

培養ヒメマツタケ (CJ-01 株) 子実体熱水抽出物質の 自然発症糖尿病 (GK) ラットにおける 膵 β 細胞数減少に対する改善作用

桧垣 宮都^{a)} 江口 文陽^{a)} 張 俊^{b)} 菊川 忠裕^{c)} 安倍 千之^{d)}
加藤 克彦^{e,f)} 長谷川 一雄^{e)} 渡辺 泰雄^{*g)}

^{a)}東京農業大学林産化学, ^{b)}シナプス (株) 開発研, ^{c)}聖マリアンナ医科大学大学生化学, ^{d)}聖マリアンナ医科大学内科学,
^{e)}日本チャールス・リバー (株), ^{f)}麻布大学獣医学部基礎教育系基礎教育研究室, ^{g)}東京医科大学麻酔学・薬理学

Improvement of pancreatic β -cells by hot water extract from cultured *Agaricus blazei* (CJ-01) fruiting bodies in GK rats

Miyato HIGAKI^{a)} Fumio EGUCHI^{a)} Jun ZHANG^{b)} Tadahiro KIKUKAWA^{c)} Chiyuki ABE^{d)}
Katsuhiko KATO^{e,f)} Kazuo HASEGAWA^{e)} and Yasuo WATANABE^{*g)}

^{a)}Laboratory of Forest Products Chemistry, Tokyo University of Agriculture, ^{b)}Department of Research & Development,
Synapse Co., ^{c)}Department of Biochemistry, St. Marianna University School of Medicine,
^{d)}Department of Medicine, St. Marianna University School of Medicine, ^{e)}Charles River Japan, Inc.,
^{f)}Department of General Education, School of Veterinary Medicine, Azabu University,
^{g)}Department of Anesthesiology/Pharmacology, Tokyo Medical University

(Received April 25, 2000. Accepted August 4, 2000.)

Abstract

Inhibitory effects of cultured *Agaricus blazei* (CJ-01) fruit hot water extract on the development of diabetes in spontaneously diabetic rats (GK rats) which are characterized as having non-obese and non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) were examined. The increase of plasma glucose level induced by a 20 % glucose solution seen in GK was significantly higher than that of normal Wistar rats. The loading of a glucose treatment was constantly performed for 12 weeks. CJ-01 (10 g/600 ml) was extracted at 80°C for 1 hr and each dosage (3, 5, 10 g/60 kg/day) was orally given to GK rats. The GK rats were divided into five groups: 1) CJ-01 untreated and glucose loading (control), 2) CJ-01 untreated and non-glucose (non-glu), 3) low dose of CJ-01 (3 g/60 kg/day) treated and glucose loading, 4) middle dose of CJ-01 (5 g/60 kg/day) and glucose loading (middle-CJ), 5) high dose of CJ-01 treated and glucose loading (high-CJ). The development of hyperglycemia induced by glucose was seen in the control animals. In the CJ-01 treated animals, however, the increase of plasma glucose levels were significantly attenuated. Particularly these levels of high-CJ group were much lower than those seen in control group at the 4th week of the CJ-01 consecutive treatment. In the blood examination, all results were identical, although the significant increase of pancreatic insulin levels were detected in the high-CJ group. Histopathological study revealed evidences that CJ-01 had no effect on number of the islets among the animals. High dose of CJ-01 had increased number of pancreatic β cells at a significance level of 0.01. It had beneficial effects on foamy cell degeneration, deposition of hyaline-like substance, and hypertrophy of the islets. Thus CJ-01 may have therapeutic effects on NIDDM due to the ameliora-

tion of the impaired function and the increase of pancreatic β cells.

Key words cultured *Agaricus blazei* (CJ-01), anti-diabetic effect, insulin secretion, pancreatic β cells, spontaneously diabetic GK-Wistar rats.

緒 言

既に、我々は栽培法の確立によって生産性ならびに成分の安定性が実証された培養ヒメマツタケ (CJ-01 株) 子実体熱水抽出物が、deoxycorticosterone acetate (DOCA) 誘発腎障害、自然発症高血圧ラットの加齢性血圧上昇、ならびに、自然発症関節炎モデルマウスや II 型コラーゲン誘導関節炎等に奏効することを報告した。¹⁻⁴⁾

しかしながら、これらの作用発現機序を明確に説明することは現時点では困難であるが、作用発現に血流改善作用、細胞保護作用、あるいは、免疫機能調節作用の関与を示唆する成績は得られている。^{2, 4)} 実際、CJ-01 株は多くの糖タンパク質や多糖類を含有することから、CJ-01 株の子実体熱水抽出物の投与は細胞構成成分の一つである細胞外マトリックスやサイトカイン類に著明な影響を及ぼす。²⁾ そのため、CJ-01 株は炎症性反応や細胞機能障害を軽減させる効力を有することが推察される。

一方、近年、年齢に拘わらず生活や運動習慣によって発病する疾患を米国での病名、Life-Related Disease を参考にして生活習慣病と呼ばれるが、我が国において、これらの疾患群の中でも糖尿病疾患は年々増加している。一般的に糖尿病疾患は常に単一の疾患ではなく、腎疾患のみならず心疾患や高脂血症を併発させ、さらには脳梗塞などを発症させることも知られており各種の療法が施行されている。⁵⁾ しかし、今後益々増加することが予測されることから、さらに適切な予防法および治療法を早急に確立する必要がある。糖尿病は「飽食の時代」とストレス社会、さらには運動不足が原因となって生ずる代謝性疾患で、我が国では、その中でも多因子遺伝型の II 型糖尿病 (従来のインシュリン非依存性糖尿病) が主流となっている。⁵⁾

インシュリン非依存性糖尿病 (NIDDM) 患者の膵 β 細胞数は非糖尿病患者と比較して明らかに低下していることを示唆する成績が報告されており、この減少が NIDDM 患者の膵 β 細胞機能不全としての重要な一因子であると考えられる。^{6, 7)} しかしながら NIDDM における治療法は膵 β 細胞に直接的な改善効果を期待するものではなく、運動療法、食事療法、インシュリン注射や経口インシュリンの継続的投与が主流である。

