

【原 著】

## 2型糖尿病マウスにおける霊芝菌糸体培養培地抽出物の血糖上昇抑制効果

### Hypoglycemic Effects of a Water-Soluble Extract from Culture Medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) Mycelia in Type 2 Diabetic Mice

神内伸也<sup>1</sup>, 八田侑子<sup>1</sup>, 宮里朱音<sup>1</sup>, 岡崎真理<sup>1</sup>, 川原由紀子<sup>1</sup>, 田中愛子<sup>1</sup>, 新藤由梨<sup>1</sup>,  
 玄 美燕<sup>1</sup>, 鈴木史子<sup>2</sup>, 飯塚 博<sup>2</sup>, 日比野康英<sup>1,\*</sup>  
 Shinya KAMIUCHI<sup>1</sup>, Yuko HATTA<sup>1</sup>, Akane MIYAZATO<sup>1</sup>, Mari OKAZAKI<sup>1</sup>,  
 Yukiko KAWAHARA<sup>1</sup>, Aiko TANAKA<sup>1</sup>, Yuri SHINDOU<sup>1</sup>, Meiyuan XUAN<sup>1</sup>,  
 Fumiko SUZUKI<sup>2</sup>, Hiroshi IIZUKA<sup>2</sup>, Yasuhide HIBINO<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 城西大学薬学部医療栄養学科生体防御学講座<sup>2</sup> 野田食菌工業株式会社

## 【要 旨】

【目的】霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER) は、マンネンタケ菌糸体をバガスおよび米糠を含む固形培地に接種し、子実体発生直前に培地と共に熱水抽出したものである。本研究では、WER の 2 型糖尿病態改善効果について検証した。

【方法】KK-A<sup>y</sup> マウスに、WER を含む飼料を摂取させ、経時的に血糖値および血中インスリン量を測定した。また、インスリン感受性試験を行った。さらに、骨格筋および脂肪組織を摘出し GLUT4 蛋白質の発現量を測定した。

【結果・考察】WER 摂取群では、対照群と比較し血糖値および血中インスリン量が有意に低下した。また、WER 摂取群ではインスリンによる血糖値低下作用の増強が認められた。さらに、WER 摂取群の骨格筋および脂肪細胞膜では、GLUT4 蛋白質の発現増大が認められた。これらの結果から、WER は 2 型糖尿病マウスにおいて、インスリン抵抗性を改善し血糖上昇を抑制すること、またその機序の一部に GLUT4 の膜移行の促進が関与することが示唆された。

## 【キーワード】

霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER), 2 型糖尿病, インスリン抵抗性, GLUT4, KK-A<sup>y</sup> マウス

## はじめに

糖尿病は、慢性の高血糖状態を主徴とする代謝性疾患であり、網膜症、腎症および神経障害などの合併症を誘発するとともに、心筋梗塞や脳梗塞などの虚血性疾患の罹患リスクを上昇させることが知られている。過剰のエネルギー摂取と肥満から生じるインスリン非依存性 2 型糖尿病の患者数は、我が国を含む先進諸国において増加の一途を辿っており、その対策が急がれている。

2 型糖尿病では、インスリンの分泌障害およびインスリンの作用障害であるインスリン抵抗性が生じており、その原因となる分子メカニズムとして慢性的な高血糖状態による酸化ストレスの関与が明らかとなっている<sup>1)</sup>。過剰のエネルギー代謝過程においては、ATP とともに活性酸素種 (ROS) が副産物として産生される。酸化ストレスの亢進は、インスリンによるシグナル伝達を抑制し、骨格筋や脂肪細胞へのグルコースの取り込みを行うグル

受理日: 2009年7月23日

\* 〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1 Tel: 049-271-7285 Fax: 049-271-7284 E-mail: seitai@josai.ac.jp

コーストランスポーター 4 (GLUT4) の細胞膜移行や脂肪の合成が障害されることが報告されている<sup>2)</sup>。

一方、小型脂肪細胞で合成されるアディポネクチンは、インスリン抵抗性や脂質異常症を改善することが報告されている<sup>3)</sup>。アディポネクチンは、骨格筋や肝臓において AMP キナーゼや PPAR- $\alpha$  を活性化させ、脂肪酸を燃焼させることで代謝を亢進する。また、アディポネクチンの分泌は、内臓脂肪と逆相関を示し、内臓脂肪が増加すると血液中のアディポネクチンは減少する。糖尿病態においてアディポネクチンの低下がみられ、アディポネクチンを補充することでインスリン抵抗性を改善できること、また、アディポネクチンの血中濃度は、全身の酸化ストレスレベルと有意な逆相関を示すことが明らかにされている<sup>4)</sup>。

