

## 生理活性物質の探索

生物工学課 田中 正男

株式会社 牛越生理学研究所 関口 敬子

Research of Physiological ActiveSubstances from *Rhizopus Delemar* U-1MasaoTANAKA<sup>1</sup> and Keiko SEKIGUCHI<sup>2</sup><sup>1</sup> Chiba Industrial Technology Research Institute, <sup>2</sup> Ushikoshi Research Institute for Physiology

*Rhizopus Delemar* 菌の培養麴抽出物は、乳牛の受胎率向上などに関与する生理活性物質を有しており、動物用製剤として商品化されている。その生理活性物質を同定するために、麴の水抽出物をカラムクロマトグラフィーで分離し、分画ごとにマクロファージ活性化能、SOD様活性及びヒアルロニダーゼ阻害活性について測定した。また、脱毛に関与する毛包細胞の増殖促進活性についても測定を行った。その結果、麴抽出物は各種の生理活性物質を含有していた。

## 1. はじめに

*Rhizopus* 属菌の利用は、古くから中国などで食品の製造に利用されてきた。

台湾の土壌より分離した *Rhizopus Delemar* U-1 株の培養麴の抽出物（以下RUと略す）は、生理活性物質を含有する<sup>1, 2, 3)</sup>とされ、現在、動物用医薬品として製品化され、乳牛の受胎率<sup>4)</sup>や成育の向上に利用されている。

また、RUを犬などのペットへの投与で、脱毛の改善<sup>5)</sup>や病気治療にも効果があることが確認されている。

本研究では、RUの有用な生理作用をもたらす因子を特定するため、麴抽出物中の生理活性作用物質について、探索を行なった。

## 解凍抽出液

↓ろ過 セライト

ろ液

↓遠心分離 12,000r.p.m., 20min

上澄

↓ろ過 メンブレンフィルター 1 μm

ろ液

↓減圧濃縮 (~80℃)

濃縮液 (冷蔵保存)

↓使用時に MiliQ-水にて希釈

↓遠心分離 10,000r.p.m., 20min, 4℃

↓ろ過 メンブレンフィルター 0.2 μm

濃縮液 A (冷蔵保存)

## 2. 材料及び方法

## 2.1 試料調製

(培養・抽出---工場での工程)

培地 40Kg (dry weight) + 水道水 55 ㍓

↓←蒸気滅菌 約 80℃, 1.5hr

↓←種菌添加

培養 4days, 夏は 24℃ で加冷, 冬は 27℃ 加温

↓←水道水 500 ㍓

抽出 25min 約 40℃

↓ろ過 400メッシュで遠心分離

抽出液

↓

冷凍保存 (濃縮・スプレードライで製品化)

↓使用時に解凍

解凍した抽出液

## 2.2. ゲルろ過による分画

濃縮液Aを用い、分子量分画可能なSephadex G-25によるゲルろ過を2回 (A1, A7) 行い、流出した分画について、下記の測定1~5の生理活性測定用の試料として調製した。

RUの高知医科大学による研究でSOD活性を持つ物質<sup>2)</sup>が、λ-270nmに吸収を持つと報告されていることから、ゲルろ過はλ-270nmの吸光度を指標に分画した。

また、λ-270nmで特に強い吸収があった分画については、HPLCによる分析も行った。

ゲルろ過A1→ 測定1(マクロファージ活性化能)

ゲルろ過A7	}	測定2 (SOD様活性)
		測定3 (ヒアルロニダーゼ阻害活性)
		測定4 (毛包上皮細胞増殖活性)
		測定5 (発毛促進活性)

