

血圧調節作用を持つたもぎ茸由来機能性食品の開発と利用

富山 隆広 [株式会社スリービー／品質管理室長]
海方 忍 [株式会社スリービー／主任研究員]
鈴木 直子 [株式会社スリービー／研究員]
萩原 伸哉 [株式会社スリービー／研究員]
寺澤 実 [北海道大学大学院農学研究科／教授]

背景・目的

きのこ類には様々な生理活性があることが知られている。その中にあって、たもぎ茸については詳しい研究がなされていなかった。我々が生産しているスリービーのたもぎ茸について、アンジオテンシン変換酵素阻害活性を指標にして、血圧降下作用を検討した結果、対照とした他の道産きのこのいずれよりもその阻害活性が高かった。こうしたシーズに基づいて、血圧調節作用を持つ、たもぎ茸由来の機能性食品の開発を試みた。菌糸体培養により有用物質の大量生産を試み、その抽出技術を確認して、高付加価値の機能性食材の開発を目的とした。

内容・方法

様々な培養条件を設定して、たもぎ茸の菌糸体培養を実施し、その培養液の血圧降下作用を観察した。これらの結果を踏まえて、血圧降下作用物質を単離・精製を試みる予定であったが、陽性対照とした子実体抽出物を上回る血圧降下作用がみられなかったため、子実体抽出物の生理活性物質の探索を実施することとした。そこで、子実体の抽出物から、血圧降下作用物質(ACE阻害物質)を単離・精製する目的で、各種クロマトグラフィーで検討した。そうして精製した物質について機器分析を行って、その物質を同定した。血圧降下物質は複数認められ、そのひとつがマンニトールであった。また、このマンニトールおよび子実体抽出物が、動物、ヒトでの実際作用があるのか確認するために、臨床実験等も実施した。

結果・成果

たもぎ茸の菌糸体培養においては、いくつかの条件でACE阻害活性が認められたものの、子実体抽出物のそれを上回ることにはなかった。しかしながら、その他の生理活性物質が産生されている可能性は高く、例えば抗腫瘍物質である β -1 \rightarrow 3-D-グルカンなどもその産生量の測定を試みた。その結果、グルカンについても産生されていた培養液はあったが、やはり子実体のそれを上回ることにはなかった。これにより、本研究は、たもぎ茸子実体抽出物中の血圧降下作用物質の同定とそれ由来機能性食品の開発という方向で軌道修正を余儀なくされた。きのこ中の血圧降下作用物質は、文献によればペプ

チド類の可能性が高いと考えられたが、今回は、たもぎ茸中の主要な糖アルコールであるマンニトールが同定された。マンニトールは、浸透圧を調節する血圧降下剤として知られているが、ACE阻害作用もあることが、今回初めて明らかにすることができた。

ACE自体は、亜鉛を活性部位に持つメタロプロテアーゼである。マンニトールのACE阻害の機序は恐らく、その水酸基が亜鉛に配位するキレート剤として働くのではないかと推測している。マンニトールがACEの活性部位の亜鉛にうまく配位するのも知れない。このマンニトールのACE阻害に関しては、すでに特許を出願済みである。さらに主要な有効成分をマンニトールとする、たもぎ茸子実体抽出物について、in vitroのみならず、in vivoでも有効性の確認実験を実施した。まず、自然発症高血圧ラットで実施したところ、単回投与、反復投与ともに有意な血圧降下作用が認められた。正常犬を用いた実験でも、血圧降下作用が見られ、投与をやめると元に戻った。犬では同時に測定したカテコラミン類も低下する傾向が見られ、その他の疾患にも有効であることが示された。これらの結果は、本年9月に札幌で開催される日本獣医学会で発表する。また、ヒト臨床試験においては、血圧低下傾向はみられたが、統計学的に有意な結果とはならなかった。この理由は、子実体抽出物は降圧剤とは違い、その作用機序が非常にマイルドであること、また被験者は血圧が高めではあるものの、その値が正常な範囲内であったこと(加療が必要な方は当然対象とはできなかった)、供試サンプル数が少なかったことなどが挙げられる。今回の試験で、臨床検査データも取得したが、それらの値に何ら異常が認められなかったことから、子実体抽出物の安全性が再確認できた。さらに胆ガンマウスを用いて免疫学的な観点からも生理活性を検討した。その結果、子実体抽出物投与群では、抑制性T細胞数が減少して、免疫賦活力の存在が示唆された。さらに具体的に、Sarcoma180を移植したマウスに投与したところ、明らかに腫瘍増殖抑制効果、延命効果が認められた。このことから、血圧調節物質以外にも様々な生理活性が存在することが示唆され、今後はこうした方向の研究も非常に興味深いと思われる。

以上のように本研究の結果・成果の概略を述べたが、ACE阻害による血圧降下物質、マンニトールに関する件は学術雑誌に投稿中である。

Hagiwara et al., in submission 2004

今後の展望

たもぎ茸子実体抽出物の持つ生理活性は、きわめて多岐にわたることが判明した。血圧調節物質は、マンニトール以外にもペプチド等判明しつつあり、新たな展開が期待できる。これらについては、現在も継続して研究中である。また、たもぎ茸子実体

抽出物には、免疫賦活力があり、抗腫瘍性も確認できた。これにより、こうした生理活性物質を明らかにしていくことで、それらをベースとした薬品に近いものの開発の可能性がでてきた。たもぎ茸に関する研究はその研究領域が広範にわたることになり、益々発展が興味深い。

★菌糸体培養による降圧物質の産生の試み

予備試験

1. 目的 たもぎ茸菌糸体を液体培養し、培養菌糸体から β グルカン等の機能成分を回収する。そのための予備試験として培養条件の検討を行った。(表1)
2. 方法
 - (1) 500mLの坂口フラスコにSMY培地130mL(8本)、300mL三角フラスコにSMY培地100mL(2本)、120℃、20分間滅菌。
接種量：栽培用種菌0.8g(6本)、1.6g(4本)の2設定。
往復振とう(130rpm)。12時間間隔で振とうと静置。
室温20から25℃で12日間培養。
 - (2) 500mLの坂口フラスコにGPY培地300mL(8本)、300mL三角フラスコにGPY培地200mL(2本)、120℃、20分間滅菌。
接種量：栽培用種菌1.6g
往復振とう(80rpm)。24時間間隔で振とうと静置。
室温20から25℃で14日間培養。
- 3-1. 結果(方法(1)について)
 - (1) 坂口フラスコでの培養は8本中3本が雑菌による汚染、あるいは振とう速度が早すぎたため白濁して、回収不能となった。
 - (2) 培養菌糸体を吸引ろ過で回収、凍結乾燥を行った。米粒大のものが多数得られ、重量で1から1.5g、乾燥歩留まり5.6から8.5%であった。
- 3-2. 結果(方法(2)について)
 - (1) 培養液表面に白い菌糸体が浮いた状態で成長し、子実体の原基形成と子実体形成が観察された。
4. 考察
 - (1) 培養条件についてはグルコースベースの培地が適当と考えられる。
接種種菌量を増やして、回収率アップ、培養日数短縮を検討する。
 - (2) 液体培養をした菌糸体を接種種菌として使用し、回収率アップ、培養日数短縮を検討する。
 - (3) 通常培養子実体との成分比較。
 - (4) 培養菌糸体の酵素処理の検討(ヘミセルラーゼ)

結果考察

1. 回収率にばらつきがある。
おが菌シードで培養すると、回収菌糸体の中におがくずも入ってしまうため、見掛けの回収率が高くなった。
そのため、おが菌を液体培地で一度培養した菌糸をシード菌として使用したところ、回収率も低下した。
回収率の目安としては、511mg/100mL培地(シイタケ、「きのこ学」から)、1.25g/100mL(マイタケ、大野先生論文から)を目標とする。
培地グルコース濃度2%を5%に上げ、塩化カルシウム0.05%添加した培地で培養したところ、培地100mL当たりの回収率が菌糸体乾燥重量で555mgとなった。
2. 菌糸体回収物の評価
 β グルカンについては期待値よりもかなり低い値であった。
今回のデータは抽出操作をしていないため、熱水抽出後のサンプルで測定を行う。
一次評価として正味の回収率と β グルカン量(子実体からの抽出量との比較)、
二次評価としてその他成分の分析
三次評価として機能性の評価(活性酸素消去能、ACE阻害、培養がん細胞の増殖抑制など)を検討する。
現段階での培養条件はGPY培地、振とう培養が最もよい結果となった。

結果考察

トレハロース2%のTPY培地(試験No.21)で、菌糸体の回収量が培地100mL当たり556mgでこれまでの最高となった。トレハロースの優位性については、再現性を確認する。

培地のpH調整で培養液中に β グルカンが生成する条件についての検討

1. 実験内容
でんぷんを炭素源とした培地(SMYP)とトレハロースを炭素源として培地(TPY)による振とう培養、グルコースおよびトレハロースのpH調整培地による振とう培養で、 β グルカンの産生を検討した。(表2,3)
2. 結果
 - (1) SMYP培地による培養は、培養液中に β グルカンが高濃度で(0.76 μ g/mL)産生された。
したがって、培養液中へ β グルカンを産生させるには、でんぷんが適している可能性が考えられる。
 - (2) 菌懸濁液をレトルトすることで、 β グルカンが菌糸体から抽出されと考えられる。
 - (3) 5%トレハロース培地のほうがグルコース培地よりも β グルカン産生量が多かった。

(4) pH3ではグルカンが産生せず、トレハロースpH4が最も多くグルカンを産生した。

ただし、pH無調整培地 (pH7.1) とはほとんど差はなかった。

(5) 培養後の全糖分析では、pH無調整培地が一番少なかった。(出発量の約10%)

pH未調整培地では β グルカン合成のほかに、菌糸体の成長に糖が使われていることがわかった。

(明らかに菌糸体量が多くなった)

以上より、pH調整することで菌糸体成長が抑えられ、優先的に β グルカンが合成されていると考えられる。

(No.5で、トレハロース1gあたり β グルカン13.8 μ g産生、現状たもぎ1gから β グルカン770 μ g抽出)

イーストエキス培養試験結果

坂口フラスコ培地300mL、前培養回収菌糸体シード室温20から25℃、90rpm往復振とう。pH調整は0.5Mクエン酸結果

1. タンパクは6日目ではほとんど減少が止まる。利用できるたんぱく質は使いきると考えられる。(表4)
2. ACE阻害活性は経時的に減少した。したがって、活性物質はイーストエキス由来のものと考えられる。
3. イーストエキスのみを基質とした培地では、ACE阻害活性物質は産生しなかった。(表5)

石突きエキスを培養試験1

石突きエキスをベース培地にして菌糸体を培養し、培養液中にACE阻害活性物質が産生されるか検討を行った。培養液は石突きエキスをBx0.5~3、pHをクエン酸で4~6.3に調製した。

培養条件：坂口フラスコ(500ml容に培地300ml)、温度25℃、90rpm往復振とう、シード量4ml

結果(表6,7)

- 1) 培養日数とともに糖、タンパクが減少し、ACE阻害活性も減少した。
- 2) 石突きエキスを菌糸体を培養した結果では、培養液中にはACE阻害活性物質は産生しないことが分かった。

石突きエキスを培養試験2

石突きエキスをBx1~2.8、pHをクエン酸で4~6.1に調製後、糖添加を行った。(トレハロース2%、4%、グルコース4%)

培養条件：坂口フラスコ(500ml容に培地300ml)、温度25℃、90rpm往復振とう、シード量4ml

石突きエキスBx3設定、pH3設定、糖類添加トレハロース、グルコース濃度2設定で振とう培養培養液について分析した

結果(表8,9)

- 1) グルコース添加培地でタンパク量の増加が見られた。
- 2) トレハロース添加ではタンパク量は減少した。
- 3) 全糖分析では、トレハロース、グルコース添加による影響は、傾向としては出ていなかった。
- 4) 糖の添加が、ACE阻害物質の産生させるのには有効な方法であった。

廃培地抽出液培養試験

廃培地をw/wで5%、10%に水で調製。5分間ボイルし、糖を添加後120℃10分滅菌した液を培養液とした。

培養条件：坂口フラスコ(500ml容に培地300ml)、温度25℃、90rpm往復振とう、シード量4ml

結果(表10)

廃培地の抽出液で菌糸体を培養した結果では、糖を添加した培地でもACE阻害活性物質は産生しなかった。

おがくず抽出液培養試験

おがくずをw/wで5%、10%に水で調製。5分間ボイルし、糖を添加後120℃10分滅菌した液を培養液とした。

培養条件：坂口フラスコ(500ml容に培地300ml)、温度25℃、90rpm往復振とう、シード量4ml

結果(表11)

- 1) 培養6日目で石突きエキス同様、グルコース添加培地でタンパクの増加が見られた。
- 2) 菌糸体成長はほとんどみられなかった。
- 3) ACE阻害活性物質は産生されなかった。

アミノ酸添加培地培養試験1

培養条件：坂口フラスコ(500ml容に培地300ml)、温度25℃、90rpm往復振とう、シード量4ml

結果(表12)

- 1) グルタミン酸は菌糸体には10~30%程度しか資化されなかった。
- 2) No.5：グルコース4%、pH4での培養液が阻害率60%で、最も良い条件であった。

アミノ酸培地抽出液培養試験2

培養条件：坂口フラスコ(500ml容に培地300ml)、温度25℃、90rpm往復振とう、シード量4ml

結果結果(表13)

各種アミノ酸にグルコースを添加した培地では30%程度の阻害率が認められた。

アミノ酸添加培地培養試験3

グルタミン酸0.2、0.5、0.7%、pH5、6、7、糖添加をグルコース、シュクロースで調製した下表19本の坂口フラスコに菌糸体

を培養した。

培養条件：坂口フラスコ(500ml容に培地300ml)、温度25℃、90rpm往復振とう、シード量4ml

結果(表14,15)

- 1) 培養19日目ではグルタミン酸0.5%、0.7%、グルコース添加培地が阻害率60%以上となった。

アミノ酸添加培地培養試験4

グルタミン酸、ペタイン0.2、0.4%、pH4、6、8、糖添加をグルコース、トレハロースで調製した表16の19本の坂口フラスコに菌糸体を培養した。

培養条件：坂口フラスコ(500ml容に培地300ml)、温度25℃、90rpm往復振とう、シード量4ml

結果

- 1) どの条件でも、ACE活性阻害物質は産生されなかった。

アミノ酸添加培地培養試験5

グルタミン酸、ペタイン0.2、0.4、0.6%、pH4、6、糖添加をグルコース、トレハロース、シュクロースで調製した表17の19本の坂口フラスコに菌糸体を培養した。

