

発酵生薬の新規機能性とその関与成分の
探索研究

2021

位上 健太郎

本文中、以下の略語および略号を用いた。

AGLHW	autodigested <i>Ganoderma ligzhi</i> hot water extract
AGLPS	autodigested <i>Ganoderma ligzhi</i> polysaccharide fraction
ALT	alanine transaminase
APAP	acetaminophen
AST	aspartate aminotransferase
cDNA	complementary DNA
CHCl ₃	chloroform
DNA	deoxyribonucleic acid
DNFB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzene
DNP	dinitrophenol
DNP-HAS	dinitrophenol-human serum albumin
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EtOAc	ethyl acetate
EI-MS	electron ionization mass spectrometry
FG	fermented ginseng
FRG	fermented red ginseng
Glc	glucose
GH	glycoside hydrolase
GLHW	<i>Ganoderma ligzhi</i> hot water extract
GLPS	<i>Ganoderma ligzhi</i> polysaccharide fraction
GPC	gel permeation chromatography
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	high performance liquid chromatography
HRESIMS	high resolution electrospray ionization mass spectrometry
HSQC	heteronuclear single-quantum correlation
IgE	immunoglobulin E
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MeOH	methanol
NAC	<i>N</i> -acetyl cysteine
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzoquinone-imine
NMR	nuclear magnetic resonance
PI3K	phosphoinositide 3 kinase
PPAR	peroxisome proliferator activated receptors
QOL	quality of life
tR	retention time
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
TLC	thin layer chromatography
TNF- α	tumor necrosis factor α

発酵生薬の新規機能性とその関与成分の探索研究

目次	2
緒言	5
第1章 生薬と発酵について	
第1節 生薬の修治と発酵	6
第2節 生薬成分と腸内細菌	8
第3節 真菌類と自己消化	9
第2章 発酵人参のアセトアミノフェン誘導肝障害に対する抑制効果とその関与成分の探索	
第1節 序論	
第1項 人参と紅参について	11
第2項 ジンセノサイドの腸内細菌による代謝	12
第3項 アセトアミノフェンと肝障害	13
第4項 乳酸菌 <i>Lactobacillus paracasei</i> A221 株による発酵	14
第2節 アセトアミノフェン誘導肝障害モデルラットに及ぼす発酵人参及び発酵紅参の影響	
第1項 発酵人参及び発酵紅参のジンセノサイド類とその代謝物	15
第2項 生化学的及び病理組織学的検査による発酵人参及び発酵紅参の肝障害抑制活性評価	15
第3項 DNA マイクロアレイによる発酵人参投与ラット肝臓中の遺伝子発現解析	17
第3節 肝細胞におけるコンパウンド K の抗炎症活性	20

第4節	PPAR α アゴニスト活性成分の探索	21
第5節	化合物1の同定	24
第6節	化合物2-5の同定	25
第7節	化合物1-5のPPAR α アゴニスト活性	26
第8節	化合物1のPPAR γ アゴニスト活性	28
	小括	29
第3章 発酵霊芝のI型アレルギーに対する抑制効果とその関与成分の探索		
第1節	序論	
第1項	霊芝について	30
第2項	β -グルカンとアレルギー	31
第3項	霊芝の酵素とその利用	32
第2節	IgE依存型アレルギー性皮膚炎モデルマウスに対する発酵霊芝及び霊芝の影響	
第1項	発酵霊芝及び霊芝の成分組成	33
第2項	耳介厚及び血清中IgE量による発酵霊芝及び霊芝のアレルギー抑制活性評価	33
第3項	DNAマイクロアレイによる発酵霊芝投与マウス耳介中の遺伝子発現解析	35
第3節	RBL2H3細胞を用いた発酵霊芝及び霊芝エキスの脱顆粒抑制活性	36
第4節	脱顆粒抑制活性成分の探索	37

第 5 節 Fr. 3 の構造解析	40
第 6 節 脱顆粒抑制活性の作用機序解析	43
小括	46
結語	48
謝辞	49
実験の部	50
参考文献	59

緒言

COVID-19 (Coronavirus disease 2019) によるパンデミックの長期化に伴い、2020 年の日本の出生数は過去最少となり、少子化と高齢化が加速している [1]。一方、2016 年の日本の健康寿命は、男性 72.14 年、女性 74.79 年であり、2010 年からそれぞれ 1.72 年、1.17 年延伸している。しかしながら、平均寿命との差が男性では 8.84 年、女性では 12.35 年あり、その差をできる限り小さくするための施策が求められている[2]。

健全な食生活が疾病予防に大きな影響を及ぼすとの考えから、生活習慣、特に食生活が見直され、アメリカ国立がん研究所 (NCI) によりがん予防効果が期待される化合物を含有する食品をピラミッド型に並べたデザイナーズフーズピラミッドが提案された[3]。これを機に、多糖、テルペノイド、ポリフェノール、アルカロイド、カロテノイドなどの成分が疾病予防に重要な役割を果たすことが注目され、日本においても食品の保健機能に関する研究が盛んに行われている。

一方、生薬は、植物、動物、微生物あるいは鉱物等を基原とする天然素材であり、薬用、食用を問わず人々の健康を支えている。生薬の機能性は、食品と同様にその成分に由来するため、その使用部位や加工方法など成分に影響を与える要因に対して知見が蓄積されている。

日本人は生活の中で微生物を巧みに利用してきた。酵母、麹菌、乳酸菌などの微生物は、資化するために高分子から低分子まで多様な化合物を代謝する。これらの微生物の資化性の違いを利用し、元の素材に対して保存性の向上、風味や味等の嗜好性の改良がなされた発酵食品が日本各地で数多く開発されている。また、発酵により生じたポリフェノール代謝物、ペプチド、あるいはポリアミン等の機能性に着目した研究が展開されている[4-6]。

上記の背景の下、著者は生薬にさらなる機能性を付与する手段として発酵に着目し、人參を乳酸菌にて発酵した発酵人參及び靈芝を自己消化した発酵靈芝についての機能性研究、並びにその関与成分の探索研究を行った。

第1章 生薬と発酵について

第1節 生薬の修治と発酵

生薬とは、人の健康に役立てる目的で、植物、動物、微生物あるいは鉱物等の天然素材を簡単に加工したものである。漢方処方では、これらの生薬を複数種組み合わせたものであり、生薬の組み合わせにより多様な薬効を示す。漢方薬の薬効は、臨床試験並びに非臨床試験により科学的エビデンスが蓄積されているが、薬効の作用機序の完全な解明には至っていない。その解明には、構成生薬の生物活性に対する理解が必要であり、生薬の生物活性に対応する成分の解明を目的とした研究が精力的に行われている。

生薬の一般的な加工方法として、使用部位の選別、洗浄、乾燥などが挙げられる。さらに、薬能の増強、改変や保存性の向上、毒性の低減などを目的として、湯通し、蒸す、加熱するなどの加工が行われる場合があり、このような加工を修治と呼ぶ。修治された生薬として、乾姜、熟地黄、紅参、加工附子等が知られている。

生姜は、*Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae) の根茎を乾燥した生薬であり、生薬の乾燥物に対して[6]-ジングロールを0.3%以上含むと、日本薬局方に規定されている[7]。一方、乾姜は同じ基原植物を、湯通し又は蒸してから乾燥したものであり、[6]-ショウガオールを0.10%以上含むと日本薬局方に規定されている[8]。生姜に含有される[6]-ジングロールは修治により脱水し、[6]-ショウガオールに変換される[9] (Figure 1.1)。生姜は穏やかに温めることで、発汗作用、健胃作用、鎮吐作用を示し、桂枝湯、小柴胡湯、半夏厚朴湯など多くの処方に配剤されている。一方、乾姜は冷えを改善する作用を目的として、大建中湯、人参湯、小青竜湯、半夏瀉心湯等に使用されている[10]。

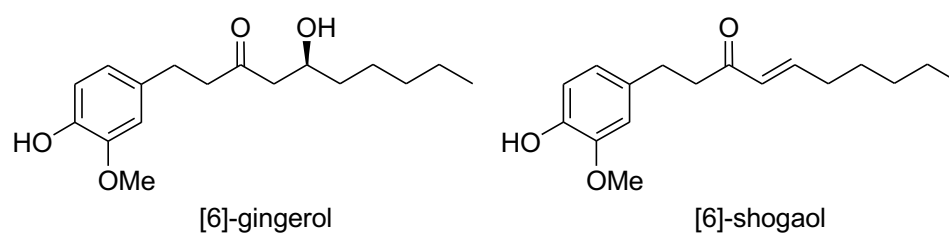


Figure 1.1. The structures of [6]-gingerol and [6]-shogaol.

八味地黄丸の構成生薬である地黄も、修治により薬能が変わる生薬として知られている。アカヤジオウ *Rehmannia glutinosa* Liboschitz var. *purpureo* Makino 又は *R. glutinosa* Liboschitz (Scrophulariaceae) の根を乾燥したものは乾地黄、蒸した後に乾燥したものは熟地黄として区別される[11]。乾地黄は止血、涼血、清熱を目的として、一方、熟地黄は補血や補腎を目的に利用される。熟地黄ではカタールポール、レーマグルチン A-D などのイリドイドが乾地黄に比べて著しく減少していることが確認されている[12] (Figure 1.2)。

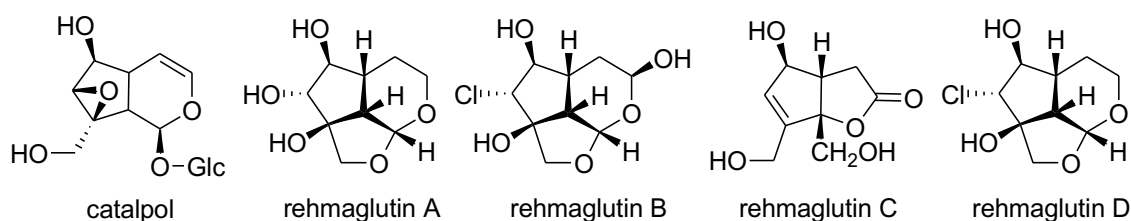


Figure 1.2. The structures of catalpol and rehma-glutinins A-D.

発酵による修治が施される生薬として神麴と淡豆鼓がある。神麴は、胃腸虚弱、頭痛、めまい等の症状に対して用いられる半夏白朮天麻湯に配合される生薬であり、薬用の麴である。その加工方法は、中国では、小麦に杏仁、赤小豆、青蒿、蒼耳、辣蓼の細末または液汁を混合し、水を加えて一定温度で発酵させ、小麦の表面に黄色の菌糸が長く伸びたときに取り出して乾燥させる[13]。日本では、米を蒸して酵母により発酵させたものを神麴としている[13,14]。神麴には酵母に加えて、乳酸菌、枯草菌など複数の微生物が共存しており、その菌叢の多様性が確認されている[15]。

淡豆鼓は、大豆の種子を発酵させたものであり、その薬能として、汗を発し、中を調べ、煩を除く作用があるとされ、消炎性健胃、消化、解熱、発汗薬として利用される[16]。風熱の表証に対する代表的な処方である銀翹散の構成生薬であり、発熱を発散し、消炎、解熱、鎮咳に働く。大豆に桑葉や青蒿などの煎液を吸収させてから、蒸して発酵させる製法が知られている[17]。

第2節 生薬成分と腸内細菌

生薬成分の中には、服用後、腸内細菌による代謝を受け薬効を生じるものがある。*Rheum palmatum* Linne 等の根茎を基原とする大黄に含まれるセンノシド A 及び B は、アンスロン二量体にグルコースが 2 分子結合した配糖体である。センノシド類は大黄の瀉下作用成分であり、日本薬局方にセンノシド A の含量が規定されている[18]。センノシド A 及び B の 2 分子のグルコースは、腸内の *Bifidobacterium* 属細菌の持つ β -グルコシダーゼによって加水分解された後、還元型補酵素であるリボフラビン等により非酵素的に還元され、10-10'位の炭素-炭素結合が開裂することによりレインアンスロンに変換される[19,20](Figure 1.3)。レインアンスロンに瀉下作用があることと、腸内細菌を殺菌した動物にセンノシドを投与しても瀉下作用がみられないことから、腸内細菌代謝物であるレインアンスロンが活性本体であることが確認されている[21,22]。最近、大黄と甘草を構成生薬とする大黄甘草湯において、甘草が *Bifidobacterium* 属細菌によるセンノシド A 代謝を促進すること、また、この瀉下効果が高脂肪食の摂取によって抑制されることが明らかにされている[23-25]。

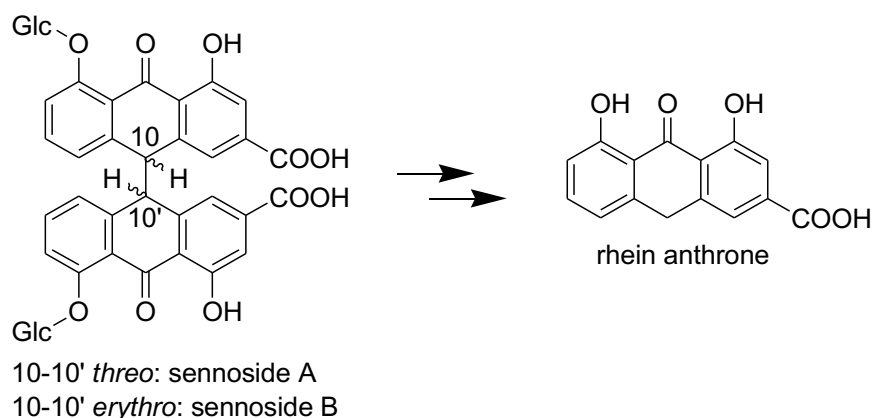


Figure 1.3. Rhein anthrone as a metabolite of sennosides A and B by intestinal bacteria.

Pueraria lobata Ohwi (Leguminosae)の根を基原とする葛根に含まれるイソフラボン C-配糖体であるプエラリンは、ヒト腸内細菌から分離された *Ruminococcus* 属及び *Dorea* 属と相同性の高い細菌 (GenBank accession No. EU377662)によってグルコースとダイゼインに分解されることが明らかにされている[26,27]。また、葛根に含まれるイソフラボン配糖体であるダイジンは、ダイズ *Glycine max* (L.)種子の成分としても知られ、腸内細菌によって代謝され、ダイゼインとなる[28,29]。ダイゼインは、*Slackia* 属や *Lactococcus* 属などの腸内細菌により、エストロゲン活性の高い(S)-エクオールに代謝される[27,30] (Figure 1.4)。腸内細菌叢は人種や個人間における差が大きく、日本人では 50%、欧米人では 70%の人がエクオール非生産

者である[29]。

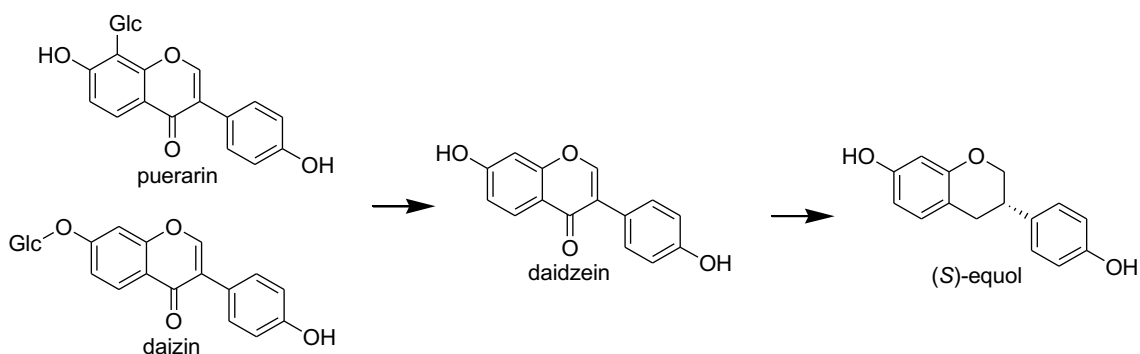


Figure 1.4. The metabolites of isoflavones by intestinal bacteria.

このように、生薬成分、特に配糖体の代謝は腸内細菌と深く関わっており、その薬効が腸内細菌叢に影響されることが明らかになりつつある。

第3節 真菌類と自己消化

1900年頃から醸造学の分野を中心に酵母の自己消化について研究が行われている[31]。自己消化とは、真菌類や細菌類の生育が停止した後、その構成成分が自身の酵素によって分解される現象である。グルカナーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼなどの酵素の働きにより、菌体成分からオリゴ糖、アミノ酸、核酸が生じるため、醸造物の風味や味等の品質に影響を与える[32]。酵母の自己消化には約1日を要し、先にヌクレアーゼ、後にプロテアーゼによる菌体成分の代謝産物が菌体外に溶出する[33]。麹菌 *Aspergillus oryzae* は、グルコース非存在、嫌気性条件下において自己消化を始めるが、2%グルコースの添加によって自己消化は阻害される。また、自己消化によって、90~100%の核酸、75%のアミノ酸、20%の糖類が菌体から溶出されることが確認されている[34]。*Aspergillus nidulans* の自己消化には、菌体外に産生する(1,3)- β -グルカナーゼやキチナーゼが関わる[35,36]。発酵による修治が行われる生薬の神麴や淡豆鼓においても、発酵過程で産生される真菌類の代謝産物に加え、それらの自己消化により生じる代謝産物が含まれていることが想定される。

真菌類に属する担子菌類は、その多くが「きのこ」と呼ばれる子実体を形成する。担子菌類においても、それらのセルラーゼ、 β -グルカナーゼ、キチナーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼなどの加水分解酵素と自己消化に関する研究が進められている[37-41]。ウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* は、自己消化の過程でキチナーゼ活性が高まることが示され

ており、glycoside hydrolase (GH)ファミリーである GH18 の発現の上昇が確認されている [42,43]。また、ウシグソヒトヨタケから自己消化に関わる 3 種類の(1,3)- β -グルカナーゼが同定されている[44]。シイタケ *Lentinula edodes* は、収穫後に GH30 である LePus30A の発現が上昇し、細胞壁の(1 \rightarrow 6)- β -D-グルカンが自己消化することが示されている[45]。自己消化は、シイタケの機能性多糖である(1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンの含量を減少させ、その機能性に影響を及ぼすことが指摘されている[46]。このように、自己消化を利用することにより、担子菌類の β -グルカンやキチンなどの構成成分を代謝することが可能である。自己消化を広義の発酵ととらえ、積極的に利用することで、生薬に分類される担子菌類の新たな機能性を有する素材開発が期待できる。

以上の背景の下、著者は発酵に着目し、人参を乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* A221 株にて発酵した発酵人参及び霊芝を自己消化した発酵霊芝についての機能性研究、並びにその関与成分の探索研究を行った。

第2章 発酵人参のアセトアミノフェン誘導肝障害に対する抑制効果とその関与成分の探索

第1節 序論

第1項 人参と紅参について

人参と紅参は、いずれもオタネニンジン *Panax ginseng* C.A. Meyer の根を基原とする生薬である。日本薬局方では、人参は「オタネニンジンの細根を除いた根又はこれを軽く湯通ししたもの」、紅参は「オタネニンジンの根を蒸したものである」と規定されている[47,48]。中国において明代のころ、オタネニンジンの根を腐らせずに早く乾燥させるため、周皮をつけたまま蒸す方法が考案された。この、長期保存を目的にオタネニンジンの根を修治したものが紅参である。その後の研究により、修治による成分の変化が確認され、人参と紅参の薬効の違いについても研究が活発に進められている[49,50]。人参と紅参の薬効は、その成分である、サポニン、糖質、ポリアセチレンアルコール等に由来すると考えられる。人参と紅参のサポニンはジンセノサイドと呼ばれるダマラン型トリテルペンの配糖体である。ジンセノサイド Rb₁ はプロトパナキサジオールを、ジンセノサイド Rg₁ はプロトパナキサトリオールをアグリコンとする代表的なジンセノサイドであり、両者は、人参と紅参の指標成分として日本薬局方で含量が規定されている。他のジンセノサイドとして、ジンセノサイド Rb₁ の 20 位の末端グルコースがアラビノピラノースとなったジンセノサイド Rb₂、アラビノフラノースであるジンセノサイド Rc、末端グルコースのないジンセノサイド Rd など糖鎖の構造が異なる化合物が多数知られている (Figure 2.1)。

