

Phellinus linteus 及び *Fuscoporia obliqua* 菌糸体粗水抽出物
の *in vitro* における抗酸化能の評価

川上 翔平・斎藤 貴

[研究論文] *Phellinus linteus* 及び *Fuscoporia obliqua*
菌糸体粗水抽出物の *in vitro* における抗酸化能の評価

川上翔平¹・斎藤貴²

1 博士前期課程応用化学・バイオサイエンス専攻

2 応用化学科

Evaluation of antioxidant activity *in vitro* for aqueous extracts of
Phellinus linteus and *Fuscoporia obliqua* mycelium

Shohei KAWAKAMI¹, Takashi SAITO²

Abstract

Cancer is one of the causes of death and is increasing year by year in Japan. So, demands for functional food increase for health maintenance to prevent cancer. Mushroom such as *Phellinus linteus* and *Fuscoporia obliqua* are known to be functional foods with anti-carcinogenic action. Because the growth of the mycelium is faster than that of the fruit body of the mushroom, radical scavenging activity, leading to causes of cancer initiation, was measured with those mycelial extracts.

Mycelia of *Phellinus linteus* and *Fuscoporia obliqua* were cultured, and those aqueous extracts were prepared.

As a result, it was found that *Phellinus linteus* mycelium had a higher antioxidant active ability than *Fuscoporia obliqua* mycelium. However, it was also found that the antioxidant active of those fruit body extracts was higher than those of mycelia extracts.

Keywords: *Phellinus linteus*, *Fuscoporia obliqua*, myceliums, antioxidant activity

1. はじめに

2018年における日本人口動態統計によると、年間死者数は136万2470人であり、その要因は(1)悪性新生物、(2)心疾患、(3)老衰、(4)脳血管疾患、(5)肺炎となっており死因別順位の上位には生活習慣病とされる疾患が占めている¹⁾。これらを背景として近年、消費者のセルフメディケーションへの意識が高まっており、食生活において機能性表示食品を摂取する嗜好が増えている。機能性表示食品の中には、担子菌類の子実体部から抽出した成分が用いられていることがある²⁾。これらの中で、*Ganoderma applanatum* (サルノコシカケ)、*Schizophyllum commune* (スエヒロタケ)等の古来より漢方に用いられてきた菌糸体の子実体の熱水抽出物がマウスの腹水腫瘍細胞のSarcoma-180の増殖に対して抑止作用を示すことが報告されて以来³⁾、菌糸体類の子実体の薬理効果に注目が集まっている。

Phellinus linteus (メシマコブ)は、*Aphylllophorales*目 *Hymenochaetales*科 *Phellinus*属に分類される多年草のキノコの一つで、桑の木に優位に寄生する。漢方薬名では桑黄と呼ばれ、古くから煎じ漢方薬として用いられてきた。しかし近年、養蚕産業の減少と共に桑の木が減り、子実体の入手が困難となっている。*Phellinus linteus*の子実体および菌糸体の薬理効果として、熱水抽出し、分画された成

分を添加した際にヒトリンパ球系がん細胞の増殖が抑制されることが報告された⁴⁾。

Fuscoporia obliqua (カバノアナタケ)は、*Hymenochaetales*目 *Hymenochaetales*科 *Inonotus*属に分類されるキノコの一つで、白樺やクルミの古木に優位に寄生する。寄生した菌糸は不定形の腫物状のコブを形成し発達する。深くヒビの入ったコブの表面は黒色で、幹に接触している部分は白色の筋の入った赤黄色である。*Fuscoporia obliqua*のエタノール抽出物がヒト大腸がんDLD-1細胞に対してアポトーシスを誘導し、かつSuperoxide dismutase(SOD)活性を示す⁵⁾。他、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する抗ウイルス効果を示すことが報告されている⁶⁾。これらの菌糸体類は個々に突出した薬理効果を有しているが、その種間での比較検討は報告例が少ないことや子実体の入手が困難であることが問題となっている。

本研究では、*Phellinus linteus*及び*Fuscoporia obliqua*の子実体の生育速度が遅く入手が困難であることから、子実体より生育が速い菌糸体に注目した。*Phellinus linteus*と*Fuscoporia obliqua*について、菌糸体の培養を行い、得られた菌糸体を水抽出し、その抽出物が子実体と同様な薬理効果を有するか検討した。薬理効果に関しては、悪性新生物の発生要因の一つである活性酸素の産生抑制効果を調べるため、活性酸素に起因するラジカルの消去率を基

