

平成14年度

春季修了

修士（工学）学位論文

担子菌メシマコブ菌糸体の培養方法と成分特性に関する研究

Research of culture method and medicinal component with mycelium
of basidiomycete, *Phellinus linteus*.

平成14年1月18日

高知工科大学 大学院 工学研究科 基盤工学専攻 起業家コース

学籍番号：1055168

秋山 幸仁

Yukihito Akiyama

担子菌メシマコブ菌糸体の培養方法と成分特性に関する研究

目 次

は じ め に	1
第 1 章 序 論	3
1-1 研究の背景	3
1-2 研究の目的	5
第 2 章 メシマコブ菌糸体の培養条件	
2-1 緒 言	8
2-2 材料および方法	10
2-2-1 供試菌株	10
2-2-2 培養組成および培養方法	10
2-2-3 菌糸体乾燥重量の測定	11
2-3 実験結果および考察	11
2-3-1 培養温度と菌糸体成長	11
2-3-2 培養初発 pH と菌糸体成長	13
2-3-3 菌糸体成長に及ぼす炭素源の影響	16
2-3-4 菌糸体成長に及ぼす窒素減の影響	19
2-3-5 菌糸体成長に及ぼす通気液体培養の効果	21
第 3 章 メシマコブ菌糸体由来成分の抗酸化実験	
3-1 緒 言	24
3-2 実験方法	31
3-2-1 供試試料	31
3-2-2 試薬	31
3-2-3 供試試料の作製	31
3-2-4 フリーラジカル消去活性の測定	32

3-5	実験結果	35
第4章	メシマコブ菌糸体由来成分の抗アレルギー実験	
4-1	緒言	39
4-2	実験方法	41
4-2-1	実験用被験試料	41
4-2-2	実験動物ならびに実験方法	41
4-3	実験結果	42
4-3-1	肉眼的皮膚所見の結果	42
4-3-2	血中 IgE 量測定の結果	42
第5章	総括	45
5-1	メシマコブ菌糸体の培養条件	45
5-2	メシマコブ菌糸体由来成分の抗酸化実験	46
5-3	メシマコブ菌糸体由来成分の抗アレルギー実験	47
5-4	まとめ	48
参考引用文献		50
謝辞		56

はじめに

高齢化社会を迎えようとしている21世紀の日本における緊急の課題のひとつが医療費の増加であり、経済的あるいは社会生活の心理的な圧迫要因となっている。しかし、医療費は年々増加しており、現状では医療費を低減させるためのグランドデザインが構築されていないのが現状である。

医療費の増加の抑制には、高齢者がより健康で長寿でありつづけることが、高度、高額医療による経済負担を低減させる近道であることは、周知のことである。高齢者がより健康に生きるには、喫煙や暴飲暴食を止めるなど生活習慣の改善が必要であると同時に、科学的な根拠に裏付けられた新たな生命支援のための製品開発が望まれている。

生命支援には、臓器移植や遺伝子診断などの高度医療技術の開発も重要であるが、その一方で、日常生活の中で食を科学する（食生活の改善）ことでより生活習慣病（糖尿病や高血圧症）を予防するための商品開発も大切と言える。

機能性食品や機能性飲料はそのような社会的な要求に基づき開発されている。その中で、最近注目されているのが和漢薬材を生活習慣病（糖尿病や高血圧症）や老化、癌、免疫・アレルギー疾患などに応用することと、予防医学への漢方製剤の利用である。すでに、活性酸素やフリーラジカルが炎症や癌など各種疾患、老化に深く関わっていることが解明され、漢方に使われる植物素材を原料とする研究が進められている。メシマコブもその素材の一つであるが、これまでは漢方薬剤として扱われる多くの原料がそうであるように、自然の中で採取された物が使われてきたため、臨床分野へ応用するには、科学的な検証が不足していた。

我々はメシマコブの大量培養に成功し、これを原料として予防医学に応用することを考えた。メシマコブの示す生理作用の発現の機

構解明に取り組み、生活習慣病（糖尿病や高血圧症）や老化、癌、免疫・アレルギー疾患の予防に有用であるかどうかの研究を進めた。その中心課題として取り上げたのが、生体傷害を招くと言われている活性酸素・フリーラジカルに対する消去能である。活性酸素・フリーラジカルを消去する機能物質は、虚血性疾患（心筋梗塞や脳梗塞）、炎症性疾患（アレルギー）、免疫疾患（抗原病）、癌、老化などに対して抑制的に作用することが知られている。代表的な物質としては、茶葉に含まれるカテキンとよばれるポリフェノール類がある。

このような研究を推進するにあたり、高知工科大学起業家コースに入学し、物質・環境システム工学科 生命環境工学講座を選んだ。生命環境工学講座は生命システムと環境システムの融合を目指した学際領域の応用研究と、生命生活支援工学を実現するため基盤研究を行っている。特に、生体システムすなわち人間の生命を守るための基盤技術の開発研究を、活性酸素・フリーラジカルを切り口として推進しており、世界的にもトップレベルであることから、研究推進の最適の研究室であるとして選択した。また、キノコを応用したバイオベンチャー企業を経営するに当たり、起業家コースの先生方の指導により、最新の経済社会の情報ならびに、最適な経営指針を得て、事業化を優位に進めることができると考えた。

修士論文の研究目的はメシマコブの予防医学への応用である。内容はメシマコブの示す活性酸素・フリーラジカルの消去能を明らかにし、機能成分の分離分画を行い、構造を決定すること、新たな医薬品とすることである。

修士論文の研究内容は、1) メシマコブの培養技術の研究、2) メシマコブ由来成分の活性酸素・フリーラジカル除去機能成分の特定、3) 抗アレルギー作用の機構研究である。このような基礎研究に加え、起業家コースにおける指導により、科学的な検証に裏付けられた商品開発を進めることができ、事業化に成功したので報告する。

第1章 序論

1-1-研究の背景-

地球上の生物は、その多くが酸素の働きを活用して生命の維持を行っている。この生物と酸素についての研究は、我々の生命活動の基盤となる秩序を解明することであるばかりでなく、人類の健康を脅かすさまざまな疾病の、予防と治療において不可欠な研究分野である事が判明している¹⁾。しかしながら生体内局所では一つ一つの化合物が複合的な特性を示すためにその作用秩序の詳細は明らかにされていないのが現状である。そのため、我々は未だに多くの疾病を克服する事が出来ないでいる。

生物と酸素の関係は、太古よりの生命と進化の歴史でもあるが、近年における測定理論と測定技術の進歩は、人類に新たな知恵の進化をもたらす大いなる可能性を秘めている。

今より約40億年前には、地球上の大気には酸素と窒素が含まれておらず、地球上に最初に誕生した生物は、嫌氣的エネルギー代謝とよばれる酸素を使わない発酵や解糖という方法でエネルギーを確保する嫌気性微生物群であった。さらに8億年と言われる歳月を経て、二酸化炭素と太陽光で光合成を行うラン藻類の誕生により、酸素・メタン・アンモニア・二酸化炭素などが大気中に放出され、太陽光の紫外線により分解されて現在の大気と同じような組成になるまでには12億年もの年月を要したとされている。酸素の増加に伴い、嫌気性生物の多くは滅亡し、酸素を利用してエネルギー代謝を行う微生物が誕生した。酸素毒性から身を守る機能を取得した、いわゆる好気性微生物である。酸素を利用する好氣的エネルギー代謝は、嫌氣的エネルギー代謝よりもはるかに効率が高く、エネルギー代謝に関わるアデノシン三リン酸(ATP)分子量で比較すると19倍ものエネルギー代謝を発揮する事が出来るため、やがてより活動能力の高い生物へと進化してゆくことになる。酸素を利用してエネルギー

を得る生物は、細胞内のミトコンドリアで酸化還元反応により、酸素を水にする効率よい化学反応システムを取得し、大量のエネルギーを生産する事が出来るようになってゆく。この化学反応の途中で出来る過酸化水素は、体内に酸素を貯蔵する役割をにない、エネルギー生産の効率を高めることを可能にし、やがて高等生物の誕生へと、進化の道を歩んできたのである。

しかし、酸素は体内のエネルギー生産に不可欠の反面、強力な毒性を発揮し、生命の恒常性を脅かす化合物である活性酸素・フリーラジカルに変成しやすい性質を持っている²⁾。

活性酸素・フリーラジカルは、酸素が化学的、物理的なエネルギーにより、より反応性の高い化合物に変化したものであり、生体内で過剰に生成されると直ちに毒性を発揮し、細胞の老化、動脈硬化、脳心血管障害、あるいはガンなど、極めて広範囲の疾患の要因となることが指摘されている。とくに発ガンの原因としてDNAの切断や炎症にも関わっていることが判明している³⁾。したがって、生体代謝のさまざまな過程で発生する過剰な活性酸素・フリーラジカルを確実に消去し無毒化する事が生命維持には不可欠の要因⁴⁾の一つである。活性酸素・フリーラジカルの多くは極めて寿命が短く、さまざまな生体成分と素早く反応するので、生体の保護にはその発生を抑制するか、発生局所に於いて分解処理する事が重要とされている。このため、多量の酸素を使う好気生成物は、活性酸素・フリーラジカルが発生する組織細胞内局所でこれらを消去するための、抗酸化機能を発揮する高濃度のスカベンジャーや消去酵素を有しており、酸素毒性を発現することなくダイナミックなエネルギー代謝を営んでいる。⁵⁾

しかし、現在の社会生活は便利で豊かになった反面、生体の恒常性を損なうリスクも増大させている。大気中に排出される排気ガスの窒素酸化物(NO_x)やイオウ酸化物(SO_x)、農業に用いられる農薬類、オゾン層の破壊による紫外線量の増加など化学物質による生活

環境の悪化や、IT関連機器等から発する電磁波をはじめ、食生活の変化などによる生活習慣病の蔓延、情報化による目まぐるしい競争社会は、精神と肉体を蝕むストレスを増加させている⁶⁻⁷⁾。これらの全てが、生体内で生産できる防御機能を上回る量の活性酸素・フリーラジカルを体内で生じさせる要因となりうるものであり、過剰に発生した活性酸素・フリーラジカルは、直ちに何らかの疾病の原因として機能する、生命にとっての最大のリスクファクターとなっている⁸⁾。我々が生体内で生産している抗酸化物質を除けば、これらのリスクを軽減、あるいは消去するために活用できる抗酸化物質として、ビタミンC、ビタミンE、β-カロテン等を上げる事が出来る⁹⁾。他には食物に含まれる僅かな天然物質に依存しているにすぎない。さまざまな疾病に苦しむ現代人にとって、充分でない事は言うまでもない。我々人類がこれまで以上に健やかな生命活動を営むためには、健康を蝕む、多くの疾病の予防、あるいは治療を目的として積極的活用できる新たな物質の登場が必要なのである¹⁰⁾。この意味において生体内で有用に機能する抗酸化機能を有する物質の研究開発は正に急務であり、渴望されている。筆者はこの様な社会的要求に応えるべく、抗酸化物質の調査、及び生産方法の開発を課題として研究に着手したものである。

1-2 研究の目的

活性酸素・フリーラジカルを体内に於いて消去する、有用な抗酸化物質の調査研究を行うに当たり、担子菌メシマコブ (*Phellinus linteus*) を調査対象に実験を行った理由を述べる。担子菌メシマコブ (以下メシマコブという) は、担子菌類、ヒダナシタケ目、タバコウロコタケ科、キコブタケ属のキノコであり、日本では長崎県の男女群島の女島 (めしま) に於いて、野生の桑の古木に寄生しているのが多く発見され、メシマコブと命名された。外見はサルノコシ

カケによく似ている。傘の直径は10 cm前後の物が多く、まれに30 cm程度にまで成長する。傘の表面は黒褐色で、裏側の部分（管孔部）は鮮明な黄色である¹¹⁾。桑の木に生える事から漢方では「桑黄」あるいは「桑耳」とよばれている。キノコの効能は古くから注目されており、中国の後漢時代（紀元25～220年）の薬学書「神農本草経」には、「長年にわたって煎じて飲めば寿命が延びる」と記されている。「桑黄」の名は、漢方の古典である「本草綱目」をはじめ、「中薬大辞典」、「中国薬用真菌」などの各種医学書や薬学辞典にも登場し、慢性病の諸症状に著効があるされ、生薬として古くから用いられてきた¹²⁾。キノコ類、特に担子菌が生成する2次代謝産物には、他の菌類にみられない特徴がある¹³⁻¹⁴⁾ことから、薬理活性物資の生産者として注目され研究対象となっている。国内の研究事例としては、1968年 国立ガンセンターの化学療法部と東京大学薬学部の共同研究により、「各種キノコにおけるガン抑制効果」について調査され、メシマコブが抗腫瘍効果実験に於いて、腫瘍阻止率96.7%と最も高い値を示したことが報告されている¹⁵⁾。しかしながら、その当時は培養技術が未熟であった為に、メシマコブを応用した製品を生産することが出来なかった。現在はキノコの多糖である、 β -(1,6)(1,3)グルカン¹⁶⁾などをはじめとする有用性分を応用した抗ガン剤（免疫賦活剤）である、シイタケの「レンチナン」¹⁷⁻¹⁹⁾、カワラタケの「クレスチン」²⁰⁻²¹⁾、スエヒロタケの「シゾフィラン」²²⁻²³⁾や化学療法による副作用の軽減剤などが開発されている²⁴⁾。これらの菌類は、細胞分離と組織培養が比較的容易である事や、菌株の入手が容易であった事から実現したものである。メシマコブは非常に稀少な菌であり、優良な菌株の入手が困難であるばかりか、硬質菌に属し細胞分離と組織培養が容易でないことから、国内に於いて大量培養の成功事例は報告されていない。

筆者は、本研究の目的として、先にあげた古くからの文献や国立ガンセンター研究所等の研究事例を踏まえ、実用に供しうるメシマ

コブ菌糸体の大量生産方法の確立を図ること。文献などが示す効能について、現在最先端の測定手法を用いての生理活性物質の計測、ならびに動物実験による効果の検証を試み、メシマコブ菌糸体由来成分が社会的要求である各種疾病の予防や治療効果について、どのような機能を持ちうるか、また実用的に応用できる可能性を調査するために、一連の実験を行った。

第2章 担子菌メシマコブの培養条件

2-1 緒言

メシマコブ（図2-1）は、担子菌類、タバコウロコタケ科、キコブタケ属のキノコである。桑の立木の心材腐朽菌であり、長崎県の女島（めしま）に自生する事から命名された¹⁾。漢方では桑黄とよばれて薬用に供せられている²⁾。日本ではメシマコブの薬理効果が33年前に試験され、サルノコシカケなどを含めたキノコの中で最も高い抗腫瘍効果が報告されている³⁾。昨今では日本国内で養蚕が衰退して桑園が減少したこともあり、子実体の採取は困難になっている。そのため、人工的にメシマコブの子実体を栽培しようとする試みが活発に展開されている⁴⁻⁵⁾。しかしメシマコブは多年生であり、実用に供する大型の子実体を得るまでには数年を要することから、大量栽培が難しい。

近年、韓国ではメシマコブの薬効に注目し、その菌糸体の培養方法や薬効に関する特許出願⁶⁻⁷⁾が行われている。この韓国の特許に於いては、メシマコブ菌糸体も子実体同様な薬効作用を有するとデータが示されているが、一方でメシマコブ菌糸体の培養に関しては寒天培地を用いた大まかな培養方法を示したにとどまっており、液体培養方法に関する実施例、あるいは最適条件検索の記述は全くない。本実験ではメシマコブ菌糸体を1t規模のタンクを使用して効率よく培養することを最終目的として、菌糸体の栄養成長に与える（1）培養温度、（2）培地 pH、（3）主要栄養素炭素源、（4）主要栄養素窒素源、（5）通気培養の影響を詳細に検討した、以下に実験の内容を示す。

