

サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの機能性解析
及び作用機序に関する研究

(The bioactive functions and underlying mechanisms of *Cordyceps
militaris* spirits soaked in sweetpotato *shochu*)

鹿児島大学大学院連合農学研究科
応用生命科学専攻

章 超

2015 年

目 次

第 1 章 序論	1
1.1 研究の背景	1
1.2 冬虫夏草に関する研究	2
1.3 アルコール飲料の摂取と健康について	4
1.4 サツマイモ焼酎について	5
1.5 スピリッツについて	6
1.6 本研究の目的及び内容	7
第 2 章 サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの成分分画	9
2.1 緒言	9
2.2 材料と方法	9
2.2.1 供試試料の調製	9
2.2.2 供試試料の分画	10
2.2.2.1 HP 20 カラムによる分画	10
2.2.2.2 Sephadex G-25 カラムによる分画	10
2.2.2.3 HPLC による分画	11
2.3 結果と考察	11
2.4 要約	16
第 3 章 サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの抗炎症作用及び機序の解析	18
3.1 緒言	18
3.2 試料と方法	19
3.2.1 試薬と培養	19
3.2.2 Western blotting	20

3.2.3	マウス飼育と足浮腫の作製	21
3.2.4	血清 ELISA 分析	21
3.2.5	統計解析	22
3.3	結果と考察	22
3.3.1	冬虫夏草スピリッツの LPS 誘導性 COX-2 発現に対する抑制作用	22
3.3.2	マウス足浮腫に対する抑制効果	25
3.3.3	血清中炎症因子 IL-6 および TNF- α の低減作用	26
3.4	要約	27
第 4 章	サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツによるヒト急性前骨髄性白血病 細胞(HL-60) に対する細胞増殖抑制効果及び作用機序	28
4.1	緒言	28
4.2	試料と方法	29
4.2.1	試薬と細胞培養	29
4.2.2	細胞増殖抑制の測定	30
4.2.3	Western blotting	30
4.2.4	DNA Ladder 分析	31
4.2.5	DNA 断片化の ELISA 分析	31
4.2.6	アポトーシス誘導の Annexin V-FITC 分析	32
4.2.7	統計解析	33
4.3	結果と考察	33
4.3.1	HL-60 細胞増殖に対する抑制作用	33
4.3.2	HL-60 細胞に対するアポトーシスの誘導作用	35
4.3.2.1	Fraction 1C のアポトーシス誘導作用	35
4.3.2.2	Fraction 1C-III のアポトーシス誘導作用	37
4.4	要約	39

第5章	サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツによるヒト大腸がん細胞 (HCT-116)	
	に対する細胞増殖抑制効果及び作用機序	41
5.1	緒言	41
5.2	試料と方法	42
5.2.1	試薬と細胞培養	42
5.2.2	細胞増殖抑制の測定	42
5.2.3	Western blotting	43
5.2.4	DNA 断片化の ELISA 分析	43
5.2.5	統計解析	43
5.3	結果と考察	43
5.3.1	HCT-116 細胞増殖に対する抑制作用	43
5.3.2	HCT-116 細胞に対するアポトーシスの誘導作用	46
5.4	要約	47
第6章	サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツ抽出物の化学構造解析	49
6.1	緒言	49
6.2	試料と方法	49
6.2.1	試料と方法	49
6.2.2	化学解析方法	49
6.2.2.1	HPLC 解析	50
6.2.2.2	FT-IR 解析	50
6.2.2.3	NMR 解析	50
6.2.2.4	LC/MS-IT-TOF 解析	50
6.3	結果と考察	51
6.4	要約	55

第 7 章 総括	56
Summary	59
参考文献	61
謝辞	70

「略語一覧」

ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid Ammonium Salt, 2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)
Caspase-3	Cysteine-aspartic-acid-protease-3, カスパーゼ-3
COX-2	Cyclooxygenase-2, シクロオキシゲナーゼ-2
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, 酵素結合免疫吸着測定法
FBS	Fetal bovine serum, ウシ胎児血清
FITC	Fluorescein isothiocyanate, フルオレセインイソチオシアネート
IL-6	Interleukin-6, インターロイキン-6
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal injection, 腹腔内注射
LPS	Lipopolysaccharides, 細菌リポ多糖
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase, ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ
PBS	Phosphate buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水
PG	Prostaglandin, プロスタグランジン
PI	Propidium iodide, ヨウ化プロピジウム
PL	Phospholipase, ホスホリパーゼ
PS	Phosphatidylserine, ホスファチジルセリン
PVDF	Polyvinylidene Difluoride, ポリフッ化ビニリデン
<i>s.c.</i>	Subcutaneous injection, 皮下注射
SCS	<i>Cordyceps militaris</i> spirits of the sweetpotato <i>shochu</i> , Kinkirishima サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツ, 金霧島
SDS	Sodium dodecyl sulfate, ドデシル硫酸ナトリウム

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
TA	Thromboxane, トロンボキサン
TBS	Tris- buffered saline, トリス緩衝生理食塩水
TEMED	Tetramethylethylenediamine, テトラメチルエチレンジアミン
TLC	Thin-layer chromatography, 薄層クロマトグラフィー
TLR	Toll-like receptor, トール様受容体
TMS	Tetramethylsilane, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, テトラメチルシラン
TNF- α	Tumor necrosis factor - α , 腫瘍壊死因子- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane, トリスヒドロキシメチルアミノメタン

List of Figures

Figure 1 .1	<i>Cordyceps sinensis</i> and <i>Cordyceps militaris</i>	3
Figure 2.1	Isolation flowchart of the bioactive ingredients from the extract of SCS	12
Figure 2.2	HPLC profiles and TLC profiles of SCS separation by HP20 column. (A) The TLC profiles of SCS and Fraction 1~4 at 254nm (B) The HPLC profiles of SCS and Fraction 1~4	12 12
Figure 2.3	Isolation flowchart of the bioactive ingredients from Fraction 1 by Sephadex G-25	13
Figure 2.4	Fractionation of Fraction 1 by Sephadex G-25	13
Figure 2.5	TLC profiles of Fraction 1 and Fraction 1A~1C	14
Figure 2.6	HPLC profiles of Fraction 1A~1C	14
Figure 2.7	Isolation flowchart of the bioactive ingredients from Fraction 1C by HPLC	15
Figure 2.8	HPLC profiles of Fraction 1C and Fraction 1C-I~IV	15
Figure 2.9	Isolation flowchart of the bioactive ingredients from the extract of <i>Cordyceps militaris</i> soaked in the sweetpotato <i>shochu</i>	16
Figure 3.1	Lipopolysaccharide-induced COX-2 expression and inflammation	19
Figure 3.2	Influence of the extracts of Fraction 1~4 on the production of COX-2 protein	23
Figure 3.3	Influence of the extracts of Fraction 1A~1C on the production of COX-2 protein	24
Figure 3.4	Influence of the extracts of Fraction 1C-I~IV on the production of COX-2 protein	24

Figure 3.5	Fraction 1C-III suppresses paw edema in mice. The experiment procedure of mouse paw edema was schematically shown in (A)	25
	The weight change of the mice was shown in (B)	25
	The change of paw edema thickness was shown in (C)	26
Figure 3.6	The change in level of IL-6 (A) and TNF- α (B) in mouse serum	27
Figure 4.1	Principle of measurement of instruction Annexin V-FITC/PI of the apoptotic cell	33
Figure 4.2	The inhibitory effects of the extracts of SCS on cell proliferation of HL-60 cells (A) Fraction 1~4 (B) Fraction1A~1C (C) Fraction 1C (D) Fraction 1C- I~IV	34 34
Figure 4.3	The HL-60 cells were harvested by centrifugation, and DNA was extracted as described in Method section (A) A time-dependence (B) A dose-dependence	35
Figure 4.4	The induction effect of Fraction 1C on the DNA fragmentation of HL-60 cells, as assessed by ELISA (A) A time-dependent experiment (B) A dose-dependent experiment	36 36
Figure 4.5	The activation of caspase-3 and the inactivation of PARP by Fraction 1C	36
Figure 4.6	The induction effect of DNA fragmentation of HL-60 cells by Fraction 1C-III, as assessed by ELISA (A) A time-dependent experiment (B) A dose-dependent experiment	37 37

Figure 4.7	The activation of caspase-3 and the cleavage of PARP by Fraction 1C-III	
	(A) A time-dependent experiment	38
	(B) A dose-dependent experiment	38
Figure 4.8	The distribution of various cells of HL-60 cells treated with (B) or without F1C- III (4.0 µg/ml) (A)	39
Figure 5.1	The inhibitory effects of Fraction 1~4 on the proliferation of HCT-116 cells	44
Figure 5.2	The inhibitory effects of Fraction 1A~1C on the proliferation of HCT-116 cells	44
Figure 5.3	The inhibitory effects of Fraction 1C I~IV on the proliferation of HCT-116 cells	45
Figure 5.4	The inhibitory effects of Fraction 1C-III on the proliferation of HCT-116 cells	45
Figure 5.5	The induction of DNA fragmentation of HCT-116 cells by Fraction 1C-III, as assessed by ELISA	
	(A) A time-dependent experiment	46
	(B) A dose-dependent experiment	46
Figure 5.6	The activation of caspase-3 and the cleavage of PARP by Fraction 1C-III	
	(A) A time-dependent experiment	47
	(B) A dose-dependent experiment	47
Figure 6.1	(A) Chemical structure of cordycepin (3'-deoxyadenosine)	51
	(B) HPLC profiles of Fraction 1C-III and cordycepin	51
Figure 6.2	FT-IR spectrum of Fraction 1C-III and cordycepin (400~4000cm ⁻¹)	52

Figure 6.3	^1H -NMR spectrum of Fraction 1C-III and cordycepin (600MHz, DMSO- d_6)	52
Figure 6.4	LC/MS-IT-TOF spectrum of cordycepin and Fraction 1C-III	
	(A) LC/MS-IT-TOF spectrum of cordycepin	53
	(B) LC/MS-IT-TOF spectrum of Fraction 1C-III	54
	(C) Exact mass of cordycepin	54

第1章 序論

1.1 研究の背景

現代社会は、経済の急速な成長と生活内容の向上に伴い、生活習慣・食生活や運動習慣などが大きく変化している。この豊かな生活によりストレス、生活習慣病・成人病などが増え続け、深刻な社会問題になっている。また、日本では急速に少子高齢社会化も進んでいる。このような背景から、厚生労働省は、すべての国民が健やかで心豊かに生活できる活力ある社会を実現するために、1988年から「健康日本 21」を推進している。したがって、現在より健康的な食品やその飲食方法を消費者に提供するために、食品の機能性の研究が重要な課題となっている。食品由来の機能性成分については、*in vitro*による研究、モデル動物による研究、ヒト集団を利用した臨床研究により、これまで数多くの成分が探索されている（長谷川，2002）。また機能性食品としては、1991年に「特定保健用食品」が誕生して以来、2014年7月までに1,112品目の商品が認可されている（独立行政法人 国立健康・栄養研究所，2014）。

現代社会でアルコール飲料は、生活に楽しみをもたらす嗜好品の一つである。アルコール飲料の適度な摂取は、ストレスの緩和、疲労回復、気分転換、食欲増進などに効果があり（滝澤；2002）、現代人にとってコミュニケーションを促す潤滑剤としての働きもある。一方、過度な摂取は肝臓、脳、心臓や膵臓に大きな負担がかかり、依存性も強いいため健康に悪影響を及ぼしてしまう。実際、脂肪肝、アルコール性肝炎、アルコール性肝繊維症、肝硬変、心臓病、がんなど多くの病気にかかわっていることが報告されており（Alkerwi *et al.*, 2009）、アルコール摂取による健康障害は、社会的課題になっている。そのため近年、身体への悪影響を少しでも低減できるアルコール飲料が求められている。またアルコール飲料についても味や風味等の2次機能だけでなく、健康維持・増進に関する3次機能、すなわち生体調節機能を有する飲料の開発が今求められている。

そこで、より健康維持・増進を意識したアルコール飲料、さらに健康的な飲み方を消費者に提供することを目的として、機能性食品素材を原料としたアルコール飲料の開

発とその生理活性及び機序の解明を試みた。

1.2 冬虫夏草に関する研究

冬虫夏草 (*Cordyceps*) は、中国の最古の薬物書「神農本草経」や「本草綱目拾遺」にも伝統的な漢方薬として記載されており、3000 年以上前から使われている (Sung *et al.*, 2007; Yahagi *et al.*, 2008)。冬虫夏草は、菌界、子囊菌門、核菌類、ボタнтаケ目、バツカクキン科、冬虫夏草属に属する真菌類であり(八杉, 2002)、400 種類以上あるといわれている。また冬虫夏草は、キノコの子実体と昆虫などの虫部の複合体であり、最近では昆虫などから出るキノコの総称として使われる場合もある。昆虫に寄生する真菌類は数多く自然界に棲息しており、寄主となる昆虫は、ボタнтаケ目 (*Hypocreales*)、チョウ目 (*Lepidoptera*)、コウチュウ目 (*Coleoptera*)、ハエ目 (*Diptera*)、カメムシ目 (*Rhynchota*)、トンボ目 (*Odonatae*)、ハチ目 (*Hymenoptera*)、バッタ目 (*Orthoptera*)、シロアリ目 (*Isoptera*)、ダニ目 (*Acarina*)、ツチダンゴキン目 (*Elaphomycetales*)、バツカクキン目 (*Clavicipitaceae*) など様々である他、昆虫以外にもクモ類やダニ類も寄主になる (清水, 1997)。

冬虫夏草の生理活性としては、糖尿病改善 (Lo *et al.*, 2006)、抗腫瘍 (Kuo *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2006)、抗酸化作用 (Dong *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2000a)、免疫調節作用 (Cheng *et al.*, 1992)、抗炎症作用 (Hong *et al.*, 2004)、抗高脂血症効果 (Guo *et al.*, 2006 ; Koh *et al.*, 2003)、インシュリン抵抗減少効果ならびにとインシュリン分泌物の増加への関与 (Zhao *et al.*, 2002) などが報告されている。しかし、冬虫夏草のすべての種類が、漢方薬や薬膳素材として使用されるわけではない。使用される代表的なものはシネンシス冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) やミリタリス冬虫夏草 (*Cordyceps militaris*) (Fig. 1.1) で、これらは伝統的に使用されてきた。シネンシス冬虫夏草は、オオコウモリガの幼虫 (イモムシ) とキノコ子実体の複合体で、中国のチベット自治区、青海省、四川省、貴州省、甘肅省、雲南省をはじめ、ネパールやブータ

ンの標高 3,000 から 5,000 メートルの高山地帯に生息している。薬用として中国の伝統医学漢方に使用され、1000 年以上の使用歴史がある。免疫調節、抗腫瘍、抗疲労等様々な生理効果がある (金城, 1999 ; Fu *et al.*, 2003; Buenz *et al.*, 2003)。

ミリタリス冬虫夏草は、主に鱗翅目や他の目の蛾や蝶の蛹、幼虫に寄生し、子実体とさなぎの複合体を形成することより、「サナギタケ」という和名でも知られている。中国、日本、カナダ、イタリアなどをはじめ、世界中に分布している。「冬虫夏草属菌図説」(Nobuo *et al.*, 2008) ではサナギタケについて次のように記載している。「鱗翅目 *Lepidoptera* の蛾や蝶の蛹、幼虫に寄生するノムシタケ属菌で、子実体は棍棒状、スリコギ棒状で地生型に発生する。頭部は朱黄色または淡朱橙色で、柔らかい肉質、柄は淡色で地上部の高さ 1.3~6.5 cm 上部に半裸生型の子囊殻 perithecium を形成し、先端が粒点状に細かく突出する。子囊殻は卵形 450-670 × 230-370 μm。2次胞子 secspore 2.0-3.5 × 1 μm は短冊状で、子囊 ascus 400-420 × 3-4 μm に内包する。」

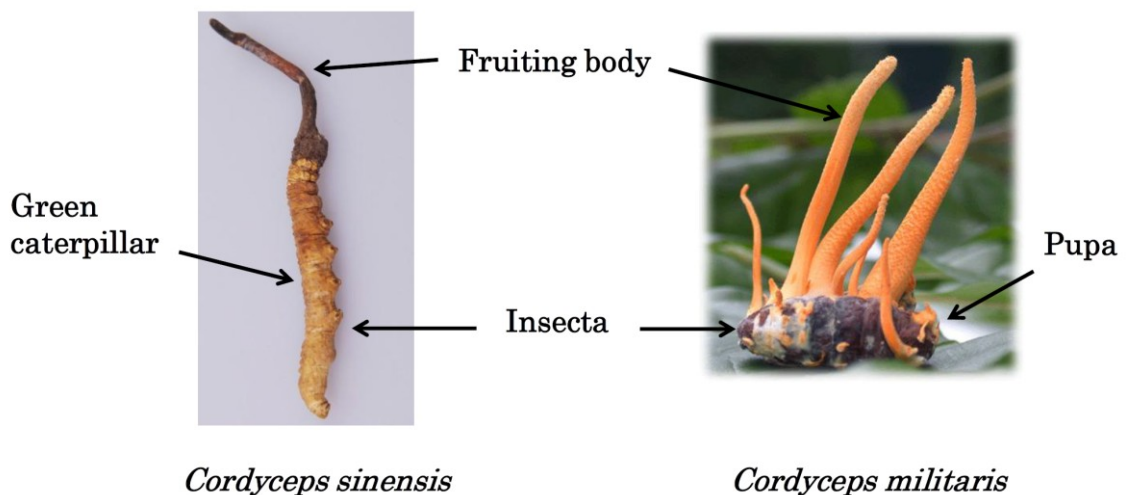


Fig. 1 .1 *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*

ミリタリス冬虫夏草には、抗腫瘍性を示すコルジセピン (Kim *et al.*, 2004) をはじめ、免疫賦活作用があるとされるオリゴ糖 (Yu *et al.*, 2004b)、血管拡張効能を有する

虫草酸 (Hu *et al.*, 2007)、抗酸化能を持つポリフェノール (Russell *et al.*, 2008)、インスリン抵抗改善 (Choi *et al.*, 2004)や抗炎症作用(Kim *et al.*, 2006)を有する生理活性成分などが豊富に含まれている (Patel *et al.*, 2013)。また、ミリタリス冬虫夏草は人工栽培技術が確立されており、その冬虫夏草はコルジセピンの含量が高いことが明らかとなっている (陳, 2009)。

1.3 アルコール飲料の摂取と健康について

酒の歴史は非常に古く、有史以前から作られてきたとされており、実際、中国の賈湖遺跡から出土した紀元前 7000 年頃の陶片の残留物から醸造酒の成分が検出されている (Patrick *et al.*, 2004)。また、紀元前 5400 年頃のイラン北部ザグロス山脈のハッジ・フィルズ・テペ遺跡から出土した壺の中にワインの残滓が確認され、古代オリエントにはワインの造り方の記載があった (神官, 1996)。さらには、メソポタミアでビールを造っていた史実として、最古の成文法であるハンムラビ法典の中にも紀元前 3000 年のビール売りに関する規定が記されている (菅間, 1975)。このように酒は古くから製造されており、神事、祝祭、冠婚葬祭、娯楽などの人類の生活の様々な場面に彩りを添えてきた。そして人々の文化や生活と切り離せないものとなり、各地域で独特な酒文化が作り上げられた。

それと同時に、アルコール飲用による身体面や心理面への影響も古くから研究されている。昔から「酒は百薬の長」といわれ、適量の飲酒は健康によく長寿につながる (田中, 1985)とされており、李時珍の「本草綱目」の中に酒が 69 種記載されていることから分かる通り、中国古代医薬学においては食と薬として利用されていた。その一方、貝原益軒の「養生訓」に「天の美禄」という言葉がある。その中で「少し飲めば陽気を補助し、血気を和らげ、食気をめぐらし、愁いを取り去り、興を起こして大変役に立つ。また、沢山飲むと酒ほどひとを害するものはほかにない。ちょうど水や火が人を助けると同時に、また人に災をするようなものである」と記載されている (小泉, 1996)。

近年、アルコール飲料の健康に対する影響に関する研究は多く行なわれてきている(アルコール健康医学協会, 1999~2012; Anderson *et al.*, 1993)。多量飲酒が健康に害をもたらすことは周知の事実であるが、健康を害しない程度の飲酒は健康を維持する上で大きな意味を持っている。1993年6月ACSH (American Council on Science and Health、米国保健科学協議会)は、「適量の酒を飲んでいる人の方が、酒を全く飲まない人、また大量に酒を飲む人に比べて最も死亡率が低い」という疫学調査の結果を発表した。酒の“J-curve”現象が検証した結果、適度の飲酒は、心臓病による死亡率の低下 (Stockley *et al.*, 2012)、虚血性脳卒中のリスク減少 (Sacco *et al.*, 1999)、循環器官以外の健康障害の低下 (Jussi *et al.*, 2002) につながるということが報告された。またビールホップのフラボノイドによるがん細胞の増殖抑制 (Delmulle *et al.*, 1999)、赤ワインポリフェノールの抗酸化 (Anis *et al.*, 2000)、日本酒の美容効果 (Hirotsune *et al.*, 2005) 及び本格焼酎の抗血栓効果 (Sumi *et al.*, 2011) などのアルコール飲料の機能性の研究も進んでいる。

1.4 サツマイモ焼酎について

焼酎は14~15世紀頃に日本へ伝来したと言われている。その伝来ルートは、まだ解明されておらず、いくつかの諸説がある。シャム(タイ)→琉球(沖縄)→薩摩(鹿児島)の南方ルートの琉球経路説、中国→朝鮮半島→壱岐(長崎)の北方ルートの朝鮮半島経路説、日本の海賊(倭寇)が中国沿岸や南洋海上に進出して海上取引品として運んだとされるルートの南海諸国経路説の3説が有力であるとされている。また、日本の焼酎の製法は14世紀頃、東南アジア、特にタイ国から現在の沖縄に伝来して定着したものと推定される。焼酎が文献にはじめて記されたのは、1546年に薩摩半島南東にある山川港を訪れたポルトガル人ジョルジュ・アルバレスがフランシスコ・ザビエルに依頼を受けて「日本の諸事に関する報告」という見聞録である。そこには「人々は米からつくる“オラーカ(焼酎)”を飲んでいる」との記述がある(西谷, 1991; 関根, 2005)。

本格焼酎とは、澱粉質原料（穀物、いも類 など）や糖質原料（黒糖）、果実（ナツメヤシ）を発酵させたアルコール含有物を蒸留したもので、米焼酎、芋焼酎や黒糖焼酎など、日本の伝統的な蒸留酒をいう。本格焼酎は酒税法における単式蒸留しょうちゅうに含まれ、単式蒸留機で蒸留した、製品のアルコール度数が 45 度以下のものである（西谷, 1991）。この本格焼酎の特徴香の揮発成分が、抗変異原と抗酸化作用を有することが報告されている（境田, 2003; 境田, 2004）。