培養条件：坂口フラスコ(500ml容に培地300ml)、温度25℃、90rpm往復振とう、シード量4ml

結果(写真1,2)

- 1) シュクロース、グルコース、pH4で培養した培養液のACE阻害率がほぼ40%以上となった。
- 2) トレハロースでの培養は、ACE阻害物質が産生されなかった。

5Lファーマンターでの菌糸体培養試験

500ml容の坂口フラスコでの振とう培養を10倍スケールアップして、容量5Lのファーマンター(培地量3L)で培養試験を行った。目的としては、菌糸体培養液中にACE阻害活性物質を産生させる条件を検討した。

培養条件：培養温度25℃、撹拌スピード25rpm(撹拌羽による撹拌)、シード量40ml

結果

- 1) 菌糸体の培養に関しては、繊維状になり、ほぼフラスコでの培養を再現できた。
- 2) ACE阻害率に関しては表18の通りとなり、こちらもほぼフラスコ培養の再現ができた。培養液のACE阻害活性については、より詳細な阻害係数IC50を求めるため、ACEカラーによる分析値を採用することとした。

ACEカラーによる阻害係数IC50の分析

一連の培養試験において、ACE阻害活性が高かった培養液の阻害係数IC50を測定した。サンプルは、表17のNo.7、No.16、表18のNo.5、No.8。

北海道大学大学院農学研究科との共同研究により、バイオゴッドに含まれるACE阻害活性成分はマンニトールであることがわかった。さらに、グルコースなどの単糖、キシリトールのような糖アルコールにもACE阻害活性があることが分かった。そこで、これらの糖、糖アルコールのIC50をACEカラーで測定した。

以上の結果から(表19,20、図1,2)

- 1) 菌糸体培養で、培養菌糸体を回収する方法は、重量回収率、機能性の面で優位性が見出されなかったため、培養液中に産生する機能性物質を回収することとした。
- 2) 菌糸体培養液の基質としてグルコースが含まれていると、それ自体にACE阻害活性がある。(バイオゴッド中にはグルコース0.01%程度含まれる)
- 3) したがって、菌糸体培養後の培養液にはグルコースが2%程度は残っているため、ACE阻害活性にかなりの比率でグルコースが寄与していると考えられる。
- 4) しかしながら実験結果から、菌糸体培養液中に賛成されたグルコース以外の成分(ペプチド?)もACE阻害活性に寄与していることがわかった。
- 5) 結論として、菌糸体培養では培養液中にACE阻害活性成分が高濃度では産生せず、目標にはいたらなかった。

★タモギタケ子実体熱水抽出物に含まれるACE阻害成分の検索

要約

食用キノコのタモギタケ(*Pleurotus cornucopiae*)からの熱水抽出物がしめす血圧降下作用に関わる成分を明らかにするために、ACE阻害活性能に基づいて活性成分の単離・精製を行った。ACE阻害活性成分は、逆相クロマトグラフィーの非吸着画分に含まれている事が明らかになった。さらにこの画分を、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて単離・精製を行った。その結果、化合物P-1が単離され、IC₅₀=0.25mgを示した。FAB-MS、EI-MS、¹H-、¹³C-NMRによりmannitolと同定された。

1. 材料と方法

1.1 材料と試薬

実験に使われた*Pleurotus cornucopiae*の熱水抽出液は、株式会社スリービーから提供された(商品名バイオゴッド)。ACE(bovine lung, rabbit lungs由来)は、Wakoより、Benzoyl-Glycyl-L-Histidyl-L-Leucine(Hippuryl-Histidyl-Leucine)はPEPTIDE INSTITUTE, INC.より購入した。ACE阻害活性評価にACEカラー(富士レビオ製)を用いた。その他の薬品は、分析等級を使用した。

1.2 ACE阻害活性のアッセイ

各画分のACE阻害活性をアッセイは、笠原法(一部改

変)を用いて行った。

p-hydroxyhippuryl-L-histidyl-L-leucine 8.3mM、4-aminoantipyrine 0.6mMを含んだ基質溶液(200 μ l)にPleurotus cornucopiaeの熱水抽出液からの溶液を32 μ l、ACE 8 μ l(1Unit/ml)を加え、37 $^{\circ}$ C、20分間湯浴上で反応させた。その後メタ過ヨウ素酸ナトリウム6.5mMを含む反応停止発色液600 μ lを加え、37 $^{\circ}$ C、3分間反応させた。反応後、すぐに λ =505nmで吸光度計測した。また、阻害率が50%となるときの反応液中の阻害成分の濃度をIC₅₀とした。

1.3 バイオゴッドに含まれるACE阻害成分の単離

1.3.1 試料の調製

バイオゴッド(brix7.5)を12298 \times gで20分間遠心し、上清をペーパーフィルターで濾過した。これに活性炭粉末(12.5g/100ml)を加え4時間攪拌し、4773 \times gで30分遠心し脱色上清を得た。これをペーパーフィルター、孔径0.45 μ m、0.22 μ mのメンブレンフィルターを順に用いて活性炭粉末を除去した後、エバポレータを用い12.5倍に濃縮した(以後Decolorized Pleurotus cornucopiae Extract : DPE と呼ぶ)。

1.3.2 逆相クロマトグラフィーによる単離

DPE 485.7mLを脱気脱イオン水で10倍に希釈し、ODS樹脂(YSI gel ODS-AQ120S50)を充填したカラム(ϕ 4.2cm \times 10cm)に通し、非吸着画分を得た。その後脱イオン水3150mlで洗浄し、次に、10%、99.5%エタノールを用いて順次溶出し、7mlづつ、141のフラクションに分取した(以下それぞれ10%画分、99.5%画分と呼ぶ)。溶出液は、波長 λ =280nmでモニターした。各溶出濃度毎にピークとピーク以外の部分に分け、4つの画分を得た(F-1 : Fraction No.16~44、F-2 : Fraction No.45~81、F-3 : Fraction No.82~111、F-4 : Fraction No.112~141)(図3)。これらを40 $^{\circ}$ Cで減圧濃縮し、その後、凍結乾燥した。乾燥粉末を脱イオン水に溶解し、また非吸着画分は10倍濃縮(以後F-0とする)した後、それらのACE阻害活性を測定した。

1.3.3 GFCによる活性画分F-0の分画

F-0の更なる精製をゲル濾過(GFC)によって行った。Sephadex G-25を充填したカラム(ϕ 1.2cm \times 7.3cm)にF-0を0.825ml流し、10mM Tris-HCl Buffer(pH8.0)を用いて溶出した。Bufferの流速はペリスタポンプで1ml/minに調節した。溶出液は1フラクションあたり1mlづつ、25のフラクションに分取し、波長 λ = 280nmでモニターした。その後各フラクションのACE活性を測定した。

次にF-0をSephadex G-10を充填したカラム(ϕ 1.5cm \times 49cm)に1mlアプライし、10mM Tris-HCl Buffer

(pH8.0)を用いて溶出した。Bufferの流速は0.9ml/minであった。溶出液は1フラクションあたり1mlづつ、94のフラクションに分取し、波長 λ = 280nmでモニターした。各フラクションのACE阻害活性を測定した。

1.3.4 Sephadex G-10カラムを用いた標準試料の分画

標準試料(ブルーデキストラン、キモトリプシノーゲン、ニトロチオ安息香酸)をSephadex G-10を充填したカラム(ϕ 1.5cm \times 49cm)に0.5mlアプライし、10mM Tris-HCl Buffer(pH8.0)を用いて溶出した。Bufferの流速は0.9ml/minであった。溶出液は1mlづつ、100のフラクションに分取した。各フラクションの λ = 620nm、420nmでの吸光度を計測した。

1.3.5 シリカゲルカラムクロマトグラフィーによるF-0に含まれるACE阻害成分の単離

F-0画分(乾燥重量1g)をシリカゲルカラム(Wako gel C-200、2.5 \times 50cm)にアプライし、酢酸エチル、メタノール、水(80 : 20 : 3 : 0 : 100)の溶出溶媒によって分画した。得られた150フラクション(50mlづつ)をすぐにエバポレータによって減圧濃縮した後、これらの各フラクションは薄層クロマトグラフィー(TLC : silica gel 60、展開溶媒 : クロロホルム : メタノール : 水 = 20 : 20 : 5、発色剤 : ニンヒドリン試薬、105 $^{\circ}$ C、10min加熱)でモニターした。Rf値の近いフラクションを集め、すぐに減圧乾固し、10フラクション(F-0-1 F-0-10)にまとめた。各フラクションのACE活性を測定した。

阻害活性をもつフラクションの一つであるF-0-1を酢酸エチル、メタノール、水(80 : 20 : 3)を溶出溶媒として再度シリカゲルカラムに通し、No.11を4 $^{\circ}$ Cで再結晶により、化合物P-1が単離された。P-1のACE阻害活性を測定し、IC₅₀値を決定した。

1.4 単離した化合物の機器分析

P-1は、エバポレータを用いて減圧乾固し、デシケーター内で冷却した後、重水で溶解された。¹H-、¹³C-NMRの測定はBrucker AM-500(¹H : 500MHz、¹³C : 125MHz)を用いた。また、FAB-MS、EI-MSは、P-1を脱イオン水に溶解した後、JEOL製 JMS-AX500を用いて測定された。

2. 結果および考察

2.1 逆相クロマトグラフィーによる分画

DPEフラクションの吸光度測定の結果、図1に示すようにエタノール10%、99.5%各濃度でピークが出現した。F-1、F-2、F-3、F-4画分の凍結乾燥粉末の重量は、それぞれ1.1、1.5、45.3、5.5mgであった。

これらのACE阻害活性は、F-1~F-4全てにおいて見られなかった(図4)。それに対し、非吸着画分(F-0)がACE阻害活性を示した。F-0のACE阻害活性は濃度依存的

に減少した(図5)。このことは予備実験と同様の結果を示した。

2.2 GFCによるF-0の分画

活性フラクションF-0をSephadex G-25カラムによって分画した(図6)。検出された吸光度のピークは1つであったことから、F-0は、このカラムの分画分子量外である事が明らかになった。また、この波長 $\lambda=280\text{nm}$ でのピークと平行にACE阻害活性が現れたことから、吸光度ピークを示す成分にACE阻害成分が含まれていると考えられた。

次に、F-0を分画範囲700分子量以下の Sephadex G-10を用いて分画した(図7)。G-25を用いた実験と同様にピークが1つのクロマトグラムを示したことから、G-10カラムでも分画出来ない事が明らかになった。

しかし、F-0ピークは、標準試料のNTBのピーク位置と重なりあってフラクションが出現しているため、F-0は分子量200前後の低分子成分である事が予想された(図7)。次に、F-0の吸光度ピークとACE阻害活性のピークを比較すると、後者が前者より2フラクション早く出現した(図8)。

以上より、ACE阻害活性成分は、分子量200前後の低分子成分と予想された。

2.3 F-0から順相カラムクロマトグラフィーを用いたACE阻害成分の単離

F-0と17種類のアミノ酸標品をBtOH: AcOH: 水=4: 1: 2の展開溶媒を用いてTLCを行った(図9)。F-0の大部分は R_f 値=0.2近傍に分布し、この領域には標品の半数以上のアミノ酸が分布していた。このことから、F-0の構成成分として、多種のアミノ酸、あるいはアミノ基をもつ成分が含まれることが予想された。

そこで単離条件を、TLCを用いて検討後、F-0をシリカゲルCCによって分画した。分取はTLCでモニターしながら行った。その結果11のスポットが検出された。フラクションを R_f 値によりF-0-1~F-0-10の10に分画した。それぞれの画分のACE阻害活性がアッセイされた。F-0-10を除き、すべての画分がACE阻害活性を示した。その中の一つであるF-0-1から精製されたP-1とその精製過程画分のACE阻害活性の濃度依存性が示された。バイオゴッドの脱色12.5倍濃縮液(DPE)は、 $IC_{50}=12\text{mg}$ を示した。ODS-AQ120S50カラムクロマトグラフィー後、F-0のACE阻害活性は $IC_{50}=2\text{mg}$ を示した。F-0のSilica gelカラムクロマトグラフィー後、単離された結晶(P-1)は $IC_{50}=0.25\text{mg}$ であった。

2.4 ACE阻害成分P-1の構造解析

P-1は白い結晶として単離され、FAB-MSで 分子量が182であった。 ^{13}C -NMRスペクトルには、左右対称構造を持つmannitolに由来する $\delta 63.7$ (C-1, 6)、 $\delta 71.19$ (C-2,

5)、 $\delta 69.63$ (C-3, 4)の6個のシグナルが帰属された。 ^1H -NMRスペクトルには、3.65(2H, dd, $J = 6.1, 11.9\text{Hz}$)、3.84(2H, dd, $J = 3.3, 11.8\text{Hz}$)はそれぞれH-1a, 6a, H-1b, 6bに帰属され、3.73(2H, m)、3.76(2H, t, $J = 8.6\text{Hz}$)はそれぞれH-2, 5, H-3, 4に帰属された。

これらの結果から、P-1はmannitolと同定された。

Pleurotus cornucopiaeの熱水抽出液であるバイオゴッドからACE阻害活性成分が単離され、mannitolと同定された。ACE阻害活性を示す成分の多くは、食品に含まれるペプチドとして報告されており、本実験の結果は糖アルコールの持つ新たな機能に焦点をあてるものとなった。Mannitolは、脳圧降下剤や利尿剤として使用されており、最近では血管拡張作用や抗酸化作用も報告されている。バイオゴッドもこれらの機能を持つことが期待される。

また、他の画分もACE阻害活性を示したことから、これらの画分の活性成分の単離・精製、および同定が急がれる。

★犬臨床実験(日本大学との共同研究結果)

○タモギダケエキスの犬における血圧降下作用

[目的]タモギダケエキス(以下、抽出液)には免疫賦活作用物質が含まれ、人の健康食品として使用されているが、最近、血圧調節物質であるアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害物質が含まれていることが明らかになった。そこで、抽出液の犬への臨床応用を目的として本実験を行った。

[方法]健康犬は、2-8歳、体重10-15kgのビーグル犬6頭を用いた。抽出液(バイオゴッド®)は、人の標準投与量に準じて、実験犬1頭あたり0.83 ml/kg(市販液の3倍濃縮液)を経口的に1日1回、14日間連続投与した。血圧は抽出液投与前から投与終了まで2日に1回動物用非観血血圧計を用いてオシロメトリック法で測定した。また、血清中のレニンアンギオテンシン系関連物質の変化を経時的に観察した。MR犬は、5-8歳のビーグル犬5頭を用い、健康犬と同様に抽出液を4週間投与して超音波により心血流動態の変化を観察した。