本研究は、機能的食品としてのキノコ類の特性を考慮

に入れ、さらに、従来までの各種疾患に対する治療効果を加味して、CJ-01 株の NIDDM における膵 β 細胞障害に対する改善効果を明らかにすることを主目的とした。そのため、NIDDM 病態モデル動物の中でも日本人型に類似すると考えられている非肥満型の GOTO-KAKIZAKI (GK) ラット^{8, 9)} を使用して CJ-01 株の子実体熱水抽出物の血糖下降ならびに膵 β 細胞への影響を中心に研究を行った。

方 法

(1) 実験動物

購入時に糖負荷試験を行い 1 時間値が 230-269 mg/dl を示す GK/Crj ラット (雄性, 5 週齢, 体重 103-138 g: 日本チャールスリバー株) のみを厳選して購入した。その後、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ に調整された部屋で明時間 (7:00-19:00)、暗時間 (19:00-7:00) の光調節下にて一週間飼育 (飼料: CRF-1, オリエンタル酵母, 及び水道水を自由摂取) した。実験日前日から約 20 時間絶食させ、各ラットに 20% グルコース溶液 10 ml/kg を強制的に経口投与した。さらに、糖負荷試験における 2 時間の血糖値の総和がほぼ等しくなるよう実験動物を、糖負荷群と①非糖負荷対照群 (Non-Glu) (滅菌水道水 10 ml/kg/day) とし、さらに、糖負荷群を②対照群 (Control-Glu; 滅菌水道水 10 ml/kg/day) ③CJ-01 低用量群 (Low-CJ; ヒトが通常適用している量 3 g/60 kg/600 ml/day を 50 mg/kg/10 ml/day に換算) ④CJ-01 中等用量群 (Middle-CJ; 100 mg/kg/10 ml/day) ⑤CJ-01 高用量群 (High-CJ; 150 mg/kg/10 ml/day) の如く五群に分類した。

(2) CJ-01 溶液の調製法および投与法

ヒメマツタケは、株式会社日本バイオにおいて、我々が開発した安定栽培法で栽培収穫したもの (CJ-01 株) を使用した。さらに、同研究室の棚段式キノコ子実体乾燥装置で $40-60^\circ\text{C}$ 可変方式により乾燥・調製した。得られた乾燥粉末、各 3 g, 5 g, 10 g と滅菌水 600 ml をリービッヒ冷却管付き三角フラスコに加え、 80°C の湯浴中で 1 時間抽出後、室温まで放冷した。上清溶液をろ紙 (東洋ろ紙, No. 2, 直径 90 mm) でろ過し、ろ液 (収率: 約 100%) は CJ-01 株の熱水抽出物として使用した。実験動物には上述した各用量の CJ-01 株の熱水抽出物を強制経

口投与した。その後、水道水を自由摂取させた。強制経口投与は毎日午前中に施行して、糖負荷試験日は経口投与を行わなかった。

(3) 糖負荷試験

糖負荷試験の前日に、全ての実験動物は約 20 時間の絶食（飲料水は自由摂取）を行った。20 % グルコースを各実験動物に強制経口投与し、投与開始直後に測定し、その後、30, 60, 90, 120 分値を測定した。採血 (5 μ l) は尾静脈から各時間毎に行い、血糖検査器（グルコカード、ヘキストマリオンセル株）にて計測を行った。各時間の測定値を計測し、さらに、2 時間までの総数の比較も行った。糖負荷試験は毎週 1 回午前中に施行した。

(4) 血液検査の所見

実験最終日の前日に全ラットを絶食させ、最終日に深麻酔（ネブタール、45 mg/kg, i.p.）し、左心室から 20 G 採血針で可能な限り採血を行った。採取した血液は Table I および Figs. 4, 5 に示した項目の生化学的検査（自動化学分析装置：Auto Lab, Radio Immuno Assay 法）を行った。膵インシュリンは各動物から採取した膵臓の一部を 125 I インシュリンによる Radio Immuno Assay (RIA) 法で測定を行った。

(5) 病理学的評価および β 細胞数の計測

実験最終日に膵を摘出後、一部はインシュリン測定用、残りは 4 % フォルマリン/リン酸緩衝液に浸潤させ組織観察ならびに β 細胞数計測のための試料とした。組織切片は 4 μ m としヘマトキシリン-エオジン染色法あるいは Gomori 氏染色法によって、各群における泡沫変性細胞、硝子変性、線維芽細胞増生、小島の数、小島の肥大化、円形細胞浸潤、 β 細胞数を主に比較検索の対象とし

て観察を行った。なお、計測上の基準を以下の如くした。①泡沫変性細胞数：全体 (+4), 1/2 以上 (+3), 1/2 以下 (+2), 1/4 以下 (0) の 4 区分、②硝子変性と線維芽細胞増生：1/4 以上 (+3), 1/4 以下 (+2), 1/8 以下 (+1), 無し (0) の 4 区分、③小島の肥大化と血色素は有 (+) 無 (-) の 2 区分、④円形細胞浸潤：（小島単位で）20 個以上 (+4), 15~19 個 (+3), 10~14 個 (+2), 9 個以下 (+1) の 4 区分とした。さらに、 β 細胞数の変動はインシュリンのモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に検出し、PCNA 染色後、顕微鏡下で五つの膵小島における β 細胞数を計測した。

(6) 統計学的解析

得られた成績は群間比較を Wilcoxon U-test で解析し 5 % 以内の危険率を持って有意な差があると判定した ($p < 0.05$)。なお、全ての成績は平均値と標準誤差値で表示した。