に菌糸体および子実体の両者の抗酸化活性を比較した。また、抗酸化活性に影響を及ぼすポリフェノール類について、含有量を測定し評価を加えた。

2. 材料および方法

2.1. 菌糸体の培養

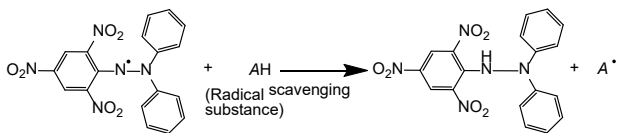
供試菌株として、*Phellinus linteus* (NBRC 6989 株)、*Fuscoporia obliqua* (NBRC 8681 株) を用いた。これら菌糸体株をエビオス培地にて前培養を行った。エビオス培地調製はエビオス $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (アサヒフードヘルスケア株式会社)、D(+)-グルコース $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (関東化学株式会社)、寒天末 $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (国産化学株式会社) の濃度とし調製、オートクレーブ ($121 \text{ }^\circ\text{C}$ 、20 分間) にて滅菌処理した。これらをペトリディッシュ (FALCON $\Phi 15 \text{ mm}$) に分注した培地で、暗所下 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ で 1 ヶ月静置培養を行った。培養 1 ヶ月後の菌種菌株 (Fig.1a) をマツタケ培地に継代し培養を行い、生育を促した。マツタケ培地の組成は、ドライイースト $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (株式会社和光ケミカル) 及び、麦芽エキス $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (関東化学株式会社) を、 $\text{pH} 7.0$ に調製したものを三角フラスコに 250 mL に分注し、オートクレーブ ($121 \text{ }^\circ\text{C}$ 、20 分間) にて滅菌処理したものを、1 ヶ月後の菌種菌株の約 $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ (エビオス培地を含む) のものを培地に添加、暗所下 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ で、振盪培養を行った。

2.2. 粗水抽出物

菌種菌株がマツタケ液体培地内で約 $\Phi 50 \times 40 \text{ mm}$ 程度の大きさに生育した後 (Fig.1b)、ろ紙 (ADVANTEC 5A) で濾別し残渣である菌糸体株から核となった寒天を除去し凍結乾燥機により乾燥させ、乾燥重量を培養日数ごと測定し、粉末化して保存した (Fig.1c)。菌糸体粉末 0.1 g に純水 10 mL を添加し 20 分間室温でインキュベートし、3 分間ボルテックスで振盪し、超音波ホモジナイザーで 3 分間氷上で攪拌後、再度 3 分間ボルテックスで振盪し 4000 rpm で、5 分間遠心分離を行った。得られた上澄み液を水抽出溶液 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ とした。

2.3. 抗酸化活性の測定

食品中の抗酸化能を測定する方法として DPPH ラジカル消去活性法が広く利用されている。DPPH による抗酸化活性の測定は食品機能性評価マニュアル⁷⁾に基づき行った。1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) は合成された安定ラジカルで、ラジカル消去物質が存在すると 1 分子あたり 1 電子の反応を示し、非ラジカル体となる。DPPH 溶液は紫色を示し、ラジカルが消去されると溶液が次第に退色し黄色に変色する。



DPPH 溶液の調製方法および抗酸化活性の測定は次のように行った。DPPH 1.575 mg (東京化成株式会社) を無水エタノール 10 mL (ナカライテスク株式会社) に溶解させた。この DPPH 溶液は長時間保存できないことから測定するごとにマグネチックスターラーを用いて、暗所で 30 分~1 時間攪拌し溶解させた。DPPH による測定では水抽出溶液 $1000 \mu\text{L}$ に対して、 200 mM MES 緩衝溶液 ($\text{pH} 6.0$)