図 2-1

メシマコブ [*Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng]



2-2 材料及び方法

2-2-1 供試菌株

本研究では1998年10月に宮崎県西諸県郡須木村で採取したメシマコブの子実体（図2-1）より純粋分離して得た菌糸体 PL-No.08 株を用いた。種の同定は、農林水産省森林総合研究所 阿部恭久博士によって行われた。比較試験に用いたヒメマツタケ (*Agaricus blazei* Murill.) およびシイタケ [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] は、(株)アイ・ビー・アイ応用きのこ研究所の Ab7002 株⁸⁾ および Le-01 株を用いた。これらの菌株は、内径90mmのペトリ皿内の Potato Dextrose Ager 培地 (Difco 社製) 上で成長させた後、メシマコブおよびシイタケは5℃で、またヒメマツタケは10℃で保存した。これらの保存菌株を上述の寒天培地へ再び接種して、25℃暗黒化で15日培養し、密生成長した培養菌糸体を内径5mmのコルクボーラーで打ち抜き（乾燥菌糸体重量0.35mg相当）、接種源とした。

2-2-2 培地組成および培養方法

蒸留水1Lに、ポリペプトン3g(0.05%N)、スクロース10g、酵母エキス3g、 KH_2PO_4 0.5gおよび Na_2HPO_4 0.5gを溶解し、pHを5.7に調整して基本液体培地とした。ポリペプトンは極東製薬工業(株)社製のペプトンA、スクロースは和光純薬工業(株)社製で試薬1級、酵母エキスはアサヒビール食品(株)社製のミースト P2G、 KH_2PO_4 および Na_2HPO_4 は和光純薬工業(株)社製の試薬特級を用いた。培地のpHは1N-HClあるいは1N-KOHを用いて調製した。培地は100ml容三角フラスコに50ml、あるいは10L容カルスター（柴田化学(株)東京）に10L分注し、シリコン栓で封じ、121℃で10分間高圧蒸気殺菌した。

三角フラスコを用いた静置培養では、接種源を1片、カルスターを用いた通気液体培養では接種源を3片接種し、25℃、暗所で培養を行った。カルスターを用いた通気培養では、強制的に孔径0.22 μm フィルター(Millex-FG50; Millipore, USA)を通した無菌的な空気を通気量2L/minで培地内へ通気した。

2-2-3 菌糸体乾燥重量の測定

菌糸体乾燥重量は、遠心分離（遠心加速度 $38,800 \times g$ ）によって培養菌糸体と培養濾液を分離し、菌糸体画分に再度蒸留水を加えて攪拌後遠心する洗浄を3回行った後、105℃で24時間乾燥して測定した。

静置培養では各実験区毎に6フラスコを用いて培養し、それらの測定の平均値を求めた。通気液体培養では各実験区それぞれ1カルスターを用い、培地1当たりの菌糸体乾燥重量に換算し示した。

2-3 実験結果および考察

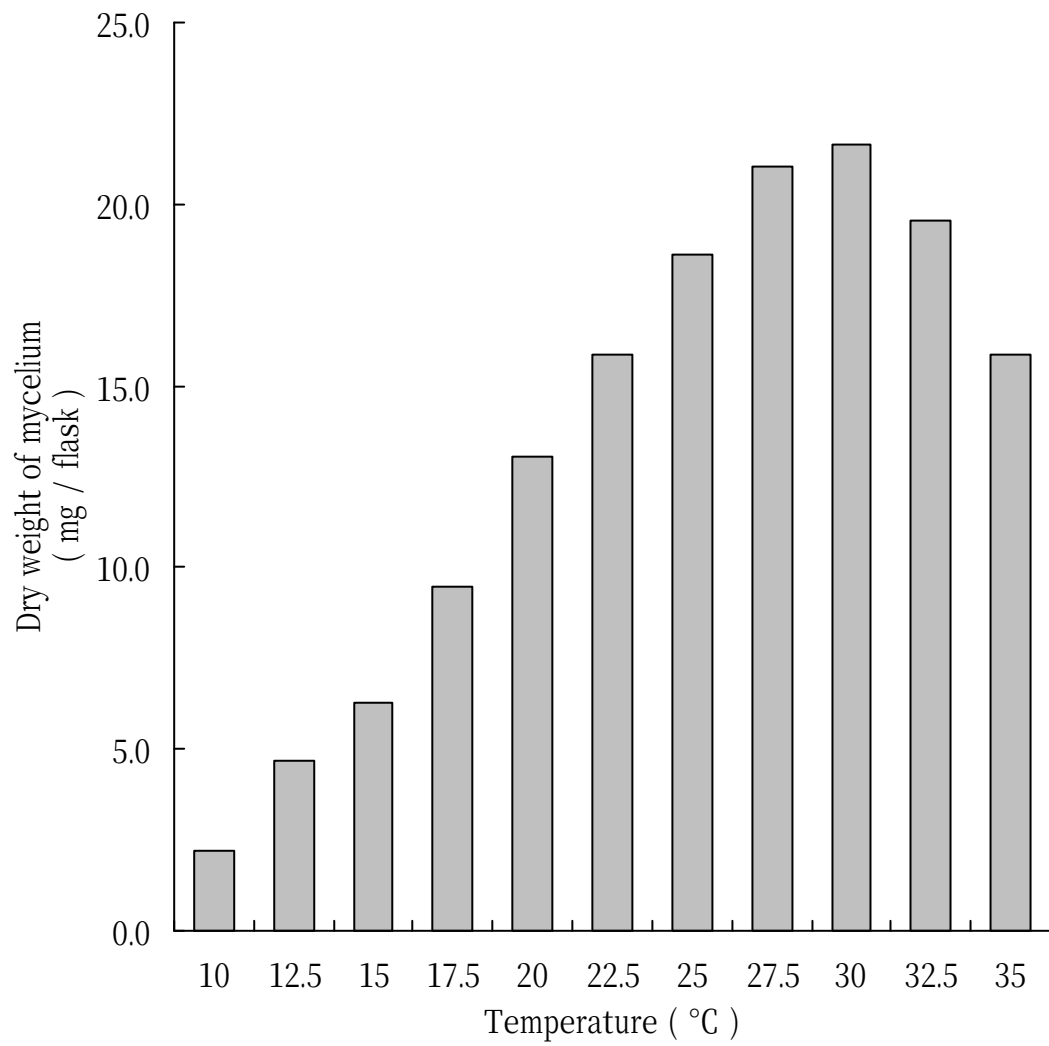
2-3-1 培養温度と菌糸体成長

各培養温度で得られたメシマコブ菌糸体乾燥重量を図2-2に示す。メシマコブ菌糸体は実験した10℃から35℃までの範囲で成長が認められ、30℃で菌糸体の乾燥重量が最も高かった。25-32.5℃では、2.5℃の温度差で比較すると菌糸体収量に有意な差は認められなかった。

以上の実験結果から、メシマコブの菌糸体の成長に最適な温度帯は25-32.5℃であった。この温度範囲は、液体培地でマイタケ菌糸体の最適生育温度とされる25-30℃⁹⁾とほぼ重なったが、

図 2-2

メシマコブ菌糸体の培養温度と菌糸体成長



ハタケシメジ菌糸体成長の最適温度 25°C ¹⁰⁾ に比べ、若干高い。また、マイタケは 35°C で菌糸体成長が急激に低下する⁹⁾ と報告されているが、メシマコブは 35°C でも急激な菌糸体成長の低下は認められなかった。

2-3-2 培地初発 pH と菌糸体成長

図 2-3 に初発 pH 3.0 から 7.0 までの培地で生育したメシマコブ菌糸体の乾燥重量、そして図 2-4 に菌糸体の培養後の培地 pH が変化した幅を示す。菌糸体の成長は実験した全 pH 域で認められた。菌糸体乾燥重量が最も多かったのは pH 5.5 であり、そこから酸性側および中性側のいずれにしても減少した。pH 5.0 - 6.5 の範囲では有意な差が認められなかった。しかし、pH 5.5 に対する pH 4.5、あるいは pH 7.0 については有意な差が認められた。以上から、メシマコブ菌糸体培養に用いる培地の初発 pH の範囲としては 5.0 - 6.5 が適当であり、最適初発 pH は 5.5 であると判定した。

培地の初発 pH と菌糸体成長との関係について、マンネンタケの菌糸体培養では、初発 pH 3.0 - 7.0 の広い範囲で菌糸体成長にあまり差がなく¹¹⁾、アラゲキクラゲでは最適初発 pH がアルカリ側に¹²⁾、マイタケのそれは酸性側の pH 4.9⁹⁾にあると報告されている。一方ホンシメジ、シャカシメジの最適初発 pH は 5.0 付近¹³⁾、エリンギでは 6.0 付近¹⁴⁾であるように、これまで報告されている担子菌の菌糸体培養の初発 pH はメシマコブと同様 5 - 6 になるものが多い¹⁵⁾。菌糸体培養による培地 pH の変化の方向は、初発 pH の値によって異なる傾向を示した (図 2-4)。pH 3.0 - 6.5 までの範囲ではアルカリ側へ移動し、pH 7.0 では酸性側に移動した。いずれの初発 pH であっても、長期間培養した後には pH 6.5 付近に収束する傾向があった。この傾向は、エリンギ菌糸体培養時の培地 pH 変化¹⁴⁾と類似していた。

図 2-3

培地初発 pH と菌糸体成長

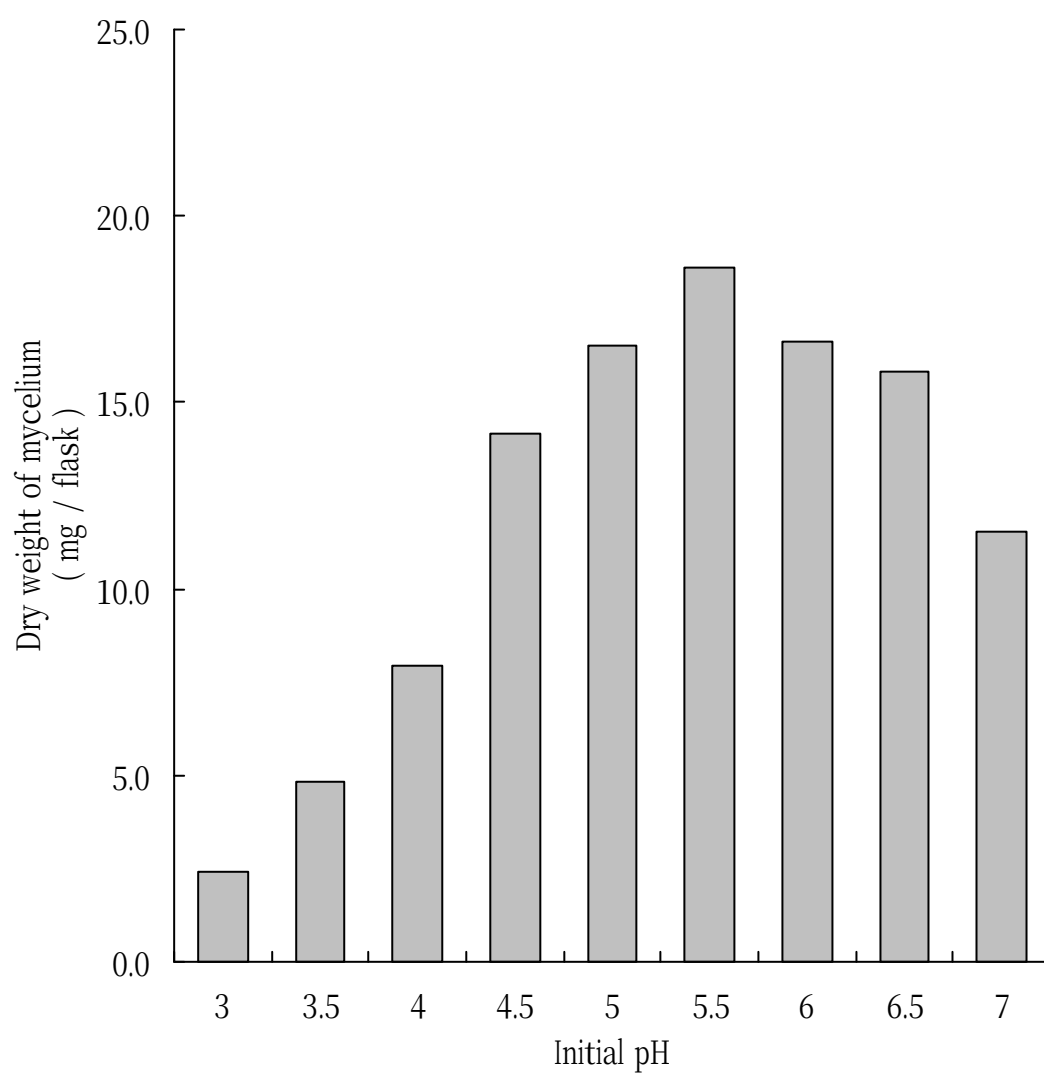
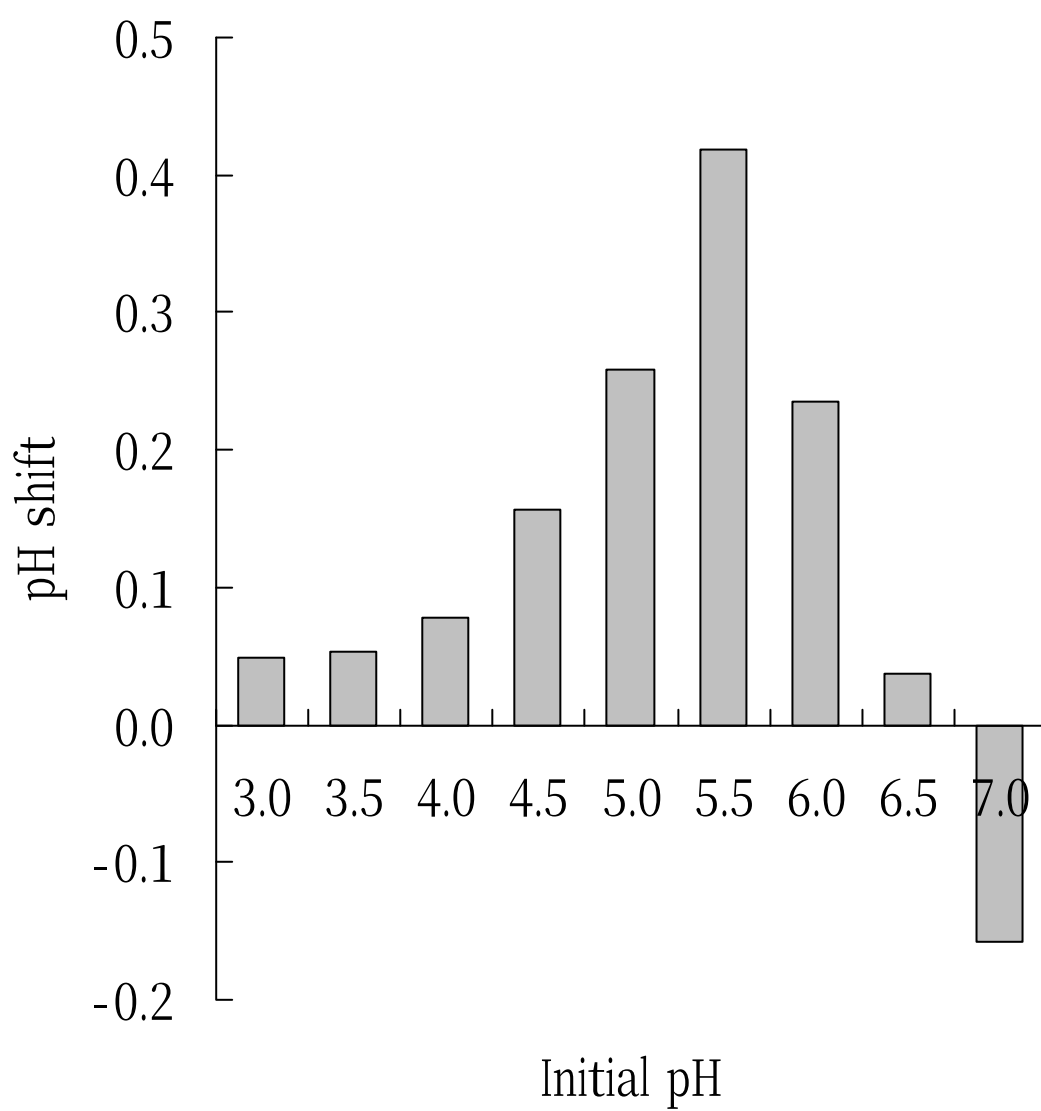