サツマイモ焼酎はサツマイモ (sweetpotato, 学名 *Ipomoea batatas*) を主原料とした本格焼酎であり、芋焼酎と一般的に呼ばれる。サツマイモ焼酎の製造方法（伊藤, 1988）は、蒸米に種麹菌を種付けして製麹し、できた米麹に水と培養した酵母を加え、5 日間発酵させる。その後、主原料である蒸したサツマイモと水を加え、8~10 日間発酵させる。この発酵後の醪を蒸留機に移し、蒸留を行ってサツマイモ焼酎原酒が得られる。サツマイモ焼酎は、蒸したサツマイモの芳香が特徴であり（神渡, 2009）、高級アルコール、エステル、テルペンアルコール、有機酸などの成分が含まれている（石川, 1997）。また蒸留酒であるサツマイモ焼酎は、糖質を含まず、カロリーが低いという特徴をもち、生活習慣病に対する認識からも期待されている。その他、サツマイモ焼酎には血栓溶解効果の機能性作用も報告されている（Sumi *et al.*, 2012）。

1.5 スピリッツについて

スピリッツ (spirits) は、アルコール度数の高い蒸留酒（ウイスキー、ブランデー等）及び蒸留酒やリキュール類などのブレンドに用いられる原料アルコール（アルコール分 45 度以上）をいう。国際的には全ての蒸留酒を意味し、その色調によってダーク・スピリッツとホワイト・スピリッツに大別される（加藤, 2006）。一方、日本の酒税法（平成 18 改正, 法 3 条 20 号）で分類されたスピリッツとは、清酒、合成清酒、焼酎、みりん、ビール、果実酒類、ウイスキー、ブランデー、発泡酒及びその他の醸造酒以外の酒類で、エキス分が 2 度未満のものを指す（富川, 2011）。

本研究の「サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツ」とは、ミリタリス冬虫夏草の子

実体を乾燥させ、サツマイモ焼酎に浸漬して造られたスピリッツ（日本の酒税法上）である。ミリタリス冬虫夏草の子実体とサツマイモ焼酎の生理活性成分が含まれ、エキスが 2 度未満で、アルコール 25 度、低カロリーのアルコール飲料である。

1.6 本研究の目的及び内容

アルコール飲料は、生活に楽しみをもたらす嗜好品であると同時に、健康に悪影響を及ぼすこともある。その悪影響を低減させる、健康アルコール飲料として開発するためには、その生理活性の評価が必要である。

本研究では、生理活性成分を多く含む健康素材であるミリタリス冬虫夏草子実体を乾燥させ、糖分を含まず機能性を有するサツマイモ焼酎に浸漬させて造られたサツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツ（商品名；金霧島）について、その機能性を解明することを目的とした。まずサツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツから生理活性成分を分離し、得られた成分について培養細胞および実験動物を用いてその機能性を検討した。さらにその活性成分の構造解析を行った。これらの研究データは、サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの機能性について科学的な根拠を提供するものである。

論文の詳細は、以下の 7 章より構成されている。

第 1 章では、冬虫夏草、アルコール飲料、サツマイモ焼酎、スピリッツについての現状と本研究の背景・目的を記述した。

第 2 章では、サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの生理活性成分の分画を行った。

第 3 章では、炎症研究のモデル細胞であるマウスマクロファージ様細胞（RAW 264.7）を用いて、サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの細菌リポ多糖（LPS）誘導による COX-2 発現抑制作用を調べた。さらに、動物炎症モデルでマウス足浮腫実験によりサツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの生体抗炎症効果及びその血清中の炎症性因子である IL-6 や TNF- α タンパク質レベルの低減作用について検討した。

第 4 章では、サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツのヒト急性前骨髄性白血病細胞（HL-60）に対する増殖抑制効果及びアポトーシス誘導能を調べた。

第 5 章では、サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツのヒト大腸がん細胞 (HCT-116) に対する増殖抑制効果及びアポトーシス誘導能を調べた。

第 6 章では、サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツから分画された抗炎症能及びがん細胞増殖抑制機能を持つ Fraction 1C-III について分子構造の化学解析を行った。

第 7 章では、これらの結果を総括し、サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの生理活性及び作用機序を提示した。

第2章 サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの成分分画

2.1 緒言

第 1 章に記述したミリタリス冬虫夏草には、コルジセピン (cordycepin, 3'-Deoxyadonsine)、虫草酸 (cordicepic acid, D-mannitol)、ポリフェノール類 (cordicepic polyphenol)、核酸 (nucleic acids)、多糖類 (cordycepic polysaccharides)、ビタミン B₁₂ (vitamin B₁₂)、アミノ酸 (amino acid)、エルゴステロール (ergosterol)、コレステロール (cholesterol) など種々な生理活性成分が含まれている (Yan *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2013)。一方、サツマイモ焼酎には高級アルコール (higher alcohols)、エステル (ester)、モノテルペンアルコール (monoterpene alcohols)、有機酸 (organic acid) などの食品成分が含まれている (Ohta *et al.*, 1990; 石川, 1997; 神渡, 2006)。我々はこれまでに、ミリタリス冬虫夏草子実体をサツマイモ焼酎に浸漬させたサツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツ (*Cordyceps militaris* spirits of the sweetpotato *shochu*, Kinkirishima; 以下 SCS と称す) を作製している。この SCS は、冬虫夏草由来の機能性成分を含んだ新たな機能性焼酎として期待される。そこで、SCS に含まれる生理活性成分を解明するために、種々のカラムクロマトグラフィーにより SCS 試料の成分分画を行った。

2.2 材料と方法

2.2.1 供試試料の調製

冬虫夏草 (*Cordyceps militaris*) の子実体は、Mushtech 社製 (韓国) のものを使用した。45°C で 12 時間、50°C で 6 時間、時間 55°C で 10 時間、65°C で 6 時間と段階的に乾燥させ、実験に用いるまで -25°C で保存した。ミリタリス冬虫夏草子実体 7.0 g をアルコール度数 36% のサツマイモ焼酎 1000 ml に常温にて 3 週間浸漬した。浸漬後、0.45 μm フィルターで濾過し、上澄み液 (SCS) を採取した。SCS を蒸留水でエ

タノール含量 20%に希釈したものをカラムクロマトグラフィーに供する試料とした。

2.2.2 供試試料の分画

2.2.2.1 HP 20 カラムによる分画

合成吸収樹脂 Diaion HP20 (三菱化学 株) をガラスカラム (直径: 5.0 cm、樹脂長: 45.0 cm、樹脂体積: 約 833.0 cm³) に充填し、HP20 カラムを作製した。

HP20 カラムにアルコール含量 20%の SCS 試料 900 ml を供し、成分を吸着させた。その後に蒸留水、40% エタノール、60% エタノール、80% エタノールの順に各溶液 1500 ml をカラムに供した。溶出液は、1500ml ずつ分画して 4 つ画分を得た。エタノールによる溶出画分を Fraction 1~3 とし、非吸着画分を Fraction 4 とした。分画試料は、ロータリーエバポレーターにて 40℃加温下で 50 ml まで減圧濃縮した後、凍結乾燥した。凍結乾燥した試料は、薄層クロマトグラフィー (Thin-layer chromatography, TLC) と高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography, HPLC) を用いて成分を分析した。

TLC の分析条件は、固定相; アルミシート シリカゲル (HPTLC-Alufohlen Kieselgel 60F₂₅₄)、展開液; クロロホルム: メタノール: 水 = 6:4:1、検出器; UV、検出波長; 254 nm と 366 nm、発色試薬; 硫酸、塩化鉄 (III)、ニンヒドリンを使用した。

HPLC の分析条件には、カラム; Cadenza CD-C18 (3 μm, 75 × 4.6 mm I.D., Imtakt Co.)、カラム温度; 40℃、移動相; (A) 水、(B) アセトニトリル、流速; 1.0 ml/min、2~55% B (0.00~20.00 min) とした。検出波長は 260 nm と 450 nm を使用した。

2.2.2.2 Sephadex G-25 カラムによる分画

担体として Sephadex G-25 (BIO-RAD Inc.) をガラスカラム (直径: 2.5 cm、樹脂長: 68.0 cm、樹脂体積: 約 333.6 cm³) に充填し、Sephadex G-25 カラムを作製した。

HP20 カラムにより分画された Fraction 1 を Sephadex G-25 ゲル濾過カラムに供し、蒸留水で溶出し、フラクションコレクター (BIO-RAD Inc.) を用いて、10 ml ずつ分画した。その後分光光度計 (CS-9300PC, 島津製作所 株) を用いて吸光波長 260 nm および 450 nm で吸光度を測定した結果を基にして、分画した試料溶液を Fraction 1A、Fraction 1B、Fraction 1C の 3 つグループに分画した。

2.2.2.3 HPLC による分画

Sephadex G-25 カラムにより分画された Fraction 1C は、さらに ODS カラムを用いた HPLC により分画を行い、Fraction 1C-I~IV に分画した。HPLC は、島津製作所製の LC-20A システムを用いて下記の条件で行った。ポンプ; LC-20ADVP、オープンカラム; CTO-20AC、UV/VIS 検出器; SPD-20A、オートサンプラ; SIL-20AHT を使用した。カラム; Cadenza CD-C18 (3 μ m, 150 \times 4.6 mm I.D., Imtakt Co.)、カラム温度; 40°C、移動相; (A) 水、(B) アセトニトリル、流速; 1.0 ml/min、2~19% B (0.00~8.00 min)、19~100% B (8.01~16.00 min)、100% B (16.01~20.00 min) とした。検出波長は 260 nm に設定した。

2.3 結果と考察

合成吸収樹脂 HP20 カラムによりエタノールによる溶出画分 Fraction 1~3 と非吸着画分である Fraction 4 が分画された (Fig. 2.1)。その各画分は、TLC による分析 (Fig. 2.2A) および HPLC による分析 (Fig. 2.2B) の結果 Fraction 1~3 では、260 nm の紫外外部吸収成分と 450 nm の可視部吸収成分が確認された。Fraction 4 では、260 nm の紫外外部吸収成分のみ検出された。

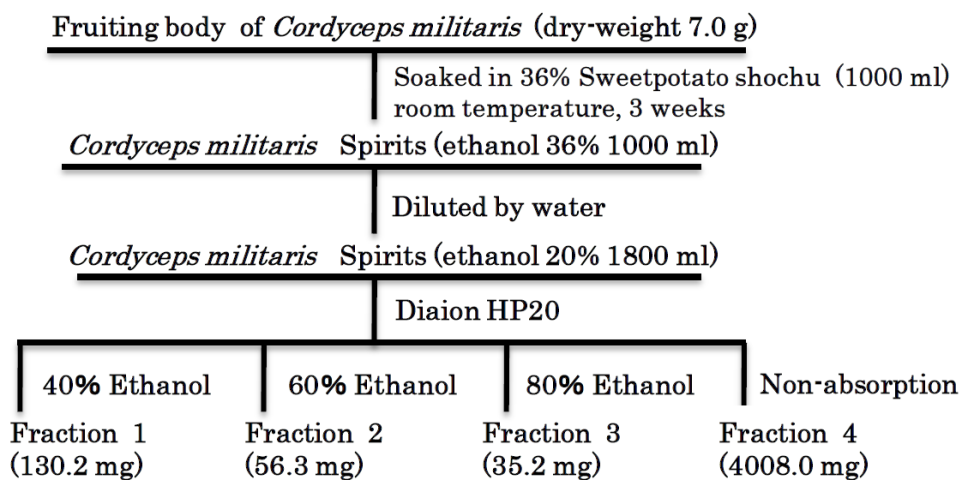


Fig. 2.1 Isolation flowchart of the bioactive ingredients from the extract of *Cordyceps militaris* soaked in the sweetpotato *shochu*, named *Kinkirishima* (SCS).

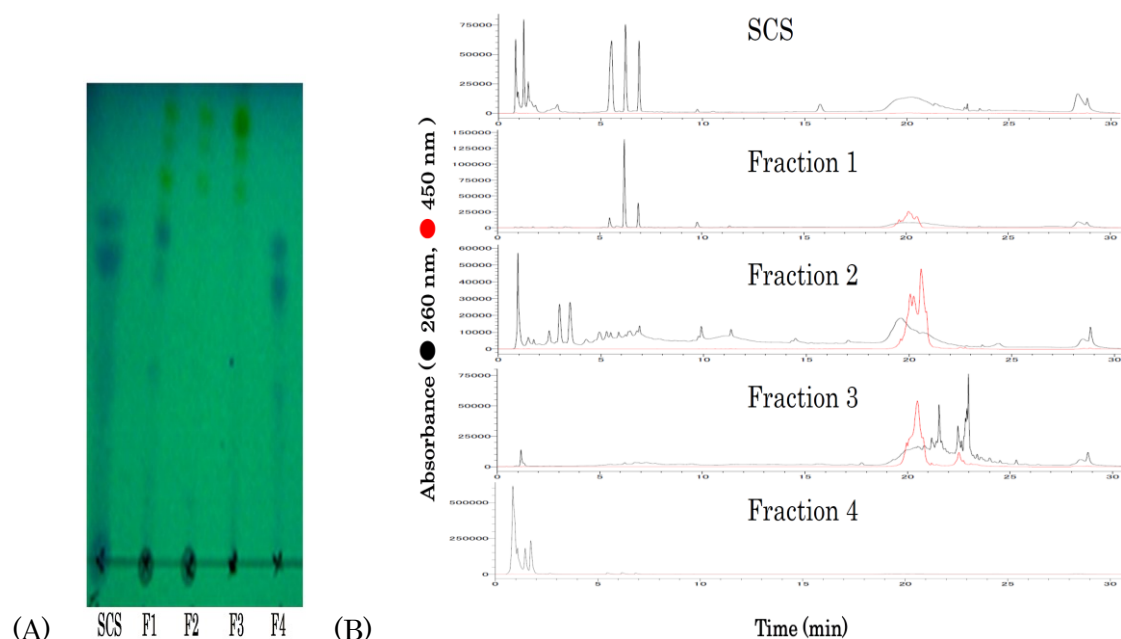


Fig. 2.2 HPLC profiles and TLC profiles of SCS separation by HP20 column. (A) The TLC profiles of SCS and Fraction 1~4. The mobile phase was chloroform, methanol and water, and detection was performed at 254 nm. (B) The HPLC profiles of SCS and Fraction 1~4 at 260 nm and 450 nm. The mobile phase A was water and phase B was acetonitrile. The absorbance was measured with 260 nm at 40°C.

後述（詳細は次章以降に示す）の機能性評価において最も高い効果が認められた HP20 カラムにより得られた Fraction 1 について Sephadex G-25 ゲル濾過カラムを用い、Fraction 1 をさらに分画した (Fig. 2.3)。Fig. 2.4 は分画した各画分の波長 260 nm と 450 nm によるクロマトグラムを示す。クロマトグラムに従い Fraction 1A、Fraction 1B、Fraction 1C の 3 つに分画した。それらを TLC を用いて各画分を確認した (Fig. 2.5)。Fraction 1A および Fraction 1B は黄色バンドが見られ、紫外部の吸収が検出された。Fraction 1B および Fraction 1C は、ニンヒドリン発色があり、アミン構造が含まれることが示された。同時に硫酸加熱発色もあることから、糖質成分も含まれることが判った。すべての画分において塩化鉄 (III) 発色は確認されなかった。Fig. 2.6 では、HPLC の波長 260 nm と 450 nm による吸光スペクトルを示した。Fraction 1C は 260 nm の吸光成分のみ認められた。

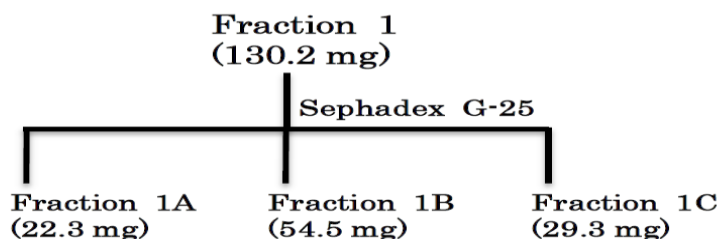


Fig. 2.3 Isolation flowchart of the bioactive ingredients from Fraction 1 by Sephadex G-25.

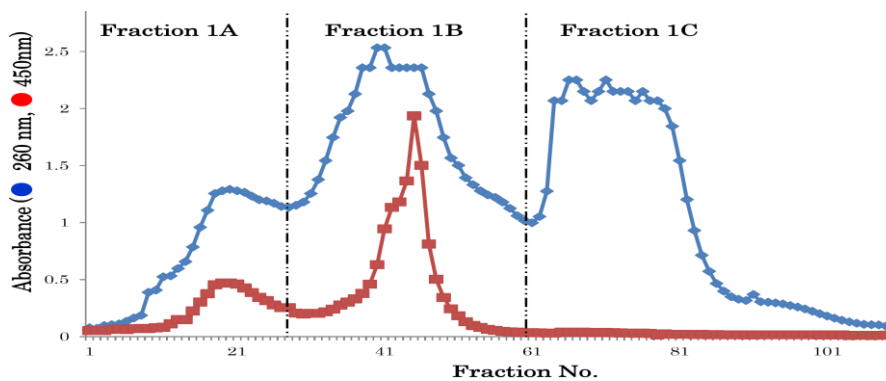


Fig. 2.4 Fractionation of Fraction 1 by Sephadex G-25 at 260 nm and 450 nm. The mobile phase was water.

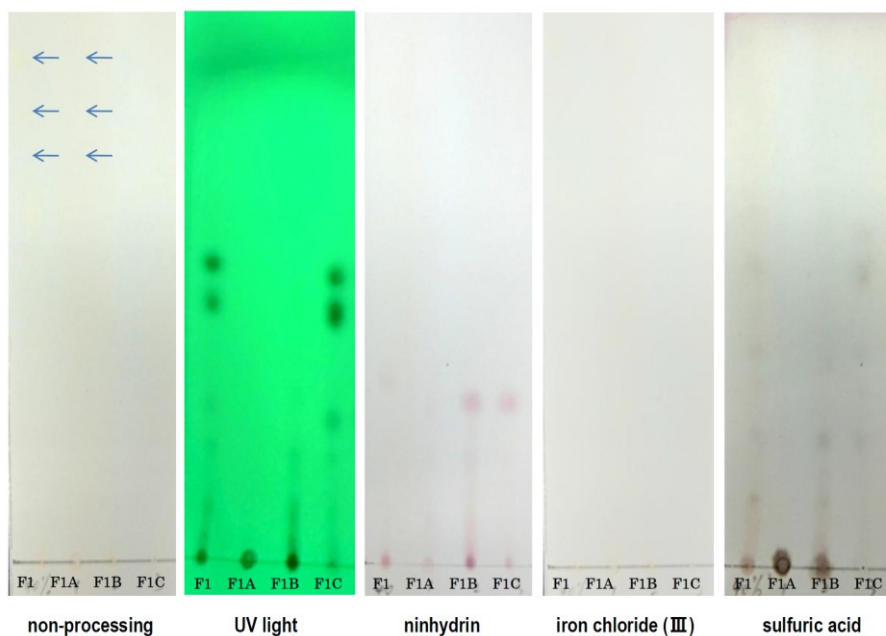


Fig. 2.5 The TLC profiles of Fraction 1 and Fraction 1A~1C. The mobile phase was solution of chloroform, methanol and water. UV detection was performed at 254 nm. Others are reagent colors (ninhydrin, iron chloride (III) and dilute sulphuric acid)

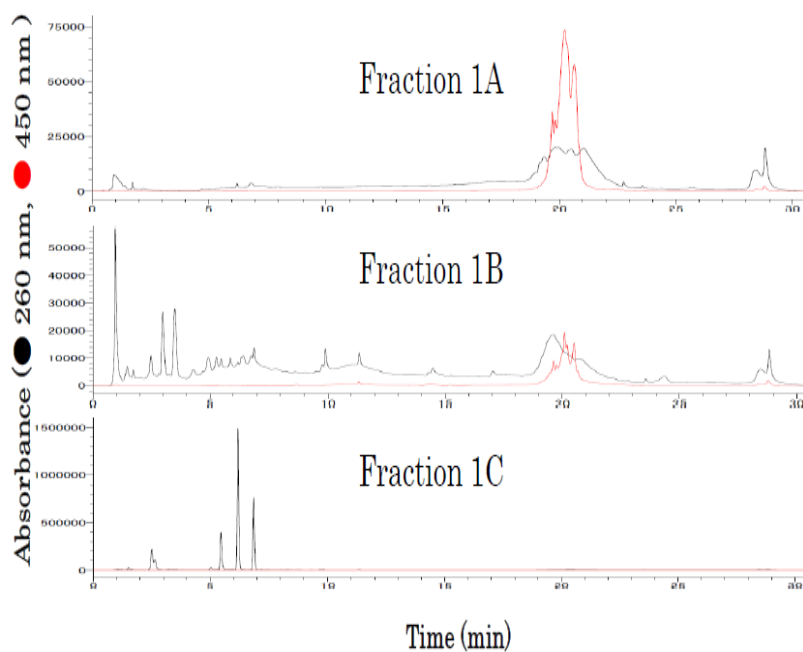


Fig. 2.6 The HPLC profiles of Fraction 1A~1C at 260 nm and 450 nm. The mobile phase A was water and phase B was acetonitrile. The absorbance was measured with 260 nm at 40°C.

Sephadex G-25 カラムによって分画された画分の機能性を評価し（詳細は次章以降に示す）、最も高い効果を示した Fraction 1C は、さらに HPLC の ODS カラムを用いて分画を行い、Fraction 1C-I~IV に分画された (Fig. 2.7)。Fig. 2.8 に示すように得られた 4 つの画分は、すべて 260 nm の紫外部吸収が見られたが、450 nm の可視部吸収が見られなかった。

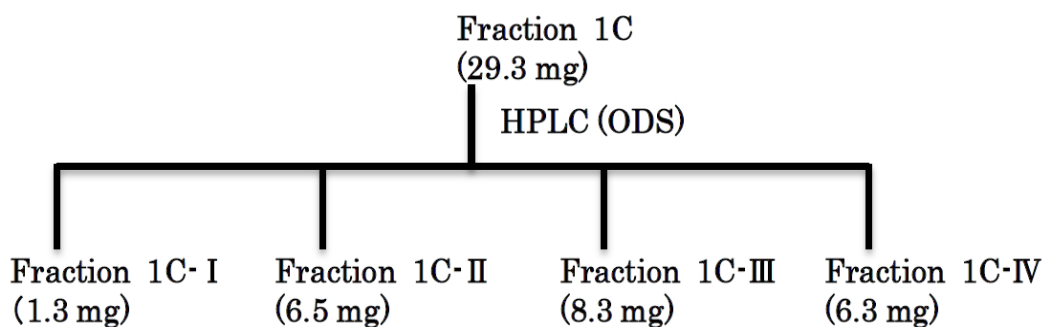


Fig. 2.7 Isolation flowchart of the bioactive ingredients from Fraction 1C by HPLC.