[結果]健康犬では、血圧は投与8日目以後に有意に低下した。血清中のACE活性値、アンギオテンシン(Ang)I、アルドステロンは、投与前と比較し投与後7、14日後に変化が見られなかった。しかし、AngIIは1、7、14日後に軽度低下していた。また、血清カテコラミン量は7日、14日後に低下していた。MR犬では血圧は低下したが、心内血流動態に変化はみられなかった。ACE関連物質はAngIIが4週後に低下していたが、

その他には変化が見られなかった。

[考察]以上の結果から抽出液に含まれるACE阻害物質の作用は、今回用いた投与量では血清ACE活性値に影響を与えるほど強力ではないが、組織内AngII濃度を低下させて血管拡張をさせて、血圧を低下させたことが考えられた。犬への臨床応用については、投与量などさらに検討する必要がある。

○タモギダケエキスの併用が奏効した犬膿皮症の1例

タモギダケエキスは、単核細胞からサイトカインを産生させ、免疫力を増強させることが明らかにされている。今回、犬の難治性膿皮症に対してタモギダケエキス(バイオゴッド®)を抗菌剤と併用したところ良好な結果を得ることができた。症例は、アメリカン・コッカー・スパニエル種の雄、13歳で、初診2年前より胸部から腹部にかけて色素沈着を伴った脱毛症が認められ、甲状腺機能低下症と診断され甲状腺ホルモン製剤が投与されていた。初診時には頭部から背部にかけて小膿疱が播種状あるいは集簇性にみられ、一部では脱毛斑もみられた。セフェム系抗生剤の投与で一時的な改善も認められたが、徐々に増悪し、約3カ月後には悪性脱毛と全身性に表皮糜爛および一部では皮下膿瘍が認められた。細菌培養では*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas. spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.* が分離された。感受性試験結果からキノロン系抗菌剤を約1カ月間投与したが、病変は改善せずに全身状態も悪化した。そこで、抗生剤に加えてタモギダケエキスを投与した。約1週間後より皮膚病変は改善に向かい4週間後には糜爛や膿瘍は略治し、発毛も認められた。3カ月後には、被毛もほぼ元の状態に回復した。このことから、ヒト表皮ケラチノサイトの培養系にタモギダケエキスを添加し、サイトカインの発現を観察した。その結果、培養3時間から24時間後にかけてIL-8およびIL-6の経時的な産生が認められた。これらのサイトカインは、白血球走化性の亢進、好中球貪食能の活性化、あるいはマクロファージの活性化作用がある。以上の実験結果から、タモギダケエキスが自然免疫系を賦活化し、本症例の膿皮症の治癒転機に関与したことが考えられた。

★自然発症高血圧ラットの実験

自然発症高血圧ラット(SHR)にタモギダケエキスを単回あるいは反復経口投与し、投与後の血圧に及ぼす影響の検討を行った。

タモギダケエキスのBx2.5の単回経口投与では、血圧への明確な影響はみられなかった。一方、タモギダケエキスのBx7.5およびBx25.0の単回経口投与において、投与後8時間の収縮期血圧に統計学的に有意な低下が認められた

(図10)。

タモギダケエキスの反復経口投与では、Bx2.5で投与5日目、Bx7.5で投与3および5日目、Bx25.0で投与3、4および5日目において収縮期血圧に統計学的に有意な低下が認められた(図11)。

以上のことから、タモギダケエキスは自然発症高血圧ラット(SHR)への単回あるいは反復経口投与により降圧作用を示すことが確認された。

★ヒト臨床試験

たもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド®)の降圧作用に関する臨床的検討

結果要約：

A) 被験者背景

試験開始時における各被験者の収縮期および拡張期の血圧値は、プラセボ群及び被験食品摂取群(実食群)ともその分散性、平均値に関して有意な差は認められなかった。

また、両群の試験期間中(8週間)における被験食品の摂取率にも有意な差は認められなかった。

B) 血圧に対する影響

プラセボ群では、収縮期及び拡張期ともに血圧値の低下傾向は見られたが、統計学的に有意な低下は認められなかった。

実食群では、拡張期の血圧値で投与4週目に統計学的に有意な血圧低下が認められた。一方、収縮期血圧には低下傾向は見られたが有意な低下は認められなかった。

機能性食品としての臨床研究に関する所見・考察

試験実施状況総評：

本試験は別紙報告書のごとく、GCP準拠のプロトコールに従った正しい手法で実施されており、被験者のサンプリングの段階(同程度の被験者を集めたことなど)、試験実施段階(摂取率も95.0%以上を維持したなど)のいずれを見てもなど、信頼のおける試験結果であると考えられる。

血圧に対する影響：

山口病院の柴崎先生のご意見では、血圧値の低下傾向は認められたということであった。統計学的には、実食群において、拡張期の血圧値で投与4週目に有意な血圧低下が認められている。また、実食群の収縮期血圧に関しては、低下傾向は見られたとのことだが、有意な低下というほどではなかった。このことからたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド®)には、緩やかに血圧を調節する働きがあると考えられる。

自然発症高血圧ラット(SHR)を用いた実験では、有意な

差が見られたのに対し、今回の実食群とプラセボ群を比較した結果で、目に見える有意な差が出なかった理由は次のように考えられる。

- 1 被験者は「血圧が高めの方」であり、健康人との差が僅かであった
- 2 被験物質の摂取量が、効果を明確化するには不足であった(実際ラットでは今回の10倍用量体重換算)まで試験している)
- 3 僅かなN数(被験者数)で実施した
被験物質であるたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド®)は、既に健康食品として上市しており、多くのユーザーがいる。血圧降下作用が認められたとするユーザーが少なからずいる中、今回このような結果になったことは、さほど不思議ではない。これは恐らく、上の理由もさることながら、たもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド®)がやみくもに血圧を低下させるということではなく、適度な血圧調節作用を兼ね備えているからだと理解している。すなわち、降圧剤とは違い、健康人、低血圧の人が飲用しても支障のないことが認められたと考えることもできる。

参考解析データ：

被験者は、「血圧が高め」ということを除いて、基本的には健康人であると考えられた。従って、血糖値及びHbA1cの推移について、有意な変動が認められなかったことは、極めて当然の結果と考えられる。このことはすなわち、たもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド®)の飲用は、こうしたファクターに何ら影響しないということが明らかとなったと思われる。

血液学、生化学、尿検査等の臨床検査結果を鑑みても、値の変動はみられず、

たもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド®)は極めて安全な食品であることのひとつの裏づけとなった。

安全性に対する影響：

実食群で見られたトラブル数例は、山口先生が報告されているように、被験物質との因果関係はないと思われる。実際被験者ご自身が自覚していることもさることながら、実食群の3例はいずれもたまたま実食群に入られた70歳以上の高齢の方がトラブルを起こしている。こうした事実と、また臨床検査結果と合わせてみても、まったく問題にはならないと思われる。

★その他の生理活性について(抗腫瘍性)

試験目的

Sarcoma 180を移植したマウスに、たもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド®)を移植前10日間、移植後35日間経口投与し、その抗腫瘍効果について検討を行った。

材料及び方法

1. 被験物質及びその調製

株式会社 スリービーより提供されたたもぎ茸熱水抽出エキス(B×3.0)(ロット番号：040518、使用期限：2004年8月18日)及びたもぎ茸熱水抽出エキス(B×1.0)(ロット番号：040416、使用期限：2004年7月16日)を被験物質とした。たもぎ茸熱水抽出エキス(B×3.0)及び(B×1.0)は、共に冷所(実測値：2～8℃)に保存した。たもぎ茸熱水抽出エキス(B×3.0)及び(B×1.0)は、日本薬局方精製水(ヤクハン製薬株式会社、ロット番号4301)を用いて所定の濃度に用時に希釈調製した。

2. 比較対照物質及びその調製

株式会社 スリービーより提供されたアガリクス仙生露ロイヤル(使用期限：2005年12月9日)及びメシマ®ピュアPL2.5(ロット番号：17BL)を比較対照物質とした。アガリクス仙生露ロイヤル及びメシマ®ピュアPL2.5は、共に室温(実測値：2～8℃)に保存した。アガリクス仙生露ロイヤル及びメシマ®ピュアPL2.5は、日本薬局方精製水(ヤクハン製薬株式会社、ロット番号4301)を用いて所定の濃度に調製した。

3. 試験動物

試験動物は、Sarcoma 180による実験腫瘍に最も適した系統であるSlc：ICR系のSPF雌性マウス(日本エスエルシー株式会社)を使用した。動物は2004年1月19日に生後5週齢100匹(入荷数：104匹、体重範囲：18.6～23.1g)を購入し、7日間の馴化飼育を行った。馴化期間中、毎日1回の一般状態観察及び期間中3回(受入れ日及び群分け日を含む)の体重測定を実施し、発育が順調な動物を試験に使用した。なお、群分け後の除外動物はSarcoma 180細胞の継代用動物として使用した。

4. 飼育環境条件

飼育室(206号室)は温度22±3℃(実測範囲22～25℃)、湿度50±20%RH(実測範囲42～64%RH)、換気回数8～13回/時間、12時間の明暗サイクル(午前8時～午後8時までの人工照明)で維持を行った。飼育室内は1日1回清掃及び清拭消毒し、消毒には塩素系消毒薬(ピューラックス、株式会社オーヤラックス)及びヨウ素系消毒薬(マイクロクリン、エコラボ株式会社)の2種類を1週間単位で交互に使用した。

試験動物は、実験動物用床敷(ホワイトフレック、日本チャールス・リバー株式会社)を敷いたポリカーボネイト製ケージ(285W×450D×210H,mm)を用いて1ケージ当たり5匹以内で収容し、群分け後は同じく実験動物用床敷を敷いたポリカーボネイト製ケージ(320W×220D×135H,mm)に個別で収容した。ケージの交換は群分け時に1回実施し、その後は1週に2回の頻度で実施した。

飼料は、γ線照射固形飼料(CRF-1、ロット番号040302、オリエンタル酵母工業株式会社)を金属製給餌器により自由に摂取させた。給餌器の交換は群分け時に1回実施し、その後は2週に1回の頻度で実施した。飼料中夾雑物及び微生物検査は、財団法人日本食品分析センター及びオリエンタル酵母工業株式会社の分析データを入手し、各混入物質が当社SOPの許容範囲内であることを確認した。

飲料水は、札幌市水道水(マイクロフィルター通過済)を給水瓶を用いて自由に摂取させ、給水瓶は2日に1回の頻度で交換した。飲料水の水質検査は日本衛生株式会社に分析を依頼し、当社SOPの水質基準の範囲内であることを確認した。

5. 群分け及び標識方法

群分けは、群分け当日の体重に基づいて層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように行った。使用動物の群分け時の体重範囲は、25.2～27.0gであった。

標識方法は、馴化期間は各動物の尾部に油性フェルトペンで標識し個体識別を行い、各飼育ケージには試験番号及び動物番号を明記したカードを標示した。群分け後は各動物の尾部に油性フェルトペンで標識し個体識別を行い、各飼育ケージに試験番号、試験群及び動物番号を明記したカードを標示した。

6. 試験群

(1) 試験群の構成(表21)

(2) 投与に関する事項

被験物質は経口投与とし、マウス用金属ゾンデ(株式会社 夏目製作所)を用いて強制的に胃内に投与した。投与期間は、移植前10日間及び移植後35日間とし、1日1回、週7日間の計45回投与とした。なお、移植当日の投与は行わなかった。投与時刻は、9:00～12:00に行った。投与容量は、いずれの群も12 mL/kgとした。

7. 腫瘍株及び移植

腫瘍株は、東北大学加齢医学研究所 附属医用細胞資源センターより購入したSarcoma 180細胞(TKG0173)を使用した。

Sarcoma 180細胞は、37℃の温水にて急速解凍し、約10倍量の日本薬局方生理食塩液(株式会社大塚製薬工場)を加え遠心(1000回転/分、5分間)し、上清を完全に除去した。この操作を4回繰り返した後の沈渣に日本薬局方生理食塩液を加え細胞液(5×10^6 cells/mL)とした。細胞液の0.1 mLを動物の腹腔内に移植し、その後7日目に頸椎脱臼し、腹部をエタノール消毒し、滅

菌した注射筒を用いて腹水を回収した。各動物から回収した腹水を混合し、移植動物の鼠径部皮下にSarcoma 180細胞を 5×10^6 cells/animalで接種した。

8. 観察及び測定項目

(1) 体重測定

予防効果試験の体重は、群分け時、前投与1、3、7、10、移植後1、3、7、10、14、18、21、24、28、32及び36日目(観察終了日)に生存している個体について、電子天秤(FY-3000、株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定した。

(2) 腫瘍体積の測定

群分け時、移植後5、7、10、14、17、21、24、28、32及び36日目(観察終了日)に生存している個体について、腫瘍の短径(a: mm)及び長径(b: mm)をデジタルノギス(株式会社 ミットヨ)を用いて測定し、以下の式より腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積}(\text{cm}^3) = 4/3\pi a^2 b/2$$

(3) 腫瘍重量の測定

死亡例は発見後速やかに、生存例は最終投与(移植後35日目)の翌日に、体外表を観察し、エーテル麻酔下で放血により安楽死させ、左鼠径部の腫瘍を摘出し、その重量を電子式上皿天秤(AR1014、ザウター社)を用いて測定した。また、各試験群の腫瘍重量の平均値より、それぞれの腫瘍増殖阻止率を以下の式により算出した。

$$\text{腫瘍増殖阻止率}(\%) =$$

$$(1 - \text{投与群の平均腫瘍重量} / \text{対照群の平均腫瘍重量}) \times 100$$

(4) 延命効果腫瘍移植後のマウスの生存日数を調べ、以下の式により延命率を算出した。

$$\text{延命率}(\%) =$$

$$(\text{投与群の平均生存日数} / \text{対照群の平均生存日数} - 1) \times 100$$

9. 統計処理

体重、腫瘍体積及び腫瘍重量は平均値±標準偏差で示した。また、各パラメータについて一元配置分散分析を実施し(有意水準10%)、群間に有意差がみられた場合は、平均値についてDunnettの多重比較検定を実施した(有意水準5%及び1%)。

