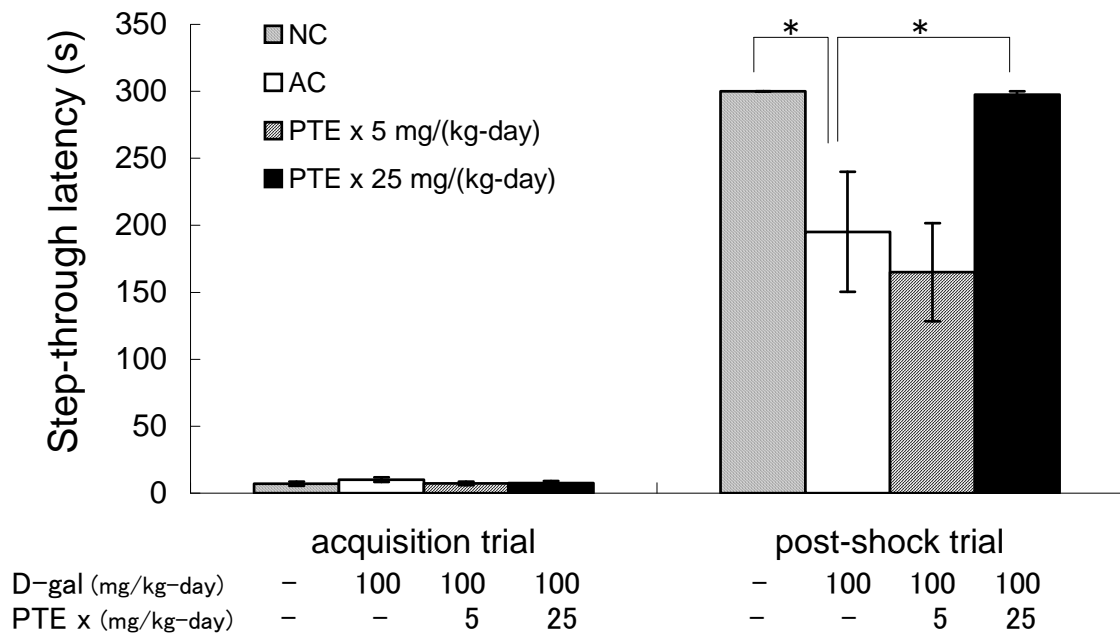


Fig. 9. Effects of PTE in step-through passive avoidance testing of mice with aging induced by D-galactose. Mice were divided into four groups. NC, the normal control group (n = 8) served as vehicle control with injection of saline (0.9 %) only and was given plain water without PTE. AC, the aging control group (n = 8), received daily subcutaneous injection of D-galactose at 100 mg/(kg-day) for 8 weeks, and was given plain water without PTE. The group given a hot-water extract of *Paecilomyces tenuipes* (PTE) at 5 mg/(kg-day) (n = 8) received daily subcutaneous injection of D-galactose at 100 mg/(kg-day) for 8 weeks and received PTE at 5 mg/(kg-day) in plain water for 5 weeks after the subcutaneous injections. The PTE × 25 mg/(kg-day) group (n = 8) received daily subcutaneous injection of D-galactose at 100 mg/(kg-day) for 8 weeks, and received PTE at 25 mg/(kg-day) in plain water for 5 weeks after the subcutaneous injections. These groups also apply to Figs. 10, 11, 12, 13, 14 and 15. All values are expressed as means±SEM. * P <0.05 vs. AC group.

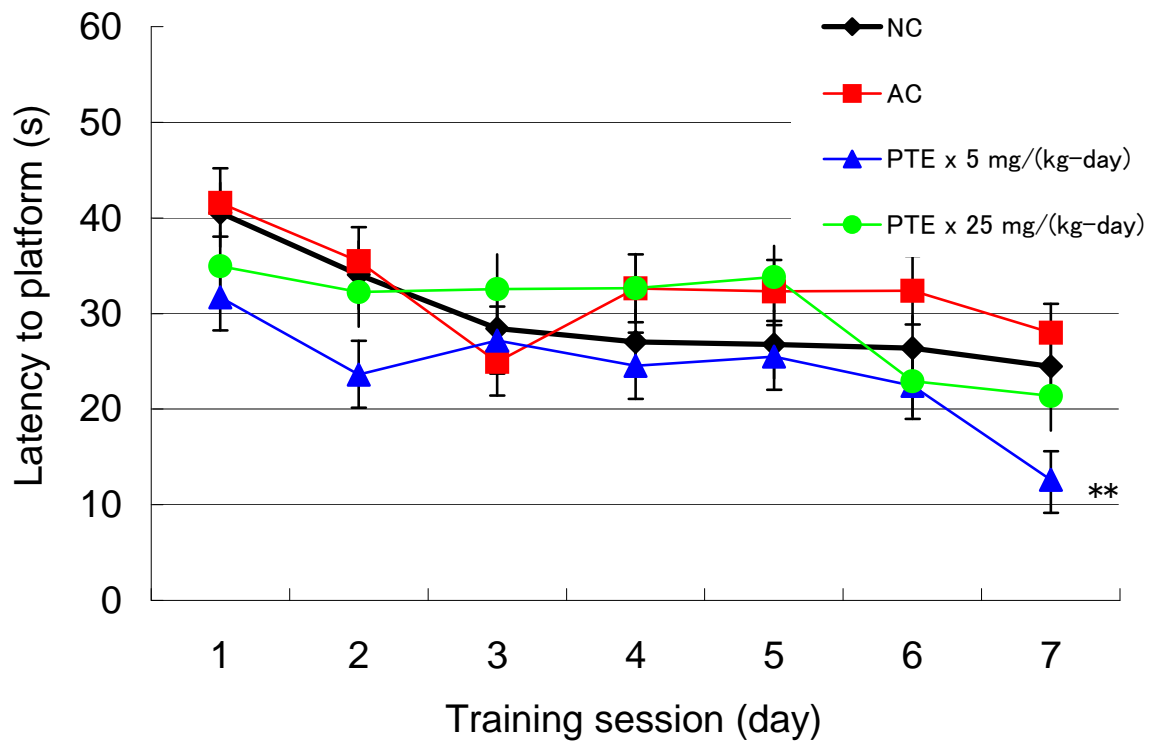


Fig. 10. Effect of PTE on latency in the time taken for mice aged by D-galactose to reach the platform in the Morris water maze test. All values are expressed as means±SEM. ** P < 0.001 vs. AC group on the same training day.

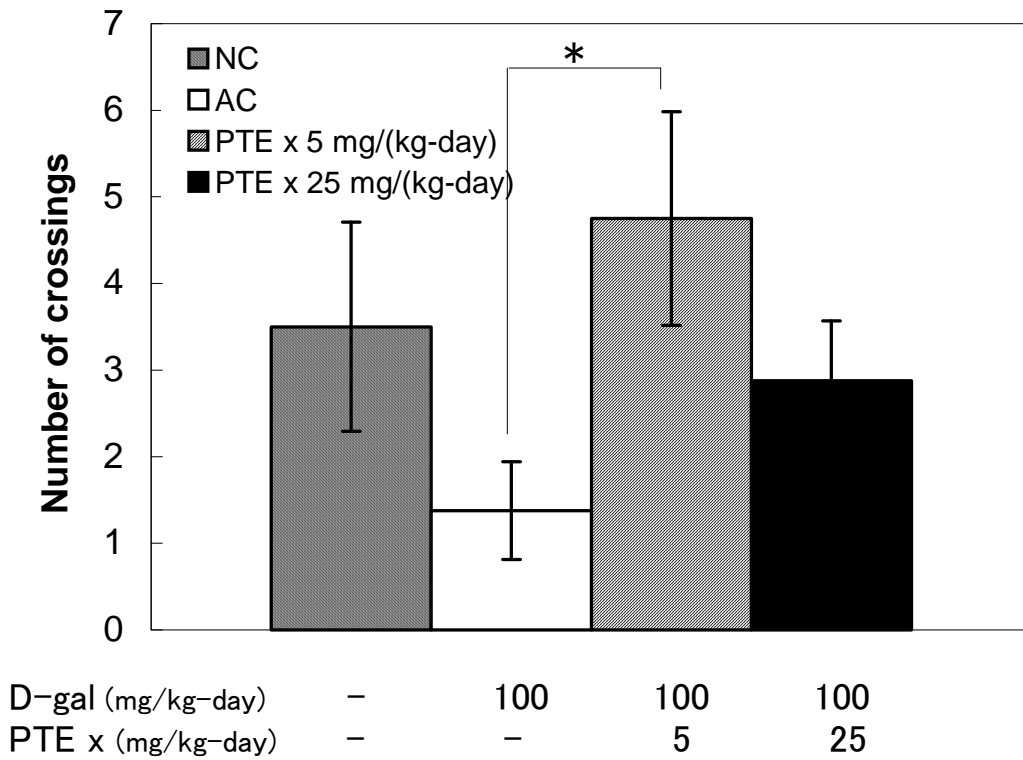


Fig. 11. Effect of PTE on number of crossings made by mice aged by D-galactose in the Morris water maze test on day 8th. All values are expressed as means±SEM. * P <0.05 vs. AC group.