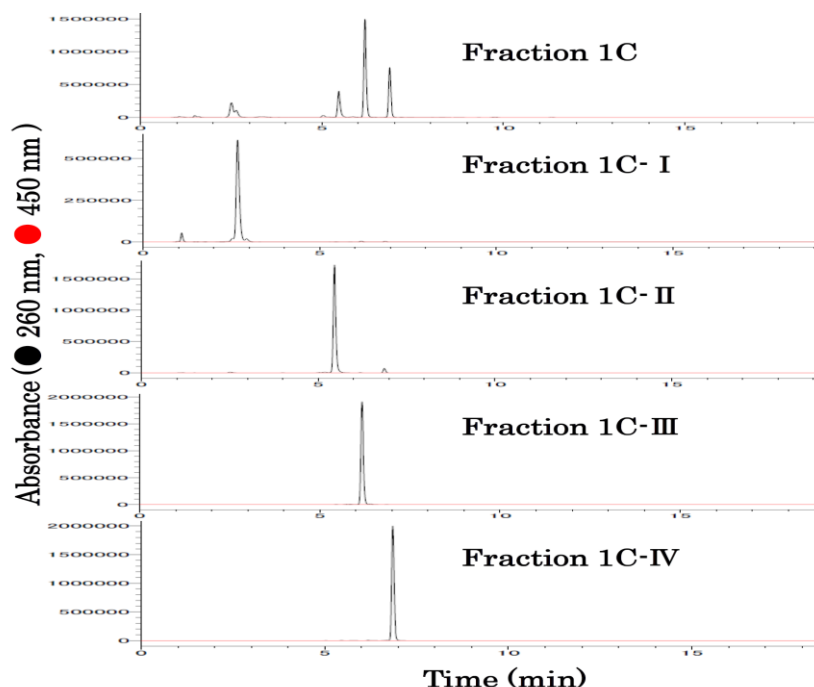


Fig. 2.8 The HPLC profiles of of Fraction 1C and Fraction 1C- I~IV at 260 nm and 450 nm. The mobile phase A was water and phase B was acetonitrile. The absorbance was measured with 260 nm at 40°C.

2.4 要約

ミリタリス冬虫夏草子実体をサツマイモ焼酎に浸漬させ SCS を作製した。SCS は Fig. 2.9 を示すように HP20 カラム、Sephadex G-25 カラムおよび HPLC (ODS カラム) により分画した。

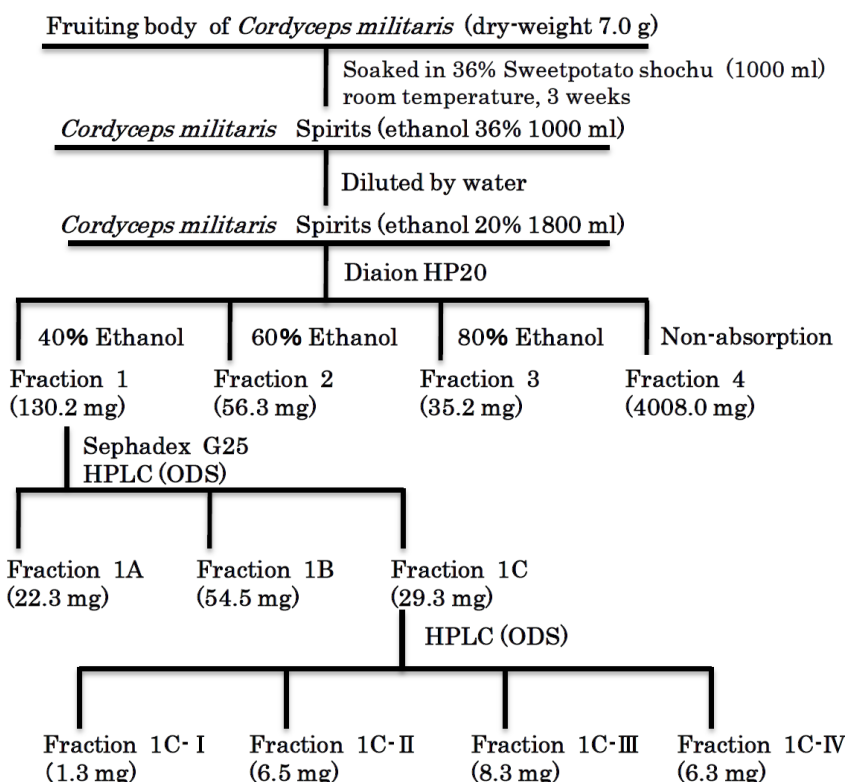


Fig. 2.9 Isolation flowchart of the bioactive ingredients from the extract of *Cordyceps militaris* soaked in the sweetpotato *shochu*, named *Kinkirishima* (SCS).

まず、SCS は HP20 カラムにより 40% エタノール、60% エタノール、80% エタノール溶出画分と非吸着画分を Fraction 1~4 として分画した。Fraction 1~3 は、260 nm の紫外部吸収成分と 450 nm の可視部吸収成分が確認された。Fraction 4 は、260 nm の紫外部吸収成分のみ検出された。

次に Fraction 1 は Sephadex G-25 カラムで分画し、各画分の波長 260 nm および 450 nm におけるクロマトグラムから Fraction 1A、Fraction 1B、Fraction 1C の 3

つに分画された。3つの画分はすべて紫外部吸収を持ち、Fraction 1A および Fraction 1B は、450 nm における吸収が確認されたが、Fraction 1C はほぼ見られなかった。Fraction 1B および Fraction 1C では、ニンヒドリン発色および硫酸加熱発色があることから、アミン構造および糖質構造を含む成分であることが明らかになった。また、すべて画分において塩化鉄(III)発色は認められなかった。

さらに Fraction 1C は HPLC (ODS カラム) によって、Fraction 1C-I、Fraction 1C-II、Fraction 1C-III、Fraction 1C-IV の 4 つに分画された。得られた 4 つの画分はすべて 260 nm の紫外部吸収が見られたが、450 nm の可視部吸収は見られなかった。

以上、SCS を分画する各過程で得られた画分を、ロータリーエバポレーターを用い、40°C で 50 ml まで減圧濃縮した後、凍結乾燥したものを SCS の生理活性解析及び生理活性成分の構造解析の供試試料とした。

第3章 サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの抗炎症作用及び機序の解析

3.1 緒言

ミリタリス冬虫夏草は、抗炎症 (Wol *et al.*, 2010)、抗腫瘍 (Tuli *et al.*, 2013)、免疫賦活 (Yu *et al.*, 2007a) 等の様々な生理活性を有することが報告されている。

炎症に関連する重要なタンパク質は既にいくつか同定されており、その一つである Toll-like 受容体 (TLR) は、細胞表面に存在し、病原体に存在する特有の「分子パターン」と結合し、様々な異物を特異的に感知する受容体ファミリーである。TLR ファミリーは炎症性サイトカインの発現に関与し、自然免疫において重要な働きをしている (Akira *et al.*, 2003)。例えば、細菌リポ多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) は TLR 4 を介して炎症シグナル伝達を引き起こす (Wang *et al.*, 2012)。

細胞膜は細胞外から種々の刺激に反応して細胞膜のリン脂質がホスホリパーゼ A₂ (Phospholipase A₂, PLA₂) により、まず不飽和脂肪酸のアラキドン酸 (Arachidonic acid) に変換される。この遊離したアラキドン酸を基質として、脂肪酸酸化酵素であるシクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase, COX) の作用により、プロスタグランジン G₂ (Prostaglandin G₂, PGG₂)、PGH₂ へと変換され、さらに各種細胞に存在する特異的な合成酵素により生理的に重要な 4 種類の PGD₂、PGE₂、PGF_{2a}、PGI₂ とトロンボキサン A₂ (Thromboxane A₂, TXA₂) が合成される。COX 酵素には COX-1 と COX-2 の 2 種類のアイソザイムが知られている。COX-1 は胃や腸などの消化管、腎臓、卵巣、精嚢、血小板などに存在し、胃液分泌、利尿、血小板凝集などの生理的な役割を担う。一方、COX-2 は誘導型酵素であり、細胞内では細胞核膜に主として存在する。COX-2 はサイトカインや発がんプロモーター、ホルモンなどの刺激により、マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、癌細胞などで誘導され、炎症反応、血管新生、アポトーシス、発癌、排卵、分娩、骨吸収などに関与する (Fig. 3.1)。(Zar *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2003)。

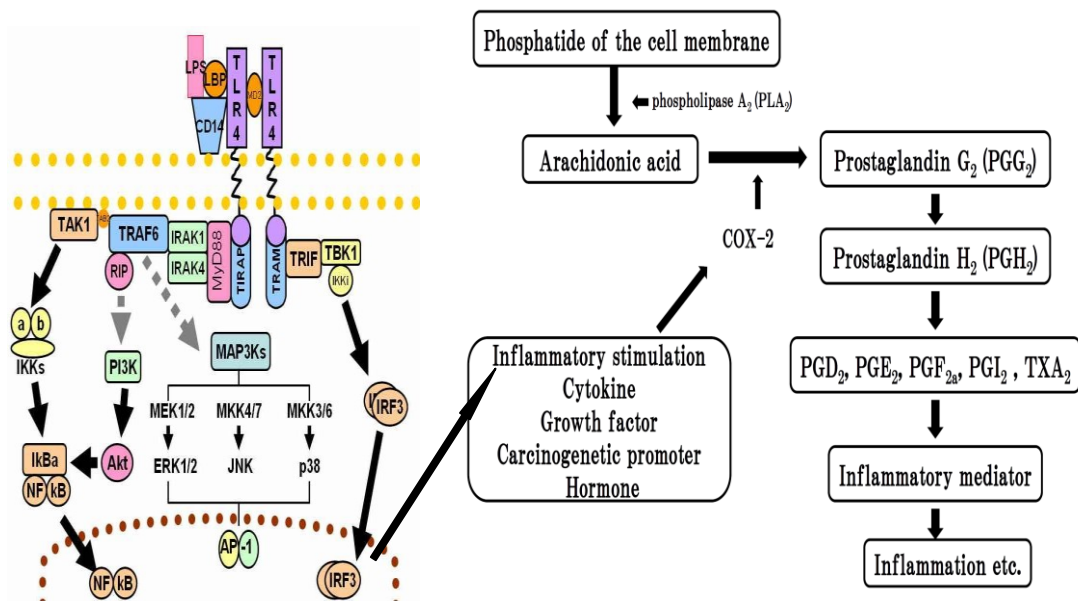


Fig. 3.1 Lipopolysaccharide-induced COX-2 expression and inflammation.

第2章においては、SCS抽出物をHP20カラム、Sephadex G-25カラムおよびHPLC (ODSカラム) により分画した。本章では、第2章にSCSの分画より得られた各画分の抗炎症効果を検討した。まず炎症モデル細胞を用いて各画分のLPS誘導によるCOX-2発現抑制作用を調べた。次に炎症モデル動物を用いて各画分の中に活性がある画分のLPS誘導性足浮腫、血清中の炎症性因子であるIL-6 (Interleukin-6) やTNF- α (Tumor Necrosis Factor - α) タンパク質レベルの低減作用について検討した。

3.2 試料と方法

SCSの供試試料は、第2章の2.2.1および2.2.2に従い調製した。

3.2.1 試薬と細胞培養

LPS (*Escherichia coli* 055:B5株) と β -actin抗体は、SIGMA-ALDRICH社製を、COX-2抗体はSanta Cruz Biotechnology社製を、Anti-rabbit IgGとAnti-mouse IgGはCell signaling社製を使用した。ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) 測定用のMouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go、Mouse TNF alpha ELISA

Ready-SET-Go は、 eBioscience 社製を使用した。その他の試薬は、 NACALAI TESQUE 社製を使用した。

細胞炎症モデルのマウスマクロファージ様細胞 (RAW 264.7)は、 American Type Culture Collection (ATCC Inc.) より購入した。 10% ウシ胎児血清 (FBS) (EQUITECH-BIO Inc.)、 2% *L*-グルタミン (NACALAI TESQUE Inc.)、 1%ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (PS) (NACALAI TESQUE Inc.) を含む D-MEM 培地 (Dalbecco's Modified Eagle Medium "Nissui") (NISSUI PHARMACEUTICAL CO.)を用いて、 37°C、 5% CO₂条件下で培養した。

3.2.2 Western blotting

RAW 264.7 (4.8×10^4 cells/cm²) 細胞は 21.5 時間培養した後、血清飢餓条件下でさらに 2.5 時間培養し、これを前培養とした。前培養終了後、規定濃度の試料を添加して 30 間分培養し、さらに LPS (終濃度 40 ng/ml) を添加して規定の時間培養した細胞を 1×SDS サンプルバッファー (0.06 M トリス塩酸バッファー (Tris-HCl, pH6.8)、2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、5% 2-メルカプトエタノール、10% グリセロール、0.01% ブロモフェエノールブルー) で回収した。回収した細胞を RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM 塩化ナトリウム (NaCl)、1% ポリエチレングリコール-*p* オクチルフェニルエーテル (NP-40)、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、0.25% デオキシコール酸ナトリウム、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1 mM フッ化ナトリウム、100 w/v プロテアーゼインヒビタータブレット、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル) で溶解させ、タンパク質定量を行った。その後、回収した細胞タンパク質は 10%ポリアクリルアミドゲル (30 (w/v)% アクリルアミド/ビス、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris) (ランニングゲル; 1.5 M、pH 8.9、スタッキングゲル; 1.0 M、pH 6.8)、10% SDS、10% ペルオキシ二 硫酸アンモニウム、テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) を使用し、 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、 PVDF

(PolyVinylidene DiFluoride) メンブランに転写した。化学発光検出解析装置 (Lumi Vision pro, アイシン精機 株) で ECL system Lumi Vision Imager soft waer を用いて間接抗体法により検出した。COX-2 タンパク質の発現は Anti-rabbit IgG の二次抗体、 β -actin タンパク質の発現は Anti-mouse IgG をそれぞれ用いた。測定と評価方法は、Houら (Hou *et al*, 2007; Tan *et al*, 2011) の方法を参考して、最低3回行った。

3.2.3 マウス飼育と足浮腫の作製

動物炎症モデルは、4週齢の雄性の ICR マウス (Japan SLC Inc.) を使用した。マウスは、1ケージ4匹、十字に分けて集団飼育した。12時間の明暗サイクル、 $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、水と餌は自由摂取とし、1週間の予備飼育後に試験に用いた。

マウスを用いた抗炎症作用は、Youらの方法 (You *et al*, 2013; Won *et al*, 2005) を参考にして LPS による炎症性足浮腫モデルを用いて実験した。Fraction 1C- III (5 mg/kg、溶媒 Phosphate buffered saline (PBS) 500 μl) と対照群の PBS (500 μl) を1日1回腹腔内注射 (Intraperitoneal injection, *i.p.*) により投与した。4日目には、足先に LPS (1 mg/kg、溶媒 PBS 10 μl) または PBS (10 μl) を皮下注射 (Subcutaneous injection, *s.c.*) した。腫れた足の厚さを1時間ごとにデジタルノギス (シンワ測定 株) により測定し、炎症の指標とした。また3時間後にマウスを屠殺し、血清を得た。血清中の IL-6 および TNF- α タンパク質を ELISA により測定した。

3.2.4 血清 ELISA 分析

マウス血清中のサイトカイン IL-6 および TNF- α の濃度は、eBioscience 社製の Ready-SET-Go kit を用いて測定した。Capture Antibody (100 $\mu\text{l}/\text{well}$) を 4°C 、一晩、インキュベートし、ELISA プレートにコーティングした。その後、上澄みを除去し Wash Buffer (250 $\mu\text{l}/\text{well}$ 、1分間浸漬) で5回洗浄した。200 $\mu\text{l}/\text{well}$ の 1 \times Assay Diluent を添加し、室温で1時間インキュベートした。上清液を除去し、Wash Buffer (250 $\mu\text{l}/\text{well}$ 、1分間浸漬) で5回洗浄した。Standard および血清を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$

添加し、室温で 2 時間インキュベートした。上清液を除去し、Wash Buffer (250 μ l/well、1 分間浸漬) で 5 回洗浄した。Detection Antibody を 100 μ l/well 添加し、室温で 1 時間インキュベートした。Wash Buffer (250 μ l/well、1 分浸漬) で 5 回、洗浄した。Avidin-HRP を 100 μ l/well 添加し、室温で 30 分間インキュベートした。Wash Buffer (250 μ l/well、1 分間浸漬) で 5 回洗浄した。1 \times TMB solution を 100 μ l/well 添加し室温で 15 分間を反応後、Stop Solution 50 μ l/well を添加し、450 nm と 570 nm における吸光度を測定した。

*サイトカイン IL-6 の濃度定量は以下の計算式で算出した。

Enrichment factor

= Log [試料処理の吸光度(450 nm - 570 nm) / 標品処理の吸光度(450 nm - 570 nm)]

*サイトカイン TNF- α の濃度定量は以下の計算式で算出した。

Enrichment factor

= 試料処理の吸光度(450 nm - 570 nm) / 標品処理の吸光度(450 nm - 570 nm)

3.2.5 統計解析

各実験の結果は、平均値 \pm 標準偏差で示した。有意差検定は統計ソフトウェア「SPSS for Windows 10.0.7J」で行った。Western blotting および ELISA (n=3) の測定は 3 回ずつ行い、Tukey の多重分析法による有意差検定 ($p < 0.01$) を行った。

3.3 結果と考察

3.3.1 冬虫夏草スピリッツの LPS 誘導性 COX-2 発現に対する抑制作用

SCS を分画する各過程で得られた画分を RAW 264.7 培養細胞に添加し、LPS 誘導性 COX-2 発現の抑制効果を検索した。まず、HP20 カラムで分画した Fraction 1~

4の中で、Fraction 1とFraction 2がLPS誘導性COX-2発現を有意に抑制した(Fig. 3.2)。その中でFraction 1が最も高い抑制効果を示した。次にFraction 1をSephadex G-25カラムで分画した画分Fraction 1A~1Cでは、Fraction 1CだけがLPS誘導性COX-2発現を有意に抑制した(Fig. 3.3)。さらにFraction 1CをHPLC(ODSカラム)にて分画した画分Fraction 1C-I~IVでは、Fraction 1C-IIIが有意にLPS誘導性COX-2発現を抑制した(Fig. 3.4)。すべての測定において、ローディングコントロールタンパク質である β -actinには変化がなかった。

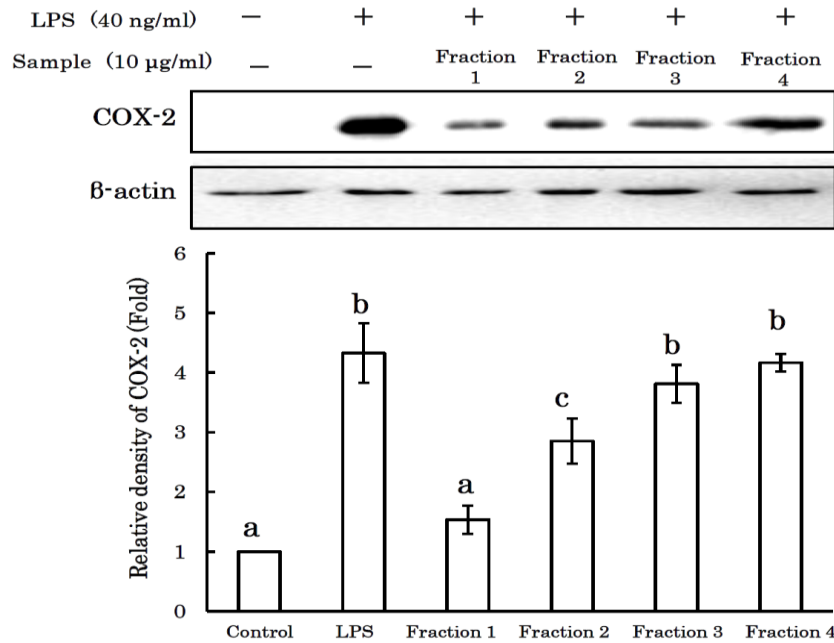


Fig. 3.2 Influence of the extracts of Fraction 1~4 on the production of COX-2 protein. RAW264.7 cells (4.8×10^4 cells/cm²) were pre-cultured for 21.5 h and starved in serum-free medium for 2.5 h. The cells were then treated with the indicated concentrations of the fractions for 30 min and then exposed to 40 ng/ml LPS for 12 h. Proteins of COX-2 and β -actin were detected by Western blotting with their antibodies, respectively. Each value represents the mean \pm SD of three samples. Different letters mean $p < 0.01$.

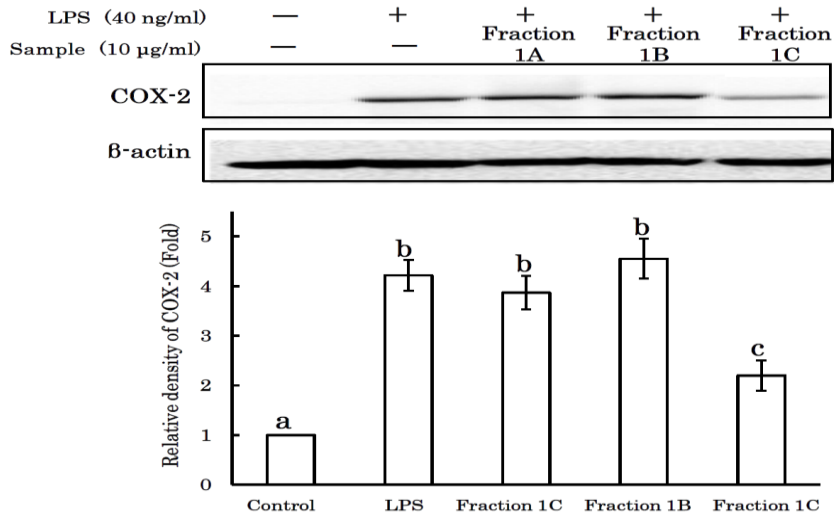


Fig. 3.3 Influence of the extracts of Fraction 1A~1C on the production of COX-2 protein. RAW264.7 cells (4.8×10^4 cells/cm²) were pre-cultured for 21.5 h and starved in serum-free medium for 2.5 h. The cells were then treated with the indicated concentrations of the fractions for 30 min and then exposed to 40 ng/ml LPS for 12 h. Proteins of COX-2 and β -actin were detected by Western blotting with their antibodies, respectively. Each value represents the mean \pm SD of three samples. Different letters mean $p < 0.01$.