図 2-4

メシマコブ菌糸体成長における培地pHの変化量



2-3-3 菌糸体成長に及ぼす炭素源の影響

メシマコブの菌糸体成長に最適な炭素源を検索した結果を図 2-5 に示す。

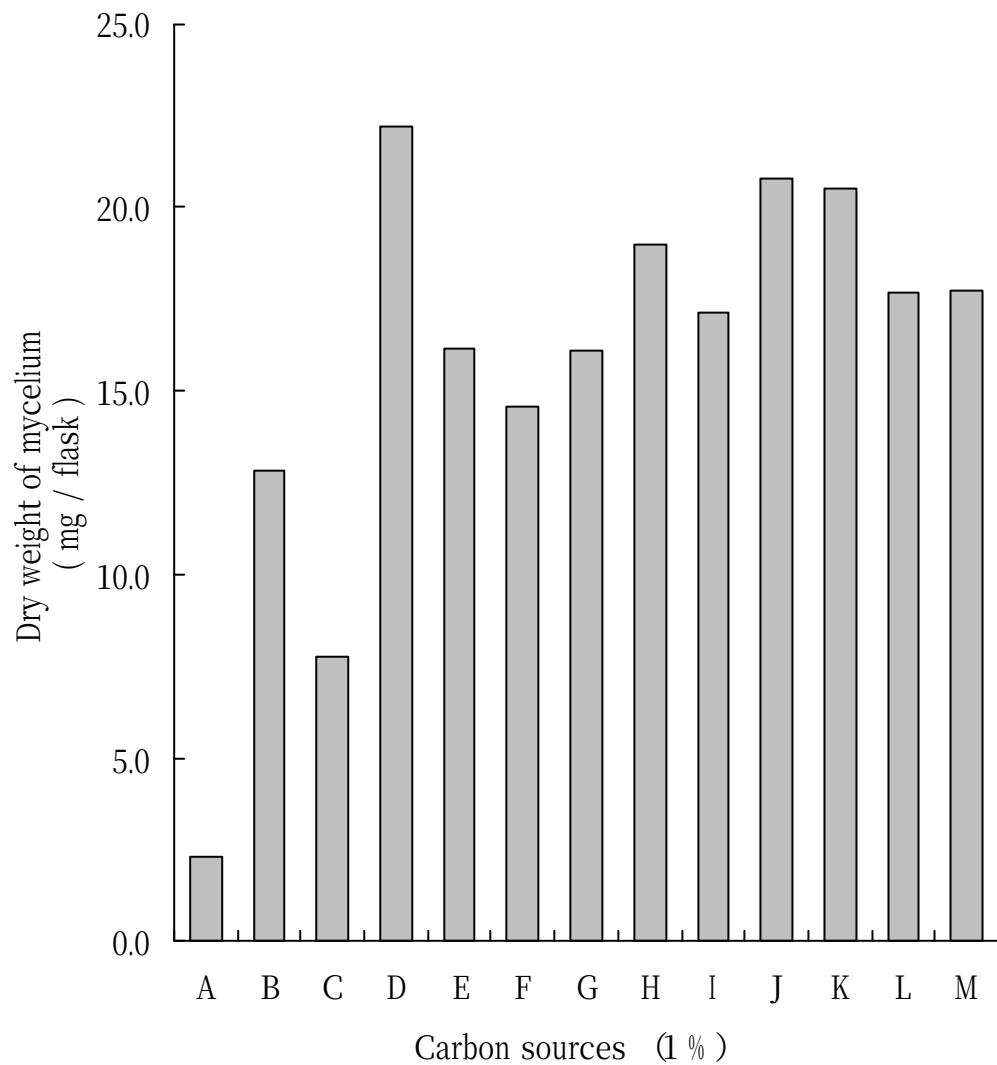
炭素源無添加では菌糸体成長はほとんど認められなかったのに対し、供試した 12 種類の炭素源を各 1 % 添加した全ての培養区で菌糸体の成長が認められた。そこで、フラスコ当たりの菌糸体乾燥重量が 12.5 mg 以下のリボース、12.5 – 15.0 mg のキシロースおよびアラビノース、17.5 – 20.0 mg のスクロース、ラクトースおよびラフィノース、20.0 – 22.5 mg のグルコース、セロビオースおよびトレハロースに組み分けし、それぞれの菌糸体乾燥重量範囲に対して検定を行ったところ、有意な差が認められた。

さらに、基本液体培地のスクロース区の菌糸体乾燥重量を上回ったグルコース、セロビオースおよびトレハロースについて検定を行ったところ、グルコースが最適炭素源であると判定した。グルコースが最適炭素源であることはマイタケ⁹⁾、ホンシメジ、シャカシメジ¹³⁾およびハタケシメジ¹⁰⁾と一致した結果であった。菌糸体成長に適した炭素源がマンノースであると報告されたクロアワビタケ¹⁶⁾やアラゲキクラゲ¹²⁾とは異なった。メシマコブの菌糸体成長が低かった炭素源は五炭糖のキシロース、アラビノースおよびリボースであり、中でもリボースが最も低かった。マイタケの菌糸体成長と同様に、五炭糖を利用しにくいことがわかった。

メシマコブの菌糸体成長に利用されやすいと判断されたスクロース、グルコース、セロビオースおよびトレハロースの添加濃度の影響を 0 – 5.0 % の範囲で検討した (図 2-6)。スクロース、グルコースおよびトレハロースの添加濃度を高くすると菌糸体乾燥重量は増加する傾向を示し、中でもグルコースの添加濃度 4.0 % は同じ濃度の他の糖を用いた場合と比較して有意な差を持って高くなった。このことから、菌糸体成長に於ける最適グルコース濃度が 3.0 % であるホンシメジやシャカシメジとは異なり、メシマコブにおいては炭素源濃度を 4.0 % 前後まで高くしても菌糸体成長が促進することがわかった。

図 2-5

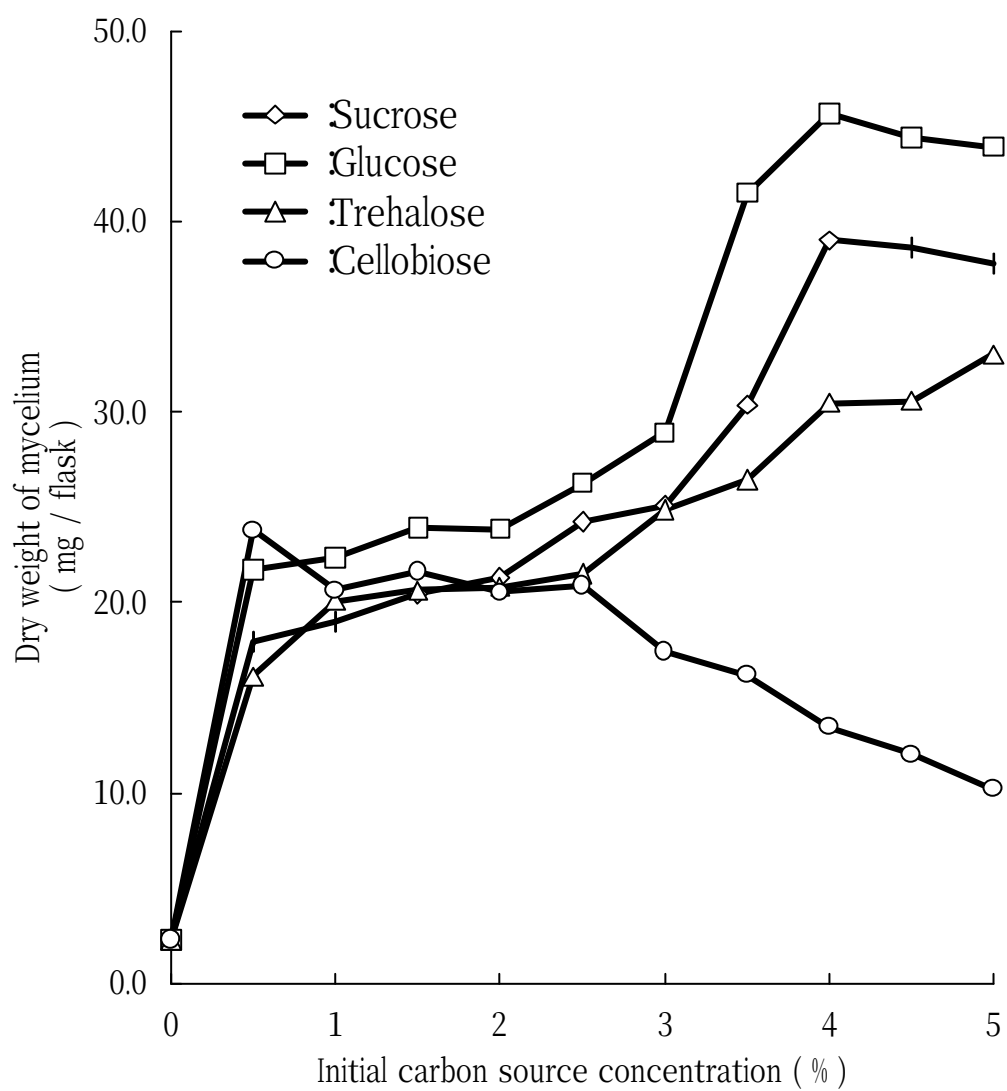
メシマコブ菌糸体生育における炭素源の効果



A, carbon-free; B, xylose; C, ribose; D, glucose; E, galactose;
F, arabinose; G, mannose; H, sucrose; I, maltose; J, cellobiose;
K, trehalose; L, lactose; M, raffinose.

図 2-6

メシマコブ菌糸体育成における炭素源濃度の効果



セロビオースは他の炭素源と異なり、添加濃度 0.5 % 菌糸体乾燥重量が最大となり、それより高い濃度では減少傾向を示した。これはヒメマツタケの菌糸体培養で炭素源として用いたリボースやアラビノースの濃度を高くすると菌糸体育成量が低くなった現象¹⁷⁾と類似した。

2-3-4 菌糸体成長に及ぼす窒素源の影響

メシマコブの菌糸体成長に最適な窒素源を検索した結果を図 2-7 に示す。

各窒素源は N 量として 0.05 % となるように培地に添加した。窒素源無添加では菌糸体の成長はほとんど認められなかった。しかし、無機態窒素および有機態窒素を添加した 8 試験区の全てにおいて、窒素源無添加区を上回る菌糸体乾燥重量が得られた。無機態窒素と有機態窒素に二分割して検定を行った結果、有機態窒素がメシマコブの菌糸体成長に有効であると認められた。

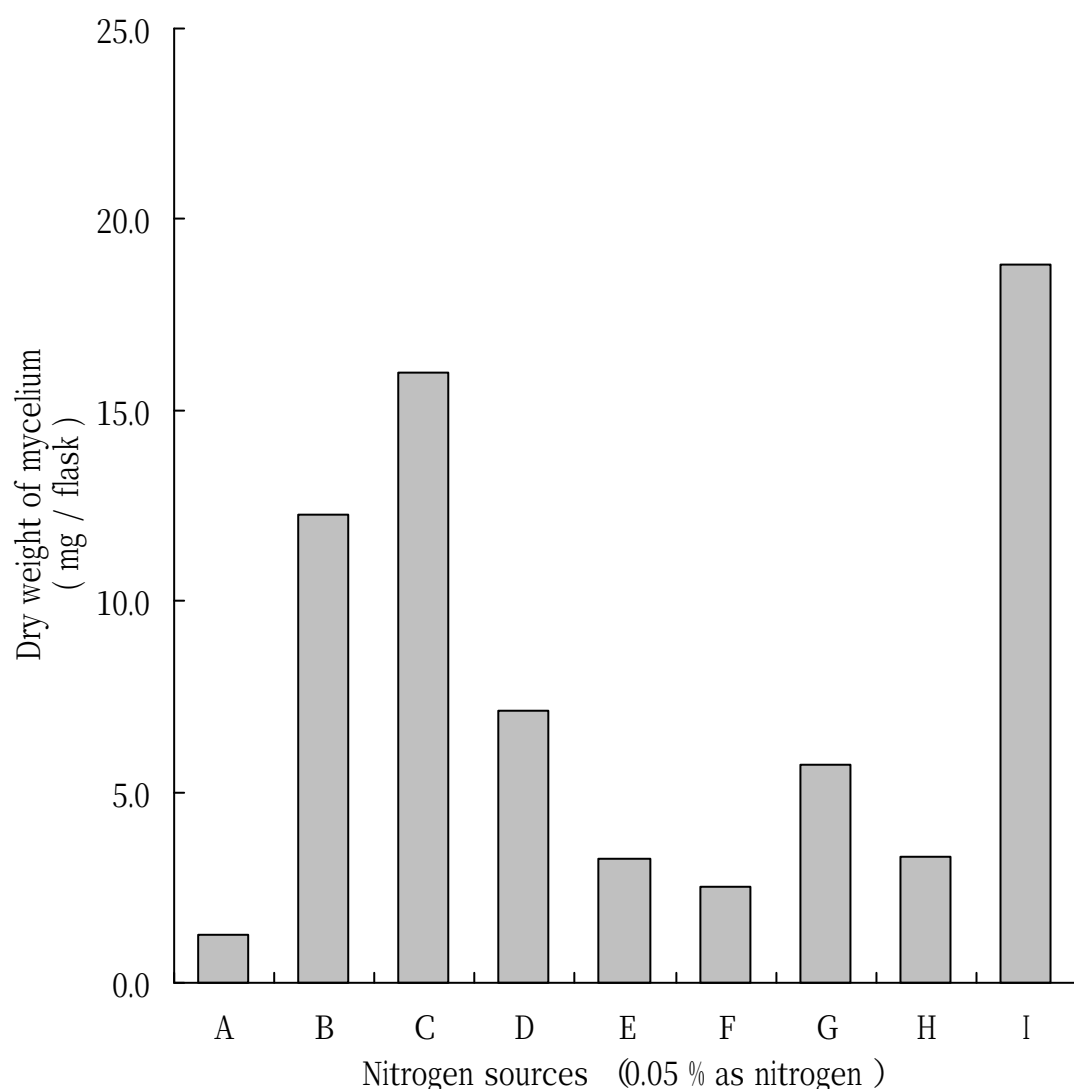
有機態窒素の中では、ビタミン B を豊富に含んだ酵母エキスおよびアミノ酸とオリゴペプチドを主成分とするポリペプトンを用いると菌糸体成長は良好であり、酵母エキスとポリペプトンを併用すると菌糸体成長は一層良好であった。

このような効果は、マイタケ、ホンシメジ、シャカシメジ、およびアラギキクラゲでもすでに認められている。

茎態窒素源として使用したアンモニア態窒素と硝酸態窒素の効果を比較すると、メシマコブの菌糸体成長にとってアンモニア態窒素が有意差を持って有効であった。なお、無機態窒素源の中では硝酸アンモニウムを用いると菌糸体成長が最も良好であった。

図 2-7

メシマコブ菌糸体生育における窒素源の効果



A, nitrogen-free; B, polypeptone; C, yeast extract; D, casamino acid;
 E, ammonium tartrate; F, KNO_3 ; G, NH_4NO_3 ; H, NH_4Cl ;
 I, yeast extract+polypeptone.