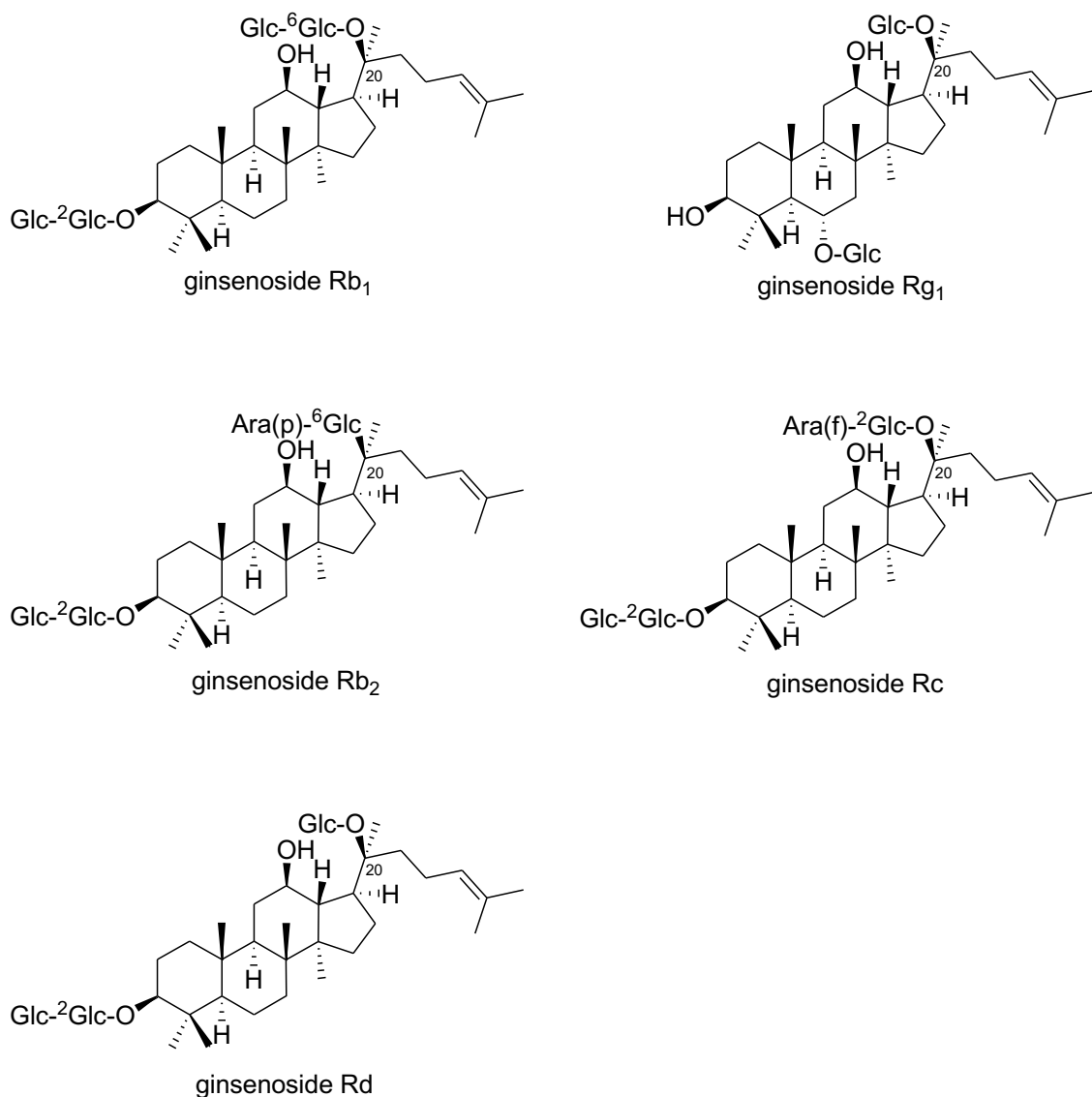


Figure 2.1. The structures of ginsenosides Rb₁, Rg₁, Rb₂, Rc, and Rd from the roots of *Panax ginseng*.

第2項 ジンセノサイドの腸内細菌による代謝

ジンセノサイド類は腸内細菌によって代謝され、脱グリコシル化されることによるバイオアベイラビリティの向上とその代謝物の種々の生物活性が報告されている[51]。コンパウンド K は、ジンセノサイド Rb₁ から 20 位に直接結合するグルコース以外の糖が脱グリコシル化された代謝産物であり、抗炎症[52]、抗腫瘍[53]、抗糖尿病[54]、神経保護[55]など多様な活性を示すことが報告されている(Figure 2.2)。一方で、腸内細菌叢の違いにより、腸内におけるコンパウンド K の産生率には個人差があり、個人間の人参の薬理効果の違いに関

与していると考えられている[56,57]。そのため、予めオタネニンジン(オタネニンジン)を微生物や酵素を用いて発酵することによりコンパウンド K を含有した発酵人参の開発と活用が広がっている。

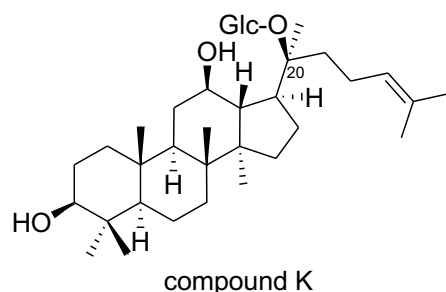


Figure 2.2. The structure of compound K contained in fermented ginseng.

第3項 アセトアミノフェンと肝障害

アセトアミノフェン(paracetamol, APAP)は、最も汎用される鎮痛剤であり、一般用医薬品として広く使用されているが、その過剰摂取は薬剤性肝障害を起こすことが知られている[58,59]。この障害は、肝臓中の薬物代謝酵素 CYP2E1 により APAP が酸化された *N*-アセチル-*p*-ベンゾキノニンイミン (NAPQI) によって引き起こされる。この NAPQI は、グルタチオン抱合により無毒化されるが (Figure 2.3)、NAPQI が過剰に存在するとグルタチオンが枯渇するため肝細胞に障害を与えられている[60]。そのため、グルタチオンの前駆体である *N*-アセチルシステイン(NAC) が APAP による肝障害の治療薬として利用されている。しかしながら、NAC 投与にもかかわらず、肝障害が継続する事例が報告されている[61,62]。

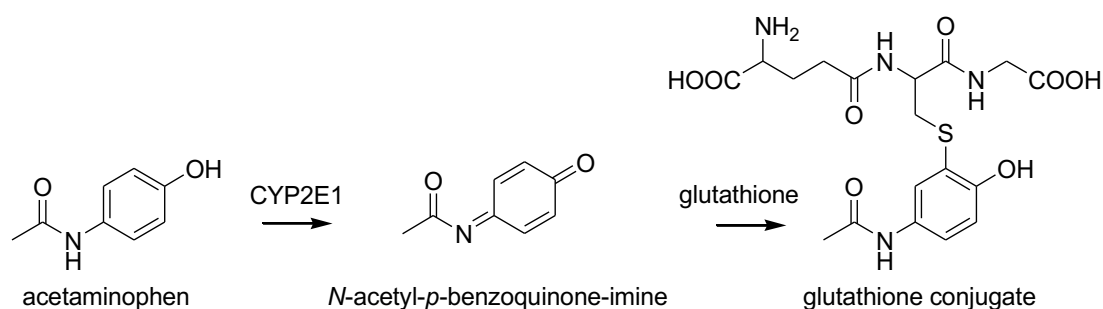


Figure 2.3. Metabolism of acetaminophen.

第4項 乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* A221 株による発酵

乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* A221 株は特異な *exo*-(1,2)- β -グルコシダーゼ活性を含む β -グルコシダーゼ活性を有する乳酸菌として、発酵食品から分離された乳酸菌であり、これまでにジンセノサイド Rb₁ の3位に結合する β -D-グルコシル-(1 \rightarrow 2)- β -D-グルコースを含め、20位に結合する末端グルコースを加水分解し、compound K を産生することが確認されている[63]。また、*L. paracasei* A221 株はアブラナ科植物であるケール *Brassica oleracea* var. *acephala* のケンフェロール配糖体の3位に結合する β -D-グルコシル-(1 \rightarrow 2)- β -D-グルコースを加水分解することにより、アグリコンであるケンフェロールの吸収性を向上させることが明らかにされている[64]。

本研究では、*L. paracasei* A221 株を用いて調製した発酵人参及び発酵紅参の機能性の探索として、APAP による肝障害に対する効果を評価した。

第2節 アセトアミノフェン誘導肝障害モデルラットに及ぼす発酵人参及び発酵紅参の影響

第1項 発酵人参及び発酵紅参のジンセノサイド類とその代謝物

オタネニンジンのヒゲ根を発酵した発酵人参 (FG) と紅参を発酵した発酵紅参 (FRG) について、ジンセノサイド Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Rg₁、及びその代謝産物であるコンパウンド K、アグリコンであるプロトパナキサトリオールを HPLC を用いて定量した。発酵人参は、ジンセノサイド Rb₁ 含有量が 0.5 mg/g であったのに対し、コンパウンド K は 7.1 mg/g 含まれていた (Table 2.1)。これまでに、*L. paracasei* A221 株により人参中のジンセノサイド Rb₁ がコンパウンド K に代謝されることが確認されており [65]、本研究に用いた発酵人参においてもコンパウンド K が含有されていることが確認された。発酵紅参は、コンパウンド K 含量が 1.2 mg/g であり、発酵人参と比較しコンパウンド K 含量が低いことが確認された。

Table 2.1. Contents (mg/g) of ginsenosides and their metabolites in FG and FRG.

	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	compound K	Rg ₁	protopanaxatriol
FG	0.5±0.10	1.2±0.15	6.2±0.51	1.4±0.34	7.1±0.17	0.7±0.09	0.5±0.08
FRG	0.1±0.01	0.3±0.02	2.6±0.17	0.4±0.06	1.2±0.05	1.3±0.14	0.3±0.04

第2項 生化学的及び病理組織学的検査による発酵人参及び発酵紅参の肝障害抑制活性評価

9週齢の雄性ラット (Wistar) を各群 12匹となるよう 5群に分け、発酵人参、発酵紅参各 50 mg/kg を 8日間強制経口投与した。陽性対照として、肝臓保護効果と抗酸化活性が知られるシリビンを 56.9 % 含有するシリマリンエキス (SIL, アスク薬品株式会社 Lot. SIE031013-000) 100 mg/kg を同様に投与した。7日目に APAP 500 mg/kg を尾静脈投与し、24時間後に血液生化学検査 (AST, ALT) を評価した。

その結果、APAP 500 mg/kg の投与による AST と ALT の顕著な増加が確認され、肝障害の誘導が認められた。発酵人参の投与により、AST と ALT の増加は有意に抑制され、陽性対照であるシリマリンエキスと同程度の抑制作用であった。一方で、発酵紅参投与群では AST と ALT の増加を抑制する傾向がみられたが、有意差は得られなかった (Figure 2.4)。これら

の結果から、発酵人参に高い APAP 誘導肝障害抑制活性を確認した。

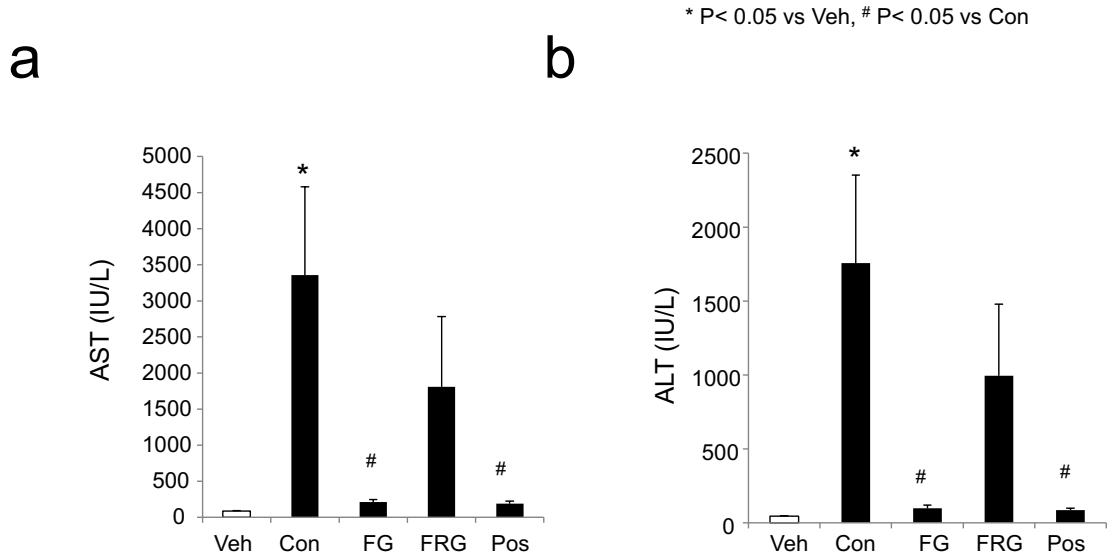


Figure 2.4. Effects of FG, FRG, and SIL on serum AST and ALT levels in APAP-induced liver injury. FG: 50 mg/kg of fermented ginseng, FRG: 50 mg/kg of fermented red ginseng, Veh: vehicle, Con: 500 mg/kg of acetaminophen, Pos: 100 mg/kg of silymarin ext.

さらに詳細に APAP 過剰投与下における発酵人参による保護効果を確認するため、APAP 投与から 48 時間後の肝臓の病理組織学的検査を行った。Vehicle 群と比較し、対照群では中心静脈周辺肝細胞の空胞変性が認められ、空胞変性スコアの上昇が確認された。発酵紅参群においても空胞変性が認められたのに対し、発酵人参群と、陽性対照群は空胞変性が認められなかった。本結果は血液生化学的検査結果と関連しており、発酵人参の肝障害抑制活性が病理組織学的にも確認された (Figure 2.5)。

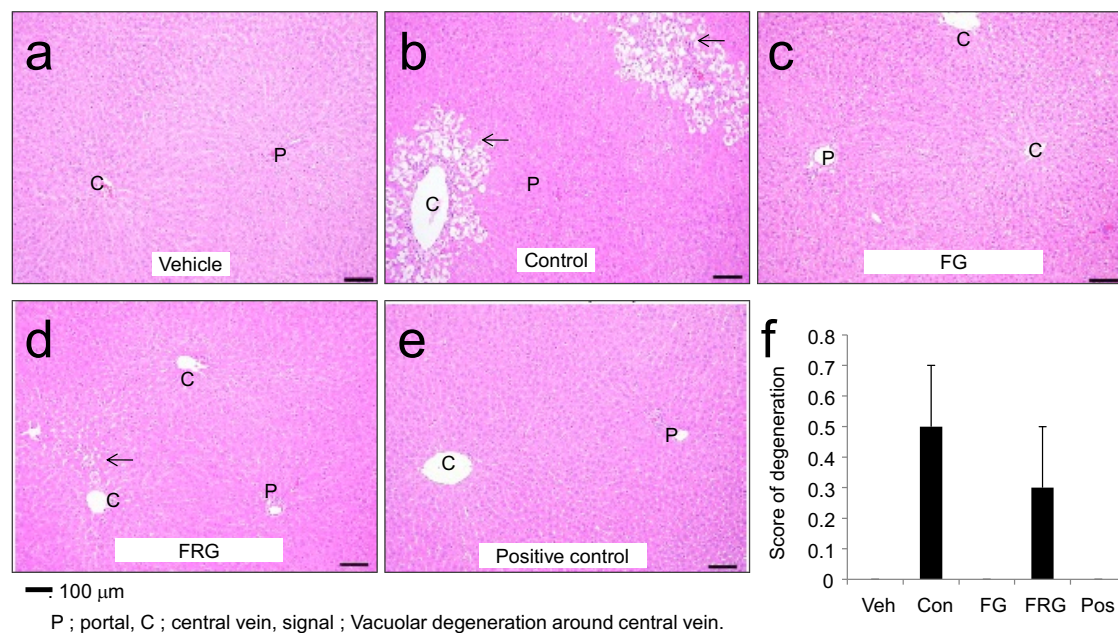


Figure 2.5. Effects of FG, FRG, and SIL on histopathology in APAP-induced liver injury. (a) Liver sections with a vehicle treatment (b) APAP (c) FG pre-treatment (d) FRG pre-treatment (e) SIL pre-treatment (f) Score of degeneration of liver section quantified with following criteria, 0: no vacuolization, 1: localized abdominal pain and mild degree of vacuolization, 2: moderate vacuolization, 3: diffused vacuolization in broad area.

第3項 DNA マイクロアレイによる発酵人参投与ラット肝臓中の遺伝子発現解析

Vehicle 群、対照群、発酵人参群について、APAP 投与から 24 時間後の肝臓を採取し、DNA マイクロアレイを用いて肝臓中の遺伝子発現変化を網羅的に解析した。Vehicle 群と比較して発現が上昇した遺伝子には、炎症関連因子として肝臓の繊維化に関わる *A2m* [66]、c-Jun N-terminal kinase (JNK) シグナル因子である *Jun* とその下流因子である *Atf3* [67]が含まれていた。また、抗酸化物質グルタチオンの合成に関わる *Gstp1*、*Gsta1*、及び *Gstm1* [68]や、内在性酸化制御システム Nrf2 / keap1 の下流に位置する *Akr7a3* [69]も発現の上昇が認められた (Table 2.2)。これらの上昇は、発酵人参の投与により抑制されており、発酵人参が JNK シグナルを介して抗炎症活性を示すことが示唆された。

Table 2.2. The genes up-regulated by APAP-administration and the alterations together with FG pretreatment (Log ratio).

accession no.	gene name	<i>symbol</i>	Control / Vehicle	FG / Vehicle
NM_012488	alpha-2-macroglobulin precursor	<i>A2m</i>	5.60	4.59
NM_013215	aldo-keto reductase family 7, member A3	<i>Akr7a3</i>	5.53	3.44
NM_053769	dual specificity protein phosphatase 1	<i>Dusp1</i>	3.16	1.15
NM_001014162	acyl-CoA synthetase medium- chain family member 5	<i>Acsm5</i>	3.10	1.73
NM_012577	glutathione S-transferase pi 1	<i>Gstp1</i>	3.09	0.54
NM_001034090	epoxide hydrolase 1	<i>Ephx1</i>	2.83	1.17
NM_012623	ATP-binding cassette, subfamily B member 1B	<i>Abcb1b</i>	2.74	0.24
NM_021835	jun proto-oncogene	<i>Jun</i>	2.72	0.32
NM_001010921	glutathione S-transferase alpha 5	<i>Gsta5</i>	2.63	1.40
NM_053469	hepcidin antimicrobial peptide	<i>Hamp</i>	2.49	1.93
NM_001106700	ISG15 ubiquitin-like modifier	<i>Isg15</i>	2.49	1.37
NM_022594	enoyl CoA hydratase 1, peroxisomal	<i>Ech1</i>	2.46	1.27
NM_001009628	kininogen 1-like 1	<i>Knng1</i>	2.46	2.95
NM_013144	insulin-like growth factor binding protein 1	<i>Igfbp1</i>	2.44	0.93
NM_017014	glutathione S-transferase mu 1	<i>Gstm1</i>	2.40	1.51
NM_145677	solute carrier family 25 member 25	<i>Slc25a25</i>	2.40	1.19
NM_012912	activating transcription factor 3	<i>Atf3</i>	2.35	0.78
NM_017306	enoyl-CoA delta isomerase 1	<i>Eci1</i>	2.35	1.13

APAP 投与により、Vehicle 群と比較して発現が顕著に低下した遺伝子が確認された。すなわち、*Stac3*、*Fads1*、*Scd1*、及び *Fmo1* は、APAP により発現が低下した因子であり、これらは全て Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPAR) のシグナル因子であった[70-73] (Table 2.3)。一方、発酵人参群ではこれらの因子の発現低下が抑制されていたため、発酵人参中に PPAR アゴニストの存在が示唆された。

