

氏名(国籍)	ふ	こう	かい	(中国)
学位の種類	博士(生物工学)			
学位記番号	博甲第5038号			
学位授与年月日	平成21年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	Extraction of Bioactive Components from Mushroom <i>Inonotus Obliquus</i> and its Activity Evaluation (カバノアナタケからの生理活性成分の抽出とその活性評価)			
主査	筑波大学教授	農学博士	杉浦 則夫	
副査	筑波大学教授	工学博士	王 碧 昭	
副査	筑波大学教授	博士(農学)	張 振 亜	
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	北 村 豊	

論文の内容の要旨

最近、キノコや薬用植物からの多くの天然化合物が様々なガンの治療薬、健康食品等として利用されている。本研究では、抗がん作用を持つ医薬品や機能性食品素材の開発を目的とし、きのこのカバノアナタケ (*Inonotus obliquus*) の抗酸化作用、大腸癌 DLD-1 細胞に対する増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果、そしてマクロファージ RAW264.7 細胞への保護効果を検討した。

まず、SOD 活性アッセイおよび DPPH ラジカル消去活性アッセイによって、カバノアナタケからの熱水抽出物 (50°C, 70°C, and 80°C) とエタノール抽出物の抗酸化作用を検討した。さらに、増殖抑制効果と共にアポトーシス誘導効果についても検討した。エタノール抽出物 (EE) は SOD 様活性と大腸癌 DLD-1 細胞への増殖抑制効果が最も強いことがわかった。また、EE は大腸癌 DLD-1 細胞のアポトーシス誘導効果があったが、熱水抽出物には、効果が観察されなかった。一方、DPPH ラジカル消去活性に関しては、70°C の熱水抽出物 (HWE70) が最大で、EE が最も弱かったことが明らかになった。多糖やタンパク質やポリフェノールの含有量および ¹H-NMR スペクトルの結果により、これらの抽出物の化学組成がそれぞれの活性の違いの原因であることが示唆された。

また、アポトーシス誘導効果における細胞内 ROS/RNS の役割を解明するため、EE をさらに水と酢酸エチルとブタノールで順次分配抽出し、酢酸エチル画分 (EE-EA)・ブタノール画分 (EE-B)・水画分 (EE-W) がそれぞれ得られた。EE-EA は DLD-1 細胞に対する強い増殖抑制効果を示した。しかし、EE-B と EE-W については、増殖抑制効果がなかった。また、EE-EA の添加により、DLD-1 細胞のアポトーシス誘導効果が検出された。EE-EA の添加後、DLD-1 細胞内の SOD が減少し、ROS と NO の産生が増大した。しかし、SOD やビタミン E の添加により、EE-EA による誘導されたアポトーシスが抑制された。これらの結果により、EE-EA による DLD-1 細胞内の ROS/RNS の増加がアポトーシス誘導の引き金となることがあきらかになった。

Doxorubicin による RAW264.7 細胞のアポトーシス誘導における熱水抽出物の阻害効果を検討したところ、80°C の熱水抽出物 (HWE80) はマクロファージ RAW264.7 細胞の増殖を促進し、NO の産生を促進した。一方、

Doxorubicin による RAW264.7 細胞の増殖が抑制され、アポトーシス誘導や ROS の増加が観察された。しかし、HWE80 の添加により、Doxorubicin による RAW264.7 細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導や ROS の増加が阻害された。これらの結果により、HWE80 は RAW264.7 細胞を活性化し、Doxorubicin からの保護効果があることがあきらかになった。

結論として、キノコのカバノアナタケは抗がん剤として癌治療における新しい治療法のオプションを提供することが可能であると考えられる。

審査の結果の要旨

キノコのカバノアナタケの抗酸化作用、大腸癌 DLD-1 細胞に対する増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果、マクロファージ RAW264.7 細胞への保護効果を検討した。

まず、SOD 活性アッセイおよび DPPH ラジカル消去活性アッセイによって、カバノアナタケからの熱水抽出物 (50℃, 70℃, and 80℃) とエタノール抽出物の抗酸化作用を検討した。そして、増殖抑制効果と共にアポトーシス誘導効果についても検討された。エタノール抽出物 (EE) は SOD 様活性と大腸癌 DLD-1 細胞への増殖抑制効果が最も強いことがわかった。また、EE は大腸癌 DLD-1 細胞のアポトーシス誘導効果があったが、熱水抽出物については、観察されなかった。一方、DPPH ラジカル消去活性について、70℃ の熱水抽出物 (HWE70) は最も強かったが、EE は最も弱かった。多糖やタンパク質やポリフェノールの含有量および ¹H-NMR スペクトルの結果により、これらの抽出物の化学組成がそれぞれの活性の違いの原因であることが示唆された。

また、アポトーシス誘導効果における細胞内 ROS/RNS の役割を解明するため、EE をさらに水と酢酸エチルとブタノールで順次分配抽出され、酢酸エチル画分 (EE-EA) とブタノール画分 (EE-B) と水画分 (EE-W) がそれぞれ得られた。EE-EA は DLD-1 細胞に対する強い増殖抑制効果を示した。しかし、EE-B と EE-W については、増殖抑制効果がなかった。また、EE-EA の添加により、DLD-1 細胞のアポトーシス誘導効果が検出された。EE-EA の添加後、DLD-1 細胞内の SOD が減少され、ROS と NO の産生が促進された。しかし、SOD やビタミン E の添加により、EE-EA による誘導されたアポトーシスが抑制された。これらの結果から、EE-EA による DLD-1 細胞内の ROS/RNS の増加がアポトーシス誘導の引き金となることが明らかになった。

Doxorubicin による RAW264.7 細胞のアポトーシス誘導における熱水抽出物の阻害効果を評価したところ、80℃ の熱水抽出物 (HWE80) はマクロファージ RAW264.7 細胞の増殖を促進し、NO の産生を増加した。一方、Doxorubicin による RAW264.7 細胞の増殖が抑制され、アポトーシス誘導や ROS の増加が観察された。しかし、HWE80 の添加により、Doxorubicin による RAW264.7 細胞の増殖抑制、アポトーシス誘導や ROS の増加が阻害された。これらの結果から、HWE80 は RAW264.7 細胞を活性化し、Doxorubicin からの保護効果があることが明らかになった。

キノコのカバノアナタケの抗酸化作用、大腸癌 DLD-1 細胞に対する増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果、そしてマクロファージ RAW264.7 細胞への保護効果が明らかになったことが極めて高く評価できる。

よって、著者は博士 (生物工学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。