結 論

Sarcoma 180を移植したマウスにたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド®)を移植前10日間、移植後35日間経口投与し、その抗腫瘍効果の検討を行った。

その結果、たもぎ茸熱水抽出エキス各投与群では、対照群と比べ統計学的に有意な生存日数の延長が確認さ

れた。また、試験期間中を通して、対照群と比べ統計学的に有意な腫瘍体積の低下が移植後5日目以降で認められた。

アガリクス仙生露ロイヤル0.83mL/kg群では、対照群と比べ統計学的に有意な生存日数の延長が確認された。また、対照群と比べ統計学的に有意な腫瘍体積の低下が移植後5日目以降で断続的に認められた。

メシマ[®]ピュアPL2.5 0.018g/kg群では、生存日数に対照群と比べ統計学的有意差はみられなかった。腫瘍体積では、対照群と比べ統計学的に有意な低下が移植後5日目以降で断続的に認められた。

このようにたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド[®])には、腫瘍増殖抑制効果及び延命効果が確認された。

成 績

10. 腫瘍体積、腫瘍重量及び腫瘍増殖抑制率

腫瘍体積の成績を図12,13に示す。

対照群では、移植後2日目以降腫瘍の生着が認められ、移植後5日目には10例全例に腫瘍の生着が認められた。また、その腫瘍体積の平均値は経日的に増加し、移植後29日目から33日目までの間で全例が死亡した。なお、移植後28日目の腫瘍体積の値は45.923cm³であり、腫瘍重量の平均値は15.178gであった。

たもぎ茸熱水抽出エキス(B×3.0)1.33mL/kg群では、移植後2日目以降腫瘍の生着が認められ、移植後6日目には10例全例に腫瘍の生着が認められた。その腫瘍体積の平均値は経日的に増加したが対照群より低値で推移し、移植後5、7、10、14、17、21、24及び28日目の値は対照群と比較して統計学的に有意に低い(各、 $p<0.01$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 及び $p<0.01$)ものであった。また、腫瘍重量の平均値は11.054gであり、対照群と比べ27.2%の腫瘍増殖抑制が認められたが、統計学的有意差はみられなかった。

たもぎ茸熱水抽出エキス(B×3.0)4.0mL/kg群では、移植後4日目以降腫瘍の生着が認められ、移植後6日目には10例全例に腫瘍の生着が認められた。なお、移植後28日目以降1例で腫瘍が消失した。その腫瘍体積の平均値は経日的に増加したが対照群より低値で推移し、移植後5、7、10、14、17、21、24及び28日目の値は対照群と比較して統計学的に有意に低い(各時点とも $p<0.01$)ものであった。また、腫瘍重量の平均値は10.733gであり、対照群と比べ29.3%の腫瘍増殖抑制が認められたが、統計学的有意差はみられなかった。

たもぎ茸熱水抽出エキス(B×1.0)1.33mL/kg群では、移植後3日目以降腫瘍の生着が認められ、移植後6日目には10例全例に腫瘍の生着が認められた。その腫瘍体積

の平均値は経日的に増加したが対照群より低値で推移し、移植後5、7、14、21、24及び28日目の値は対照群と比較して統計学的に有意に低い(各、 $p<0.05$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 及び $p<0.01$)ものであった。また、腫瘍重量の平均値は11.626gであり、対照群と比べ23.4%の腫瘍増殖抑制が認められたが、統計学的有意差はみられなかった。

アガリクス仙生露ロイヤル0.83 mL/kg群では、移植後3日目以降腫瘍の生着が認められ、移植後5日目には10例全例に腫瘍の生着が認められた。その腫瘍体積の平均値は経日的に増加したが対照群より低値で推移し、移植後5、7、14、17及び28日目の値は対照群と比較して統計学的に有意に低い(各、 $p<0.01$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.05$ 及び $p<0.05$)ものであった。また、腫瘍重量の平均値は14.320gであり、対照群と比べ5.7%の腫瘍増殖抑制が認められたが、統計学的有意差はみられなかった。

メシマ[®]ピュアPL2.5 0.018g/kg群では、移植後4日目以降腫瘍の生着が認められ、移植後6日目には10例全例に腫瘍の生着が認められた。その腫瘍体積の平均値は経日的に増加したが対照群より低値で推移し、移植後5、7、10、14、17、24及び28日目の値は対照群と比較して統計学的に有意に低い(各、 $p<0.01$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.05$ 及び $p<0.05$)ものであった。また、腫瘍重量の平均値は11.441 gであり、対照群と比べ24.6%の腫瘍増殖抑制が認められたが、統計学的有意差はみられなかった。

11. 延命効果

生存率の成績を図14-1～14-4に示す。

対照群では、移植後13日目に1例の死亡がみられ、その後移植後29日目に1例、30日目に3例、31日目に3例、33日目に2例死亡が観察され全例が死亡した。平均生存日数は 29.1 ± 5.8 日($n=10$ 、平均±標準偏差)であった。

たもぎ茸熱水抽出エキス(B×3.0)1.33mL/kg群では、移植後24日目より死亡がみられ、移植後24、29、30日目にそれぞれ1例死亡が観察され、観察終了日までに10例中3例が死亡した。平均生存日数は 33.5 ± 4.3 日であり、延命率は15.5%であった。また、生存日数において対照群に比べ統計学に有意な延命効果($p<0.05$)がみられた。

たもぎ茸熱水抽出エキス(B×3.0)4.0mL/kg群では、移植後28日目に1例死亡が観察された。平均生存日数は 35.2 ± 2.5 日であり、延命率は21.0%であった。また、生存日数において対照群に比べ統計学に有意な延命効果($p<0.01$)がみられた。

たもぎ茸熱水抽出エキス(B×1.0)1.33mL/kg群では、移植後28日目より死亡がみられ、移植後28、31、33日目に

それぞれ1例死亡が観察され、観察終了日までに10例中3例が死亡した。平均生存日数は 34.4 ± 2.8 日であり、延命率は18.2%であった。また、生存日数において対照群に比べ統計学に有意な延命効果($p < 0.05$)がみられた。

アガリクス仙生露ロイヤル0.83mL/kg群では、移植後31日目より死亡がみられ、移植後31日目に1例、34日目に2例死亡が観察され、観察終了日までに10例中3例が死亡した。平均生存日数は 35.1 ± 1.7 日であり、延命率は20.6%であった。また、生存日数において対照群に比べ統計学に有意な延命効果($p < 0.01$)がみられた。

メシマ[®]ピュアPL2.5 0.018g/kg群では、移植後23日目より死亡がみられ、移植後23日目に2例、29、30、32日目にそれぞれ1例死亡が観察され、観察終了日までに10例中5例が死亡した。平均生存日数は 31.7 ± 5.3 日であり、延命率は8.9%であった。生存日数は対照群と比べ統計学的有意差はみられなかった。

12. 体重

たもぎ茸熱水抽出エキス各投与群、アガリクス仙生露ロ

イヤル0.83mL/kg群、メシマ[®]ピュアPL2.5 0.018g/kg群の体重の推移に对照群との間に差はみられなかった。

図1 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド[®])の抗腫瘍作用(予防効果)(腫瘍体積)

図2 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド[®])の抗腫瘍作用(予防効果)(腫瘍重量)

図3-1 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド[®])の抗腫瘍作用(予防効果)(生存率)

図3-2 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド[®])の抗腫瘍作用(予防効果)(生存率:比較対照物質との比較I)

図3-3 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド[®])の抗腫瘍作用(予防効果)(生存率:比較対照物質との比較II)

図3-4 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド[®])の抗腫瘍作用(予防効果)(生存率:比較対照物質との比較III)

表1.培養条件の検討

No	培 地	容器	培地量 mL	シード条件	本 数	振とう/攪拌		日数	回収量	β グルカン ($\mu\text{g/g}$)
						回転数	間隔			
1	SPY	坂口	130	おが ¹ 0.8g	4	130	12時間	12	0.95	
2	SPY	坂口	130	おが ¹ 1.6g	4	130	12時間	12	0.92	6.0
3	GPY	坂口	300	おが ¹ 1.6g	8	80	24時間	14	1.19	5.7
4	GPY	坂口	300	おが ¹ 1.6g	4	110	24時間	7	0.93	
5	GPY	坂口	300	おが ² 2.4g	4	110	24時間	7	1.03	138.8
6	GPY	三角	300	液4mL	8	110	24時間	9	0.31	
7	GPY	三角	300	液4mL	1	静置		9	0.10	11.5
8	GPY	三角	2000	液30mL	1	70	2から5日目まで 攪拌	6	0.05	
9	GPY	三角	2000	液30mL	1	静置		12	0.01	
10	GPY	坂口	300	液4mL	8	110	3日目から攪拌	10	0.20	
11	GPY	三角	300	液4mL	8	静置	6日目から振とう	8	0.103	
12	GPY5%-CaCl ₂	坂口	300	液4mL	4	100	24時間	10	428	2.6
13	GPY5%-CaCl ₂	坂口	300	液4mL	4	100	24時間	13	555	1.7
15	GPY5%-CaCl ₂	三角	2000	液30mL	2	攪拌	連続	12	184	
16	GPY5%-CaCl ₂	三角	300	液4mL	8	110	24時間	9	241	
17	GPY5%-CaCl ₂	坂口	300	液4mL	8	攪拌	24時間	7	144	
18	SMYP	坂口	300	液4mL	7	100	連続	7	264	
19	SMYP	坂口	300	液4mL	7	100	連続	10	500	
20	SMYP	三角	300	液4mL	8	攪拌	24時間	13	190	
21	TPY	坂口	300	液4mL	7	100	連続	12	556	11.8
22	TPY	三角	2000	液30mL	2	攪拌	連続	13	39	
23	TPY	坂口	300	液4mL	7	90	連続	13	543	
24	G5%	坂口	300	液4mL	3	90	連続	14		
25	T5%	坂口	300	液4mL	4	90	連続	14		

※回収量は、凍結乾燥重量mg/培地100mL当り

※培地組成： SPY…… ショ糖2%、ペプトン1%、酵母エキス0.5%、KH₂PO₄ 0.5%

MgSO₄·7H₂O 0.05%

GPY …… グルコース2%、ペプトン1%、酵母エキス0.5%、KH₂PO₄ 0.5%

MgSO₄·7H₂O 0.05%

SMYP…… でんぷん2%、麦芽エキス1.0%、ペプトン0.1%、酵母エキス0.1%、

TPY …… レハロース2%、ペプトン1%、酵母エキス0.5%、KH₂PO₄ 0.5%

MgSO₄·7H₂O 0.05%

※CaCl₂は0.05%添加

※坂口フラスコは500ml容、三角フラスコは500ml容と3L容を使用した。

※種菌シードは当社で使用しているおがくず種菌及び、あらかじめおがくず種菌をGPY培地で2週間振とう培養したものを
使用した。

※培養温度は25℃から30℃

表2.βグルカン、DPPH測定結果

No	処 理	β-G	DPPH
		μg/mL	mg/mL
19SMYP	菌懸濁液	0.14	0.015
	菌懸濁液レトルト	0.72	0.006
	培養ろ液	0.76	0.018
21TPY	菌懸濁液	0.70	0.009
	菌懸濁液レトルト	1.64	0.014
	培養ろ液	0.17	0.016
23TPY	培養ろ液	0.09	0.031

表3.糖培地による培養結果

No	5%	pH	2週間振とう培養	
			β-G	全糖
			μg/ml	%
1	グルコース	3.0	0	1.81
2	グルコース	4.0	0.03	1.85
3	グルコース	4.5	0.05	1.70
4	トレハロース	3.0	0	1.13
5	トレハロース	4.0	0.69	1.18
6	トレハロース	4.5	0.31	1.08
7	トレハロース	7.1	0.61	0.49

表4.タンパク%

No	エキス%	pH	初発	6日目	減少量	13日目	減少量	18日目	減少量
1	0.3	4	0.210	0.044	0.166	0.028	0.016	0.023	0.005
2	0.5	4	0.268	0.086	0.182	0.059	0.027	0.043	0.016
3	0.7	4	0.342	0.118	0.224	0.073	0.045	0.06	0.013
4	1	4	0.452	0.209	0.243	0.155	0.054	0.112	0.043
5	1	7	0.489	0.194	0.295	0.157	0.037	0.158	-0.001

表5.ACE阻害活性%

No	エキス%	pH	初発	6日目	13日目	18日目	最終pH
1	0.3	4	0.0	37.7	41.9	37.9	
2	0.5	4	71.8	51.3	45.6	37.9	
3	0.7	4	80.0	55.8	47.0	40.8	
4	1	4	88.3	78.6	60.7	46.5	
5	1	7	86.6	68.3	55.8	56.4	8.08

表6.石突きエキス培養液の分析結果 (pH、タンパク)

No.	Bx	初発	5日目	8日目	13日目	初発	5日目	8日目	13日目
		pH				タンパク%			
1	1.0	4.04	4.41	4.76	6.53	0.323	0.149	0.123	0.097
2	1.0	4.12	4.63	5.65	5.90	0.323	0.118	0.110	0.090
3	1.0	5.10	6.82	4.62	6.80	0.323	0.119	0.127	0.089
4	1.0	5.09	6.68	4.89	6.09	0.323	0.126	0.130	0.097
5	1.0	6.32	7.07	4.68	6.81	0.323	0.150	0.131	0.088
6	1.0	6.10	5.52	4.93	6.64	0.323	0.129	0.121	0.099
7	2.0	4.05	4.23	4.36	4.81	0.613	0.625	0.230	0.181
8	2.0	3.99	4.04	4.15	4.67	0.613	0.427	0.342	0.233
9	2.0	5.02	5.65	6.10	5.71	0.613	0.287	0.230	0.198
10	2.0	5.07	6.39	5.57	5.22	0.613	0.279	0.207	0.219
11	2.0	6.19	6.09	5.70	6.90	0.613	0.438	0.449	0.364
12	2.0	6.07	6.63	5.68		0.613	0.255	0.228	
13	3.0	4.09	4.12	4.18	4.38	0.808	0.615	0.555	0.447
14	3.0	4.11	4.17	4.23		0.808	0.550	0.482	
15	3.0	5.09	5.44	5.85	6.08	0.808	0.382	0.363	0.289
16	3.0	5.08	6.28	6.37		0.808	0.388	0.310	
17	3.0	6.12	6.48	6.54	6.18	0.808	0.522	0.312	0.295
18	3.0	6.00	6.32	6.29	6.01	0.808	0.477	0.344	0.283
19	0.5	4.01	4.49	5.50	6.96	0.183	0.086	0.080	0.059