Table 2.3. The down-regulated genes by APAP-administration and altered by FG pretreatment. (Log ratio)

accession no.	gene name	symbol	Control / Vehicle	FG / Vehicle
NM_001130558	SH3 and cysteine rich domain 3	<i>Stac3</i>	-3.95	-0.68
NM_030850	Betaine-homocysteine S- methyltransferase 1	<i>Bhmt1</i>	-3.53	-1.38
NM_019292	Carbonic anhydrase 3	<i>Ca3</i>	-2.74	-1.87
NM_053445	Fatty acid desaturase 1	<i>Fads1</i>	-2.67	-1.51
NM_139192	Acyl-CoA desaturase 1	<i>Scd1</i>	-2.59	-1.17
NM_012792	Hepatic flavin containing monooxygenase 1	<i>Fmo1</i>	-2.39	-1.55

第3節 肝細胞におけるコンパウンド K の抗炎症活性

DNA マイクロアレイ解析により、発酵人参に JNK シグナルを介した抗炎症活性成分が含まれることが示唆された。発酵人参中のコンパウンド K 含量は 7.1 mg/g であり、発酵紅参 1.2 mg/g と比較して約 6 倍高いことから、コンパウンド K が抗炎症作用を発揮し、APAP による肝障害を改善したと考えられた。そこで、ヒト肝癌細胞株 HepG2 を用いて、JNK リン酸化に及ぼすコンパウンド K の影響を評価した。

TNF- α 100 ng/mL の処理により、50 kDa 付近に検出された JNK の発現に影響は見られなかったが、リン酸化 JNK の増加が認められ、JNK シグナルの活性化が確認された。TNF- α 処理の 24 時間前に 2、6、及び 20 μ g/mL のコンパウンド K を処理したところ、リン酸化 JNK の増加が抑制された (Figure 2.6)。以上の結果から、コンパウンド K は JNK シグナルを抑制することにより、抗炎症活性を発揮することが示唆された。

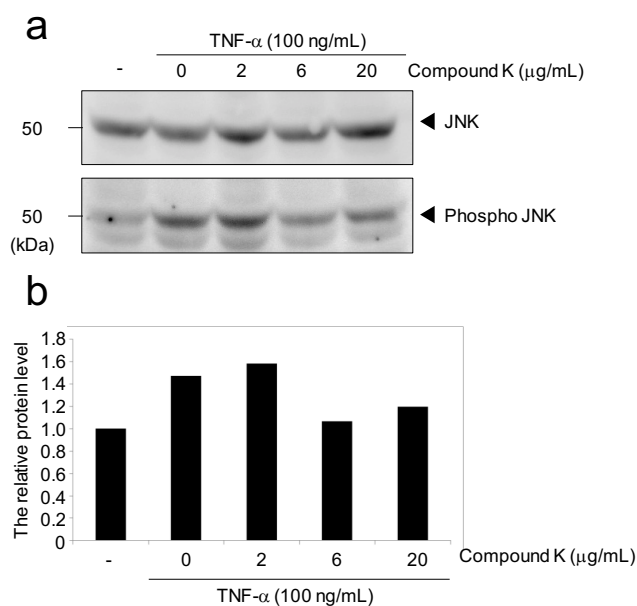


Figure 2.6. Effect of compound K against c-Jun N-terminal kinase phosphorylation in HepG2 cells. (a) Western blot signals developed by ECL. (b) Detected signals were quantified from their band intensities.

第4節 PPAR α アゴニスト活性成分の探索

DNA マイクロアレイ解析から、発酵人参に PPAR α アゴニストの存在が示唆されたため、ルシフェラーゼアッセイによる PPAR α の転写活性を指標として発酵人参中の PPAR α アゴニストの探索を行った。

発酵人参 (1 kg) を MeOH で抽出し、エキスを得た。これを CHCl₃、EtOAc、H₂O により順次分配した。CHCl₃ 及び EtOAc 可溶画分について、ルシフェラーゼアッセイにより PPAR α アゴニスト活性を評価した (Table 2.4)。

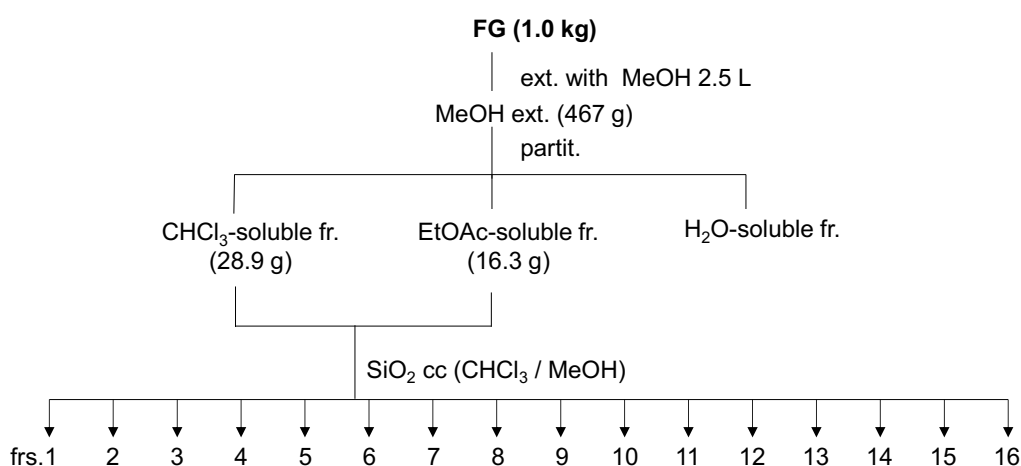
Table 2.4. Transcription activities of PPAR α in the treatment of CHCl₃ and EtOAc soluble fractions from FG.

fraction	luciferase activity ratio	
	5 μ g/mL	20 μ g/mL
vehicle	1.0 \pm 0.2	
CHCl ₃ -soluble fraction	1.7 \pm 0.2 ^a	-
EtOAc-soluble fraction	1.3 \pm 0.2	-

The ratio of luciferase activity was indicated by mean values \pm SD (n=3).

^a p<0.01 compared with vehicle.

その結果、CHCl₃ と EtOAc 可溶部に PPAR α アゴニスト活性が確認された。両フラクションは、TLC 分析において存在する化合物に大きな違いが認められなかったため混合した後、シリカゲルカラム(CHCl₃: MeOH = 1:0 \rightarrow 6:4) により分画し、fr. 1-16 を得た (Scheme 2.1)。得られた fr. 1-16 について、ルシフェラーゼアッセイにより PPAR α アゴニスト活性を評価した (Table 2.5)。



Scheme 2.1. Extraction and separation of fermented ginseng (FG).

Table 2.5. Transcription activities of PPAR α in the treatment of FG-fractions.

fraction	luciferase activity ratio	
	5 μ g/mL	20 μ g/mL
vehicle	1.0 \pm 0.1	
1	3.2 \pm 0.8 ^a	9.1 \pm 0.7 ^a
2	11.7 \pm 1.0 ^a	17.8 \pm 1.3 ^a
3	1.5 \pm 0.2	3.2 \pm 0.4 ^a
4	1.9 \pm 0.3 ^a	7.4 \pm 1.0 ^a
5	2.0 \pm 0.3 ^a	3.6 \pm 0.2 ^a
6	1.7 \pm 0.2 ^a	3.2 \pm 0.4 ^a
7	1.2 \pm 0.1	1.8 \pm 0.2 ^a
8	1.4 \pm 0.2	2.2 \pm 0.7
9	1.1 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2 ^a
10	1.2 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1 ^a
11	1.6 \pm 0.1 ^a	1.4 \pm 0.1 ^a
12	1.5 \pm 0.2 ^a	1.6 \pm 0.2
13	1.2 \pm 0.3	1.7 \pm 0.3
14	1.4 \pm 0.3	1.7 \pm 0.1 ^a
15	1.1 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1 ^a
16	1.4 \pm 0.1 ^a	0.6 \pm 0.3

The ratio of luciferase activity was indicated by mean values \pm SD (n=3).

^a p<0.01 compared with vehicle.

Fr. 2 の 5 $\mu\text{g/mL}$ 及び 20 $\mu\text{g/mL}$ に、それぞれ 11.7 倍及び 17.8 倍の強い PPAR α アゴニスト活性が確認された。Fr. 2 をアセトンと *n*-hexane の混液により結晶化を行い、化合物 **1** を得た。さらに、fr. 3 をシリカゲルカラム (*n*-hexane: EtOAc = 1:0 \rightarrow 6:4) により分離し、化合物 **2** 及び **3** を得た。Fr. 13 をシリカゲルカラム (CHCl₃: MeOH: H₂O = 20:1:0.3) により分離し、化合物 **4** 及び **5** を得た。

第5節 化合物1の同定

化合物 **1** は無色針状結晶として得られ、HRESIMS より、分子式を $C_{18}H_{35}O_3$ (m/z 299.2591 [M-H], $\Delta+0.5$ mmu) と帰属した。 1H 及び ^{13}C NMR スペクトルから、15 個のメチレンと共に、1 個のカルボキシ基、1 個のオキシメチン、1 個の末端メチル基のシグナルが観測された。以上のスペクトルデータより、本化合物をモノヒドロキシオクタデカン酸であると推定した。NMR の解析からは水酸基の位置が推定できなかったため、化合物 **1** 並びに 12-ヒドロキシオクタデカン酸 (標準品) をそれぞれメチル化し、得られたメチルエステルの EI-MS フラグメントを比較した。12-ヒドロキシオクタデカン酸メチルエステル (12-HOA-Me) の EI-MS において、12 位水酸基の α 開裂により生じた m/z 229 のフラグメントとともに、32 マスユニット少ない、 m/z 197 が検出された。一方、化合物 **1** のメチルエステルの EI-MS では、 m/z 201 とそれより 32 マスユニット少ない m/z 169 が検出された (Figure 2.7)。化合物 **1** のメチルエステルのフラグメントは、12-ヒドロキシオクタデカン酸メチルエステルのそれらより 28 マスユニットずつ小さいことから、水酸基は 10 位に結合していると推定した。以上のことから、化合物 **1** は 10-ヒドロキシオクタデカン酸 (10-HOA) であると帰属した (Figure 2.8)。なお、**1** の 10 位不斉炭素の立体配置は未帰属である。

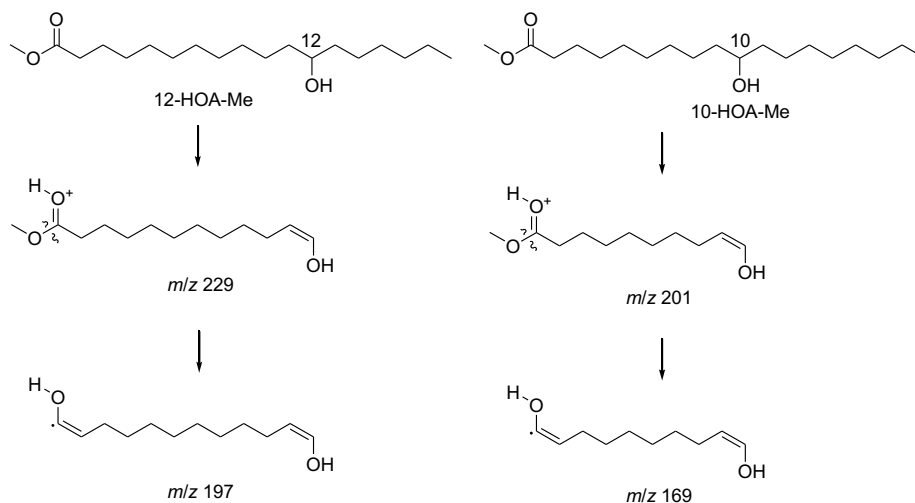


Figure 2.7. EI-MS fragmentations of 12-HOA-Me and 10-HOA-Me.

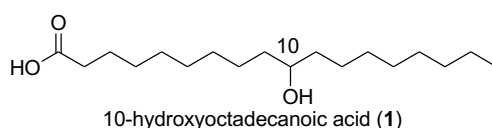


Figure 2.8. The structure of 10-hydroxyoctadecanoic acid (**1**).

第6節 化合物 2-5 の同定

化合物 2-5 は各種スペクトルデータを文献値と比較することで、20(*R*)-プロトパナキサジオール (2)、20(*S*)-プロトパナキサジオール (3)、20(*R*)-ジンセノサイド Rh1 (4)、20(*S*)-ジンセノサイド Rh1 (5) と同定した[74] (Figure 2.9)。

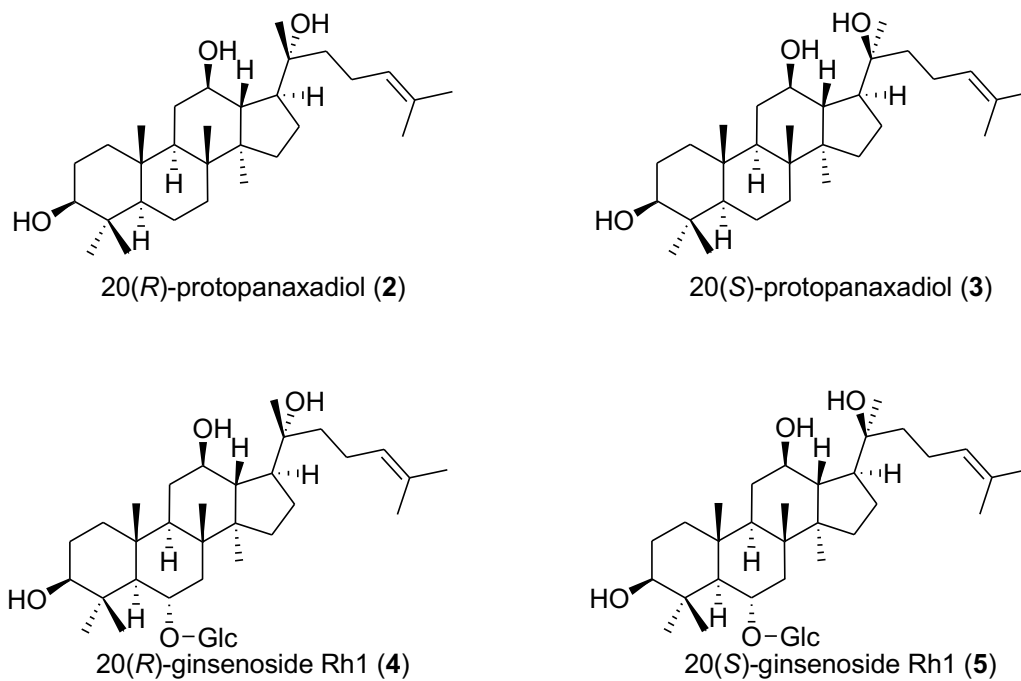


Figure 2.9. The structures of 20(*R*)-protopanaxadiol (2), 20(*S*)-protopanaxadiol (3), 20(*R*)-ginsenoside Rh1 (4), and 20(*S*)-ginsenoside Rh1 (5) isolated from fermented ginseng.

第7節 化合物 1-5 の PPAR α アゴニスト活性

化合物 1-5 及び PPAR α アゴニストである WY-14643 (Figure 2.10)について、ルシフェラーゼアッセイにより PPAR α アゴニスト活性を評価した。化合物 1 は 5 μ g/mL 及び 20 μ g/mL において、PPAR α アゴニストである WY-14643 10 μ M と同程度の活性を示した(Table 2.6)。一方で、化合物 2-5 は PPAR α アゴニスト活性を示さなかった。

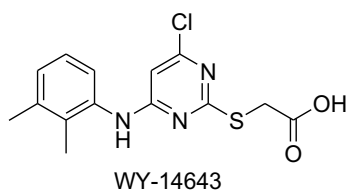


Figure 2.10. The structure of WY-14643.

Table 2.6. Transcription activities of PPAR α in the treatment of compounds 1-5.

compound	luciferase activity ratio	
	5 μ g/mL	20 μ g/mL
1	12.6 \pm 1.8 ^a	13.3 \pm 1.2 ^a
2	1.1 \pm 0.1	1.4 \pm 0.0 ^a
3	1.5 \pm 0.2	1.2 \pm 0.7
4	1.5 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2
5	1.5 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2
WY-14643 (10 μ M)	15.7 \pm 0.5 ^a	

The ratio of luciferase activity was indicated mean values \pm SD (n=3).

^a p<0.01 compared with vehicle.

PPAR α はアゴニストと結合すると共役転写因子である CBP: cAMP response element binding protein (CREB) binding protein と結合して複合体を形成する。CBP ペプチドを固相化したプレートを用いて、CBP- PPAR α -リガンド複合体の形成を定量することにより、化合物 1 と WY-14643 の活性強度を比較した。化合物 1 では 0.5 μ M 以上の濃度において、CBP- PPAR α -リガンド複合体の形成が認められたことから、化合物 1 は PPAR α アゴニストであることが示された。一方で、WY-14643 より化合物 1 の活性は低いことが示された (Figure 2.11)。

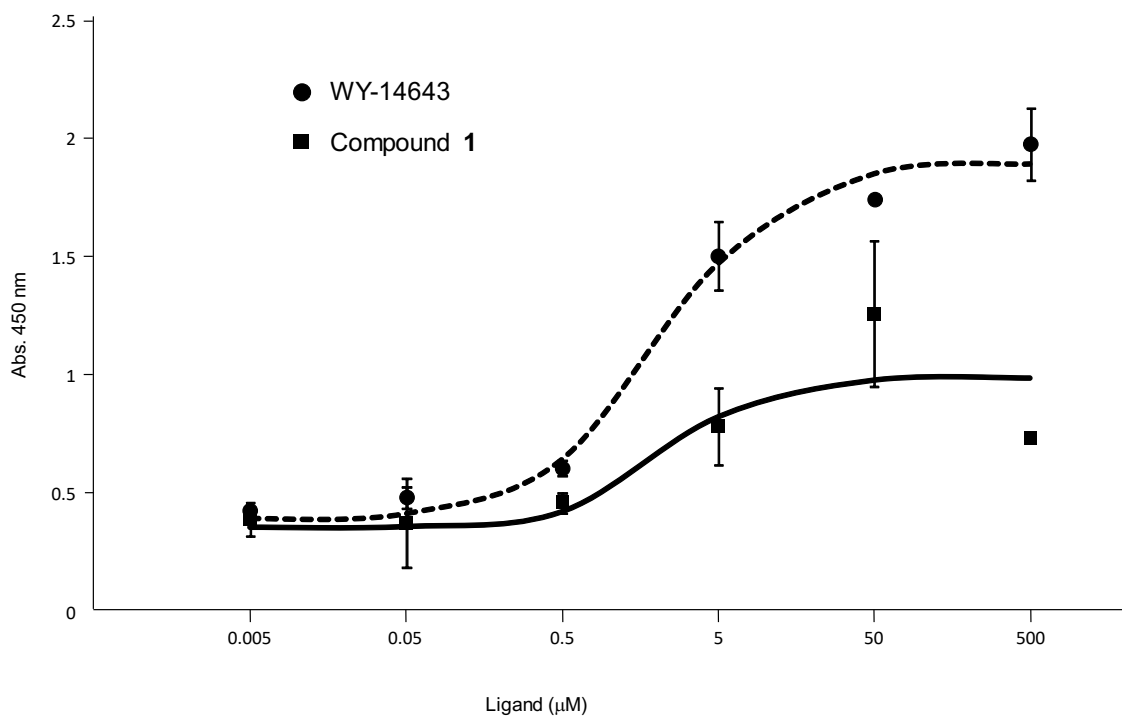


Figure 2.11. PPAR α agonist activity of compound 1 and WY-14643 measured by ELISA method.