近年、糖尿病をはじめとした生活習慣病の増加を背景に国民の健康志向が高まる中、これら疾患の予防や改善効果を期待した特定保健用食品や健康食品の開発が盛んに行われている。霊芝菌糸体培養培地抽出物 (WER) は、マンネンタケ菌糸体をバガスおよび米糠を含む固形培地に接種し、子実体発生直前に培地と共に熱水抽出・凍結乾燥したもので、滋養強壮を目的とした健康食品として長く用いられてきた。霊芝は、サルノコシカケ科に属するマンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) の別名であり、古くから滋養強壮・長寿の伝承薬として使用されている。マンネンタケは、多様な生理学的活性を示し、その子実体の薬理作用として免疫調節作用<sup>5)</sup> や抗悪性腫瘍作用<sup>6)</sup>、抗ウイルス作用<sup>7)</sup>、コレステロール低下作用<sup>8)</sup>、抗酸化作用<sup>9)</sup> などが報告されている。また、血糖上昇抑制作用についてもいくつかの研究報告がなされている<sup>10,11)</sup>。一方、WER は、マンネンタケの菌糸体成分に加え、水溶性リグニンをはじめとした菌糸体による固形培地の分解物や菌糸体の自己消化成分等を含むことから、マンネンタケとは異なる生理学的活性を有する可能性が考えられる。我々は、これまでに WER がストレプトゾトシン (STZ) 誘発 1 型糖尿病マウスにおいて血糖や体内酸化ストレス度の低下作用を示すこと、肝臓や腎臓における過酸化脂質産生を抑制して、これら臓器の保護作用を示すことを明らかにしている<sup>12)</sup>。しかし、WER の 2 型糖尿病に対する改善効果については科学的な証明がなされていない。

そこで本研究では、高脂肪飼料を負荷した 2 型糖尿病モデル動物である KK-A<sup>y</sup> マウスを用いて、WER の長期間摂取による高血糖改善効果について検討した。また、WER を摂取したマウスにおいてインスリン感受性試験を行い、WER のインスリン抵抗性改善効果について調査した。さらに、血中アディポネクチン量、および骨格筋

と脂肪細胞における GLUT4 の発現量を測定し、WER のインスリン抵抗性改善メカニズムについて検討した。

## 材料・方法

### 1. 実験材料

本研究では、WER として野田食菌工業 (株) において製造された「MAK」を使用した。霊芝菌糸体ペレットをバガス (砂糖キビ搾汁残渣) と脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、約 3.5 ヶ月間培養後、子実体発生直前に培地ごと破碎し、蒸留水で懸濁、熱水抽出した。抽出物を珪藻土上で濾過した後、メンブランフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) にて濾過滅菌し、濾液の凍結乾燥品を WER とした。

### 2. 実験動物

雌性 KK-A<sup>y</sup> マウス (5 週齢, 日本エスエルシー, 浜松) を温度  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 10\%$ 、照度サイクル 12 時間 (明期 7:00~19:00) の環境下、固形飼料 (CE-2, 日本クレア, 東京) および水を自由に摂取させ馴化させた。1 週間の予備飼育後、飼料を高脂肪飼料 (Quick Fat, 日本クレア) または、0.5% WER 含有高脂肪飼料に変更し、自由摂取により 8 週間飼育した。すべての実験動物は、環境省の「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「城西大学動物実験規定」に従って行った。

### 3. 血糖値および血中インスリン濃度の測定

マウスの尾静脈より血液を採取し、血糖値測定用の検体とした。血糖値の測定には簡易型血糖値測定器 (デキスター ZII, バイエル薬品, 大阪) を用いた。また、同様に採取し、得られた血漿をインスリン測定用の検体とした。インスリン濃度の測定は、市販のキット (超高感度ラットインスリン測定キット: 森永生科学研究所, 横浜) を用いた。これらの実験は、全て非絶食状態で行った。

### 4. 体内酸化ストレス度の測定

酸化ストレス度の測定は、d-ROMs (Reactive Oxygen Metabolites) テストキット (Diacron International, Grosseto, Italy) を用いて血中のヒドロペルオキシド濃度を指標として測定した<sup>13)</sup>。マウスの尾静脈血から 10  $\mu\text{L}$  の血漿を調製し、キット付属の酢酸緩衝液と混和し、10  $\mu\text{L}$  呈色クロモゲン (N,N ジエチルパラフェニレンジアミン) を加え、活性酸素・フリーラジカル自動分析装置 (F.R.E.E.: Free Radical Elective Evaluator, Diacron International) にて測定した。

## 5. 血中脂質, AST および ALT の測定

トリグリセリド, 総コレステロール, HDL-コレステロール, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値は, 乾式臨床化学分析装置 (富士ドライケム 3500, 富士フィルムメディカル, 東京) を用いて測定した. WER 投与開始から 8 週間後, 解剖時に下大静脈より血液を採取し, 得られた血漿を検体とした.