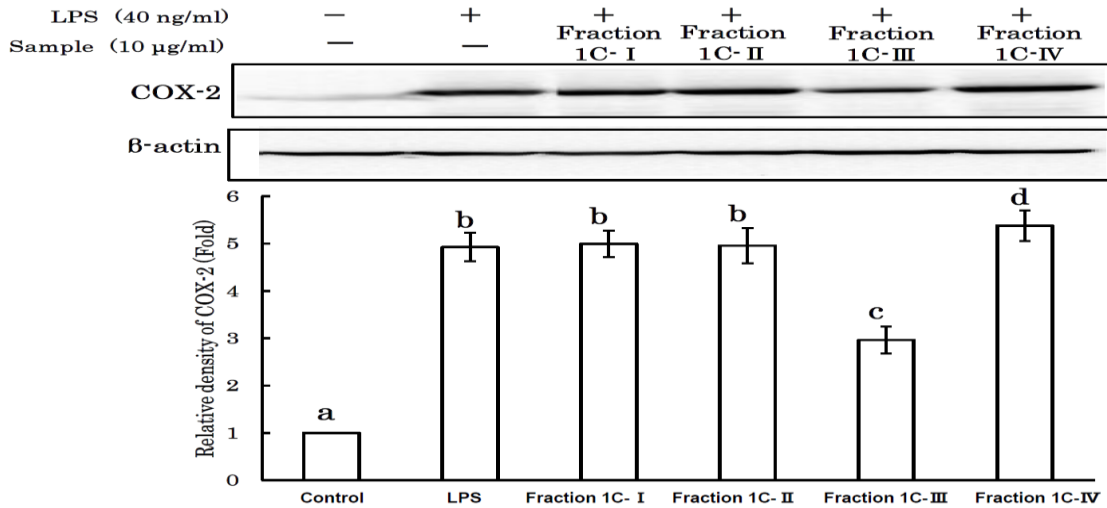


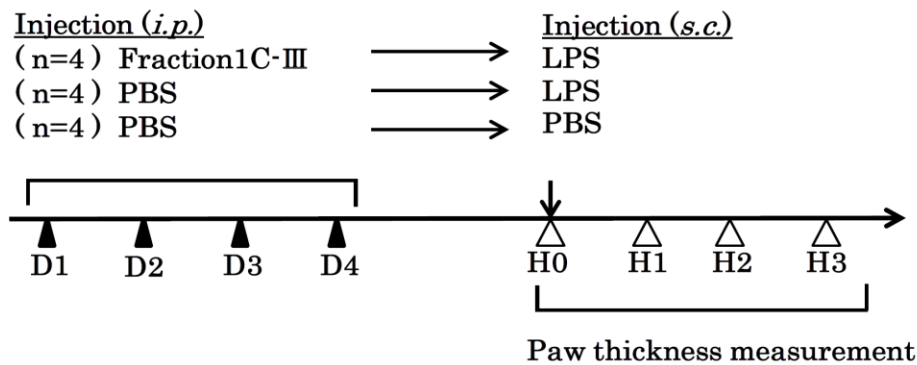
Fig. 3.4 Influence of the extracts of Fraction 1C-I~IV on the production of COX-2 protein. RAW264.7 cells (4.8×10^4 cells/cm²) were pre-cultured for 21.5 h and starved in serum-free medium for 2.5 h. The cells were then treated with the indicated concentrations of the fractions for 30 min and then exposed to 40 ng/ml LPS for 12 h. Proteins of COX-2 and β -actin were detected by Western blotting with their antibodies, respectively. Each value represents the mean \pm SD of three samples. Different letters mean $p < 0.01$.

3.3.2 マウス足浮腫に対する抑制効果

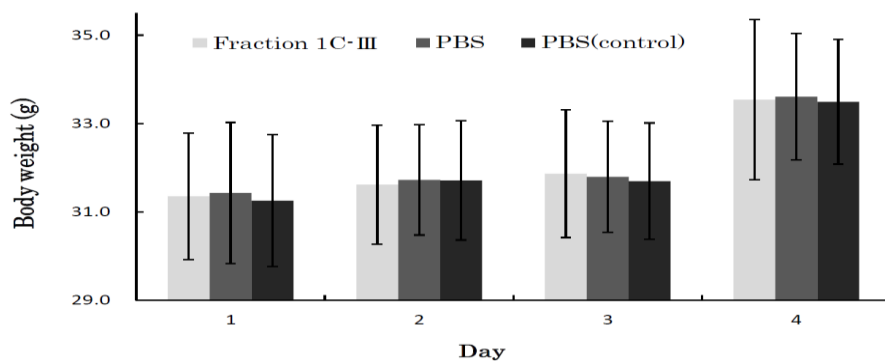
RAW 264.7 細胞において Fraction 1C-III が LPS 誘導性 COX-2 発現を有意に抑制したことより、炎症性足浮腫マウスモデルを用いて Fraction 1C-III の抗炎症効果について検討した。

まず処理群 (Fraction 1C-III + LPS 群) に Fraction 1C-III を、PBS + LPS 群および対照群 (PBS + PBS) のマウスに PBS を 4 日間腹部注射 (*i.p.*) にてそれぞれ投入した (Fig. 3.5A)。体重を毎日測定した結果、各群間に差が認められなかった (Fig. 3.5B)。4 日目に処理群および PBS + LPS 群マウスの足先に LPS、対照群マウスの足先には PBS を皮下注射し、1 時間ごとに足先の厚さを測定した (Fig. 3.5A)。その結果、PBS のみを注射した対照群では足の厚さの変化が見られなかった。LPS 群マウスでは足先に有意な炎症性肥大 (足腫) が見られた。これに対し Fraction 1C-III + LPS 処理群が LPS 誘導性炎症性足腫を有意に抑制した (Fig. 3.5C)。

(A)



(B)



(C)

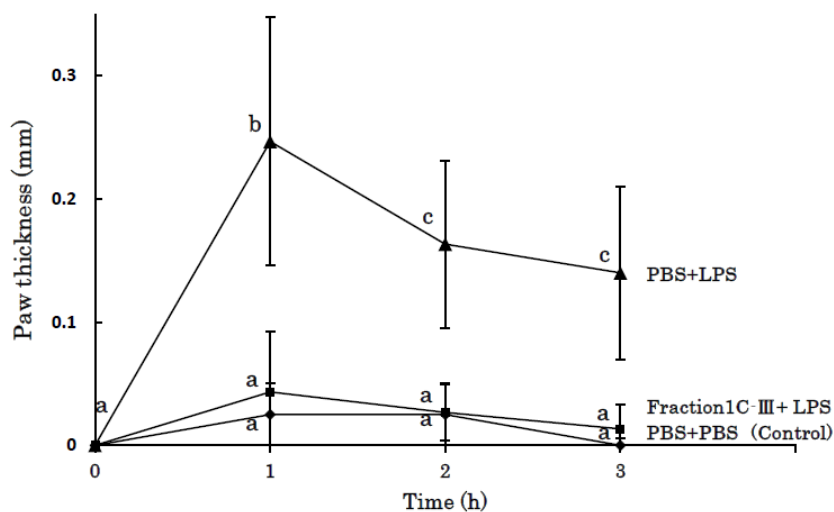


Fig. 3.5 Fraction 1C-III suppresses paw edema in mice. The mice were divided into three groups: Fraction 1C-III + LPS, PBS + LPS, and control (PBS + PBS). Each group had four mice, respectively. The experiment procedure of mouse paw edema was schematically shown in (A). The weight change of the mice was shown in (B). The change of paw edema thickness was shown in (C). The thickness of paw before injecting LPS was set as zero to compare the change after injection. Each value represents the mean \pm SD of three mice. Different letter means $p < 0.01$.

3.3.3 血清中炎症因子 IL-6 および TNF- α の低減作用

炎症性因子が LPS 誘導性足腫を引き起こす原因因子であることより、次に代表的な炎症性因子 IL-6 や TNF- α タンパク質の血清中レベルを調べた。3.3.2 の皮下注射 3 時間後のマウスを屠殺し、血清を得た。Fig. 3.6 に示すように PBS + LPS 群マウスにおいて、IL-6 (Fig. 3.6A) および TNF- α (Fig. 3.6B) タンパク質の血清レベルが PBS のみを注射した対照群より有意に上昇した。これに対して、Fraction 1C-III + LPS 群マウスでは、IL-6 (Fig. 3.6A) と TNF- α (Fig. 3.6B) タンパク質レベルが有意に抑制された。これらの結果は、足腫の結果と一致していることから、Fraction 1C-III が IL-6 や TNF- α のような炎症性因子の発現を抑制することで足腫症状を緩和したと考えられた。

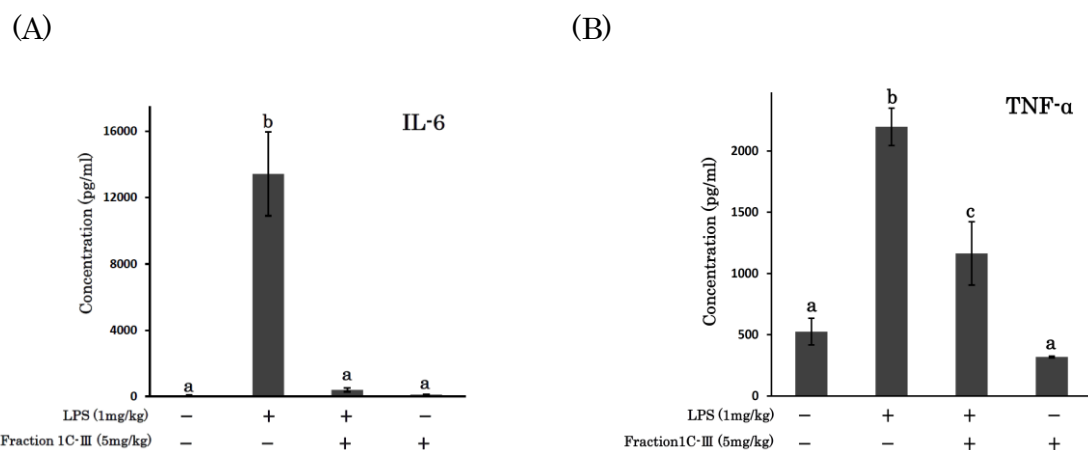


Fig. 3.6 The change in level of IL-6 (A) and TNF- α (B) in mouse serum. Mouse administration and treatment were described as Fig.3.5. Each value represents the mean \pm SD of three mice. Different letter means $p < 0.01$.

3.4 要約

SCS から分画カラムクロマトグラフィー (HP20、Sephadex G-25、HPLC (ODS)) により得られた各画分について、細胞及びマウスモデルにより抗炎症機能を解析した。

まず、SCS を分画する各過程で得られた画分を RAW 264.7 培養細胞に添加し、細菌リポ多糖 (LPS) 誘導性酵素 COX-2 発現の抑制効果を検索した。その結果は、HP20 カラムで分画した Fraction 1~4 の中で、Fraction 1 と Fraction 2 が LPS 誘導性 COX-2 発現を有意に抑制した。特に Fraction 1 の抑制効果が強かった。次に Fraction 1 を Sephadex G-25 カラムで分画した画分では、Fraction 1C が LPS 誘導性 COX-2 発現を有意に抑制した。さらに Fraction 1C を HPLC (ODS カラム) で分画した画分では、Fraction 1C-III が有意に LPS 誘導性 COX-2 発現を抑制したことが示された。

次に、ICR マウス実験においては、Fraction 1C-III が炎症性因子 IL-6 や TNF- α タンパク質の血清中レベルを有意に低減させ、マウスの足腫症状を緩和したことが示された。

以上の結果から、冬虫夏草スピリッツの抽出物の Fraction 1C-III が抗炎症機能を有することが示唆された。

第4章 サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツによるヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60) に対する細胞増殖抑制効果及び作用機序

4.1 緒言

ミリタリス冬虫夏草は、抗腫瘍、免疫賦活作用等が多く報告されている (Lee *et al.*, 2007a)。第3章で SCS をカラムクロマトグラフィーにて分画した画分が、LPS により誘導された COX-2 の発現を有意に抑制することが確認され、その抗炎症効果が示唆された。発がんの一つのメカニズムに、慢性的な炎症反応がある。動物実験では、COX-2 発現により腫瘍増殖の亢進や COX-2 経路阻害により発がん抑制が見られるなど、COX-2 の発がんへの関与が示唆されている (Hennie *et al.*, 2014; Ferrández *et al.*, 2003)。

日本の白血病発生率は年々増加傾向にあり、2012 年の統計では全白血病の発症率は年間に人口 10 万人あたり 6.3 人程度と見られ、年間約 7,900 名が死亡している。そのうち急性白血病が人口 10 万人あたり 4 人程度で発生頻度が最も高い (公益財団法人がん研究振興財団, 2013)。現在、白血病の治療は抗がん剤を中心とした支持療法で治療が行われる。従来の治療法は白血病細胞をすべて殺すが、最近白血病幹細胞の研究の進歩及び急性前骨髄性白血病での分化誘導療法も開発している (浅野, 2006)。

ヒト急性前骨髄性白血病細胞 (Human promyelocytic leukemia cells) HL-60 は、白血病細胞株であり、浮遊細胞である。この細胞特徴の一つは、分化誘導によって (レチノインによって顆粒球、ビタミン D₃ や発がんプロモーターである TPA による単球/マクロファージ、エオジノフィルペルオキシダーゼによる好酸球、IgE レセプターによる好塩基球) 分化しうることである。また細胞分化にともない増殖は停止し、成熟細胞に特徴的な形態や生理機能が出現することから、正常細胞及び白血病患者の白血病細胞の増殖と分化メカニズムの研究に広く利用されている。HL-60 培養細胞株は、骨髄球の分化における分子イベントならびに分化プロセスにおける生理学的、薬理的、ウイルス学的要素に関する研究のためのヒト細胞の継続した供給源となっている

(山田, 1991)。抗がん剤検索用の細胞モデルとして広く利用されている。

発がん遺伝子は、細胞増殖と深い関係がある。がん原遺伝子 (proto-oncogene) は、正常細胞にも存在する遺伝子で、通常状態ではがん化を引き起こさないが、突然変異により発がん遺伝子に変換するものを指す。HL-60 細胞モデルは、いくつかのがん原遺伝子の発現が観察され、細胞の増殖と分化と関与を明らかにしている。そのため、抗がん活性を検証するモデル細胞系として、細胞の分化およびアポトーシスにおける切断した DNA へ再結合する酵素 DNA トポイソメラーゼ (DNA topoisomerases, topo) II α および II β の効果を研究するために用いられている (山田, 1991; Mizutani, *et al.*, 2007; Nodake *et al.*, 2012)。

本章では、モデル細胞 HL-60 を用いて、SCS をカラムクロマトグラフィーにて分離した画分において、がん細胞増殖抑制作用及びアポトーシス誘導能を調べ、その作用機序を解明した。

4.2 試料と方法

SCS の供試試料は、第 2 章の 2.2.1 および 2.2.2 に従い調製した。

4.2.1 試薬と細胞培養

細胞増殖能測定用の 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) は SIGMA 社製を使用した。Western blotting 分析用の β -actin の抗体は SIGMA 社製を、Cysteine-aspartic-acid-protease-3 (caspase-3)、Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)、Anti-rabbit IgG、Anti-mouse IgG の抗体は Cell signaling 社製を、ELISA 測定用の細胞死検出キット (ELISA^{PLUS}) は Roche Diagnostics 社製を使用した。Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit I は BD Biosciences 社製を使用した。その他の試薬は NACALAI TESQUE 社製を使用した。

アポトーシス測定用の Tail buffer (100 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、100 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、1% SDS)、プロテイナーゼ K、イソプロパノ

ール、 RNase TE、 Loading buffer、 TAE buffer、 DNA ladder marker、 ニチジウムブロマイドは、 NACALAI TESQUE 社製を、 アガロース Agarose、 Type I は SIGMA 社製を使用した。 NNA 塩基配列決定装置 (ABI PRISM310-2 パーキンエルマー社) を使用した。

ヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60)は、 RIKEN CELL BANK より入手した。 10% FBS (EQUITECH-BIO Inc.)、 1% PS-*L*-グルタミン混合液 (PSG) (GIBCO Inc.) を含む RPMI 1640 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO.) を用いて、 37°C、 5% CO₂条件下で培養した。

4.2.2 細胞増殖抑制の測定

がん細胞増殖抑制能は、 MTT 測定法を用いて測定した (Hou *et al.*, 2003)。 24 時間前培養した HL-60 細胞 (5.0×10^3 cells/100 μ l) に規定濃度の試料を添加し、 48 時間培養後、 MTT 溶液 (5 mg/ml) を 10 μ l 添加し、 4 時間培養した。さらに酸性イソプロパノール (0.04N-HCl-Isopropanol) を 100 μ l/well 加え、 MTT フォルマザンを完全に溶解させた後、プレートリーダー用分光光度計 (サーモサイエンティフィック 社) で 595 nm 波長における吸光度を測定した。試料添加による吸光度の減少に基づき、細胞の生存率 (%) を算出した。また画分のがん細胞増殖抑制の強さは、 IC₅₀ (がん細胞増殖を 50%までに抑制する試料濃度) で表示した。

4.2.3 Western blotting

タンパク質発現の検出には、 Western blotting 分析法を用いて測定した (Hou *et al.*, 2003)。 24 時間前培養した HL-60 細胞 (2.0×10^6 cells/6 ml) に規定濃度の試料を添加して 0、 12、 24、 36、 48 時間培養した。細胞を RIPA バッファーで溶解させ、タンパク質定量を行い、細胞タンパク質を得た。その後、 10%ポリアクリルアミドゲル (ランニングゲル; pH 8.9, スタッキングゲル; pH 6.8) を使用し、回収した細胞タンパク質 (20 μ g) を SDS-PAGE にアプライし、 PVDF メンブレンに 2 時間トランスファ

一した。5% スキムミルクと0.1% Tween-20を含む TBS バッファーで1時間のブロッキングを経て、PARP、caspase-3、 β -actinの一次抗体に4°C、一晩浸漬した。さらに、一次抗体と結合した PARP と caspase-3 は Anti-rabbit IgG の二次抗体に、 β -actin は Anti-mouse IgG の二次抗体に、1.5 時間漬けた後間接抗体法によりそれぞれ検出した。

4.2.4 DNA Ladder 分析

DNA 断片化の検出は、DNA ラダー法 (Sakao *et al.*, 2012)を用いた。24 時間前培養した HL-60 細胞 (2.0×10^6 cells/6 ml) に規定濃度の試料を添加し、48 時間培養した。回収した細胞は 500 μ l の Tail buffer (100 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、1% SDS) で溶解し、終濃度 0.5 mg/ml となるようにプロテイナーゼ K を加え、55°C で 3 時間インキュベートした。その後、NaCl とイソプロパノールを用いて DNA を沈殿させた。得られた DNA は 0.1 mg/ml の RNase を含む TE buffer (10 mM Tris-HCl、pH 8.0、1 mM EDTA、pH 8.0) で溶解し、37°C で 30 分間インキュベートして RNA を除去した。細胞から抽出した DNA を 2% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドによる DNA 染色し、UV 照射による DNA 断片化を検出した。

4.2.5 DNA 断片化の ELISA 分析

DNA 断片化の定量は、ELISA^{PLUS}を用いて、アポトーシスが起こった細胞に生成するヒストン/ DNA 断片複合体を検出する (Sakao *et al.*, 2012) ことによって行った。24 時間前培養した HL-60 細胞 (1.0×10^5 cells/ml) を試料 4.0 μ l/mg、0~48 時間で、または添加試料 0.0~4.0 μ l/mg、48 時間で処理した。それぞれの細胞を 25°C、10 分、200 g の遠心分離で回収し、上清除去後 200 μ l の Lysis buffer を添加し、25°C、30 分間インキュベートした。次に 25°C、10 分間、200 g で遠心分離を行った後、20 μ l の上清をストレプトアビジンでコートしたプレートへ移し、80 μ l の免疫試薬 (抗ヒストン抗体、ペルオキシダーゼ標識抗 DNA 抗体) を加え、25°C、2 時

間、プレートシェーカー (300 rpm) で反応させた。その後、上澄みを除去し、Incubation buffer (3 回、100 μ l) で洗い流し、100 μ l の ABTS (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid Ammonium Salt)) 溶液を添加し、プレートシェーカーで 10~20 分間反応させ、405 nm と 490 nm における吸光度を測定した。DNA 断片化の定量は以下の計算式で算出した。

Enrichment factor

= 試料処理細胞の吸光度(405 nm - 490 nm) / 未処理細胞の吸光度(405 nm - 490 nm)

4.2.6 アポトーシス誘導の Annexin V-FITC 分析

アネキシンV (Annexin V) はアポトーシス誘導による細胞膜の変化を検出するプローブである。また、Annexin Vおよびヨウ化プロピジウム (propidium iodide, PI) の二重染色によって、早期アポトーシス、後期アポトーシス、ネクローシスの区別が可能である (Yan *et al.*, 2011; Fig. 4.1)。本解析では、Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit I (BD Pharmigen Inc.) を用いて、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識した Annexin Vおよび PIの二重染色によりアポトーシスの定量を行った。37°C、24 時間前培養した HL-60 細胞 (1.0×10^5 cells/2 ml) に規定濃度の試料を添加し、24 時間培養した。その後、細胞を回収し、Annexin V-FITC (2 μ l)、PI (2 μ l) で染色した。Annexin V-FITCおよび PIは 488 nmにて励起し、Annexin V-FITCは 520 nmで、PI は 630 nmでそれぞれの発光強度をフローサイトメトリー (CyFlow, Partec Inc.) を用いて測定した。