### 2. 2. 1 ゲルろ過A1

温度：室温

カラム：SephadexG-25, 25mm φ × 30cm

添加量：濃縮液Aを3ml

溶出液：Mili-Q水

フラクション：5mlずつ分画後、吸収スペクトルをもとに7区分に取りまとめて冷蔵保存し、測定1に供した

### 2. 2. 2 ゲルろ過A7

温度：室温

カラム：SephadexG-25, 25mm φ × 80cm

添加量：濃縮液Aを3ml

溶媒：Mili-Q水

流速：1ml/min

フラクション：15mlずつ分画後、測定2に供した。さらに、λ-270nm吸収の最も高いフラクションを20倍に減圧濃縮、冷蔵保存し、測定3～測定5に供した。

## 2. 3 生理活性の測定

### 2. 3. 1 マクロファージ活性化能の測定（測定1）

静岡県立大学薬学部産業衛生学教室の高木邦明氏に測定いただいた。

マクロファージは、細菌や腫瘍細胞を殺すのに重要な役割を果たしており、また免疫系細胞を刺激する物質を放出し、生体機能の活性化を図っている。

### 2. 3. 2 SOD様活性（測定2）

酵素SOD(SuperOxide Dismutase)は、動植物の中で作られる酵素で活性酸素を消去する機能を持つ。

SODは、活性酸素と老化及び発ガンや病気との関係が活発に研究されており、受胎率向上に関与する因子の可能性として測定を行った。

RUのSOD作用については、好中球を用いたチトクロムc法による報告<sup>2)</sup>がなされている。今回は血中好中球を扱える環境にないため、市販の測定キット(DOJIN WST-SODアッセイキット)を用いて、SOD様活性を測定した。

### 2. 3. 3 ヒアルロニダーゼ阻害活性(測定3)

酵素ヒアルロニダーゼは、真皮中のヒアルロン酸を分解し炎症を引き起こすので、ヒアルロニダ

ーゼ阻害活性が抗炎症作用の指標<sup>6)</sup>となる。

そのため、RUが犬などの皮膚炎や脱毛の改善に効果があるとの報告があるので、ヒアルロニダーゼ阻害活性を測定した。

### 2. 3. 4 毛包上皮細胞の増殖促進活性(測定4)

脱毛したペット犬にRUを投与した結果、脱毛が改善される効果があったので、*invitro*の実験として、毛包上皮細胞の増殖促進活性の測定を行った。

### 2. 3. 5 発毛促進活性(測定5)

発毛促進活を調べるために、抽出液を実験動物(マウス)の毛を刈った背中皮膚に塗布して、発毛の状況を観察した。

試料は再度、0.2μmφのメンブレンフィルターにてろ過後、試験に供した。

## 3 結果

### 3. 1 試料調製

抽出温度が低くて、濃縮時の加熱温度が55℃を超えると冷蔵後に白色の沈殿物を生ずる。

沈殿物の顕微鏡観察により、澱粉ではないかと推察される。濃縮液の冷蔵保存中に微生物が増殖したので、再度ろ過等を行い、濃縮液Aとした。高濃度に濃縮するには、抽出条件を工夫するなどして粘性をおさえる必要がある。

### 3. 2 マクロファージ活性(ゲルろ過A1+測定1)

溶出液を70本のフラクションに集め、5～65本の分画についてλ-270nmの吸光度及び吸収スペクトルのパターン等の相違から7区分に(A1-G4～A1-G7)分けて濃縮し、試料とした(図1・下)。

この区分をもとにマクロファージ活性化能の測定を行った。

細胞の活性化の指標は、一酸化窒素の産生量で示した。活性の指標物質であるLPS(リポポリサッカライド)と比較しても、RUはIFN(インターフェロン)を加えることにより、LPS以上にマクロファージを活性化することが判明した。