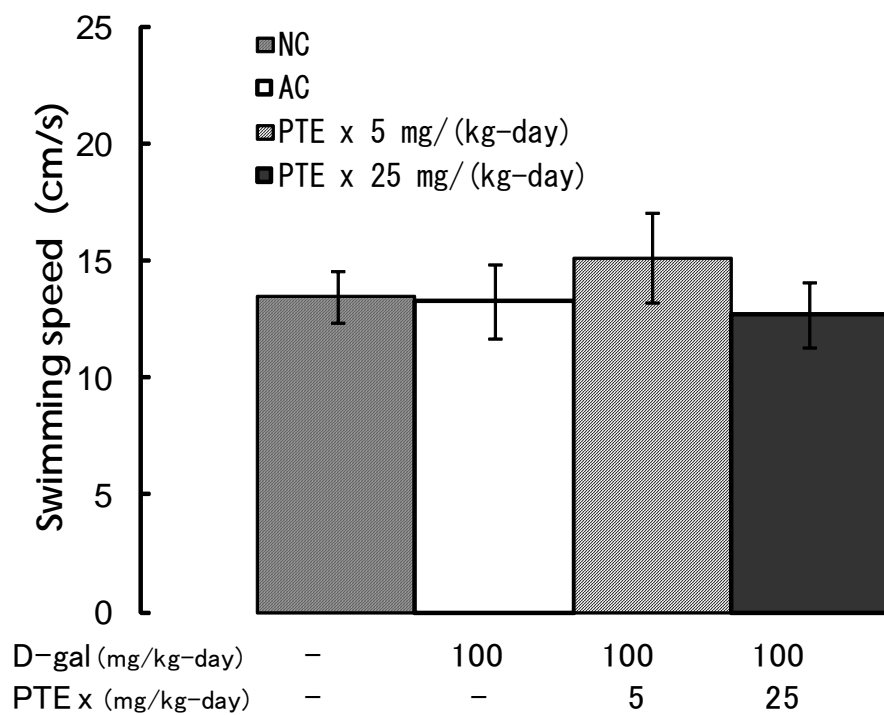


Fig. 12. Effect of PTE on swimming speed in the Morris water maze test (day 8th) of mice aged by D-galactose. All values means \pm SEM.

Ⅲ. 考 察

本研究で使用したカイコ冬虫夏草は、宿主が福島産の実用品種のカイコ蛹で、菌株は同じく福島県内の山中から採取された *P. tenuipe* であることから、昨今食品分野で問題となっているトレーサビリティに優れた素材である。Table 1 に示すように、熱水抽出前の冬虫夏草粉末の状態ではあるが、各アミノ酸成分がバランスよく含有されていることがわかる。さらには、脳機能改善に効果があるといわれるアラニン、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシン、グルタミン酸、セリン、トリプトファン等が含まれている（中川, 1989; Pardridge, 1983）。熱水抽出法では、多糖類とタンパク画分が得られることと（Miyazawa *et al.*, 2008）、逐次抽出法における MQ 抽出物・メタノール抽出物・酢酸エチル抽出物に含まれる広い範囲の物質まで抽出が可能であると考えられること（吉田, 2010）や、カイコ冬虫夏草からの PTE 抽出の収量が 65.7% と高率であったことと併せ、本研究で調製した PTE にはこれらの幅広い有効成分が含まれているものと考えられる。さらに、Table 2 に示すように、多様なビタミン類やβ-グルカンの含有量の多さが注目される。なお、これらの成分の分析データは宿主のカイコ蛹のロットが異なるサンプルであっても各成分の含有比率はほぼ変化がみられなかった（データ省略）。さらには、電子スピン共鳴（ESR）法による分析では、スーパーオキシド消去活性が 4.8×10^3 unit/g あることから、抗酸化活性による脳機能改善効果を有していることも推察できる（データ省略）。

本研究では、これまでの多くの報告（Wei *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2009）によって確立されている手法に基づき、ステップスルー型受動的回避試験（Fig. 9）とモリス水迷路（Figs. 10~12）を用い、D-gal を 8 週間にわたりマウスに皮下注射をすることで脳機能が低下することを確認した。D-gal の投与量 100 mg/(kg-day) は、C57BL/6J 雄マウスに対して適切であり、Fig. 12 において 4 群間の平均水泳速度に差

異が認められないことから、Weiら(2005)が指摘していたD-gal 100 mg/(kg-day)以上の投与で発生する神経筋の機能不全を伴うことなく学習・記憶障害を発生させることができたと考えられる。それゆえ、D-galの皮下注射量とその投与期間によるモデルは、昆虫資源の神経保護作用を分析するための脳老化誘導モデルマウスの作出に適しており、今後も様々なサンプルを用いた脳機能改善物質の探索と機能解析に応用が期待される。

C. sinensis (CSE)の熱水抽出物がD-galによる脳老化マウスの脳機能の向上と去勢ラットの性機能を促進させた研究例がある(Ji *et al.*, 2009)が、PTEもまた脳老化マウスの空間学習・記憶障害を修復したことが示唆された(Figs. 9~11 and 13)。しかしながら、この肯定的なPTEの効果は、いずれの試験結果においても明らかな濃度依存性が認められず、低濃度であるPTE x 5 mg/(kg-day)投与が脳老化マウスに対して適切かつ有意な記憶回復をもたらす濃度であることが示唆された。この原因は、高濃度のPTE x 25 mg/(kg-day)には効果が打ち消されるような成分の含有も考えられるが、今後の課題として残る。しかし、本研究では、フラボノイドの一種であるケルセチンをD-galによる脳老化マウスに投与し記憶・学習能の改善が認められた報告(Lu *et al.*, 2006)を参考にPTE投与量を5 mg/(kg-day)と25 mg/(kg-day)に設定した。一方、上述のCSEによる脳老化マウスの脳機能の向上は、CSEを経口で2~4 g/(kg-day)と非常に高濃度の試料を摂取していた。PTEでは5または25 mg/(kg-day)の摂取であり、入手困難な*C. sinensis*のわずか400分の1の量で十分な効果が期待され、コスト面や供給の面でも非常に優れていると言える。なお、CSEとPTEに含まれる生理活性化合物の違いとこれらの投与量の差に相関があるかどうかはいまだ説明されていない。Paterson(2008)は、*Cordyceps*類及び他の菌類が多く、生理活生機能である免疫性、抗酸化、低血糖、コレステロール低下作用、中性脂肪降下作用並びに抗炎症活性を有することを示唆している。したがって、今後様々な冬虫夏草の成分の分析・比較が進められることを

期待する。

以上より、入手が困難でトレーサビリティなど食品としての安全性の面で課題を有するチベット産の *C. sinensis* だけでなく、純国産の *P. tenuipes* の熱水抽出物が老化誘導マウスの空間学習・記憶障害を有意に改善したことが注目に値すると考える。この冬虫夏草を製造販売している、東白農産企業組合の培養方法は、福島県林業研究センターが開発した培養技術を導入し、その技術指導を受けつつ、独自に培地などの工夫を重ね安定供給のための技術力を身につけ製造されたものである。今後は宿主の品種の選定や安定的な品質確保を行うことで機能性に特徴を有するカイコ冬虫夏草の創出ができるものと期待される（藤田, 2008）。

IV. 摘 要

カイコ冬虫夏草 *P. tenuipes* の熱水抽出物 (PTE) が, D-gal 誘導性脳老化マウスの記憶・学習機能に及ぼす影響を調べるために行動実験をおこなった.

その結果, 熱水抽出物の投与によるマウスの顕著な体重や摂食量の変化は確認されず, 下記のような脳機能改善効果が明らかになった.

1. 使用した PTE の原料としたカイコ冬虫夏草粉末には各種のアミノ酸が含有され, 中でも脳機能改善に効果があるといわれるアラニン, フェニルアラニン, チロシン, イソロイシン, グルタミン酸, セリン, トリプトファン等が多量に含まれていることから, 熱水抽出法を用いることで, それらが消失せず PTE にも含有されていると考えられる.
2. 文脈記憶・学習機能を調べるためのステップスルー型受動的回避実験において, PTE x 25 mg/(kg-day) の高濃度のサンプルを投与した群が, AC 群に比べて明室にとどまる時間が有意に増加した. また, 空間記憶・学習機能を調べるためのモリス水迷路実験では, PTE x 5 mg/(kg-day) 群のプラットフォームへの平均反応潜時が AC 群と比較して有意に短縮された. また, 同群は, プローブテストにおいて, プラットフォームがあった地点のクロッシング回数が AC 群に比較して顕著に増加した. プラットフォームがあったターゲットクワドラント 1 領域での滞在時間が, PTE x 5 mg/(kg-day) 群, PTE x 25 mg/(kg-day) 群とも他のクワドラント滞在時間よりも顕著に多く, NC 群と AC 群はターゲットクワドラント 1 領域で顕著に滞在することはなかった. これらの結果は, PTE を投与が D-gal 誘導脳老化マウスの空間学習・記憶能力を向上させたことが示唆された.