結 果

1. 成長に伴う体重変動への影響

GK ラットの体重は生後 6 週齢で 135~165 g であった。各群の体重は実験開始時にいずれの群においても有意な差が生じない様に考慮した。すなわち、非糖負荷群 ($n=8$) で 153 ± 9 g, 糖負荷対照群 ($n=8$) で 152 ± 9 g, CJ-01 低用量群 ($n=8$) で 151 ± 4 g, CJ-01 中等用量群 ($n=8$) で 147 ± 10 g, CJ-01 高用量群 ($n=8$) で 152 ± 9 g であった。12 週齢では、非糖負荷群で 289 ± 11 g, 糖負荷対照群で 285 ± 12 g, CJ-01 低用量群で 292 ± 15 g, CJ-01 中等用量群で 286 ± 12 g, CJ-01 高用量群で 298 ± 14 g といずれも同様に増加した。さらに、最終実験日である 17 週齢では、非糖負荷群で 338 ± 9 g, 糖負荷対照群で 334 ± 14 g, CJ-01 低用量群で 341 ± 21 g, CJ-01 中等用量群で 333 ± 16 g, CJ-01 高用量群で 353 ± 16 g であった。すなわち、加齢による体重増加は得られたが、各群間での体重変動に有意な差は認められなかった。

2. 糖負荷後の血糖値の経時的変動

20 時間絶食後、6 週齢の正常 Wistar 系ラット、GK ラット、それぞれに糖負荷試験を行った (Fig. 1)。糖負荷を行う前の 6 週齢正常 Wistar ラットの血糖値は 56 ± 2 mg/dl ($n=6$) であり、同週齢の GK ラットは 95 ± 5 mg/dl ($n=8$) であった。すなわち、Wistar 系正常ラットの血糖値は同週齢の GK ラットと比較すると統計学的にも有意な差 ($p < 0.01$, Fig. 1) を持って低い値であった。一方、糖負荷をしない GK ラットの血糖値は $90 \sim 113$ mg/dl の変動範囲であった (Fig. 1, Non-Glu)。糖負荷後の正常ラットの血糖値は急速に上昇して 30 分で最大

Table I Effects of CJ-01 treatment on biochemical changes in the blood examination of GK rats with or without a 20 % glucose loading

	T-Cho	HDL-C	TG
Control-Glu	112 ± 1.0	76.0 ± 0.8	25.6 ± 2.7
Low-CJ	118 ± 2.1	78.2 ± 1.4	29.4 ± 3.5
Middle-CJ	$120 \pm 4.5^*$	79.3 ± 2.5	$35.7 \pm 2.9^*$
High-CJ	$119 \pm 3.0^*$	77.2 ± 1.3	$35.3 \pm 3.1^*$
Non-Glu	117 ± 2.3	77.0 ± 0.8	$31.8 \pm 2.3^*$

Control-Glu ($n=8$); Consequently administered with a 20 % glucose, Low-CJ ($n=8$); Treatment of CJ-01 (3 g/60 kg/day) with a glucose, Middle-CJ ($n=8$); Treatment of CJ-01 (5 g/60 kg/day) with a glucose, High-CJ; Treatment of CJ-01 (10 g/60 kg/day) with a glucose, Non-glu ($n=6$); Without a glucose. Each number expresses the mean value and standard error. T-Cho; Total cholesterol. HDL-C; HDL-cholesterol. TG; triglyceride. *: Significant difference from Control-Glu; $p < 0.05$.

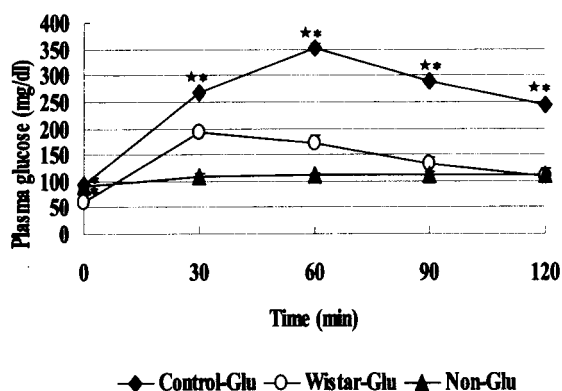


Fig. 1 Time-dependent changes in plasma glucose levels of GK rats and normal Wistar rats after either with or without a 20 % glucose loading. Each point is shown as a mean value and standard errors of six to eight animals. Control-Glu: GK rats treated with a 20 % glucose. Wistar-Glu: Normal Wistar rats treated with a 20 % glucose. Non-Glu: GK rats treated without a 20 % glucose. ★ Significant difference from Wistar-Glu, ★ $p < 0.01$. * Significant difference from Non-Glu, * $p < 0.01$.

値が得られ 182 ± 12 mg/dl であった (Fig. 1, Wistar-Glu)。その後、次第に低下し 2 時間後には、ほぼ糖負荷開始時と同様な値を得た。GK ラットでは、糖負荷 60 分後に最大値 (353 ± 30 mg/dl) が得られ、その後、血糖値は減少したが 2 時間後においても 243 ± 32 mg/dl と開始時値と比較しても約 2.6 倍の増量が認められた (Fig. 1, Control-Glu)。糖負荷をした GK ラット (Control-Glu) の各時間における血糖値は同様に糖負荷をした正常 Wistar ラット (Wistar-Glu) と比較して、いずれも有意に高い値であった ($p < 0.01$)。同種の GK ラットにおいても、糖負荷群 (Control-Glu) の血糖値は非糖負荷群 (Non-Glu) と比較して、糖負荷後 30 分以降はいずれも著明に高い値が観察された ($p < 0.01$, Fig. 1)。さらに、図示していないが、CJ-01 投与群においても、6 週齢では GK ラットの対照群と比較しても糖負荷後の各時間における血糖値はいずれも著明な差を認めることはなかった。しかし、CJ-01 の多量投与群では、投与開始 4 週間後の糖負荷最大血糖値が 299 ± 21 mg/dl となり、対照群 (342 ± 18 mg/dl) と比較して有意に低下した ($p < 0.05$)。この差は 17 週齢においても同程度に認められた。

