

【原 著】

靈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

Antioxidant Properties of a Water-soluble Extract from Culture Medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) Mycelia and Antidiabetic Effects in Streptozotocin-treated Mice

岡崎真理¹, 田中愛子¹, 八田侑子¹, 川原由紀子¹, 神内伸也¹, 岩田直洋¹,
浅野 哲², 鈴木史子³, 飯塚 博³, 日比野康英^{1,*}

Mari OKAZAKI¹, Aiko TANAKA¹, Yuko HATTA¹, Yukiko KAWAHARA¹,
Shinya KAMIUCHI¹, Naohiro IWATA¹, Satoshi ASANO², Fumiko SUZUKI³,
Hiroshi IIZUKA³, Yasuhide HIBINO^{1,*}

¹ 城西大学薬学部医療栄養学科生体防御学講座

² グラクソsmithkline株式会社開発本部 PMS 部

³ 野田食菌工業株式会社

【要 旨】

糖尿病では、持続的な高血糖状態による酸化ストレスが病状の進行や合併症の誘発に密接に関与する。そこで、靈芝菌糸体培養培地抽出物 (WER) の抗酸化活性を調査し、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスを用い、WER の糖尿病態改善効果について検証した。

WER の O_2^- 消去能および過酸化脂質産生抑制能を調査した。また、STZ 糖尿病マウスに WER (1 g/kg) を約 2 ヶ月間 1 日 1 回経口投与し、血糖値、体内酸化ストレス度、臓器の過酸化脂質含量および抗酸化酵素 (catalase, SOD, GPx) の活性について検討した。

WER は濃度依存的な O_2^- 消去能および過酸化脂質産生抑制能を示した。WER を投与した STZ 糖尿病マウスでは対照群に比べ血糖値および血中酸化ストレス度の有意な低下が認められた。また、WER は腎臓および肝臓の過酸化脂質含量および抗酸化酵素活性を正常群と同レベルに維持し、組織学的障害を軽減した。これらの結果から、WER は糖尿病における高血糖および酸化ストレスを低下さ

せ、臓器障害を予防・改善する可能性が示された。

【キーワード】

靈芝菌糸体培養培地抽出物 (WER), 糖尿病, 酸化ストレス, ストレプトゾトシン, マウス

はじめに

近年、先進諸国において大きな社会問題となっている糖尿病は、虚血性心疾患や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の危険因子であり、また、糖尿病性腎症、神経障害、および網膜症等の様々な合併症を誘発する。これらの糖尿病合併症の発症および進行には、糖尿病の持続的高血糖状態による体内酸化ストレスの増大が強く関与していることが明らかになっている¹⁾。酸化ストレスの原因物質であるスーパーオキシドアニオン (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) などの活性酸素種 (ROS) は、DNA の損傷や脂質の過酸化、タンパク質の変性などを誘導し、生体にとって有害な反応を引き起こす。

受理日：2008年6月15日

* 〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台1-1 城西大学薬学部医療栄養学科生体防御学講座 Tel: 049-271-7285 Fax: 049-271-7284
E-mail: seitaib@josai.ac.jp

高血糖状態では、終末糖化産物 (AGES) の生成過程で血管内皮細胞において ROS が発生し、血管障害が引き起こされることが報告されている¹⁾。また、ROS によってもたらされる種々の毒性に対して、生体内ではスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) といった抗酸化酵素などの内因性の ROS 除去機構の存在が知られているが、糖尿病状態では、組織中の抗酸化酵素活性が低下し、また、ビタミン C、ビタミン E やグルタチオンなどの抗酸化物質も減少することが明らかになっている^{2,3)}。ROS は、糖尿病のみならず多くの疾患に関与することが明らかになっており、これらの疾病予防やその改善効果を目的とした酸化ストレスの軽減が重要視されてきている。近年、多くの基礎研究^{2,3)}や疫学研究⁴⁾から抗酸化食品等の摂取による ROS 除去が酸化ストレスの軽減に有効であるとの知見が得られており、抗酸化ビタミンやポリフェノール等の抗酸化物質、またはこれらを含む抗酸化食品の摂取による糖尿病の改善や二次的障害の予防に注目が集まっている。

靈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。マンネンタケの子実体あるいはその成分に関する研究は数多く、免疫調節作用⁵⁾や抗悪性腫瘍作用⁶⁾、抗ウイルス作用⁷⁾、コレステロール低下作用⁸⁾、抗酸化作用⁹⁾などが報告されている。また、血糖降下作用についてもいくつかの研究報告がある^{10,11)}。一方、靈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体培地に接種し、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、主にマンネンタケの菌糸体成分を由来とし、水溶性リグニンをはじめとした菌糸細胞による固体培地の分解物や菌糸体の自己消化成分等を含有している。WER もまた、滋養強壮を目的とした健康食品として用いられており、これまで民間療法において、糖尿病患者の高血糖改善効果を認めた例があるが、未だ科学的な検証が不十分である。我々は、これまでに WER の α -グルコシダーゼ阻害活性および正常血糖マウスにおけるマルトース負荷後の血糖上昇抑制効果を明らかにしているが¹²⁾、糖尿病における高血糖や酸化ストレス状態、およびこれらによる二次的障害に対する WER の予防・改善効果については未検討である。

そこで本研究では、まず *in vitro* の実験系を用い、WER の O_2^- 消去能および過酸化脂質産生抑制能を調査した。また、WER の長期摂取による糖尿病状態への影響を明らかにするために、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスに WER を約 2 ヶ月間経口投与し血糖値の変化を経

時的に観察した。さらに、体内酸化ストレス度、血中脂質、アスパラギン酸アミトランスフェラーゼ (AST) およびアラニンアミトランスフェラーゼ (ALT) 値、臓器の過酸化脂質含量、抗酸化酵素 (SOD, CAT, GPx) 活性に対する影響についても検討した。また、糖尿病における肝臓および腎臓の障害に対する WER の保護効果について組織学的評価を行った。