第二章 カイコ冬虫夏草熱水抽出物による脳機能向上の作用機構

記憶は宣言的記憶と手続き的記憶に分類され、前者はさらにエピソード記憶と意味記憶に分けられる。エピソード記憶は特定の時間と場所において経験した単一事象の保持であり、獲得された情報は海馬や海馬周辺領域に貯蔵され、一定期間後に新皮質に移されると考えられている（磯村ら, 2006）。

記憶に最も関係する海馬は、発生学的に最も古い大脳皮質の領域の一つである。海馬とはアンモン角（Cornu Ammonis）を指し、アンモン角と歯状回（dentate gyrus）をあわせて海馬体（hippocampal formation）とも呼ばれている。アンモン角は小型錐体細胞からなる CA1 領域と、大型錐体細胞からなる CA2 領域と CA3 領域に区分される。

本研究では、第一章において D-gal の長期投与によって脳老化誘導マウスを作出し、冬虫夏草熱水抽出物（PTE）を経口摂取させたところ、複数の行動実験において有意な脳機能の改善が認められた。しかしながら、PTE が脳神経系に影響を及ぼすメカニズムとして、神経伝達物質としてのアミノ酸や抗酸化活性物質の存在が推定されるが、機能性の糸口も明らかにされていない。アルツハイマー病患者の脳内において、神経伝達物質であるアセチルコリン（Ach）等が低下し、側頭葉を中心とする大脳皮質、海馬、扁桃核の Ach 合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）の活性が低下することが知られている（Wang *et al.*, 2009）。そこで本章では、PTE を経口摂取させた脳老化誘導モデルマウスの脳から mRNA を抽出し、ChAT の遺伝子発現の差異を RT-PCR により比較した。さらに、脳老化誘導モデルマウスの脳切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色とホルツァ染色による海馬領域の組織化学的解析をおこない、PTE が脳組織へ及ぼす作用について解析した。

I. 材料と方法

1. RT-PCR による記憶関連遺伝子の発現解析

(1) マウス脳からの Total RNA の抽出

第一章で行動実験に用いたマウス脳内における Ach 合成酵素コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の遺伝子発現の差異を比較するため、エーテル吸入深麻酔下のマウスを素早く断頭した後、脳を摘出し、50 mM (pH 7.4)の冷 PBS で洗浄した。その後、カミソリで脳を左脳と右脳に分断し、一方を *RNAlater*[®] Solution (Applied Biosystems Inc.) に一晩浸漬した後 -80°C で保管保存した。この脳サンプルを用い、TRIzol Reagent (Invitrogen Co., California, USA) を加え、取扱説明書のプロトコルに従って Total RNA を抽出した。すなわち、凍結した半分の脳の半分の重量 250 mg に対し TRIzol Reagent 4 ml を添加し、ホモジナイズした後、氷中に 5 分間放置した。続いて、0.8 ml のクロロホルムを添加、振とうし、25°C 3 分間放置静置した。次に 12,000 × *g* , 4°C 25 分間遠心分離をおこなった。これにより RNA を含む水相、DNA を含む中間相、タンパクを含む有機相の 3 層に分離された。RNA 沈殿のために、上清を別のコニカルチューブに回収し、2 ml のイソプロパノールを添加後、軽く振とうし、25°C 10 分間放置静置することで RNA を沈殿させた。12,600 × *g* , 4°C 10 分間遠心分離をおこなった後、上清を捨て、4 ml の 70%エタノールを添加して RNA を洗浄した。さらに、12,600 × *g* , 4°C 10 分間遠心分離をおこなった後、上清を捨て、乾燥後、100 μl のピロ炭酸ジエチル(DEPC)処理水を添加し、60°C 10 分間インキュベートすることで溶解した。抽出した Total RNA は、分光光度計 Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を用いて OD₂₆₀測定により定量をおこなった。また、Total RNA は使用するま

で -80°Cで保存した.

(2) 逆転写反応

前項で調製した Total RNA を RNA LA PCR Kit (AMV) Ver. 1.1 (Takara Bio Inc., Tokyo, Japan)を用い, 次のプロトコルに従って逆転写反応をおこなった. 前項の方法により調製した 500 ng Total RNA を 2 μ l, 5 mM MgCl₂ を 1 μ l, 10 \times PCR Buffer を 1 μ l, RNase Free dH₂O を 2.75 μ l, 10 mM dNTP Mixture を 1 μ l, RNase Inhibitor (1 U/ μ l)を 0.25 μ l, AMV Reverse Transcriptase XL (0.25 U/ μ l)を 0.5 μ l, 0.125 μ l Oligo dT-Adaptor Primer を 0.5 μ l 加えた各 PCR 溶液 25 μ l を, サーマルサイクラーを用い, 以下の条件で PCR 反応をおこなった. 42°Cで 30 分間反応させた後, 99°Cで 5 分間ヒートショックを与え, 5°Cで 5 分間反応させ, 逆転写反応液を得た.

(3) PCR 反応

上記の方法により合成した逆転写反応液 2.5 μ l, 2.5 mM MgCl₂ を 1.5 μ l, 10 \times LA PCR Buffer II を 2 μ l, RNase Free dH₂O を 18.38 μ l, TaKaRa LA Taq (12.5 U/50 μ l) を 0.125 μ l, 設計したそれぞれのプライマー0.2 μ M を 0.25 μ l 加えた PCR 溶液 25 μ l を, サーマルサイクラーを用い, 以下の条件で PCR 反応をおこなった. 94°Cで 2 分間の熱処理後, 熱変性を 94°Cで 30 秒間, アニーリングを 50°Cで 30 秒間, 伸長を 72°Cで 1 分 30 秒間の条件で 27 サイクルおこなった. なお, ハウスキーピング遺伝子には β -actin を用いた. プライマー配列は次の通りである (作製: (株) 日本遺伝子研究所, 宮城県仙台市):

ChAT (Wang *et al.*, 2009) : forward primer(5'-GGTGGCCAGAAGAGCAGTATC -3'),
reverse primer(5'-ATTGGAGGCAGGCGTTCATC -3')

β -actin (Shindo *et al.*, 2006) : forward primer(5'-CCTGTACGCCAACACAGTGC -3'),
reverse primer(5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC -3')

(4) アガロースゲル電気泳動

PCR 産物の確認のために、アガロースゲル電気泳動をおこなった。PCR で得られた各反応物 10 μ l あたりに、6 \times ローディングバッファーを 2 μ l 加えたものを試料とした。電気泳動アガロースは、1 \times TAE バッファー (40 mM Tris, 40 mM 氷酢酸, 1 mM EDTA) に最終濃度 2%になるように溶解した。そのゲル溶液にエチジウムブロマイドを添加した後、コームをセットしたゲル型トレイに流し込み、室温に放置し固化させた。固化したゲルを 1 \times TAE バッファーで満たしたサブマリン電気泳動装置にセットし、PCR 産物と 6 \times ローディングバッファーを混合した DNA 試料を各ウェルに添加し、100V を通電した。ブロモフェノールブルーが 7 割程度移動したところで泳動を終了した。泳動後、UV 撮影装置を用い、312 nm の波長泳動パターンを確認した。

2. 脳老化誘導マウスの海馬切片の組織化学的研究

(1) マウス脳の切片の作製

組織化学的解析のために、1. (1) で摘出・分割した脳的一方を、すみやかに

4%PFA/PBS (pH 7.4) 溶液中で 4°C, overnight 固定し, 脳スライス作製用の試料とした. 以下の標本作製は岩手大学農学部獣医学課程・御領政信准教授に依頼した. NC, AC 並びに PTE の各群の全ての脳サンプルは, 一般的な方法によりパラフィンワックスにより包埋し, 切片化した後, ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色法並びにホルツァ染色法により染色した. なお, HE 染色法は, 細胞核内のクロマチン評価のための一般染色方法であり, ホルツァ染色法は, 損傷神経再生を阻止するグリオーシス (神経膠症) を肉眼で観察できる染色法である.

海馬領域の撮影は, 光学式倒立顕微鏡 (OLYMPUS, BH-2, 対物レンズ倍率: $\times 4$, $\times 20$) を用い, デジタルカメラで撮影した.

II. 結 果

1. RT-PCR による ChAT の遺伝子発現の比較

NC, AC 並びに PTE の各群において、脳内の ChAT の遺伝子発現の差異を明らかにするため、Total RNA を抽出し、完全長 cDNA 配列を元に設計した特異的 Forward と Reverse プライマーを合成し、RT-PCR をおこなった (Fig. 14).