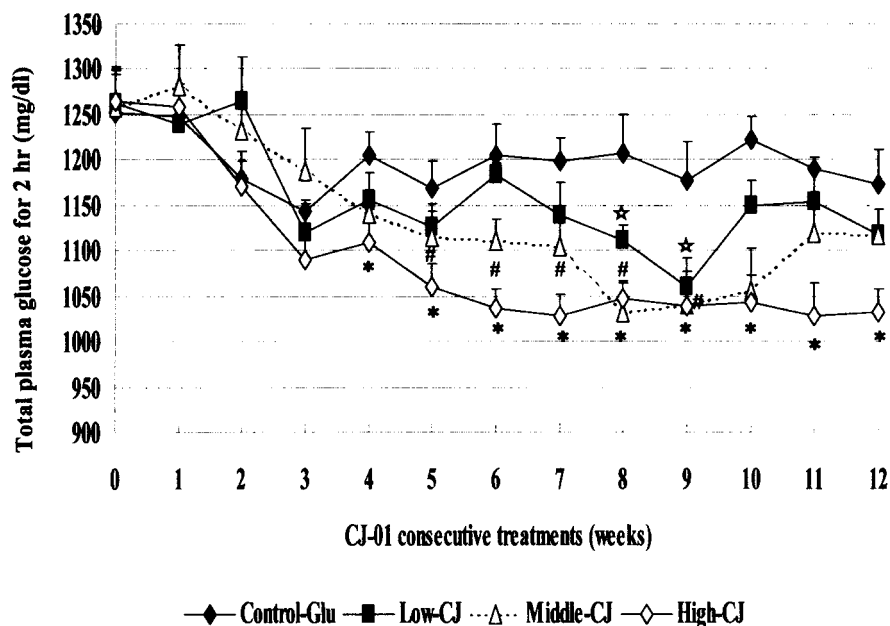


Fig. 2 Changes in plasma glucose levels (a total value detected in two hours) of non-CJ-01 treated GK rats and CJ-01 treated GK rats after a 20 % glucose loading. Each point is shown as a mean value and standard errors of six to eight animals. Control-Glu: GK rats with a 20 % glucose. Low-CJ: GK rats with a 20 % glucose and 50 mg/kg/10 ml/day CJ-01. Middle-CJ: GK rats with a 20 % glucose and 100 mg/kg/10 ml/day CJ-01. High-CJ: GK rats with a 20 % glucose and 150 mg/kg/10 ml/day CJ-01. Significant difference between Control-Glu and Low-CJ, $p < 0.01$. # Significant difference between Control-Glu and Middle-CJ, $p < 0.01$. * Significant difference between Control-Glu and High-CJ, $p < 0.01$.

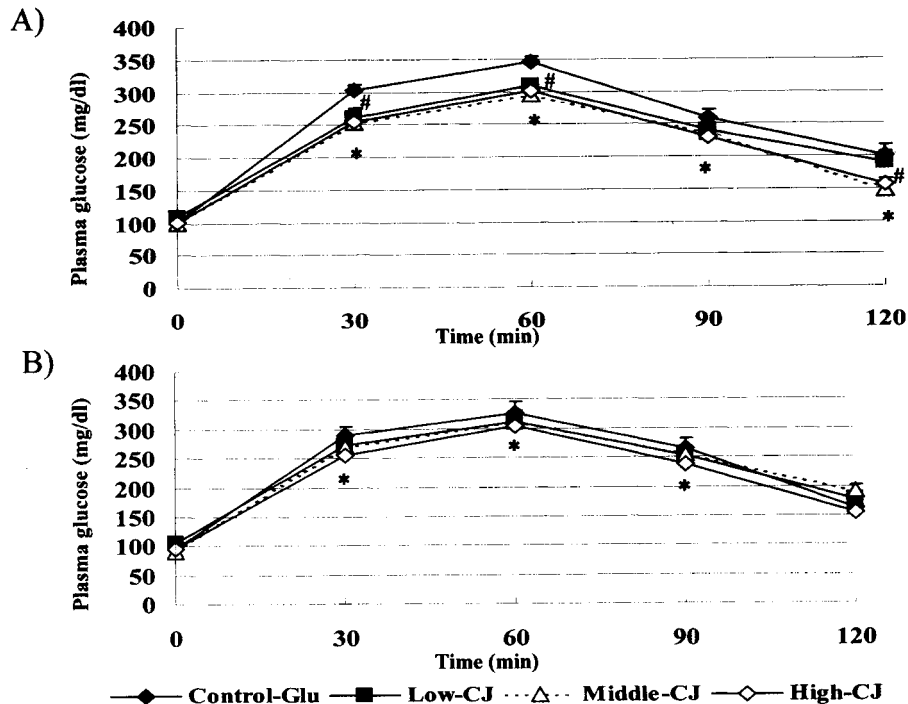


Fig. 3 Time-dependent changes in plasma glucose levels of GK rats after a 20 % glucose loading at the 7th week (A) and the 12th week (B) of the consecutive treatments of CJ-01. Each point is shown as a mean value and standard errors of six to eight animals. Control-Glu: GK rats treated with a 20 % glucose. Low-CJ: GK rats with a 20 % glucose and 50 mg/kg/10 ml/day CJ-01. Middle-CJ: GK rats with a 20 % glucose and 100 mg/kg/10ml/day CJ-01. High-CJ: GK rats with a 20 % glucose and 150 mg/kg/10 ml/day CJ-01. #Significant difference between Control-Glu and Middle-CJ, $p < 0.01$. * Significant difference between Control-Glu and High-CJ, $p < 0.01$.

3. CJ-01 の血糖下降作用

各群の糖負荷後に得られた各時間の血糖値を2時間における総和としてまとめ、投与開始から12週間の変動をFig. 2にまとめた。さらに、糖負荷試験の時間毎の成績をCJ-01投与開始から6 (Fig. 3A)および12 (Fig. 3B)週目の成績をFig. 3に表示した。糖負荷をした対照群では1140~1270 mg/dlと非糖負荷群と比較して2~2.7倍の高い値が認められた (Fig. 2, Control-Glu)。しかしながら、いずれの群においても加齢による血糖値の上昇は認められなかった。さらに、CJ-01投与群においては、低用量群で投与開始8および9週後に対照群と比較して有意に低下 ($p < 0.01$) する時期が認められた (Fig. 2, Low-CJ)。さらに中等用量群でも6から10週後に有意に低下 ($p < 0.01$) したが、効果の持続が得られなかった (Fig. 2, Middle-CJ)。しかしながら、高用量群では投与開始4週間以降の血糖値の総和は持続的に血糖値の上昇を有意に抑制 ($p < 0.01$) した (Fig. 2, High-CJ)。しかも、これらの血糖値は2時間値の総和において約1000 mg/dlと安定した値が得られた。

