

# ヤマブシタケの子実体生育に伴う数種生理的機能性の変化

高島 幸司

## Changes of some physiological functions with the development of fruit-bodies, *Hericium erinaceum*

Koji TAKABATAKE

ヤマブシタケの生理的機能性能の観点から子実体の収穫時期を明らかにするために数種の生理的機能性能に関して子実体の生育ステージの進展に伴う変化を検討した。ヤマブシタケ子実体の活性酸素消失作用、過酸化脂質形成抑制作用、ACE阻害作用、グリケーション阻害作用、ヒアルロニダーゼ阻害作用は、子実体の生育ステージの進展に伴って阻害率は高くなり、 $IC_{50}$ 値は小さくなった。これらのことから、ヤマブシタケの収穫適期は、子実体の針が十分に発達した時期と考えられる。

### 1. はじめに

ヤマブシタケ *Hericium erinaceum* (Bull.:Fr.) Pers. は、ブナ、ナラ、カシなどの広葉樹の立木、倒木にはえ、材の白腐れをおこすサンゴハリタケ科のきのこである<sup>1)</sup>。子実体は柄、傘を形成せず、1～5 cmの針を無数に垂らして形成し、内部は多孔質でスポンジ状になっている。

昨今、食用きのこの栄養成分や生理的機能に関する研究が進められ、このことを生活習慣病の予防や病態の回復に役立てるようにと啓蒙されている<sup>2)</sup>。ヤマブシタケは HeLa 細胞増殖阻害物質、神経成長因子合成誘導促進物質、花粉管発芽成長阻害物質、免疫調節成分、抗腫瘍多糖類、レクチンと様々な生理活性成分を有することが報告されている<sup>3)</sup>。ヤマブシタケは野外で採取されることは希であり、通常きのこのこと形態が異なるので、馴染みの薄いきのこである。しかし、健康に良いきのことして注目されており、培地基材に広葉樹オガ粉、栄養材にコーン系糖を用いた菌床で栽培することによって、比較的容易に子実体を形成する<sup>4)</sup>。このため、ヤマブシタケは新規のきのことして市場流通するようになってきた。

一般消費者は、ヤマブシタケに対して生活習慣病

の予防など、健康維持に寄与するきのことしての期待感があることから、ヤマブシタケの生理的機能性能を最大の状態で開催して提供することは消費者ニーズを満たすことと考えられる。そこで、本研究ではヤマブシタケ子実体の生育ステージの進展に伴って変化する数種の生理活性について調査し、生理的機能性の観点から見たヤマブシタケの収穫適期について検討した。

### 2. 材料および方法

#### 2.1 供試菌および接種源

供試菌は、富山県林業技術センター保存菌株、ヤマブシタケ Her-14 を供試した。

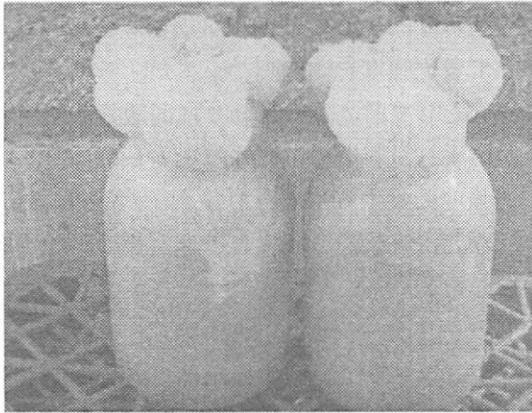
市販種菌用ブナオガ粉と米ぬかを乾重量比で 4 : 1 に混合し、含水率を 65% (湿量基準) に調整して接種源用培地とした。接種源用培地に予め PDA 培地で供試菌を 25°C にて 14 日間培養した菌糸体を接種し、25°C で 6 週間培養して菌床栽培用の接種源とした。

#### 2.2 ヤマブシタケの栽培条件および収穫時期

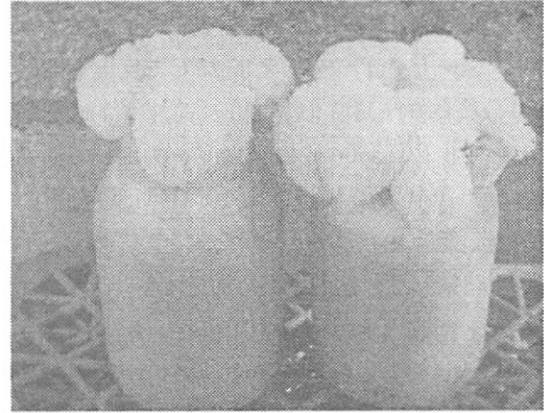
培地基材に市販種菌用ブナオガ粉、栄養材にコーンブランを用いた。培地基材と栄養材を乾物重量比

で1:1に混合して供試培地とした。なお、培地含水率は、水道水で65% (湿量基準) に調整した。ポリプロピレン製 850mlビンに供試培地を 520 g 詰め、118°C・1.2 気圧の条件で 45 分間、高圧滅菌処理をした。放冷後、供試菌を約 10g 接種した。その後、 $21 \pm 2^\circ\text{C}$  にて 28 日間培養を行い、培養終了後、培養基を発生室 ( $12 \pm 2^\circ\text{C}$ , 相対湿度 90% 以上, 照度 300lux) に移し、子実体形成を促した。