方法・材料

1. 実験材料

本研究に用いた WER は、野田食菌工業（株）において製造されたもの（商品名：MAK）であり、その調製法は次に示すとおりである。バガス（砂糖キビ搾汁残渣）と脱脂した米糠の混合固体培地（バガス：米糠=9:1, w/w）にマンネンタケ菌糸体ペレットを接種し、子実体発生直前まで約 3.5 ヶ月間培養した後、培地を破碎し、60°C の温水で 16 時間抽出した。得られた抽出液を 0.45 μ m のメンブランにて濾過滅菌し、凍結乾燥したものを WER とした。本実験では、マンネンタケ菌糸体の培養経過における成分および抗酸化活性の変化を調べるために、通常の WER の他にマンネンタケ菌糸体の培養期間を 1, 2, 3, 4, または 5 ヶ月間としたものについても同様に調製した。また、*in vitro* の抗酸化活性を比較するための標準品としてビタミン C (L-ascorbic acid) および Trolox (2-carboxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-ol) を和光純薬工業より購入し用いた。

2. WER の成分組成の測定

全糖はフェノール硫酸法¹³⁾、タンパク質はセミミクロケルダール法¹⁴⁾、リグニンはイオン化示差法¹⁵⁾により測定した。

3. WER の抗酸化活性の測定

3.1 スーパーオキシドアニオン (O_2^-) 消去能¹⁶⁾

ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系によって発生する O_2^- と発光試薬とを反応させ、以下のように試料の O_2^- 消去能を発光の阻害率で評価した。発光測定用の 96 穴プレートに、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (170 μ L, pH 7.5)、発光試薬であるメチルメトキシフェニルエチニルイミダゾピラジノン (MPEC, ATTO Co., Ltd.; 10 μ L)、試料 (10 μ L)、およびキサンチンオキシダーゼ溶液 (xanthine oxidase, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA; 60 μ L) をそれぞれ分注した。続いて、ヒポキサンチン (hypoxanthine, 和光純薬工業; 50 μ L) を分注し、その後から生じた発光をマルチラベルカウンター (1420

ARVOsx, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) にて測定した。1秒間毎の発光値を10秒から110秒まで測定し、試料非存在下の発光積算値(a)と試料存在下の発光積算値(b)を求め、阻害率(%)=(1-b/a)×100の式から阻害率を算出した。各試料の効力は、50%阻害濃度(IC₅₀)で比較した。

3.2 過酸化脂質産生抑制能の測定

各試料の過酸化脂質産生抑制能は、チオバルビツール酸(TBA)法を用い、リノール酸の自動酸化抑制能を指標として評価した¹⁷⁾。キャップ付き試験管に、2 mg/mLのリノール酸(linoleic acid, 和光純薬工業)および試料を20 μLずつ入れ、よく混和した。試験管のキャップをはずし、80°Cの浴槽にて60分間加熱した後、氷中で速やかに室温まで冷却した。その後、200 μLの20 mM プチルヒドロキシトルエン(butylhydroxytoluene, 和光純薬工業)を加えてリノール酸の酸化反応を停止させた。次に、200 μLの8%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS, 和光純薬工業)および400 μLの精製水を加えよく混和した後、125 mM リン酸緩衝液(pH 3.0)で溶解した3.2 mLの0.67%チオバルビツール酸(2-thiobarbituric acid, 和光純薬工業)を加え、キャップを閉めて沸騰水中で15分間加熱した。氷中で室温まで冷却し、4 mLの酢酸エチルを加えてよく混和した後、遠心(550×g, 10分間, 室温)し、上層の酢酸エチル層の蛍光(Ex 515-Em 555)を蛍光光度計(RF-1500, 島津製作所)にて測定した。前述のO₂⁻消去能と同様に阻害率を算出し、各試料の効力を50%阻害濃度(IC₅₀)で比較した。

4. 糖尿病マウスの作製

すべての動物実験は、総理府の「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」および「城西大学動物実験規定」に従って行った。ICRマウス(♂, 4週齢)32匹を東京実験動物(株)より購入し、室温23±2°C、湿度55±10%、12時間の明暗サイクルで飼育した。固体飼料(CE-2, 日本クレア)および水は自由に摂取させた。1週間の予備飼育期間にマウスを胃内ゾンデによる経口投与および尾静脈からの採血操作に馴化させた。無作為に選別した16匹にSTZ(150 mg/kg, 和光純薬工業)を腹腔内投与し、糖尿病マウス(STZ)として実験に用いた。STZは50 mM クエン酸緩衝液(pH 4.5)に溶解し使用した。残りの16匹にはクエン酸緩衝液のみを同様に投与して飼育した後、正常血糖(Normal)マウスとした。これらのNormalおよびSTZマウスをさらに対照群とWER投与群の2群(各n=8)に無作為に分け、対照群には蒸留水を、WER群にはWER(1 g/kg, 蒸留水に溶解)を1日1回、9週間経口投与し、1あるいは2週間毎に非絶食時

において尾静脈から採血し血糖値を測定した。血糖値の測定には簡易型血糖値測定器(デキスターZII, バイエルメディカル)を用いた。

5. 生体内酸化ストレス度、中性脂肪、総コレステロール、ASTおよびALT値の測定

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¹⁸⁾。マウスの尾静脈から採取した10 μLの血漿をキット付属の酢酸緩衝液に加えて混和し、10 μL呈色クロモゲン(N,N-diethyl-p-phenylenediamine)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)にて測定した。d-ROMs テストキットおよびF.R.E.E.はDiacron International社(Grosseto, Italy)より代理店(Wismerrl社)を通じて購入した。また、WER投与期間終了後、解剖時に血液を採取し、得られた血漿を検体として、富士ドライケム3500(富士メディカル)を用いて中性脂肪、総コレステロール、ASTおよびALT値を測定した。