2-3-5 菌糸体成長に及ぼす通気液体培養の効果

メシマコブ、シイタケおよびヒメマツタケの菌糸体を通気液体培養したときの効果を図 2-8 に示す。

メシマコブの通気液体培養 15 日間の菌糸体乾燥重量は培地 50 ml に換算した場合には 91.3 mg (図 2-8) であり、静置培養で得た 19.0 mg (図 2-5) に比べて 4.8 倍であった。

3 種の担子菌の通気液体培養における菌糸体成長を比較すると、メシマコブは誘導期が 7 日間で最も長く、シイタケは 5 日間、ヒメマツタケは 4 日間であった。しかし、メシマコブの菌糸体乾燥重量は培養 18 日目でシイタケとヒメマツタケの 1.7-1.8 倍であった。

なお、図 2-8 に示したヒメマツタケ菌糸体成長の経日変化は、米山ら¹⁷⁾の報告と類似している。以上のことから、メシマコブの液体培養では通気による効果が大きく、菌糸体を大量に獲得する方法としては通気液体培養法は適すると考えられる。

スクロース、トレハロースおよびグルコースを炭素源とし、それぞれ初発濃度を 4.0 % にして通気液体培養試験をした結果を図 2-9 に示す。培養 18 日目の菌糸体乾燥重量が最も高くなった炭素源はグルコースであった。スクロースを炭素源とした培養では、全培養期間にわたってグルコースの場合より低い菌糸体成長曲線を示し、終了時の菌糸体乾燥重量はグルコースのその 0.77 倍であった。ヒメマツタケの通気液体培養¹⁷⁾では、菌糸体成長に有効な炭素源を検索した実験の結果が報告されているが、有効な炭素源を用いると菌糸体重量の増大は認められるものの、誘導期短縮は認められていない。これに対して、メシマコブではグルコースを炭素源にするとスクロースの場合に比べて菌糸体乾燥重量が増大するとともに、誘導期間が短縮された。

本研究では、メシマコブ菌糸体の液体培養法の開発を目指して培養条件を検討し、通気液体培養法でグルコースを炭素源とし、添加濃度を 4.0 % に高めることで、18 日間で 7.8 g/L の菌糸体乾燥重量を獲得できた。

図 2-8

通気培養を用いた3種の担子菌における生育曲線

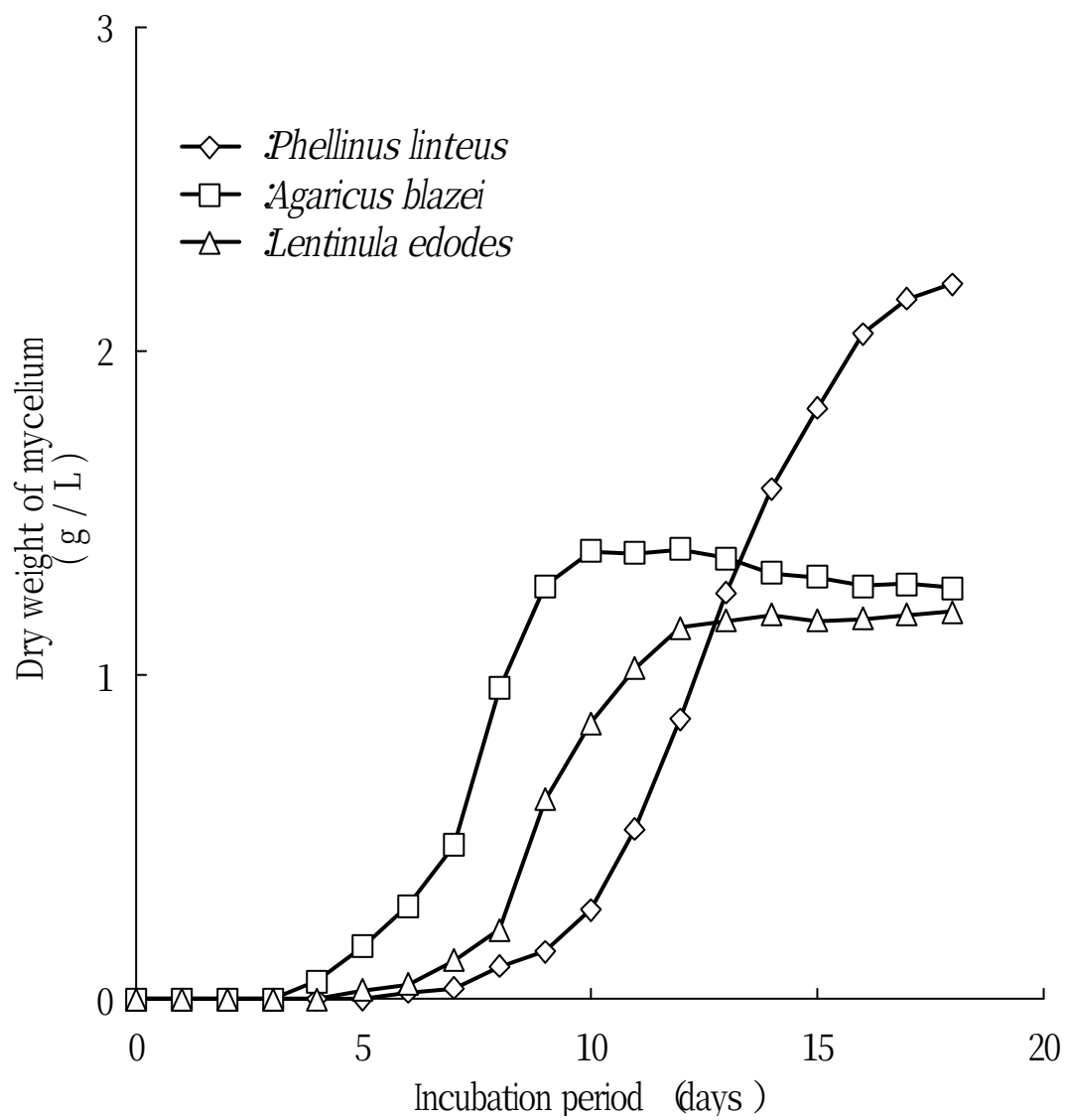
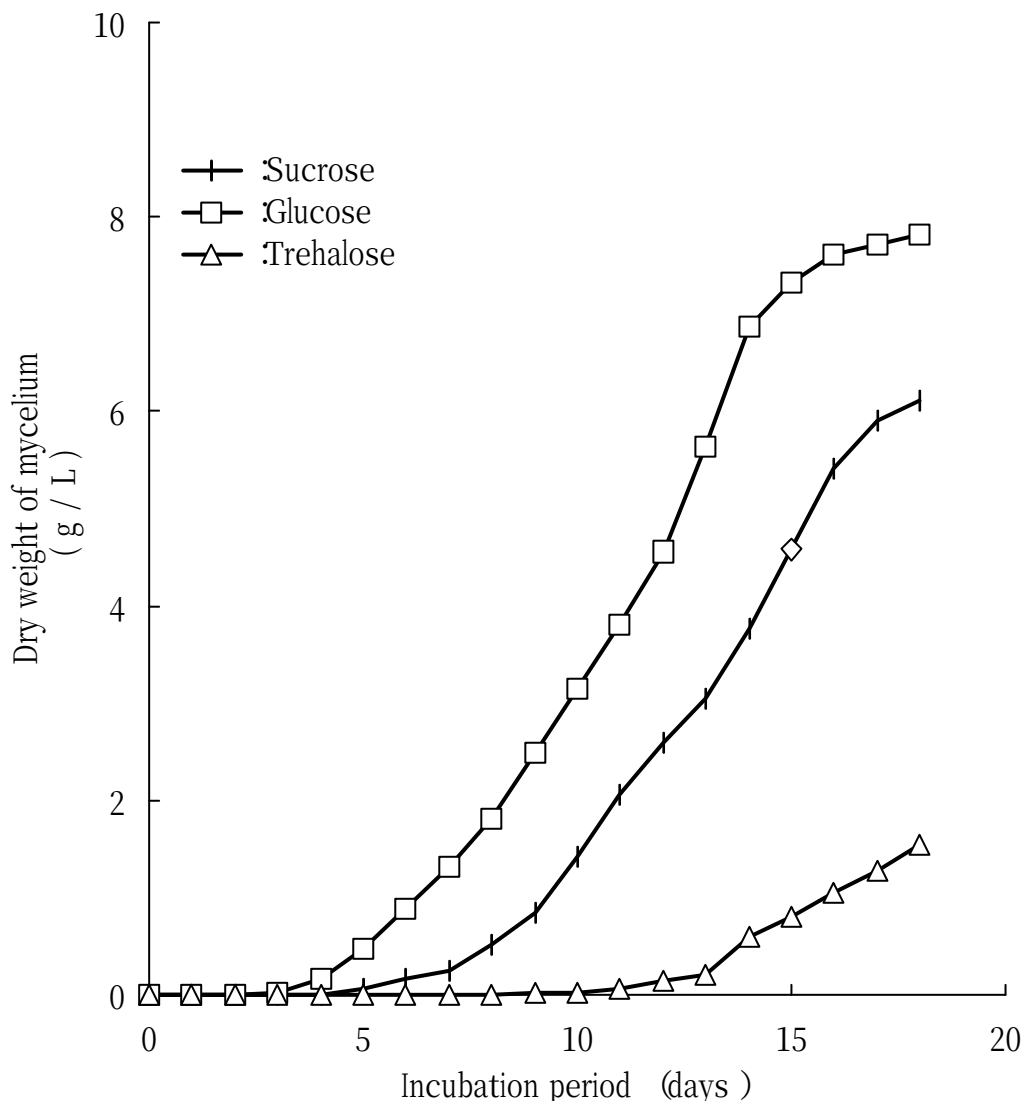


図 2-9

メシマコブ菌糸体生育における3種の炭素源の生育曲線



第3章 メシマコブ菌糸体由来成分の抗酸化実験

3-1 緒言

我々は、生命維持に必要なエネルギーを細胞内のミトコンドリアにおいて酸素の酸化還元反応を利用し、食物から産出している。食物を摂取した量に比例して酸素が消費されるが、その3～10%が生体毒性の高い活性酸素・フリーラジカルに変換されると考えられている。

したがって、生体代謝のさまざまな過程で発生する活性酸素・フリーラジカルを確実に消去無毒化することが生命維持に不可欠となっている。このため生体内部には、活性酸素・フリーラジカルの毒性を消去するための防御機能が広く分布し恒常性の維持をはかっている¹⁾。

しかし近年の社会環境は生体内に過剰に活性酸素・フリーラジカルを生成しやすい要因が増えており、体内の防御機能を上回る危険性を日常的にはらんだ環境となっているため²⁾、活性酸素・フリーラジカルを体内において抑制する機能を持つ物質の調査、研究が待たれている。

本実験の目的として、活性酸素・フリーラジカルを消去抑制する抗酸化物質の調査を上げた。実験に先立ち活性酸素・フリーラジカルの性質について明らかにすると共に、実験の有用性を述べる事とする。

研究対象となる、酸素($^3\text{O}_2$)は固体、液体、気体全ての状態で常磁性(磁石のような性質)を示す。この性質は酸素が2個の不対電子を持っているために現れる性質である。水や窒素のような物質は、2個の電子が対の形をとることで安定な分子を形成しているが、酸素、一酸化窒素、二酸化窒素などは、対の形をとっていない不対電子を持っている。このような不対電子を一つ以上もつ分子種をフリーラジカル分子と呼ぶ。中でも2個の不対電子をもつ分子は酸素のみである。また、酸素($^3\text{O}_2$)は物理的、化学的なエネルギーを加えられる事により、より活性の高い化合物に変化する性質を持ち、変化した状態の総称を活性酸素と呼ぶ。

活性酸素種は酸素 ($^3\text{O}_2$) の他に、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\cdot -}$: 通称スーパーオキシド)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル ($\text{HO}^{\cdot}$) の 4 種類がある。これらのうちスーパーオキシドとヒドロキシルラジカルはフリーラジカルであり、過酸化水素と一重項酸素は不対電子を持たないためフリーラジカルではない。おもな活性酸素・フリーラジカルと緑類物質の区分を図 3-1 に示した。

フリーラジカルは不安定で反応しやすい性質をもっている。とくにスーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot -}$) は、大気中にある酸素 ($^3\text{O}_2$) の酸化あるいは還元によって生成する活性酸素種のフリーラジカルであり、酸素分子に 1 個余分に電子が付いたもので、微弱な電氣的エネルギーでも容易に生成し、生体内では過酸化水素 (H_2O_2) と素早く反応して、強力な酸化作用をもつ反応性の高いラジカルであるヒドロキシルラジカル ($\text{HO}^{\cdot}$) を生成させる。ヒドロキシルラジカルはアミノ酸、脂質、金属イオンなどの生体に関わりの深い分子と反応しやすい物質であり、細胞膜を構成している脂質とは比較的容易に反応し、脂質を毒性の高い過酸化脂質³⁻⁴⁾に変化させ、連鎖的に次々と反応をひき起こさせるため、DNA の切断や細胞死を招く引き金となると考えられている⁵⁾。

この脂質過酸化反応の機構を図 3-2 に示した。

日常生活の中において食べ物として体内に入る化学物質は、直接、間接的に遺伝子 DNA を傷つけ、細胞の質的な異常をひきおこし、そこに活性酸素・フリーラジカルが発生することでさらに損傷が進行し、修復が不可能となった DNA により細胞のガン化が発生する。他にも脳虚血、肝障害、糖尿病の合併症、老化に至るまで、活性酸素・フリーラジカルがさまざまな疾病に関与している⁶⁻⁷⁾。また、生体を防御するための免疫の過剰反応や誤動作によっても発生し、アレルギー反応である花粉症、アトピー性皮膚炎などの炎症にも関与していると言われている。このため生体内にはこれらの活性酸素・フリーラジカルの防御系をつかさどる複数の酵素が生体内に存在し恒常性の維持をはかっている⁸⁾ (図 3-3) (図 3-4)。