正常マウスである NC マウスで ChAT の発現が最も強く、D-gal により脳老化を誘導した他の群のマウスはいずれも NC に比べ ChAT の発現が弱かったが、AC マウスよりも PTE x 25 mg/(kg-day) マウスでの強いシグナルが検出された。

2. 海馬切片の組織化学的研究

冬虫夏草熱水抽出物が、脳老化誘導マウスの脳において、基質的な変化をもたらすか確認するために海馬領域を含む脳切片を作製し、組織化学的解析をおこなった。HE 染色の結果、マウス海馬の錐体細胞を始めとする神経細胞がよく保存されていることがわかる : NC (Fig. 15A), AC (Fig. 15C), PTE x 5 mg/(kg-day) (Fig. 15E), PTE x 25 mg/(kg-day) (Fig. 15G).

しかし、ホルツァ染色により脳老化マウスの海馬の神経細胞を観察したところ、非常に顕著な反応性グリオシスが海馬 CA3 領域に発生していることが判った(Fig. 15D)。一方、PTE x 5 mg/(kg-day)を投与されたマウスでは、CA3 領域のグリオシスの発生は非常に少ないことが観察された(Fig. 15F)。さらに、PTE x 25 mg/(kg-day)を投与されたマウスでは、NC のマウスと同様に、CA3 領域のグリオシスがほとんど発生して

いないことが観察された (Fig. 15H, B).

これらの結果は、空間パターン認識を司る CA3 領域において、反応性グリオースが D-gal 誘導性脳老化マウス群の海馬で発生し、その後、PTE を摂取したマウス群ではグリオースが消失することを示唆している。

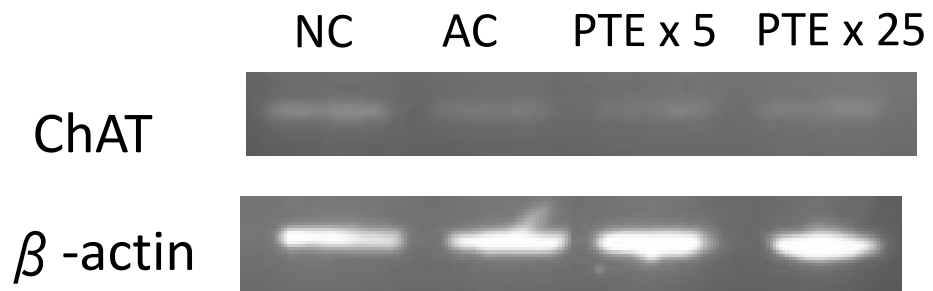


Fig. 14. Expression of ChAT in mouse brain by RT-PCR. This figure shows comparison of differentiation of D-gal-treated mice fed with PTEX at different doses or vehicle. β -actin was used for housekeeping gene.

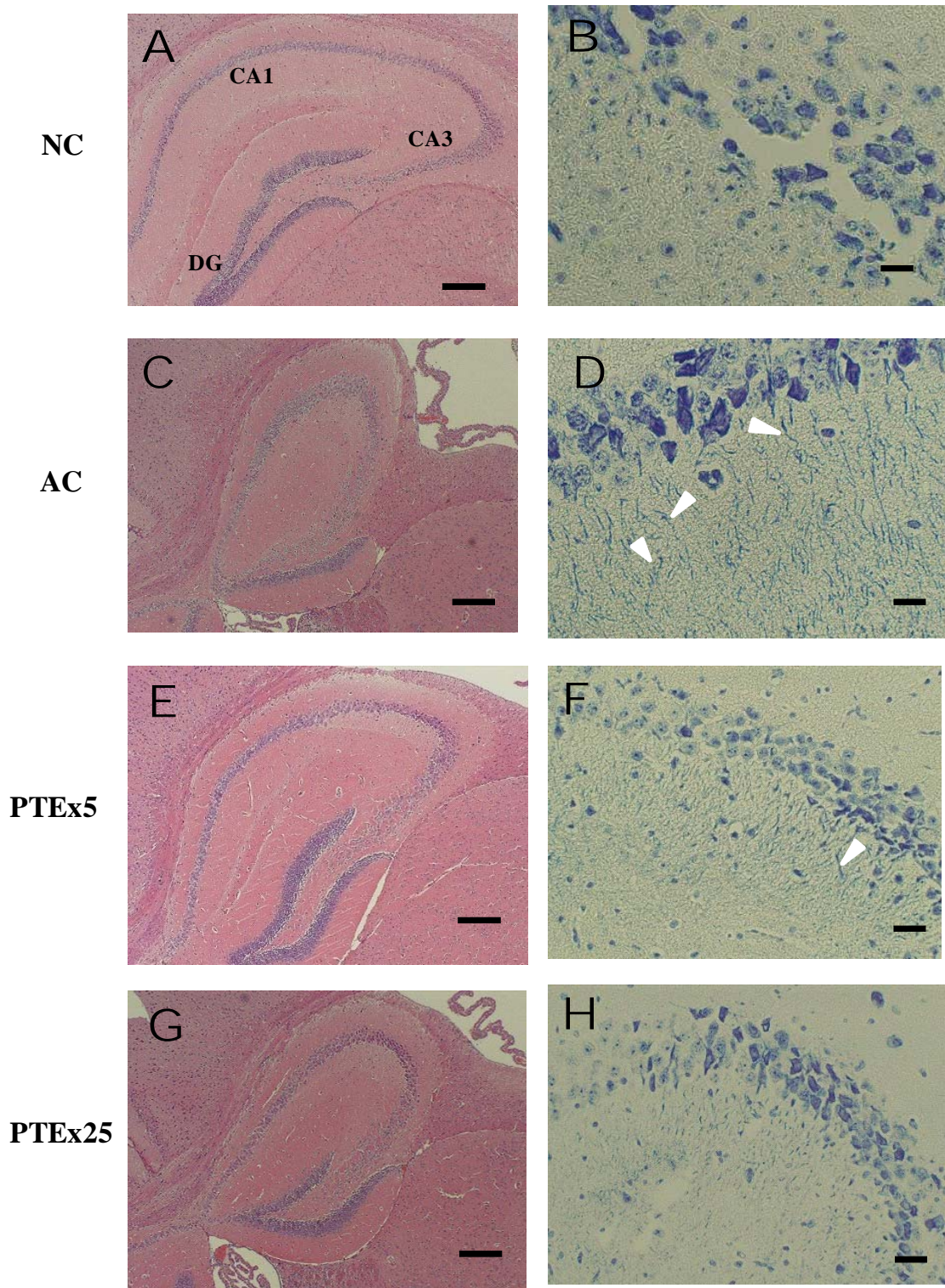


Fig. 15. Effect of PTE on hippocampal structures of mice aged mice by D-galactose. Left column: hippocampal structures (A, C, E, G) stained with HE stain (Bars = 40 μ m). Right column: CA3 areas of the hippocampus (B, D, F, H) stained by Holzer stain (Bars = 4 μ m). Arrowheads show gliosis.

Ⅲ. 考 察

本章では、第一章の行動実験で用いた D-gal の皮下注射により作出した脳老化誘導モデルマウスの脳を摘出し、RT-PCR による ChAT の遺伝子発現解析とともに、脳切片の各種染色による組織化学的解析をおこなった。

Fig.14 に示すように、ChAT の RT-PCR の結果は多少不鮮明な写真となったが、撮影した写真の原板では、NC, PTE x 25 mg/(kg-day), PTE x 5 mg/(kg-day), AC の順にシグナル強度が低下していることが確認できた。アルツハイマー病 (AD) では、アセチルコリン (Ach) をはじめとする神経伝達物質が低下しており、中でも Ach 系の低下は顕著であり、側頭葉を中心とする大脳皮質、海馬、扁桃核などでの Ach の合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の活性も低下しており (Wang *et al.*, 2009)、現在、AD 治療薬として最も多くの治験が進められているのが Ach 系の賦活薬が多い (奥田, 1998)。したがって、PTE は加齢による脳機能の低下のみならず、AD 予防・進行抑制効果を有する食品として応用開発できる可能性が考えられる。

今回の RT-PCR の操作において、27 サイクルの PCR 反応をおこなったが、伸長のサイクル数が不足したため明瞭な結果が得られなかったと考えられる。今後は、熱変性サイクルのさらなる最適化をおこなうとともに、リアルタイム PCR による発現量の定量化をおこなうことが望まれる。さらには、学習・記憶機能に関係する神経成長因子 (NGF) (Shindo *et al.*, 2006)、神経組織特異的タンパク質 (GAP43) (Wang *et al.*, 2009)、脳由来栄養因子 (BDNF) (Shindo *et al.*, 2006) をはじめとする各種関係因子の発現の比較分析をすることが必要と考える。

また、組織化学的知見解析において、HE 染色では 4 群間に明瞭な差異を確認出来なかったものの (Fig. 15A, C, E, G)、ホルツァ染色では AC 群に顕著なグリオシスが確認出来た (Fig. 15D)。さらに、D-gal を投与した AC, PTE x 5 mg/(kg-day), PTE

x 25 mg/(kg-day)の 3 群において、この順にグリオシスの発生状況が弱くなっており (Fig. 15D, F, H)、PTE x 25 mg/(kg-day)においては、健常マウスである NC と同様にグリオシスがほぼ発生していなかった (Fig. 15B, H)。