糖負荷試験での時間毎の成績を各群で比較すると、総和で認められた成績とほぼ同様にCJ-01高用量群 (Fig. 3, High-CJ) は糖負荷対照群 (Fig. 3, Control-Glu) と比較して有意な差 ($p < 0.01$) を持って血糖値の上昇の抑制が認められた (Fig. 3A, B)。

4. 血液検査値の変動

実験最終日に非糖負荷群および糖負荷群の各群の血液を採取して生化学的検査を行った。糖負荷群の対照群 (Control) に対して、CJ-01処置群 (Low-CJ, Middle-CJ, High-CJ)、および、非糖負荷群 (Non-Glu) の比較を行なった。表示はしていないが、カリウム、ナトリウム、クロライド、各イオン類の変動、血中尿素窒素、クレアチニンの変動において、対照群と比較して、いずれも有意な差を認めなかった。同様に、蛋白分画の比較において、A/G比、アルブミン値、 $\alpha 1$ グロブリン値、 $\alpha 2$ グロブリン値、 β グロブリン値、 γ グロブリン値は、いずれの群においても対照群と比較して著明な変動が認められなかった。しかし、脂質系の変動において、総コレステロール (T-Cho)、HDL-コレステロール (HDL-C)、

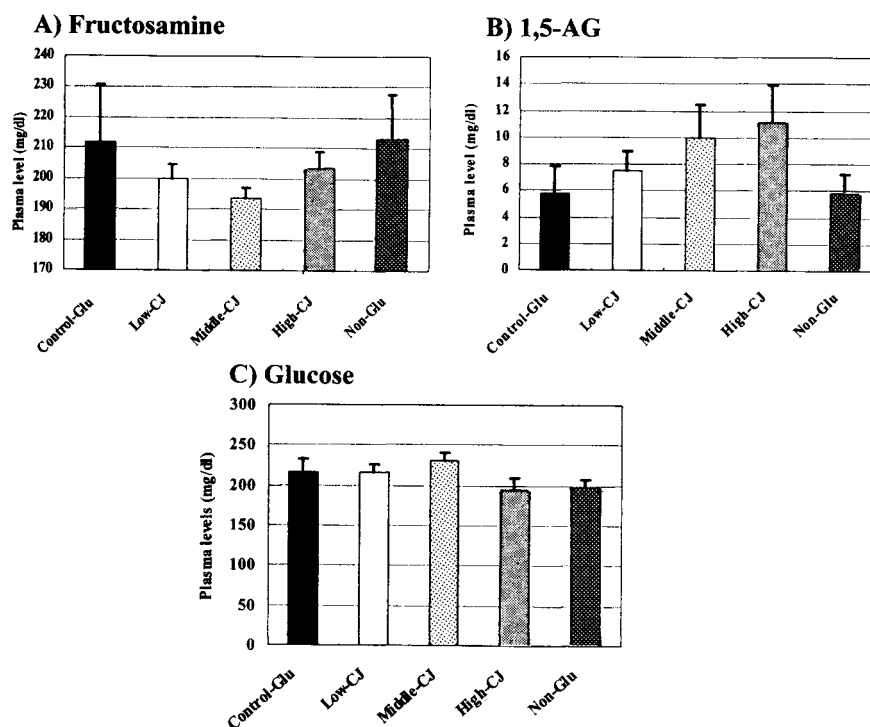


Fig. 4 Changes in plasma fructosamin (A), 1,5-AG (B) and glucose (C) levels of GK rats and CJ-01 treated GK rats after either with or without a 20 % glucose loading. Each bar is shown as a mean value and standard errors of six to eight animals. These results were obtained at the final day of this experiment. Control: GK rats with a 20 % glucose loading. Low-CJ: GK rats with a 20 % glucose loading and 50 mg/kg/10 ml/day CJ-01. Middle-CJ: GK rats with a 20 % glucose loading and 100 mg/kg/10 ml/day CJ-01. High-CJ: GK rats with a 20 % glucose loading and 150 mg/kg/10 ml/day CJ-01. Non-Glu: GK rats without 20 % glucose loading.

および、トリグリセリド値 (TG) はいずれも CJ-01 投与群の方が対照群よりも高い値を示した (Table I)。殊に、T-Cho と TG 値は中等用量群 (Middle-CJ) と高用量群 (High-CJ) で有意な差が認められた ($p < 0.05$)。さらに、Fig. 3 には、血漿中のフルクトサミン、1,5-アンヒドログルシトール (1,5-AG) およびグルコースの各群における変動値を示す。フルクトサミン値に関して、CJ-01 投与群はいずれも対照群 (Control) や非糖負荷群 (Non-Glu) と比較して低値を示したが、統計学的に有意な差は得られなかった (Fig. 4A)。反対に 1,5-AG 値においては、CJ-01 投与群は用量依存的に高い値が得られる傾向にあった (Fig. 4B)。グルコース値においては糖負荷を行っていない状態で、対照群 (Control) と比較していずれの群も著明な変動は認められなかった (Fig. 4C)。

5. 膵インシュリン値の変動

各群における膵のインシュリン値を ^{125}I インシュリン放射活性免疫抗体法で測定を行った。対照群 (Control-Glu; 42 ± 6 pg/ml) と比較して、非糖負荷群 (Non-Glu)、CJ-01 の低用量 (Low-CJ) および中等用量群 (Middle-

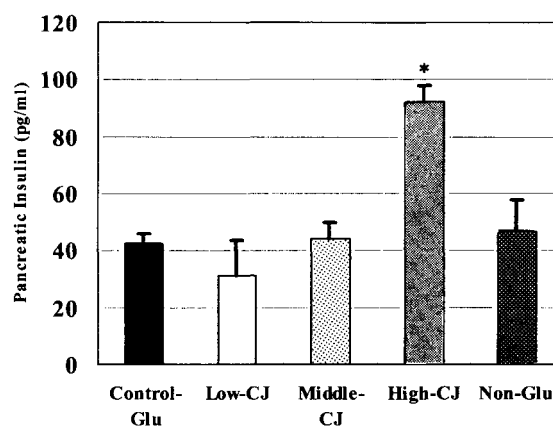


Fig. 5 Changes in pancreatic insulin levels of GK rats and CJ-01 treated GK rats after either with or without a 20 % glucose loading. Each bar is shown as a mean value and standard errors of six to eight animals. * Significant difference from Control-Glu $p < 0.01$.