図 3-1

おもな活性酸素・フリーラジカルとその縁類物質

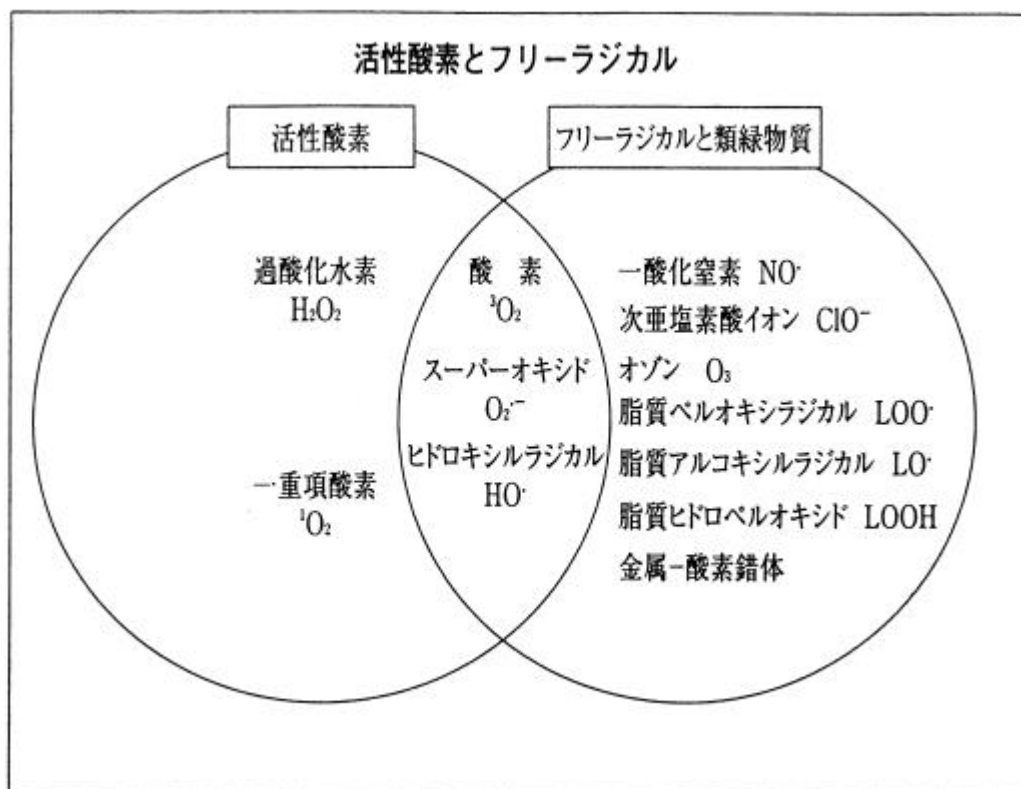


図 3-2 脂質過酸化反応の機構

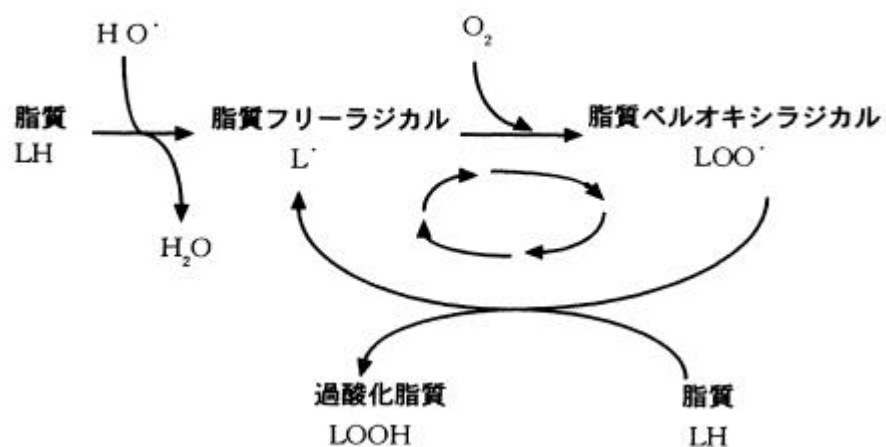


図 3-3

生体抗酸化防御系の種類, 分布と特色

防御系消去酵素	
スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)	全組織の細胞
Cu/Zn 型	細胞質, 赤血球内 (2,300 U/g・Hb)
Mn 型	ミトコンドリア内
細胞外 SOD	血管内皮細胞膜表面と血漿 (活性は低い)
カタラーゼ	ペルオキシソーム, 赤血球内 (153,000 U/g・Hb)
グルタチオンペルオキシダーゼ (Se 結合型が主)	細胞質 (75 %), ミトコンドリア (25 %) 赤血球内 (31 U/g・Hb)
グルタチオンレダクターゼ	NADPH でグルタチオンを還元型に維持する
結合蛋白質	
アルブミン (メルカプトアルブミンとノンメルカプトアルブミン)	血中濃度は 0.5 mM で, 主要な“SH 物質”, ビルリビン複合体は抗酸化作用を示す
セルロプラスミン	フェロキシダーゼ活性を介して防御作用を示す, 15~60 mg/dl 血漿 (1~4 μ M)
トランスフェリン	血中で遊離鉄イオンの存在を阻止する, 200~400 mg/dl 血漿 (25~50 μ M)
フェリチン	肝臓, 脾臓の細胞質中で遊離鉄イオン濃度を下げる
低分子抗酸化物質	
グルタチオン* (GSH)	細胞内外の親水性区画における主要抗酸化物 細胞内 = 2~10 mM; 動脈血漿 5 μ M (10~25 μ M)
他のチオール化合物	システインなどの抗酸化物質, GSH より低濃度
ビタミン C	親水性区画の還元物質, ビタミン E と共同作業, 0.7~2.5 mg/dl 血漿 (40~140 μ M)
ビタミン E	細胞膜脂溶性区画のスカベンジャー, LDL にも結合 0.5~1.6 mg/dl 血漿 (10~40 μ M)
尿酸	アデニンやヒポキサンチンの最終代謝産物, 強い抗酸化作用 (キサンチンオキシダーゼの代謝産物!), 2.6~7.5 mg/dl 血漿 (0.12~0.45 mM)
ビルリビン	アルブミンに結合して抗酸化作用を示す (正常で 20 μ M)
その他 (リポ酸, PQQ など)	

* グルタチオンの値は日内変動や食事性変動を示すが, 表に示した値は測定時間, 年齢, その他の実験条件が少しづつ異なるデータを含む (カッコ内はラットにおける値)。

図 3-4

ヒト組織における活性酸素消去酵素の分布様相

組織	酵素活性 (U/mg 蛋白質)				
	SOD	カタラーゼ	GSH-POase(Se)	GSH (μ M/g 湿重量)	
	ヒト (ラット [U/g])	ヒト*	ヒト* (ラット)	ヒト	(ラット)
脳灰白質	4 (3) [260]	3/11	66/71 (全体で 33)	—	(全体で 1.7)
脳白質	—	20	76	—	—
肺	0.5 (3) [200]	180/210	54/54 (171)	—	(2~3)
心	2 (9) [420]	54	69 (225)	—	(1~2)
胃粘膜	1 (7) [140]	—	—	—	(2~5)
小腸	— (3) [120]	—	— (30)	—	(3)
肝臓	5 (22) [4,500]	1,300/1,400	120/190 (270)	4~6	(5~7)
腎臓	2 (13) [1,340]	110/430	19/140 (146)	—	(3)
副腎	— (20) [1,560]	300	120 (278)	—	(5~8)
膵臓	0.4 (2) [300]	100/120	43/110	—	(2)
脾臓	— (5) [440]	56	50 (270)	—	(4~5)
赤血球	0.5 (3) [790]	—	—	2~3	(2)
骨格筋	—	25/36	22/38	—	(1)
脂肪組織	— (11)	270/560	77/89 (53)	—	(2)
レンズ	—	—	—	4.6	(6~10)

* ヒトのカタラーゼと GSH-ペルオキシダーゼ (GSH-POase) 活性は 2 名の健常者組織における値を示す。
(U/mg 蛋白質) および [U/g 組織] 内はラットの値を示す。グルタチオンの値は日内変動や食事変動を示すが、表に示した値は測定時間、年齢、その他の実験条件が少しずつ異なるデータを含む。

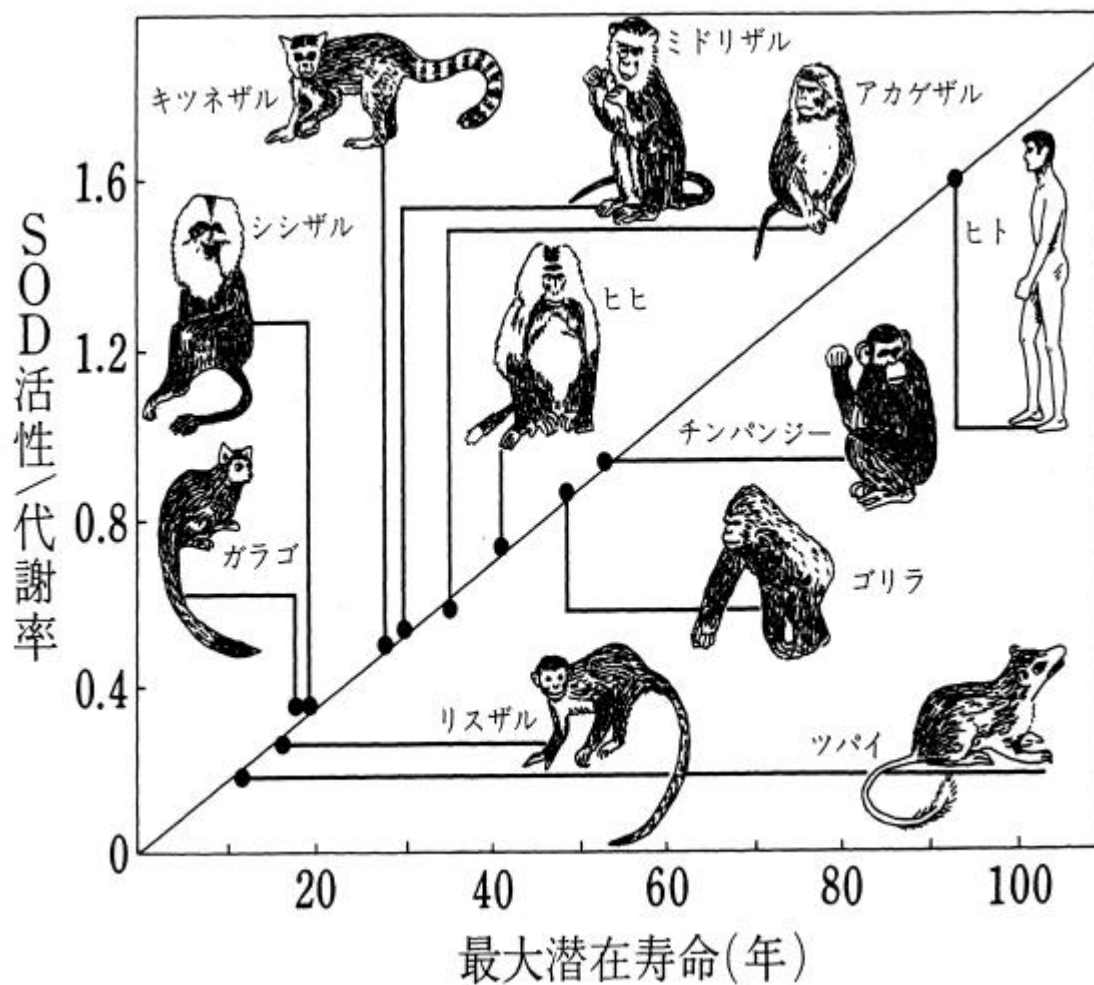
中でもスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）は体内の全組織細胞に最も多く存在し、スーパーオキシドだけに作用して酸素や過酸化水素に還元している酵素である⁹⁾。過剰なスーパーオキシドの消去は、より酸化力の強いヒドロキシルラジカルの発生抑制にも有効であり、最も基本的な防御系酵素である。特にさまざまな哺乳類の潜在寿命に対して行われた研究として、Cutlerの研究¹⁰⁾をあげることができる。これによると哺乳類の体内のSOD活性と代謝率（酸素消費量）の比を調査した結果、全ての動物の潜在寿命と正の相関性が得られると報告されている（図3-5）。

この実験により、SODが多くの疾病の予防や老化の進行抑制に重要な働きをしていることが理解できる。今日、活性酸素・フリーラジカルがきわめて広範な疾患に関与することから、病態の改善に抗酸化物質が重要であることは疑う余地がない¹¹⁻¹²⁾。

メシマコブは、古来より漢方の文献などで慢性病の改善に著効があるとされ¹³⁾、生薬として用いられてきた。また国内の研究においても、最も高い抗腫瘍効果¹⁴⁾が報告されていることから、何らかの有用な生理活性物質を含有していることが窺えるが、科学的な調査による根拠は明確にされていない。これらの効能に関与する生理活性物質の科学的な解明と、多くの疾病の予防や治療に応用できる物質の調査研究は、現代社会において優先順位の高い要求である。特に抗酸化物質は生命維持のための必須要素であることから、大量培養したメシマコブ菌糸体に、体内のSODと同様の機能を発揮する抗酸化物質の存在を期待し、以下の抗酸化実験を行ったものである。

図 3-5

組織のSOD活性と代謝率と最大潜在寿命



多くの霊長類の最大潜在寿命は組織のSOD活性と酸素消費度の比に比例する。これは霊長類以外の種にも当てはまる。
すなわち、酸素とスーパーオキシドラジカルが種の最大潜在寿命を決定する主要因であることを示唆する。

3-2 実験方法

3-2-1 供試試料

実験に用いたメシマコブ(*Phellinus linteus*)は、株式会社アイ・ビー・アイが保有する PL-No.08 株を用いて、前 2 章で得た最適培養条件下で通気液体培養を行った。培養温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、培養期間 40 日間の培養により得た菌糸体を供試試料原料とした。

3-2-2 試薬

測定に用いた試薬、ヒポキサンチンはシグマ社製、キサンチンオキシダーゼ (XOD) は、ベリンガー・インゲルハイム社製、5,5-ジメチル-1-ピロリン N-オキシド (DMPO) は、第一化学薬品製、HPLC 用蒸留水は、和光純薬製を使用した。その他の試験試薬は、和光純薬製の精密機器分析用または特級を用いた。

3-2-3 供試試料の作製

本実験は、最終的には活性成分の単離、分子構造の解明を行う前段階の試験となるため、事前に活性成分の分布調査を兼ね、試料原料をクロロホルム、酢酸エチル、水、に溶解するそれぞれの成分と熱水で抽出される 4 つの特徴的な成分に分画して実験に用いた。

分画方法は、試料原料の 10 倍量の 99% アルコール (EtOH) を加え、24 時間の室温抽出を 2 回繰り返し、遠心分離により上澄みと沈殿に分けた。上澄み液は、同量のクロロホルム (CHCl_3) を加え攪拌の後に分液ロートを用いてクロロホルム画分 (試料 1) と水画分に分けた。水画分には同量の酢酸エチル (EtOAc) を加え、攪拌の後に分液ロートにより酢酸エチル画分 (試料 2) と水画分 (試料 3) に分けた。

なお、遠心分離した沈殿物は、10倍量の蒸留水を用いて、100℃で12時間熱水抽出し、遠心分離により上澄み液を得て熱水抽出画分（試料4）とした。

これら（試料1～4）は、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮した後、デシケーターを用いて真空乾燥し、実験に用いる供試試料①～④とした。（図3-6）