ヒトの脳内のニューロンの総数は 1,000 億から 2,000 億個存在するといわれており、さらにそれを取り巻く支持細胞であるグリア細胞の数はその 10 倍存在し、脳の体積の約半分を占めている (渡辺, 2008)。この中枢神経の主要なグリア細胞は、アストロサイト (星状膠細胞)、オリゴデンドロサイト (希突起膠細胞)、ミクログリア (小膠細胞) の 3 種類である。ニューロンや他のグリア細胞が虚血時の低酸素や低グルコースに対して脆弱であるのに対し、アストロサイトは虚血に耐性があると同時に、脳の損傷や脳組織への激しい作用や中枢神経組織傷害に対して敏感に反応を示すのも特徴である。この障害が発生するとアストロサイトは膨張したり、グリオシス (神経膠症またはグリア瘢痕) を起こす (渡辺, 2008)。これが反応性グリオシスまたはアストロサイトーシスと呼ばれる所以である。この反応では、神経膠線維性酸性蛋白 (GFAP: glia fibrillary acidic protein) やある種のタンパク質 (接着分子, 細胞骨格タンパク, 酸化的代謝系酵素, サイトカイン, 成長因子, 主要組織適合性遺伝子複合体タイプ I 及び II) を産生する細胞の大きさが増加することを特徴とする (Tritsh *et al.*, 2009)。結果的に、グリオシスは総称神経の再生を阻害する病理的所見と言える。また、病理学的検査法からみた AD の病理組織像は、ニューロンの消失とグリオシスによる置換が行われているか否かにより診断される (広井, 2002)。さらには、臨床医の判断基準の提案例ではあるが、神経原線維変化 (neurofibrillary tangle: NFT) が海馬領域を中心に広範にあればその量が少なくとも AD に罹患していることを示し、加齢脳に発生する老人斑の数が多くとも海馬領域の NFT やグリオシスが乏しければ正常範囲であるとしている (松下, 1999; 山田, 2009)。したがって、このグリオシスの発生状況を観察することで、脳が AD の状態にあるか否かを決定するための临床上重要な判断材料であると考え

られている。

本研究の結果は、D-gal によって引き起こされた老化マウス海馬領域のグリオーススが、PTE によって修復される可能性を示唆するものである。これまで、成人の脳において一度死滅したニューロンは再生しないとされてきた。しかし、近年成人の脳の中でも少なくとも記憶と学習に重要な海馬においてニューロンが日常的に新生しているという驚くべき発見が発表され (Eriksson, *et al.*, 1998), その後、多くの研究者によりこの現象が確認されるにいたった。

また、グリオーススが観察された領域にも重要な意味がある。1996 年、利根川らは NMDA 型受容体 NR1 を海馬 CA1 領域でノックアウトした NR1-CA1-KO マウスを作成し、このマウスにより、CA1 領域で選択的にシナプス後細胞の反応が増大する長期増強 (Long-term potentiation; LTP) が完全消失して、学習 (記憶の銘記) が障害されるとともに、CA1 領域内の場所ニューロン (place cell) による空間表現パターンの形成が障害されることを明らかにした (Tsien *et al.*, 1996)。さらに、同グループは 2002 年に海馬 CA3 領域でも選択的に NMDA 型受容体 NR1 を欠損する NR1-CA3-KO マウスを開発し、CA3 領域で選択的に LTP が完全消滅することを確認した。当初、学習は正常におこなわれたが、学習時に使った空間手がかりを徐々に減らしていくにつれて空間学習行動に障害が表出してきた (Nakazawa *et al.*, 2002)。これらの研究成果から、CA1 領域の NMDA 型受容体は記憶の銘記に、CA3 領域の NMDA 型受容体は記憶の想起に重要な役割を果たしていると結論づけられている (渡辺, 2008)。すなわち、CA1 領域と CA3 領域でグリオーススが観察されるという事実は、上述の NMDA 型受容体が機能不全に陥ることを意味しており、PTE の摂取による学習記憶能力向上効果の可能性が示唆される。

CSE (*C. sinensis* の熱水抽出物) を与えられた脳老化マウスの脳内では、電子顕微鏡によりニューロン中の僅かな濃密化が、細胞質、細胞小器官、リポフスチン沈着、軸

素及びグリア細胞のマトリックス粗化及び変性の豊富化, 内皮細胞の血管周囲の浮腫や変性と共に観察されている(Ji *et al.*, 2009). *C. sinensis* にはタンパク質, D-マンニトール(虫草酸), コルジセピン及びコルジセプスポリサッカライドが含まれており, CSE は, スーパーオキシドジスムターゼ, グルタチオンペルオキシダーゼ及びカタラーゼの抗酸化活性を増進させた(Ji *et al.*, 2009).

本研究では PTE によるこの種の生化学実験をおこなわなかったが, 脳老化マウスの海馬の CA3 領域でグリオシスが生じ, PTE を与えた脳老化マウスの脳ではそれが劇的に消失したことを見いだした. CA3 領域は, 空間パターン関連及び情報の補充, 新しい状況の検知, 並びに短期記憶を司っている(Miller and O' Callaghan, 2005). 一般に, 反応性グリオシスは脳損傷に対する普遍的な反応であり, 細胞組織の保全を促進するために損傷した組織を封印し, 炎症拡大やニューロン死を制限するのに役立っている(Buffo *et al.*, 2008). 故に, PTE 中の生理活性化合物の単離やその構造決定は, 将来, 脳疾患のニューロン修復に貢献すると考えられ, 速やかな実験の進展が望まれる.

IV. 摘 要

D-gal 誘導性脳老化モデルマウスに、カイコ冬虫夏草熱水抽出物 (PTE) を経口摂取させ、脳における Ach 合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の発現の差異を RT-PCR により解析した。NC, PTE x 25 mg/(kg-day), PTE x 5 mg/(kg-day), AC の順に ChAT 発現のシグナル強度が低下していることが確認され、PTE が D-gal 誘導性脳老化マウスの脳機能の改善に寄与していることを確認した。しかしながら、今回の RT-PCR の熱変性サイクル数の最適化について課題があり、今後の追試験が期待される。

組織化学的解析として、D-gal 誘導性脳老化マウスの海馬領域のホルツァ染色により、AC 群の海馬 CA3 領域において、反応性グリオシスが顕著に発生していることが判った。そのような状態のマウスに PTE x 5 mg/(kg-day)ならびに PTE x 25 mg/(kg-day) を経口投与することにより、濃度依存的にグリオシスが減少または消失することがわかった。

以上の結果から、PTE は老化にともなって発生したニューロン損傷箇所を修復し、脳機能を改善させる効果があることが示唆された。

総合考察

「加齢 (aging)」と「老化 (senescence)」の定義は似て非なるものである。前者は単なる時間経過を重ねることを指し、後者は“加齢に伴う生体機能の低下”を意味する (丸山, 2009)。体の老いととも外科的、内科的な疾病に罹患する割合も増えるが、最もかかりたくない病気はガンと認知症であるということをよく聞く。1999年の厚生省のデータでは、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病、血管性その他の認知症を併せた医療費の合計は年間約 5,800 億円であり、1999年から 2005年の6年間では、ADの患者数は6倍、医療費は3倍に急増している。さらには社会的な経済負担としては、これらの医療費だけではなく、家族らによる介護費 (医療費の3~5倍におよぶ) や労働損失も発生している (福田, 2008)。このように、患者だけではなくその家族を含めた QOL を向上させるためには、ADをはじめとする認知症の予防や早期治癒が期待できる治療法や治療薬の確立が求められている。

脳血管性認知症に対する薬物療法としては、その原因となる脳血管障害に対する脳血管拡張剤などの脳循環代謝改善薬や脳神経細胞保護剤がある程度の予防・改善効果を上げている (齋藤, 2008)。一方、AD型認知症に対しては、コリン作動性ニューロンの進行性の脱落に伴う脳内アセチルコリン (Ach) レベルの低下が認知機能障害の原因の一部であるとする「コリン仮説」に基づいて開発されたの医薬品がコリンエステラーゼ (ChE) 阻害剤であり (Coyle *et al.*, 1983)、現在欧米における AD 治療薬としてはリバスチグミン、ガランタミン、タクリン及び塩酸ドネペジルが使用され効果をあげている (齋藤, 2008)。その中でも塩酸ドネペジル {(エーザイ (株) のアリセプト (商品名)} のみが我が国で承認され上市されているが、主に AD の症状の改善や進行遅延を目的とした対処療法薬に位置づけられており、発症そのものや進行を阻止するような根本治療薬はまだ知られていない (齋藤, 2008)。最近では、N-メチル-アスパラギン酸 (NMDA)