小括

乳酸菌 *L. paracasei* A221 株により発酵した発酵人参は、ジンセノサイド Rb₁ の腸内細菌代謝物であるコンパウンド K を含有していることが確認されている。一方で、本研究により発酵紅参は発酵人参と比較して compound K 含量が低く、修治が発酵代謝物の含量に影響することが示唆された。発酵人参と発酵紅参について、APAP による肝障害に及ぼす影響を、生化学的及び病理組織学的検査により評価した結果、発酵人参に高い肝障害抑制活性を見出した。肝臓の DNA マイクロアレイ解析から、発酵人参に JNK シグナルを抑制する抗炎症活性成分が含まれていること、並びに PPAR アゴニスト成分の存在が示唆された。

発酵人参に豊富に含まれるコンパウンド K は、activator protein 1 (AP-1) の DNA 結合及び転写活性を阻害することにより、JNK シグナルを抑制することが知られている[75]。肝細胞におけるコンパウンド K の JNK シグナルへの影響についてウェスタンブロットにより評価した結果、コンパウンド K は TNF- α によって誘導される JNK リン酸化を抑制することが示された。本結果から、発酵人参による肝障害抑制活性に、コンパウンド K による抗炎症効果が関与していることが示唆された。

発酵人参中の PPAR α アゴニスト成分として化合物 **1** を単離し、10-ヒドロキシオクタデカン酸と帰属した。さらに、化合物 **1** に PPAR γ アゴニスト活性を見出した。10-ヒドロキシオクタデカン酸は *Lactobacillus plantarum* 等の乳酸菌によって、リノール酸から産生することが報告されており[76]、人参の乳酸菌発酵中に産生されたと考えられる。PPAR α アゴニストであるベザフィブラートは、慢性 C 型肝炎による肝機能異常を改善する効果が臨床試験で確認され、その作用機序として PPAR α の活性化による肝臓の酸化ストレス低減、炎症抑制の関与が示唆されている[77,78]。また、PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾンにはラットにおいて APAP 誘導肝障害を抑制することが知られている[79]。

本研究の結果から、発酵人参の新たな機能性として APAP 過剰摂取による肝障害を抑制する効果を明らかにした。その関与成分としてコンパウンド K 及び 10-ヒドロキシオクタデカン酸を見出した。発酵人参中の代謝産物であるコンパウンド K が肝細胞の JNK シグナルを抑制することにより抗炎症効果を発揮したこと、並びに 10-ヒドロキシオクタデカン酸が PPAR α 及び γ のデュアルアゴニスト活性を示したことにより、APAP 誘導肝障害が抑制されたと推察される。

第3章 発酵霊芝のI型アレルギーに対する抑制効果とその関与成分の探索

第1節 序論

第1項 霊芝について

霊芝は、サルノコシカケ科のマンネンタケ *Ganoderma lucidum* (LEYSS. ex FR.) KARST. 又はその近縁種 *G. lingzhi*、*G. atrum*、*G. sinensis*、*G. tsugae* 等の子実体を基原とする生薬である[80](Figure 3.1)。マンネンタケはアジア太平洋沿岸、北米、ヨーロッパ温帯、中央アフリカなど北半球の温帯に広く生息する担子菌類である[81]。中国最古の薬物書である神農本草経には、現在の霊芝と考えられる生薬が六種類（赤芝、黒芝、青芝、白芝、黄芝、紫芝）上品として収載されており、日本最古の本草書である本草和名（918年）にもこの六芝が収載されている[82,83]。

霊芝は硬く苦いため、その煎液が薬用に利用されてきた。霊芝の成分として、 β -グルカンやラノスタン型トリテルペンなどが知られており、それらの抗腫瘍、代謝異常抑制、免疫調節作用などが報告されている[84,85] (Figure 3.2)。

霊芝由来の水溶性(1 \rightarrow 6)、(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンに、Sarcoma180 細胞移植マウスに対する抗腫瘍活性が認められている[86,87]。また、水不溶性キシロ β -グルカン、マンノ β -グルカン、ヘテロ β -グルカンに抗腫瘍活性が見られており、(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンコア構造が抗腫瘍活性に重要であることが示されている[88]。

これまでに、霊芝から 300 種以上のトリテルペンが単離され、その活性について研究が進められている [89]。ガノデリン酸 A はラノスタン型トリテルペンであり、リンパ腫や髄膜種細胞のアポトーシス誘導、肝癌由来細胞に対するシスプラチン誘導細胞毒性の促進効果などを示すことが報告されている[90-93]。また、ガノデリン酸 A はラット経口投与後に CYP3A により代謝され、ガノデリン酸 C2 及び 7 β ,15 α -ジヒドロキシ-3,11,23-トリオキシラノスト-26-酸に変換されることが明らかにされており、ガノデリン酸 C2 は、ラットマスト細胞株からのヒスタミン産生抑制活性を示すことが報告されている[94,95]。



Figure 3.1. Cultivation of *Ganoderma ligzhi*.

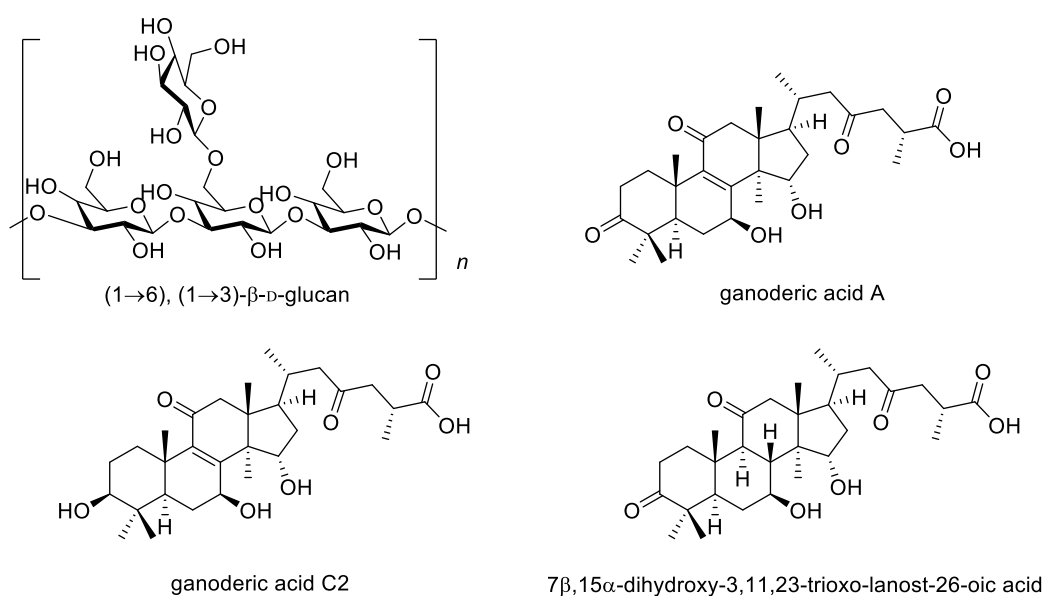


Figure 3.2. The structures of β-glucan and triterpenes in *Ganoderma lucidum* and metabolites of ganoderic acid A.

第2項 β-グルカンとアレルギー

アレルギーは炎症を誘導する免疫応答であり、痛みや痒みを伴うため、罹患者の QOL を低下させる[96,97]。アレルギーは I～IV型に分類され、I型アレルギーは、花粉症、喘息、アナフィラキシー、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎等に関わる[98]。日本では、1998年～2008年にかけて、アレルギー性鼻炎の患者数が増加しており、特にスギ花粉による花粉症の増加率と中年層の罹患率が高まっている[99]。I型アレルギーはイムノグロブリン E (IgE) を介して誘導される。ある抗原が侵入すると、Th2細胞がリンパ球 B細胞に抗原特異的な IgE を産生させる。マスト細胞や好塩基球などの免疫担当細胞膜上に発現する FcεRI に、この抗原特異的な IgE が結合することで、特異的な抗原に対する免疫反応が誘発されや

すい状態（感作）となる。再び侵入した抗原により、細胞上の2個以上のIgE抗体が架橋することにより、チロシンキナーゼ Syk のシグナルを介してヒスタミン、 β -ヘキソサミニダーゼ、サイトカイン、ケモカイン等の炎症性メディエーターが分泌（脱顆粒）され、アレルギー症状が引き起こされる。花粉、カビ、ほこりやダニなどに由来する β -グルカンは、アレルギー症状を引き起こす抗原となる[100-102]。また、スギ *Cryptomeria japonica* の花粉由来の(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンは、アレルギー症状を悪化させることが報告されている[103]。

一方で、酵母やヒラタケ由来の β -D-グルカンは喘息やアレルギー性鼻炎を軽減することが臨床試験で確認されている[104-106]。また、黒色真菌 *Aureobasidium pullulans* 由来の水溶性低分子(1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンは食物由来のアレルギー反応を抑制することが示されている[107]。このように、 β -グルカンはその構造によりアレルギーに対して異なる反応を示すことが報告されているが、 β -グルカンの構造と機能性の関係は明らかになっていない。

第3項 霊芝の酵素とその利用

近年、霊芝の成分である β -グルカンやトリテルペンの活性が注目され、その生合成に関連する酵素群に注目が集まっている。霊芝 *G. lucidum* 260125-1 株のゲノム情報が解明され、417種の糖質関連酵素群の存在が明らかとなった。 β -グルカンの合成酵素として、霊芝中に2種の(1,3)- β -グルカン合成酵素及び7種の β -グルカン合成関連酵素をコードする遺伝子群が見いだされている。一方で、 β -グルカンの分解酵素として、(1,3)- β -グルカナーゼのGH16、キチナーゼのGH18をコードする遺伝子が見出されている。これらの遺伝子群に由来する酵素は、霊芝の多糖成分を合成するとともに、消化にも役割を果たしていると考えられる[108]。また、霊芝の子実体から、タンパク質分解酵素として、ペプチダーゼG1ファミリーのグルタミン酸プロテアーゼ、 β -グルカンの分解酵素としてグルカナーゼ、マンノシダーゼ、*N*-アセチルヘキソサミニダーゼなどのGHが見いだされている。霊芝のペプチダーゼを利用し、自己消化によりアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを産生する試みがなされている[109]。

そこで、私たちは自己消化を広義の発酵ととらえ、霊芝の自己消化を積極的に用いることにより、機能性成分を産生することができると考え、自己消化した霊芝を発酵霊芝として調製し、その化学的及び生物学的特性について研究を進めている。これまでに、発酵霊芝は冷水中に溶出する β -グルカン量が高まること及び敗血症による腸炎を抑制することを確認している[110,111]。本研究では、霊芝と発酵霊芝のアレルギーに及ぼす影響について評価し、その関与成分の探索を行った。

第2節 IgE依存型アレルギー性皮膚炎モデルマウスに対する発酵霊芝及び霊芝の影響

第1項 発酵霊芝及び霊芝の成分組成

霊芝 *G. lingzhi* BMC9049 株の乾燥粉末を 10 % となるよう水に懸濁し、37°C、24 時間攪拌し、自己消化させた。自己消化物を 121°C で滅菌した後、噴霧乾燥により粉末化し、これを発酵霊芝とした。発酵霊芝(AGL) 及び霊芝(GL) について、その組成分析を行った。発酵霊芝、霊芝ともに総重量から水分量、タンパク質量、脂質量、及び灰分量の合計を差し引いた炭水化物量と酵素-重量法により測定した食物繊維量に差がないことから、ほとんどの炭水化物が食物繊維であることが明らかになった(Table 3.1)。

Table 3.1. Chemical compositions (%) of AGL and GL.

composition	AGL	GL
water	6.8	10.3
protein	15.3	14.8
fat	2.7	2.8
ash	2.1	1.8
carbohydrate	73.1	70.3
dietary fibers	70.8	71.5

第2項 耳介厚及び血清中 IgE 量による発酵霊芝及び霊芝のアレルギー抑制活性評価

6 週齢の雄性マウス (BALB/cA Jc1) を各群 6 匹となるよう 9 群に分け、発酵霊芝と霊芝を 30、100、及び 300 mg/kg にて 7 日間強制経口投与した。6 日目に抗ジニトロフェノール (DNP) -マウス IgE 抗体を尾静脈投与し、24 時間後に耳介に 1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン (DNFB) を塗布し、塗布前、及び塗布後 1、4、24、及び 48 時間後の耳介厚を測定した。陽性対照として、プレドニゾロン 5 mg/kg を DNFB 塗布の 2 時間前に経口投与した。Vehicle 群は、DNFB 塗布せずに耳介厚を測定した。

Vehicle 群に対し、DNFB を塗布した対照群は、耳介浮腫が確認された。発酵霊芝群は、DNFB 塗布後 1 時間から全投与量において浮腫の有意な抑制が認められた。一方で、霊芝群は、30 mg/kg では有意な浮腫の抑制は確認されず、100 及び 300 mg/kg において、有意な浮腫の抑制が確認された(Figure 3.1)。以上の結果から、発酵霊芝及び霊芝の経口摂取により、

IgE 依存型アレルギー性皮膚炎の抑制活性が認められ、霊芝と比較して発酵霊芝はより低濃度で活性を示すことが明らかになった。

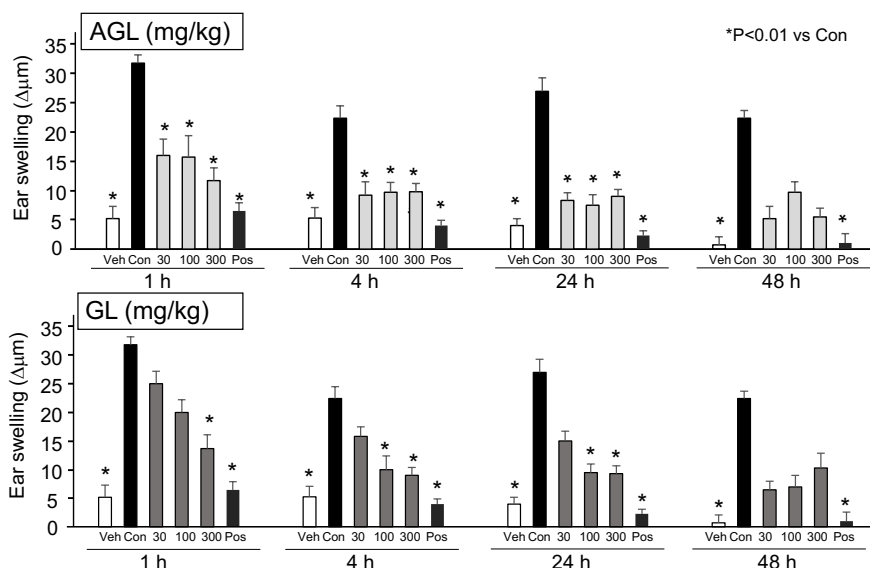


Figure 3.1. Effects of AGL and GL on the ear swelling caused by DNFB in BALB/c mice injected with anti-DNP mouse monoclonal IgE antibody. Veh: Vehicle, Con: control, AGL: 30, 100, 300 mg/kg of autodigested *Ganoderma lingzhi*, GL: 30, 100, 300 mg/kg of *Ganoderma lingzhi*, Pos: 5 mg/kg of prednisolone.

DNFB 塗布 48 時間後の血清を採取し、ELISA を用いて血清中の IgE を定量した。Vehicle 群と比較し、DNFB を塗布した対照群では血清中の IgE 量が有意に高値を示した。発酵霊芝及び霊芝群は IgE 量の抑制傾向が確認されたものの、有意な変化は発酵霊芝 100 mg/kg 群のみに認められた (Figure 3.2)。

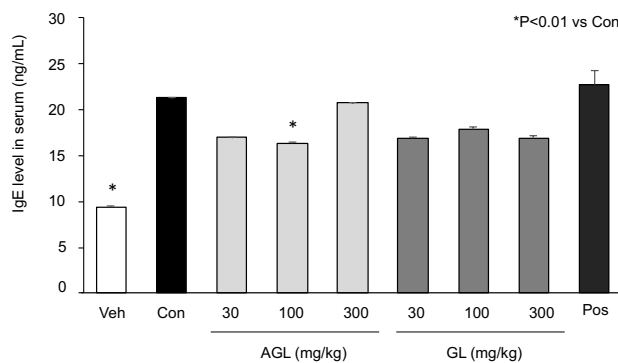


Figure 3.2. Effects of AGL and GL on the IgE level in serum of mice treated with anti-DNP mouse monoclonal IgE antibody. Veh: vehicle, Con: control, Pos: prednisolone.

第3項 DNA マイクロアレイによる発酵霊芝投与マウス耳介中の遺伝子発現解析

第2項で用いた Vehicle 群、対照群、発酵霊芝群、陽性対照群について、DNFB 塗布 48 時間後のマウス耳介を回収し、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を網羅的に解析した。Vehicle 群と比較し、DNFB 塗布により発現が上昇した遺伝子のうち、炎症関連因子として、*Ptgs2os2*、*Duos1*、*Muc20* [112-114]、血管透過性に関連する因子として、*Cdh10*、*Igf2bp1* が確認された[115,116]。これらの因子は、発酵霊芝 30、100、及び 300 mg/kg の投与により発現の上昇が抑制された(Table 3.2)。また、DNFB 塗布によりインターロイキン関連因子として、*Il9r* と *Il13ra2* の発現が、それぞれ 3.9 倍と 2.8 倍上昇した。これらの因子についても、発酵霊芝の投与により発現の上昇が抑制された。

Table 3.2. The genes up-regulated by DNFB treatment and alterations together with AGL and prednisolone pretreatment. (Log ratio)

No.	PrimaryAccession	GeneSymbol	control	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	Positive control
1	NM_001364427	<i>Nrg1</i>	7.7	3.5	2.8	5.6	4.0
3	NM_207150	<i>Olf1313</i>	6.1	-0.1	0.4	0.2	4.2
6	NR_110420	<i>Ptgs2os2</i>	5.8	1.9	1.6	0.0	3.6
8	NM_009865	<i>Cdh10</i>	5.7	1.7	2.5	1.2	4.0
9	ENSMUST00000193642.5	<i>Nphp3</i>	5.2	1.5	2.1	-1.0	2.3
10	NM_146916	<i>Olf1346</i>	5.2	0.4	0.4	1.2	3.2
14	NM_001033876	<i>Kcnk9</i>	5.1	-0.1	0.4	0.1	3.2
15	ENSMUST00000185750.1	<i>Relch</i>	5.1	-0.1	0.7	0.1	3.6
16	BC059021	<i>Pgr</i>	5.0	-0.1	0.4	0.4	3.3
19	ENSMUST00000153982.1	<i>Ccdc47</i>	4.9	0.5	2.9	0.1	3.9
24	ENSMUST00000110538.7	<i>Duoxa1</i>	4.7	0.6	0.4	0.1	3.3
29	NR_033638	<i>Olf29-ps1</i>	4.4	1.6	2.0	1.7	3.0
30	NM_001037712	<i>Kcnh6</i>	4.4	1.0	1.1	-0.2	2.8
31	XM_006515242	<i>Asx12</i>	4.4	-1.4	0.1	0.3	1.7
32	NM_009951	<i>Igf2bp1</i>	4.4	-1.4	-0.6	-0.2	2.2
35	NM_173189	<i>Mcp1</i>	4.2	0.7	1.5	1.3	0.2
36	NM_001145874	<i>Muc20</i>	4.2	-0.9	-0.3	-0.8	2.6
43	NM_001134458	<i>Il9r</i>	3.9	-0.5	0.0	-1.7	2.0
78	NM_001306059	<i>Il13ra2</i>	2.8	-0.1	0.4	0.1	4.7

第3節 RBL2H3細胞を用いた発酵霊芝及び霊芝エキスの脱顆粒抑制活性

IgE 依存型アレルギー性皮膚炎モデルマウスを用いた評価により、発酵霊芝は、霊芝より高いアレルギー抑制活性を有することが示唆された。そこで、発酵霊芝熱水抽出エキス (AGLHW) と霊芝熱水抽出エキス (GLHW) をそれぞれ調製し、各エキスのラットマスト細胞株 RBL2H3 細胞に対する脱顆粒抑制活性を評価した。抗 DNP-IgE で感作した RBL2H3 細胞に、抗原として DNP-HSA を添加すると、脱顆粒により β -ヘキソサミニダーゼが細胞培養培地中に検出された。陽性対照として用いたホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) 阻害剤であるウォルトマニン は、 $5 \mu\text{M}$ において脱顆粒を抑制した。AGLHW は、 0.1 mg/mL から濃度依存的に脱顆粒抑制活性を示した (Figure 3.3a)。GLHW は 1.0 mg/mL において、有意に脱顆粒抑制活性を示したが、 0.1 及び 0.3 mg/mL では脱顆粒抑制活性が認められなかった (Figure 3.3b)。本結果より、GLHW と AGLHW の両者に感作後の脱顆粒反応に対する抑制活性が認められ、発酵霊芝により高い活性が認められた。

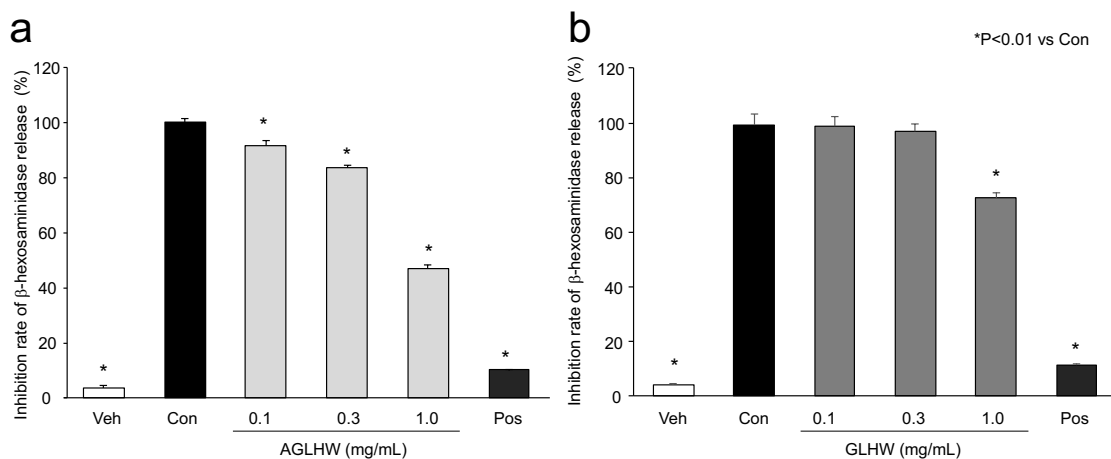


Figure 3.3. Effect of AGLHW and GLHW on the inhibition of β -hexosaminidase release in RBL2H3. (a) Inhibition rate of AGLHW. (b) Inhibition rate of GLHW. Veh: Vehicle, Con: control, Pos: $5 \mu\text{M}$ of wortmannin.