99%EtOH(エタノール)抽出より得られた供試試料

①CHCl₃（クロロホルム）画分

②EtOAc（酢酸エチル）画分

③水画分

④熱水抽出画分

3-2-4 フリーラジカル消去活性の測定¹⁵⁻¹⁶⁾

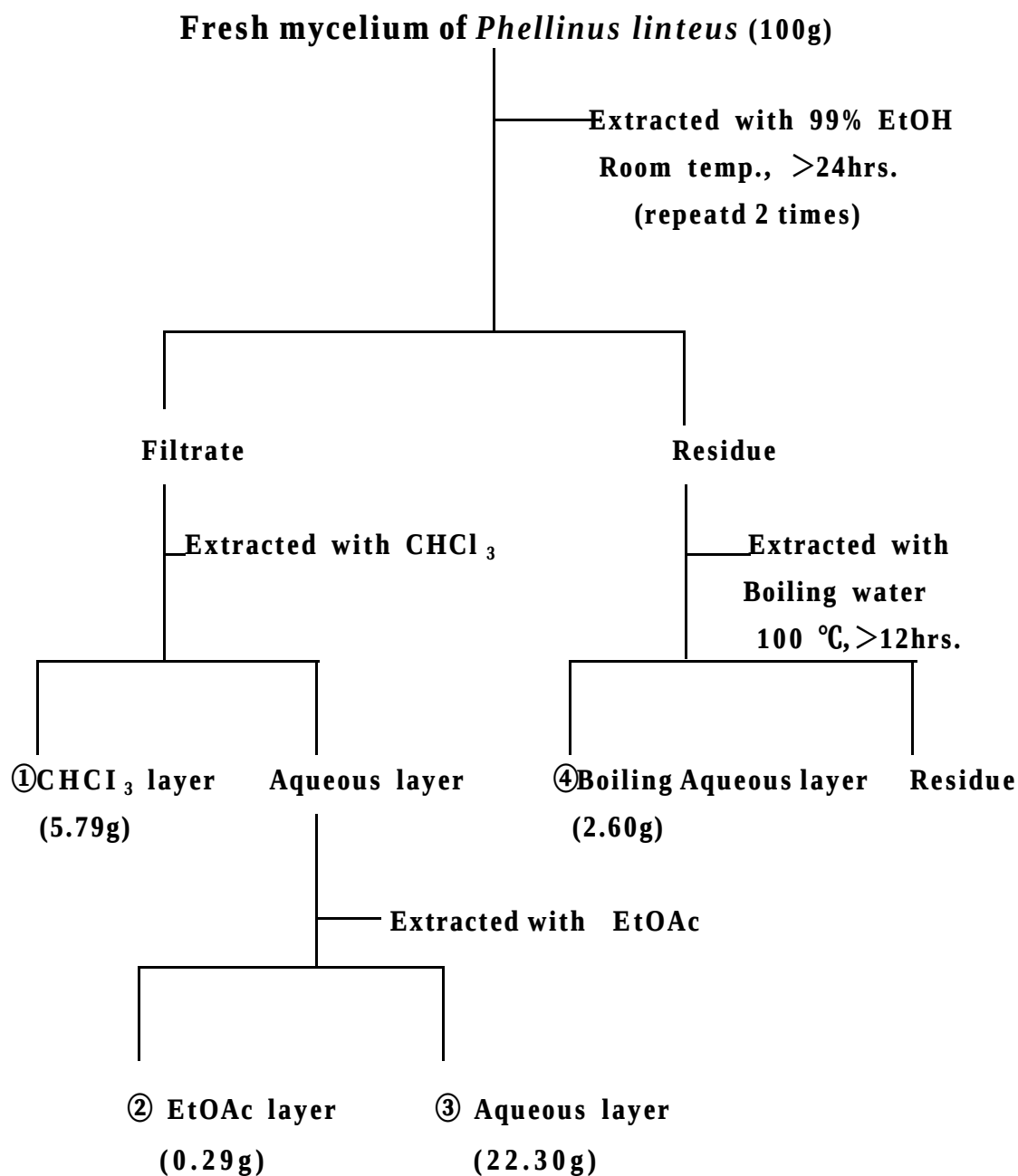
測定機器は、日本電子社製 電子スピン共鳴（electron spin resonance：ESR）装置（JEOL JES-FASERIES）を用い、室温（20℃）下で、表3-7に示す条件下で行った。

本実験で測定したスーパーオキシドは、室温で短寿命の不安定なラジカルである。そのため、これらのラジカルに反応性の高い試薬（スピントラップ剤）である

5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO)を付加させて捕捉をし、比較的安定なスピンアダクト（ラジカルアダクト）に変換して、ラジカルを測定する方法（スピントラップ法）を用いた。

ラジカル量の変化は、内部標準物質として、酸化マンガン（Mn²⁺）を使用して、Mn²⁺の信号強度とラジカルの信号強度との比から求めた（実際のDMPO-OHのESRスペクトルを図3-8に示した）。以下に、スーパーオキシドの測定方法を示す。

図 3-6 試料原料の分画



99% EtOH抽出で得られた供試試料

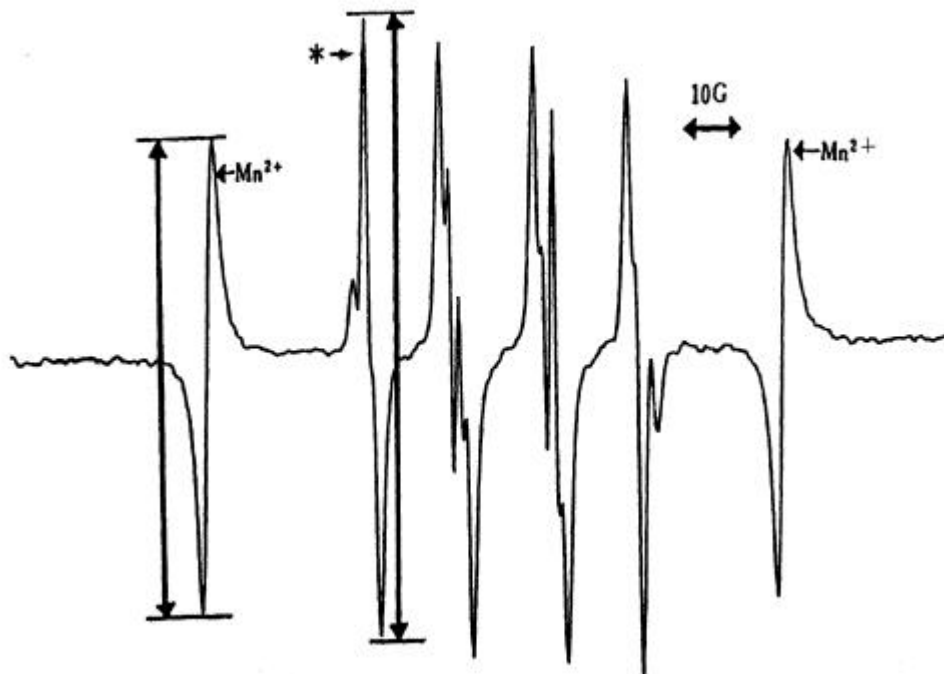
①CHCl ₃ (クロロホルム) 画分	5.79 g
②EtOAc (酢酸エチル) 画分	0.20 g
③水画分	22.30 g
④熱水抽出画分	2.60 g

表 3-7 ESR装置の測定条件

設 定 値	スーパーオキシド消去活性
磁 場 (G)	3360±50
出 力 (mW)	8.0
変 調 (kHz)	100
変調振幅 (G)	0.8
掃引時間 (min)	2.0
応答時間 (sec)	0.3
測定温度 (°C)	20.0

図 3-8

DMPO-O₂HスペクトルのESRスペクトル



DMPO-O₂Hスペクトルの第1シグナル(*)の高さを測ってスーパーオキシドのアダクト量とした。

スーパーオキシド消去活性試験は、試験管に 2 mM ヒポキサンチンを 50 μ l、5.5mM diethylenetriamine pentaacetic acid(DETAPAC)を 50 μ l、試料 50 μ l (dimethyl sulfoxide にて調製)、DMPO を 15 μ l、そしてキサンチンオキシダーゼ (XOD) (272unit/ml) を 50 μ l 加えたのち攪拌し、反応液を高感度 ESR 水溶性セルに移し、XOD 添加の 40 秒後より ESR 装置を用いて、スーパーオキシドのスピンアダクト ($\text{DMPO-O}_2^{\cdot-}$) を測定した¹⁷⁾。

得られたスーパーオキシドのスピンアダクト量からスーパーオキシド消去活性値を算出した。

3-3 実験結果

メシマコブ由来の供試試料のスーパーオキシド消去活性を ESR を用いて測定するにあたり、まず内部標準物質 (Mn^{2+}) とスーパーオキシドの標準スペクトルを計測し 図 3-9 に示した。

下記の 4 分画成分の供試試料の抗酸化活性を測定し、実際の ESR スペクトルをスーパーオキシド標準スペクトルとともに 図 3-10 に示した。

- ① CHCl_3 画分
- ② EtOAc 画分
- ③ 水画分
- ④ 熱水抽出画分

内部標準物質、酸化マンガン (Mn^{2+}) の信号強度とスーパーオキシドおよび消去されたスーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot-}$) の信号強度比を求めて、各メシマコブ菌糸体由来成分の抗酸化活性の試験結果表を作成し 図 3-11 に示した。

図 3-9

内部標準物質 (Mn^{2+}) とスーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot-}$) の標準スペクトル