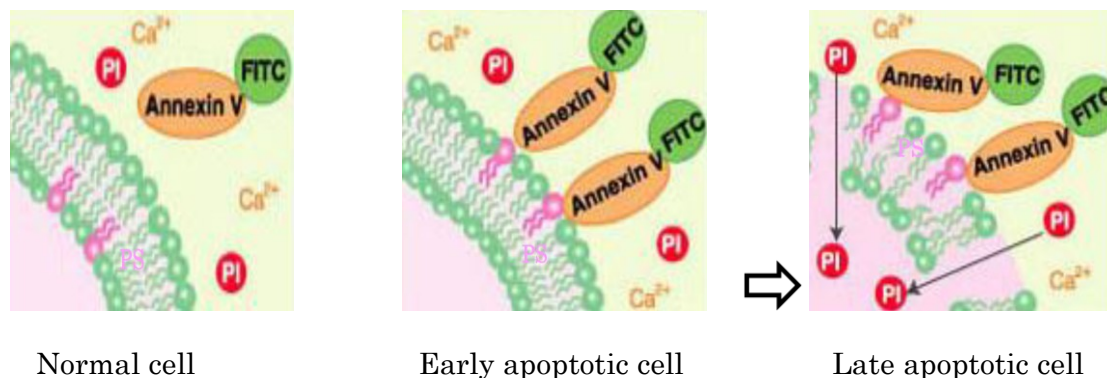


Fig. 4.1 Principle of measurement of instruction Annexin V-FITC of the apoptotic cell (Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit I (BD Pharmigen Inc.)の説明より抜粋)

4.2.7 統計解析

各実験の結果は、平均値±標準偏差で示した。有意差検定は統計ソフトウェア「SPSS for Windows 10.0.7J」で行った。MTT (n=8)、Western blotting および ELISA (n=3) の測定は3回ずつ行い、Tukeyの多重分析法による有意差検定 ($p < 0.01$) を行った。

4.3 結果と考察

4.3.1 HL-60 細胞増殖に対する抑制作用

SCS を分画する各過程で得られた画分を HL-60 培養細胞に添加し、細胞の増殖効果を検索した。まず、HP20 カラムで分画した Fraction 1~4 では、Fraction 1 と Fraction 3 の IC_{50} 値が $15.2 \mu\text{g/ml}$ と $19.0 \mu\text{g/ml}$ であり、有意に細胞の増殖抑制効果を示した(Fig. 4.2A)。Fraction 2 と Fraction 4 では有意な細胞増殖抑制効果が認められなかった (Fig. 4.2A)。次に細胞増殖抑制効果が一番高い Fraction 1 を Sephadex G-25 で分画した画分では、Fraction 1A と Fraction 1C が、HL-60 細胞を有意に抑制した (Fig. 4.2B)。その IC_{50} 値は $16.3 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 4.2B)と $0.3 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 4.2C) であった。さらに特に細胞増殖抑制効果が高かった Fraction 1C を HPLC (ODS) で分画した。Fraction 1C-III と Fraction 1C-IV で有意に細胞の増殖抑制効果が示された

(Fig. 4.2D)。その IC_{50} 値は $1.1 \mu\text{g/ml}$ と $8.0 \mu\text{g/ml}$ であり、Fraction 1C から分画した画分中の Fraction 1C-III の増殖抑制能が最も高かった (Fig. 4.2D)。Fraction 1C-III の増殖抑制能は Fraction 1C より若干減少した。その原因は、Fraction 1C に含む Fraction 1C-III と Fraction 1C-IV の相乗効果と考えられる。

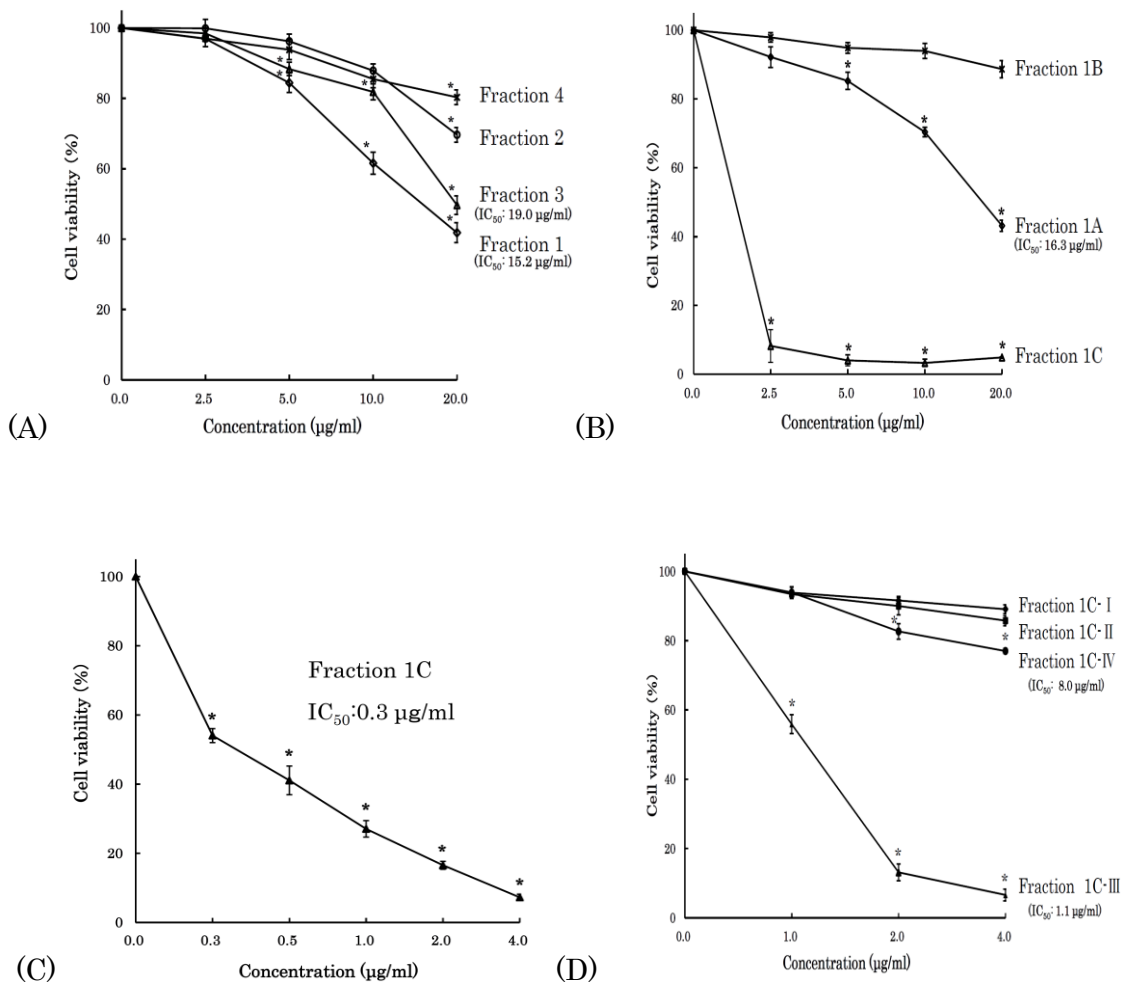


Fig. 4.2 The inhibitory effects of the fractions isolated of SCS on cell proliferation of HL-60 cells. The cells (5.0×10^3 cells/100 μl) were seeded into 96-wells plates for 24 h, and then treated with the various fractions of SCS. (A) Fraction 1~4 from SCS separated by HP20 gel with 0%, 40%, 60%, 80% EtOH, 0.0~20.0 $\mu\text{g/ml}$. (B) Fraction1A~1C from Fraction 1 separated by Sephadex G25 gel with water, 0.0~20.0 $\mu\text{g/ml}$. (C) Fraction 1C (0.0~4.0 $\mu\text{g/ml}$). (D) Fraction 1C-I~IV, 0.0~4.0 $\mu\text{g/ml}$. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate cultures. Means with differently lettered superscripts differ significantly at the probability of $p < 0.01$.

4.3.2 HL-60 細胞に対するアポトーシスの誘導作用

4.3.2.1 Fraction 1C のアポトーシス誘導作用

Fraction 1C は高い細胞増殖抑制効果を示した。その細胞増殖抑制機構を明らかにするため、DNA 断片化や caspase-3 の活性化等のアポトーシスマーカーによる解析を行った。

(1) Fraction 1C による DNA 断片化の誘導

DNA ラダー法を用いた DNA 断片化の検出結果は、Fig. 4.3A と Fig. 4.3B に示すように、Fraction 1C は時間と濃度依存的に DNA 断片化を引き起こし、4.0 $\mu\text{g/ml}$ 、48 時間で最大効果が得られた。

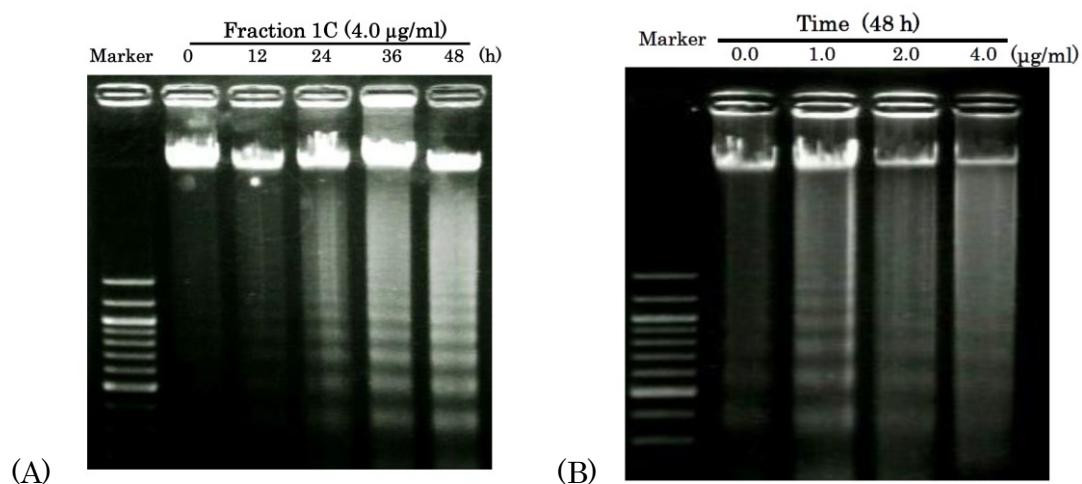


Fig. 4.3 The HL-60 cells (2.0×10^6 cells/6 ml) were harvested by centrifugation, and DNA was extracted as described in Method section. The DNA fragment was separated on 2% agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet light after staining with ethidium bromide. The 100 bp DNA ladder is served as a molecular marker. (A) A time-dependence (0~48h, Fraction 1C 4.0 $\mu\text{g/ml}$), (B) A dose-dependence (Fraction 1C 0.0~4.0 $\mu\text{g/ml}$, 48h).

ELISA 法で DNA 断片化を定量した結果においても、Fig. 4.4A と Fig. 4.4B に示すように、Fraction 1C は 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 、48 時間で最大効果が得られ、時間と濃度依存的にコントロールより 3.4 倍の DNA 断片化を引き起こした。

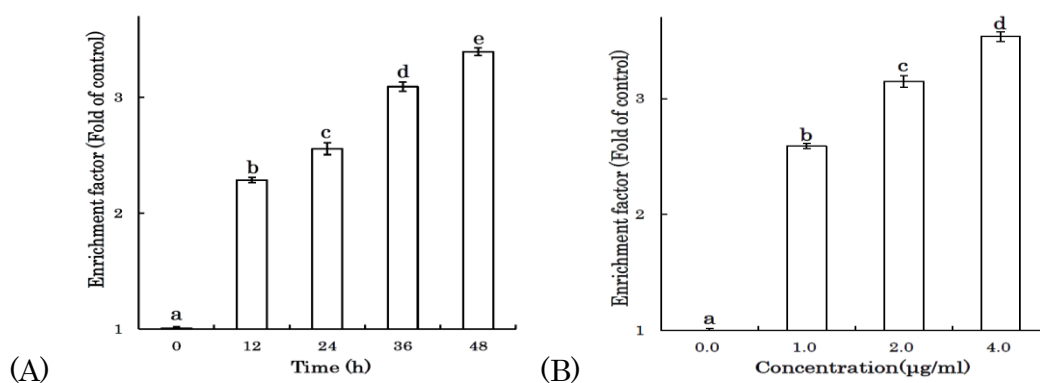


Fig. 4.4 The induction effect of Fraction 1C on the DNA fragmentation of HL-60 cells, as assessed by ELISA. The cells (1.0×10^5 cells/ml) were seeded into 12-wells plates. (A) A time-dependent experiment (0~48h, 4.0 $\mu\text{g/ml}$). (B) A dose-dependent experiment (0.0~4.0 $\mu\text{g/ml}$, 48h). Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate cultures. Means with differently lettered superscripts differ significantly at the probability of $p < 0.01$.

(2) Fraction 1C による caspase-3 および PARP の影響

Western blotting 法で 最低 3 回繰り返し解析した結果、Fraction 1C が 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 、48 時間でアポトーシス実行タンパク質である caspase-3 の開裂活性化 (Cleaved)、DNA の修復酵素である PARP の開裂不活性化 (Cleaved) を引き起こした。ローディングコントロールタンパク質である β -actin には変化しなかった (Fig. 4.5)。

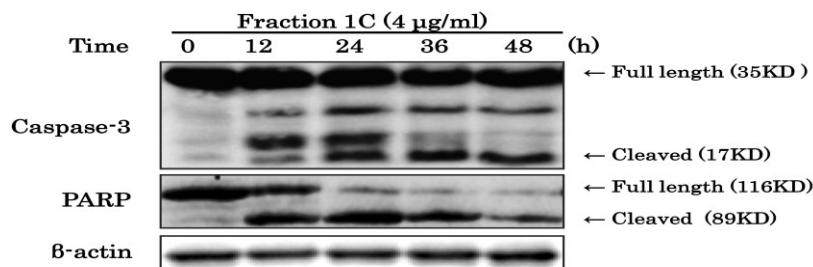


Fig. 4.5 The activation of caspase-3 and inactivation of PARP by Fraction 1C. HL-60 cells (2.0×10^6 cells/6 ml) were seeded into 6cm-dishes for 24 h with 4.0 $\mu\text{g/ml}$ of Fraction 1C for 48 h, whole-cell lysate was used for Western blotting analysis with the indicated specific antibodies, respectively.

4.3.2.2 Fraction 1C-III のアポトーシス誘導作用

Fraction 1C-III は高い細胞増殖抑制効果が示された (Fig. 4.2D)。そこで、その効果がアポトーシスによるものかを調べるため、DNA 断片化や caspase-3 の活性化等のアポトーシスマーカーの解析を行った。

(1) Fraction 1C-III による DNA 断片化の誘導

ELISA 法で DNA 断片化を定量した結果、Fig. 4.6A と Fig. 4.6B に示すように、Fraction 1C-III は、時間と濃度依存的に DNA 断片化を引き起こし、4.0 $\mu\text{g/ml}$ 、48 時間で最大効果が得られ、コントロールより 4.3 倍の DNA 断片化を示した。

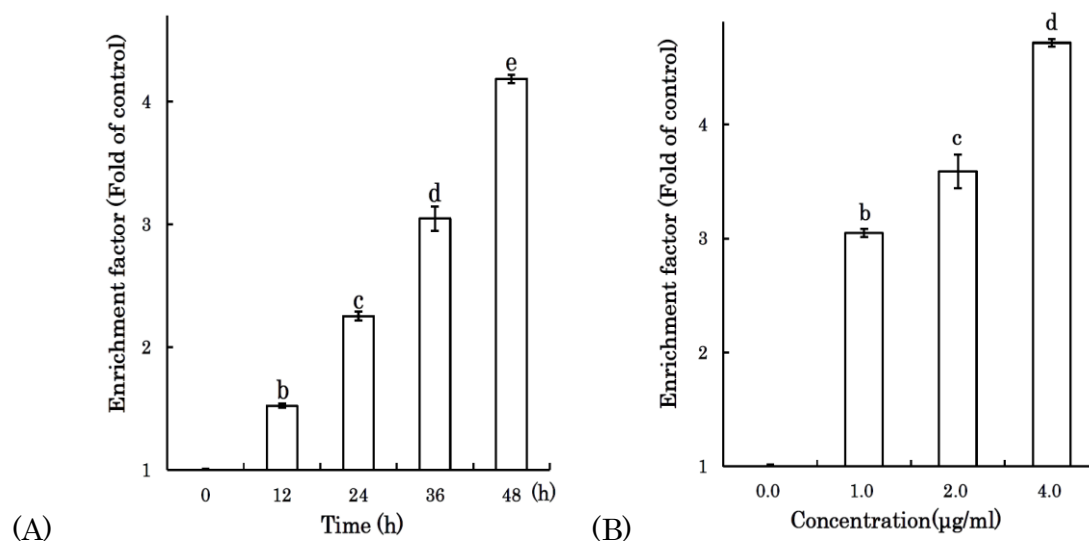


Fig. 4.6 The induction effect of DNA fragmentation of HL-60 cells by Fraction 1C-III, as assessed by ELISA. The cells (1.0×10^5 cells/ml) were seeded into 12-wells plates. (A) A time-dependent experiment (0~48h, 4.0 $\mu\text{g/ml}$). (B) A dose-dependent experiment (0.0~4.0 $\mu\text{g/ml}$, 48h). Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate cultures. Means with differently lettered superscripts differ significantly at the probability of $p < 0.01$.

(2) Fraction 1C-III によるアポトーシスの誘導の解析

Western blotting 法で解析した結果、Fig. 4.7A と Fig. 4.7B を示すように Fraction 1C-III が 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 、48 時間で caspase-3 の開裂活性化 (Cleaved)、PARP

の開裂不活性化 (Cleaved) を一番強く誘導した。ローディングコントロールタンパク質である β -actin には変化しなかった。

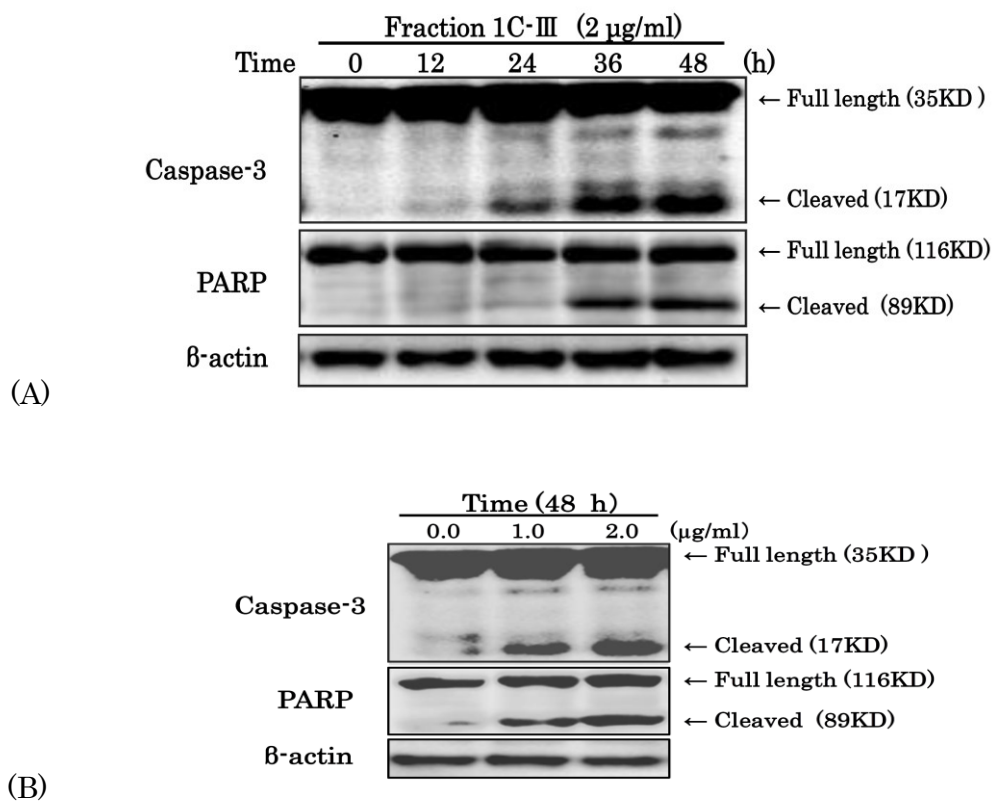


Fig. 4.7 The activation of caspase-3 and inactivation of PARP by Fraction 1C-III.

(A) A time-dependant experiment. HL-60 cells (2.0×10^6 cells/6 ml) were treated with 2.0 µg/ml of Fraction 1C 48 h, whole-cell lysate was used for Western blotting analysis with the indicated specific antibodies, respectively. (B) A dose-dependent experiment. HL-60 cells (2.0×10^6 cells/6 ml) were treated with 0.0, 1.0 and 2.0 µg/ml of Fraction 1C for 24 h, whole-cell lysate was used for Western blotting analysis with the indicated specific antibodies, respectively.

細胞を Annexin V-FITC および PI で二重染色し、フローサイトメトリーで解析した。その結果、コントロール細胞では初期アポトーシスが 3.72%、後期アポトーシスが 2.86%だったのに対して (Fig. 4.8A)、 Fraction 1C-III を 4.0 µg/ml で 24 時間処理した細胞では、初期アポトーシスが 20.79%、後期アポトーシスが 11.51%であり

(Fig. 4.8B)、コントロール細胞に比べ 4.9 倍アポトーシスが誘導された。一方、ネクローシスは、コントロール細胞では 4.60%、 Fraction 1C-III を添加した細胞では 3.78%であり、大きな差が見られなかった。以上のことから Fraction 1C-III による細胞死はネクローシスではなくアポトーシスであることが示唆された。

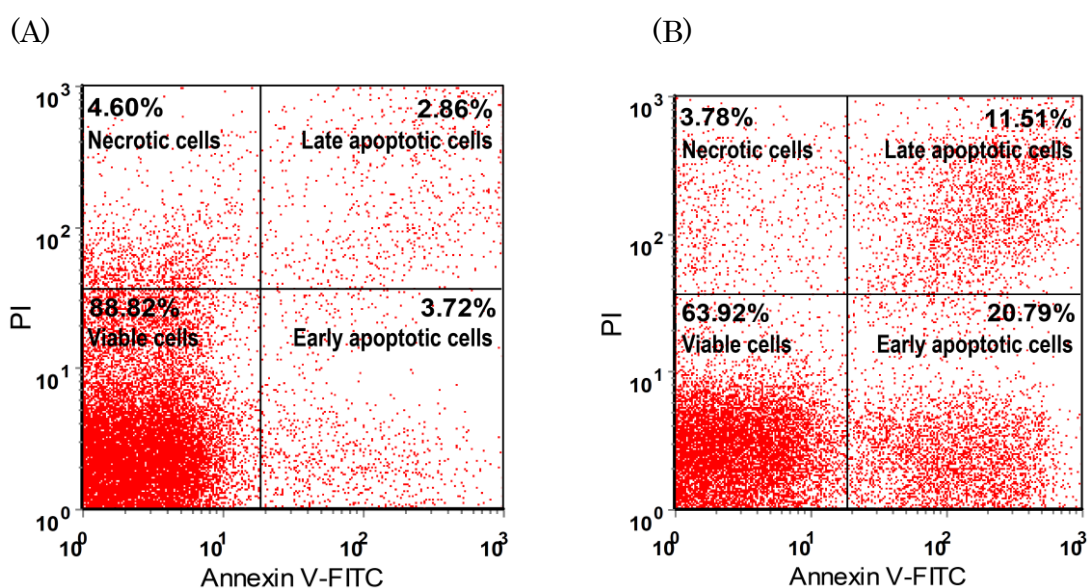


Fig.4.8 The distribution of various cells of HL-60 cells (1.0×10^5 cells/2 ml) treated with (B) or without Fraction 1C-III ($4.0 \mu\text{g/ml}$) (A). HL-60 cells (1.0×10^5 cells/2 ml) were treated with Fraction 1C-III ($4.0 \mu\text{g/ml}$) for 24 h, and then harvested cells were stained with Annexin V-FITC ($2 \mu\text{l}$) and PI ($2 \mu\text{l}$). The distribution of HL-60 cells was measured by flow cytometry at 520 nm for Annexin V and at 630 nm for PI.