第4節 脱顆粒抑制活性成分の探索

発酵霊芝と霊芝の熱水抽出エキスに弱い脱顆粒抑制活性が見出されたことから、多糖に着目し、抗アレルギー成分の探索を行った。発酵霊芝及び霊芝を熱水抽出し、得られたエキスに終濃度 70%となるよう EtOH を加えて得た沈殿物をそれぞれ発酵霊芝多糖粗画分 (AGLPS)及び霊芝多糖粗画分 (GLPS) として得た。ゲルろ過カラムを用いた HPLC により、それぞれの多糖粗画分を分析した。分子量はプルラン標準品 (6.3、9.8、22.0、49.4、106.0、201.0、334.0、642.0 kDa) を同条件で分析し、標準品の保持時間 (tR) との比較により推定した。GLPS は 642 kDa 以上の高分子多糖を含有していることが確認された (Figure 3.4b)。一方で、AGLPS はその高分子多糖由来のピークは極めて小さく、6-22 kDa に相当する tR に大きなピークを示し、低分子化多糖と考えられる成分の集積が認められた (Figure 3.4a)。

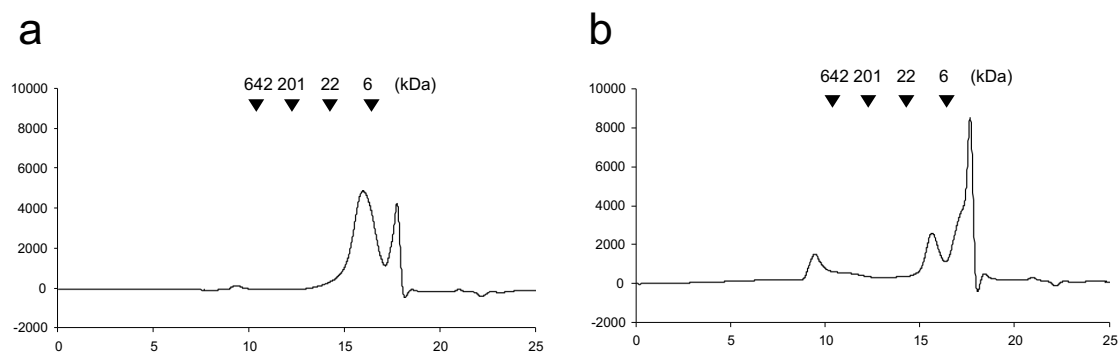


Figure 3.4. The GPC chromatograms of polysaccharides of AGL and GL. (a) AGLPS from AGL. (b) GLPS from GL.

ゲルろ過樹脂 ToyoPearl HW-55F を充填したカラムを用いて、発酵霊芝多糖粗画分より低分子多糖を、霊芝多糖粗画分より高分子多糖を分離した (Figures 3.5a and 3.5b)。発酵霊芝の低分子画分 (AGLPS-L) の組成は、糖 88%、タンパク質 9.1%であり、構成糖はグルコース 68.5%、ガラクトース 20.7%、マンノース 4.6%、フルクトース 3.7%、フコース 2.6%であった。一方で、霊芝の高分子画分 (GLPS-H) の組成は、糖 103%、タンパク質 0.5%を示し、構成糖はグルコース 94.9%、ガラクトース 3.6%、フルクトース 1.5%であった (Figure 3.5d)。

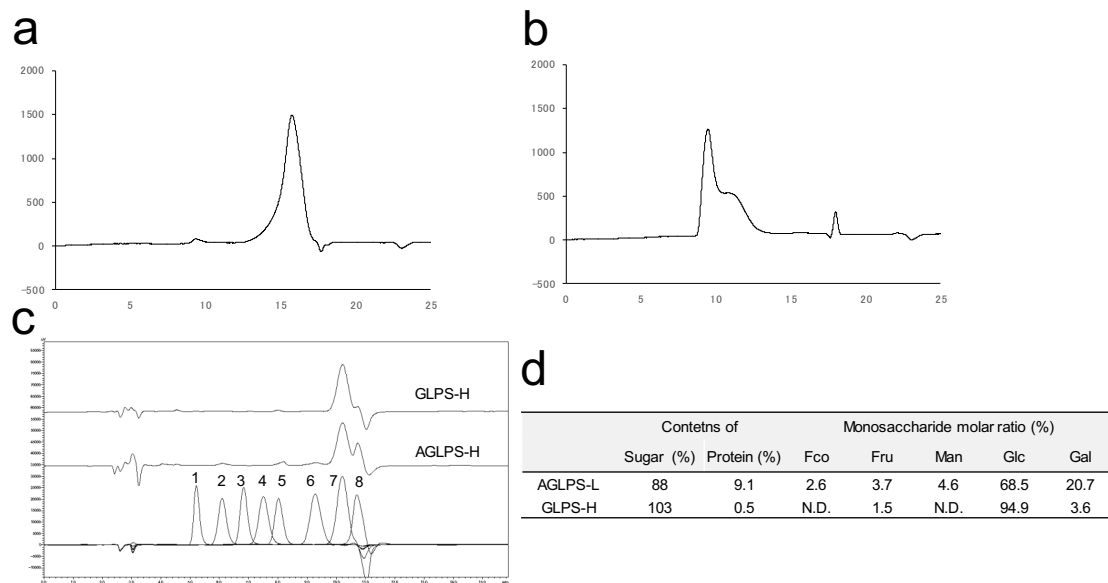


Figure 3.5. The GPC chromatograms and monosaccharide composition analyses of AGLPS-L and GLPS-H. (a) Chromatogram of AGLPS-L. (b) Chromatogram of GLPS-H. (c) Chromatogram of monosaccharide analysis. (d) Monosaccharide analysis data of AGLPS-L and GLPS-H. N.D.: not detected.

得られた AGLPS-L 及び GLPS-H について、RBL2H3 細胞に対する脱顆粒抑制活性を評価した。AGLPS-L は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において RBL2H3 細胞からの脱顆粒を有意に抑制した (Figure 3.6a)。一方で、GLPS-H は有意な変化を示さなかった (Figure 3.6b)。そこで、AGLPS-L について、さらに陰イオン交換樹脂を用いて分離を行った。

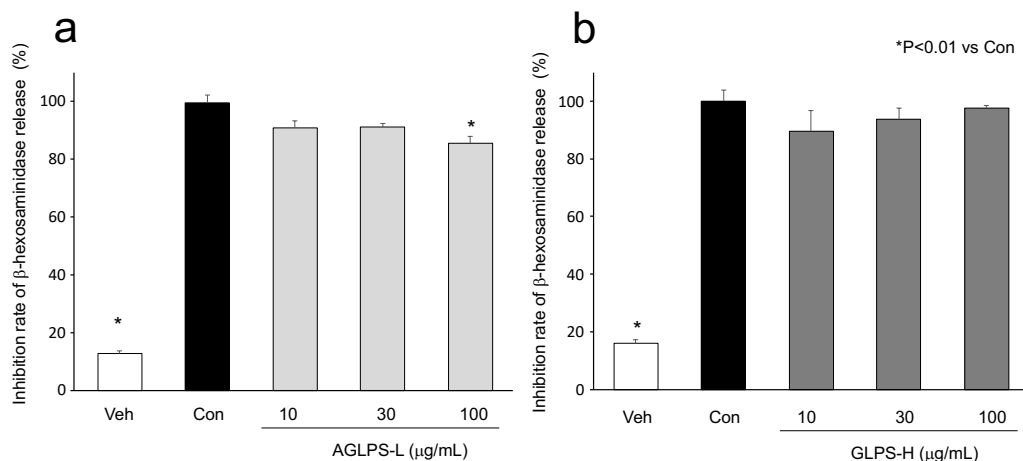


Figure 3.6. Effects of AGLPS-L and GLPS-H on the inhibition of β -hexosaminidase release from RBL2H3 cell. (a) Inhibition rate of AGLPS-L. (b) Inhibition rate of GLPS-H. Veh: Vehicle, Con: control.

AGLPS-L 100 mg を水に溶解し、HiTrap Q FF 陰イオン交換樹脂に吸着させ、洗浄した後、0.1、0.2、及び 0.5 M NaCl 水溶液を用いて順次溶出させ、fr. 1-4 を得た。得られた画分は透析膜にて脱塩した後、脱顆粒抑制活性を評価した。その結果、fr. 1 及び fr. 2 は脱顆粒抑制活性を示さなかった。一方で、fr. 3 の 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、fr. 4 の 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に有意な脱顆粒抑制活性が確認された (Figure 3.7)。この結果から、fr. 3 及び fr. 4 に脱顆粒抑制活性を有する成分の存在が示唆された。

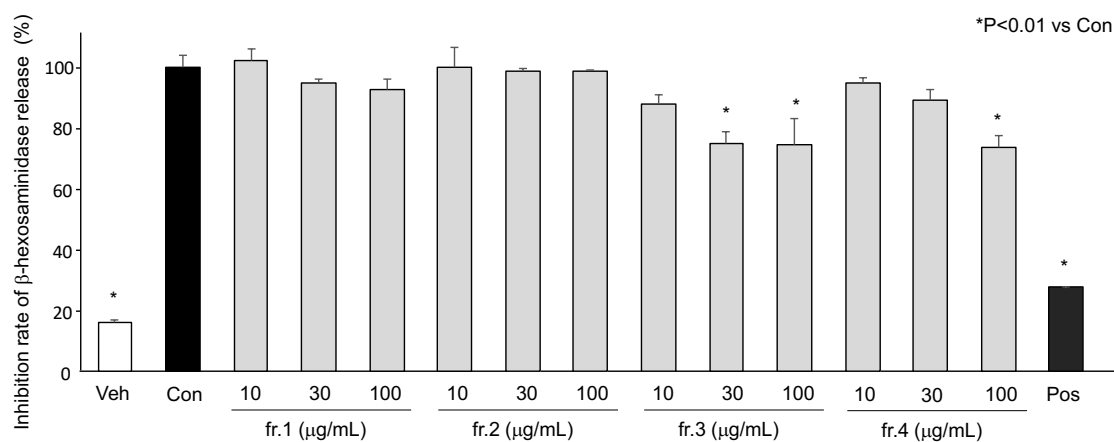


Figure 3.7. Effect of Hi-Trap Q FF fractions on the inhibition of β -hexosaminidase release from RBL2H3. Veh: Vehicle, Con: control, Pos: 5 μM of wortmannin.

第5節 Fr. 3の構造解析

Fr. 3 と fr. 4 の各種 NMR スペクトルは類似していたため、fr. 3 の解析を行った。構成糖分析から、fr. 3 は 99.5%がグルコースから構成されることが明らかとなり (Table 3.3)、 ^1H NMR 及び ^{13}C NMR スペクトルにおいてもグルコースに帰属されるシグナルが観測された (Figure 3.8 a,b)。HSQC スペクトルより、 β -(1 \rightarrow 6)グリコシド結合するグルコースのアノマープロトンと 6 位メチレンプロトンに帰属されるシグナル、ならびに β -(1 \rightarrow 3)グリコシド結合するグルコースのアノマープロトンと 6 位メチレンプロトンに帰属されるシグナルが観測された (Figure 3.9)。HMBC スペクトルにおいても同様の部分構造を示唆する相関が確認された (Figure 3.10a)。

一方、構造既知の海藻由来多糖類であるラミナランの HMBC スペクトルでは、fr. 3 のスペクトルで観測された相関に加え、(1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンの分岐構造を示唆する相関が認められた (Figure 3.10b)。

以上の結果から、fr.3 は直鎖(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンと直鎖(1 \rightarrow 6)- β -D-グルカンの混合物、 β -(1 \rightarrow 3)結合と β -(1 \rightarrow 6)結合が混在する直鎖グルカン、あるいはそれらの混合物であると推定した (Figure 3.11)。 ^{13}C NMR スペクトルにおいて、84.3 ppm に見られる(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンの 3 位カーボンに帰属されるシグナル強度が他のシグナルと比較してわずかにしか観測されなかったため、fr. 3 の主要なグリコシド結合は β -(1 \rightarrow 6)結合であることが示唆された (Figure 3.10a)。

Table 3.3. The monosaccharide composition analysis of fr. 3.

	Monosaccharide molar ratio (%)				
	Fco	Fru	Man	Glc	Gal
fr.3	N.D.	N.D.	0.5	99.5	N.D.

N.D.: not detected, Fco: fucose, Fru: fructose, Man: mannose, Glc: glucose, Gal: galactose.

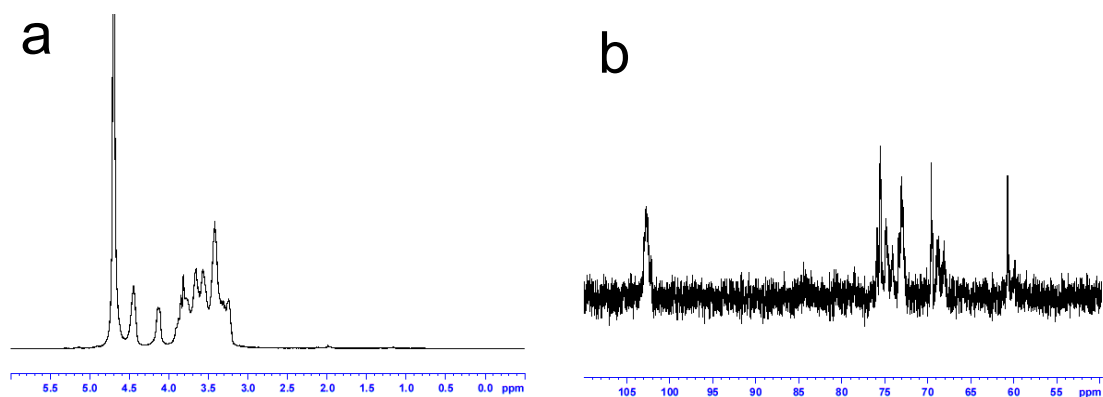


Figure 3.8. NMR spectra of fr. 3 in D_2O . (a) ^1H NMR, (b) ^{13}C NMR.

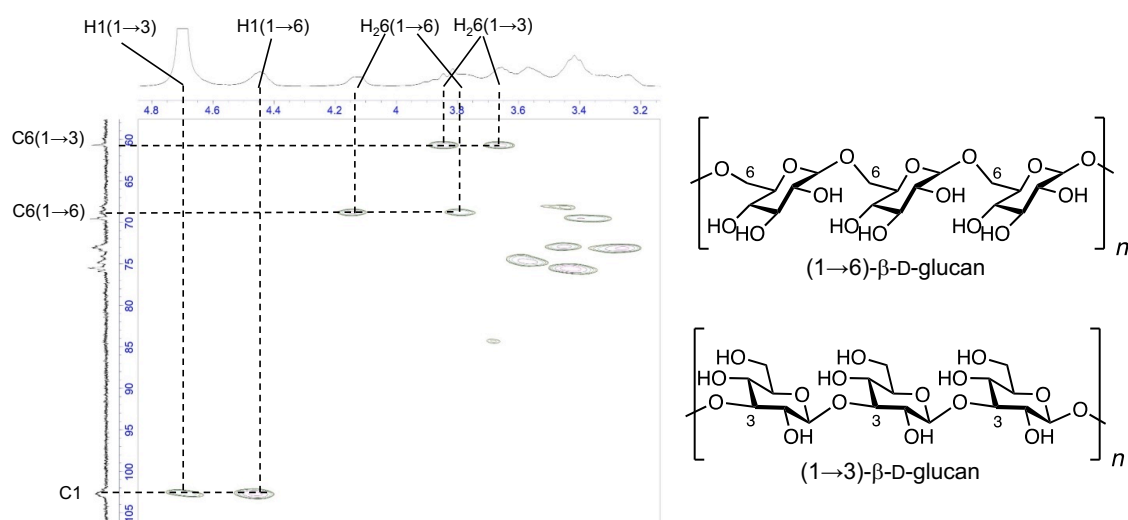


Figure 3.9. HSQC spectrum of fr. 3 in D_2O and structures of (1→6)- β -D-glucan and (1→3)- β -D-glucan.

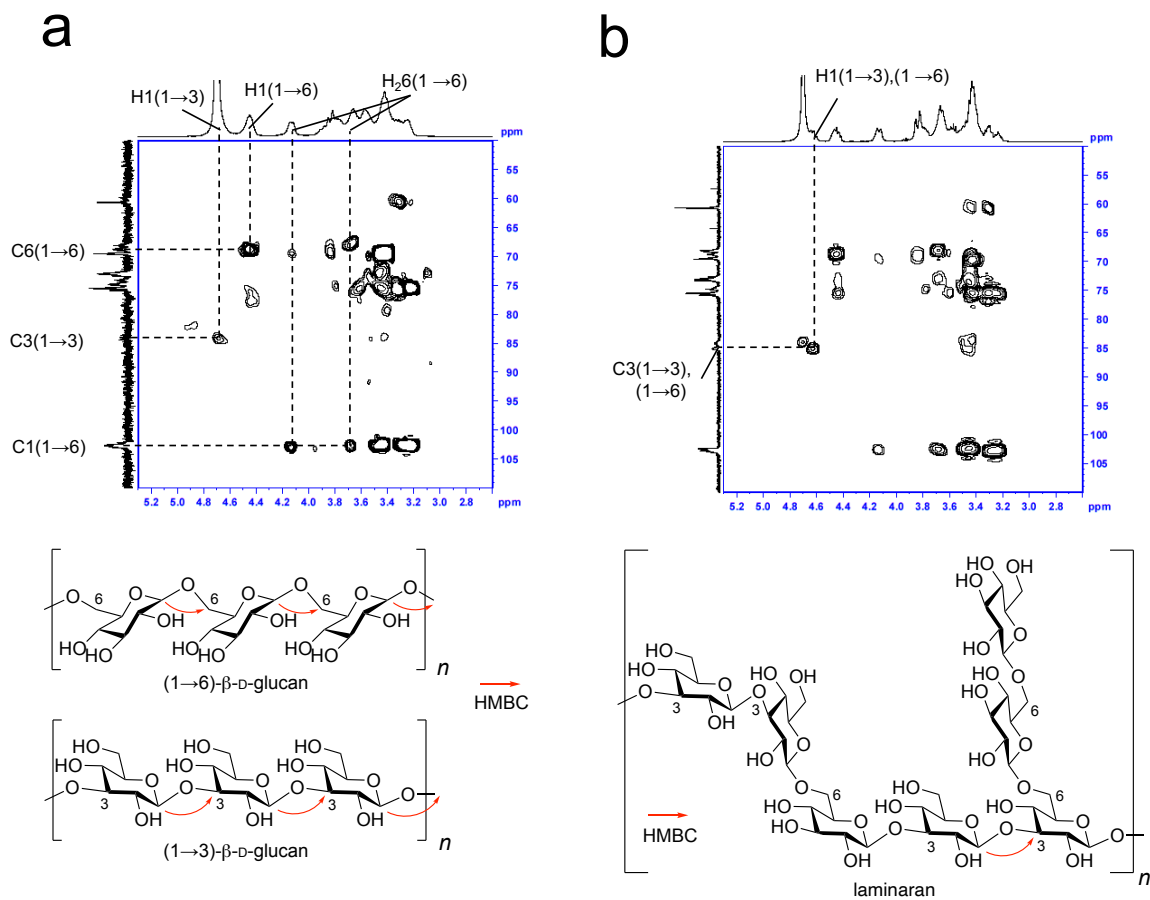


Figure 3.10. HMBC spectra of fr. 3 and laminaran in D₂O and structures of (1→6)-β-D-glucan, (1→3)-β-D-glucan, and laminaran. (a) Fr. 3, (b) Laminaran.