表7.石突きエキス培養液の分析結果(全糖、ACE阻害率)

		初発	5日目	8日目	13日目	初発	5日目	8日目	13日目
No.	Bx	全糖%				ACE阻害率%			
1	1.0	0.372	0.218	0.144	0.036	70.4	22.4	0.0	8.1
2	1.0	0.372	0.157	0.124	0.089	70.4	24.3	10.6	8.2
3	1.0	0.372	0.132	0.155	0.098	70.4	14.4	4.8	8.2
4	1.0	0.372	0.134	0.081	0.089	70.4	15.7	10.8	8.2
5	1.0	0.372	0.180	0.108	0.122	70.4	18.8	0.0	8.1
6	1.0	0.372	0.139	0.129	0.102	70.4	24.2	0.0	8.1
7	2.0	0.597	0.411	0.345	0.150	100.0	52.7	34.5	8.1
8	2.0	0.597	0.472	0.517	0.193	100.0	69.4	39.0	7.9
9	2.0	0.597	0.241	0.254	0.225	100.0	38.3	12.5	8.0
10	2.0	0.597	0.222	0.198	0.145	100.0	39.7	12.2	8.0
11	2.0	0.597	0.370	0.287	0.257	100.0	40.6	24.7	7.9
12	2.0	0.597	0.316	0.251		100.0	38.1	18.0	
13	3.0	0.990	0.747	0.811	0.440	100.0	43.7	36.6	8.1
14	3.0	0.990	1.036	0.983		100.0		39.1	
15	3.0	0.990	0.876	0.390	0.398	100.0	35.2	9.4	7.9
16	3.0	0.990	0.747	0.412		100.0	38.6	25.0	7.8
17	3.0	0.990	0.640	0.510	0.400	100.0	32.1	26.6	
18	3.0	0.990	0.631	0.385	0.391	100.0	33.5	27.2	7.8
19	0.5	0.182	0.118	0.060	0.041	46.8	0.0	0.0	7.8

※ACE阻害率は液クロ法で分析した。

表8.石突きエキス培養液の分析結果

				6日目					
初発				全糖	タンパク	pH	タンパク	全糖	阻害率
No.	Bx	pH	糖添加	%	%		%	%	%
1	1.0	4.0	T2%	2.27	0.211	4.23	0.136	2.27	8.10
2	1.0	4.0	T4%	4.27	0.211	4.23	0.129	3.23	8.00
3	1.0	5.0	T2%	2.27	0.211	6.12	0.100	2.09	8.00
4	1.0	5.0	T4%	4.27	0.211	6.04	0.124	3.10	8.00
5	1.0	4.0	G4%	4.27	0.211	4.09	0.527	4.12	8.00
6	1.0	5.0	G4%	4.27	0.211	5.72	0.495	3.81	7.90
7	1.0	6.07	0	0.27	0.211	7.30	0.098	0.19	7.90
8	2.0	4.0	T2%	2.54	0.422	4.08	0.371	2.18	60.5
9	2.0	4.0	T4%	4.54	0.422	4.07	0.372	3.70	59.0
10	2.0	5.0	T2%	2.54	0.422	5.60	0.274	1.88	45.1
11	2.0	5.0	T4%	4.54	0.422	5.58	0.244	3.66	42.8
12	2.0	4.0	G4%	4.54	0.422	4.03	0.663	4.78	58.6
13	2.0	6.07	0	0.27	0.422	6.76	0.233	0.32	43.4
14	2.8	4.0	T2%	2.76	0.591	4.02	0.518	2.47	69.0
15	2.8	4.0	T4%	4.76	0.591	4.03	0.513	4.48	70.7
16	2.8	5.0	T2%	2.76	0.591	5.36	0.407	2.43	63.8
17	2.8	5.0	T4%	4.76	0.591	5.35	0.445	3.95	71.1
18	2.8	4.0	G4%	4.76	0.591	4.02	0.980	4.56	79.4
19	2.8	6.1	0.0	0.76	0.591	6.47	0.415	0.43	64.6

表9.石突きエキス培養液の分析結果

12日目

No.	pH	タンパク	全糖	阻害率	菌糸の状態
		%	%	%	
1	4.50	0.151	1.00	25.8	塊
2	4.43	0.165	4.56	38.9	塊
3	5.20	0.143	2.27	19.8	繊維
4	5.02	0.155	4.37	36.1	繊維
5	4.13	0.342	4.69	58.8	塊
6	4.98	0.393	4.92	40.5	繊維
7	7.76	0.072	0.15	20.6	塊
8	4.24	0.341	2.53	73.0	塊
9	4.21	0.346	4.67	66.5	塊
10	5.60	0.269	1.97	49.0	繊維
11	5.38	0.233	4.72	57.9	繊維
12	4.14	0.571	5.22	83.2	塊
13	5.84	0.176	0.25	40.6	塊
14	4.13	0.460	2.94	79.2	繊維
15	4.15	0.465	6.10	76.5	繊維
16	5.80	0.317	2.51	39.0	繊維
17	5.80	0.337	4.28	56.6	繊維
18	4.08	0.819	5.47	84.0	塊
19	6.61	0.305	0.33	30.3	繊維

表10.廃培地抽出液の培養分析結果

6日目

13日目

初発				6日目		pH	13日目			タンパク	全糖	阻害率	菌糸体
No.	%	pH	糖	タンパク	全糖		タンパク	全糖	阻害率				
				%	%		%	%	%	%	%	%	
1	5.0	4.0	0	0.07	0.15	5.92	0.04	0.04	8.70	0.05	0.03	3.7	小さい塊
2	5.0	5.0	0	0.07	0.15	5.56	0.03	0.03	1.50	0.04	0.04	9.6	塊+繊維
3	5.0	6.0	0	0.07	0.15	5.55	0.03	0.02	4.30	0.03	0.04	0	小さい塊
4	5.0	4.0	T4%	0.07	4.15	4.40	0.05	3.60	12.60	0.06	3.06	10	小さい塊
5	5.0	5.0	T4%	0.07	4.15	5.71	0.04	3.46	8.60	0.08	3.51	0	繊維
6	5.0	6.0	T4%	0.07	4.15	5.33	0.03	3.51	5.00	0.05	3.27	0	繊維
7	5.0	4.0	G4%	0.07	4.15	4.45	0.38	3.85	7.50	0.47	3.72	0	小さい塊
8	5.0	5.0	G4%	0.07	4.15	5.80	0.42	4.00	2.70	0.52	4.41	0	小さい塊
9	5.0	6.0	G4%	0.07	4.15	5.46	0.42	4.32	0.00	0.55	4.01	2.3	繊維
10	10.0	4.0	0	0.10	0.10	5.69	0.06	0.25	9.00	0.05	0.05	1	小さい塊
11	10.0	5.0	0	0.10	0.10	5.66	0.05	0.09	0.00	0.06	0.04	0	繊維
12	10.0	5.8	0	0.10	0.10	5.53	0.05	0.09	0.00	0.06	0.04	0	繊維
13	10.0	4.0	T4%	0.10	4.10	4.38	0.08	3.29	24.80	0.10	4.19	0	大きい塊
14	10.0	5.0	T4%	0.10	4.10	5.44	0.06	3.23	0.00	0.07	3.46	0	塊+繊維
15	10.0	5.8	T4%	0.10	4.10	5.13	0.05	3.46	0.00	0.06	3.58	0	塊+繊維
16	10.0	4.0	G4%	0.10	4.10	4.39	0.42	3.74	19.60	0.49	3.74	3.2	大きい塊
17	10.0	5.0	G4%	0.10	4.10	5.67	0.43	3.98	23.50	0.53	3.56	8.6	大きい塊
18	10.0	5.8	G4%	0.10	4.10	5.57	0.45	4.18	6.90	0.53	3.79	0	小さい塊
19	10.0	4.0	G5%	0.10	4.10	4.33	0.53	3.97	31.60	0.65	4.41	0	大きい塊

表11.おがくず抽出液の培養分析結果

初発				6日目			13日目					
				タンパク	全糖	pH	タンパク	全糖	阻害率	タンパク	全糖	阻害率
				%	%		%	%	%	%	%	%
No.	%	pH	糖									
1	5.0	4.0	0	0.37	0.06	4.08	0.33	0.08	4.12	0.31	0.06	0.2
2	5.0	5.0	0	0.37	0.06	4.88	0.32	0.05	4.85	0.33	0.09	22.1
3	5.0	6.0	0	0.37	0.06	5.50	0.31	0.05	5.18	0.27	0.10	11.7
4	5.0	4.0	T4%	0.37	4.06	4.30	0.33	4.33	4.31	0.31	4.71	8.8
5	5.0	5.0	T4%	0.37	4.06	4.73	0.28	3.36	4.62	0.23	4.96	3.9
6	5.0	6.0	T4%	0.37	4.06	5.30	0.32	4.20	4.96	0.25	4.40	0.0
7	5.0	4.0	G4%	0.37	4.06	4.22	0.63	4.78	4.21	0.65	4.58	0.0
8	5.0	5.0	G4%	0.37	4.06	4.69	0.66	5.10	4.62	0.60	4.68	12.9
9	5.0	6.0	G4%	0.37	4.06	4.90	0.67	3.30	4.74	0.65	4.19	2.5
10	10.0	4.0	0	0.46	0.09	4.31	0.46	0.21	4.31	0.45	0.11	0.0
11	10.0	5.0	0	0.46	0.09	4.93	0.44	0.12	4.90	0.52	0.11	0.0
12	10.0	6.0	0	0.46	0.09	5.50	0.43	0.09	5.41	0.42	0.11	0.0
13	10.0	4.0	T4%	0.46	4.09	4.25	0.43	5.11	4.27	0.42	4.38	0.0
14	10.0	5.0	T4%	0.46	4.09	4.88	0.44	5.14	4.85	0.43	4.85	0.0
15	10.0	6.0	T4%	0.46	4.09	5.37	0.43	4.95	5.20	0.41	4.80	0.0
16	10.0	4.0	G4%	0.46	4.09	4.18	0.71	4.95	4.20	0.71	4.96	0.0
17	10.0	5.0	G4%	0.46	4.09	4.79	0.76	5.23	4.75	0.75	4.81	12.8
18	10.0	6.0	G4%	0.46	4.09	5.04	0.78	5.52	4.96	0.82	5.37	0.0
19	10.0	4.0	G5%	0.46	4.09	4.21	0.89	6.24	4.22	0.86	4.95	0.0

表12.アミノ酸添加培地の培養分析結果

初発			6日目				10日目				グルタミン酸 (最終)
グルタミン酸			糖	タンパク	糖	阻害率	タンパク	糖	阻害率	pH	
No.	%	pH									
1	0.2	4.0	0	0.03	0.00	5.8	0.02	0.00	16.1	3.86	
2	0.2	6.0	0	0.02	0.00	0.0	0.02	0.00	19.7	7.15	
3	0.2	4.0	T4%	0.05	2.78	0.0	0.07	2.70	32.7	3.81	
4	0.2	6.0	T4%	0.04	2.82	0.0	0.07	2.80	30.8	5.94	
5	0.2	4.0	G4%	0.47	2.39	18.0	0.42	3.38	60.0	3.80	
6	0.2	6.0	G4%	0.55	2.58	24.8	0.49	3.38	33.2	5.89	0.18
7	0.5	4.0	0	0.05	0.02	4.0	0.04	0.01	24.3	3.81	
8	0.5	6.0	0	0.04	0.00	0.9	0.02	0.00	26.4	7.02	
9	0.5	4.0	T4%	0.08	1.78	0.0	0.09	2.66	32.3	3.82	
10	0.5	6.0	T4%	0.06	1.86	5.1	0.09	2.83	29.4	5.76	
11	0.5	4.0	G4%	0.48	2.77	25.9	0.41	3.29	46.1	3.77	
12	0.5	6.0	G4%	0.64	3.35	19.0	0.47	2.97	37.7	5.97	0.46
13	0.2	4.0	T4%	0.18	2.81	54.6	0.14	2.56	51.6	4.15	
14	0.2	6.0	T4%	0.12	2.92	34.3	0.12	2.30	38.0	6.36	
15	0.2	4.0	G4%	0.53	2.87	59.9	0.49	2.91	37.0	4.21	
16	0.2	6.0	G4%	0.55	3.03	37.8	0.53	3.23	38.9	6.08	0.14
17	0.2	4.0	G4%	0.53	2.51	50.8	0.52	0.07	40.7	4.19	
18	0.2	4.0	0.0	0.14	0.09	29.3	0.12	0.05	24.3	4.46	
19	0.2	6.0	0.0	0.12	0.06	34.5	0.10	3.82	30.2	6.04	

*No.13からNo.19まで10%廃培地抽出液ベース

No.13からNo.19まで初発タンパク0.183%

No.18初発全糖0.25%

表13.アミノ酸添加培地の培養分析結果

9日目					12日目						
No.		%	pH	糖	初期pH	タンパク	糖	阻害率	タンパク	糖	阻害率
1	L(-)Pro	0.2	6.0	G4%	7.08	0.47	2.91	14.8	0.47	2.40	14.0
2	Lアラニン	0.2	6.0	G4%	7.04	0.41	3.04	5.2	0.38	2.79	22.5
3	Lリジン	0.2	6.0	G4%	6.95	0.44	3.23	15.4	0.37	3.04	19.2
4	L(+)-Arg	0.2	6.0	G4%	9.82	0.52	3.41	1.4	0.46	2.98	17.0
5	Lノバリン	0.2	6.0	G4%	7.12	0.43	2.80	0.7	0.38	2.88	3.5
6	LAsp	0.2	6.0	G4%	3.20	0.44	3.02	0.0	0.41	2.76	0.0
7	Lロイシン	0.2	6.0	G4%	7.08	0.44	2.66	0.4	0.41	2.86	0.0
8	L-His	0.2	6.0	G4%	7.62	0.41	2.73	41.3	0.38	3.16	35.4
9	グリシン	0.2	6.0	G4%	7.06	0.43	2.40	12.3	0.40	2.98	0.0
10	Lセリン	0.2	6.0	G4%	7.00	0.49	2.22	19.2	0.43	2.84	0.0
11	L(-)Phe	0.2	6.0	G4%	7.13	0.51	3.06	14.6	0.49	3.00	0.0
12	GABA	0.2	6.0	G4%	7.33	0.46	3.07	25.5	0.48	2.99	14.0
13	Ala	0.1	6.0	G4%	7.24	0.42	2.91	20.3	0.44	3.08	1.0
	Pro	0.1									
14	Lys	0.1	6.0	G4%	7.03	0.45	2.32	33.7	0.44	2.88	17.6
	Pro	0.1									
15	Arg	0.1	6.0	G4%	9.54	0.53	2.89	18.7	0.51	2.92	30.2
	Pro	0.1									
16	Ala	0.1	6.0	G4%	8.96	0.51	1.43	33.6	0.51	2.87	31.6
	Pro	0.1									
	Lys	0.1									
	Arg	0.1									
17	硫アン	0.2	6.0	G4%	7.08	0.41	0.95	34.6	0.41	3.02	30.4
18	Glu	0.2	6.0	G4%	3.55	0.47	1.38	30.6	0.43	2.84	28.1
19	Glu	0.2	6.0	St3%	3.55	0.02	2.51	0.0	0.03	2.16	2.4