## 6. インスリン感受性試験

インスリン感受性試験は, WER 摂取開始から 8 週間目に行った<sup>14,15)</sup>. マウスを 17 時間絶食後, インスリン (1 U/kg 体重) を腹腔内に投与した. 投与直前および投与後 15, 30, 60, 90, 120 分に尾静脈より採血し, 血糖値を測定した.

## 7. 血中アディポネクチン量の測定

アディポネクチンは, マウス/ラットアディポネクチン ELISA キット (大塚製薬, 東京) を用いて測定した. WER 摂取飼育 8 週間の後, 解剖時に下大静脈より血液を採取し, 得られた血漿を検体とした.

## 8. 組織の採取と細胞膜画分の調製

WER 摂取開始から 8 週間後, 卵巣上皮・子宮周囲脂肪細胞および下肢骨格筋組織を採取した. 組織 1 g に対して 12.5 mL の緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride および protease inhibitor mixture (和光純薬工業, 大阪)) を加え, ポリトロンホモジナイザーで粉碎した. 組織懸濁液を 700×g, 10 分間遠心した後, 上清を再度 13000×g, 20 分間遠心し, 沈殿を膜画分とした<sup>14)</sup>.

## 9. 免疫組織染色法による GLUT4 発現の解析

マウス脂肪細胞および骨格筋組織を 4%ホルマリンにて浸漬固定した後, 12.5%および 25%スクロース溶液で順次置換を行い, クライオスタット (CM3050S, Leica, Bensheim, Germany) を用いて凍結切片 (10 μm 厚) を作製した. 切片をスライドガラスにマウントし, 市販のブロッキング剤 (1:4; ブロックエース™, 大日本住友製薬, 大阪) で 2 時間処理し, 1 次抗体 (1:100; Glut4 (C-20), Santa Cruz, CA, USA) を 4°C で一晩作用させた. 次に, 2 次抗体 (1:200; FITC conjugated donkey anti-goat IgG antibody, Santa Cruz) を室温で 2 時間作用させ封入後, 共焦点レーザー顕微鏡 FV1000-D (オリンパス, 東京) を用いて観察した.

## 10. ウェスタンブロッティング法による細胞膜 GLUT4 発現の解析

膜画分 30 μg を, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) および 50 mM dithiothreitol を含む溶液に懸濁・溶解させ, SDS-polyacrylamide (10%) gel で電気泳動した. 常法に従って蛋白質を PVDF 膜に転写した後, 5%スキムミルクで 1 時間処理し, 1 次抗体 (1:100; Glut4 (C-20) あるいは 1:500; caveolin-1 (N-20), Santa Cruz) を 4°C で 1 時間作用させた. 次に, 2 次抗体 (1:2000; HRP conjugated donkey anti-goat IgG antibody, Santa Cruz, CA, USA あるいは 1:2000; HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody, GE Healthcare, Buckinghamshire, England) をそれぞれ 1 時間作用させた. その後, ECL Plus ウェスタンブロッティング検出システム (GE Healthcare) を用いて解析した.

## 11. 統計処理

データは, 全て平均値±標準偏差として表示した. 群間の統計学的有意差は, 一元配置分散分析後, Tukey の多重比較により検定した. P 値 0.05 を有意差の判定基準とした.

## 結果

### 1. KK-A<sup>y</sup> マウスにおける WER の血糖上昇抑制効果

KK-A<sup>y</sup> マウスに WER を混合した高脂肪飼料を 8 週間自由摂取させ, 血糖値の推移を対照群と比較した (図 1). 飼料摂取前の血糖値は約 200 mg/dL であったが, 高脂肪飼料負荷後は徐々に上昇し, 対照群では 8 週間後に約 500 mg/dL を示した. WER 群においても血糖値の上昇は