6. 臓器中の過酸化脂質含量の測定

臓器中の過酸化脂質含量は、TBA法を用いて測定した¹⁹⁾。9週間の経口投与終了後、マウスの脳、心臓、肝臓、脾臓および腎臓を摘出し、それぞれの組織サンプルに対して10% (w/v) になるようにプロテアーゼインヒビター[1 μg/mL Pepstatin A, 1 μg/mL Leupeptin, 10 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 μg/mL プロテアーゼ阻害剤ミックス(AEBSF 塩酸塩(100 mM), アプロチニン(80 μM), ベスタチン(5 mM), E-64 プロテアーゼ阻害剤(1.5 mM), ロイペプチノミ硫酸塩(2 mM), ペプスタチンA(1 mM))(以上、和光純薬工業), 1 μL/mL Trasylol(Bayer Medical, Land Nordrhein-Westfalen, Germany)]を含む1.15%塩化カリウム溶液を加え、ホモジナイザーで粉碎した。キャップ付き試験管に0.2 mLの組織ホモジネートおよび0.2 mLの8.1% SDS, 1.5 mLの20%酢酸緩衝液(pH 3.5), 0.05 mLの0.8%プチルヒドロキシトルエン酢酸溶液, 1.5 mLの0.8%ジエチルチオバルビツール酸(1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid, Sigma Aldrich), 0.7 mLの蒸留水を順に分注し、十分混和した後、5°Cで60分間静置した。続いて95°Cで60分間煮沸した後、流水で10分間速やかに冷却して室温に戻し、1.0 mLの蒸留水、およびブタノール(1-butanol, ナカライトスク)とピリジン(和光純薬工業)の混合物(15:1 (v/v))を5.0 mL加え、よく混和し10分間静置した。続いて、1200×g, 室温の条件下で10分間遠心し、有機層(上層)の吸光度(532 nm)を

測定した。試料 1 g あたりの赤色色素量 ($\mu\text{mol}/\text{mg tissue}$) は、 $((A-A_0)/156000) \times (5.8/10^3) \times (10^2/3) \times 10^6$ の計算式から算出した。それぞれの組織のタンパク質含量は Lowry 法により測定した¹⁴⁾。

7. 抗酸化酵素活性の測定²⁰⁾

7.1 SOD 活性の測定

肝臓および腎臓組織中の SOD 活性は、SOD Assay Kit-WST (同仁化学) を用いて測定した。各臓器を生理食塩水で十分洗浄し、湿重量に対して 4 倍量のスクロース緩衝液 (0.25 mol/L スクロース、10 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4)、1 mmol/L EDTA) を加え、ホモジナイザーで粉碎した。ホモジネートを $78000 \times g$ 、4°C、60 分間遠心し、上清を測定試料として用いた。測定試料の SOD 活性を検量線から算出し、unit/mg protein で表した。

7.2 CAT 活性の測定

組織中の CAT 活性は、過酸化水素 (H_2O_2) の減少勾配から算出した¹⁹⁾。過酸化脂質含量測定時と同様に調製した 10% (w/v) の組織ホモジネート 60 μL を 1.94 mL の 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に混和し、1.0 mL の 0.059 M H_2O_2 を添加した。その後から 4 分間の吸光度 (波長 240 nm; A_{240}) の変化を 10 秒毎に測定した。最初の 1 分間の測定値を用いて減少勾配を求め、unit/mg protein = $(\Delta A_{240}/\text{min} \times 1000)/(43.6 \text{ mg enzyme/mL reaction mixture})$ の式より CAT 活性を算出した。

7.3 GPx 活性の測定

組織中の GPx 活性は、NADPH の NADP⁺への酸化による減少率から算出した²¹⁾。組織湿重量に対して 10% (w/v) の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、ホモジナイザーで粉碎した。粉碎後、 $10000 \times g$ 、4°C で 20 分間遠心し、上清を測定試料として用いた。10% (w/v) の組織ホモジネート 0.1 mL を反応溶液 (1.44 mL の 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1 mL の 1 mM EDTA、0.1 mL の 1 mM sodium azide、0.05 mL の 240 mU/mL glutathione reductase、0.1 mL の 1 mM glutathione、0.1 mL の 0.2 mM NADPH (以上、和光純薬工業)) に混和し、37°C の水浴にて 3 分間インキュベートした後、0.01 mL の 0.25 mM H_2O_2 を添加した。その後から 4 分間の吸光度 (340 nm) の変化を 10 秒毎に測定した。4 分間の測定値を用いて減少勾配を求め、nmol NADPH oxidized/min/mg protein として算出した。

8. ヘマトキシリン-エオジン染色による肝臓および腎臓の組織化学的評価

肝臓および腎臓を 10% ホルマリン-0.1% リン酸緩衝液にて 24 時間浸漬固定し、12.5% および 25% スクロースで順次置換した後、凍結ブロックを作製した。クライオス

タット (CM3050S, Leica, Bensheim, Germany) にて組織を 10 μm 厚に薄切し、常法³⁾ に従いヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

9. 統計計算

データの数値は全て平均値 \pm 標準偏差で表した。群間の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. マンネンタケ菌糸体の培養経過と成分組成の変化