$500 \mu\text{L}$ 、DPPH 溶液 $500 \mu\text{L}$ を加え、20 分間室温でインキュベートし、紫外可視分光光度計 (日本分光株式会社 JASCO V-630) を用いて 520 nm で吸光度 (A_s) 測定した。また、抽出液を $1\text{-}5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ に希釈した際、エタノールを用いて希釈を行った。ネガティブコントロールとして、水抽出溶液の代わりにエタノール $1000 \mu\text{L}$ を対照として用いた A_c 、粗水抽出液の色補正のブランクとして DPPH 溶液の代わりにエタノール $500 \mu\text{L}$ を加えたものを A_b とし、(1)式に代入しラジカル消去率を算出した。

$$\text{DPPH radical scavenging rate} / \% = \frac{A_c - A_s - A_b}{A_c} \times 100 \quad \dots (1)$$

A_c [-] : Control
 A_s [-] : Absorbance of sample
 A_b [-] : Blank

2.4. 総ポリフェノールの測定

総ポリフェノールに用いた Folin-Ciocalteu 法はフェノールやフェノール性水酸基の抗酸化活性を *in vitro* で測定する手法として広く用いている。総ポリフェノールを測定するため、食品機能性評価マニュアル⁸⁾に基づき指標物質に没食子酸を用いて検量線を作成した。Folin-Ciocalteu 法は、リンモリブデン酸とリタンングステン酸からなる Folin-Ciocalteu 試薬を用いた。Folin-Ciocalteu 法は、ポリフェノール存在下において、アルカリ条件下でフェノール化合物の水酸基に生じた電子により、リタンングステン酸/リンモリブデン錯体の青色発色団 (タンングステンモリブデンプルー) を形成する。形成された青色錯体の最大吸収波長は 765 nm を示す。

2.2 章で抽出された菌糸体粗水抽出物に含まれる総ポリフェノールの測定は、水抽出液 2 mL に調製した $10 \text{ vol}\%$ Folin-Ciocalteu 溶液 5 mL 、 $7.5 \text{ wt}\%$ 炭酸ナトリウム溶液 4 mL を加え攪拌し、室温で 60 分反応させた後、紫外可視分光光度計を用いて 765 nm の波長で吸光度を測定し、総ポリフェノールの量 W_T (総ポリフェノール mg /抽出固体 g) を(2)式で算出した。

$$W_T [\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}] = \frac{(D_s - D_i) \times V \times d}{S \times M} \quad \dots (2)$$

D_s [-] : Absorbance of sample
 D_i [-] : Intercept of calibration curve
 S [-] : Gradient of calibration curve
 M [g] : Amount of sample
 V [mL] : Amount of extracts
 d [-] : Diluting ratio

3. 実験結果と考察

3.1. 菌糸体培養における収量

Phellinus linteus 菌糸体の収穫した際の乾燥質量を *Fuscoporia obliqua* 菌糸体と比較した結果を Fig.1d に示した。培養約 20 日後では *Phellinus linteus* 菌糸体 (0.31 g) は、*Fuscoporia obliqua* 菌糸体 (0.036 g) の約 10 倍の収量となり、*Phellinus linteus* 菌糸体の方が成長が早いことが分かった。一般に *Phellinus linteus* 菌糸体は生育が遅いことが知られており、培地に添加物を添加することで生育を

促進させる研究がなされている。その一例としてマツタケ培地に 0.005 vol%のイチョウ葉抽出物を添加することで、培養 20 日後の菌糸体の生育量は添加しない場合と比べて約 4 倍増加することを我々は報告した⁹⁾。