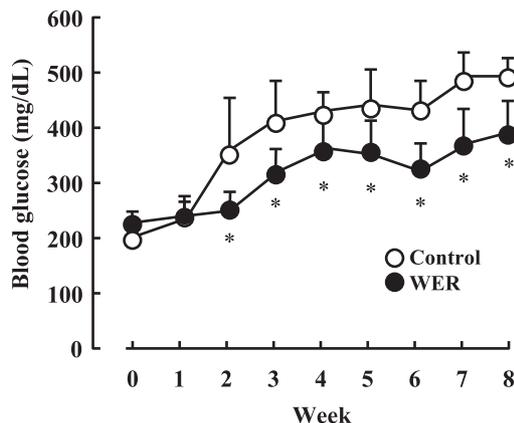


図 1 Effect of WER on non-fasting blood glucose level in KK-A<sup>y</sup> mice. WER (0.5%) was given freely to KK-A<sup>y</sup> diabetic mice. Blood samples were taken every week. Each plot represents mean±S.D. for 5–10 mice in WER or control group. \*,  $P < 0.05$  compared with control group by one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

認められたものの、対照群と比較して WER 摂取 2 週間から抑制傾向を示し、8 週間後の血糖値は約 350 mg/dL であった。データは示さないが、対照群と WER 群の体重および摂食量に差は認められなかった。

## 2. 血中インスリンに対する WER の効果

WER 群および対照群の血中インスリン値を比較した (図 2)。対照群では、高脂肪食負荷後徐々に血中インスリン値が増加し、8 週間後には約 500 ng/dL の高値を示した。これに対して、WER 群における血中インスリン値の増加は対照群と比較し緩やかであり、WER 摂取以降、各週の血中インスリン値は対照群と比べて低値を示した。

## 3. 体内酸化ストレス度に対する WER の効果

体内の酸化ストレス度を d-ROMs テストにより評価した (図 3)。対照群では、高脂肪食負荷後 8 週の体内酸化ストレス度が負荷前 (0 週) と比較し高値を示したが、WER 群では酸化ストレス度の有意な上昇抑制が認められた。

## 4. 脂質代謝および肝機能に与える WER の影響

WER 群および対照群における脂質代謝に関するパラメーターであるトリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-chol)、HDL-コレステロール値 (HDL-chol) (図 4A)、また、肝機能のパラメーターである AST および ALT 値を測定した (図 4B)。WER 群において血中 ALT 値は対照群と比較して有意に低い値を示したが、その他の測定項目については差が認められなかった。

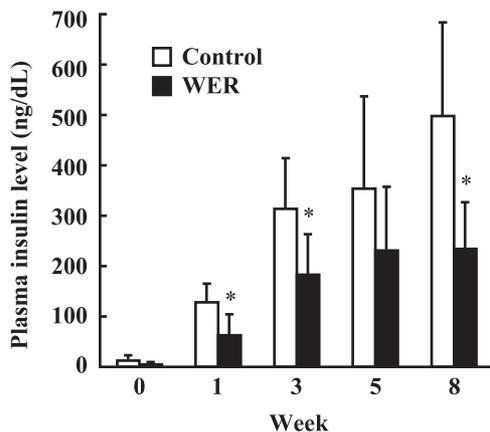


図 2 Effect of WER on plasma insulin level in KK-A<sup>y</sup> mice. Blood samples were taken at 0, 1, 3, 5 and 8 weeks. Data represented as mean ± S.D. for 4–7 mice in each group. \*,  $P < 0.05$  compared with control group by one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

## 5. WER によるインスリン感受性の改善

WER 摂取 8 週間後、インスリン感受性試験を行い、対照群と比較した (図 5)。両群におけるインスリン投与前の血糖値を 100 とし、インスリンによる血糖値の低下を相対値で表した。WER 群では対照群と比較し、インスリン投与後 60 分以降において、インスリンの血糖低下作用の有意な増大が認められた。

## 6. 血中アディポネクチンに与える WER の影響

2 型糖尿病態において血中のアディポネクチンの減少がインスリン抵抗性に関連しているとの報告があることから、WER 群および対照群の血中アディポネクチン濃度を測定した (図 6)。両群ともに高脂肪食負荷 8 週間後には血中アディポネクチン濃度が減少したが、群間に差は

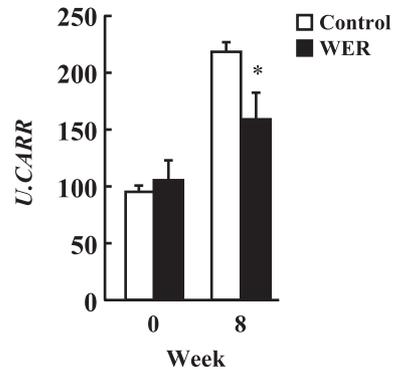


図 3 Effects of WER on the level of total plasma oxidative stress in KK-A<sup>y</sup> mice determined by d-ROMs test. Blood samples were taken at 0 and 8 weeks. Data represented as mean ± S.D. for 3–5 mice in each group. \*,  $P < 0.05$  compared with control group by one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