7区分に分画する前の濃縮液Aでは、活性が強すぎて細胞が死んでしまったものの、明らかに全区分ともマクロファージを活性化させる作用を持っていた(図1・上)。

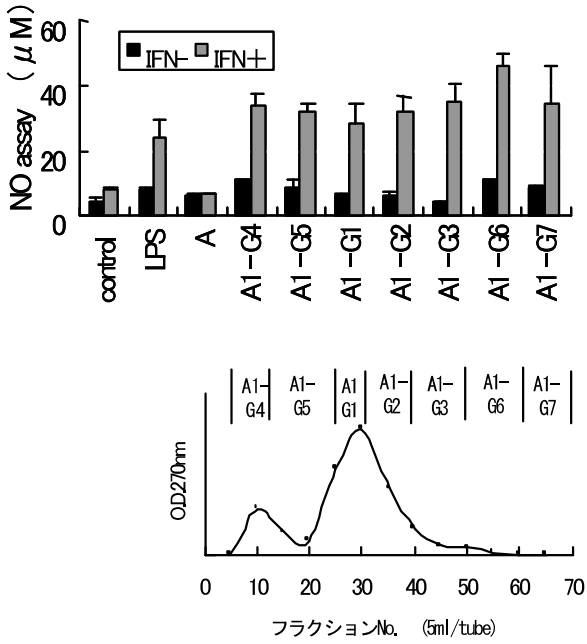


図1-上 各分画におけるマクロファージ活性  
 図1-下 Sephadex G-25による分子量分画

3.3 ゲルろ過A7

図2のようにSephadexG-25による分子量分画で集めたフラクションのうち、5~35本目の分画についてSOD様活性を測定した。

また、λ-270nm 吸収の高いフラクションA7-G25分画(推定分子量約1,000)についてヒアルロニダーゼ阻害活性、発毛促進活性の測定に供した。

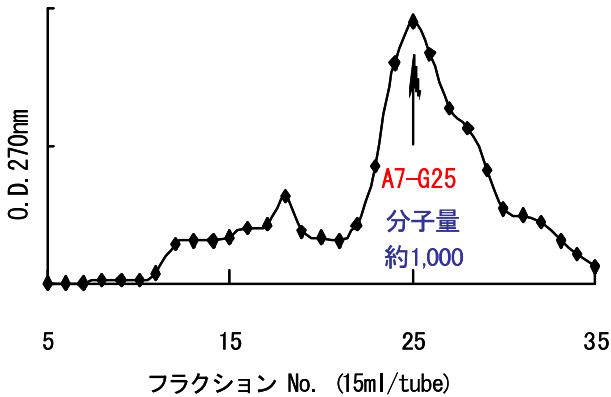


図2 Sephadex G-25による分子量分画

3.4 SOD様活性 (測定2)

RUをSephadex G-25により分画し、各分画についてSOD様活性を測定した結果、すべての分画に活性があり、特に強い活性を持つ分画は特

定できなかった。(図3)

そのため、味噌などの食品について測定した結果、SOD様活性は、ほとんどの物質に存在し、RU中の活性物質を特定するのは困難と思われた。以前に行った血中の好中球を用いたSOD活性測定では、低分子領域に活性が存在したので、測定法によって変動することも考えられる。

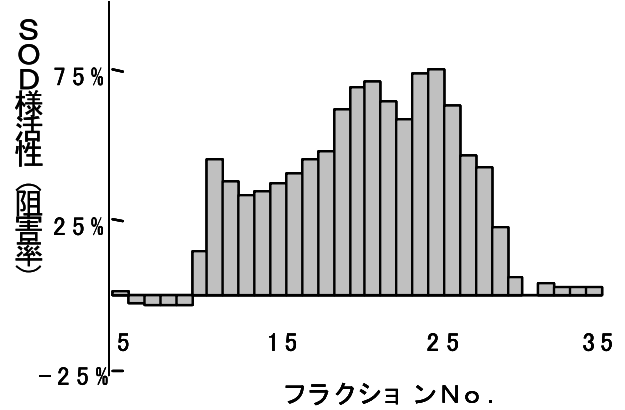


図3 SOD様活性

3.5 ヒアルロニダーゼ阻害活性 (測定3)

抗炎症作用に関与するヒアルロニダーゼ阻害活性については、RUの濃縮液A及びフラクションA7-G25分画を濃縮した試料のみに活性が認められた。濃縮液を希釈した場合には阻害活性は認められなかったため、阻害活性は濃縮による塩類などによって、ヒアルロニダーゼ活性が阻害されていると推察できる。RUによる直接的な阻害活性ではないと考えられる(図4)。