4.4 要約

HP20 カラム、 Sephadex G-25 カラム、 HPLC (ODS カラム) の各分画法により得られた SCS の分画画分について、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60) の増殖抑制機能とその作用機序の検討及びその作用成分の単離を試みた。

まず、SCS から分画した各画分による HL-60 細胞の増殖抑制効果について探索した結果、 Fraction 1C-III が HL-60 細胞の増殖に最大の抑制効果を示し、その IC_{50}

値は 1.1 µg/ml であった。

次に、Fraction 1C-III が HL-60 細胞に対して 4.0 µg/ml、48 時間で最大の DNA 断片化を引き起こした。また Fraction 1C-III が caspase-3 の活性化及び PARP の開裂不活性化を誘導することによってがん細胞のアポトーシスを引き起こした。

HL-60 細胞を Annexin V-FITC および PI で二重染色し、フローサイトメトリーで解析した結果は、Fraction 1C-III を 4.0 µg/ml で 24 時間処理した細胞では、コントロール細胞に比べ 4.9 倍アポトーシスが誘導された。

以上の結果から、SCS 抽出物の Fraction 1C-III は、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60) のアポトーシスを誘導し、がん細胞増殖を抑制することが明らかになった。

第5章 サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツによるヒト大腸がん細胞 (HCT-116) に対する細胞増殖抑制効果及び作用機序

5.1 緒言

人の体内に食物が最初に出会うのは最大の免疫系である腸管免疫系である。体内の免疫細胞は約 6 割が腸内にある。腸管免疫系は、病原性細菌など有害な抗原には免疫応答を発動し排除する一方で、蛋白質や共生細菌など無害な抗原には反応しないような制御（経口免疫寛容）があることも知られている。口から入った様々な抗原が小腸に達すると、小腸免疫系で IgA 産生や経口免疫寛容など免疫反応を起こす。一方で、大腸の免疫系としては孤立リンパ濾胞、シーカムパッチがある。大腸においてはこれら大量の腸内細菌と共生するための独自の免疫系が存在する（上野川, 2003）。大腸では小腸に比べて腸内共生菌に対する強い免疫応答が制御されている報告もある（細野, 2011）。

大腸がんは食事の欧米化、とくに動物性脂肪や蛋白質の過剰摂取などにより、日本でも近年急速に増え、30 年間で患者数は約 6 倍になっている。2012 年の統計では、肺がん、胃がんに続き、がん部位別の罹患率と死亡率とも 3 位になった。大腸がんの発症率は年間に人口 10 万人あたり 99.4 人程度と見られ、年間約 47,286 名が死亡している（公益財団法人がん研究振興財団, 2013）。大腸がんの原因はまだ十分に解明されてはいないが、それでも近年の研究により、食事などの生活習慣が大きく関わっていることが分かった。また、一部は遺伝的要素もある。

SCS は、第 3 章において抗炎症効果が示唆され、その中に細菌リポ多糖 LPS 誘導性酵素 COX-2 発現の抑制効果が示された。近年、種々の消化器腫瘍の間質細胞、腫瘍上皮細胞で COX-2 の高発現が認められる。COX-2 はアポトーシスに対する抵抗性、細胞増殖能、血管新生能、浸潤転移能の亢進、腫瘍免疫抑制、遺伝子変異の増幅など、腫瘍の発生・進展に有利になる条件を腫瘍組織に付与することにより、腫瘍形成に関

する可能性が明らかにされてきた (辻井, 2006)。

ヒト大腸がん細胞 (Human colon carcinoma cells) HCT-116 は、接着細胞である。がん抑制遺伝子 p53 遺伝子を有する (p53 +/+, wild type) または欠損する (p53 -/-, null type) ヒト大腸がん細胞株があり、がん細胞モデルをとして、抗がん活性の検証をよく使われている。

本章では、モデル細胞 HCT-116 を用いて、SCS をカラムクロマトグラフィーにて分画した画分において、がん細胞増殖抑制効果及びアポトーシス誘導能を調べ、その作用機序を解明した。また、第 4 章においてヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60) の増殖抑制効果及びアポトーシス誘導能を有することが示された。接着細胞である HCT-116 細胞と浮遊細胞である HL-60 細胞の抗がん活性を比較した。

5.2 試料と方法

SCS の供試試料は、第 2 章の 2.2.1 および 2.2.2 に従い調製した。

5.2.1 試薬と細胞培養

細胞増殖能測定用の MTT は SIGMA 社製を使用した。Western blotting 分析用の β -actin の抗体は、SIGMA 社製を、caspase-3、PARP の抗体、Anti-rabbit IgG、Anti-mouse IgG は Cell signaling 社製を、ELISA 測定用の細胞死検出キット (ELISA^{PLUS}) は Roche Diagnostics 社製を使用した。その他の試薬は、NACALAI TESQUE 社製を使用した。

ヒト大腸がん細胞 (HCT-116) は、RIKEN CELL BANK より入手し、10% FBS (EQUITECH-BIO Inc.)、1% PSG (GIBCO Inc.) を含む D-MEM 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO.) を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

5.2.2 細胞増殖抑制の測定

細胞増殖抑制能は、MTT 測定法を用いて測定した (Hou *et al.*, 2003)。24 時間前

培養した HCT-116 細胞 (2.2×10^4 cells/cm²) に規定濃度の試料を添加し、48 時間培養後、MTT 溶液 (5 mg/ml) を 10 μ l 添加し、さらに 4 時間培養した。測定方法は第 4 章の 4.2.2 に準じた。

5.2.3 Western blotting

Western blotting 分析法 (Hou *et al.*, 2003) では、24 時間前培養した HCT-116 細胞 (2.2×10^4 cells/cm²) に規定濃度の試料を添加して 0、12、24、48 時間培養した。測定方法は第 4 章の 4.2.3 に準じた。

5.2.4 DNA 断片化 の ELISA 分析

DNA 断片化の定量は、ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics Inc.) を用いて、アポトーシスが起った細胞にあるヒストン/ DNA 断片複合体を検出することによって DNA 断片化を定量した (Sakao *et al.*, 2012)。24 時間前培養した HCT-116 細胞 (3.7×10^3 cells/cm²) を 4.0 μ g/ml の試料、0~48 時間で、または 0.0~8.0 μ l/ml の試料、48 時間で処理した。測定方法は第 4 章の 4.2.5 に準じた。

5.2.5 統計解析

各実験の結果は、平均値 \pm 標準偏差で示した。有意差検定は統計ソフトウェア「SPSS for Windows 10.0.7J」で行った。MTT (n=8)、Western blotting および ELISA (n=3) の測定は 3 回ずつ行い、Tukey の多重分析法による有意差検定 ($p < 0.01$) を行った。

5.3 結果と考察

5.3.1 HCT-116 細胞増殖に対する抑制作用

SCS を分画する各過程で得られた画分を HCT-116 培養細胞に添加し、細胞の増殖抑制効果を評価した。まず、HP20 カラムで分画した Fraction 1~4 で、Fraction 1、

Fraction 2 および Fraction 3 が有意に細胞の増殖を抑制した。 Fraction 4 では有意な細胞増殖抑制効果が認められなかった (Fig. 5.1)。次に増殖抑制効果が一番高かった Fraction 1 を Sephadex G-25 カラムで分画した。その中で Fraction 1A と Fraction 1C が、有意に HCT-116 細胞の増殖を抑制した (Fig. 5.2)。さらに細胞増殖抑制効果が高かった Fraction 1C を HPLC (ODS カラム) で分画した。得られた Fraction 1C-III が、有意に HCT-116 細胞の増殖を抑制した (Fig. 5.3)。また濃度依存的な抑制効果も認められ、その IC₅₀ 値は 1.8 µg/ml であった (Fig. 5.4)。

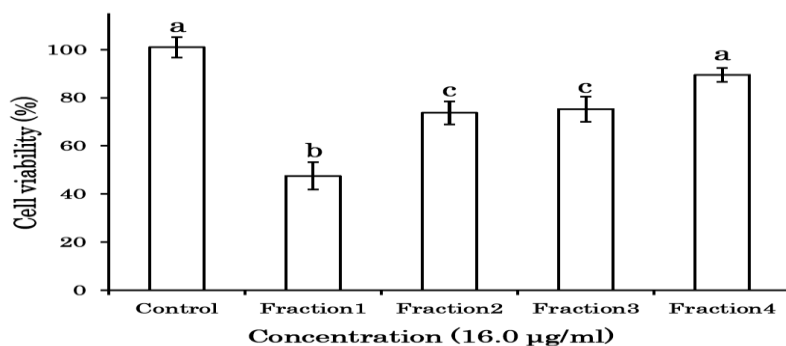


Fig. 5.1 The inhibitory effects of Fraction 1~4 on the proliferation of HCT-116 cells. The cells (2.2×10^4 cells/cm²) were seeded into 96-wells plates for 24 h, and then treated with Fraction 1~4. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate cultures. Means with differently lettered superscript differ significantly at the probability of $p < 0.01$.

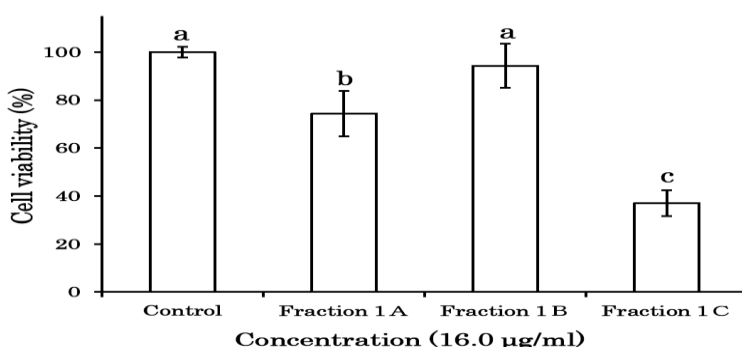


Fig. 5.2 The inhibitory effects of Fraction 1A~1C on the proliferation of HCT-116 cells. The cells (2.2×10^4 cells/cm²) were seeded into 96-wells plates for 24 h, and then treated with Fraction 1A~1C. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate cultures. Means with differently lettered superscript differ significantly at the probability of $p < 0.01$.

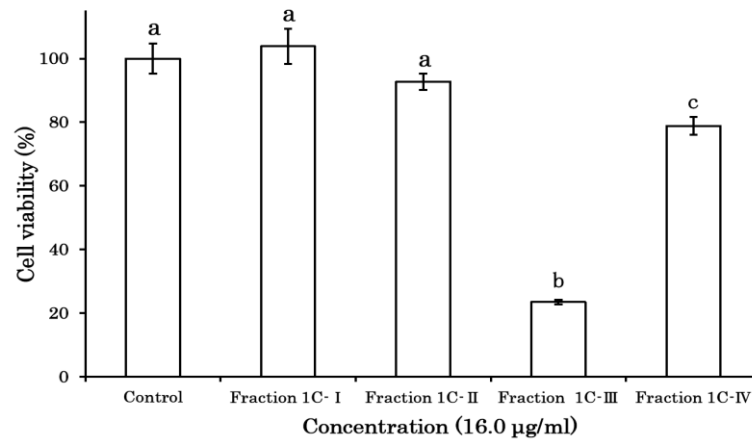


Fig. 5.3 The inhibitory effects of Fraction 1C-I~IV on the proliferation of HCT-116 cells. The cells (2.2×10^4 cells/cm²) were seeded into 96-wells plates for 24 h, and then treated with Fraction 1C-I~IV. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate cultures. Means with differently lettered superscript differ significantly at the probability of $p < 0.01$.

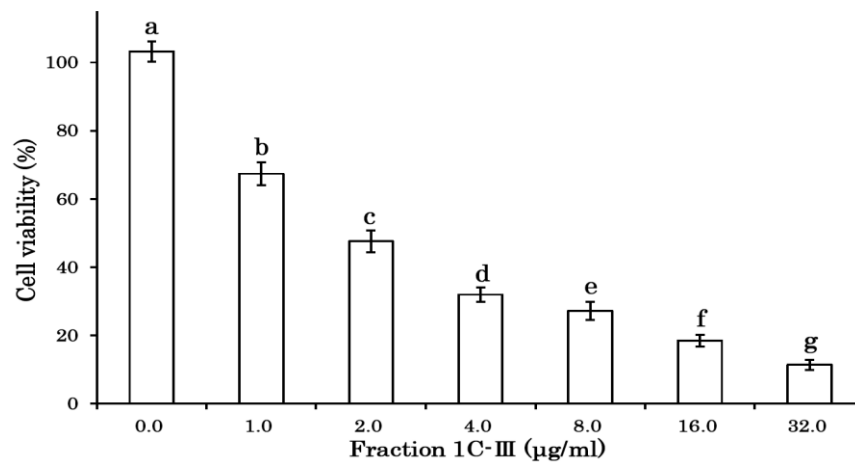


Fig. 5.4 The inhibitory effects of Fraction 1C-III on the proliferation of HCT-116 cells. The cells (2.2×10^4 cells/cm²) were seeded into 96-wells plates for 24 h, and then treated with Fraction 1C-III. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate cultures. Means with differently lettered superscript differ significantly at the probability of $p < 0.01$.

5.3.2 HCT-116 細胞に対するアポトーシスの誘導作用

Fraction 1C-III が、有意に HCT-116 細胞の増殖を抑制したことが確認されたことより、Fraction 1C-III の細胞増殖抑制効果がアポトーシスによるものかを調べるため、DNA 断片化や caspase-3 の活性化等のアポトーシスマーカーを解析した。

ELISA により DNA 断片化を定量した結果、Fraction 1C-III は時間と濃度依存的に DNA 断片化を引き起こし、4.0 $\mu\text{g/ml}$ 、48 時間で最大の効果が得られた (Fig. 5.5A と 5.5B)。

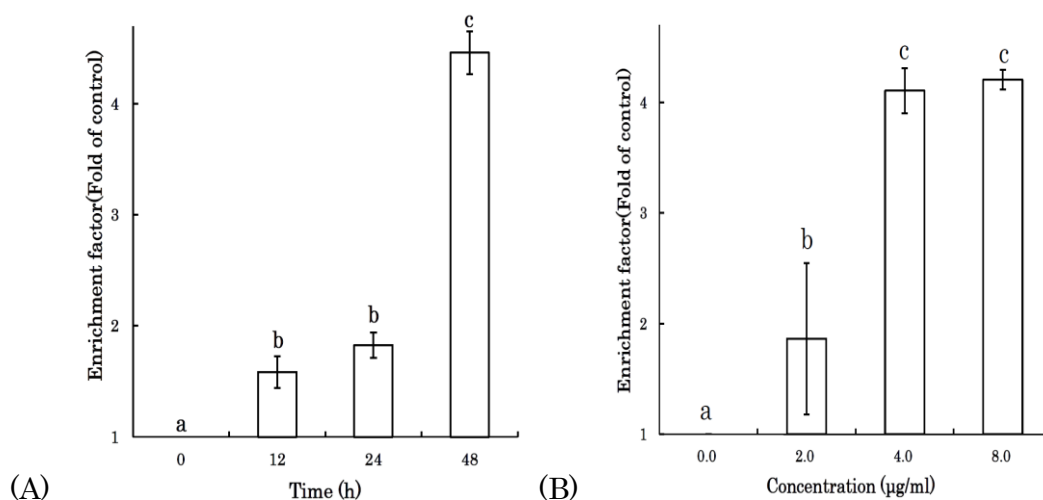


Fig. 5.5 The induction of DNA fragmentation of HCT-116 cells by Fraction 1C-III, as assessed by ELISA. The cells (3.7×10^3 cells/cm²) were seeded into 12-wells plates. (A) A time-dependent experiment (0~48 h, 4.0 $\mu\text{g/ml}$). (B) A dose-dependent experiment (0.0~8.0 $\mu\text{g/ml}$, 48 h). Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate cultures. Means with differently lettered superscript differ significantly at the probability of $p < 0.01$.

Caspase-3 の活性化と PARP の開裂は、Fraction 1C-III が 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 、48 時間で caspase-3 の開裂活性化 (Cleaved)、PARP の開裂不活性化 (Cleaved) を一番強く誘導した。ローディングコントロールタンパク質である β -actin には変化がなかった (Fig. 5.6A と 5.6B)。

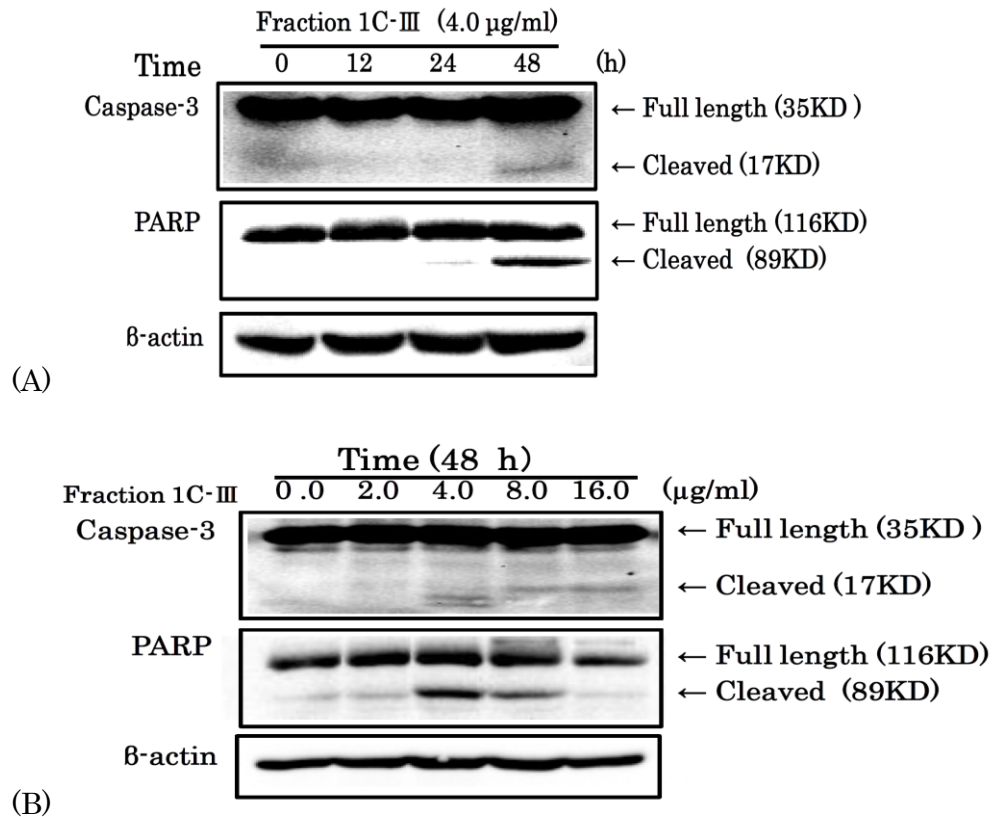


Fig. 5.6 The activation of caspase-3 and inactivation of PARP by Fraction 1C-III. A time-dependant experiment. HCT-116 cells (2.2×10^4 cells/cm²) were treated with 4.0 µg/ml of Fraction 1C 48 h, whole-cell lysate was used for Western blotting analysis with the indicated specific antibodies, respectively. (B) A dose-dependent experiment. HL-60 cells (2.2×10^4 cells/cm²) were treated with 0.0, 2.0, 4.0, 8.0 and 16.0 µg/ml of Fraction 1C for 24 h, whole-cell lysate was used for Western blotting analysis with the indicated specific antibodies, respectively.