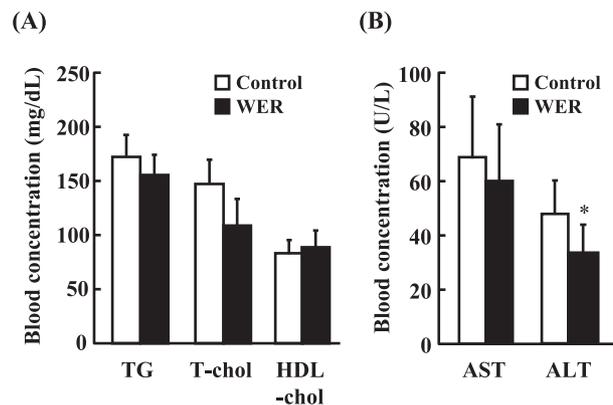


図 4 Effects of WER on levels of lipids and hepatic enzymes in plasma of KK-A<sup>y</sup> mice. Blood samples were taken at 0 and 8 weeks. Data represented as mean ± S.D. for 6–8 mice in each group. \*,  $P < 0.05$  compared with control group by one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

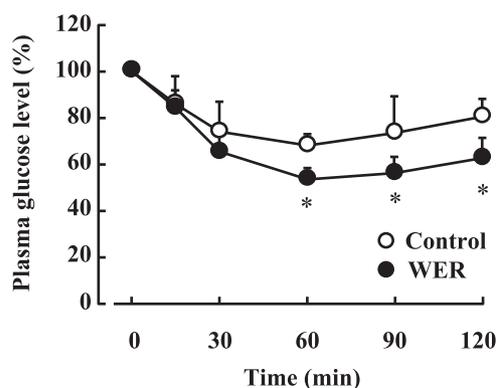


図5 Effect of WER on insulin tolerance test in KK- $A^y$  mice. After 17 hours of fasting, insulin solution was administered subcutaneously (1.0 U/kg body weight). Blood samples were collected before and 15, 30, 60, 90, 120 min after the insulin administration. Data represented as mean  $\pm$  S.D. for 5–6 mice in each group. \*,  $P < 0.05$  compared with control group by one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

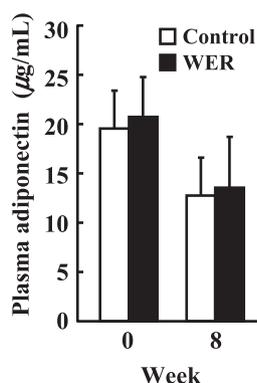


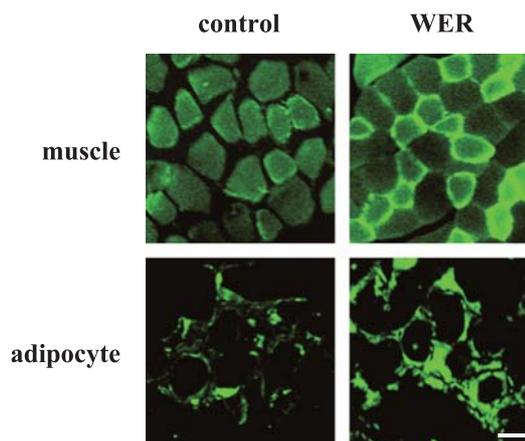
図6 Effect of WER on plasma adiponectin levels in KK- $A^y$  mice. Blood samples were taken at 0 and 8 weeks. Data represented as mean  $\pm$  S.D. for 6–8 mice in each group.

なく、血中アディポネクチン濃度に対する WER の影響は認められなかった。

## 7. 骨格筋、脂肪組織における GLUT4 の発現に及ぼす WER の影響

骨格筋および脂肪細胞における GLUT4 の発現量を免疫染色法 (図 7A) およびウエスタンブロッティング法により調査した (図 7B)。免疫染色の結果から、WER 群の骨格筋および脂肪細胞では対照群と比べ細胞膜上の GLUT4 の発現量が増加していることが明らかとなり、また、ウエスタンブロッティング法において膜画分に存在する GLUT4 が両細胞共に約 3 倍量に増加していることが認められた。

(A)



(B)