バガスと米糠からなる固体培地を充填した培養基に、マンネンタケ菌糸体を接種し、培養経過を 1 ヶ月単位で観察したところ、菌糸体接種 1 ヶ月後には菌糸が培養基全体の 2/3 から 3/4 程度に繁茂した状態になった。2 ヶ月経過すると菌糸が全体に蔓延し菌糸密度が増加し、4 カ月後には子実体の発生が始まった。5 カ月後には、子実体の伸長と培地の収縮が認められた。これらの 1 ヶ月毎のマンネンタケ菌糸体培養培地から WER サンプルを調製し、糖質、タンパク質、リグニンの比率の変化を調査した (図 1)。その結果、灰分およびタンパク質の含量 (%) は、培養期間を通じてほぼ一定の値を示したが、リグニンの比率は培養開始後徐々に増加し、培養 3 ヶ月で最大となり、4 ヶ月間以降はほぼ一定となった。糖質の含量 (%) は培養 3 ヶ月で最大となり、その後徐々に減少した。

2. WER の *in vitro* 抗酸化活性評価

In vitro の実験系において、WER の O_2^- 消去能および過酸化脂質産生抑制能を調査した (表 1)。WER の O_2^- 消去能は、ビタミン C と比べて弱いものであったが、1

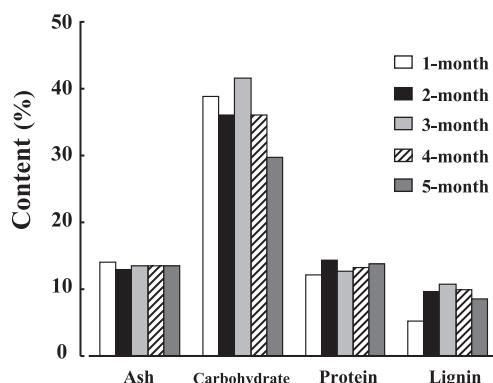


図 1 Content (%) of ash, carbohydrate, protein, and lignin of water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia cultured for various periods (1–5 months).

～5ヶ月間培養サンプルは、全て濃度依存的なO₂⁻消去能を示した。中でも3ヶ月間培養サンプルが最も高い効果を示し、4ヶ月間培養サンプルについても3ヶ月間のものと同等の効果が認められたが、それ以降の活性の上昇はみられなかった。一方、過酸化脂質産生抑制能については、1～4ヶ月間培養サンプルは、すべてビタミンCと同等かそれ以上の効力を示した。特に、2ヶ月間培養サンプルが最も高い効果を示し、5ヶ月間培養したサンプルの過酸化脂質産生抑制能は著しく減弱した。培地成分であるバガスおよび米糠のO₂⁻消去能はWERのどの培養期間のサンプルよりも弱かったが、バガスの過酸化脂質産生抑制能はWERの3ヶ月間培養サンプルと同等の比較的高い効力を示した。これらの結果からWERの抗酸化能は培養期間によって変化し、2～3ヶ月間培養で最大となることが明らかとなった。

3. 糖尿病マウスの血糖値に対するWERの影響

WER水溶液(1 g/kg)をNormalおよびSTZマウスに一日一回経口投与し、血糖値の推移を観察した(図2)。STZの投与により、マウスの血糖値は徐々に上昇し、6～8週間で約900 mg/dLに達し一定となった。WERを投与したSTZ群(STZ+WER)では、蒸留水を投与した群(STZ+water)と比較し、WER投与後4週以降からマイクロドな高血糖の抑制が認められた。また、WERはNormal群の血糖値には影響を与えたなかった。一方、データは示さないがSTZ+water群はNormal+water群と比較し低体重を示したが、WERはNormalおよびSTZマウスの体重には影響を与えたなかった。

表1 IC₅₀ of water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia cultured for various periods (WER, 1～5 months) and components of the culture medium to O₂⁻ and lipid peroxidation

WER (month)	IC ₅₀ (mg/mL)	
	O ₂ ⁻	lipid peroxidation
1	2.54	4.94
2	1.33	2.60
3	1.11	3.21
4	1.11	4.89
5	1.26	54.56
Bagasse	7.96	3.49
Rice bran	11.11	10.62
Vitamin C	0.02	5.55
Trolox	2.20	0.34

Data are means of three replicate IC₅₀ values in three separate experiments.

4. 糖尿病マウスの体内酸化ストレス度、中性脂肪値、総コレステロール値、ASTおよびALT値に対するWERの影響

蒸留水またはWERを投与したNormalおよびSTZ各群において、d-ROMsテストを用い、血中ヒドロペルオキシド濃度を指標とした体内酸化ストレス度を経時に測定した(図3)。STZ+water群では、STZ投与後5週以降においてNormal+water群と比較し酸化ストレス度の有意な上昇が認められた。これに対して、STZ+WER群では酸化ストレス度の上昇はみられず、Normal群と同レベルであった。Normal+WER群においては、有意な体内酸化ストレス度の低下は認められなかった。また、STZ+water群の中性脂肪値、ASTおよびALT値はNormal+water群に比べ有意に高い値を示したが、

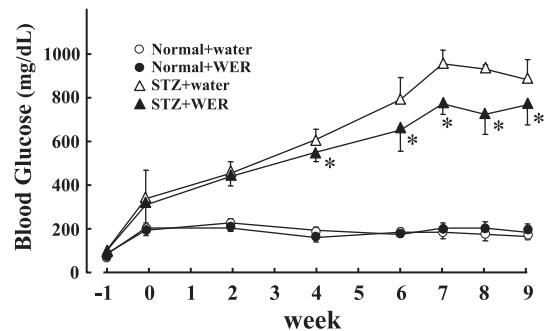


図2 Effects of oral administration of WER (1 g/kg) on non-fasting blood glucose levels in ICR mice after a single injection of STZ (150 mg/kg, i.p.). Each plot represents mean±S.D. for 8 mice in each group. *, P<0.05 compared with the STZ+water group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