受容体拮抗薬のメマンチンが抗認知症薬として欧米で承認され、日本でも 2009 年現在、治験の最終段階である第Ⅲ相試験を終えている。メマンチンは、グルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体を非競合的に阻害することで興奮毒性による神経細胞死を抑制する効果があり (Chen *et al.*, 1992)、脳血管性認知症や AD に対して有効性が示されている (Orgogozo *et al.*, 2002; Reisberg *et al.*, 2003)。天然物由来化合物による抗認知症薬としては、ChE 阻害剤であるガランタミンがヒガンバナ科のスノードロップ (*Galanthus nivalis*) から発見されたものである (Thomsen *et al.*, 1990)。

近年の予防医学や補完代替医療に対する関心の高まりの中で、脳機能改善に寄与する可能性があるとするサプリメントや健康食品が多数開発されている (Kim *et al.*, 1005; Shih *et al.*, 2009)。また、いくつかの漢方方剤が認知症治療に有効であることが報告されている (荒井, 2006)。生薬の代表例として、イチョウ (*Ginkgo biloba*) 葉エキスがあり、アミロイド蛋白の凝集を制御する蛋白であるトランスサイレチンの mRNA の発現量を増加させること、AD にみられる神経原線維変化の生成や代謝に関わるチロシン / スレオニンホスファターゼ 1 の発現を増強することが報告されており (Watanabe *et al.*, 2001)、老化による空間認識知能の低下を抑えることが確認されている (Stackman *et al.*, 2003)。AD の発症により脳内神経伝達物質であるアセチルコリン合成能が低下することが知られているが、その他の生薬として、遠志 (*Polygalae Radix*) の有効成分であるテヌイゲニンが アセチルコリン合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) を活性化する作用が報告されている (Wang, *et al.*, 2000)。漢方において、基礎実験や臨床で AD や脳血管性認知症に効果が認められた報告があるものとしては、当帰芍薬散、加味温胆湯、八味地黄丸、釣藤散、抑肝散、黄連解毒湯などが挙げられる (荒井, 2006)。東洋医学には古来より「末病を治す」という精神がある。これは、日常の危険因子を抱えながらも継続的な養生をすることで発症を防ぎ長生きできるという考え方であり、漢方治療は病気の症状によってもさまざまな処方が存在し、副作

用が少なく理想的な治療効果が得られることから、今日の臨床研究や病院医療に多く用いられるようになった（荒井, 2006）。

今回、研究対象とした冬虫夏草は、狭義ではそもそも中国チベットなどで採取される希少な *Cordyceps sinensis* の菌種のみを指し、糖尿病、心血管疾患、ガンや代謝病を防ぎ、遅延させるのに有効であるとして広く利用されている（Paterson, 2008）。キノコ類の抽出物が抗加齢や記憶力向上効果を有することはあまり知られていないが、Ji ら(2009)は、*C. sinensis* 抽出物に、D-galactose を投与されることで老化促進されたマウスの学習・記憶能力を向上させる可能性があることを報告した。中国上海市などの中心街では冬虫夏草（虫草）の専門店がいくつも見られ、万人の健康食品として古くから受け入れられていることを証明している。しかしながら、稀ではあろうが、現在流通されている冬虫夏草の一部にはまがい物や取引重量を上積みするための有害な化学物質が含まれているケースもあるとされ、品質が保証されたものは特に高値で取引されることもあるという。

本研究では、菌株として福島県内の山岳地帯で採取されたハナサナギタケ (*Paecilomyces tenuipes*) を、同じく福島県内の養蚕農家で飼育されている実用品種のカイコ蛹を宿主とし、感染させることで人工培養されたカイコ冬虫夏草の子実体ならびに宿主混合物の粉末（販売実績のある市販品）を材料として用いた。そのため、製造段階からトレーサビリティが確保され、かつ人体に安全な冬虫夏草であると考えられる。

第一章において、カイコ冬虫夏草の熱水抽出物（PTE）を、D-galactose 誘導性脳老化モデルマウスに摂取させ、ステップスルー型受動的回避実験とモリス水迷路実験からなる行動実験をおこなった。それらの結果、D-gal 100 mg/(kg-day)を8週間にわたり皮下注射することで、運動能力に関わる神経筋の機能不全を伴うことなくAC群が脳老化を確実に誘導していることと、PTEの5週間にわたる経口摂取により、AC群と比

較して PTE x 25 mg/(kg-day)群のステップスルー受動的回避実験での反応潜時が有意に増加したことから、PTE が D-gal 誘導性脳老化マウスの文脈記憶能力向上に効果がある可能性がでてきた。また、モリス水迷路実験のプロープテストでは、AC 群と比較して PTE x 5 mg/(kg-day)群のクロッシング回数が有意に多かった。そして、他の 3 つのクワドラントに比較して、ターゲットクワドラント領域内での滞在時間が有意に長かったのは、濃度に関わらず PTE 群であったことから、PTE がマウスの D-gal 誘導性脳老化マウスの空間学習・記憶能力向上に効果があることが示唆された。

カイコ冬虫夏草の抽出方法として熱水抽出を選択したのは、日常的に摂取する健康食品として提供するためには有機溶媒系による抽出法を避けたいためである。さらに、熱水抽出法では、冬虫夏草に多量に含まれる多糖類とタンパク画分が得られることと (Miyazawa *et al.*, 2008), 逐次抽出法における MQ 抽出物・メタノール抽出物・酢酸エチル抽出物に含まれる広い範囲の物質までの抽出が可能であると考えられるためである (吉田, 2010)。そのため、今回の熱水抽出による収率は 65.7%と非常に高率であり、各種のアミノ酸がバランスよく含有されていると考えられる。

なお、Ohgushi ら (2009) の研究では、ヤマブシタケ子実体に含まれる多糖類であるβ-グルカンの抽出にあたり、通常的外部加熱を用いた熱水抽出法 (100°C, 6 h) を用いるよりも、含水マイクロ波加熱法 (140°C, 5 min) を利用した方が (1→3;1→6)・β-D-グルカンのうち、免疫賦活化能への寄与の低い (1→6) 結合の 22.5%が開裂され、免疫賦活化能の高い (1→3) 結合を多く含むβ-グルカン抽出できると報告している。本研究で使用したカイコ冬虫夏草の熱水抽出前の粉体 100 g 中にβ-グルカンが 4.5 g の高い比率で含有されていること (東白農産企業組合データ, Table 2) や、マイクロ波による他の成分の変性も期待されることから、含水マイクロ波加熱法抽出方法を適用して比較検討してみることも興味深いと考える。

第二章では、第一章で行動実験に用いた脳老化誘導モデルマウスを用い、冬虫夏草熱

水抽出物 (PTE) を経口摂取した場合についての遺伝子発現解析として, Ach 合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 遺伝子の発現の差異を RT-PCR により比較した. AD の脳内では, アセチルコリン (Ach) をはじめとする神経伝達物質が低下しており, 中でも側頭葉を中心とする大脳皮質, 海馬, 扁桃核などでの Ach 系の低下が顕著であることが知られていることから (Wang, 2009), ChAT を脳老化の指標とした. RT-PCR の結果, AC のマウスよりも PTE x 25 mg/(kg-day) での発現が高く, PTE の摂取により脳内の ChAT の増加による学習記憶能力向上効果の可能性が示唆された. 今後は, リアルタイム PCR 等により PTE 摂取による脳機能関連遺伝子の発現の差異の定量比較をおこなうことが必要であると考えられる.

また, 組織化学的解析として, 海馬領域でのグリオーシスの発生状況の有無から PTE の脳組織への影響について検討をおこなった. ホルツァ染色により脳老化誘導モデルマウスの海馬領域の神経細胞を観察したところ, 非常に顕著な反応性グリオーシスが海馬 CA3 領域に発生していることが判った. この CA3 領域は空間パターン認識を司る部分であり, 前述の行動実験の結果の根拠となり得ると考える. PTE x 5 mg/(kg-day) の低濃度の PTE を投与されたマウスでは, わずかなグリオーシスが観察されたが, 驚くべきことに, PTE x 25 mg/(kg-day) を投与されたマウスでは, NC のマウスと同様に, CA3 領域のグリオーシスがほとんど発生していないということが観察された.