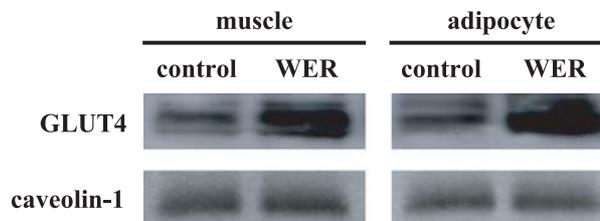


図7 Effects of WER on GLUT4 protein population in skeletal muscle and adipocytes from KK- $A^y$  mice. (A) Fluorescence immunostaining of GLUT4 protein population in muscle and adipocyte cells. GLUT4 protein was detected with anti-GLUT4 antibody and visualized by FITC conjugated donkey anti-goat IgG antibody. Scale bar=50  $\mu$ m. (B) Western blot analysis of GLUT4 protein in total membrane from muscle and adipocytes. Total membrane was isolated as described in materials and methods. Total protein were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblot to measure GLUT4 and caveolin-1. Representative immunoblots of 3 independent experiments are shown.

## 考 察

WER は、マンネンタケ菌糸体を固形培地に接種し、約 3.5 ヶ月培養後、子実体発生直前に培地と共に熱水抽出・凍結乾燥したものであり、滋養強壮を目的とした健康食品として使用されている。WER の生理活性には、これまでに免疫賦活作用<sup>16)</sup>、抗腫瘍作用<sup>17)</sup>などが報告されている。我々は、すでに WER が  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を有し、空腹時血糖には影響することなくマウスにおけるマルトース負荷後の血糖値の上昇を抑制すること<sup>18)</sup>、さらに、1 型糖尿病モデルである STZ 誘発糖尿病マウスの高血糖を改善することを明らかにしている<sup>12)</sup>。しかしながら、2 型糖尿病に対する WER の改善効果については未検討であったことから、KK- $A^y$  マウスを用いて WER

の経口摂取による高血糖改善作用およびそのメカニズムを検討した。多くの2型糖尿病態では、インスリン抵抗性が生じ、持続的な高血糖状態がインスリン抵抗性を助長して、インスリン分泌を亢進させ、高インスリン血症を呈する<sup>19,20</sup>。本研究結果から、WERはKK-A<sup>y</sup>マウスの血糖を低下させ、2型糖尿病の特徴であるインスリン抵抗性および高インスリン血症に対しても改善効果を示すことが明らかになった。

糖尿病態における持続的な高血糖は、生体内の酸化ストレスを著しく増大させ、インスリン抵抗性を誘発することが示唆されている。我々は、これまでにWERがスーパーオキシドアニオンラジカル消去能やラジカル捕捉能、過酸化脂質産生抑制能などの抗酸化作用を有することを明らかにしている<sup>12</sup>。今回の実験においてもWERを摂取させたKK-A<sup>y</sup>マウスにおいて血中酸化ストレス度の低下が認められたことから、WERのインスリン抵抗性改善メカニズムの一因として体内酸化ストレスの抑制作用が関与している可能性が考えられる。

インスリン抵抗性の原因の一つとして、骨格筋細胞の糖輸送担体であるGLUT4の細胞膜への移行阻害による糖利用の低下が考えられる。これまでに、チアゾリジン系の薬剤であるトログリタゾンは、GLUT4の細胞膜への移行を促進させるとの報告がある<sup>21,22</sup>。さらに、バナバ葉やハタケシメジは、GLUT4の細胞膜移行の促進に加えて、血中インスリン量の低下、インスリン感受性の亢進を示すとの報告がある<sup>14,23,24</sup>。今回の実験から、WERは骨格筋および脂肪細胞においてGLUT4の細胞膜移行を促進することが明らかになった。従って、WERの血糖上昇抑制作用メカニズムの一部にGLUT4を介した糖の取り込み促進が関与すると考えられる。

一方、血糖値上昇抑制には、肝臓での糖新生抑制も関与することが報告されている。オリーブの皮から抽出されたマスリン酸は、糖尿病態で異常となった肝臓の糖新生を抑制することにより、インスリン感受性の亢進、血中インスリン量の低下を示すとの報告がある<sup>25</sup>。今回、肝臓における糖新生に対するWERの作用については検討を行っていないが、これまでに我々は、WERがSTZマウスにおける肝細胞の萎縮や類洞の拡張などの肝細胞障害に対して保護効果を示すことを明らかにしている<sup>12</sup>。また、本研究においてもWER摂取群では、肝障害の指標であるALT値の上昇抑制が認められたことから、WERが肝機能に対して保護作用を有する可能性が考えられる。今後、肝臓の代謝機能に対するWERの作用についても検討を進める予定である。