表14.アミノ酸添加培地の培養分析結果

グルタミン酸

6日目

No.	%	pH	糖	タンパク	糖	pH	阻害率
1	0.2	5.0	G3%	0.21	2.61	4.95	10.0
2	0.2	5.0	G5%	0.33	3.90	5.02	21.1
3	0.2	5.0	Suc3%	0.06	2.87	5.09	0.0
4	0.2	5.0	Suc5%	0.10	4.43	5.06	14.3
5	0.2	6.0	G3%	0.22	2.33	5.79	0.0
6	0.2	6.0	G5%	0.40	3.68	5.99	12.3
7	0.2	6.0	Suc3%	0.01	2.85	6.71	0.0
8	0.2	6.0	Suc5%	0.02	4.36	6.73	6.9
9	0.2	7.0	G3%	0.30	2.21	6.55	0.0
10	0.2	7.0	G5%	0.53	3.19	6.12	0.2
11	0.2	7.0	Suc3%	0.01	2.88	7.12	0.0
12	0.2	7.0	Suc5%	0.01	4.62	6.57	0.0
13	0.5	5.0	G5%	0.37	3.68	4.85	0.0
14	0.5	6.0	G5%	0.39	3.53	5.60	0.0
15	0.5	7.0	G5%	0.47	3.60	5.88	0.0
16	0.5	8.0	G5%	0.54	3.82	6.10	2.5
17	0.7	5.0	G5%	0.40	3.69	4.91	8.2
18	0.7	6.0	G5%	0.45	3.45	5.51	0.0
19	0.7	7.0	G5%	0.60	3.52	5.94	3.2

表15.アミノ酸添加培地の培養分析結果

13日目					19日目			
No.	タンパク	糖	pH	阻害率	タンパク	糖	pH	阻害率
1	0.28	2.29	5.10	7.1	0.32	2.05	5.25	30.3
2	0.41	3.70	5.19	14.1	0.48	3.67	5.32	35.3
3	0.08	2.76	5.31	0.0	0.10	2.64	5.46	57.3
4	0.13	4.49	5.27	11.1	0.16	4.31	5.47	56.0
5	0.28	2.44	5.86	13.4	0.31	2.41	5.77	46.2
6	0.50	3.86	6.02	13.5	0.55	3.88	5.91	62.7
7	0.01	2.73	6.38	4.2	0.01	2.74	6.58	57.4
8	0.02	4.28	6.32	36.7	0.01	4.24	6.21	40.7
9	0.37	2.34	5.95	21.6	0.37	2.50	6.05	44.3
10	0.59	3.66	5.90	34.4	0.63	3.82	5.97	43.5
11	0.01	2.68	7.26	20.4	0.01	2.51	6.98	61.5
12	0.01	4.55	6.68	18.2	0.01	4.31	7.09	49.0
13	0.50	3.89	4.91	43.4	0.53	4.08	4.97	60.4
14	0.51	3.60	5.72	27.0	0.54	3.66	5.79	68.5
15	0.59	3.73	6.09	31.4	0.60	3.83	5.93	64.7
16	0.66	3.76	6.13	51.5	0.69	4.02	5.82	67.1
17	0.50	3.80	4.95	29.1	0.54	4.07	5.01	62.7
18	0.54	3.74	5.62	26.3	0.58	4.05	5.70	60.5
19	0.66	3.59	6.05	36.0	0.71	4.10	5.90	59.4

表16.アミノ酸添加培地の培養分析結果

7日目						14日目						
No.	アミノ酸	%	pH	糖	pH	タンパク	糖	阻害率	pH	タンパク	糖	阻害率
1	グルタミン酸	0.2	4.0	G4%	3.76	0.36	2.88	19.5	3.75	0.44	4.83	9.0
2	グルタミン酸	0.2	6.0	G4%	5.82	0.38	2.79	2.5	5.97	0.43	4.77	17.8
3	グルタミン酸	0.2	8.0	G4%	5.92	0.48	2.97	2.2	6.56	0.53	4.34	0.0
4	グルタミン酸	0.2	4.0	T4%	3.90	0.01	2.79	0	3.9	0.01	4.46	0.0
5	グルタミン酸	0.2	6.0	T4%	5.60	0.01	2.66	0	5.67	0.01	4.11	0.0
7	ベタイン	0.2	4.0	G4%	4.02	0.40	2.95	0	4.04	0.38	4.51	0.0
8	ベタイン	0.2	6.0	G4%	5.93	0.35	2.88	0.9	6.1	0.40	4.34	0.0
9	ベタイン	0.2	8.0	G4%	6.17	0.42	2.93	8.1	6.14	0.49	4.43	0.0
10	ベタイン	0.2	4.0	T4%	4.13	0.00	2.75	0	4.14	0.01	4.12	0.0
11	ベタイン	0.2	6.0	T4%	6.15	0.01	2.80	0	6.19	0.01	4.17	0.0
12	ベタイン	0.2	8.0	T4%	6.78	0.01	2.67	0	5.76	0.01	4.51	0.0
13	ベタイン	0.4	4.0	G4%	4.01	0.32	3.17	0	4.01	0.41	4.39	0.0
14	ベタイン	0.4	6.0	G4%	5.60	0.35	2.91	0	5.74	0.42	4.62	0.0
15	ベタイン	0.4	8.0	G4%	6.12	0.41	2.97	0	5.73	0.49	4.64	2.6
16		0.0	4.0	G4%	3.99	0.38	3.21	0	4	0.40	4.51	0.0
17		0.0	4.0	T4%	4.01	0.01	2.80	0	4.03	0.01	4.39	0.0
18		0.0	6.0	G4%	5.59	0.43	3.18	22.6	5.73	0.46	4.63	0.0
19		0.0	6.0	T4%	5.85	0.01	2.87	6.4	6.06	0.01	4.36	0.0

表17.アミノ酸添加培地の培養分析結果

グルタミン酸		6日目		13日目	
No.	%	pH	糖	阻害率	阻害率
1	0.2	4.0	G4%	18.2	26.7
2	0.2	6.0	G4%	<0	23.4
3	0.2	4.0	Suc4%	27.7	55.2
4	0.2	6.0	Suc4%	<0	7.0
5	0.2	4.0	T4%	<0	0.0
6	0.2	6.0	T4%	<0	0.0
7	0.4	4.0	G4%	28.4	45.6
8	0.4	6.0	G4%	<0	15.1
9	0.4	4.0	Suc4%	31.3	61.7
10	0.4	6.0	Suc4%	<0	0.0
11	0.4	4.0	T4%	<0	0.0
12	0.4	6.0	T4%	<0	0.0
13	0.6	4.0	G4%	1.2	41.4
14	0.6	4.0	G5%	12.5	36.3
15	0.6	6.0	G4%	<0	0.0
16	0.6	4.0	Suc4%	64.0	87.7
17	0.6	6.0	Suc4%	<0	0.0
18	0.6	4.0	T4%	<0	0.0
19	0.6	6.0	T4%	<0	0.0

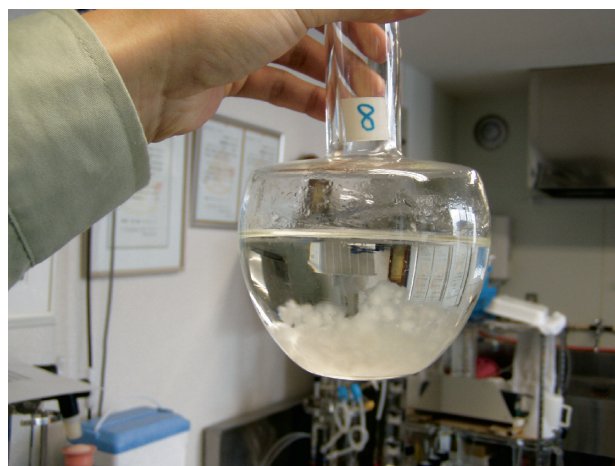


写真1 培養菌糸体(繊維状)



写真2 培養菌糸体(ペレット状)

表18.5Lファーマンターの培養分析結果

	培 地	pH	培養日数	阻害率
1	石突きエキスBx2.2+G4%	6.2	5	58.0
2	たもぎエキスBx1.0+G4%	6	11	44.7
3	廃培地エキス10%+G4%		10	51.3
4	Glucose4%+GlutamicAcid0.2%	6	7	21.7
5	Glucose5%+GlutamicAcid0.7%	6	8	26.1
6	Toreha5%+GlutamicAcid0.5%	6	14	0.0
7	Glucose5%+Beta0.5%	6	6	0.0
8	Glucose5%+GlutamicAcid0.5%	4	13	65.6

表19.ACE阻害活性分析結果

濃度	サンプル/阻害率(%)			
	5L-5	5L-8	18-5	18-16
0.2	4.24	22.71	16.67	0
0.33	17.78	39.38	38.37	40.63
0.5	38.79	46.15	46.7	52.26
1	63.43	67.95	65.1	82.64
IC50濃度	0.67倍	0.57倍	0.57倍	0.46倍

表20.糖、糖アルコールとバイオゴッドのIC50

	マンニトール	グルコース	キシリトール	バイオゴッド
IC50濃度(%)	0.67	2.51	1.74	2.00

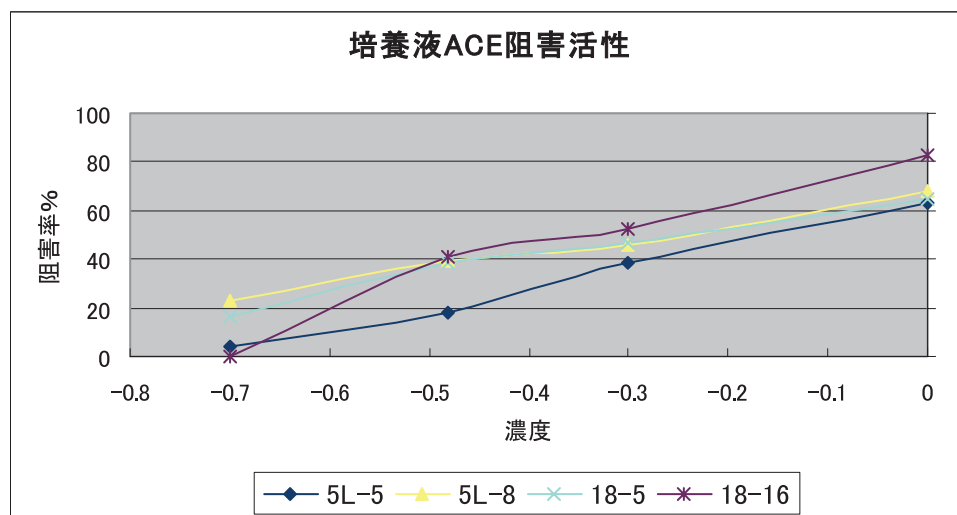


図1 培養液のACE阻害活性

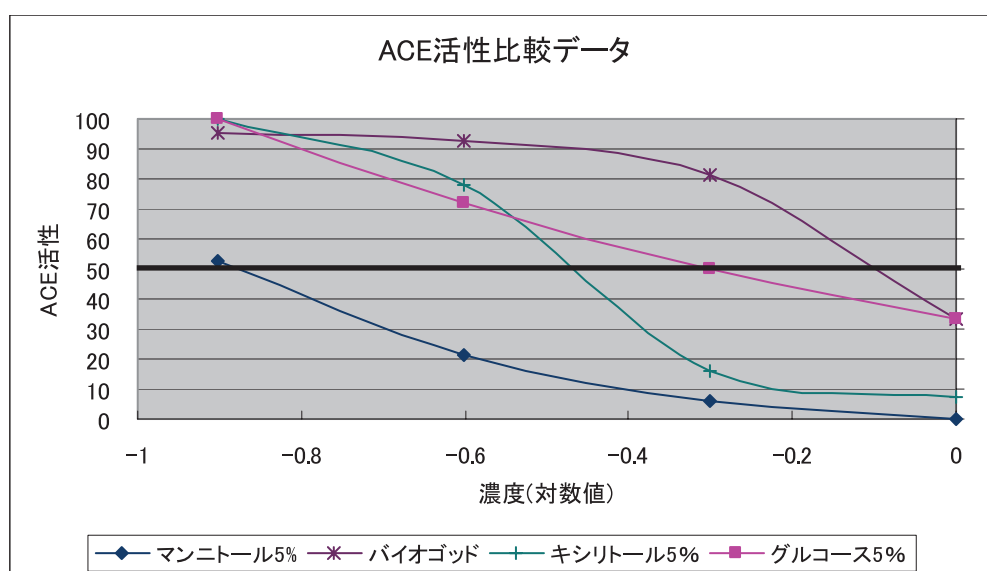


図2 糖類のACE活性比較

表21 試験群の構成

試験群	投与液濃度 (vol%)	投与容量 (mL/kg)	動物数 (動物番号)
対照群 ^{注1)}	—	12	10 (151～160)
たもぎ茸熱水抽出 エキス(Bラ3.0)1.33 mL/kg群	11.1	12	10 (251～260)
たもぎ茸熱水抽出 エキス(Bラ3.0)4.0 mL/kg群	33.3	12	10 (351～360)
たもぎ茸熱水抽出 エキス(Bラ1.0)1.33 mL/kg群	11.1	12	10 (451～460)
アガリクス仙生露ロイヤル0.83 mL/kg群	6.9	12	10 (551～560)
メシマ [®] ピュアPL2.5 0.018 g/kg群	0.15 w/v%	12	10 (651～660)