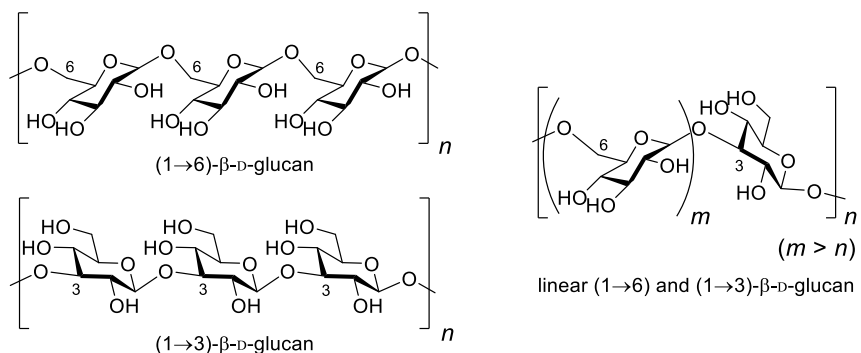


Figure 3.11. Plausible structures for constituents of fr. 3.

第6節 脱顆粒抑制活性の作用機序解析

C型レクチン受容体である Dectin-1 は、 β -グルカン受容体として特異的に(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン及び(1 \rightarrow 6)- β -D-グルカンを認識し、チロシンキナーゼ Syk のリン酸化を介して真菌感染からの防御に重要な役割を果たす [117,118]。Dectin-1 による β -グルカンの認識は、 β -グルカンの分子量や水への溶解性に依存することが知られており、不溶性の β -グルカン粒子は真菌感染防御作用を示す一方で、水溶性の低分子(1 \rightarrow 6),(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンは、Dectin-1 のアンタゴニストとして働く [119-121]。水溶性低分子(1 \rightarrow 6),(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン (ラミナラン) は β -グルカン粒子により誘導される Syk のリン酸化を阻害することが確認されており [122]、IgE を介した脱顆粒は Syk のリン酸化により制御を受けることから、Dectin-1 と Fc ϵ RI と協調したアレルギー反応の制御機構について興味もたれる (Figure 3.12)。そこで、低分子化 β -D-グルカンである fr.3 が Dectin-1 を介して脱顆粒に影響を及ぼすか検討するため、RBL2H3 細胞に Dectin-1 の強制発現細胞株の樹立を試み、fr.3 の脱顆粒抑制活性に及ぼす Dectin-1 の影響を評価した。

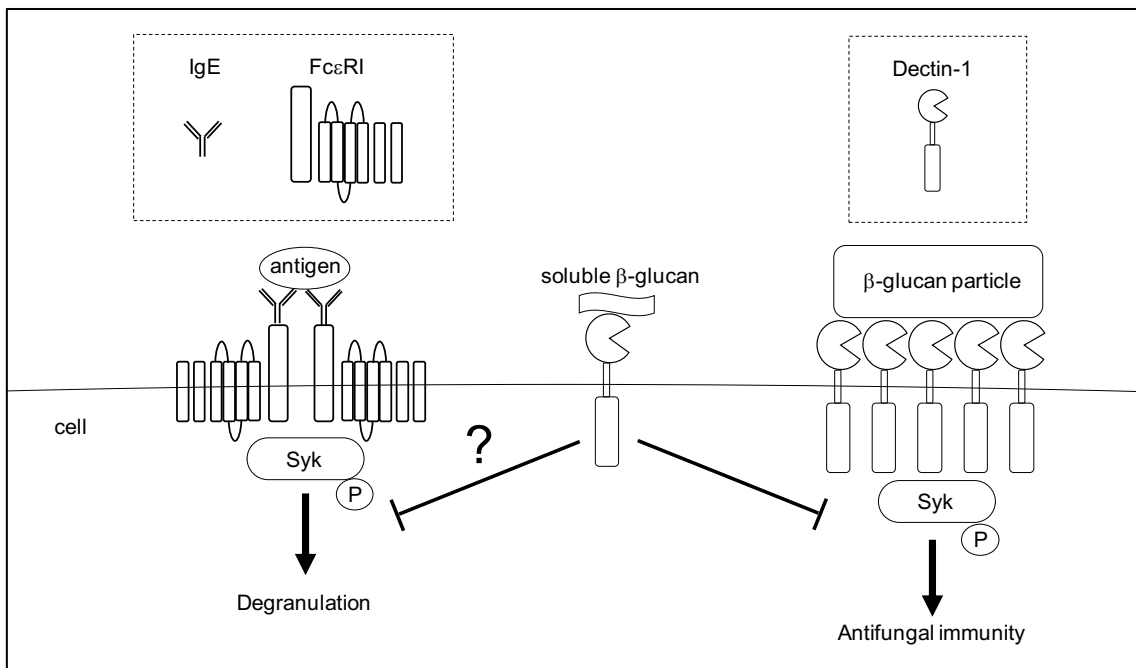


Figure 3.12. Fc ϵ RI (left) and Dectin-1(right) signals in immunocytes.

Raw264.3 細胞の cDNA より Dectin-1 をクローニングし、得られた DNA を pcDNA3.1 vector に挿入し、pcDNA3.1-Dectin-1 vector を作製した。pcDNA3.1-Dectin-1 vector を、RBL2H3 細胞に導入し、アミノグリコシド系抗生物質 G418 を用いて Dectin-1 安定発現細胞株を樹立した。Dectin-1 安定発現細胞株、並びに細胞樹立に用いた RBL2H3 細胞の Dectin-1 発現量について、抗 Dectin-1 抗体を用いたウェスタンブロットにて確認した。RBL2H3 細胞の Dectin-1 発現量に対し、Dectin-1 安定発現株は Dectin-1 を過剰発現していることが確認された (Figure 3.13a)。Dectin-1 安定発現細胞株を用いて、脱顆粒に対する fr. 3 の活性を評価した。ウォルトマニン は脱顆粒を抑制した一方で、RBL2H3 細胞に対して確認されていた fr. 3 の脱顆粒抑制活性は消失した (Figure 3.13b)。

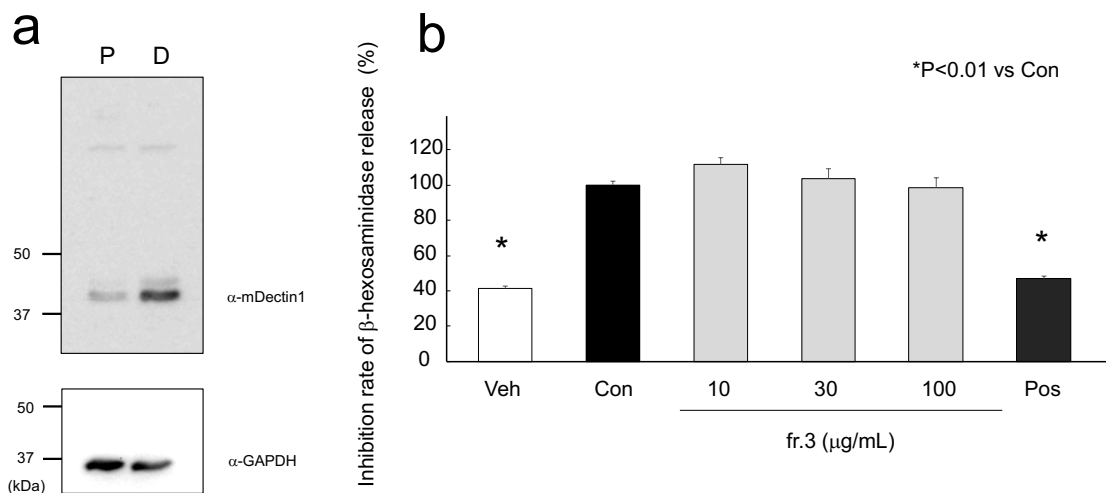


Figure 3.13. Effect of fr.3 on the inhibition of β -hexosaminidase release in RBL2H3 overexpressing mouse Dectin-1. (a) Expression of mouse Dectin-1 and GAPDH detected by western blotting. P: RBL2H3 cells (parental), D: cells overexpressing Dectin-1. (b) Inhibition rate of β -hexosaminidase release in RBL2H3 overexpressing mouse Dectin-1. Veh: Vehicle, Con: control, Pos: 5 μ M of wortmannin.

IL-4、IL-5、及び IL-13 は Th2 サイトカインとして知られ、これらは IgE による I 型アレルギーを調節する [123]。IL-4 と IL-13 は、リンパ球 B 細胞を刺激して B 細胞からの IgE 産生を高めることにより、アレルギー症状を増強させる [124]。IL-5 は好酸球に働きかけて遅延型アレルギーを誘導する。DNA マイクロアレイ解析の結果から、抗原である DNFB を塗布した耳介において、IL-9、IL-13 の受容体である *Il9r* と *Il13ra2* の発現の上昇が認められ、発酵靈芝の投与により両遺伝子の発現の上昇が抑制されることが示唆された。そこで、fr. 3

が Th2 サイトカイン並びに *Dectin-1* の発現に及ぼす影響を評価するため、RT-PCR にて遺伝子発現解析を行った。fr. 3 は、*Dectin-1*、*Il-4*、及び *Il-5* の発現には影響を与えない一方で、*Il-13* の発現を抑制することが確認された (Figure 3.14)。本結果から、fr. 3 が何らかの受容体に働きかけ、IL-13 の産生を抑制することが脱顆粒抑制活性に関与することが示唆された。

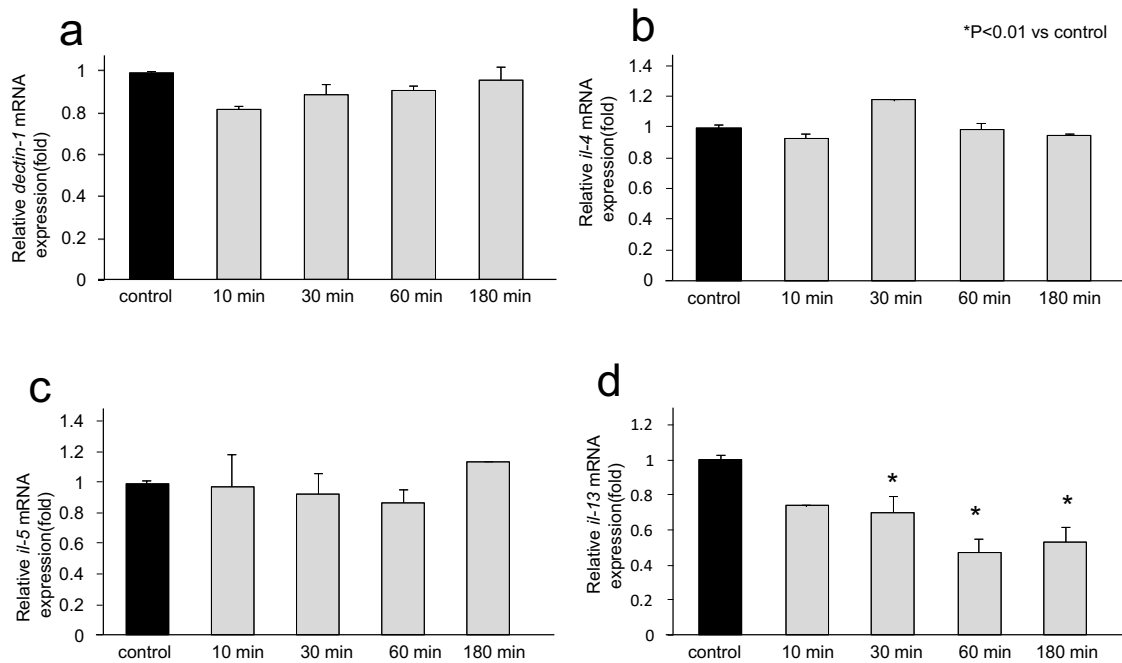


Figure 3.14. Effects of fr. 3 (100 µg/mL) on Th2 cytokines and *Dectin-1* expressions in RBL2H3. (a) Relative expression of *Dectin-1*, (b) relative expression of *Il-4*, (c) relative expression of *Il-5*, (d) Relative expression of *Il-13*.

小括

IgE 依存型アレルギー性皮膚炎モデルマウスに対する発酵霊芝及び霊芝の効果を評価した結果、発酵霊芝は霊芝より低濃度でアレルギー反応による皮膚炎を抑制することを見出した。血中 IgE 量は発酵霊芝及び霊芝投与により大きな影響を受けなかった。DNA マイクロアレイ解析から、発酵霊芝投与により、炎症及び血管透過性関連遺伝子の発現の上昇が抑制されたことが示された。RBL2H3 細胞からの脱顆粒に及ぼす発酵霊芝及び霊芝熱水抽出エキスの影響を評価したところ、発酵霊芝エキスは霊芝エキスより低濃度で脱顆粒抑制活性を示した。これらの結果より、発酵霊芝中に、霊芝の自己消化に由来するアレルギー抑制活性成分の存在が示唆された。

発酵霊芝の熱水抽出エキスを脱顆粒抑制活性が見出されたことから、多糖に着目してアレルギー抑制活性成分の探索を行った。発酵霊芝及び霊芝多糖粗画分をゲルろ過カラムを用いて分析したところ、発酵霊芝に 6-22 kDa に相当する低分子化多糖の集積が認められた。脱顆粒抑制活性を指標に、ゲルろ過樹脂及び陰イオン交換樹脂を用いて fr. 3 を分離し、NMR スペクトルから、低分子化 β -D-グルカンであることを確認した。Fr. 3 の脱顆粒抑制活性の作用機序を明らかにするため、(1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン受容体である Dectin-1 の安定発現 RBL2H3 細胞株を樹立し、本細胞からの脱顆粒に及ぼす fr. 3 の影響を評価した。しかし、fr. 3 には Dectin-1 安定発現細胞株からの脱顆粒抑制活性が認められなかった。次に、Th2 サイトカインの遺伝子発現に及ぼす fr. 3 の影響について RBL2H3 細胞を用いて評価したところ、fr. 3 は *IL-13* の発現を抑制することが示された。発酵霊芝投与マウス耳介における DNA マイクロアレイ解析では、IL-13 の受容体である *Il13ra2* の発現が発酵霊芝投与群において抑制されていることが示されており、IL-13 の抑制がアレルギー抑制活性に関与することが示唆された。

IL-13 は、胚細胞に働きかけてムチンの産生に関与することが知られている[125]。Mucin 20 は発酵霊芝投与により、発現が抑制されることが DNA マイクロアレイ解析にて示されており、発酵霊芝由来の低分子化 β -D-グルカンによるムチン産生の調節機能が推察される。また、水溶性低分子(1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンは Dectin-1 のアンタゴニストとして働くため、 β -グルカンによる花粉症の増強を発酵霊芝由来の低分子化 β -D-グルカンが軽減することが期待される。

本研究により、発酵霊芝が霊芝より低濃度でアレルギー抑制活性を示すことを明らかにした。その関与成分として、霊芝の自己消化により産生する低分子化 β -D-グルカンを見出した。本成分が IL-13 を抑制することにより脱顆粒抑制効果を発揮することが示唆された。霊

芝のガノデリン酸 C2 は、ヒスタミン抑制活性を示すことが報告されており[95]、霊芝には、トリテルペンによる抗アレルギー活性が認められている。霊芝を自己消化することにより、霊芝がもつアレルギー抑制活性をさらに高めることが可能になると推察される。

結語

著者は生薬にさらなる機能性を付与する手段として発酵に着目し、人参を *L. paracasei* A221 株にて発酵した発酵人参、及び霊芝を自己消化した発酵霊芝についての機能性研究、並びにその関与成分の探索研究を行った。

発酵人参は、APAP 誘導肝障害に対して、生化学的及び病理組織学的評価により肝障害抑制活性が確認された。この活性には、発酵によりジンセンサイド Rb₁ から脱グリコシル化された代謝物コンパウンド K による JNK シグナルを介した抗炎症活性が関与していることが示唆された。また、DNA マイクロアレイ解析より示された PPAR アゴニスト活性成分の探索により、発酵人参中の成分として 10-ヒドロキシオクタデカン酸を同定した。10-ヒドロキシオクタデカン酸は PPAR α 及び γ のデュアルアゴニスト活性を示した。これらの結果から発酵人参の新規機能性として、APAP 誘導肝障害の抑制効果を見出し、その関与成分として、発酵によるジンセノサイド代謝物コンパウンド K 並びに乳酸菌産生物質 10-ヒドロキシオクタデカン酸を同定した。

霊芝を自己消化させた発酵霊芝には、IgE 依存型アレルギー性皮膚炎に対して、霊芝より低濃度でアレルギー性皮膚炎抑制活性が確認された。霊芝の自己消化により、6-22 kDa に相当する低分子の多糖の集積が認められ、本画分から RBL2H3 細胞の脱顆粒を抑制する低分子化 β -D-グルカンを見出した。本成分は *IL-13* 遺伝子発現を抑制することが示された。これらの結果から、発酵霊芝の機能性として I 型アレルギー抑制活性を見出し、その関与成分として、低分子化 β -D-グルカンを見出した。

本研究により、生薬成分の発酵による代謝産物が、生薬の機能性拡大に寄与する可能性を示すことができた。

謝辞

本研究を行うにあたり、私を社会人博士課程へ導いて下さり、終始多大なる御指導・御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院医歯薬学研究部 生薬学分野 柏田 良樹 教授に深く感謝し心から御礼申し上げます。

本研究において、研究の方向性、技術面から本論文の作成に至るまで多大なる御指導・御鞭撻を頂きました、徳島大学大学院医歯薬学研究部 生薬学分野 田中 直伸 准教授に心から感謝申し上げます。

本研究において、成分探索と構造解析にご協力頂きました丸善製薬株式会社 川本 扶佐子 氏に深く感謝致します。

本研究は株式会社ナガセビューティケアの社員として行いました。本研究の遂行に御支援、御配慮を頂きました株式会社ナガセビューティケア 代表取締役社長 千葉 敏英 氏、生産開発本部 本部長 木嶋 育雄 氏、元株式会社ナガセビューティケア 代表取締役社長 吉野 啓公 氏、元長瀬産業株式会社 事業部長 平井 孝明 氏に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、株式会社ナガセビューティケア 生産開発本部 R&D グループへ私を導いて下さり、多大なる御支援と御配慮、並びにご指導を頂きましたグループリーダー 伊藤 久富 氏、宮崎 寿次 氏に心より感謝申し上げます。また、研究方法から論文作成、日常業務まで様々な面でご指導頂きました元長瀬産業株式会社 ビューティケア製品事業部 研究開発チーム 下条 洋輔 氏に心より感謝申し上げます。

本研究を社員として遂行するにあたり、ご助言、ご協力を頂きました元長瀬産業株式会社 ビューティケア製品事業部 研究開発チームの皆様、並びに、株式会社ナガセビューティケア 生産開発本部 R&D グループの皆様にご深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、ご協力下さいました徳島大学薬学部生薬学研究室の皆様にご感謝致します。

最後に、本研究に理解し、応援してくれた妻と息子達に心から感謝致します。

2021年9月 位上 健太郎

実験の部

Chapter 2

General experimental procedure

Mass spectrometry (MS) were obtained on a Waters LCT PREMIER 2695. 1D and 2D NMR spectra were measured on a Bruker AVANCE-500 instrument using tetramethylsilane (0.03%, v/v) as an internal standard. Column chromatographies were performed with silica gel 60N (63-210 μm , Kanto Kagaku, Japan), Sephadex LH-20 (25-100 μm ; GE Health Care, U.K.), MCI-gel CHP20P (75-150 μm ; Mitsubishi Chemical, Japan) and YMC-gel ODS-A (S-50 μm ; YMC Co., Ltd., Japan). Preparative HPLC was performed on JASCO apparatus consisting of a PU-980 prep. pump, UV-970UV/VIS (at a wavelength of 210 nm) and RI-930 with COSMOSIL Cholester (20 mm i.d. \times 250 mm; 5 μm ; Nacalai Tesque).