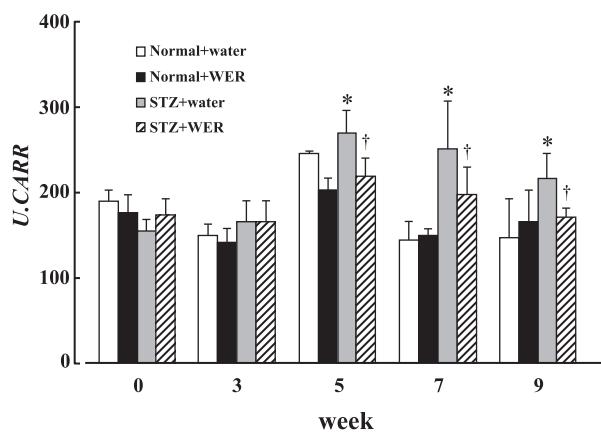


図3 Effects of WER (1 g/kg, p.o.) on total plasma oxidative stress in normal and STZ-induced diabetic mice determined by d-ROMs test. The data are represented as means±S.D. from 6～8 mice in each group. 1 U. CARR=0.08 mg/100 mL H₂O₂. *, P<0.05, compared with the Normal+water group. †, p<0.05 compared with the STZ+water group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

表 2 Effects of WER on lipid profile and hepatic enzyme activities in normal and STZ mice

	Normal+water	Normal+WER	STZ+water	STZ+WER
Triglycerides (mg/dL)	91.0±26.0	97.8±14.5	148.3±38.7*	91.8±10.1†
Total cholesterol (mg/dL)	83.1±10.9	89.7±12.9	113.6±16.2	111.8±14.3
AST (unit/L)	41.8±6.3	43.9±5.8	84.8±11.6*	58.3±9.7†
ALT (unit/L)	21.8±5.2	24.7±6.4	48.0±11.2*	34.5±3.9†

Each value is mean±S.E.M. for 8 mice in each group.

* $P<0.05$ vs Normal+water; † $P<0.05$ vs STZ+water.

STZ+WER 群ではこれらの変化は認められず、STZ+water 群と比較し有意に減少していた（表 2）。Normal+WER 群と Normal+water 群の間に差は認められなかった。総コレステロール値に関しては、STZ 群で高い傾向がみられたが、正常の範囲であり、WER による影響も認められなかった。

5. マウス臓器中の過酸化脂質含量に対する WER の影響

STZ+water 群の肝臓および腎臓の過酸化脂質含量は、Normal+water 群と比較し、約 2 倍程度有意に増加していた（図 4）。STZ+WER 群では、過酸化脂質含量の増加は認められず、STZ+water 群と比較し有意に低い値を示した。心臓、脳、脾臓、および肺においても同様の傾向がみられた。

6. 肝臓および腎臓の抗酸化酵素活性に対する WER の影響

過酸化脂質含量の測定結果において WER の効果が認められた肝臓と腎臓について、これら臓器中の抗酸化酵素活性に対する WER の影響を調査した（図 5）。STZ+water 群の肝臓と腎臓では、SOD（図 5A）、CAT（図 5B）、および GPx（図 5C）の活性が Normal+water 群に比べ有意に低下していた。これに対し STZ+WER 群では、

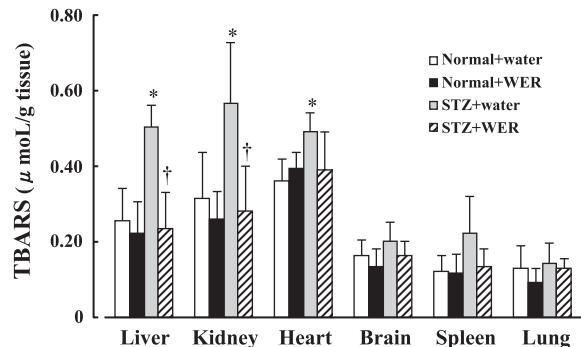


図 4 Effects of WER (1 g/kg, p.o.) on lipid peroxidation in various tissues of the normal and STZ-induced diabetic mice determined by assaying thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). The data are represented as means±S.D. from 4–5 mice in each group. *, $P<0.05$, compared with the Normal+water group. †, $P<0.05$ compared with the STZ+water group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

いずれの抗酸化酵素においても活性の低下はみられず、Normal 群と同程度の活性が維持されていた。また、Normal+WER 群と Normal+water 群との間に差は認められなかった。

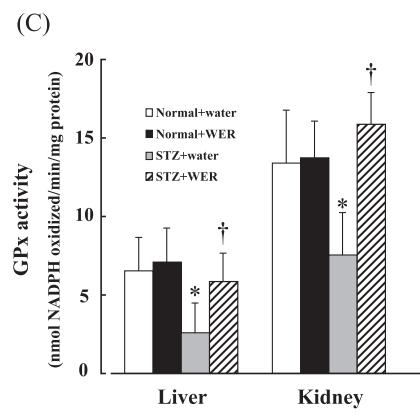
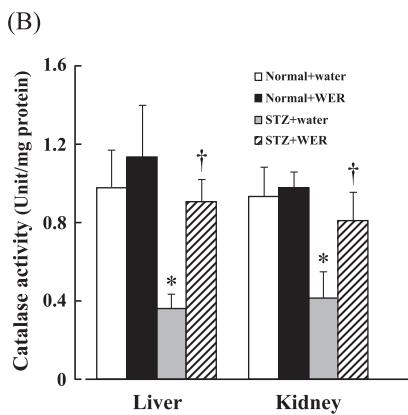
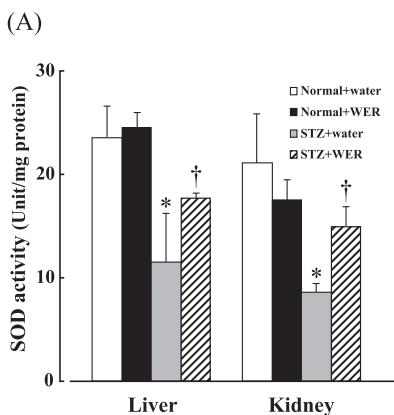