計 60

注1) : 日本薬局方精製水を投与した。

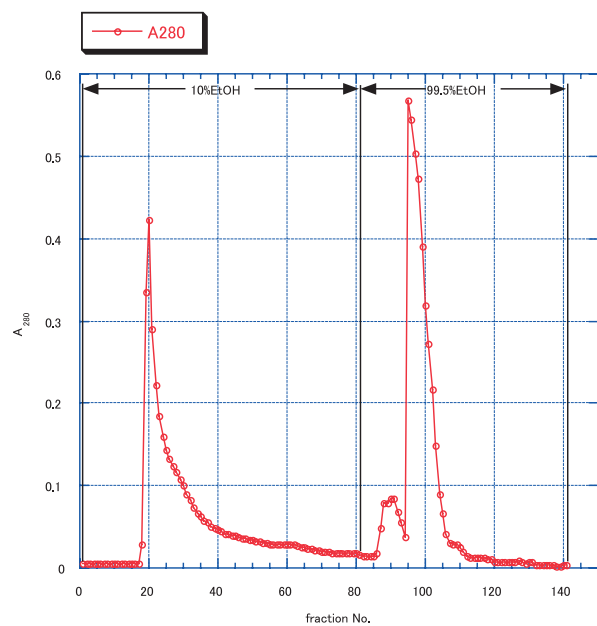


図3 ODS120S50を用いたDPEのカラムクロマトグラム

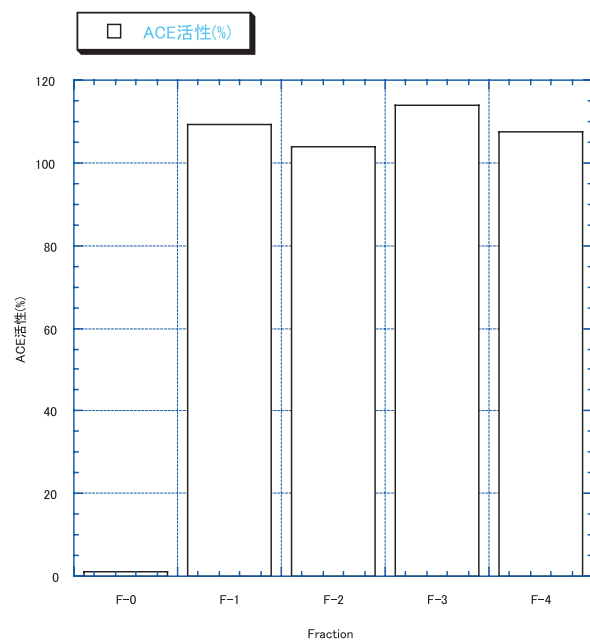


図4 ODSカラムクロマトグラフィーによって分画された各画分のACE活性の比較

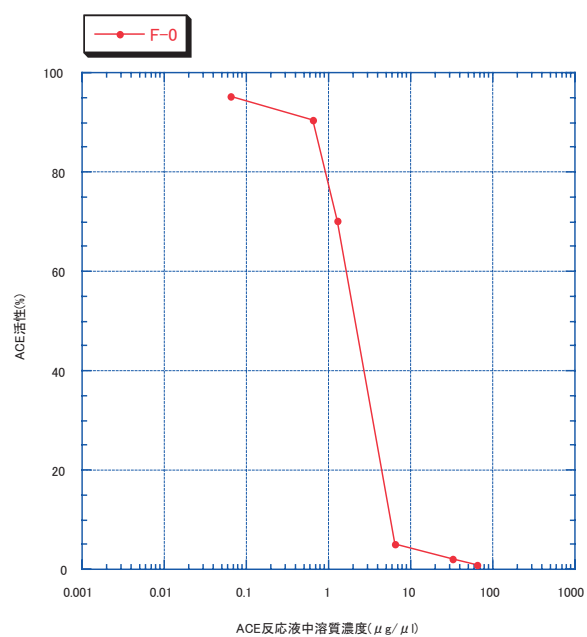


図5 F-0の異なる濃度におけるACE活性

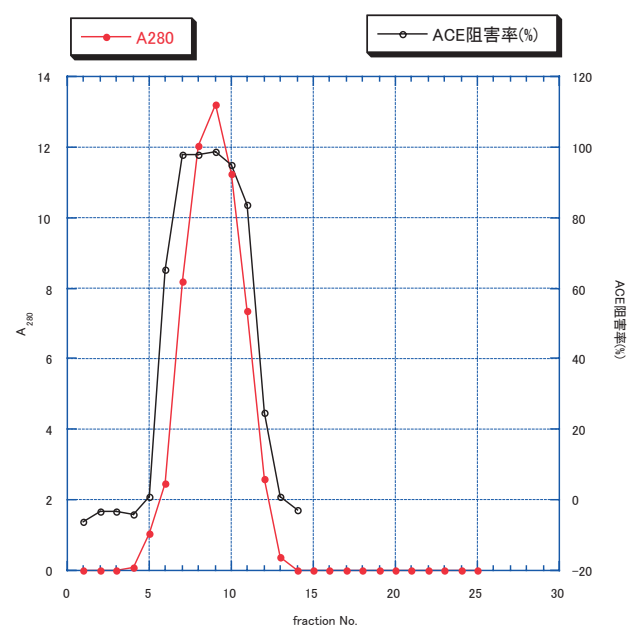


図6 Sephadex-G25を用いたF-0のカラムクロマトグラムとACE阻害率

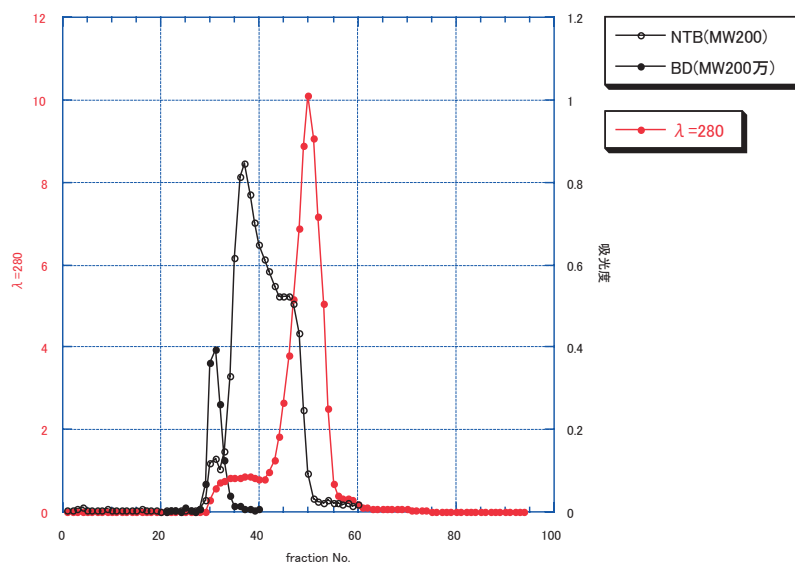


図7 Sephadex-G10を用いたF-0のカラムクロマトグラム

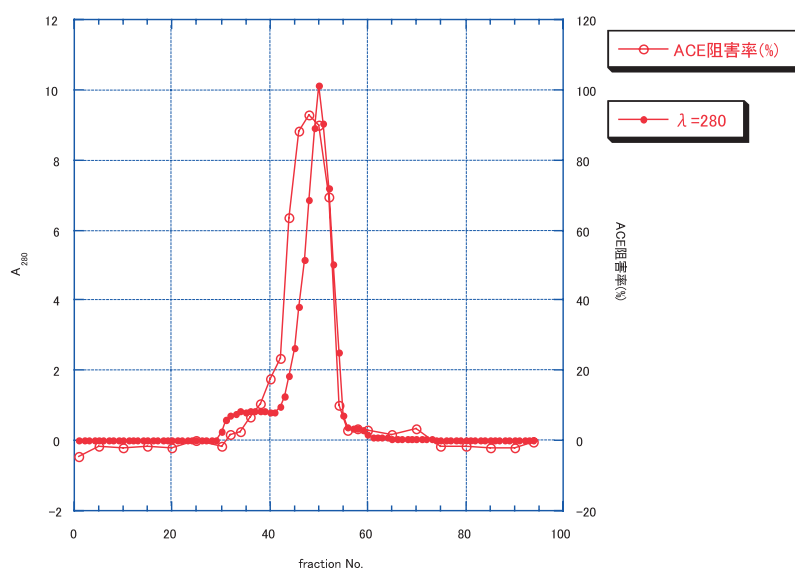


図8 Sephadex-G10を用いたF-0のカラムクロマトグラムとACE阻害率

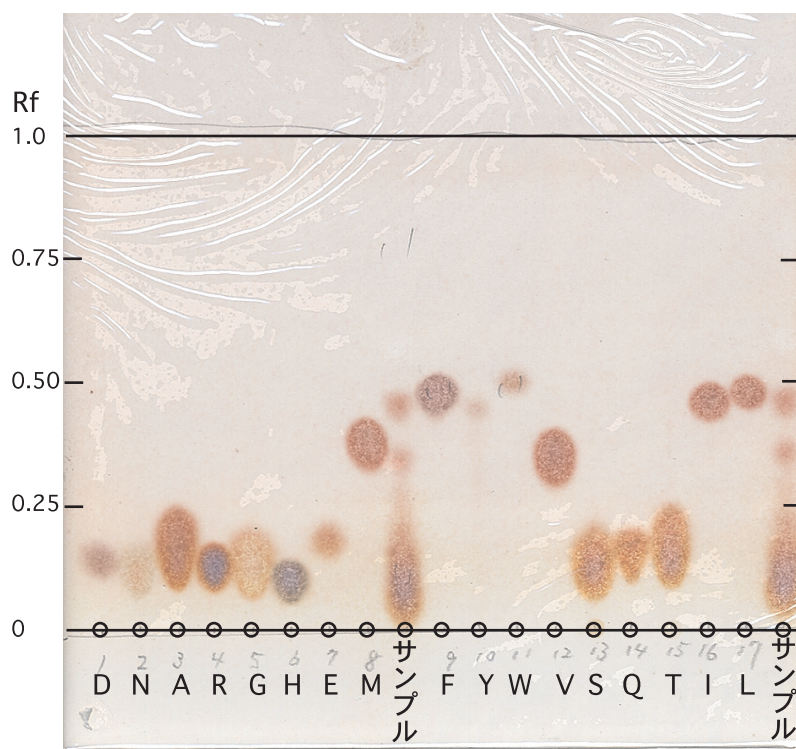


図9 ODSカラムの非吸着画分のTLC

サンプル：非吸着画分(6倍希釈)

展開溶剤：BuOH:AcOH:H₂O = 4:1:2

プレート：Silica gel 60

発色剤：0.2% ninhydrin in 1-Butanol : 10% acetic acid aq = 1

加熱条件：105°C 10min

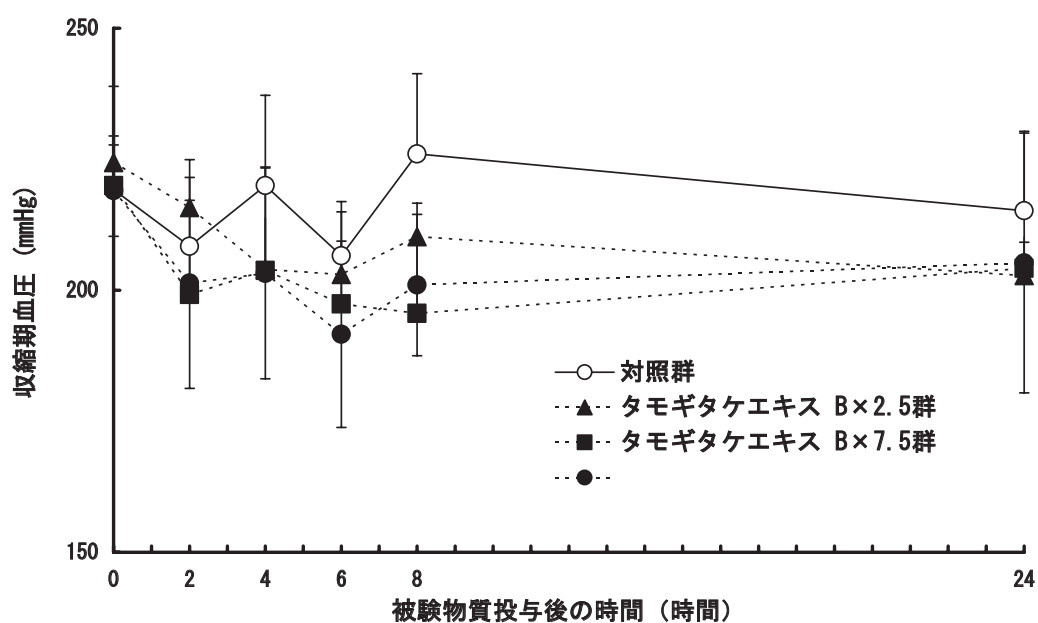


図10 タモギタケエキスの自然発症高血圧ラットの血圧に及ぼす影響(単回経口投与による経時変化)
 平均値±標準偏差、n=5. ** p<0.01：対照群との比較(Dunnettの多重比較検定、片側検定)

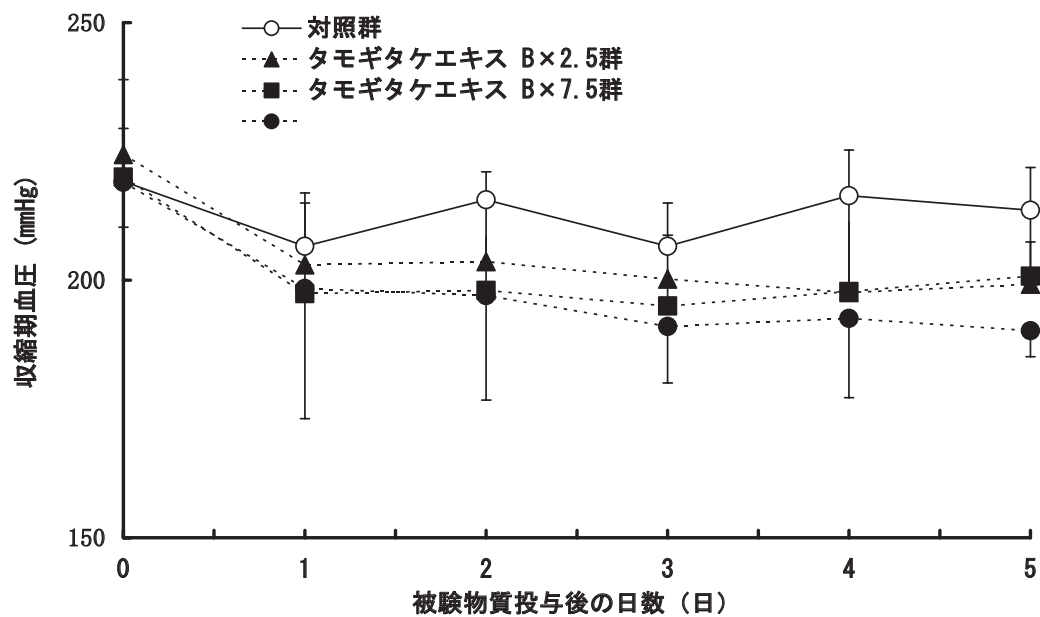


図11 タモギタケエキスの自然発症高血圧ラットの血圧に及ぼす反復経口投与の影響(投与後6時間の収縮期血圧)
 平均値±標準偏差、n=5.