Materials

Ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, and Rg₁ were purchased from Wako Pure Chemical Industries. Ginsenoside metabolites compound K and protopanaxatriol were kindly provided by Dr. Hasegawa (Fermenta Herb Institute Inc.). SIL (Lot.SIE031013-000), which contains 56.9% silybin, was obtained from Ask Intercity Co., Ltd. APAP was obtained from Wako Pure Chemical Industries. WY-14643 and troglitazone were obtained from Calbiochem and Sigma-Aldrich, respectively. 12-Hydroxy-octadecanoic acid was purchased from Wako Pure Chemical Industries.

Preparation of FG and FRG

The dried powder of lateral roots of ginseng (age 5 years) was purchased from NIPPON Funmatsu Yakuhin Co., Ltd, Japan (lot. 070228BH). FG was produced by fermentation of a culture medium including ginseng mixture (15 %) and *Lactobacillus paracasei* A221 (2 %, 10¹⁰ colony-forming units [CFU]/mL) for 10 days at 28°C. The ginseng mixture contained ginseng (84 %), yeast extract (6.5 %, Asahi Food & Healthcare Co., Ltd, Japan), soybean peptide (3 %, Fuji Oil Co., Ltd, Japan) and calcium carbonate (6.5 %). FRG was prepared in the same way as for FG using Red ginseng (NIPPON Funmatsu Yakuhin Co., Ltd, Japan, lot. RH8303S).

High-performance liquid chromatography analysis for ginsenosides

The quantitative analyses of ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, and Rg₁, compound K, and protopanaxatriol in FG and FRG were carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC). HPLC consisted of a LC-10AT (SHIMADZU Corp.), an SPD-M10A (SHIMADZU Corp.), and a YMC-Pack ODS-A column (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm; YMC Co., Ltd.). The column temperature was set at 40 °C and the ginsenosides were detected at a wavelength of 203 nm. Elution was performed at the flow rate of 1.0 mL/min with an isocratic elution system of 60% acetonitrile aq. for compound K and protopanaxatriol, 33% acetonitrile aq. for ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, and Rd, and 20% acetonitrile aq. for ginsenoside Rg₁. HPLC analysis was performed three times and the results were expressed as mean ± SE.

Animal Treatment

Animals (Slc: Wistar, SPF male rats), obtained from Japan SLC, Inc., were maintained under a 12 h photoperiod with free access to standard laboratory chow (Funabashi Farm Co. Ltd.) and water. Rats (9 weeks old, 214-241 g) were divided into 5 groups with 12 rats in each group. FG and FRG were orally administered once a day with gavage at the dose of 50 mg/kg for 8 consecutive days. SIL was orally administered at 100 mg/kg in the same way as FG and FRG. As a control group, 0.3% sodium carboxymethyl cellulose aq. was administered. APAP was intraperitoneally administered on the seventh day. Twenty-four hours after the APAP administration, blood samples were collected for the serum biochemical analysis. Liver samples for histopathological assessment were enucleated 48 hours after the APAP administration under ether anesthesia. Rat livers were collected 24 hours after the APAP administration for DNA microarray analysis from vehicle-treated rats and APAP-treated rats with either vehicle or FG pretreatment. Animal studies were conducted in accordance with the Guidelines for Animal Studies of the Japan Biological Science Center based on the Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments of the Science Council of Japan (Test No. JBS-11-ROPP-651, JBS-10-ROPP-592).

Evaluation of APAP-induced liver injury

Serums were obtained from blood samples by centrifugation, and the serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were analyzed by a Hitachi automatic analyzer Model 7170. Lateral left liver lobes were fixed with a 10% neutral buffered formalin solution. After the lobes were embedded in paraffin wax, they were sliced and all sections were stained with hematoxylin-eosin. The severity of liver injury was assessed by vacuolization levels, scored according

to the following criteria: 0: no vacuolization, 1: localized abdominal pain and mild degree of vacuolization, 2: moderate vacuolization, 3: diffused vacuolization in a broad area.

DNA microarray analysis of rat liver

Liver samples of vehicle-treated rats and APAP-treated rats pretreated with either vehicle or FG were obtained in animal experiments. Three liver samples were used for each group in the DNA microarray analysis. Total RNA was isolated using Isogen (Invitrogen). RNA concentration and quality were checked by spectrophotometric analysis (260 and 280 nm) and electrophoresis, respectively. Aminoallyl-RNA was prepared from 1000 ng total RNA by T7 oligo(dT)-Primer using the Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA amplification Kit (Ambion). Aminoallyl-RNA concentration and quality were determined as described above. Ten micrograms of Aminoallyl-RNA were vacuum-dried and fluorescence-labeled using the CyDye Post-Labeling Reactive Dye Pack (GE healthcare). Fluorescence-labeled aminoallyl-RNA concentration and quality were determined by spectrophotometric analysis and electrophoresis. One microgram of fluorescence-labeled aminoallyl-RNA was hybridized with combimatrix custom rat 40K (Combimatrix) for 16 h. Fluorescent images were scanned by a GenePix4000B and analyzed by Microarray Image Analysis GenePix Pro 6.1. In this analysis, median values were calculated for the changes of each gene expression in each different subject of the group, and comparison among the three groups was expressed in terms of the fold change relative to vehicle-treated rat samples without APAP administration.

Cell culture and treatment

HepG2 cells obtained from the American Type Culture Collection were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin. After overnight incubation of the cells at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂-95% air, compound K was added to medium at doses of 2, 6, or 20 µM and the cells were further incubated for 24 hours. The cultured medium was changed to a fresh medium containing tumor necrosis factor (TNF)-alpha (100 ng/mL), and the cells were incubated for an additional 3 hours. Cells were collected by radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer and lysates were assayed by western blot analysis.

Western blot analysis

Whole cell lysates were prepared as described above, and proteins were separated by sodium dodecyl

sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Proteins were blotted to PVDF membranes (Millipore). Antibodies for JNK/SAPK and phospho-SAPK/JNK were purchased from CST Signaling. Anti-SAPK/JNK, an isoform of JNK, was diluted to 1:1000 as was anti-phospho-SAPK/JNK. A secondary antibody linked to horseradish peroxidase was used for ECL detection (GE Healthcare).

Extraction and isolation

FG (1.0 kg) was extracted with MeOH (2.5 L) at room temperature three times. After removal of the solvent by evaporation, the MeOH extracts (467 g) were partitioned successively between CHCl₃, EtOAc and H₂O. The CHCl₃-soluble (28.9 g) and EtOAc-soluble (16.3 g) fractions were combined, and subject to column chromatography over a silica gel (CHCl₃: MeOH = 1:0 → 6:4) to give 16 fractions (frs. 1 – 16). Compound **1** (310 mg) was obtained by the crystallization of fr. 2 from *n*-hexane-acetone. Fraction 3 was further chromatographed on silica gel [*n*-hexane-EtOAc (7:3→1:4) to yield four fractions (frs. 3.1–3.4). Crystallization of fr. 3.1 from acetone furnished 20(*R*)-protopanaxadiol (**2**, 328 mg), while 20(*S*)-protopanaxadiol (**3**, 334 mg) was obtained from fr. 3.2 by crystallization with EtOAc. Silica gel column chromatography of fr. 13 eluting with EtOAc/MeOH/H₂O (20:1:0.3) gave 20(*S*)-ginsenoside Rh1 (**5**, 11 mg) and 20(*R*)-ginsenoside Rh1 (**4**, 43 mg).

Compound **1** Colorless needles; $[\alpha]_D^{20}$ 0.0 (c 0.20, MeOH); HRESI-MS m/z 299.2591 [M-H]⁻ (calcd for C₁₈H₃₅O₃, 299.2586); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 0.86 (3H, t, $J = 6.5$ Hz), 1.23-1.37 (20H, m), 1.37-1.49 (6H, m), 1.63 (2H, m), 2.33 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), and 3.59 (1H, m); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 14.1 (CH₃), 22.6, 24.7, 25.5, 25.6, 29.0, 29.1, 29.2, 29.3, 29.6, 29.6, 29.7, 31.9, 34.0, 37.3, 37.4, 72.1 (C-OH), and 179.2 (COOH).

Plasmid construction for reporter assay

To measure the transcription activities of PPAR α and γ , pcDNA3.1-GAL4-PPAR α , pcDNA3.1-GAL4-PPAR γ , and upstream activating sequence (UAS) reporter plasmids were constructed as follows. Full-length rat's PPAR α or mouse's PPAR γ was subcloned into the pcDNA3.1 His-V5 vector (invitrogen), where the GAL4 gene was inserted. Four copies of the UAS sequence were subcloned into pGL3-luciferase reporter vector (promega). pSV- β -galactosidase expression vector was obtained from Promega.

Cell culture and transfection

CV-1 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin. After overnight incubation of the cells at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂-95% air, three plasmids containing UAS reporter plasmid and β-galactosidase expression vector with GAL4-PPAR α or GAL4-PPAR γ plasmid were co-transfected into CV-1 cells by Transfast™ (Promega). At 48 hours after co-transfection, each fraction obtained by column chromatography of the FG extract was added to medium at doses of 5 or 20 µg/mL and the cells were further incubated for 24 hours. WY-14643 and troglitazone were added at the dose of 10 µM as PPAR α and PPAR γ agonist, respectively. Cells were collected by passive lysis buffer (Promega) and incubated for one hour under room temperature. The luciferase activities of the lysates were measured using a luciferase assay kit (Promega) with Luminescencer JNR II (ATTO) and were normalized with the β-galactosidase activities.

Complex of PPAR α with coactivator

The binding between PPAR α and CREB binding protein (CBP) known as a coactivator of PPAR α was measured using an ELISA method (Fujikura kasei Co.,Ltd., Japan). CBP peptides were coated 96-well plates for 1 hour at room temperature. The recombinant PPAR α was mixed with each compound **1** at the dose of 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50, and 500 µM and the mixture was incubated in the plates for 1 hour at room temperature. The plates were washed with wash buffer three times and incubated with an HRP coupled secondary antibody for 30 minutes at room temperature. Tetramethylbenzene was added, and the absorbance at 450 nm was measured to detect the complexes. WY-14643 was used as a positive control.

Statistical analysis

For serum biochemical and histopathological analysis, significant difference was determined by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post hoc test. P<0.05 was considered to be statistically significant. In DNA microarray analysis, values at least 5-fold higher than the intensity of the non-APAP-treated vehicle control were considered to be significant. For the reporter assay, significant difference was determined by Student's t test. P<0.01 was considered to be statistically significant.

Chapter 3

General experimental procedure

NMR spectra were measured by a Bruker Ascend™ 400 instrument.

Materials

L-Fucose, D-mannose (Fujifilm Wako Pure Chemical Co.) and D-glucose, D-galactose, D-fructose, and TFA (Nacalai Tesque, Inc. Kyoto, Japan) were purchased. Prednisolone and wortmannin were obtained from Fujifilm Wako Pure Chemical Co. Laminaran was obtained from Tokyo Chemical Industry co., Ltd. Shodex pullulan standard kit P-82 was purchased from Showa Denko K.K.

Preparation of AGL

AGL powder was prepared as follows. *Ganoderma lingzhi* (BMC9049 strain) powder (GL) was mixed with water to be 10 % volume. The mixture was incubated at 37 °C for 24 hours with shaking and then sterilized at 121 °C, and powdered by spray drying to give AGL.

Animal treatment

Six-week-old BALB/cA Jc1 male mice were maintained under a 12 hours photoperiod with free access to standard CE-2 diet (Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan). Mice were divided into 9 groups of 6 mice in each. GL and AGL were orally administered once a day with gavage at the dose of 30, 100, 300 mg/kg for 7 consecutive days. Each group was injected anti-DNP mouse IgE at 3 µg/body on the 6 days through tail intravenously. After 24 hours from the injection, DNFB was treated and ear swelling was measured before DNFB treatment and 1, 4, 24 and 48 hours after treatment. As positive control group, water was administered for 7 consecutive days and prednisolone (5 mg/kg) was orally administered 2 hours before DNFB treatment. As vehicle group, DNFB was not treated and ear swelling was measured. The auricles and sera were collected 48 hours after DNFB treatment from each group. Animal studies were conducted in accordance with the guidelines for animal studies of the Control of Innate Immunity Technology Research Association.

DNA microarray analysis

Auricle samples of AGL treated mice were obtained from the animal experiments. The samples were soaked in RNAlater (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) solution at 4 °C for 16 hours and

kept at -80 °C. RNA was extracted by NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel GmbH & Co. Kg., Duren, Germany). Double-stranded cDNA was amplified from 20 ng of RNA and Cy3 labelled single-stranded cDNA were amplified with SureTag complete DNA Labeling Kit. Cy3 labelled cDNA was hybridized Agilent Expression Array with Gene Expression Hybridization Kit and scanned by SureScan microarrayscanner G2600D (Agilent Technologies, Inc., CA, USA). Average values of measured gene expressions in each group were calculated and compared. these values were expressed as fold changes relative to the negative-control group.

Cell culture and degranulation assay

RBL2H3 (JCRB Cell Bank, Osaka, Japan) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific Inc.) in 5% CO₂ at 37 °C. Degranulation assay using RBL2H3 cells were performed as described below. RBL2H3 cells were seeded onto 24 well plates at 2.5×10^5 cells/well in 1 mL of medium. Cells were incubated for 16 h at 37 °C and sensitized with 50 ng/mL anti-DNP-IgE (Sigma-Aldrich Co. Llc., MO, USA). After incubation at 37 °C for two hours, cells were washed twice with MT buffer containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM glucose, 20 mM HEPES and 0.1 % BSA to eliminate free IgE. Ten minutes after samples treated, DNP-HSA (Sigma-Aldrich Co. Llc.) was added at 2.5 µg/ml, followed by incubation at 37 °C for 30 minutes. Wortmannin at 5 µM was used as positive control. The β-hexosaminidase released into the supernatant was measured as coloring from substrate of *p*-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (Fujifilm Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) at 405 nm.

Extraction and isolation

AGL and GL (0.5 kg) were extracted separately by water (5 L) at 85 °C for 2 h. Ethanol was added to the extracts to be 70 %, and the solutions were kept at room temperature for 16 h. The precipitates were collected by centrifugation and freeze dried to give residues, which were separated by ToyoPearl HW-55F (Tosoh Co., Ltd., Tokyo, Japan) column chromatography with 0.1 M phosphate buffer. HiTrap QFF (GE Healthcare, IL, USA) was used for further separation, and the obtained fractions were desalted by dialysis membrane and concentrated. GPC chromatography was performed on a TSKgel G4000PWXL column (10 mm, $\phi 7.8 \times 300$ mm, Tosoh Co., Ltd.) with refractive index detector. Shodex pullulan standard kit P-82 were used for markers of molecular weight.

Monosaccharide composition analysis

Monosaccharide composition was determined as follows. Polysaccharides were dissolved in 2M TFA aq. and degraded at 120 °C for 2 hours. Methanol was added and dried 3 times with nitrogen blowing to remove TFA. The samples and monosaccharide standards were analyzed on Asahipac NH2P-50 4E column (ϕ 4.6 × 250 mm, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan) and detected by refractive index detector. The mobile phase was 80% CH₃CN aq. with 250 mM phosphate.

Plasmid construction and transfection

The mouse Dectin-1 cDNA was obtained as follows. Total RNA from RAW264.7 cells was isolated by Trizol (Thermo Fisher Scientific Inc.), and the first-strand cDNA was generated by using Primescript RT Reagent kit (Takarabio Inc., shiga, Japan) with oligo (dT) primers. The mouse Dectin-1 cDNA was subsequently amplified by PCR using following primers (FW: 5'-atcggatccatgaaatatcactctcatatag-3', RV: 5'-gcatgcatgcatgcgccgcttacagttcctctcacag-3'). The PCR product was cloned into pcDNA3.1-V5-His-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific inc.) and verified by nucleotide sequencing. Transfection was conducted to RBL2H3 cells for establishing stable cell line. 10⁶ cells were seeded in 35-mm dishes and cultured in the DMEM overnight. 20 µg of Dectin-1-inserted vector was transfected into RBL2H3 cells by FugeneHD (Promega Co., WI, USA). Stably transfected cell line was selected with 0.4 mg/mL G418 (Sigma-Aldrich Co. Llc.).

Immunoblotting analysis of RBL2H3

Mouse Dectin-1 stable cell line and parental RBL2H3 cells were incubated in the DMEM at 1 × 10⁶ cells for each. Cells were washed PBS and solubilized in the RIPA lysis buffer. Protein volume in the lysates were measured by BCA assay to normalize protein. Cell lysates were separated with SDS-PAGE with 12 % gel and transferred PVDF membrane. Mouse Dectin-1 was detected by Dectin-1/CLEC7A antibody (NBP1-45514, Novus Biologicals, Llc., CO, USA). GAPDH was used as loading control.

Quantitative real-time PCR analyses of RBL2H3

RBL2H3 cell were seeded in 35-mm dishes at 10⁶ cells and cultured in the DMEM overnight. Cells were treated with 0.2M fraction of ADGL and collected by Trizol at 10, 30, 60, and 180 minutes after the treatment. cDNA was prepared as described plasmid construction section. Real-time PCR was conducted using TB Green Premix Ex Taq II (Takarabio Inc.). The primers used in this study were

as follows: *Dectin-1* (FW: 5'-ccaactcgtttcaagtcagaaatcacag-3', RV: 5'-cagttccttccacagatagtgatgagg-3'), *Il-4* (FW: 5'-gtaccgggaacgggtatccacgg-3', RV: 5'-ggtgttccttggtgccgtaaggacg-3'), *Il-5* (FW: 5'-ccgagctctgttgacgagcaatgag-3', RV: 5'-cggacagttgattcttcagtagtctagcccc-3'), *Il-13* (FW: 5'-gctctcgctgccttggtgg-3', RV: 5'-catccaggcctttggttaca-3'), *Gapdh* (FW: 5'-ggtctacatgtccagtagtactctaccacg-3', RV: 5'-cccatttgatgttagcgggatctcgc-3'). The expression of *Gapdh* was used as a reference for normalization and relative units were compared.

Statistical analysis

Significant differences were determined by Dunnett. *P<0.01 were considered as statistically significant.