図 5 Effects of WER (1 g/kg, p.o.) on (A) SOD, (B) CAT, and (C) GPx in liver and kidney of normal and STZ-induced diabetic mice. The data are represented as means±S.D. from 4–5 mice in each group. *, $P<0.05$, compared with the Normal+water group. †, $P<0.05$ compared with the STZ+water group, one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

7. ヘマトキシリン-エオジン染色による肝臓および腎臓の組織化学的評価

STZ+water群の肝臓では、肝細胞の軽度から中等度の萎縮とこれによる類洞の拡張が認められたが、STZ+WER群ではこれらの異常は軽微であった(図6)。

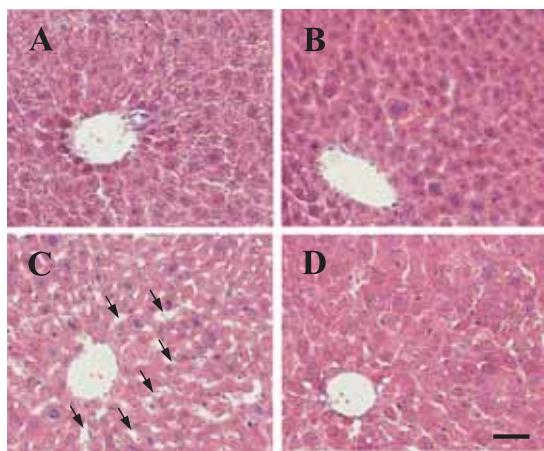


図6 Histological findings of STZ-induced diabetic liver damage in mice. Liver sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) from Normal+water (A), Normal+WER (B), STZ+water (C), STZ+WER (D). Diabetic liver showed moderate dilation of hepatic sinusoids ((C); arrowheads) and slight hepatocellular degeneration, whereas WER treated diabetic liver showed slight sinusoidal dilation. H&E, horizontal bar: 50 μ m.

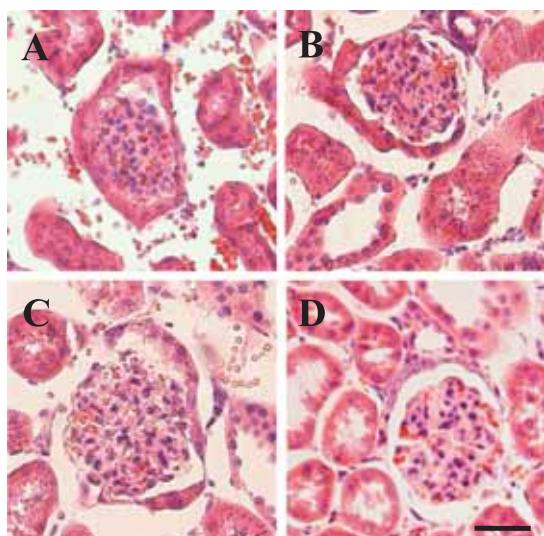


図7 Effects of WER on histological alteration in STZ-induced diabetic kidney in mice. Kidney sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) from Normal+water (A), Normal+WER (B), STZ+water (C), STZ+WER (D). Diabetic kidney showed expansion of mesangial matrix, whereas WER treated diabetic kidney showed normal glomeruli. H&E, horizontal bar: 20 μ m.

また、STZ+water群の肝臓では、肝細胞の軽微な変性像が認められたが、STZ+WER群では認められなかった。一方、STZ+water群の腎臓では、糸球体のメサンギウム基質領域の拡大が認められたが、STZ+WER群ではこれが抑制されていた(図7)。データは示さないが、STZ+water群の腎において、尿細管間質で限局性の慢性炎症性細胞浸潤および肉芽形成が見られたが、STZ+WER群ではこのような異常は認められなかった。

考 察

WERは、マンネンタケ菌糸体を固体培地に接種し、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用いられている。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体培地の分解物や菌糸体の自己消化成分等を含有しており、生理活性として、免疫賦活作用²²⁾、抗腫瘍作用²³⁾などがこれまでに報告されている。WERの健康食品としての使用例では、高血糖や高血圧、肝機能の改善等の様々な効果が認められているが、科学的な証明はほとんどなされておらず、その生理活性についての基礎的検討も十分ではない。我々は、WERの生活習慣病の予防や改善効果について動物実験による検討を行い、これまでにWERが α -グルコシダーゼであるマルターゼ、アミラーゼおよびスクラーゼの阻害活性を有すること、正常血糖マウスにおけるマルトース負荷後の血糖値の上昇がWERの前投与によって抑制されることを明らかにしているが¹²⁾、糖尿病マウスにおけるWERの予防・改善効果については未検討であった。また、当研究室では、糖尿病ラットの一過性脳虚血障害に対するWERの脳保護作用²⁴⁾についても明らかにしており、この作用は虚血再灌流時に発生する酸化ストレスの軽減に起因すると考えられたが、WERの抗酸化活性についての詳細は明らかではなかった。さらに、WERの原料であるマンネンタケ菌糸体の繁茂・蔓延から子実体の発生に至るまでの経過に伴う生理活性の変化についても未検討であった。そこで、今回、菌糸体の培養期間別(1~5ヶ月)に調製したWERの成分組成を調査し、さらにin vitroにおける抗酸化作用評価実験を行った。その結果、WERの含有成分のうち、特にリグニン含量が菌糸体の繁茂に伴って増加することが明らかになった。抗酸化作用については、菌糸体を2~4ヶ月間培養し調製したWERが比較的強いO₂⁻消去能および過酸化脂質産成抑制作用を有することが示された。これまでマンネンタケの子実体を用いた研究は数多く、子実体の