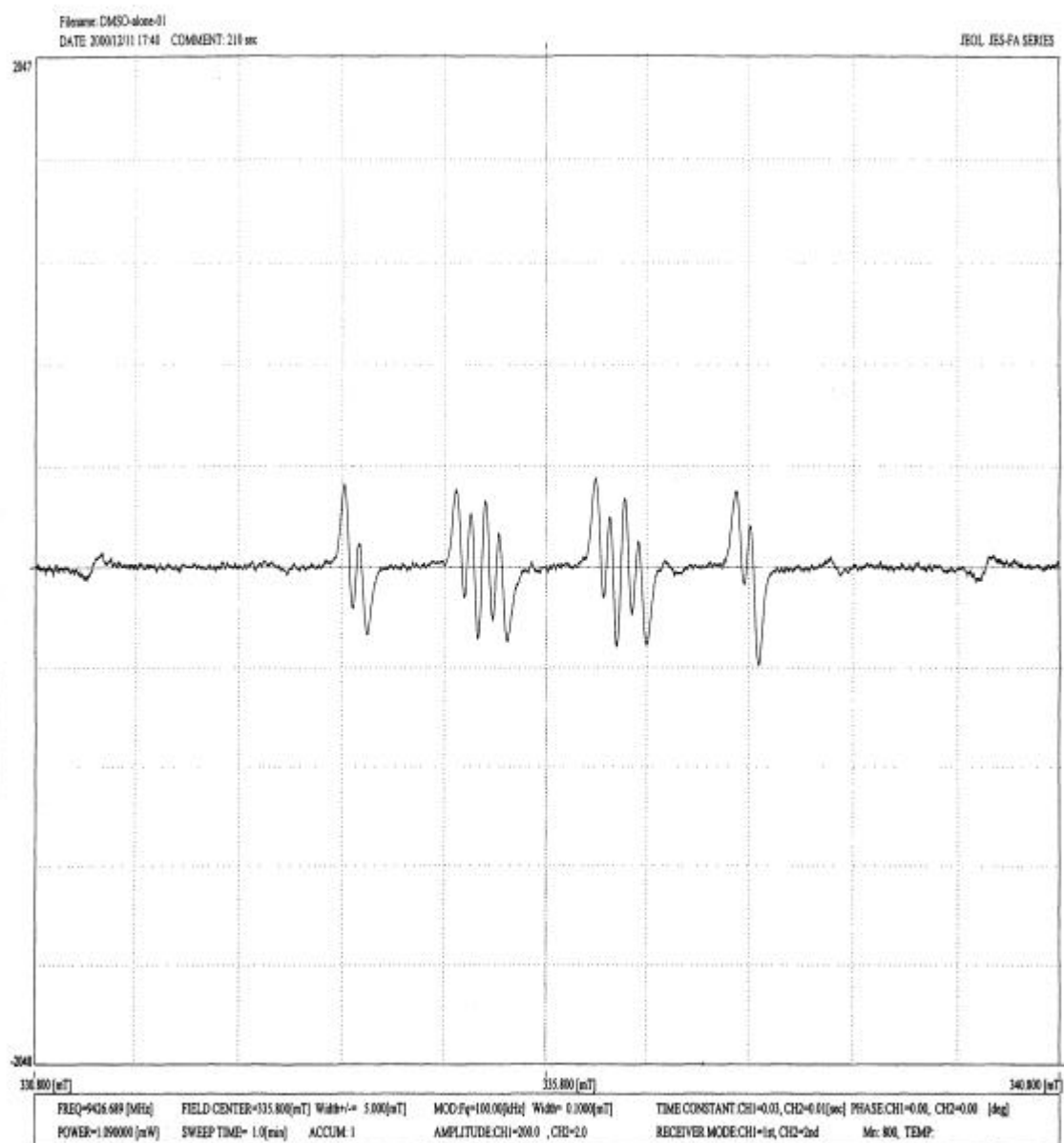


図3-10 計測した供試試料のESRスペクトル

スーパーオキシドの標準スペクトル



①CHCl₃ 画分



②EtOAc 画分



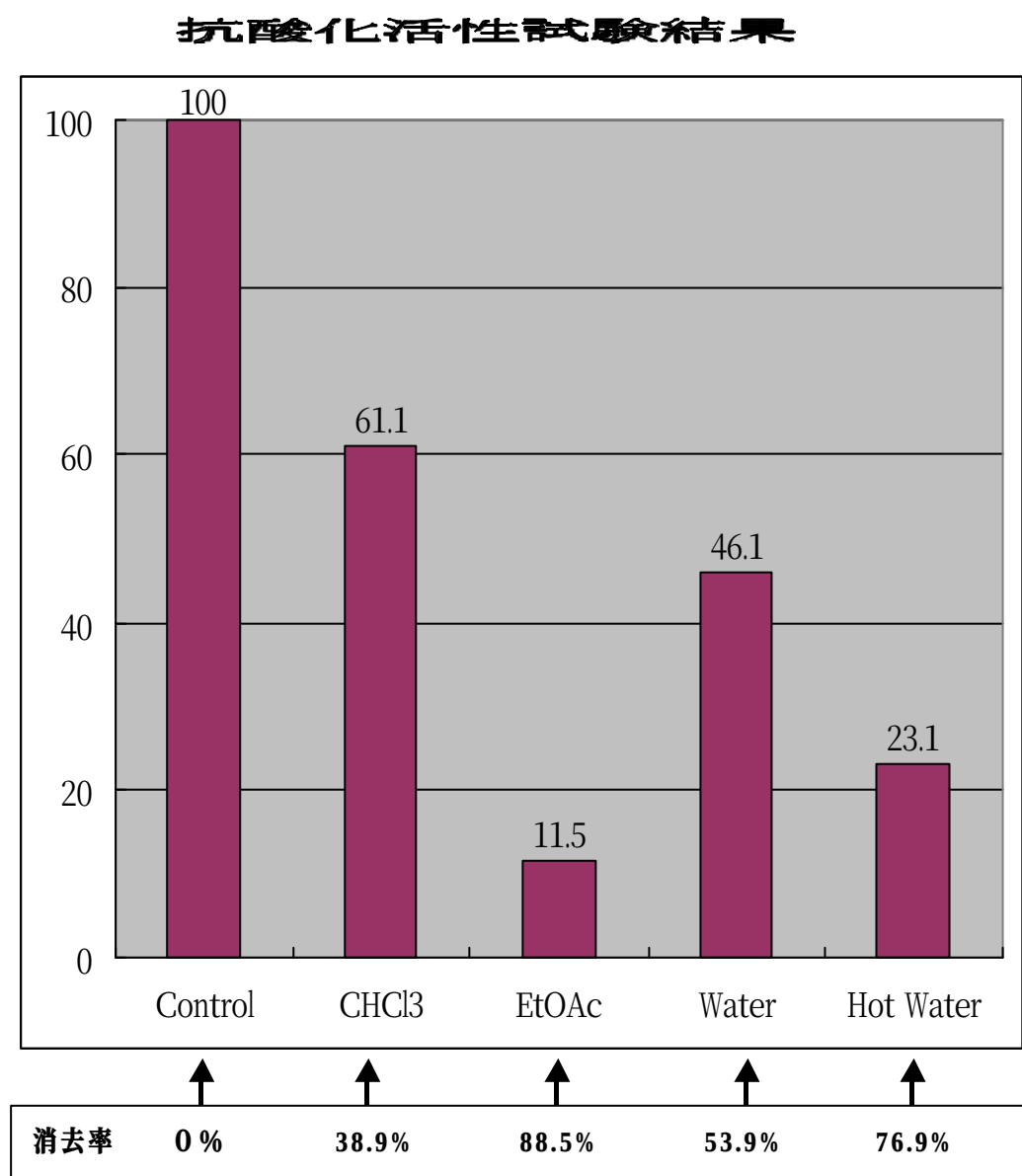
③水面分



④熱水抽出画分



圖 3-11



第4章 メシマコブ菌糸体由来成分の抗アレルギー実験

4-1 緒言

アトピー性皮膚炎の発症機助はいまだ不明と言わざるを得ず、この事が本症の概念、診断基準、治療などに明確な見解を与える困難な要因となっている¹⁾。厚生省所管の財団法人日本アレルギー協会（Japan Allergy Foundation）によると、わが国に於けるアレルギー性疾患に苦しむ患者は国民の30%を越えると推定され、しかも年々増加傾向にあり、国民生活に及ぼす影響は多大である²⁾。として研究の必要性をうたっている。現在までに判明しているところでは、アレルギーの分類にはI型－IV型がある（図4-1）。一番身近なアレルギーは、アトピー性アレルギー（atopic allergy）と呼ばれるI型アレルギーであり、IgE抗体を介した反応である。アトピー性疾患として、アレルギー性鼻炎、アレルギー性喘息、アレルギー性皮膚炎がある。I型アレルギーを引き起こす原因となる抗原物質をアレルゲンと言い、よく知られるアレルゲンとして花粉症の原因となる花粉がある。特にスギ花粉は、日本人の花粉症の80%がこれによるとされている。他にブタクサ、ヒノキ、シラカバ、イネ科牧草などがある。喘息の要因として知られる、イエダニ、節足動物、微生物のタンパク質。食物アレルゲンとして、小麦、そば粉、卵、牛乳、大豆など多数あり、さらに、ニッケル、クロムなどの重金属や、ディーゼル排気ガスなど、日常生活の中において、さまざまな原因物質が身の回りを取り囲んでいる³⁻⁴⁾。

アレルギー反応は身体の外から入ってきたこれらの抗原が、再び入った場合により強い反応を示す状態で、これらの抗原抗体反応により生じるさまざまな刺激物質が、好中球や好酸球などの食細胞に作用し、活性酸素・フリーラジカルを発生させる。なかでもI型アレルギーは、IgE抗体－抗原の複合体反応により、好酸球が活発に活性酸素・フリーラジカルを発生させる。⁵⁾メシマコブ菌糸体由来成分は抗酸化試験により、同成分にスーパーオキシドを消去する（SOD様）機能が確認されたことから、アレルギー反応に伴う炎症の

図 4-1

アレルギーの分類

型	抗体または細胞	神経系の関与	代表的な反応
即時型			
アレルギー			
I 型	IgE	—	花粉アレルギー、じんま疹
II 型	IgG、IgM	+	血液型不適合による障害
III 型	IgG	+	血清病
遅延型			
アレルギー			
IV 型	エフェクター細胞	—	ツベルクリン反応、接触過敏症
・ I 型 アレルギー：I g E 抗体の抗原との反応による障害 ・ II 型 アレルギー：からだの細胞に特異的な I g G や I g M 抗体による障害 ・ III 型 アレルギー：I g G 抗体の免疫複合体が多量に生成し、強い生物作用による障害 ・ IV 型 アレルギー：エフェクター T 細胞による抗原排除にともなう障害			
このうち、I、II、III型アレルギーが即時型で、IV型アレルギーが遅延型である			

発症を抑制する可能性が考えられる⁶⁻⁷⁾。そこで、高 IgE 血症を伴う皮膚炎症モデルマウス（アトピー性皮膚炎自然発症マウス、NC/Nga mouse）⁸⁻⁹⁾を用いた動物実験による、肉眼的皮膚所見を行うと共に、血中の IgE 総量の経時的測定を行い、メシマコブ菌糸体由来成分の投与、非投与群間における有効性の差異を検討することで、同成分の抗アレルギー作用の有用性について検討した。

4-2 実験方法

4-2-1 実験用被験試料

実験には、メシマコブ菌糸体熱水抽出物と培養濾液の 2 種類を用い、

それぞれ凍結乾燥により、乾燥粉末化し混和試料として用いた。

- ・ Phellinus linteus-hot water extract(PL-No.08, Lot No.PL 904053)
- ・ Phellinus linteus-culture filtrate(PL-No.08, Lot No.PL 904052)

4-2-2 実験動物ならびに実験方法

NC/Nga mouse, clean, CV（雄、4 週齢を日本 S L C より入手）を用いて、1 群 10 匹の系で被験試料投与群および control としての通常滅菌粉末試料のみの投与群で実施した。

（NC/Nga マウスは 5 週齢頃より、血中 IgE が上昇しはじめ、アトピー性皮膚炎を自然発症する実験動物。）

上記実験動物はすべて入荷後 1 週間の予備飼育の後、第 5 週齢より第 16 週齢に至るまでの間を観察期間とした。

被験試料については、人（体重 60 kg）の経口摂取量（一日 3

g)より換算し、マウスの平均体重(30g)より換算し、約1.5mgを一日摂取量とし、また一日の餌接種量(5g)を目安として投与量を決定した。実際には食べこぼし飼料分を考慮し、この2倍量の混和量とし、餌10kgに対し各被験飼料5g混和物として行った。なお、control群は通常の滅菌粉末飼料のみの摂取とした。

- ・マウスの肉眼的皮膚所見は、試料摂取11週間後(16週齢)において観察比較を行った。
- ・血中IgE量の測定については、試料摂取の1週間後(6週齢)、4週後(9週齢)、7週後(12週齢)、11週後(16週齢)の4回にわたり、マウス眼底静脈層より採血を行い、血清中のIgE総量の経時的変化をマウスIgEに対する特異抗体を用いたサンドウィッチライサ法により算出した。

4-3 実験結果

4-3-1 肉眼的皮膚所見の結果

NC/Nga マウスの肉眼的皮膚所見は、11週間後に観察したもので、control群を除くメシマコブ菌糸体熱水抽出物と培養濾液の各試料の混合飼料摂取群において、明らかに皮膚アレルギー症状の発症抑制作用が認められた。しかし、メシマコブ菌糸体熱水抽出物と培養濾液に有効な作用の差異は認められなかった。(図4-2)

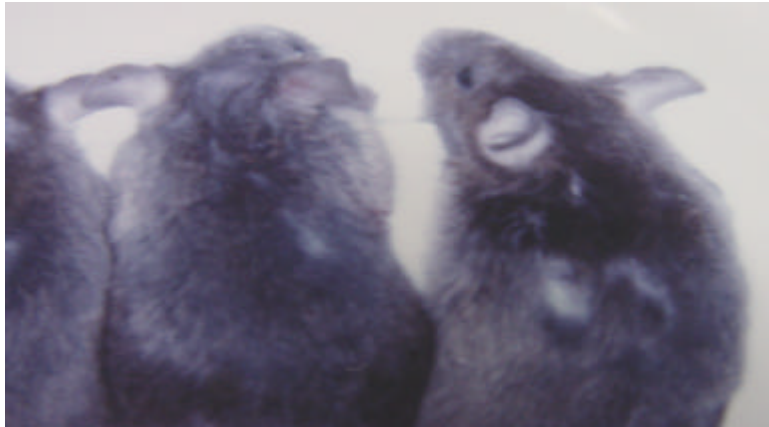
4-3-2 血中IgE量測定の結果

血中IgE総量は、control群を除くメシマコブ菌糸体熱水抽出物と培養濾液の各試料の混合飼料摂取群において優位に血中IgE生産の抑制が認められた。

この傾向は、Phellinus linteus-hot water extract(PL-No.08, Lot No.PL 904053)投与群において特に著明な結果を得た。(図4-3)

図 4-2 11週間後のNC/Nga MOUSE

Control



Hot water extract

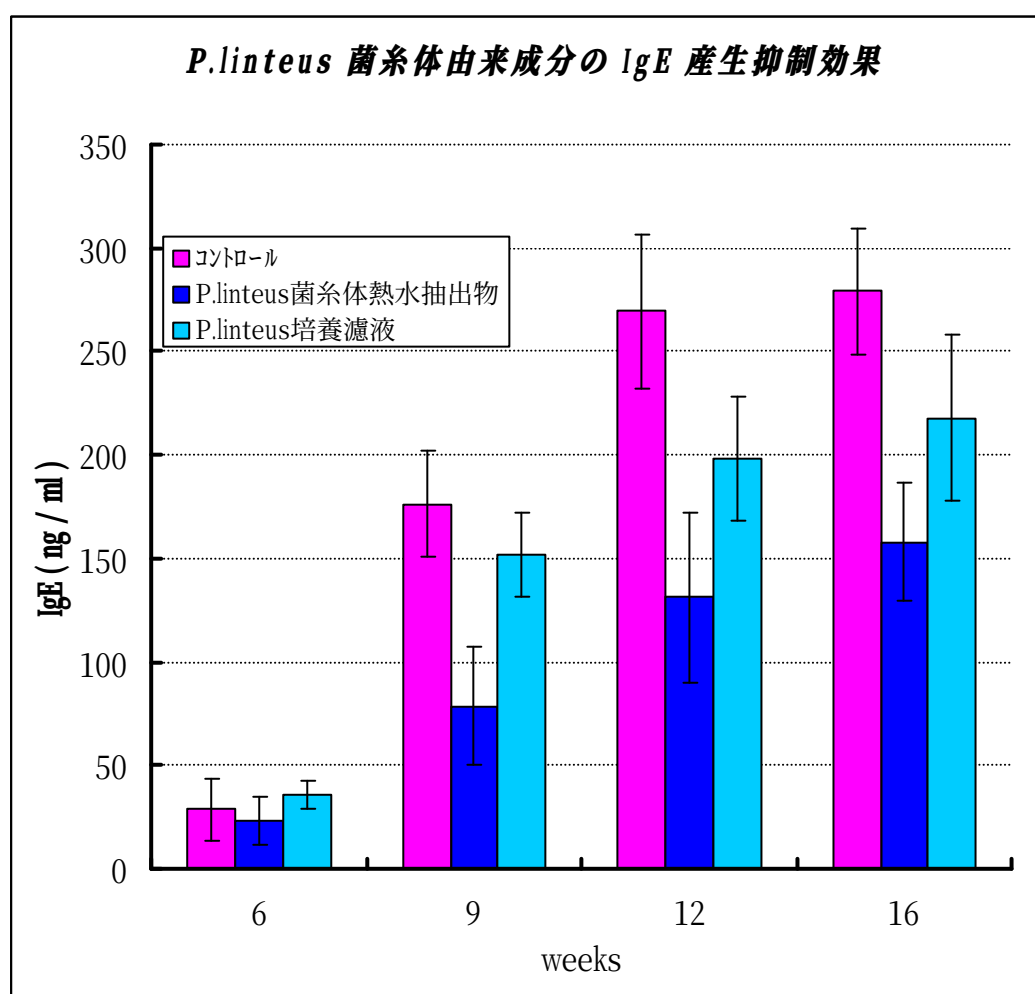


Culture filtrate



図 4-3

血中 IgE 量測定結果



第 5 章 総括

医学的知識や医療技術が進歩した現在においても、多くの疾病の発生機序が解明されないでいるが、近年の研究により、その多くに活性酸素・フリーラジカルが直接あるいは間接的に関与している事が明らかにされはじめた。生体内の活性酸素・フリーラジカルの消去や抑制を行う事により、現代人の生活習慣病を始めとする多くの疾病の予防、もしくは治療に応用できる抗酸化物質の調査研究は社会的要求であると捉え、有用な生理活性物質を生産する可能性の高い、担子菌メシマコブを研究の対象とした。まずメシマコブ菌糸体を安定的に効率よく生産出来る培養方法の確立を目指して一連の実験を行い、国内初の大量タンク液体培養に成功した。

生物の潜在寿命を左右する体内のスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性に着目し、メシマコブ菌糸体由来成分の抗酸化活性試験を行い、メシマコブ菌糸体にスーパーオキシドを消去するSOD様の抗酸化機能がある成分の含有を確認した。

抗酸化機能を有するメシマコブ菌糸体由来成分の生体内における有用性を調査するため、皮膚炎症モデルマウス（NC/Nga）を用いた、抗アレルギー反応実験を行い、メシマコブ菌糸体由来成分がアレルギーの発症を抑制すること、またI型アレルギーの原因となる抗原抗体（IgE）の生産抑制を示唆する実験結果を得た。

以下、これら各実験における結果をもとに、総括的な考察を付け加える。

5-1 メシマコブ菌糸体の培養条件

メシマコブ菌糸体を、大量かつ安定的に培養する目的で、生理学的要因を詳細に検討し、最適培養条件を見出した。メシマコブ菌糸体は、10－35℃で成育し、生育適温は25－32.5℃であった。25℃で初発pHの依存性を調査したところ、3.0－7.0の範囲で生育を示し、最適初発pHは5.5であった。最適炭素源の検索は五

炭糖、六炭糖を含む12の炭水化物を用いて行った。グルコースが菌糸体成長に最も有効で、五炭糖は生育に有効ではなかった。窒素源である酵母エキスとポリペプトンを単独あるいは併用した時に菌糸体成長は非常に良好であった。

通気培養すると誘導期は7日で、通気をしない場合より菌糸体重量が増大した。さらに、グルコースを4.0%添加すると、誘導期が短縮され、菌糸体乾燥重量が7.8 g/Lに達した。

これらの実験結果より、メシマコブ菌糸体の液体培養を行うためには下記の最適条件がえられた。

培養温度：30℃、培養初発：pH 5.5、炭素源：グルコース(4.0%)、窒素源：酵母エキス、ポリペプトンを併用(N量,0.05%)、通気培養にて誘導期短縮をはかることが出来る。

5-2 メシマコブ菌糸体由来成分の抗酸化実験

メシマコブは、漢方の文献によると、慢性病に著効があるとされる。また国内実験においても最も高い抗腫瘍活性が報告されていることから、何らかの生理活性物質の含有が予測された。中でも重要とされる活性酸素・フリーラジカルを抑制する抗酸化物質の存在を期待し、電子スピン共鳴(electron spin resonance:ESR)装置(日本電子社製JES-FA SERIES)を用いてスーパーオキシド消去活性実験を行った結果、分画したメシマコブの4成分に抗酸化活性を認めた。スーパーオキシド消去率は、クロロホルム画分=38.9%、酢酸エチル画分=88.5%、水画分=53.9%、熱水抽出画分=76.9%であり、特に酢酸エチルに溶解する成分と、熱水抽出によって得られた成分は顕著な抗酸化活性(SOD様)を示した。