5.4 要約

HP20 カラム、Sephadex G-25 カラム、HPLC (ODS カラム) により得られた SCS の分画画分について、ヒト大腸がん細胞 (HCT-116) の増殖抑制能及びアポトーシス誘導能の解析並びにその活性成分の単離を試みた。

はじめに、SCS を分画する各過程で得られた画分を HCT-116 培養細胞に添加し、細胞の増殖抑制効果を評価した。まず、HP20 カラムで分画した Fraction 1~4 の中で、Fraction 1、Fraction 2 および Fraction 3 が有意に細胞の増殖を抑制した。次

に増殖抑制効果が一番高かった Fraction 1 を Sephadex G-25 カラムで分画した。その中で Fraction 1A と Fraction 1C が、有意に HCT-116 細胞の増殖を抑制した。さらに増殖抑制効果が高かった Fraction 1C を HPLC (ODS カラム) で分画した。得られた Fraction 1C-III、有意に HCT-116 細胞の増殖を抑制した。また Fraction 1C-III によって濃度依存的な抑制効果も認められ、その IC₅₀ 値は 1.8 µg/ml であった。

次に、HCT-116 細胞に対するアポトーシスの誘導作用を検討した。その結果、Fraction 1C-III が 4.0 µg/ml、48 時間で最大効果の DNA 断片化を引き起こしたことが示唆された。また、Fraction 1C-III は、caspase-3 の活性化及び PARP の開裂不活性化を誘導し、がん細胞のアポトーシスを引き起こした。

以上の結果から、SCS から分画した Fraction 1C-III は、ヒト大腸がん細胞(HCT-116) のアポトーシスを誘導し、がん細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。また、Fraction 1C-III は、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60) の増殖抑制 IC₅₀ 値は 1.1 µg/ml に対して、ヒト大腸がん細胞(HCT-116)の増殖抑制 IC₅₀ 値は 1.8 µg/ml であった。HL-60 細胞と HCT-116 細胞に対する増殖抑制効果においては、Fraction 1C-III が大きな差が見られなかった。

第6章 サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツ抽出物の化学構造解析

6.1 緒言

第2章においてサツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツ (SCS) 成分の分画について示した。そして SCS から分画された画分の各種活性を解析した結果、Fraction 1C-III が高い生理活性を保持することが示唆された。第3章で分画物の中で Fraction 1C-III が LPS により誘導されたシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現を有意に抑制した。また、Fraction 1C-III は LPS 誘導性炎症足腫の ICR マウスにおいて、血清中の炎症性因子である IL-6 や TNF- α タンパク質レベルを低減させることで、炎症性足腫を顕著に抑制した。第4章と第5章では、Fraction 1C-III がヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60) 細胞及びヒト大腸がん細胞 (HCT-116) のがん細胞増殖抑制作用とアポトーシス誘導効果を有することが示唆された。

本章では SCS の抽出物の生理活性成分について化学構造解析を行った。冬虫夏草には、生理活性成分であるコルジセピン (3'-Deoxyadenosine) が存在する (Kim *et al.*, 2002) ことから、その標品を用いて生理活性を持つ Fraction 1C-III の活性物質の化学構造の解析を行った。

6.2 試料と方法

6.2.1 試料調製

SCS の分画試料は、第2章の 2.2.1 および 2.2.2 に従い調製した。

6.2.2 化学解析方法

標品コルジセピンを用いて各画分の化学構造の解析を行った (Zhu *et al.*, 2011; Masuda *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007)。コルジセピン (3'-Deoxyadenosine) は、和光純薬工業社 (株) より購入した。

6.2.2.1 HPLC 解析

HPLCは島津製作所の LC-20A システムを用いて下記の条件で Fraction 1C-IIIおよびコルジセピン標品の同定を行った。ポンプ; LC-20ADVP、オープンカラム; CTO-20AC、UV/VIS 検出器; SPD-20A、オートサンプラ; SIL-20AHT を使用した。カラム; Cadenza CD-C18 (3 μm , 75 mm \times 4.6 mm I.D., Imtakt Co.)。カラム温度; 40 $^{\circ}\text{C}$ 。移動相; (A) 水、(B) アセトニトリル。流速; 1.0 ml/min、2~19% B (0.00~8.00 min)、19~100%B (8.01~16.00 min)、100%B (16.01~20.00 min)とし、検出波長は 260 nm に設定した。

6.2.2.2 FT-IR 解析

FT-IR/IRT- 3000 ATR-30-Z (JASCO CO.) による同定は、全反射測定法 (ATR) により、粉末状試料を ATR 結晶表面領域に置き、圧縮しながらプリズムに密着させて測定することで行った。測定領域は 400~4000 cm^{-1} とした。

6.2.2.3 NMR 解析

^1H -NMR スペクトルは、JNM-ECA600 (JEOL Inc.)を用いて測定した。各試料 3mg を DMSO- d_6 (600 μl) で溶解し、5mm の NMR チューブに移して測定を行った。標準化合物にはテトラメチルシラン (TMS) を用いた。

6.2.2.4 LC/MS-IT-TOF 解析

島津製作所の LC/MS-IT-TOF システムにより下記の条件で同定を行った。LC 条件: 質量分析計; LC/MS-IT-TOF、システムコントローラ; CBM-20A、送液ユニット; LC-30AD、オンラインデガッサ; DGU-20A $_5$ 、カラムオープン; CTO-20AC、オートサンプラ; SIL-30AC、LC/MS ワークステーション LC/MS solution を使用した。カラム; Luna 3 μ HILIC 200A (3 μm , 150mm \times 2.0 mm I.D., 島津ジーエルシー 株)。カラム温度; 40 $^{\circ}\text{C}$ 。移動相; (A) 5mmol/L 蟻酸アンモニウム・精製水、(B) アセトニト

リル。流速; 0.2 ml/min、98% B (0.00 min)、30% B (6.00~10.00 min)、98% B (10.01~15.00 min) とした。MS 条件:イオン化モード; ESI +、噴霧ガス流量; 1.5 L/min、DryingGas 圧; 0.10 MPa、印可電圧; +4.5 kV、CDL 温度; 200 °C、BH 温度; 200 °C、Scan 幅; MS¹: m/z 150-2000、MS²: m/z 50-2000、MS³: m/z 50-2000 であった。

6.3 結果と考察

HPLC による画分の化学解析には、コルジセピン標品 (Fig. 6.1A) と Fraction 1C-III を用いた。Fig. 6.1B に示すように、Fraction 1C-III とコルジセピンは同じリテンションタイムであった。

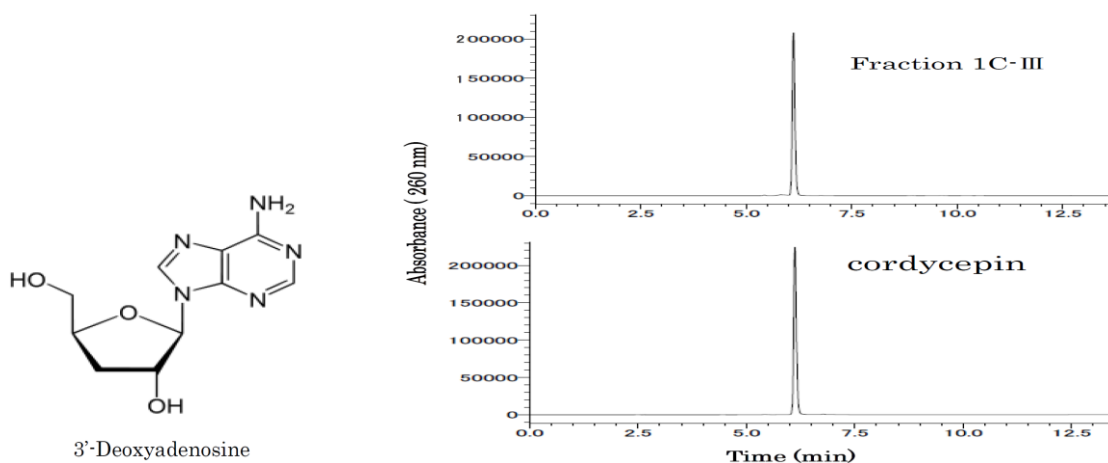


Fig. 6.1 (A) Chemical structure of cordycepin (3'-deoxyadenosine). (B) HPLC profiles of Fraction 1C-III and cordycepin. The mobile phase A was water, and phase B was acetonitrile. The absorbance was measured with 260 nm at 40°C.

FT-IR による画分の化学解析については、Fraction 1C-III を FT-IR で分析した結果、3325、3120、2919 に O-H および N-H 伸縮振動の吸収波数 (cm⁻¹) が認められ、1670、1608 に C=N 伸縮振動ならびに N-H 変角振動の吸収波数の主なバンドが得られた。これらの値はコルジセピン標準品とほぼ一致した (Fig. 6.2)。

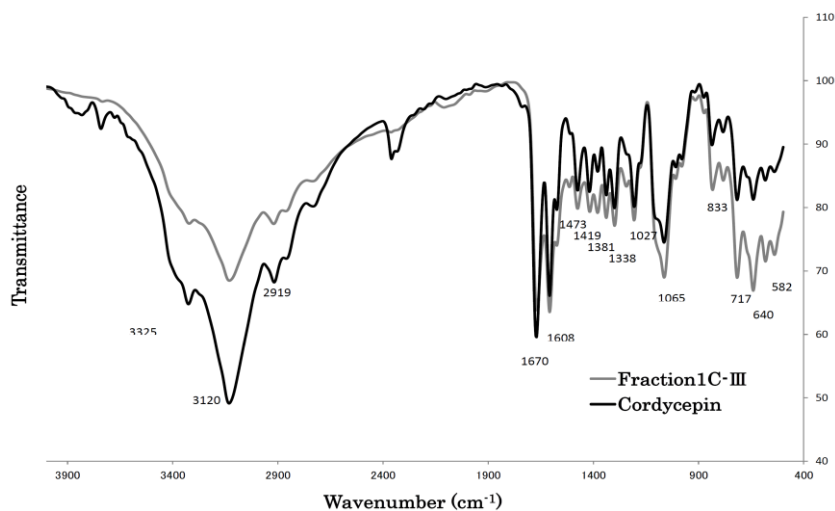


Fig. 6.2 FT-IR spectrum of Fraction 1C-III and cordycepin (400~4000 cm^{-1}).

NMR による画分の化学解析結果は、Fraction 1C-III の NMR ($^1\text{H-NMR}$) のスペクトルより、化学シフトおよび積分比： 1.91 (1H, m)、 2.23 (1H, m)、 3.53 (1H, m)、 3.67 (1H, m)、 4.33 (1H, m)、 4.56 (1H, m)、 5.19 (1H, t)、 5.66 (1H, d)、 5.86 (1H, t)、 7.28 (2H, s)、 8.13 (1H, s)、 8.35 (1H, s) が得られ、コルジセピンの値とほぼ一致した (Fig. 6.3)。

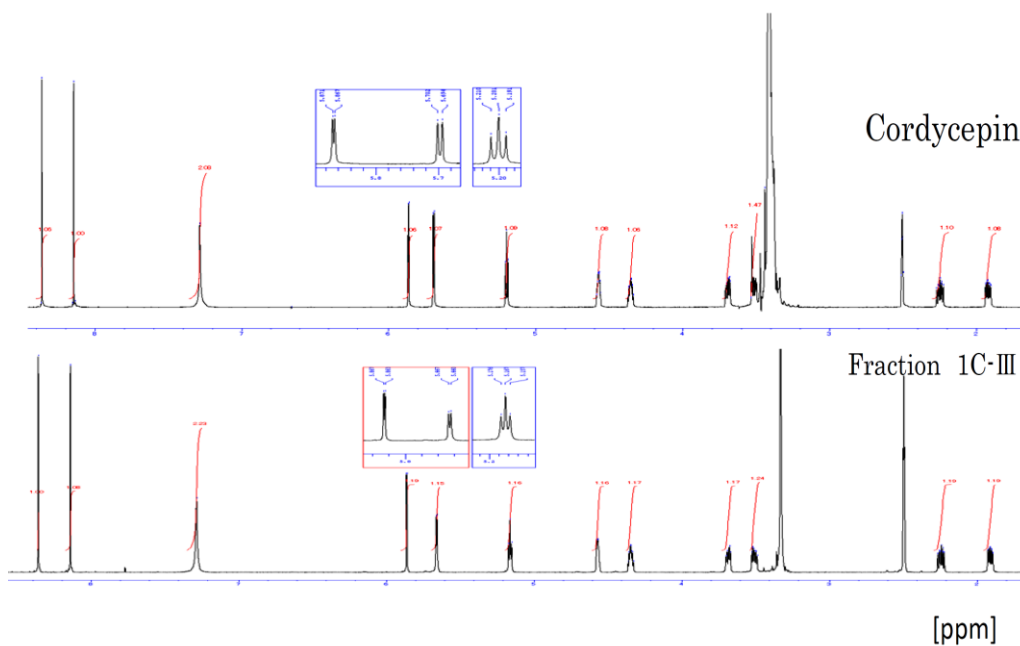


Fig. 6.3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Fraction 1C-III and cordycepin (600 MHz, DMSO-d_6).

LC/MS-IT-TOF による化学解析では、Fraction 1C-III は、Fig. 6.4A に示すように MS¹ 測定より m/z 252.11 (C₁₀H₁₃N₅O₃ + H⁺) ピークが検出された。MS² 測定より m/z 136.06 (C₅H₅N₅ + H⁺) ピークが検出され、解離した部分は m/z 116.05 (C₅H₈O₃ + H⁺) と推定された。MS³ 測定より m/z 119.03 (C₅H₂N₄ + H⁺) ピークが検出された。以上の結果は、コルジセピンの値とほぼ一致した (Fig. 6.4B)。

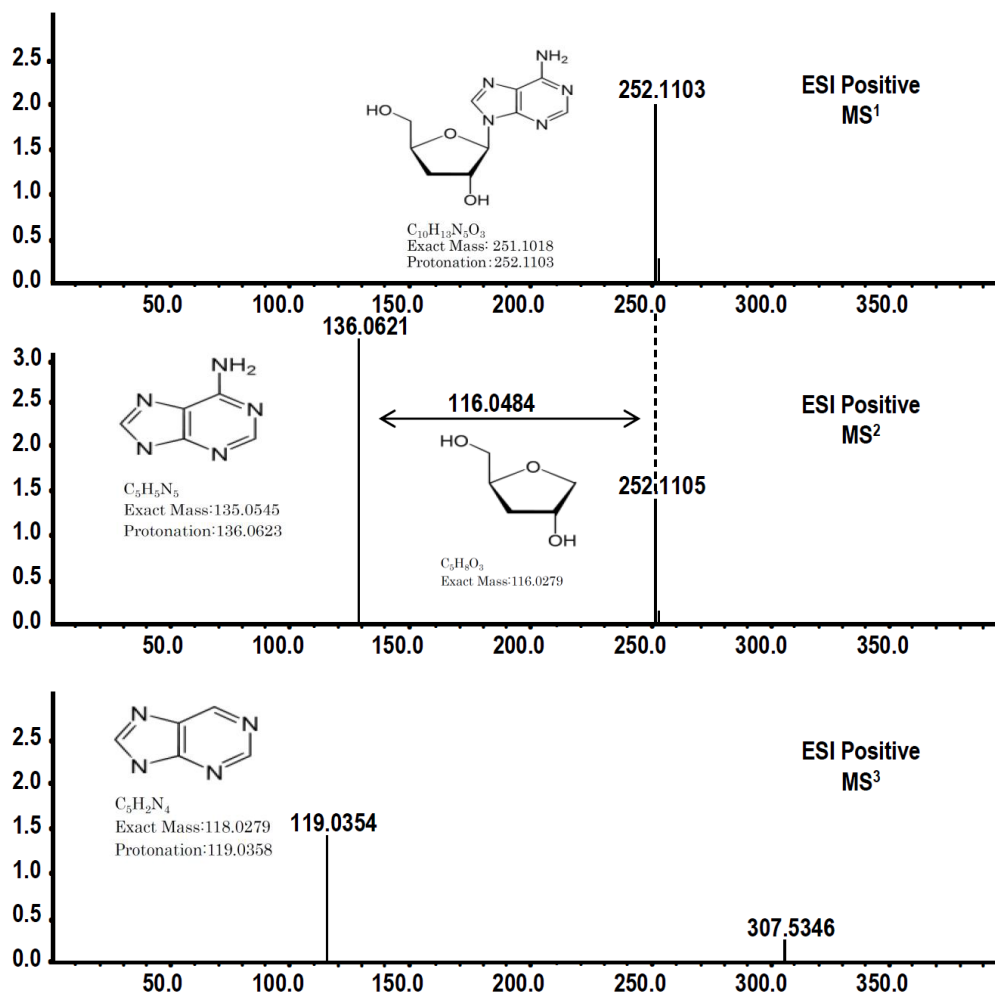


Fig. 6.4A LC/MS-IT-TOF spectrum of cordycepin. The mobile phase A was 5 mmol/L ammonium formate, and phase B was acetonitrile.

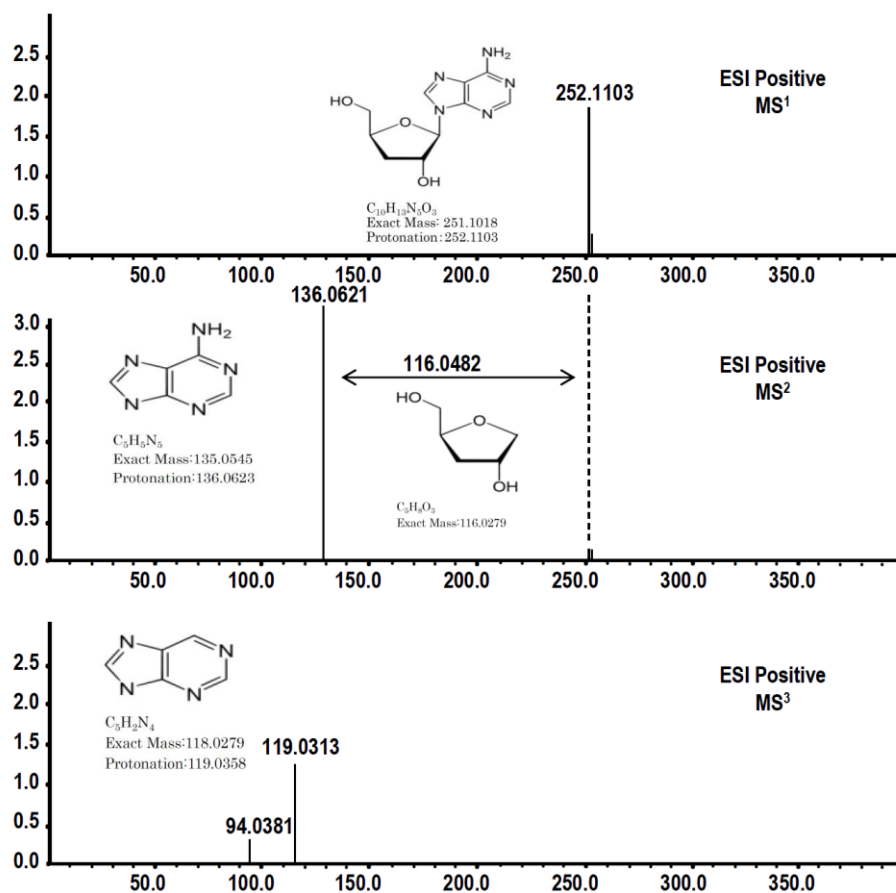


Fig. 6.4B LC/MS-IT-TOF spectrum of Fraction 1C-III. The mobile phase A was 5mmol/L ammonium formate, and phase B was acetonitrile.

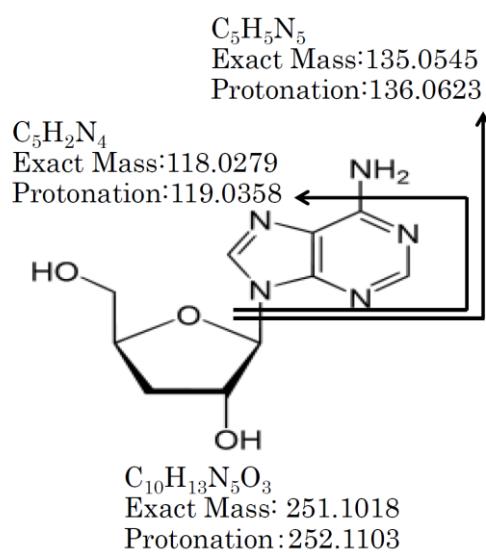


Fig. 6.4C Chemical structure of cordycepin.

6.4 要約

冬虫夏草に存在する活性物質コルジセピン標品を用いて、HPLC、FT-IR、NMR および LC/MS-IT-TOF の 4 つの方法により SCS から得られた活性画分 Fraction 1C-III の化学構造解析を行った。

まず、HPLC 分析より Fraction 1C-III とコルジセピンとリテンションタイムが同じであった。次に FT-IR の測定では、吸収波数の主なバンドは、Fraction 1C-III とコルジセピンとほぼ一致した。さらに NMR ($^1\text{H-NMR}$) 分析結果も Fraction 1C-III の NMR のスペクトルとコルジセピンとほぼ一致した。最後に LC/MS-IT-TOF 結果も Fraction 1C-III の LC/MS-IT-TOF の MS スペクトルとコルジセピンのそれはとほぼ一致した。

以上の解析結果より、Fraction 1C-III の主成分がコルジセピン (3'-Deoxyadenosine) であることを示唆された。

第7章 総括

アルコール飲料は、生活に楽しみをもたらす嗜好品であると同時に、健康に悪影響を及ぼすこともある。そのことより、その悪影響を低減させ、生体調節機能を持つ健康アルコール飲料の開発が求められている。ミリタリス冬虫夏草は、コルジセピン、D-マンニトール、 β -D-グルカン、核酸およびポリフェノール等の生理活性成分を豊富に含み、抗炎症効果、抗腫瘍、免疫賦活等の様々な生理活性を有し、機能性素材として注目されている。しかし、ミリタリス冬虫夏草をスピリッツに使用される場合にはこれらの機能が保持されているかどうか、または、その活性成分が保持されているかどうか不明である。本研究では、機能性を有する蒸留酒であるサツマイモ焼酎にミリタリス冬虫夏草子実体を浸漬させて造られた冬虫夏草スピリッツ（金霧島, SCS）について、その機能性の解析及び活性成分の同定を行った。

SCS の活性成分の分離は HP20 カラム、Sephadex G-25 カラム及び HPLC 等の分画により行った。まず、SCS を HP20 カラムにより Fraction 1~4 に分画した。次に Fraction 1 を Sephadex G-25 カラムで Fraction 1A、Fraction 1B、Fraction 1C の 3 つに分画した。さらに Fraction 1C を HPLC (ODS カラム) によって、Fraction 1C-I、Fraction 1C-II、Fraction 1C-III、Fraction 1C-IV の 4 つに分画した。得られた各画分について炎症抑制効果及びがん細胞増殖抑制機能をそれぞれ検討した。

炎症抑制効果については、培養細胞モデルおよび動物モデルを用いて検討した。まず、炎症モデル細胞であるマウスマクロファージ様細胞(RAW 264.7)において、画分 1C-III (Fraction 1C-III) が細菌リポ多糖 (LPS) 誘導性酵素 (COX-2) の発現を顕著に抑制した。また、炎症動物モデルである ICR マウスを用いた炎症性マウス足浮腫実験においては、炎症動物モデル (ICR マウス) 実験においては、Fraction 1C-III が炎症性因子 IL-6 や TNF- α タンパク質の血清中レベルを有意に低減させ、マウスの足浮腫症状を緩和する効果が認められた。よって、Fraction 1C-III は、抗炎症作用を有することが明らかになった。

次に、SCS 分画の抗がん作用を検討するため、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL-60) 及びヒト大腸がん細胞 (HCT-116) に対する増殖抑制効果及びアポトーシス誘導機能を調べた。

HL-60 の培養細胞実験において、Fraction 1C-III は HL-60 細胞の増殖を顕著に抑制し、その IC₅₀ 値が 1.1 µg/ml であった。また、細胞 DNA 断片化およびアポトーシス関連タンパク質への効果を解析した結果、HL-60 細胞に Fraction 1C-III を 4.0 µg/ml 添加し、48 時間後、最大の DNA 断片化を引き起こし、caspase-3 の活性化及び PARP の開裂不活化を誘導することによって細胞アポトーシスを引き起こした。さらに、細胞を Annexin V-FITC / PI の二重染色で解析した結果、Fraction 1C-III で処理した HL-60 細胞 (4.0 µg/ml, 24 時間) には、未処理細胞より 4.9 倍のアポトーシス細胞が認められた。

HCT-116 細胞においても、Fraction 1C-III が HCT-116 細胞の増殖を顕著に抑制し、その IC₅₀ 値は 1.8 µg/ml であった。同様に、Fraction 1C-III の HCT-116 細胞の DNA 断片化及びアポトーシス関連タンパク質への効果を解析した結果は、4.0 µg/ml 添加し、48 時間後で caspase-3 の活性化及び PARP の開裂不活化、それに伴い DNA 断片化を誘導することによって細胞にアポトーシス誘導の特徴を引き起こした。

よって、Fraction 1C-III は、HL-60 細胞及び HCT-116 細胞のアポトーシスを引き起こさせ、それぞれの細胞増殖を抑制することが明らかとなった。

最後に HPLC、FT-IR、NMR および LC/MS-IT-TOF の 4 つの手法により生理活性を持つ Fraction 1C-III の活性物質の同定を行った。その結果、Fraction 1C-III の主要活性成分はコルジセピンと同定した。

このことにより、サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツが炎症抑制効果及びがん細胞増殖抑制機能を持つことが細胞及び動物レベルで明らかとなり、その主な活性成分は冬虫夏草由来のコルジセピンであることが明らかになった。

以上のことから、サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツには、活性成分コルジセピ

ンが存在し、抗炎症機能や抗がん機能を発揮することが明らかになった。これらの成果は、サツマイモ焼酎の冬虫夏草スピリッツの機能性に関して科学的エビデンスを提供するとともに、機能性素材の付加価値を生かした新たな健康アルコール飲料の開発に資するものである。

Summary

Alcoholic drinks are favorite drinks for many peoples. However, alcoholic drinks may adversely affect health. The research and development of healthy alcoholic drinks are desired for consumers. *Cordyceps militaris* is a traditional Chinese medicine from a genus of ascomycete fungi, which produce a diverse variety of bioactive metabolites including cordycepin, mannitol, polyphenols and polysaccharides. Accumulated data have showed that *Cordyceps militaris* has anti-inflammatory, anti-cancer and immune-enhancing activities, and been used as healthy supplement. To utilize the bioactivity of *Cordyceps militaris*, the spirits, named *Kinkirishima* (SCS), was manufactured by soaking *Cordyceps militaris* in sweetpotato *shochu*. In the present study, the bioactive fractions were separated from SCS by HP20 column, Sephadex G-25 column and HPLC (ODS column). The anti-inflammatory, anti-cancer activities were then investigated at cellular and animal levels, and the bioactive compound was finally identified at chemical structure.