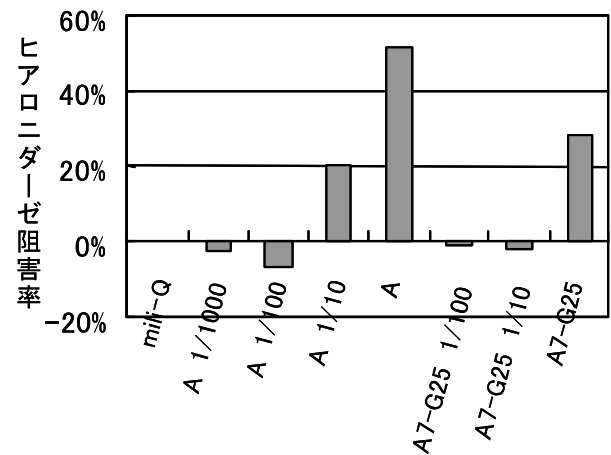


図4 ヒアルロニダーゼ阻害活性

3.6 毛包上皮細胞の増殖促進活性(in vitro)

発毛促進活性については、in vitroの実験で、毛包上皮細胞の増殖促進活性について測定した。

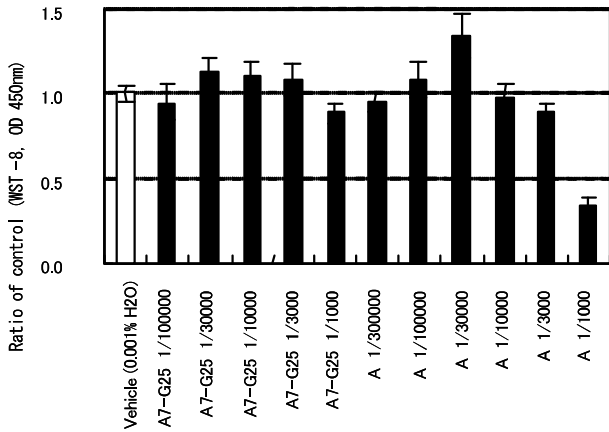


図5 毛包細胞の増殖促進活性

RU抽出液A及びA7-G25画分の濃縮液を100倍~30万倍希釈液について活性を測定した結果、活性が認められているVehicleの1,000倍希釈液より、RU分画物3万倍希釈でも有意な活性があった(図5)。

### 3.7 マウスを用いた発毛促進実験(in vivo)

RUは、in vitro 実験により毛包細胞増殖促進活性の強い物質であったので、in vivo実験として、毛を剃ったマウスの背中皮膚に直接RUを塗布し、発毛の状態を観察した。



写真1 マウスを用いた発毛促進実験

その結果、発毛活性のある物質(Vehicle)とRU抽出物を比較して観察した結果、12日目に活性物質Vehicleには発毛が認められたが、RU抽出物では有意な活性は認められなかった(写真1)。

毛包上皮細胞を用いた増殖促進活性のinvitro実験では、効果が確認されているので、今後は希釈率を変えた試験を行う必要がある。

また、脱毛した犬などのペット動物では、経口投与により6ヶ月で発毛が回復した報告もあるので、経口投与による試験も行う必要がある。

### 4. まとめ

- ①Sephadex G-25による分子量分画を活性物質の指標として、λ-270nmの吸収を用いて分画した。
- ②SOD様活性は、すべての分画に存在して、活性物質の特定は、できなかった。
- ③マクロファージ活性化作用は、インターフェロンとの併用で、広い分画範囲で活性が存在し、特定の分画を決められなかった。
- ④ヒアルロニダーゼ阻害活性については、無いと思われる。
- ⑤毛包上皮細胞の増殖促進活性は、invitro実験において、30万倍希釈においても活性が認められた。
- ⑥RUをマウスに皮膚に塗布した発毛促進試験では、効果が認められなかった。  
今後、希釈率を変えた塗布試験や経口投与による発毛促進試験を行う必要がある。

### 謝辞

今回の研究において、マクロファージ活性化能を測定していただいた静岡県立大学薬学部高木邦明助教授並びにマウスを用いた発毛促進実験や生理活性測定法などのご指導をいただいた(独)産業技術総合研究所の岡 修一氏に深謝します。

### 文献

- 1) 高知医科大学一般教育紀要第8号(1992)
- 2) Clinica Chimica Acta 282(1999)
- 3) 第18回麻布大学環境科学研究会
- 4) 家畜診療第161号(1976)
- 5) 第75回麻布獣医学会講演要旨集(2000)
- 6) Biosci.Biotech.Biochem.,61,1030-1032(1997)