Table II Histopathological and statistical analysis of GK rat pancreas

	No. of Islets				SA		No. of β cells				SA	
	-	+	++	+++	A	B	-	+	++	+++	A	B
Control (n=8)	10	5	1	9		—	16	9	0	0		**
Low-CJ (n=8)	2	2	2	19	—	—	9	10	6	0	*	—
Middle-CJ (n=8)	11	6	2	11	—	—	5	3	10	12	**	**
High-CJ (n=8)	13	6	4	7	—	—	0	0	10	20	**	**
Non-Glu (n=6)	16	4	4	6	—		2	21	5	2	**	

Numbers of Islets were calculated in each pancreas under an object-lens ($\times 20$)

No. of Islets - : <9, + : 10~14, ++ : 15~19, +++ : >20.

Numbers of β cells were calculated in a five islets of each rat.

No. of β cells - : <9, + : 10~29, ++ : 30~49, +++ : >50.

SA: Statistical Analysis

A: Data (to Control) statistically assessed by analysis of U test of Wilcoxon.

B: Data (to Non-Glu) statistically assessed by analysis of U test of Wilcoxon.

- : NS, * p <0.05, ** p <0.01.

CJ) のインシュリン値は有意な差が認められなかった。しかし、高用量群 (High-CJ; 93 ± 6 pg/ml) では対照群と比較して2倍以上の有意な上昇が認められた (Fig. 5)。

6. 病理組織学的所見

膵の病理組織学的評価の一部を Table II, Table III に、病理組織学的所見を Fig. 6 に示す。これらの成績は本実験の最終日に全群のすべての実験動物から採取した結果をまとめたものである。尚、膵は「方法」に記述し

たが各実験動物から摘出し一部はインシュリン測定、そして残りを全て病理鑑定のための組織切片とした。Fig. 6 は正常な Wistar 系ラット、糖負荷群の GK ラット、および、糖負荷をし、且つ高用量の CJ-01 を連続投与した GK ラットの膵の病理組織切片である。GK ラットを用いた実験群において、膵小島数は対照群 (Control) と比較していずれの群においても明らかな変動は認められなかった (Table II)。しかし、小島の β 細胞数は CJ-01 の投与量に従って著明な増量が認められた (p <0.01)。

Table III Effects of CJ-01 treatment on morphological changes in the pancreatic cells of GK rats with or without a 20 % glucose loading

	A : Foam Cells					B : Vitreous					C : Fibrosis				
	IV	III	II	I	P	IV	III	II	I	P	IV	III	II	I	P
Control	92 %	8	0	0		32 %	20	36	12		44 %	12	32	12	
Low-CJ	96 %	4	0	0		20 %	40	28	12		64 %	20	16	0	
Middle-CJ	53 %	27	20	0	**	17 %	20	37	27	**	50 %	10	30	10	
High-CJ	3 %	40	57	0	**	0 %	17	10	73	**	20 %	20	43	17	*
Non-Glu	0 %	0	0	100	**	0 %	0	33	67	**	0 %	0	30	70	**
	D : Hypertrophy			E : Hemoglobin			F : Round cells								
	+	-	P	+	-	P	IV	III	II	I	P				
Control	52 %	48		80 %	20		36 %	4	20	40					
Low-CJ	56 %	44		88 %	12		76 %	8	8	8					
Middle-CJ	40 %	60		73 %	27		37 %	7	20	37					
High-CJ	6 %	94	**	60 %	40		23 %	13	20	43					
Non-Glu	6 %	94	**	73 %	27		20 %	13	13	53					

Each result is expressed as an average of percentage in whole cells.

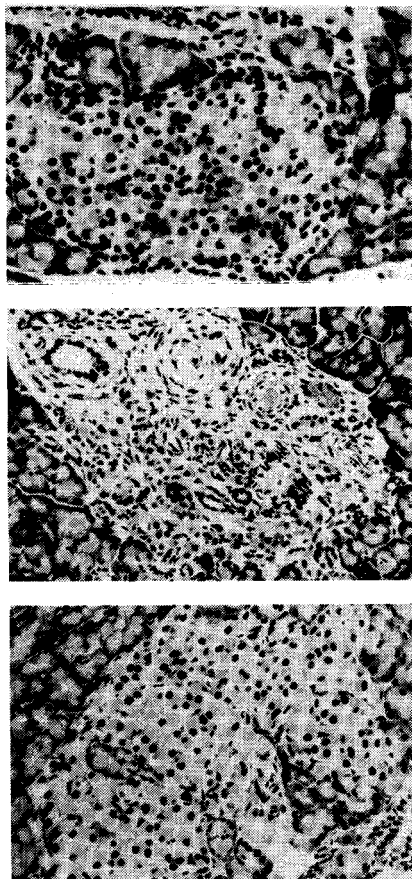
Number of animals; Control (n=8), Low-CJ (n=8), Middle-CJ (n=8), High-CJ (n=8), Non-CJ (n=6)

"IV-I" appears the severity of pathological evidences described in "Materials and Methods"

"+/-" shows either existence or disappearance.