熱水抽出物が過酸化脂質産生抑制能やラジカル捕捉能などの抗酸化作用を有することが報告されている²⁵⁾。マンネンタケからは、多糖体(GLPS)やトリテルペノイドなど100を超える生理活性物質が単離されており、なかでもGLPSは、マンネンタケの生理活性の中心をなす成分として多数の研究報告がなされている。また、Sunら²⁶⁾は、発酵靈芝粉末より抽出した水溶性ペプチド(GLS)が強いラジカル捕捉能や過酸化脂質産生抑制能を有することを報告しており、マンネンタケの広範な効能は、このような強い抗酸化活性に基づいている可能性が示されている。一方、マンネンタケ菌糸体の抗酸化作用についての研究はほとんどない。Yangら²⁵⁾は、ラジカルを介した四塩化炭素による肝毒性に対して、菌糸体由来のプロテオグリカン(GLPG)が保護作用を示すことを報告している。今回明らかになったWERの抗酸化能は、マンネンタケ子実体熱水抽出物²⁷⁾とほぼ同等であった。WERの抗酸化活性成分としては、多糖体、プロテオグリカン、テルペノイドなどマンネンタケ菌糸体由来成分に加え、菌糸体による固体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等が考えられるが、その活性本体については今後検討が必要である。

WERが比較的強い抗酸化活性を有することから、STZ誘発糖尿病マウスにWERを長期間経口投与し、血糖値への影響を調査した。その結果、WERは正常血糖マウスの血糖値に影響を与えることなく、STZ群における血糖上昇をマイルドに抑制した。また、d-ROMsテストの結果から、STZマウスにおける体内酸化ストレスの増大がWERにより抑制されることが明らかになった。さらに、糖尿病態における中性脂肪値や臓器の過酸化脂質含量および抗酸化酵素活性に対するWERの影響について検討したところ、STZマウスにおいては、中性脂肪値の上昇、肝臓、腎臓、および心臓の過酸化脂質含量の増加が確認され、また、肝臓および腎臓においてSOD、CAT、およびGPx活性の低下が認められたが、これらの異常がWERによって抑制され、正常レベルに維持されることが示された。組織化学的な検討から、STZマウスの肝臓においては肝細胞の萎縮と類洞の拡張が認められたが、WERを投与したマウスではこれらの異常が抑制されており、また、肝障害の指標であるASTおよびALT値も正常レベルに近い値を示した。また、WERは、STZマウスの腎臓において認められた糸球体のメサンギウム基質領域の拡大も抑制した。糖尿病態下では、細胞膜の不安定化や機能性タンパク質の障害による肝細胞障害、同様の糸球体毛細血管内皮の障害に起因したメサンギウム領域の活性化が生じるが、WERは、STZマウスにおける酸化ストレスの増大やこれら肝臓、腎臓の組織障害に対し

て保護効果を示すことが明らかになった。

酸化ストレスは脂質の過酸化や酵素などの機能性タンパク質の障害を引き起こし、酸化ダメージによる細胞死および様々な血管作動性物質の産生を誘導することにより、生体機能に悪影響を及ぼす²⁸⁾。糖尿病における持続的高血糖状態では、血管内皮細胞におけるAGEs産生に伴うROSの発生や、グルタチオン系などのROS消去機能の低下、プロテインキナーゼCの活性化等により、血管障害や動脈硬化が進行し、様々な合併症が引き起こされる^{1,28)}。また、糖尿病態における抗酸化ビタミンやグルタチオンなどの生体内抗酸化因子の消費の増大や、抗酸化酵素活性の低下等の生体内抗酸化力の低下は、さらなるROSの増大を引き起こす^{1,28)}。また、長期にわたるインスリンの絶対的または相対的不足は、糖および脂質代謝異常を原因とする種々の系路を介して糖尿病の増悪化を招くと考えられている。

近年、多くの基礎研究や疫学研究から抗酸化食品や食品成分の摂取による酸化ストレスの軽減に注目が集まっている、これまでに、赤ワイン²⁾、ルチン³⁾、熱帶性薬用植物であるScoparia dulcisのエキス²⁹⁾等によって、糖尿病における高血糖状態や抗酸化酵素活性の低下等の異常が抑制されたとの報告があり、今回のWERの効果においても、その作用メカニズムや活性本体の詳細は不明であるものの、WERの抗酸化能による寄与が大きいと推察できる。マンネンタケ成分の血糖降下作用については、マンネンタケ子実体に含まれる多糖類のガノデランAおよびB³⁰⁾、 α -グルコシダーゼ阻害作用を示すSKG-3などが報告されている³¹⁾。当研究室においても、WERの α -グルコシダーゼ阻害作用をすでに報告しており¹²⁾、WERの血糖上昇抑制のメカニズムの一つに、 α -グルコシダーゼ阻害作用が含まれていると考えられる。また、マンネンタケの子実体から熱水抽出された分子量約58万の多糖類が、膵臓B細胞からのインスリン分泌を促進するとの報告がなされている¹⁰⁾。今回、データは示さなかつたが、WERの血中インスリン量に対する影響は認められなかつたことから、今後血糖上昇抑制のメカニズムを明らかにするために、さらなる調査が必要であると考えている。

結論

本研究結果より、WERの長期摂取は糖尿病態における体内的酸化ストレスを軽減し、マイルドな高血糖改善効果をあらわすことが示された。また、WERは、糖尿病態における肝臓および腎臓の組織障害に対して保護効果を示した。今後は、WERの血糖上昇抑制成分の探索とその

メカニズムの解明についてさらに検討を行う必要があると考えられる。

助成源

本研究の一部は、独立行政法人日本学術振興会科学研費補助金「肥満および糖尿病による中枢性呼吸機能障害に関する基礎的研究」(課題番号: 16790450), 「糖尿病による中枢神経障害の分子メカニズムと新規抗酸化食品の改善効果」(課題番号: 19590700) により実施された。