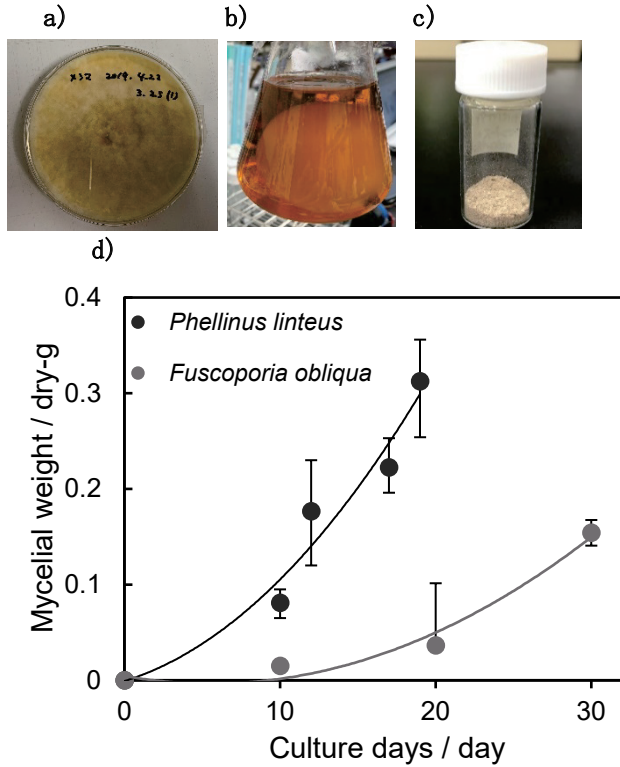


Fig.1 a) Agar medium, b) Liquid culture, c) Dried mycelial powder, d) Change of dry mass of mycelium for each culture days

しかしながら、本研究では *Phellinus linteus* と *Fuscoporia obliqua* の両菌糸体の活性を等しく評価するため、イチョウ葉抽出物の生理活性の影響を避けるため、抽出物は添加せずに培養を行った。その結果 *Fuscoporia obliqua* 菌糸体の方が *Phellinus linteus* 菌糸体よりも生育面において遅いことが明らかとなった。

3.2. 菌糸体粗水抽出物の抗酸化活性能

2.2 章で得られた菌糸体の粗水抽出物を 1-10 mg・L⁻¹ の濃度範囲の条件でラジカル消去率を求めたものを Fig.2 に示した。また、菌糸体と子実体の活性を比較するため、市販されている *Phellinus linteus* 子実体 (健康野草茶センター株式会社、中国産)、*Fuscoporia obliqua* 子実体 (株式会社ピーアットライフ、福島産) を用いて、菌糸体同様に 2.2 章の手順で水抽出を行い、1-10 mg・mL⁻¹ の濃度範囲の条件でラジカル消去率を算出した。その結果、*Phellinus linteus* 菌糸体以外は、抽出物の濃度の増加とともに、ラジカル消去率も増加する傾向が見られた。活性が高いものは、*Fuscoporia obliqua* 子実体であり、低濃度におけるラジカル消去率も 48 % と高く、さらに 10 mg・mL⁻¹ においてはラジカル消去活性能は 100 % に達した。続いて *Fuscoporia obliqua* 菌糸体 77 %、*Phellinus linteus* 子実体 47 %、*Phellinus linteus* 菌糸体 40 % となった。*Fuscoporia obliqua* 菌糸体は *Phellinus linteus* 子実体よりも高い活性を有していることが明らかとなった。このことから、*Fuscoporia obliqua* は抗酸化活性において高い活性能を持つことは、子実体および菌糸体が有する活性物質

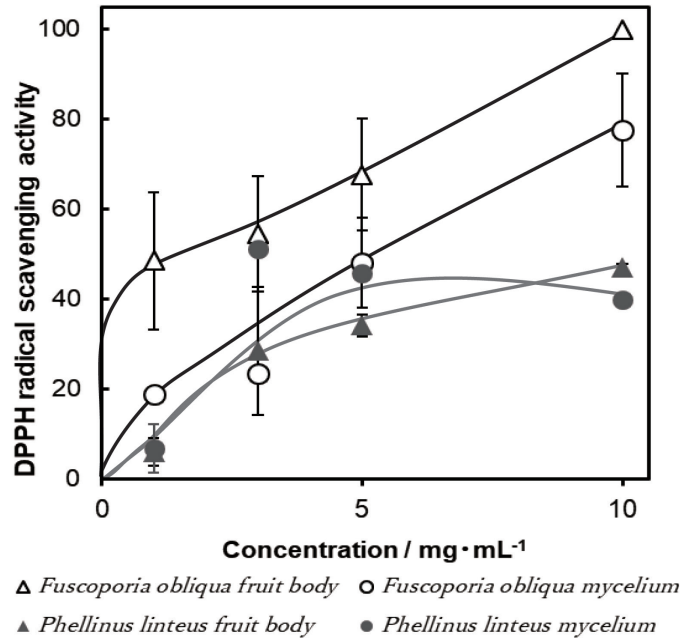


Fig.2 DPPH radical scavenging activity for myceliums and fruiting bodies

の含有量の違い、あるいは異なる活性物質が寄与していると判断される。また、菌糸体粗水抽出物におけるラジカル消去活性が子実体の粗水抽出物と比較して低いのは、1 つには培養の際に液体培地に活性成分が溶出していることに起因していると考えられる。