肥満糖尿病のモデルマウスに高脂肪食を負荷すると、白色脂肪細胞由来の主要なインスリン抵抗性改善ホルモ

ンであるアディポネクチンの血中濃度が低下し、インスリン抵抗性、脂質異常症が惹起されることが報告されている<sup>4</sup>。このマウスにアディポネクチンを投与すると、これらの異常が改善されることから、肥満はアディポネクチンの分泌を低下させ、2型糖尿病の原因となることが示唆されている<sup>4</sup>。しかしながら、今回の研究結果においては、WERのアディポネクチン分泌低下に対する改善効果は認められなかった。

マンネンタケ成分の血糖への影響については、子実体に含まれる多糖類のガノデランAおよびBが血糖降下作用を有すること<sup>26</sup>、SKG-3が $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を有すること<sup>27</sup>、さらに、子実体から熱水抽出された分子量約58万の多糖類がインスリン分泌を促進する<sup>10</sup>との報告がある。WERには、多糖体、プロテオグリカン、テルペノイドなどのマンネンタケ菌糸体由来成分に加え、菌糸体による固形培地の分解物である水溶性リグニンや菌糸体の自己消化成分などの水溶性生理活性物質が含まれると考えられる。今後、本研究で明らかになったWERのインスリン感受性の亢進やGLUT4の細胞膜への移行促進効果を現す活性本体の探索が必要であると考えている。

## 結 論

WERの継続的な摂取は2型糖尿病における高血糖状態を緩和し、さらに高インスリン状態およびインスリン抵抗性を改善した。これらWERの2型糖尿病態改善メカニズムとして、骨格筋および脂肪細胞におけるGLUT4の膜移行促進作用の関与が強く示唆された。以上、本研究結果から、WERは2型糖尿病態のマイルドな改善効果を有し、インスリン抵抗性を改善する有用な機能性食品であることが明らかとなった。

## 参 考 文 献

- 1) Baynes J. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40(4): 405–412.
- 2) Hirshman MF, Goodyear LJ, Wardzala LJ, et al. Identification of an intracellular pool of glucose transporters from basal and insulin-stimulated rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 1990; 265(2): 987–991.
- 3) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8(11): 1288–1295.
- 4) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7(8): 941–946.

- 5) Zhu XL, Lin ZB. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on proliferation and cytotoxicity of cytokine-induced killer cells. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26(9): 1130–1137.
- 6) Gao Y, Gao H, Chan E, et al. Antitumor activity and underlying mechanisms of ganopoly, the refined polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*, in mice. *Immunol Invest* 2005; 34(2): 171–198.
- 7) Liu J, Yang F, Ye LB, et al. Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. *J Ethnopharmacol* 2004; 95(2-3): 265–272.
- 8) Hajjaj H, Macé C, Roberts M, et al. Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(7): 3653–3658.
- 9) Wong KL, Chao HH, Chan P, et al. Antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* in acute ethanol-induced heart toxicity. *Phytother Res* 2004; 18(12): 1024–1026.
- 10) Zhang HN, Lin ZB. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta Pharmacol* 2004; 25(2): 191–195.
- 11) Kimura Y, Okuda H, Arichi S. Effects of the extracts of *Ganoderma lucidum* on blood glucose level in rats. *Planta Med* 1988; 54(4): 290–294.
- 12) 岡崎真理, 田中愛子, 八田侑子ら. 霊芝菌糸体培養培地抽出物の抗酸化活性とストレプトゾトシン糖尿病マウスにおける改善効果. *日本補完代替医療学会誌*. 2008; 5(3): 209–218.
- 13) Cornelli U, Terranova R, Luca S, et al. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the D-Roms test as a marker of oxidative stress. *J Nutr* 2001; 131(12): 3208–3211.
- 14) Miura T, Kubo M, Itoh Y, et al. Antidiabetic activity of *Lyophyllum decastes* in genetically type 2 diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(9): 1234–1237.
- 15) Hanamura T, Mayama C, Aoki H, et al. Antihyperglycemic effect of polyphenols from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70(8): 1813–1820.
- 16) 中川育也, 日比野康英, 大橋康宏ら. マンネンタケ (霊芝) 菌糸体培養基より得られるヘテロ多糖・蛋白質画分 (MTP2) によるマウス脾細胞の傷害活性の増強. *Biotherapy* 1999; 13: 513–515.
- 17) Lu H, Kyo E, Uesaka T, et al. A water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia suppresses azoxymethane-induction of colon cancers in male F344 rats. *Oncol Rep* 2003; 10(2): 375–379.
- 18) 白井達洋, 岡崎真理, 神内伸也ら. 霊芝菌糸体培養培地抽出物の糖負荷後の血糖上昇抑制効果と食後過血糖改善薬との併用効果. *日本栄養・食糧学会誌*. 2007; 60(5): 249–255.
- 19) Hyun CK, Kim IY, Frost SC. Soluble fibroin enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 2004; 134(12): 3257–3263.
- 20) Ginsberg H, Kimmerling G, Olefsky JM, et al. Demonstration of insulin resistance in untreated adult onset diabetic subjects with fasting hyperglycemia. *J Clin Invest* 1975; 55(3): 454–461.
- 21) Shintani M, Nishimura H, Yonemitsu S, et al. Troglitazone not only increases GLUT4 but also induces its translocation in rat adipocytes. *Diabetes* 2001; 50(10): 2296–2300.
- 22) Yonemitsu S, Nishimura H, Shintani M, et al. Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 myotubes. *Diabetes* 2001; 50(5): 1093–1101.
- 23) Miura T, Ueda N, Yamada K, et al. Antidiabetic effects of corosolic acid in KK-Ay diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(3): 585–587.
- 24) Miura T, Itoh Y, Kaneko T, et al. Corosolic acid induces GLUT4 translocation in genetically type 2 diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(7): 1103–1105.
- 25) Liu J, Sun H, Duan W, et al. Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(11): 2075–2078.
- 26) Hikino H, Konno C, Mirin Y, et al. Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med* 1985; 51(4): 339–340.
- 27) Kim SD, Nho HJ. Isolation and characterization of alpha-glucosidase inhibitor from the fungus *Ganoderma lucidum*. *J Microbiol* 2004; 42(3): 223–227.