P*: Significant difference from "control", * p <0.05, ** p <0.01

Photo



A) Wistar-Glu

B) Control

C) High-CJ

Fig. 6 Histopathological evidences on dysfunctions of pancreatic β cells of the 18 week old GK rats and CJ-01 treated GK rats after a 20 % glucose loading. A) Normal Wistar rat (Wistar-Glu), B) Glucose loading and CJ-01 untreated (Control), C) high dose of CJ-01 treated and glucose loading (High-CJ). These tissues were dyed with PCNA. ($\times 20$)

すなわち CJ-01 を投与した群では、糖負荷対照群 (Control) と比較して、低用量 (Low-CJ) 群 ($p < 0.05$) でも、中等用量 (Middle-CJ), 高用量 (High-CJ) 群 ($p < 0.01$) でも β 細胞数の減少の著明な抑制が認められた (Table II)。さらに、糖負荷対照群と比較して β 細胞数が著明に多い ($p < 0.01$) 非糖負荷群 (Non-Glu) と比較しても CJ-01 の中ならびに高用量群は著明に β 細胞数は増量が認められた ($p < 0.01$)。しかも、CJ-01 の高用量群は泡沫性変性細胞数、硝子様物質の沈着、小島の肥大において、糖負荷無処置群と比較すると著明 ($p < 0.01$) な改善効果が認められた (Table III, Fig. 6)。

考 察

NIDDM モデル動物である GK ラットに CJ-01 株子実体熱水抽出物質を 12 週間連続的に経口投与を行った。GK ラットで認められた糖負荷によって上昇する血糖値は CJ-01 株子実体熱水抽出物質の連続投与によって 4 週間後から抑制が認められ、この抑制効果は用量依存性で高用量群においては統計的に有意な抑制作用 ($p < 0.01$) が 12 週まで認められた。

さらに、生化学検査によって、用量依存性の 1,5-AG 値の増量傾向、フルクトサミンの減少傾向のみならず、膵インシュリン値の著明な増量 ($p < 0.01$) が CJ-01 高用量群で認められた。しかも、GK ラットで認められる膵 β 細胞数の減少は CJ-01 の中等用量ならびに高用量によって明らかに抑制され、むしろ細胞機能障害の改善を伴う膵 β 細胞の増量が CJ-01 株子実体熱水抽出物質によって惹起されることが病理組織学的検索において認められた。

GK ラットは他の NIDDM モデル動物である OLETF や Zucker Diabetic Fatty ラットとは異なり非肥満型で、しかも、インシュリン分泌障害を特徴とする。^{8,9)} ヒトの NIDDM では肥満型と非肥満型とに分類され、肥満型 NIDDM はインシュリン抵抗性で高インシュリン血症を示すのに対し、我が国での糖尿病患者に多い軽度の肥満型あるいは非肥満型 NIDDM は高インシュリン血症を示すことは少ない。¹⁰⁾ そのため、GK ラットは日本人の NIDDM 型に近似の動物モデルと考えられている。⁹⁾

本研究では GK ラットの 6 週齢から 18 週齢までの糖尿病発達期から安定期において糖負荷を行った群と行わなかった群との比較検索を試みた。血液検査の成績で、無機イオン類や BUN, クレアチニン、および、蛋白分画、脂質、糖代謝系には両者間の相違が認められなかった。病理組織学的検索においては、小島の数には両群間に有意な差は認められなかったものの、膵 β 細胞数は非糖負荷群 (Non-Glu) および糖負荷対照群 (Control-Glu) ではより著明な減少が観察された。CJ-01 株子実体熱水抽出物質の投与は小島の数には増減が認められなかったものの、小島の中の β 細胞数は用量依存的に増加した (Table II, Fig. 5)。さらに、糖負荷対照群 (Control-Glu) と非糖負荷群 (Non-Glu) と比較して、泡沫変性細胞の発現、小島の肥大、硝子様物質の沈着が多く観察された (Table III)。しかし、膵インシュリン値は糖負荷対照群 (Control-Glu) と非糖負荷群 (Non-Glu) の両群間で有意な差として現れなかった (Table II, Fig. 5)。これらの結果は、GK ラットの β 細胞における ATP 感受性

K⁺ チャンネルがグルコースに対して感受性低下を引き起こしていることから β 細胞が増加した場合でもインシュリン分泌障害が誘発されることを裏付けるものと考ええる。¹¹⁾さらに、分子生物学的研究からGKラットのインシュリン分泌に関連する β 細胞のADPリボシルシクラーゼ活性が正常ラットと比較して50%以上低下していること、および、遺伝子的研究から糖代謝系の遺伝子の欠落が報告されている。¹²⁻¹⁵⁾このように、糖負荷によってGKラットの β 細胞やランゲルハンス島における細胞障害は増強されるが、既に機能障害が生じている β 細胞インシュリン分泌に糖負荷は著明な影響を及ぼさないことが判明した。

これまでの報告と本研究とで得られた成績を加味するとGKラットの特徴として、①性差と無関係で、非肥満型の軽度の高血糖状態を示すこと、②ケトosisを来さない、③高インシュリン血症を認めない、④ β 細胞の減少、⑤ β 細胞の減少、⑥グルコースに対するインシュリン分泌障害が挙げられる。¹¹⁻¹⁵⁾このような特徴を有するGKラットにCJ-01株子実体熱水抽出物質の各濃度を3ヶ月間連続投与して抗糖尿病作用を検索した。

CJ-01株子実体熱水抽出物質の連続投与は糖代謝系に影響を及ぼすことが1,5-AGおよびフルクトサミンの成績から示唆された (Fig. 3)。フルクトサミンの変動は全血清蛋白糖結合物の変動を評価しており、糖尿病疾患の増悪期には上昇する。一方、1,5-AGは糖尿病疾患の増悪期には減少する。すなわち、フルクトサミンと1,5-AGは相反する変動を示す。本研究ではCJ-01投与群でフルクトサミン値は対照群と比較して統計的に有意な差は認められなかったが減少傾向を示し、1,5-AG値は用量依存的な増加傾向が認められた (Fig. 4)。血糖負荷後の血糖値の2時間における総和の変動を検索した結果では低用量群や中等用量群では対照群の変動と比較して著明な抑制を示す期間は短かった。しかし、高用量群では血糖値の上昇を著明に抑制する期間が長期に認められた (Fig. 2)。さらに、血糖負荷後の時間別による比較を行なった結果からも明らかにCJ-01投与群は糖負荷対照群と比較していずれの時間も低い血糖値がえられた (Fig. 3)。これらの抑制は従来の血糖下降薬で得られる効果と比較して緩やかであり、本研究で使用したCJ-01の用量範囲では正常血糖値までの血糖下降作用は得られなかった。尚、本研究で使用したCJ-01株子実体熱水抽出物質の用量は、既に報告をした降圧作用や腎機能障害改善作用に基づいており、高用量である10 g/60 kg/600 mlはいずれの動物モデルに対して明らかな治療効果を認めた用量である。^{2,4)}これらの結果から、本研究において用いた10

g/60 kg/600 mlの値は薬理効果の期待できる最大値と思われる。すなわち、CJ-01株子実体熱水抽出物質の血糖下降作用は緩徐に発現するものと考えられる。

本研究において、高用量投与での著明な効果として β 細胞インシュリン値の著明な増量効果 (Fig. 5) と細胞機能回復効果が挙げられる。インシュリン値の上昇に関しては、病理組織の研究成績 (Table II, Table III, Fig. 6) からインシュリン産生機能の改善が裏付けられる。¹⁶⁻¹⁷⁾