本研究は, D-gal の投与により誘導された老化ネズミを使用しているが, この薬理的な根拠として, 生体内でグリケーション (糖化) 産物を形成し, 代謝されずに神経細胞に集積するために老化を促進すると考えられている (Wei et al., 2005; Lu et al., 2006; Ji et al., 2009). そこで, 本研究成果のメカニズムとして, D-gal 誘導性脳老化マウスにおいて CA3 領域のグリオーシス発生はグリケーションに由来するもので, PTE 中には, 脳関門を透過でき, かつ, グリオーシス発生の抑制や除去をする有力な活性成分の存在を推定することができる. なお, この生物活性分子実体については, 今

後の重要課題である。

神経細胞は体細胞に比べて非常に長い神経突起を維持しながらエネルギーの放出，すなわち神経伝達をすることから，脳組織でのエネルギー消費量は非常に高い。ヒトの脳組織重量は体全体の約 40 分の 1 であるが，全身血流の約 5 分の 1 が脳に送られ，エネルギー源であるグルコースなどの栄養素が細胞内のミトコンドリアの酸化的リン酸化反応でつくられ供給されている。そのためミトコンドリアは常に酸化ストレスにさらされている（丸山，2009）。PTE には第一章に示した成分表からも判るように，抗酸化作用の高いビタミン E（トコフェノール）が含まれているとともに，脳機能に関係するアミノ酸であるフェニルアラニン，チロシン，イソロイシン，グリシン，グルタミン酸，セリン，トリプトファンなどの重要な成分が含まれている。この成分表では測定項目にはなかったが，脳機能向上に関係するペプチドホルモンの一つであるメラトニンについても含まれているものと推察される（金城，1999）。これらの特徴は，本研究で用いたカイコ冬虫夏草 100 g 中にタンパク質が 65.0 g も含まれていることからわかるように，宿主にカイコを用いていることも寄与していると考えられる。現在市販されている冬虫夏草の製造法は，菌株の子実体のみをタンク培養による手法がコスト，品質の均一性，大量生産等の点でメリットがあるために普及している。しかしながら冬虫夏草の本来の生育環境に近い状態である昆虫宿主への菌株の寄生によって，正常な成分を有する冬虫夏草が得られるとともに，藤田（2008）の報告にもあるように，宿主と冬虫夏草の種類それぞれの特徴を生かした選択をおこない，それらを適切に組み合わせることで，機能性に特徴を有し，トレーサビリティが確保された冬虫夏草が栽培できるものとする。

一方，カイコ冬虫夏草に含有されているマウス脳機能向上を制御する物質の同定とその構造については残されている大きな課題である。摂取・消化・吸収された上で血液循環されながら脳血液関門を通過し，最終的に海馬領域のニューロンにおけるグリオシ

ス修復に至る経路が推定される。本研究が *in vitro* 系の生物検定の弱点を克服して、*in vivo* 系で脳機能向上効果を発見した意義は極めて重要であるが、逆に摂取・消化・吸収 → 血液循環 → 脳血液関門 → 海馬領域ニューロンの経路を考慮しながら、分子実体の同定と構造解析が次のステージの課題である。

21 世紀のわが国の重要課題には環境と長寿社会への対応が掲げられている。無農薬の桑で育つカイコの蛹は、これまでは養蚕業における主要な廃棄物であった。今後の高齢化社会が進む中で、本研究成果が、それらカイコの蛹に学習・記憶機能の向上の可能性を有するカイコ冬虫夏草の宿主としての大きな付加価値が付与され、社会から渴望されている AD をはじめとする脳機能障害の予防やその治療のための安全かつ日常的な機能性食品として、人々の QOL 向上のための重要な産業に発展することを切に願う。

引用文献

- 荒井啓行 (2006) 漢方薬への期待. *Modern Physician*, **26**, 2877-1881.
- Bok, J. W., Lermer, L., Chilton, J., Klingeman, H. G. and Neil Towers, G. H., (1999) Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, **51**, 891-898.
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lapier, A., Colak, D., Horn, A.-P., Mori, T. and Götz, M. (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 3851-3586.
- Chen, H. S., Pellegrini, J. W., Aggarwal, S. K., Lei, S. Z., Warach, S., Jensen, F. E. and Lipton. S.A.(1992) Open-channel block of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J. Neurosci.*, **12**, 4427-4436.
- Chen, J., Long, Y., Han, M., Wang, T., Chen, Q. and Wang, R. (2008) Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacology, Biochemistry and behavior*, **90**, 441-446.
- Choi, S. B., Park, C. H., Choi, M. K., Jun, D. W. and Park, S. (2004) Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 2257-2264.
- Coyle, J. T., Price, D. L. and DeLong, M. R. (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, **219**, 1184-1190.
- Dan, Z., Gengtao, L., Jiangong, S. and Jianjun, Z. (2006) *Coeloglossum viride* var. bracteatum extract attenuates D-galactose and NaNO₂ induced memory impairment in mice. *J. ethnopharmacology*. **104**, 250-256.
- Droge, W. (2003) Oxidative stress and aging. *Advances in experimental medicine and biology*, **543**, 191-200.

- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T. Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. and Gage, F. H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med.*, **4**, 1313-1317.
- Fujiwara, Y., Kobayashi, H., Kawai, S. and Suzuki, K. (2007) The effect of *Vespa simillima* extracts on long-term memory and MK-801-induced learning disability in mice. *Int. J. Indust. Entomol.* **15**, 39-45.
- 福田敬 (2008) 認知症予防 認知症の予防と医療経済, *Modern Physician.* **28**, 1453-1456.
- 藤田純平 (2008) カイコ冬虫夏草からの生理活性物質の機能と構造解析. pp. 2-5, 岩手大学大学院農学研究科修士課程農業生命科学専攻修士論文.
- Gan, M., Wan, D., Qin, X. and Gao, P. (2006) Pharmacological study on *Samia cynthia ricini* in old female mice. *J. Ethnopharmacol.* **105**, 210-214.
- Gong, G. and Xu, F. (1991) Study of aging model in mice. *J. China pharm. Univ.*, **24**, 101-103.
- Hamburger, M. (2007) Comment on comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 7213-7214.
- 広井禎之, 羽賀千恵, 秋山治彦, 三瓶接子, 石川喜美雄 (2002) 臨床検査—病態へのアプローチ(12) 痴呆症の病態像および病理学的検査法. *医学検査*, **51**, pp.13-17.
- Ho, S., Liu, J. and Wu, R. (2003) Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology*, **4**, 15-18.
- Hu, D., Liu, Q., Cui, H., Wang, H., Han, D. and Xu, H. (2005) Effects of amino acid from selenium-rich silkworm pupas on human hepatoma cell. *Life Sciences*, **77**, 2098-2110.
- 井口昭久 (2008) 認知症予防 認知症予防はどこまで可能か, エビデンスから展望する. *Modern Physician*, **28**, 1435-1437.

- 磯村宜和, 塚元葉子 (2006) 感覚受容から認知, 記憶・学習, 行動までの脳機能研究の
展開—海馬ネットワーク・オシレーションの機能と発生メカニズム. *実験医学*, **24**,
p. 164, 羊土社.
- Ji, D.-B., Ye, J., Li, C. L., Wang, Y. H., Zhao, J. and Cai, S. Q. (2009) Antiaging
effect of *Cordyceps sinensis* extract. *Phytother. Res.* **23**, 116–122.
- 瓦林毅, 東海林幹夫 (2008) 認知予防—動物実験から予防を考える. *Modern Physician*.
28, 1477-1484.
- Kim, D. K., Kang, Y. K., Lee, M. Y., Lee, K. G., Yeo, J. H., Lee, W. B., Kim, Y. S. and
Kim, S. S. (2005) Neuoprotection and enhancement of learning and memory by
BF-7. *J. Health Sci.* **51**, 317–324.
- 金城典子 (1999) やっぱりすごい! 究極の生薬 冬虫夏草. pp. 23-27, リヨン社.
- 北島博, 菅栄子, 榎原寛 (2006) 人工飼料によるコウモリガ幼虫の飼育. *日本森林学会
誌*, **88**, No.3, 192-196.
- Koh, J.- H., Kim, J. -M., Chang, U.- J. and Suh, H.- J. (2003) Hypocholesterolemic
effect of hot-water extract from mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biol. Pharm.*
Bull. **26**, 84–87.
- 久保田競 (2007) 記憶と脳. サイエンス社. pp.142-144.
- Kuo, Y. C., Tsai, W. J., Wang, J. Y., Chang, S. C., Lin, C. Y. and Shiao, M. S. (2001)
Regulation of bronchoalveolar lavage fluids cell function by the
immunomodulatory agents from *Cordyceps sinensis*. *Life Sciences*, **68**,
1067-1082.
- Li, Q., Zeng, W., Yin, D. and Huang, T. (1998) A preliminary study on alternation of
generations of *Cordyceps sinensis* (Berkey) Sacc. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*,
23, No.4, 210-254.