参考文献

- 1) Baynes J. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40(4): 405–412.
- 2) Montilla P, Barcos M, Munoz MC, et al. Red wine prevents brain oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38(5): 539–544.
- 3) Kamalakkannan N, Stanely Mainzen Prince P. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem* 2006; 293(1–2): 211–219.
- 4) Riccioni G, Bucciarelli T, Mancini B, et al. Antioxidant vitamin supplementation in cardiovascular diseases. *Ann Clin Lab Sci* 2007; 37(1): 89–95.
- 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) 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.
- 13) Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 1956; 28(3): 350–357.
- 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265–275.
- 15) Iiyama K, Wallis AFA. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Sci Technol* 1988; 22(3): 271–280.
- 16) Kurokawa T, Itagaki S, Yamaji T, et al. Antioxidant activity of a novel extract from bamboo grass (AHSS) against ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(11): 2301–2303.
- 17) Furuta S, Nishiba Y, Suda I. Fluorometric Assay for Screening Antioxidative Activity of Vegetables. *J Food Sci* 1997; 62(3): 526–528.
- 18) 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. 2001; 131(12): 3208–3211.
- 19) Shah ZA, Gilani RA, Sharma P, et al. Cerebroprotective effect of Korean ginseng tea against global and focal models of ischemia in rats. *J Ethnopharmacol* 2005; 101(1–3): 299–307.
- 20) Ukeda H, Sarker AK, Kawana D, et al. Flow-Injection Assay of Superoxide Dismutase Based on the Reduction of Highly Water-Soluble Tetrazolium. *Anal Sci* 1999; 15(4): 353–357.
- 21) Mohandas J, Marshall JJ, Duggin GG, et al. Differential distribution of glutathione and glutathione-related enzymes in rabbit kidney. Possible implications in analgesic nephropathy. *Biochem Pharmacol* 1984; 33(11): 1801–1807.
- 22) 中川育也, 日比野康英, 大橋康宏ら. マンネンタケ (靈芝) 菌糸体培養基より得られるヘテロ多糖・蛋白質画分 (MTP2) によるマウス腎細胞の傷害活性の増強. *Biotherapy* 1999; 13: 513–515.
- 23) 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.
- 24) 岩田直洋, 岡崎真理. 笠原知里ら. 糖尿病マウスにおける靈芝菌糸体培養培地抽出物の保護効果. *日本栄養・食糧学会誌*. 2008; 61(3): 119–127.
- 25) Yang XJ, Liu J, Ye LB, et al. In vitro and in vivo protective effects of proteoglycan isolated from mycelia of *Ganoderma lucidum* on carbon tetrachloride-induced liver injury. *World J Gastroenterol* 2006; 12(9): 1379–1385.
- 26) Sun J, He H, Xie BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Agric Food Chem* 2004; 52(21): 6646–6652.
- 27) Nakajima Y, Sato Y, Konishi T. Antioxidant small phenolic ingredients in *Inonotus obliquus* (persoon) Pilat (Chaga). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2007; 55(8): 1222–1226.
- 28) Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212(2): 167–178.
- 29) Pari L, Latha M. Protective role of *Scoparia dulcis* plant extract

- on brain antioxidant status and lipidperoxidation in STZ diabetic male Wistar rats. *BMC Complement Altern Med* 2004; 4: 16.
- 30) Hikino H, Konno C, Mirin Y, et al. Isolation and Hypoglycemic Activity of Ganoderans A and B, Glycans of *Ganoderma lucidum* Fruit Bodies1. *Planta Med* 1985; 51(4): 339–340.
- 31) Kim SD, Nho HJ. Isolation and characterization of alpha-glucosidase inhibitor from the fungus *Ganoderma lucidum*. *J Microbiol* 2004; 42(3): 223–227.

ABSTRACT

Antioxidant Properties of a Water-soluble Extract from Culture Medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) Mycelia and Antidiabetic Effects in Streptozotocin-treated Mice

Mari OKAZAKI¹, Aiko TANAKA¹, Yuko HATTA¹, Yukiko KAWAHARA¹, Shinya KAMIUCHI¹, Naohiro IWATA¹, Satoshi ASANO², Fumiko SUZUKI³, Hiroshi IIZUKA³, Yasuhide HIBINO¹

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

² *Post-marketing surveillance, Development & Medical Affairs Division, GlaxoSmithKline K.K.*

³ *Noda Shokukinkogyo Co. Ltd.*

Objective: *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) is widely used as an alternative medicine agent to promote health and longevity. The water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia (WER) is prepared from a solid medium composed of bagasse and rice bran overgrown for 3–4 months with *Ganoderma lucidum* mycelia.

Design: In this study, we evaluate antioxidant activity of WER *in vitro*, and examined the effects of oral treatment of WER on oxidative stress in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice.

Method: Male ICR mice were treated with STZ (150 mg/kg, i.p.) and were housed for a week for induction of experimental diabetic state. WER (1 g/kg daily) was orally administered for an additional 9 weeks, and the levels of blood glucose, oxidative stress in plasma, liver and kidney of the mice were assessed.

Result: WER inhibited generation of superoxide anion and lipid peroxidation in concentration dependent manner *in vitro*. Oral administration of WER to diabetic mice significantly reduced the levels of blood glucose, hydroperoxides, triglyceride, ALT, and AST. Moreover, WER prevented the increase in lipid peroxide levels and the decrease in activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) in liver and kidney of diabetic mice. In addition, histochemical studies revealed that treatment of WER precluded the sinusoidal dilation in liver and expansion of mesangial matrix in kidney of diabetic mice. Normal mice treated with WER showed no change in any parameters studied.

Conclusion: These data suggested that WER can act as an antioxidant *in vivo*, and show the antidiabetic effects by relieving diabetic hyperglycemia-induced oxidative stress.

Key words: water-soluble extract of *Ganoderma lucidum* mycelia (WER), antidiabetic, oxidative stress, streptozotocin, mice