参考文献

- 1) 厚生労働省, 令和2年(2020)人口動態統計月報年計(概数)の概況, **2021**, 2.
- 2) 厚生労働省, 第11回健康日本21(第二次)推進専門委員会資料1-1, **2018**, 様式1.
- 3) 大澤 俊彦, 日本食生活学会誌, **2009**, 20, 11-16.
- 4) Dimidi, K.; Cox, S. R.; Rossi, M.; Whelan, K. *Nutrients* **2019**, 11, 1806.
- 5) Filannino, P, Bai, Y.; Cagno, R. D.; Gobetti, M.; Ganzle, M. G. *Food Microbiol.* **2015**, 46, 272-279.
- 6) Pessione, E.; Cirrincione, S. *Front. Microbiol.* **2016**, 7, 74.
- 7) 田中 久 他監修, 第17改正日本薬局方解説書, 日本薬局方解説書編集委員会編, 廣川書店, **2016**, D475-D480.
- 8) 田中 久 他監修, 第17改正日本薬局方解説書, 日本薬局方解説書編集委員会編, 廣川書店, **2016**, D202-D204.
- 9) Doui-Ota, M.; Mikage, M. *J. Trad. Med.* **2013**, 30, 158-163.
- 10) 高石 喜久 他編, 薬学生のための薬用植物学・生薬学テキスト, 廣川書店, **2011**, 103-106.
- 11) 田中 久 他監修, 第17改正日本薬局方解説書, 日本薬局方解説書編集委員会編, 廣川書店, **2016**, D421-D425.
- 12) Kitagawa, I.; Fukuda, Y.; Taniyama, T.; Yoshikawa, M. *Yakugaku Zasshi* **1995**, 115, 992-1003.
- 13) 難波 恒雄 著, 原色和漢薬図鑑(下), 株式会社保育社, **1980**, 214-215.
- 14) 中薬大辞典 第二卷, 上海科学技術出版社編, 株式会社小学館, **1985**, 1303-1304.
- 15) Okutsu, K.; Kadooka, C.; Kojo, A.; Yoshizaki, Y.; Futagami, t.; Tamaki, H.; Takamine, K. *The Japanese Journal of Pharmacognosy* **2017**, 71, 41-48.
- 16) 難波 恒雄 著, 原色和漢薬図鑑(上), 株式会社保育社, **1980**, 221-222.
- 17) 中薬大辞典 第三卷, 上海科学技術出版社編, 株式会社小学館, **1985**, 1733-1734.
- 18) 田中 久 他監修, 第17改正日本薬局方解説書, 日本薬局方解説書編集委員会編, 廣川書店, **2016**, D581-D590.
- 19) Akao, T.; Che, Q. M.; Kobashi, K. Yang, L. Hattori, M.; Namba, T. *Appl. Env. Microbiol.* **1994**, 60, 1041-1043.
- 20) Akao, T.; Mibu, K.; Erabi, T.; Hattori, M.; Namba, T.; Kobashi, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 1998-2003.
- 21) Dressen, M.; Eyssen, H.; Lemli, J. *J. Pharm. Pharmacol.* **1981**, 33, 679-681.

- 22) Hattori, M. *Bifidus* **1991**, *5*, 27-40.
- 23) Takayama, K.; Tsutsumi, H.; Ishizu, T.; Okamura, N. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 2204-2208.
- 24) Takayama, K.; Morita, T.; Tabuchi, N.; Fukunaga, M.; Okamura, N. *J. Trad. Med.* **2013**, *30*, 215-220.
- 25) Takayama, K.; Takahara, C.; Tabuchi, N.; Okamura, N. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3833.
- 26) Nakamura, K.; Nishihata, T.; Jin, J. S.; Ma, C. M.; Komatsu, K.; Iwashima, M.; Hattori, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 23-27.
- 27) Jin, J. S.; Kitahara, M.; Sakamoto, M.; Hattori, M., Benno, Y. *Int. J. System. Evol. Microbio.* **2010**, *60*, 1721-1724.
- 28) Kim, D. H.; Yu, K. U.; Bae, E. A.; Han, J. M. *Biol. Pharm. Bull.* **1998**, *21*, 628-630.
- 29) Yasuda, T.; Kano, Y.; Saito, K.; Ohsawa, K. *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, *17*, 1369-1374.
- 30) 内山 成人 他, 腸内細菌学雑誌, **2007**, *21*, 217-220.
- 31) 黒野 勘六, 日本醸造協会雑誌, **1976**, *11*, 5-15.
- 32) 魚住 武司 他, 化学と生物, **1966**, *61*, 563-567.
- 33) 魚住 武司 他, 化学と生物, **1965**, *3*, 569-574.
- 34) Arima, K.; Uozumi, T.; Takahashi, M. *Agr. Biol. Chem.* **1965**, *29*, 1033-1041.
- 35) Szilagyi, M.; Kwon, N. J.; Dorogi, C.; Pocsí, I.; Yu, J. H.; Emri, T. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 1498-1508.
- 36) Yamazaki, H.; Yamazaki, D.; Takaya, N.; Takagi, M.; Ohta, A.; Horiuchi, H. *Curr. Genet.* **2007**, *51*, 8-98.
- 37) 川合 正允, 日本農芸化学会誌, **1973**, *47*, 473-477.
- 38) 川合 正允, 日本農芸化学会誌, **1973**, *47*, 467-472.
- 39) Adams, D. J.; *Microbiology* **2004**, *150*, 2029-2035.
- 40) Terashita, T.; Oda, K.; Kono, M.; Murao, S. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 2639-2645.
- 41) Endo, K.; Umeyama, Y.; Nakajima, J.; Kawai, H. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 1545-1551.
- 42) Lim, H.; Choi, H. T. *J. Microbiol.* **2009**, *42*, 225-228.
- 43) Niu, X.; Liu, C. C.; Xiong, Y. J.; Yang, M. M.; Ma, F.; Liu, Z. H.; Yuan, S. *J. Agric. Food. Chem.* **2016**, *64*, 6958-6968.
- 44) Zhou, Y.; Zhang, W.; Liu, Z.; Wang, J.; Yuan, S. *Microbiology* **2015**, *161*, 1978-1989.
- 45) Konno, N.; Sakamoto, Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 1365-1373.
- 46) Minato, K.; Mizuno, M.; Terai, H.; Tsuchida, H. *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, *47*, 1530-1532.
- 47) 田中 久 他監修, 第 17 改正日本薬局方解説書, 日本薬局方解説書編集委員会編,

- 廣川書店, 2016, D748-D760.
- 48) 田中 久 他監修, 第 17 改正日本薬局方解説書, 日本薬局方解説書編集委員会編, 廣川書店, 2016, D305-D310.
 - 49) Matsuda, H. *Natural Medicines* **1999**, 53, 217-222.
 - 50) He, M.; Huang, X.; Liu, S.; Guo, C.; Xie, Y.; Meijer, A. H.; Wang, M.; *Planta. Med.* **2018**, 84, 845-854.
 - 51) Hasegawa, H. *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, 95, 153-157.
 - 52) Chen, J.; Si, M.; Wang, Y.; Liu, L.; Zhang, Y.; Zhou, A.; Wei, W. *Inflammapharmacology* **2019**, 27, 157-166.
 - 53) Hasegawa, H.; Uchiyama, M. *Plant. Med.* **1998**, 64, 696-700.
 - 54) Guan, F. Y.; Gu, J.; Li, W.; Zhang, M.; Ji, Y.; Li, J.; Chen, L.; Hatch, G. M. *Life Sci.* **2014**, 27, 42-49.
 - 55) Zong, W.; Zeng, X.; Chen, S.; Chen, L.; Zhou, L.; Wang, X.; Gao, Q.; Zeng, G.; Hu, K.; Ouyang, D. *J. Pharmacol. Sci.* **2019**, 139, 223-230.
 - 56) Yim, J. S.; Kim, Y. S.; Moon, S. K.; Cho, K. H.; Bae, H. S.; Kim, J. J.; Park, E. K.; Kim, D. H. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, 27, 1580-1583.
 - 57) Kim, K. A.; Jung, I. H.; Park, S. H.; Ahn, Y. T.; Huh, C. S.; Kim, D. H. *PLoS One* **2013**, 8, e62409.
 - 58) Bond, G. R.; Ho, M.; Woodward, R. W. *Drug Saf.* **2012**, 35, 149-157.
 - 59) Larson, A. M.; Polson, J.; Fontana, R. J.; Davern, T. J.; Lalani, E.; Hynan, L. S.; Reisch, J. S.; Schiodt, f. V.; Ostapowicz, G.; Shakil, A. O.; Lee, W. M. *Hepatology.* **2005**, 42, 1364-1372.
 - 60) Coles, B.; Wilson, I.; Wardman, P.; Hinson, J. A.; Nelson, S. D.; Ketterer, B. *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, 264, 253-260.
 - 61) Waring, W. S. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2012**, 5, 311-318.
 - 62) Zira, A.; Mikros, E.; Giannioti, K.; Galanopoulou, P.; Papalois, A.; Liapi, C.; Theocharis, S. *J. Appl. Toxicol.* **2009**, 29, 395-402.
 - 63) Hasegawa, H.; Benno, Y. *J. Trad. Med.* **2006**, 23, 42-46.
 - 64) Shimojo, Y.; Ozawa, Y.; Toda, T.; Igami, K.; Shimizu, T. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 9239.
 - 65) Kitaoka, K.; Uchida, K.; okamoto, N.; Chikahisa, S.; Miyazaki, T.; Takeda, E.; Sei, H. *Sleep* **2009**, 32, 413-421.
 - 66) Ho, A. S.; Cheng, C. C.; Lee, S. C.; Liu, M. L.; Lee, J. Y.; Wang, W. M.; Wang, C. C. *J. Biomed. Sci.* **2010**, 17, 58

- 67) Liang, G.; Wolfgang, C. D.; Chen, B. P.; Chen, T. H.; Hai, T. *J. Biol. Chem.* **1996**, *19*, 1695-1701
- 68) Reisman, S. A.; Yeager, R. L.; Yamamoto, M.; Klaassen, C. D. *Toxicol. Sci.* **2009**, *108*, 35-47.
- 69) Ahmed, M. M.; Wang, T.; Luo, Y.; Ye, S.; Wu, Q.; Guo, Z.; Roebuck, B. D.; Sutter, T. R.; Yang, J. Y. *Hepatology* **2011**, *54*, 1322-1332.
- 70) Akiyama, K.; Liang, Y. Q.; Isono, M. *J. Atheroscler. Thromb.* **2015**, *22*, 455-480.
- 71) Matsuzaka, T.; Shimano, H.; Yahagi, N. *J. Lipid. Res.* **2002**, *43*, 107-114.
- 72) Miler, C. W.; Ntambi, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 9443-9448.
- 73) Shin, D. M.; Wang, Z.; Lee, r. *J. Lipid. Res.* **2015**, *56*, 22-37.
- 74) Yang, H.; Kim, J. Y.; Kim, S. O. *J. Ginseng Res.* **2014**, *38*, 194-202.
- 75) Jung, S. H.; Woo, M. S.; Kim, S. Y.; Kim, W. K.; Hyun, J. W.; Kim, E. J.; Kim, D. H.; Kim, H. S. *Int. J. Cancer* **2006**, *15*, 490-497.
- 76) Yamada, Y.; Uemura, H.; Nakaya, H.; Sakata, K.; Takatori, T.; Nagao, M.; Iwase, H.; Iwadate, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *13*, 391-395.
- 77) Kurihara, T.; Niimi, A.; Maeda, A.; Shigemoto, M.; Yamashita, K. *Am. J. Gastroenterol* **2001**, *96*, 1659-1660.
- 78) Knop, V.; Bergk, A.; Schlosser, B, Thieringer, J.; Bommel, F. V.; Frost, N.; Kintscher, U.; Berg, T. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *25*, 594-600.
- 79) Gupta, G.; Krishna, G.; Chellappan, D. K.; Gubbiyappa, K. S.; Candasamy, M.; dua, K. *Mol. Cell Biochem.* **2014**, *393*, 223-228.
- 80) 難波 恒雄 著, 原色和漢薬図鑑 (下), 株式会社保育社, **1980**, 247-248.
- 81) Cao, Y.; Wu, s. H.; Dai, Y. C. *Fungal Divers.* **2012**, *56*, 49-62.
- 82) 久保 道德 編, 新装版 靈芝, 三一書房, **2007**, 9-47.
- 83) 深江 輔仁 他, 本草和名 二卷, 和泉屋庄次郎 出版, **1796**
- 84) 水野 卓 編, キノコの化学・生化学, 学会出版センター, **1992**, 211-221.
- 85) Bishop, K. S.; Kao, C. H.; Xu, Y.; Glucina, M. P.; Paterson, R.; Ferguson, L. R. *Phytochemistry* **2015**, *114*, 56-65.
- 86) 水野 卓 他, 日本農芸化学会誌, **1984**, *58*, 871-880.
- 87) Sone, Y.; Okuda, R.; Wada, N.; Kishida, E.; Misaki, A. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2641-2653.
- 88) 水野 卓 他, 化学と生物, **1985**, *23*, 797-802.
- 89) Xia, Q.; Zhang, H.; Sun, X.; Zhao, H.; Wu, L.; Zhu, D.; Yang, G.; Shao, Y.; Zhang, X.; Mao, X.; Zhang, L.; She, G. *molecules*, **2014**, *19*, 17478-17535.

- 90) Kubota, T.; Asaka, Y.; Miura, I.; Mori, H. *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 611-619.
- 91) Radwan, F. F.; Hossain, A.; God, J. M.; Leaphard, N.; Elvington, M.; Nagarkatti, M. *J. Cell. Biochem.* **2015**, *116*, 102-114.
- 92) Das, A.; Miller, R.; Lee, P.; Holden, C. A.; Lindhorst, S. M.; Jaboin, J. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 7027-7034.
- 93) Yao, X.; Li, G.; Xu, H.; Lu, C. *Planta. Med.* **2012**, *78*, 1740-1748.
- 94) Cao, F. R.; Feng, L.; Ye, L. H.; Wang, L. S.; Xiao, B. X.; Tao, X.; Chang, Q. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 101.
- 95) Kohda, H.; Tokumoto, W.; Sakamoto, K.; Fujii, M.; Hirai, Y.; Yamasaki, K.; Komoda, Y.; Nakamura, H.; Ishihara, S.; Uchida, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 1367-1374.
- 96) Leynaert, B. C.; Neukirch, C.; Liard, R.; Bousquet, J.; Neukirch, F. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **2000**, *162*, 1391-1396.
- 97) Nathan, R. A. *Allergy Asthma. Proc.* **2007**, *28*, 3-9.
- 98) Warrington, R.; Watson, W.; Kim, H. L.; Antonetti, F. R. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2011**, *7*, S1.
- 99) Okubo, K.; Kurono, Y.; Fujieda, S.; Ogino, S.; Uchio, E.; Odajima, H.; Takenaka, H.; Baba, K. *Allergol. Int.* **2011**, *60*, 171-189.
- 100) Fogelmark, B.; Rylander, J. T. *Mediators Inflamm.* **2001**, *10*, 13-19.
- 101) Young, S. H.; Robinson, V. A.; Barger, M.; Whitmer, M.; Porter, D. W.; Frazer, D. G.; Castranova, V. J. *toxicol. Environ. Health.* **2003**, *66*, 25038.
- 102) Ito, T.; Hirose, K.; Norimoto, A. Tamachi, T.; Yokota, M.; Saku, A.; Takatori, H.; Saijo, S.; Iwakura, Y.; Nakajima, H. *J. Immunol.* **2017**, *198*, 61-70.
- 103) Kanno, T.; Adachi, Y.; Doi, K. O.; Matsuhara, H.; Hiratsuka, R.; Ishibashi, K. I.; Yamanaka, D.; Ohno, N. *Allergol. Int.* **2021**, *70*, 105-113.
- 104) Jesenak, M.; Hrubisko, M.; Majtan, J.; Rennerova, Z.; Banovcin, P. *Phytother. Res.* **2014**, *28*, 471-474.
- 105) Kirmaz, C.; Bayrak, P.; Yilmaz, O.; Yuksel, H.; *Eur Cytokine Netw.* **2005**, *16*, 128-134.
- 106) Talbott, S. M.; Talbott, J. A.; Talbott, T. L.; Dingler, E. *Food Sci. Nutr.* **2012**, *1*, 90-101.
- 107) Kimura, Y.; Sumiyoshi, M.; Suzuki, T.; Suzuki, T.; Sakanaka, M. *Inter. Immunopharmacol.* **2007**, *7*, 963-972.
- 108) Chen, S.; Xu, J.; Liu, C.; Zhu, Y.; Nelson, D. R.; Zhou, S.; Li, C.; Wang, L.; Guo, X.; Sun, Y.; Luo, H.; Li, Y.; song, J.; henrissat, B.; Levasseru, A.; Zian, J.; Li, J.; Luo, X.; Shi, L.; He, L.;

- Xiang, L.; Xu, X.; Niu, Y.; Li, Q.; Han, M. V.; Yan, H.; Zhang, J.; Chen, H.; Lv, A.; Wang, Z.; Liu, M.; Schwartz, D. C.; Sun, C. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 913.
- 109) Kumakura, K.; Hori, C.; Matsuoka, H.; Igarashi, K.; Samejima, M. *J. Sci. Food. Agric.* **2019**, *99*, 529-535.
- 110) Ishimoto, Y.; Ishibashi, K. I.; Yamanaka, D.; Adachi, Y.; Ito, H.; Igami, K.; Miyazaki, T.; Ohno, N. *Int. J. Med. Mushrooms.* **2017**, *19*, 1-16.
- 111) Ishimoto, Y.; Ishibashi, K. I.; yamanaka, D.; Adachi, Y. Ito, H.; Igami, K.; Miyazaki, T. Ohno, N. *Int. J. Med. Mushrooms.* **2018**, *20*, 809-823.
- 112) Carpenter, S.; Aiello, D.; Atianand, M. K.; Ricci, E. P.; Gandhi, P.; hall, L. L.; Byron, M.; Monks, B.; Henry-Bezy, M.; Lawrence, J. B.; O'neill, L. A.; Moore, M. J.; Caffrey, D. R.; Fitzgerald, K. A. *Science* **2013**, *16*, 789-792.
- 113) Grasberger, H.; EI-Zaatari, M.; Gand, D. T.; Merchant, J. L. *Gastroenterology* **2013**, *145*, 1045-1054.
- 114) Higuchi, T.; Orita, T.; Nakanishi, S.; Katsuya, K.; Watanabe, H.; Yamasaki, Y.; Waga, I.; Nanayama, T.; Yamamoto, Y.; Munger, W.; Sun, H. W.; Falk, R. F.; Jennette, J. C.; Alcorta, D. A.; Li, H.; Yamamoto, T.; Saito, Y.; Nakamura, M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *16*, 1968-1979.
- 115) Rho, S. S.; Ando, K.; Fukuhara, S. *J. Nippon Med. Sch.* **2017**, *84*, 148-159.
- 116) Singh, V.; Gowda, C. P.; Singh, V.; Ganapathy, A. S.; Karamchandani, C. M.; Eshelman, M. A.; Yochum, G. S.; Nighot, P.; Spigelman, V. S. *J. Biol. Chem.* **2020**, *19*, 8602-8612.
- 117) Brown, G. D.; Gordon, S. *Nature* **2001**, *413*, 36-37.
- 118) Dambuza, I. M.; Brown, G. D. *Curr. Opin. Immunol.* **2015**, *32*, 21-27.
- 119) Goodridge, H. C. Reyes, C. N.; Becker, C. A.; Katsumoto, T. R.; Ma, J.; Wolf, A. J.; Bose, N.; Chan, A. S. H.; Magee, A. S.; Danielson, M. E.; Weiss, A.; Vasilakos, J. P. Underhill D. M. *Nature* **2011**, *472*, 471-475.
- 120) Tang, C.; Kamiya, T.; Liu, Y.; Kadoki, M.; Kakuta, S.; Oshima, K.; Hattori, M.; Takeshita, K.; Kanai, T. Saijo, S.; Ohno, N.; Iwakura, Y. *Cell Host Microbe.* **2015**, *18*, 183-197.
- 121) Huang, H.; Ostroff, G. R.; Lee, C. K.; Agarwal, S.; Ram, S. Rice, P. A.; Specht, C. A.; Levitz, S. M. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 312-317.
- 122) Underhill, D. M.; Rosnagle, E.; Lowell, C. A.; Simmons, R. M. *Blood* **2005**, *106*, 2543-2550.
- 123) Drazen, J. M.; Arm, J. P.; austen, K. F. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 1-5.
- 124) Pawankar, R.; Okuda, M.; Yssel, H.; Okumura, K.; Ra, C. *J. Clin Invest.* **1997**, *99*, 1492-1499.
- 125) Izuhara, K.; ohta, S.; Hiraishi, H.; Suzuki, S.; Taniguchi, K.; Toda, S.; Tanabe, t.; Yasuo, M.;

Kubo, K.; Hoshino, t.; Aizawa, H. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *22*, 2867-2875.