First of all, the anti-inflammatory effects of SCS extracts were investigated in mouse macrophage cells (RAW264.7). The fraction 1C-III (F1C-III) showed a significant inhibition on cyclooxygenase-2 (COX-2) expression induced by lipopolysaccharide (LPS). In the model of mouse paw edema, F1C-III significantly reduced the level of IL-6 and TNF- α in serum and further attenuated the paw edema induced by LPS.

Secondly, the anti-cancer activities of SCS extracts were determined by investigating the abilities of proliferation inhibition and apoptosis induction in both human promyelocytic leukemia cells (HL-60) and human colon

carcinoma cells (HCT-116). F1C-III had significant inhibition on the proliferation of both HL-60 and HCT-116 cells. Molecular data showed that F1C-III induced apoptosis of both HL-60 and HCT-116 cells as characterized by DNA fragmentation, activation of caspase-3, and cleavage of poly (ADP) ribose polymerase (PARP).

Finally, F1C-III was identified as cordycepin, a major bioactive component in *Cordyceps militaris*, using HPLC, FT-IR, NMR and LC/MS-IT-TOF analyses.

In summary, these data demonstrated that *Cordyceps militaris* spirits soaked in sweetpotato *shouchu* possesses anti-inflammatory effects in both cell and animal models, and also showed anti-cancer activities through the suppressing the proliferation inhibition and inducing apoptosis in both human promyelocytic leukemia and human colon carcinoma cells. These results provide insight for understanding the bioactive functions and underlying mechanisms of *Cordyceps militaris* spirits soaked in sweetpotato *shochu*.

参考文献

- Akira, S., Sato, S., Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J. Infect Dis.*, 35, 555-62 (2003).
- Alkerwi, A., Boutsen, M., Vaillant, M., Barre, J., Lair, M.L., Albert, A., Guillaume, M., Dramaix, M., Alcohol consumption and the prevalence of metabolic syndrome: A meta-analysis of observational studies. *Atherosclerosis*, 204, 624-635 (2009).
- 浅野茂隆, 池田康夫, 内山卓 監修, 「三輪血液病学」, 第3版 (文光堂, 東京), p 1375-1430 (2006).
- Anderson, P., Cremona, A., Paton, A., Turner, C., Wallace, P., The risk of alcohol. *Addiction.*, 88, 1493-1508 (1993).
- Anis, A., Dimintris, P.M., Panagiotis, K., correlation of Pigment and Flavanol content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 220-230 (2000).
- Buenz E.J., Bauer, B.A., Osmundson, T.W., The traditional Chinese Cordyceps sinensis and its effect on apoptotic homeostasis. *J. Antibiot*, 47, 1010-1016 (2005).
- Chen, J., Zhang, W., Lu, T., Li, J., Zheng, Y., Kong, L., Morphological and genetic characterization of a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus and its polysaccharide component possessing antioxidant property in H22 tumor-bearing, *Mice.Life Sci.*, 78, 2742-2748 (2006).
- Cheng, Q., Effect of *Cordyceps sinensis* on cellular immunity in rats with chronic renal insufficiency. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 72, 27-29 (1992).
- 陳 瑞英, 「冬虫夏草とサナギタケの生態・培養・応用」, 第3章 (かんぼう, 大阪), p 35-41 (2009).

- Choi, S.B., Park, C.H., Choi, M.K., Jun, D.W., Park, S., Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 68, 2257-2264 (2004).
- Delmulle, L., Bellahcène, A., Dhooge, W., Comhaire, F., Roelens, F., Huvaere, K., Heyerick, A., Castronovo, V., Keukeleire, D. De., Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.*, 37, 271-285 (1999).
- 独立行政法人 国立健康・栄養研究所, 「特定保健用食品」表示許可, 2014.
- Dong, C.H., Yao, Y.J., In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *LWT: Food Sci. Technol.*, 41, 669-677 (2007).
- Ferrández, A., Prescott, S., Burt, R.W., COX-2 and colorectal cancer. *Curr. Pharm. Des.*, 9, 2229-2251 (2003).
- Fu, L., Chen, Z.H., Research advances of chemical constituents and pharmacological activities of *Cordyceps*. *Life Sci.*, 8, 1-5 (2004).
- 八杉 龍一, 小関 治男, 古谷 雅樹, 日高 敏隆, 「生物学辞典」, 第4版 (岩波書店 東京), p 1564-1565 (2002).
- Roelofs, H.M., Te-Morsche, R.H., Van-Heumen, B.W., Nagengast, F.M., Peters, W.H., Over-expression of COX-2 mRNA In colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.*, 14, 1471-230X (2014).
- Hirotsune, M., Haratake, A., Komiya, A., Sugita, J., Tachihara, T., Komai, T., Hizume, K., Ozeki, K., Ikemoto, T., Effect of ingested concentrate and components of sake on epidermal permeability barrier disruption by UVB irradiation. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 948-952 (2005).

- Hong, Y.H., Lin, B.F., Evaluation of the anti-inflammation screening model of macrophages cell line by the proinflammatory mediators secretions. *Nutr. Sci. J.*, 29, 159-167 (2004).
- 細野 朗, 今野 拓馬, 笠倉 和巳, 鈴木 あみ, 百瀬 愛佳, 伊藤 喜久治, 高橋 恭子, 上野川 修一, 小腸と大腸の免疫系細胞応答は部位や腸内環境により異なる特徴をもつ. *腸内細菌学雑誌*, 25, 70 (2011).
- Hou, D.X., Luo, D., Tanigawa, S., Hashimoto, F., Uto, T., Masuzaki, S., Fujii, M., Sakata, Y., Prodelphinidin B-4 3'-O-gallate, a tea polyphenol, is involved in the inhibition of COX-2 and iNOS via the downregulation of TAK1-NF-kB pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 4, 742-751 (2007).
- Hou, D.X., Ose, T., Lin, S., Harazoro, K., Imamura, I., Kubo, M., Uto, T., Terahara, N., Yoshimoto, M., Fujii, M., Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Int. J. Oncol.*, 23, 705-712 (2003).
- Hu, F.L., Li, Z.Z., Secondary metabolites and their bioactivities of *Cordyceps* and its related fungi. *Mycosystema.*, 26, 607-632 (2007).
- 井上 圭三ら 編, 「生化学辞典」, 第3版 (東京科学同人, 東京), p 452 (1998).
- 石川 雄章ら 編, 「醸造物成分」, (日本醸造協会, 東京), p 109-13 (1999).
- 伊藤 清ら 編, 第4回改正「国税庁所定分析法注解」, (財団法人日本醸造協会, 東京), p 34-37 (1988).
- 上野川 修一, 「免疫と腸内細菌」, 第1部 (平凡社新書, 東京), (2003).
- 神渡 巧, 瀬戸口 眞司, 上田 次郎, 瀬戸 口智子, 緒方 新一郎, 芋焼酎の酒質に及ぼすサツマイモ品種の影響と特徴香成分の検索. *J. Brew. Soc. Jpn.*, 101, 437-445 (2006).
- 神渡 巧, 瀬戸口 智子, 上田 次郎, 吉永 優, 緒方 新一郎, 瀬戸口 眞治, 高峯 和則, 鮫島 吉廣, 原料サツマイモの特性と芋焼酎の特徴香成分. *日本醸造学会誌*, 104, 49-56 (2009).

- Jussi, V., Kari, P., Mika, K., Leena, A. M., Jaana, P., Alcohol intake and sickness absence: a curvilinear relation. *Am. J. Epidemiol.*, 156, 969-976 (2002).
- 加藤 周一, 大周 謙一ら 編, 「世界大百科事典」, スピリッツ, 第2版 (平凡社, 東京), p 2368 (2006).
- Kim, H.G., Shrestha, B., Lim, S.Y., Yoon, D.H., Chang, W.C., Shin, D.J., Han, S.K., Park, S.M., Park, J.H., Park, H.I., Sung, J.M., Jang, Y., Chung, N., Hwang, K.C., Kim, T.W., Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol*, 545, 2-3 (2006).
- Kim, J.R., Yeon, S.H., Kim, H.S., Ahn, Y.J., Larvicidal activity against *Plutella xylostella* of cordycepin from the fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Pest. Manag. Sci.*, 58, 713 (2002).
- 金城 典, やっぱりすごい! 「究極の生薬 冬虫夏草」, (リヨン者, 東京), p 23-27 (1999).
- 小泉 武夫, 財団法人アルコール研究医学協会, 「日本の酒の文化」, (春日斉, 東京), p 57 (1996).
- Koh, J.H., Kim, J.M., Chang, U.J., Suh, H.J., Hypocholesterolemic effect of hot-water extract from mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biol Pharm Bull.*, 26, 84-87 (2003).
- Kuo, H.C., Su, Y.L., Yang, H.L., Huang, I.C., Chen, T.Y., Differentiation of *Cordyceps sinensis* by a PCR-single-stranded conformation polymorphism-based method and characterization of the fermented products in Taiwan. *Food Biotechnol.*, 20, 161-170 (2006).
- Kuo, Y.C., Linc.Y., Tsai, W.J., Wu, C.L., Chen, C.F., Shiao, M.S., Growth inhibitors against tumor cells *Incordyceps sinensis* other than corydcepin and polysaccharides. *Cancer Invest.*, 12, 611-615 (1994).
- 公益財団法人がん研究振興財団, 「がんの統計13」, p 54-65, (2013).

- Lee, S.Y., Debnath, T., Kim, S.K., Lim, B.O., Anti-cancer effect and apoptosis induction of cordycepin through DR3 pathway in the human colonic cancer cell HT-29. *Food Chem. Toxicol.*, 60, 439-47 (2013).
- Lim, H.W., Kwon, Y.M., Cho, S.M., Kim, J.H., Yoon, G.H., Lee, S.J., Kim, H.W., Lee, M.W., Antitumor activity of *Cordyceps militaris* on human cancer cell line. *Korean J. Pharmacogn.*, 35, 364-367 (2004).
- Lo, H.C., Hsu, T.H., Tu, S.T., Lin, K.C., Anti-hyperglycemic activity of natural and fermented *Cordyceps sinensis* in rats with diabetes induced by nicotinamide and streptozotocin. *Am. J. Chin. Med.*, 34, 819-832 (2006).
- Masuda, M., Urabe, E., Sakurai, A., Sakakibara, M., Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Mic. Technol.*, 39, 641-646 (2006).
- 長谷川 明宏, 茂木 伸一, 機能性食品の研究開発の動向, 「科学技術動向」, p 12-18 (2002).
- 西田 尚道ら 編, 「本格焼酎製造技術」, (財団法人日本醸造協会, 東京), p 1-13 (1991).
- Nobuo, Y., Illustrated catalogue of Japanese Cordyceps (Entomonogenous Fungi): The Yahagi collection of Japanese Cordyceps stored in the Tohoku University Museum. *Bull. Tohoku Univ.Museum*, 8, 29-89 (2008).
- Nodake, Y., Fukasawa, M., Sakakibara, R., Growth Inhibition Action of Lactic Acid Bacteria-Metabolic Products on Human Leukemia HL-60 Cells. *Soy Protein Res. Jpn.*, 15, 96-102 (2012).
- Ohta, T., Ikuta, R., Nakashima, M., Morimitsu, Y., Samuta, T., Saiki, H., Characteristic flavor of Kansho-shochu (sweet potato spirit). *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1353-1357, 1990.
- Patel, K.J., Ingalthalli, R.S., *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link - An Important Medicinal Mushroom. *J. Pharmacog. Phytochem.*, 2, 315-319 (2013).

- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A. Nunez, A., Butrym, E., Richards, M.P., Wang, C., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C., Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 101, 17593-17598 (2004).
- Mizutani, H., Mechanism of DNA damage and apoptosis induced by anticancer drugs through generation of reactive oxygen species. *Pharm. Soci. J.*, 127, 1837-1842 (2007).
- Russell, R., Paterson, M., *Cordyceps* - A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory ? *Phytochem.*, 69, 1469-1495 (2008).
- 境田 博至, 中原 徳昭, 渡司 奈穂子, 甲斐 孝憲, 中島 美幸, 榊原 陽一, 西山 和夫, 福田 亘博, 水光 正仁, 蕎麦焼酎の特徴香および穀物本格焼酎の揮発成分分析, 日本食品科学工学会誌, 50, 555-562 (2003).
- 境田 博至, 甲斐 孝憲, 榊原 陽一, 水光 正仁, 蕎麦焼酎揮発性成分の抗変異原性と抗酸化作用, *AROMA RES.*, 19, 61-65 (2004).
- Sacco, R.L., Elkind, M., Boden-Albala, B., The protective effect of moderate alcohol consumption on ischemic stroke. *JAMA*, 281, 53-60 (1999).
- Sakao, K., Desineni, S., Hahm, E.R., Singh, S.V., Phenethyl Isothiocyanate Suppresses Inhibitor of^{Q1} Apoptosis Family protein Expression in Prostate Cancer Cells Incultrue and *In Vivo*. *Prostate.*, 72, 1104-1106 (2012).
- 関根 彰, 「世界のスピリッツ焼酎」, (技報堂出版, 東京), p 33-37, 2005.
- 神官シンレキウニンニ, 「ギルガメッシュ叙事詩」, 月本 昭男 (翻訳), 第10章 (岩波書店, 東京), 1996.
- 清水 大典, 「冬虫夏草図鑑」, (家の光協会, 東京), p 23-358 (1997).
- Stockley, C.S., Is it merely a myth that alcoholic beverages such as red wine can be cardioprotective? *J. Sci. Food Agric.*, 92, 1815-1821 (2012).

- Sumi, H., Naito, S., Yatagai, C., Maruyama, M., Anti-platelet aggregation activity observed in the first distillation fraction of Honkaku-Shochu. *Jpn. J. Alcohol & Drug Dependence*, 46, 297-301 (2011).
- Sumi, H., Yamaguchi, Y., Tokudome, S., Kajiwara, Y., Takashita, H., Maruyama, M., Shochu aroma Increases t-PA activity, and decreases platelet aggregation activity. *Jpn. J. Alcohol & Drug Dependence*, 47, 75-81 (2012).
- Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-Ard, J.J., Shrestha, B., Spatafora, J.W., Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud. Mycol.*, 57, 5-59 (2007).
- Suzuki, R., COX-2 and Cancer. *J. Kmazawa Med. Univ.*, 28, 11-16 (2003)
- 社団法人アルコール健康医学協会編, 「アルコールと健康に関する学術情報」, 1999～2012.
- 滝澤 博士, 1日2合, 「日本酒いきいき健康法」, (柏書房刊, 東京), p 91-112 (2002).
- Tan, A., Hou, D.X., Konczak, I., Tanigawa, S., Ramzan, I., Sze, D., Native Australian fruit polyphenols inhibit COX-2 and iNOS expression in LPS-activated murine macrophages. *Food Sci. Res. Int.*, 44, 2362-2367 (2011).
- 田中 潔, 晩酌のすすめ, 「アルコール長寿法」, (共立出版, 東京), p 35-155 (1985).
- 富川 泰敬, 平成23年「図解 酒税」, (一般財団法人大蔵財務協会, 東京), p 31-32 (2011).
- Tuli, H.S., Sandhu, S.S., Sharma, A.K., Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to cordycepin. *3Biotech.*, 4, 1-12 (2013).
- 辻井 正彦, 林 紀夫, COX-2阻害薬を用いた消化器癌予防, 大腸癌化学予防, 臨牀消化器内科, Vol.23, No.12, 1653~1659 (2008).
- Wang, X., Loram, L. C., Ramos, K., de Jesus, A. J., Thomas, J., Cheng, K., Reddy, A., Somogyi, A. A., Hutchinson, M. R., Watkins, L. R., Yin, H., Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109, 6325-6330 (2012).

- Wol, S. J., Yoo, J. C., Hyoun, J. k., Jae, Y.L., Byung, H. N., Jae, D. L., Sang, W. L., Su, Y. S., Min, H. J., The Anti-inflammatory Effects of Water Extract from *Cordyceps militaris* in Murine Macrophage. *Mycobiol.*, 38, 46-51 (2010).
- Won, S.Y., Park, E.H., Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J. Ethnopharmacol.*, 96, 555-561 (2005).
- Yahagi, N., Illustrated catalogue of Japanese *Cordyceps* (Entomonogenous Fungi): The Yahagi collection of Japanese *Cordyceps* stored in the Tohoku University Museum. *Bull. Tohoku Univ. Museum*, 8, 29-89 (2008)
- Yamaguchi, Y., Kagota, S., Nakamura, K., Shinozuka, K., Kunitomo, M., Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Phytother. Res.*, 14, 647-649 (2000a).
- 山田 道之, 橋中 一也, 骨髓性白血病細胞HL-60の細胞分化と遺伝子発現の調節, 蛋白質核酸酵素, 36, 41-53 (1991).
- Yan, H., Zhu, D.J., Xu, D.B., Wu, J., Bian, X.Y., A study on *Cordyceps militaris* polysaccharide purification, composition and activity analysis. *Afric. J. Biotechnol.* 7, 4004-4009 (2008).
- Yan, Z.H., Yang, R.L., Jiang, Y., Yang, Z.J., Yang, J.R., Zhao, Q., Lu, Y., Induction of Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia HL60 Cells by Panaxynol and Panaxydol. *Molecules.* 16, 5561-5573 (2011).
- Yang, Z., Chi, S.Y., Zhang, C.H., Wu, A., Quantitative analysis of adenosine and cordycepin In cordyceps sinensis and its substitutes with LC/MS-MS. *CN. J. Chin. Materia Medica*, 32, 2018-2021 (2007).
- You, S., Nakanishi, E., Kuwata, H., Chen, J., Nakasone, Y., He, X., He, J., Liu, X., Zhang, S., Zhang, B., Hou, D.X., Inhibitory effects and molecular mechanisms of garlicorganosulfur compounds on the production of inflammatory mediators. *Mol. Nutr. Food Res.*, 57, 2049-2060 (2013).

- Yu, R., Wang, L., Zhang, H., Zhou, C., Zhao, Y., Isolation, purification and identification of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia*, 75, 662-666 (2004b).
- Yu, R.M., Yang, W., Song, L., Yan, C.Y., Zhang, Z., Zhao, Y., Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydr. Polym.*, 70, 430-436 (2007a).
- Zar, P.P.K., Sakao, K., Hashimoto, F., Moroshita, A., Fujii, M., Wada, K., Hou, D.X., Antioxidant and anti-inflammatory activities of loquat (*Eriobotrya japonica*) tea . *Functional Foods in Health and Disease*, 3, 447-461 (2013).
- Zhao, C.S., Yin, W.T., Wang, J.Y., Zhang, Y., Yu, H., Cooper, R., Smidt, C., Zhu, J.S., CordyMax Cs-4 improves glucose metabolism and Increases insulin sensitivity in normal rats. *J. Altern. Complement. Med.*, 8, 309-314 (2002).
- Zhu, L., Liang, Y., Lao, D., Zhang, T., Ito, Y., Preparative separation of high-purity cordycepin from *Cordyceps militaris* (L.) Link by high-speed countercurrent chromatography. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 37, 491-499 (2011).

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鹿児島大学大学院連合農学研究科・侯 徳興教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文の審査にあたって御指導、御鞭撻を頂きました鹿児島大学大学院連合農学研究科・高峯 和則教授、和田 浩二教授、橋本 文雄教授、屋 宏典教授に心から感謝の意を表します。

また、本研究を遂行する上で御指導、御鞭撻をいただきました鹿児島大学大学院連合農学研究科・坂尾 こずえ助教、吉崎 由美子助教に深く感謝いたします。本研究を進める上で御協力をしていただきました鹿児島大学農学部生物資源化学科食品分子機能研究室・久永 絢美氏、矢野 敏史氏、小野 友愛氏、廣 眞梨子氏及び研究室の皆様にも心より感謝いたします。

また、本研究を行うにあたり、御助言、御支援をいただきました鹿児島女子短期大学・吉元 誠教授、九州沖縄農業研究センター・倉田 理恵氏に深く感謝の意を表します。化学構造を解析するにあたり、御支援、御協力をいただきました島津製作所グローバルアプリケーション開発センター・高橋 忠裕氏、荒川 清美氏に深く感謝いたします。

最後に、本論文を完成させるにあたり、御指導、御支援、御協力をいただきました霧島酒造株式会社・取締役専務の江夏 拓三氏、酒質開発本部の高瀬 良和氏、奥野 博紀氏、岩井 謙一氏、河野 邦晃氏、企画室的那須 一樹氏及び研究開発部の皆様に対しましても、心から御礼を申し上げます。