なお、抗酸化活性において、近年ポリフェノール類が大きく寄与していると示唆されていることが報告されていることから¹⁰⁾、粗水抽出物中の総ポリフェノールの定量を行い種間における含有量を求め、次項で比較検討した。

3.3. 総ポリフェノールの定量

2.4 の方法により、没食子酸の濃度の範囲を 0-5.85 μg・mL⁻¹ として検量線を作成したところ、

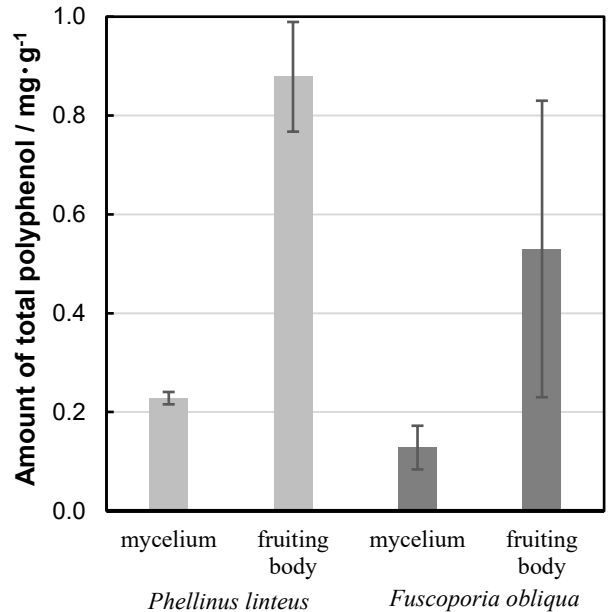


Fig.3 Amount of total polyphenol in myceliums and fruiting bodies

$y = 0.0128x + 0.0069$ 、 $R^2 = 0.9993$ となった。また、粗水抽出物における測定で、吸光度が 1.0 を超えたため、比色定量する際の試料の希釈を 1/100 とした。ここで、(2) 式において、 $S=0.0128$ 、 $D_0=0.0069$ 、 $d=100$ として 2.2 章で得られた菌糸体および子実体の粗水抽出物中の総ポリフェノールを算出した結果を Fig.3 に示した。

2.2 章で得られた菌糸体および子実体粗水抽出物中の総ポリフェノール量は $0.138 - 0.878 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ であり、*Phellinus linteus* 子実体および菌糸体間では 3.8 倍、*Fuscoporia obliqua* 子実体および菌糸体間では 3.9 倍程度の差が生じた。各粗水抽出物 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 中の総ポリフェノール含有量は *Phellinus linteus* 子実体 ($0.878 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) が最も高く、次いで *Fuscoporia obliqua* 子実体 ($0.503 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、*Phellinus linteus* 菌糸体 ($0.228 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、*Fuscoporia obliqua* 菌糸体 ($0.128 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) の順であった。ラジカル消去活性において、最も高い活性を生じたものは *Fuscoporia obliqua* 子実体であるが、含有する総ポリフェノール量は *Phellinus linteus* 子実体と比較すると少ないことが明らかとなった。これは、標準物質として検量線に用いた没食子酸よりも抗酸化活性に高く寄与しているポリフェノールが存在することにより、低濃度の含有で、高いラジカル消去活性を生じていることがわかる。さらに、本実験で用いた抽出試料は粗水抽出物であるためポリフェノール以外の活性成分がラジカル消去活性にも影響を与えていると示唆させる。

天然物の食品に含まれるポリフェノール類のその多くは、配糖体として含まれていることから¹¹⁾、本実験で試料として用いた各担子菌類に含まれているポリフェノール類も同様に多くは配糖体として含有されているものと考えられる。また、経口摂取された抗酸化活性を持つポリフェノール類は、体内でその大部分がアグリコンとして吸収され、血中ではグルクロン酸抱合体などの代謝物と共役している¹²⁾。従って、今後各種担子菌類の粗水抽出物の分画分取を行い、抗酸化活性の高い分画区留中からポリフェノール類等の同定を行う必要があると考えられる。