- Li, W., Wei, F., Fan, M., Zhang, J., Zhang, B., Ma, X., Yang, W. and Wei, W. (1995) Mimetic brain aging effect induced by D-galactose in mice. *Chinese J. pharm. Toxicol.*, **9**, 93-95.
- Lu, J., Zheng, Y., Luo, L., Wu, D., Sun, D. and Feng, Y. (2006) Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. *Behav. Brain Res.* **171**, 251-260.
- Ma, K., Liu, F., Wu, X., Zeng, W. and Chen, S. (2007) 冬虫夏草の宿主 *Hepialus armoricanus* 成虫の生活習性の研究. 中国中薬雑誌. **32**, No. 16, 1712-1714.
- McGaugh, J. L. and Landfield, P. W. (1970) Delayed development of amnesia following electroconvulsive shock. *Physiol. Behav.*, **5**, 1109-1113.
- 松下正明 (1999) アルツハイマー型痴呆症. 老年期痴呆研究会誌, **11**, 99-106.
- 丸山和佳子. (2009) 漢方薬生薬による脳内老化制御, 脳内老化制御とバイオマーカー : 基盤研究と食品素材, pp. 15-19, シーエムシー出版.
- 三橋淳 (2010) 昆虫食 古今東西, pp. 15-264, 工業調査会.
- Miller, D. B. and O'Callaghan, J. P. (2005) Aging stress and the hippocampus. *Ageing Res. Rev.* **4**, 123-140.
- Miyazawa, N., Ohga, S. and Okazaki, M. (2008) Antihypertensive effect of pleurotus nebrodensis in spontaneously hypertensive rats. *J. Oleo. Sci.*, **57**, 675-681.
- Morris, R. G. M. (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv.* **12**, 239-260.
- 中川八郎 (1989) 脳の栄養-脳の活性化法を探る. pp. 25-27, 共立出版.
- Nakamura, T., Matsugo, S., Uzuka, Y., Matsuo, S. and Kawagishi, H. (2004) Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 868-872.

- Nakazawa, K., Quirk, M. C., Chitwood, R. A., Watanabe, M., Yeckel, M., Sun, L. D., Kato, A., Carr, C. A., Johnston, D., Wilspn, M. A. and Tonegawa, S. (2002) Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science*, **297**, 211-218.
- Orgogozo, J. M., Rigaud, A. S., Stoffler, A., Mobius, H. J. and Forette, F. (2002) Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: a randomized, placebo-controlled trial (MMM 300). *Stroke*, **33**, 1834-1839.
- Ohgushi, Y., Sakamoto, M. and Azuma, J. (2009) Effects of microwave irradiation on water-soluble polysaccharides of the fruiting body of *Hericium erinaceum*. *J. Appl. Glycosci.*, **56**, 153-157.
- 大内順子, 藤原由美子, 小林晴男, 鈴木幸一 (2001) カイコシルクパウダーによるマウスの抗痴呆効果作用の解析. 東北蚕糸・昆虫利用研究報告, **26**, 30.
- 奥田聡 (1998) 痴呆 アルツハイマー病の薬物療法, 現代医学, **46**, 183-188.
- Pardridge, W. M. (1983) Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiol. Rev.*, **63**, 1481-1535.
- Paterson, R.R.M. (2008) *Cordyceps* – A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? *Phytochemistry*, **69**, 1469–1495.
- Pereira, N. R., Ferraese-Filiho, O., Matsushita, M. and de Souza, N. E. (2003) Proximate composition and fatty acid profile of *Bombyx mori* L. chrysalis toast. *J. Food Composition and Analysis*, **16**, 451-457.
- Rao, Y. K., Fang, S. H. and Tzeng, Y. M. (2007) Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorate*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. *J. Ethnopharmacology*, **114**, 78-85.

- Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S. and Mobius, H. J. (2003) Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, **348**, 1333-1341.
- Ryu, K. S., Ahn, M. Y., Lee, H. S., Kim, I., Kim, J. W., Kim, S. H. and Cjoi, J. H. (2002) The tonic effect of the extract from male silkworm (*Bombyx mori*) pupae on rats. *Int. J. Indust. Entomol.*, **5**, 123-126.
- 齋藤清人, 車炳允, 米澤貴之, 照屋俊明, 永井和夫, 禹濟泰. (2008) 天然生理活性物質による認知症の予防・改善について. 生物機構開発研究所紀要, **8**, 33-38.
- Sakakura, A., Shioya, K., Katsuzaki, H., Komiya, T., Imamura, T., Aizono, Y. and Imai, K. (2009) Isolation, structural elucidation and synthesis of a novel antioxidative pseudo-di-peptide, Hanasanagin, and its biogenetic precursor from the *Isaria japonica* mushroom. *Tetrahedron*, **65**, 6822-6827.
- Sakakura, A., Suzuki, K., Katsuzaki, H., Komiya, T., Imamura, T., Aizono, Y. and Imai, K. (2005) Hanasanagin: a new antioxidative pseudo-di-peptide, 3,4-diguanidinobutanoyl-DOPA, from the mushroom, *Isaria japonica*. *Tetrahedron Letters*, **46**, 9057-9059.
- Sato, K., Tanaka, H., Saito, Y. and Suzuki, K. (2002) Baculovirus-mediated production and antifungal activity of a diapause-specific peptide, Diapausin, of the adult leaf beetle, *Gastrophysa atrocyanea* (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **71**, 69-77.
- Shih, P.-H., Chan, Y. C., Liao, J. W., Wang, M. F. and Yen, G. C. (2009) Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J. Nutritional Biochem.* (Published online).
- 清水大典 (1979) グリーンブックス51 「冬虫夏草」, p. 97, ニューサイエンス社.

- Shindo, T., Matsumoto, Y., Wang, Q., Kawai, N., Tamiya, T. and Nagano, S. (2006) Differences in the neuronal stem cells survival, neuronal differentiation and neurological improvement after transplantation of neural stem cells between mild and severe experimental traumatic brain injury. *J. medical Investigation*, **53**, 42-51.
- Stackman, R. W., Eckenstein, F., Frei, B., Kulhanek, D., Nowlin, J. and Quinn, J. F. (2003) Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6577-6580.
- 鈴木幸一 (2005) 昆虫テクノロジーの総論－研究開発動向－. In: 昆虫テクノロジー研究とその産業利用, pp. 3-12, シーエムシー出版.
- 鈴木幸一, 山本圭一郎, 満月眞寿, 大内順子. (2006) 地域とQOL向上のための昆虫バイオテクノロジー. 蚕糸・昆虫バイオテック, **75**, 97-102.
- Thomsen, T. and Kewitz, H. (1990) Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine *in vitro* and *in vivo*. *Life Sci.*, **46**, 1553-1558.
- Tritsch, D., Chesnoy-Marchais, D., Feltz, A. (編者), 御子柴克彦 (監訳者) (2009) ニューロンの生理学, pp.36-37, 京都大学学術出版会.
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T. and Tonegawa, S. (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, **87**, 1327-1338.
- 築地謙治, 渡辺賢治. (2009) 漢方薬生薬による脳内老化制御, 脳内老化制御とバイオマーカー: 基盤研究と食品素材, pp. 281-291, シーエムシー出版.
- 梅谷献二 (2004) 虫を食べる文化誌, pp.22-171, 創森社.
- Wahrendorf, M.-S. and Wink, M. (2006) Pharmacologically active natural products in the defence secretion of *Palembus ocularis* (Tenebrionidae, Coleoptera). *J. Ethnopharmacol.* **106**, 51-56.

- Wang, F., Chen, H. and Sun, X. (2009) Age-related spatial cognitive impairment is correlated with a decrease in ChAT in the cerebral cortex, hippocampus and forebrain of SAMP8 mice. *Neuroscience letters*, **454**, 212-217.
- Wang, Q., Iwasaki, K., Suzuki, T., Arai, H., Ikarashi, Y., Yabe, T., Toriizuka, K., Hanawa, T., Yamada, H. and Sasaki H. (2000) Potentiation of brain acetylcholine neurons by Kami-Untan-To (KUT) in aged mice: implications for a possible antidementia drug. *Phytomedicine*, **7**, 253-258.
- Watanabe, C. M. H., Wolfram, S., Ader, P., Rimbach, G., Packer, L., Maguire, J. J., Schulta, P. G. and Gohil, K. (2001) The *in vivo* neuromodulatory effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6577-6580.
- 渡辺雅彦 (2008) みる見るわかる脳・神経科学入門講座 改訂版 前編. pp. 55-58, 羊土社.
- Wei, H., Li, L., Song, Q., Ai, H., Chu, J. and Li, W. (2005) Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.* **157**, 245-251.
- Yamaguchi, Y., Kagota, S., Nakamura, K., Shinozuka, K. and Kunimoto, M. (2000) Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Phytother. Res.*, **14**, 647-649.
- 山田正仁 (2009) その他の孤発性タウオパチー神経原繊維変化型老年期認知症／石灰沈着を伴うびまん性神経原繊維変化病. *Clin. Neurosci.*, **27**, 328-330.
- 吉田敦司 (2010) ハリナシミツバチのプロポリスによるマウス脳機能改善効果に関する研究. pp. 1-60, 岩手大学大学院農学研究科修士課程農業生命科学専攻修士論文.
- Zeisel, S., Reinstein, D., Corkin, S., Growden, J. and Wurtman, R. (1981) Cholinergic neurons and memory. *Nature*, **293**, 187-188.
- Zhang, Y., Shoyama, Y., Sugiura, M. and Saito, H. (1994) Effects of *Crocus sativus* L. on the ethanol-induced impairment of passive avoidance performances in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 217-221.