5-3 メシマコブ菌糸体由来成分の抗アレルギー実験

アレルギーは、発症を引き起こす抗体により I 型～IV 型の 4 種類に区分されている。中でも I 型は IgE 抗体と抗原の反応によって発症するアレルギー反応であり、アレルギー性鼻炎、アレルギー性喘息、アレルギー性皮膚炎など、一番身近なアレルギー症状に関与していることが判明している。しかし、アレルギー性皮膚炎の発症機序についてはいまだ解明しておらず、決定的な治療方法は確立されていない。しかし近年の研究により皮膚炎の炎症局部では、活性酸素・フリーラジカルが関与していることが判明している。

メシマコブ菌糸体由来成分にスーパーオキシドを消去する機能があることから、遺伝的にアトピーを発症する皮膚炎症モデルマウス（NC/Nga）を用いた動物実験をおこなった。

皮膚炎症モデルマウスは、誕生後 5 週齢頃から血中 IgE 量が増加をはじめ、同時にアトピー性皮膚炎が進行する実験動物であることから、5 週齢より 16 週齢に至るまでの期間を観察し、肉眼的皮膚所見を得た。また各週齢ごとに血中 IgE 量を測定した。

肉眼的皮膚所見においては、メシマコブ菌糸体熱水抽出物と培養濾液の被験試料の混合飼料摂取群に、アレルギーによる皮膚炎症の発症抑制が認められた。これにより、被験飼料に含有する抗酸化物質が関与し、血中 IgE 量の上昇にともなうマウス体内の過剰なスーパーオキシドが消去されたことにより、皮膚炎症の発症を抑制した可能性が示唆された。

また、血中 IgE 量はコントロール群を含むすべてのマウス群において、個体の発育とともに上昇が認められたが、コントロール群に比べ被験試料の混合飼料摂取群に優位な血中 IgE 生産抑制効果が認められたことから、I 型アレルギー発症を優位に抑制する可能性が示唆された。

アレルギー反応によるアトピー性皮膚炎の発生機序が明らかにされていない現在、血中 IgE 生産抑制と抗酸化物質の関連を示唆する報告はなく、メシマコブ菌糸体由来成分がなぜ血中 IgE 生産抑制に

働いたかは不明である。また、肉眼的皮膚所見において皮膚炎症の発症抑制が、抗酸化物質の直接関与によるものであるか、血中 IgE 生産抑制による効果、あるいは双方の相乗効果によるものであるのか本実験のみでは判断を下す事が出来なかった。

5-4 まとめ

本実験を開始するにあたり目的とした3つの課題において、第1に掲げたメシマコブ菌糸体培養方法の確立は、最適培養条件の必要項目において満足の出来る結果を得ることができた。一連の実験により得られた条件を用いて、安定的に高品質のメシマコブ菌糸体を大量に液体タンク培養で生産する事に成功することができた。

第2の抗酸化活性実験においては酢酸エチル画分と熱水抽出画分において、強力な抗酸化機能物質を含有することが判明した。酢酸エチルに溶解した成分は、脂溶性と水溶性の中間的な性質を持つ低分子成分であり、また熱水抽出成分は、細胞内の核酸、糖タンパクおよび多糖を主とする比較的分子量の大きな物質であると考えられる。このことから、低分子系の物質と比較的分子量の大きな物質の2種類の抗酸化物質が存在するものと推定できる。今後さらに試験試料の再分画作業に取り組み、抗酸化活性を示す物質の特定に努力したいと考える。

第3の課題とした皮膚炎症モデルマウスを用いた、抗アレルギー実験においては、メシマコブ菌糸体由来成分がI型アレルギー発症の抑制と血中IgE生産を抑制する効果を示唆された。I型アレルギーは予防および治療方法が確立されていない事から、大変画期的な実験結果を得た事になる。これらの効果の機序と物質の解明は、医薬品として応用できる可能性が高いばかりか、I型アレルギー発症の要因解明の糸口ともなり得るため、有意義な実験であったと考えている。

しかし、本実験においては抗酸化物質の関与の可能性が示唆されたものの、決定的な判断を下すことが出来なかった。

今後の課題として、I型アレルギー発症抑制にどのような物質が関与しているのか確認を行うために、メシマコブ菌糸体由来の抗酸化物質を特定および、単離成分を用いた同様の実験を行う必要があると考える。

またメシマコブは、高い抗腫瘍効果を発揮することが他の研究により報告されていることから、同様に分画成分の動物実験により、抗腫瘍効果に関与する物質の解明も進めるべく努力したいと考える。

メシマコブ菌糸体は生産方法が確立し、成分の科学研究は始まったばかりである。多くの疾病の予防あるいは治療に有望な可能性をもつ物質の検出につとめ、社会に貢献できる結果を導き出したい。

第1章 参考引用文献

- 1) 井上正康 編：活性酸素の病態－疾患モデルからベッドサイドへ、学会出版センター(1992)
- 2) 吉川敏一、河野雅弘、野原一子：活性酸素・フリーラジカルのすべて、丸善(株)、pp.21-22 (2000)
- 3) Dumelin, E.E., Tappel, A.L. : *Lipids*, 12, 894-900 (1977).
- 4) Tolmsoft, J.M., Ono, T., Cutler, R.G.: *Proc. Natl. Sci. USA*, 77, 2777-2781 (1980)
- 5) 井上正康編：活性酸素と医食同源、共立出版(株)、第3版 pp.3-7 (1999)
- 6) 木谷輝夫、村上正人、他、ストレスと疲労の評価に関する研究、厚生科学研究費補助金健康科学総合研究事業、平成11年度研究業績報告書、p.109 (2000)
- 7) 村上正人、宗像和彦、全身の慢性的な痛みを訴える結合組織炎症候群 (Fibrositis Syndrome), ペインクリニック、18 (2), 211 (1997).
- 8) Sagai, M., et al : *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health.*, 40, 399-413 (1994).
- 9) Gey, k.f., Brubacher, G.B., Staehelin, H.b. : *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 1368-1377 (1987).
- 10) 二木鋭雄、島崎弘幸、美濃 誠 編：抗酸化物質－フリーラジカルと生体防御、学会出版センター(1994)
- 11) 今関六也、本郷次雄編：原色日本新菌類図鑑 (Ⅱ) 保育社, p.189 (1989)
- 12) 劉 波：中国の薬用菌類－効能と応用性、難波恒雄、布目慎勇訳、自然社, pp78-79 (1982)
- 13) 田川俊一：日菌報、3, 92 (1962)
- 14) 島崎幹夫：菌類図鑑 (上)、宇田川俊一他編、講談社、pp. 94-117 (1978).
- 15) Iekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N. and Chihara, G. 1968.
Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 59:155-157.

- 1 6) Sasaki, T., Takasuka, N. : *Carbohydrate Res.*, 47, 99 (1976).
- 1 7) G.Chihara,Y.Y.Maeda, J.hamuro, T.Sasaki and F.Fukuoka: *Nature*,
222, 689(1969)
- 1 8) G.Chihara, J.hamuro, Y.Y.Maeda, Y.Arai and F.Fukuoka: *Cancer Res.*,
30, 2776 (1976)
- 1 9) N.R.DiLuzio and G.Chihara, : *Advances in Immuno pharmacology I*,
J.W.Hadden *et al.* eds., pergamon press, Oxford, p.477(1981).
- 2 0) 平瀬 進 : PKS KRESTIN 基礎と臨床 1988, Excerpta Medica, 東京、
P.3-17(1988).
- 2 1) 飯塚勝也 : 日本農芸化学会昭和 57 年度大会講演要旨集、P.521.
- 2 2) K.tabata, W.itoh, T.kojima, S.kawabata and A.Misaki : *Carbokydr. Rea.*,
89, 121 (1981)
- 2 3) T.yamaki, W.Itoh, and K.Tabata : *Agric Biol.Chem.*, 50.2415 (1986)
- 2 4) 水野 卓, 川合正充編 : キノコの化学・生化学、(株)学会出版センター、
第 2 版 pp315-347 (1995).

第2章 参考引用文献

- 1) 今関六也. 1989. 原色日本新菌類図鑑 (Ⅱ) (今関六也・本郷次雄編)、P189. 保育社、大阪.
- 2) 劉 波. 1982. 中国の薬用菌類 (難波恒雄・布目慎勇 訳). P.78-79. 自然社.東京.
- 3) Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N. and Chihara, G.1968
Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*.
Jpn. J. Cancer Res. (Gann) 59:155-157.
- 4) 鶴崎一水・米山 誠・目黒貞利・河内進策. 1996. 抗腫瘍性担子菌メシマコブの栽培. 第46回日本木材学会大会要旨. P.466.
- 5) 中島 豊. 1998. メシマコブの栽培. 日本林学会九州支部研報. 51 : 161-162.
- 6) Han, M. W., Ko, k. S. and Chung, K. S. 1995. *Phellinus linteus* 菌糸体の液体培養と抗癌免疫増強物質の製造法 大韓民国特許公報 (B) 95-7860:69-73.
- 7) 山名征三. 1992. 多糖類及びその製造方法. 大韓民国特許報. (B) 92-1367:125-130.
- 8) 中村友幸・秋山幸仁・松尾純孝・岡野哲郎・原田芳照. 1999. 担子菌ヒメマツタケ (*Agaricus blazei* Murr.) の菌糸体における抗腫瘍 (腫瘍増殖抑制) 活性について. 第2回 日本代替医療学会学術集会要旨. P.67,125.
- 9) 松本晃幸・大平郁夫. 1982. マイタケ菌糸体の培養特性. 菌茸研究報告書. 20 : 140-147.
- 10) 衣田雅人・古野 毅・高橋 徹. 1996. ハタケシメジ菌糸体の培養特性について. 日菌報 37 : 139-145.
- 11) 吉岡佳彦・渡辺和夫・河合昌孝・小畠 靖. 1993. マンネンタケの生理学的性質および培養特性. 奈良林試研報. 23 : 57-63.
- 12) 金城一彦・近藤民雄. 1979. 担子菌栽培培地に関する研究 (第3報). 木材学誌 38 : 393-399.

- 1 3) 山中勝次・太田千絵. 1998. ホンシメジおよびシャカシメジの菌糸体成長における栄養要求性. 日本応用きのこ学会誌 6 : 159-165
- 1 4) 宮内信之助・昆喜知郎・山内 健・下村雅人、1998. *Pleurotus eryngii* 菌糸体の培養特性、日菌報 39 : 83-87.
- 1 5) 北本 豊・鈴木 彰. 1992. きのこ学 (古川久彦編), P.79-115. 共立出版、東京.
- 1 6) 金城一彦・屋我嗣良・砂川政英・林 弘也・赤尾真一, 1992. 担子菌栽培培地に関する研究 (第7報). 木材学会誌 38 : 393-399.
- 1 7) 米山 誠・目黒貞利・河内進策. 1997. ヒメマツタケ *Agaricus blazei* の液体培養. 木材学会誌 43 : 349-355.

第3章 参考引用文献

- 1) 上正康編：活性酸素と医食同源、共立出版、第3版、pp.2-7 (1999).
- 2) 長谷川秀夫：実用ESR入門（石津和彦 編）講談社, pp.263-283 (1981).
- 3) 二木悦雄：食品と開発, 28, 6-9 (1993).
- 4) Sreinbrecher, U. P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L., Steinberg, D.: *Proc. Natl. Acad. USA*, 81, 3883-3887 (1984).
- 5) 吉川敏一、河野雅弘、野原一子：活性酸素・フリーラジカルのすべて、丸善(株) pp.7-76 (1999).
- 6) 大柳善彦：スーパーオキサイドと医学、共立出版 (1981)
- 7) 一戸裕子 編：生体内フリーラジカルと疾患、実験医学 4: 9-66, (1986).
- 8) 二木鋭雄、島崎弘幸 編：活性酸素—化学・生物・医学—、医歯薬出版、(1987)
- 9) 井上正康 編：活性酸素と病態、学会出版センター (1992).
- 10) Cutler, R.G.: *in Free Radicals in Biology* (Pryer, w., ed.), 6, pp.371-424, Academic press (1984)
- 11) 寺尾純二：現代医療, 25, 181-184 (1994).
- 12) Farr, S.B., Kogoma, T.: *Microbiol. Rev.*, 55, 561-585 (1991).
- 13) 劉 波：中国の薬用菌類—効能と応用性、難波恒雄・布目慎勇訳、自然社 pp.78-79 (1982)
- 14) Iekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N. and Chihara, G. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 59:155-157.
- 15) 平松緑・枝松礼・門脇大・岡村容子・金倉圭一・森昭胤：磁気共鳴と医学、小倉良平・吉川敏一編、日本医学館 Vo.3, pp.97-101 (1989).
- 16) 中井由美・橋本豊・大森大二郎・山倉文幸：ESRとフリーラジカル 西川弘恭・吉川敏一編、日本医学館、pp.97-101 (1989)
- 17) 平松緑・河野雅弘：ESRによる superoxide dismutase 活性測定法の開発、日本電子 ニュース、126, 6~9, (1986).

第4章 参考引用文献

- 1) 厚生省長期慢性疾患総合研究事業「アレルギー総合研究」平成7年研究報告書、アトピー性皮膚炎班 研究要旨：山本昇壮 (1995)
- 2) 厚生省所管・財団法人 日本アレルギー協会 (Japan Allergy Foundation) 設立目的 趣意書 抜粋, (1999) .
- 3) 斎藤洋三、井手 武、花粉症の化学、化学同人 (1994).
- 4) 小山次郎：免疫のしくみ、(株)化学同人、pp.125-137 (1996)
- 5) 吉川敏一、河野雅弘、野原一子：活性酸素・フリーラジカルのすべて、丸善(株)、pp68-69 . (2000)
- 6) Wakata, A., Oka, N., Hiramoto, K., Yoshioka, A., Negishi, K., Wataya, Y., Hayatsu, H. : *Cancer Res.*, 45, 5867-5871 (1985).
- 7) 平本一幸、根岸和雄、綿矢有佑、早津彦哉：蚕淡白核酸 酵素、33 (16), 2869-2874 (1988).
- 8) Matsuda H, Watanabe N, Geba GP.et al : Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* in press.(1996)
- 9) 松田浩珍、澤田淳子、松本正博：アトピー性皮膚炎モデルマウス、Annual Review 免疫 1997.菊地浩吉、矢田純一、奥村康編：pp.402-408 中外医学社、(1996)

謝 辞

本研究を遂行するにあたり御指導、御鞭撻を賜りました高知工科大学工学部 河野雅弘教授、野田泰子講師を始めとする生命環境工学研究室内の皆様、北里大学 医療衛生学部 松尾純考講師、岡野哲郎講師、静岡大学農学部 河岸洋和教授の各位に深く感謝いたします。

また、本研究を実施するに先立ち、*P.linteus* の子実体の鑑定をして戴いた、農林水産省森林総合研究所 阿部恭久博士、本研究に適切な助言と御鞭撻を賜りました山梨大学工学部 兎束保之教授、山梨医科大学 手塚英夫教授に深く感謝いたします。

さらに、本論文を作成するにあたり御指導を賜ったばかりでなく、研究成果の事業化のために多大なる御指導、御鞭撻を賜りました高知工科大学 大学院 加納剛太教授を始めとする起業家コースの教授各位に対しまして厚く御礼申し上げます。