4. まとめ

Phellinus linteus および *Fuscoporia obliqua* の子実体と菌糸体の計 4 種の粗水抽出物について DPPH ラジカル消去活性を調査し、総ポリフェノール類として定量した。*Phellinus linteus* 子実体および菌糸体、*Fuscoporia obliqua* 子実体および菌糸体の粗水抽出物 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ において、いずれも 40% 以上のラジカル消去活性を示した。子実体の中では *Fuscoporia obliqua* が優位に活性酸素等のラジカル消去を示すことが認められ、培養した菌糸体においても *Fuscoporia obliqua* が高い活性を持っていることが明らかになった。

総ポリフェノール類は、子実体および菌糸体の粗水抽出物 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 中に $0.138-0.878 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ を含んでいた。DPPH ラジカル消去活性と総ポリフェノール類の量と相関が認められなかったが、*Fuscoporia obliqua* には高い抗酸化作用を示すポリフェノール類が含まれていることが示唆された。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 人口動態統計年報 (2018)
- 2) 河岸洋和, きのこの生理活性と機能性の研究, シーエ

ムシー出版, pp.34-38 (2011)

- 3) Tetsuro Ikekawa, Miyako Nakanishi, Nobuaki Uehara, Goro Chihara, and Fumiko Fukuoka, Antitumor Action of Some Basidiomycetes, Especially *Phellinus linteus*, *Gann*, vol.59, pp.155-157 (1968)
- 4) 中嶋加代子, 岸本律子, メシマコブの抗腫瘍活性成分について, 別府大学短期大学部紀要, 第 28 号, pp.1-8 (2009)
- 5) Honghai Hu, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Yingnan Yang, and Norio Sugiura, Comparative study of antioxidant activity and antiproliferative effect of hot water and ethanol extracts from the mushroom *Inonotus obliquus*, *J. of Bioscience and Bioengineering*. vol.107(1), pp.42-48 (2009)
- 6) Toshiaki Ichimura, Osamu Watanabe, and Susumu Maruyama, Inhibition of HIV-1 Protease by Water-Soluble Lignin-Like Substance from an Edible Mushroom, *Fuscoporia obliqua*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol.62(2), pp.575-577 (1998)
- 7) 沖智之, 社団法人日本食品科学工学会品機能性評価マニュアル集第 II 集, pp.71-78 (2007)
- 8) 沖智之, 社団法人日本食品科学工学会品機能性評価マニュアル集第 II 集, pp.1-7(2007)
- 9) 長山純子, 斎藤貴, *Phellinus linteus* 菌糸体の培養と免疫賦活能, 環境バイオテクノロジー学会, vol.19(1), pp.67-72 (2019)
- 10) 石原伸治, 渡辺敏郎, Mazumder Tapan Kumar, 永井史郎, 辻啓介, ラットにおけるメシマコブ菌糸体の血糖値上昇抑止作用, 日本栄養・食糧学会誌, 第 58 巻, 第 4 号, pp.225-229 (2005)
- 11) 上原万里子, フラボノイドと健康, 臨床栄養, 第 102 巻, 第 5 号, pp.541 (2003)
- 12) 宮澤陽夫, 仲川清隆, 浅井明, 天然抗酸化物質の吸収と代謝, 化学と生物, 第 38 巻, pp.104-114 (2000)

工学教育研究推進機構運営会議

議長 上平 員丈

構成委員	木村 茂雄	河原崎徳之	栗原 誠	納富 一宏	馬嶋 正隆
	黄 啓新	高村 岳樹	山口 淳一	小池あゆみ	岡崎 美蘭
	高橋 勝美	一色 正男	井上 秀雄	兵頭 和人	山家 敏彦
	塩川 茂樹	工藤 嗣友	脇田 敏裕	野田 毅	吉満 俊拓
	高橋 正雄	三井 和博	星野 潤	井藤 晴久	

神奈川工科大学研究報告

B-46 理工学編 通巻 46 号

令和 4 年 3 月 1 日 発行

編集兼発行者 神 奈 川 工 科 大 学

〒 243-0292 神奈川県厚木市下荻野1030

電 話 046-241-6221

印 刷 者 株式会社スクールパートナーズ

当該研究報告に掲載された論文の著作権は本学に帰属する。