すなわち、CJ-01投与により β 細胞の減少に対して明確な保護作用が確認された。さらに、高用量では β 細胞数の著明な増加が認められた。これらの成績は、高用量のCJ-01によって増加した β 細胞がインシュリン分泌を増量させたことが示唆される。CJ-01株の細胞保護作用に関しては、既報の如くDOCA処置の片腎摘出ラットでの腎糸球体細胞の障害に対する抑制作用ならびに関節炎マウスの治療効果を考慮すると、CJ-01株子実体熱水抽出物質の成分のいずれかが有する細胞外マトリックス修復作用が関連しているか、あるいは、糖処理能の向上に起因することが考えられる。^{2,16,17)}

結論として、CJ-01株子実体熱水抽出物質はGKラットの β 細胞機能を回復させインシュリン産生を増加するに伴って、インシュリン分泌機能を亢進させることが明らかとなった。これらの作用はII型糖尿病に対してCJ-01株子実体熱水抽出物質が効果的であることを示唆するものである。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費 (基盤研究B) (YW) によっておこなわれたものである。本研究にあたり、安定栽培法によるヒメマツタケ (CJ-01) の提供をいただきました (株) 日本バイオの吉本博明専務に御礼を申し上げます。また、血液検査ならびに組織切片作成に御協力をいただいた (株) 保健科学研究所の綿貫正道部長および実験の補助をいただいた (株) 日本医食研究所の山本都章専務に深謝いたします。

References

- 1) Eguchi, F., Yoshimoto, H. and Higaki, M.: A year-round cultivation method *Agaricus blazei* (CJ-01) and the effect of hot-water extract from its fruit bodies. *DABIA* 511-518, 1997.
- 2) Eguchi, F., Watanabe, Y., Kikukawa, T., Yoshimoto, H., Abe, C. and Higaki, M.: Renoprotective effects of a hot water extract of *Agaricus blazei* fruiting bodies in experimental renal injury assessed by a DOCA-NaCl hemi-nephrectomized rats. *J. Trad. Med.*

- 16, 24-31, 1999. (in Japanese)
- 3) Eguchi, F., Watanabe, Y., Zhang, J., Miyamoto, K., Yoshimoto, H., Fukuhara, T. and Higaki, M.: Inhibitory effects of hot water extract of *Agaricus blazei* fruiting bodies (CJ-01) on hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *J. Trad. Med.* **16**, 201-207, 1999. (in Japanese)
 - 4) Kikukawa, T., Eguchi, F., Abe, C., Yoshimoto, H. and Higaki, M.: A novel anti-inflammatory substance: Effects of *Agaricus blazei* murri (CJ-01) on spontaneous arthritis in MRL/lpr mice and type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Japan. J. Inflamm.* **19**, 261-267, 1999. (in Japanese)
 - 5) The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **20**, 1183-1197, 1997.
 - 6) Kloppel, G., Lohr, M., Habich, K., Oberholzer, M. and Heitz, P.U.: Islet pathology and the pathogenesis of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* **4**, 110-125, 1985.
 - 7) Stefan, Y., Orei, L., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., Patel, Y. and Unger, R. H.: Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* **3**, 694-700, 1982.
 - 8) Goto, Y., Kakizaki, M. and Masaki, N.: Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc Jap Acad* **51**, 80-85, 1975.
 - 9) Goto, Y. and Suzuki, K.: GK rat- A spontaneous model of non-insulin-dependent diabetes. *CRJ Letters* **7**, 1-16, 1994.
 - 10) WHO Study Group: Prevention of diabetes mellitus. Report of a WHO study group. *WHO technical report series No.844*, World Health Organization, Geneva, pp.7-10, 1994.
 - 11) Tsuura, Y., Ishida, H., Okamoto, Y., *et al.*: Glucose sensitivity of ATP-sensitive K⁺ channels is impaired in β -cells of the GK rat; A new genetic model of NIDDM. *Diabetes* **42**, 1446-1453, 1993.
 - 12) Ohneda, M., Johnson, J. H., Inman, L. R., *et al.*: GLUT2 expression and function in β -cells of GK rats with NIDDM: dissociation between reductions in glucose transport and glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* **42**, 1065-1072, 1993.
 - 13) Movassat, J., Saulnier, C. and Portha, B.: β -cell mass depletion precedes the onset of hyperglycemia in the GK rat, A genetic model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab* **21**, 365-370, 1995.
 - 14) Galli, J., Li, L.-S., Glaser, A., *et al.*: Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nature Genet* **12**, 31-37, 1996.
 - 15) Matsuoka, T., Kajimoto, Y., Watada, H., *et al.*: Expression of CD38 gene, but not of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene, is impaired in pancreatic islets of GK rats. *Biochem Biophysiol Res Comm* **214**, 239-246, 1995.
 - 16) Takami, K., Odaka, H., Tsukuda, R. and Matsuo, T.: Antidiabetic actions of a disaccharidase inhibitor, AO-128, in spontaneous diabetic (GK) rats. *Pharmacology and Therapy* **19**, 161-171, 1991. (in Japanese)
 - 17) Ladrerie, L., Malaisse-Lagae, F., Fuhlendorf, J. and Malaisse, W. J.: Repaglinide, glibenclamide and glimepiride administration to normal and hereditarily diabetic rats. *Eur J Pharmacol* **335**, 227-234, 1997.