* p<0.05, ** p<0.01 : 対照群との比較 (Dunnettの多重比較検定、片側検定)

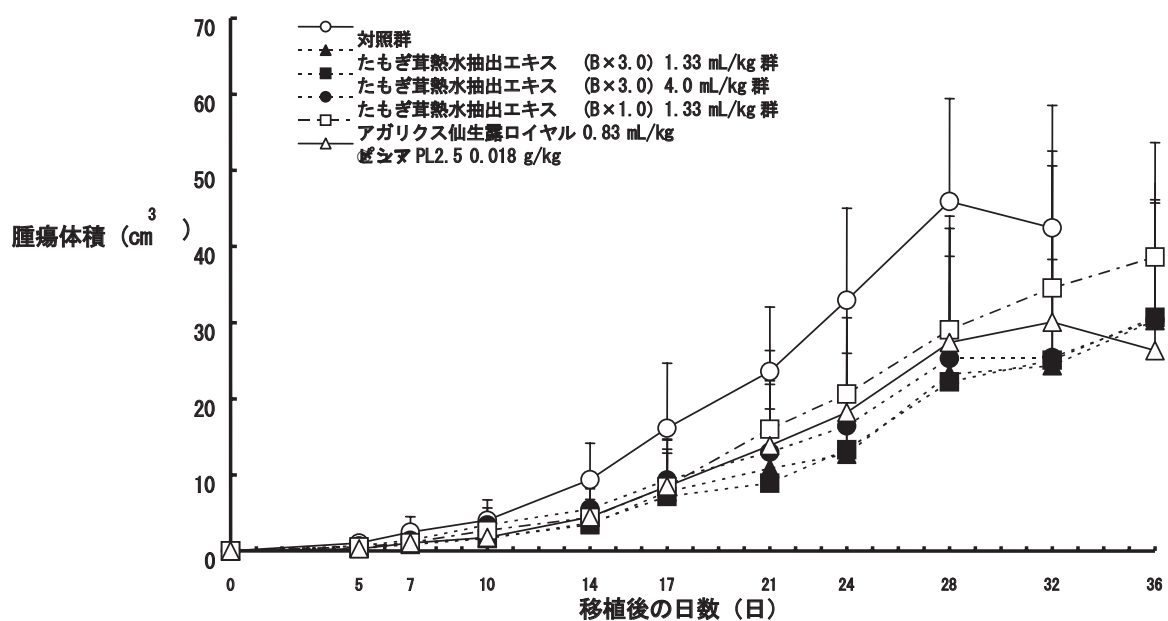


図12 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド)の抗腫瘍作用(予防効果)(腫瘍体積)
 平均値±標準偏差、n=10.

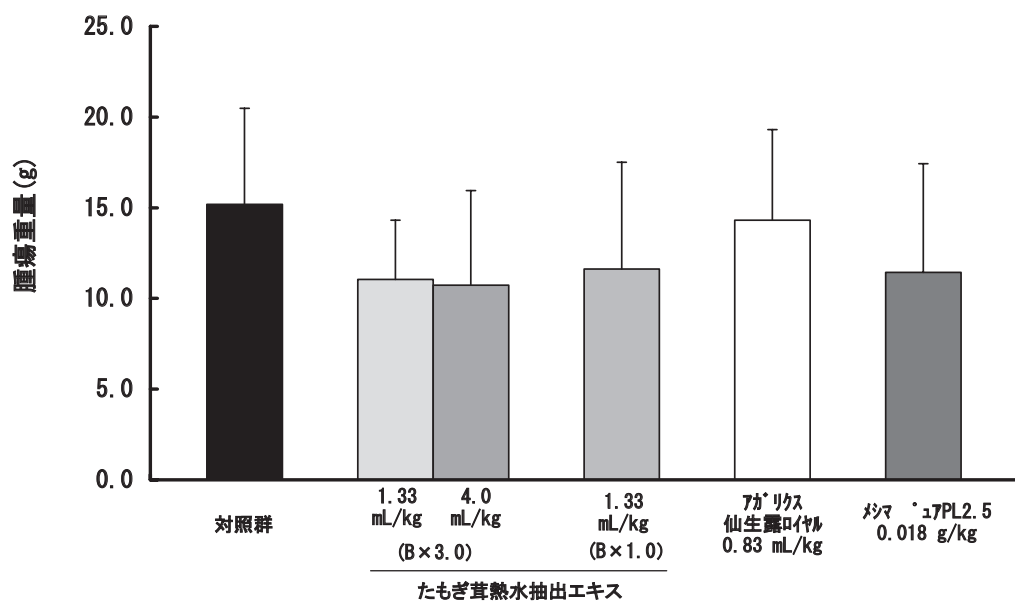


図13 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド)の抗腫瘍作用(予防効果)(腫瘍重量) 平均値±標準偏差、n=10.

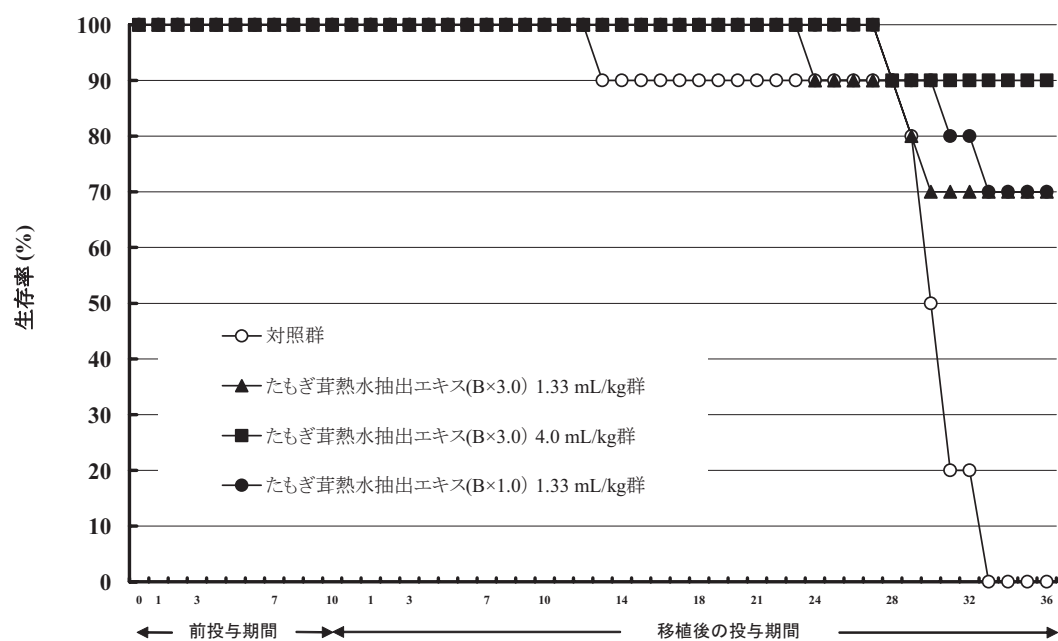


図14-1 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド)の抗腫瘍作用(予防効果)(生存率)

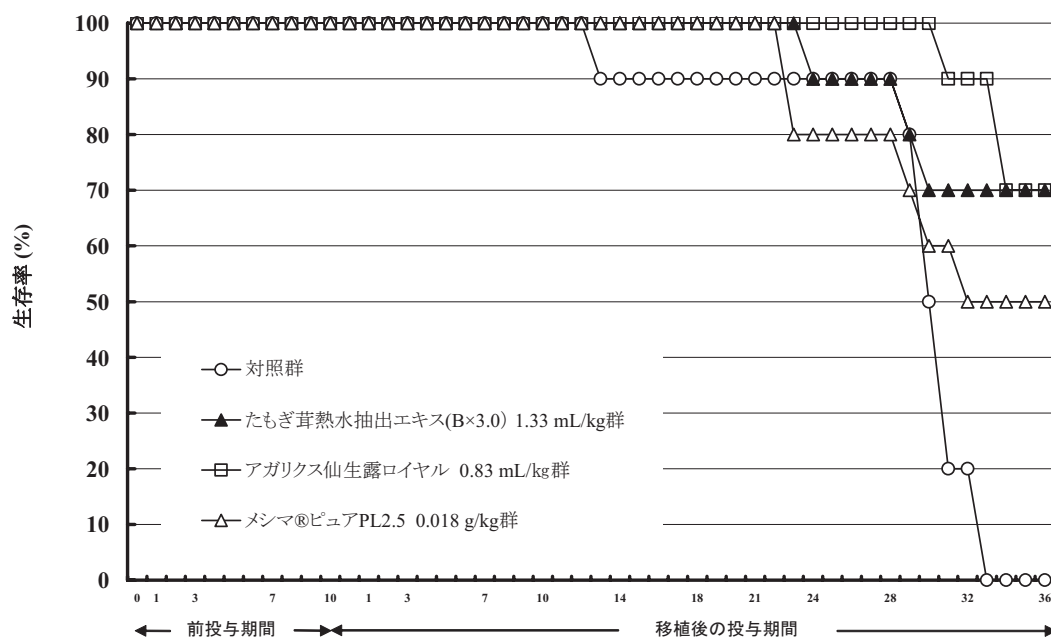


図14-2 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド)の抗腫瘍作用(予防効果)(生存率:比較対照物質との比較I)

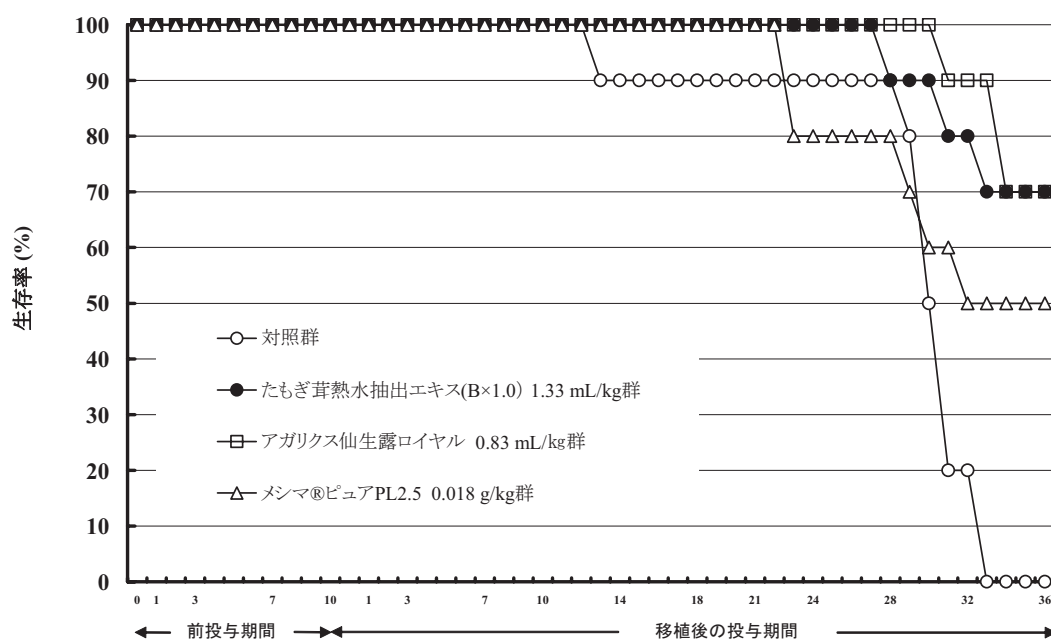


図14-3 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド)の抗腫瘍作用(予防効果)(生存率:比較対照物質との比較II)

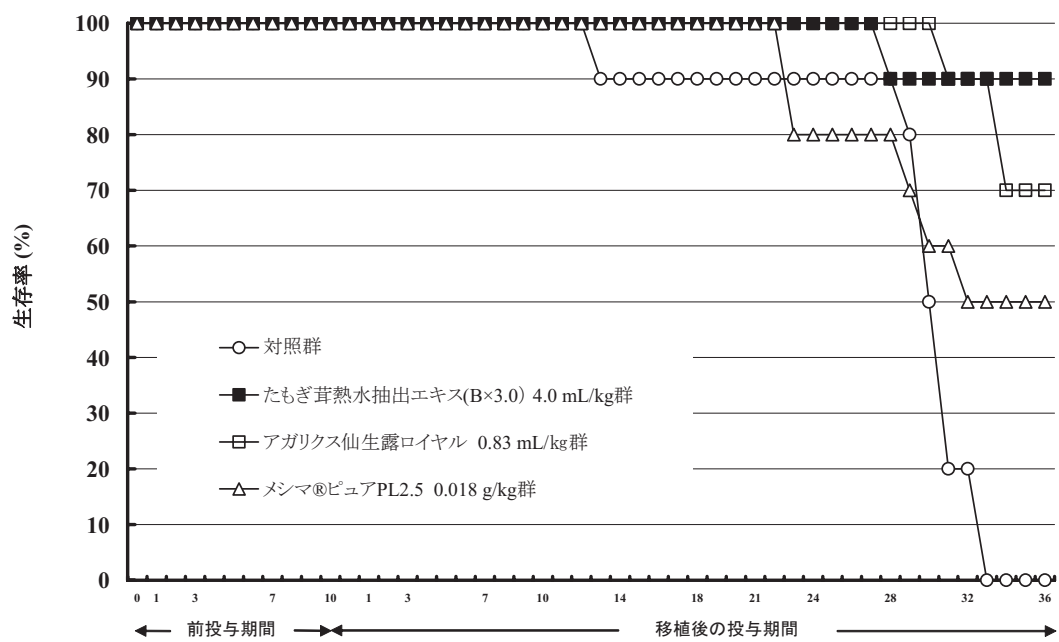


図14-4 Sarcoma 180移植マウスを用いたたもぎ茸熱水抽出エキス(バイオゴッド)の抗腫瘍作用(予防効果)(生存率:比較対照物質との比較Ⅲ)