## ABSTRACT

### Hypoglycemic Effects of a Water-Soluble Extract from Culture Medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) Mycelia in Type 2 Diabetic Mice

Shinya KAMIUCHI<sup>1</sup>, Yuko HATTA<sup>1</sup>, Akane MIYAZATO<sup>1</sup>, Mari OKAZAKI<sup>1</sup>, Yukiko KAWAHARA<sup>1</sup>, Aiko TANAKA<sup>1</sup>, Yuri SHINDOU<sup>1</sup>, Meiyan XUAN<sup>1</sup>, Fumiko SUZUKI<sup>2</sup>, Hiroshi IIZUKA<sup>2</sup>, Yasuhide HIBINO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Immunobiochemistry, Department of Clinical Dietetics & Human Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University*

<sup>2</sup> *Noda Shokukinkogyo Co., Ltd.*

**Objective:** The water-soluble extract of *Ganoderma lucidum* mycelia (WER) is prepared from a solid medium composed of bagasse and rice bran overgrown with *Ganoderma lucidum* mycelia. Recently, we have reported that WER had glucose-lowering effect in streptozotocin-induced diabetic mice, an animal model of type 1 diabetes. Here, we investigated whether long-term treatment with WER affects hyperglycemia and insulin resistance in KK-A<sup>y</sup> mice, a type 2 diabetic animal model with obesity.

**Methods:** Female KK-A<sup>y</sup> mice were given free access to water and high-fat food containing 0.5% WER for 8 weeks, with blood glucose and plasma insulin levels assessed every week. At the end of the experimental period, insulin tolerance test (ITT) was performed, and plasma levels of triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, AST, ALT and adiponectin were measured. Furthermore, expression of GLUT4 in skeletal muscle cell membrane and adipocytes was also determined by immunostaining and Western blot analysis.

**Results:** The mice with high-fat ingestion showed a gradual increase in levels of blood glucose and body weight. In the WER-treated mice, the blood glucose level was significantly suppressed after 2 weeks of treatment. WER also reduced plasma levels of ALT and insulin, but did not affect the other parameters. Additionally, ITT revealed that WER improved insulin sensitivity. Moreover, expression of GLUT4 in the plasma membrane of skeletal muscle cells and adipocytes of the WER-treated mice was increased.

**Conclusion:** These results indicate that WER has a glucose-lowering effect in type 2 diabetic mice. WER also improved hyperinsulinemia and insulin sensitivity, which may derive from enhancement of glucose uptake through GLUT4 of skeletal muscle cells and adipocytes.

**Key words:** water-soluble extract of *Ganoderma lucidum* mycelia (WER), type 2 diabetes, insulin resistance, GLUT4, Hypoglycemic