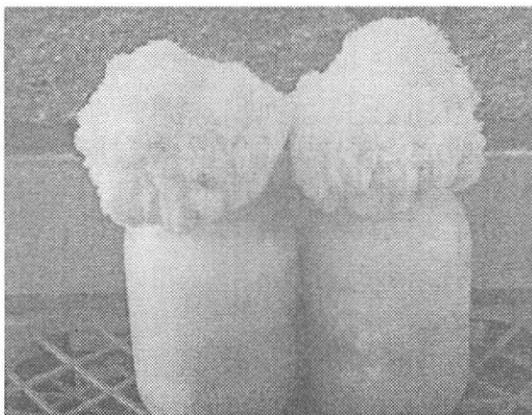
子実体の生育ステージを次の 4 期に区分して収穫した (図-1)。ステージ 1 (S1): 子実体の針の長さが 15mm 以下, ステージ 2 (S2): 子実体の針の長さが 15~25mm, ステージ 3 (S3): 子実体の針の長さが 25mm 以上で胞子が落下していない, ステージ 4 (S4): 子実体の針が 25mm 以上で胞子の落下が認められる時期とした。



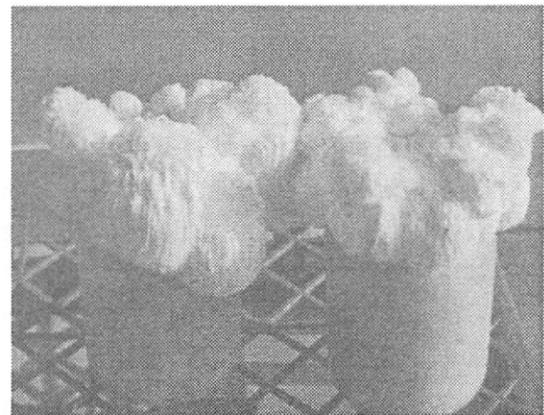
ステージ 1



ステージ 2



ステージ 3



ステージ 4

図-1 収穫区分したヤマブシタケ子実体の生育ステージ

ステージ 1 : 子実体の針の長さが 15mm 以下

ステージ 2 : 子実体の針の長さが 15~25mm

ステージ 3 : 子実体の針の長さが 25mm 以上で胞子が落下していない

ステージ 4 : 子実体の針の長さが 25mm 以上で胞子の落下が認められる

## 2.3 生理的機能性能の測定

生理的機能性能として活性酸素消失作用, 過酸化脂質形成抑制作用, アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害作用, グリケーション阻害作用, ヒアルロニダーゼ阻害作用を測定した。

### 1) 試料調整

収穫したヤマブシタケ子実体 100 g を 1 辺 5 mm 程度のサイの目きりにし, 300ml エタノールで  $4^\circ\text{C}$  にて 72 時間抽出し, 濾過した。濾液を  $40^\circ\text{C}$  以下で減圧濃縮して乾固し, 10% DMSO (ジメチルスルホキシド) 10ml に溶解して試料とした。

### 2) エタノール抽出物およびフェノール性成分の定量

エタノール抽出物量は, 所定量の試料を秤量し,  $105^\circ\text{C}$  下で乾固して再び秤量し, 試料中のエタノール

抽出物含量を算出した。なお、秤量した試料と同量の10%DMSOを105°C下で乾固し、秤量して補正した。

試料中のフェノール性成分量をFolin-Denis法<sup>12)</sup>で測定し、カテキンを標準として求めた。試料0.5 mlにFolin-Denis 試薬0.5 mlを加え、3分後に10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液0.5 mlを加えた。30分間静置した後、700nmの吸光度を測定し、カテキン相当量を算出した。

### 3) 活性酸素消失作用

活性酸素消失作用とは発生した活性酸素を除去する作用のことであり、NBT (ニトロブルーテトラゾリウム) 法によって測定した<sup>5,6)</sup>。50 mM炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.2) 2.5 ml, 0.75 mM NBT溶液0.1 ml, 3 mMキサンチン0.1 ml, 3.0 mM EDTA溶液0.1 ml, 0.15% BSA溶液0.1 ml, 試料0.1 mlを加えて25°Cにて20分間放置後、0.19 U/mlキサンチンオキシダーゼ0.1 mlを加えて25°Cで反応を開始した。20分後に6 mM塩化銅 (II) 溶液0.1 mlを加えて反応を停止し、560 nmの吸光度を測定して活性酸素量とした。試料の代わりに10% DMSOを用いて対照区とした。また、それぞれのブランク区として6 mM塩化銅 (II) 溶液を予め加えてキサンチンオキシダーゼと反応させたものを用いた。対照区より試料区の吸光度を差し引き、その値の対照区の吸光度に対する割合を活性酸素消失率とした。

なお、実験を2回繰り返して、その平均値を測定値とした。

### 4) 過酸化脂質形成抑制作用

過酸化脂質形成抑制作用とは、活性酸素の発生源になっている脂質の酸化を妨げる作用のことであり、TBA (チオバルビツール酸) 法によって測定した<sup>5,6)</sup>。0.1%リノール酸1.8 mlに試料0.2 mlを加え、紫外線を3時間照射して過酸化脂質を生成させた。この反応液0.5 mlに0.2 M BHT (ジブチルヒドロキソトルエン) 10  $\mu$ l, 55 mM TBA 750  $\mu$ l, 3.4 M酢酸750  $\mu$ lを加え、95°Cにて60分間加熱処理した。その後、冷却してn-ブタノール4 mlを加えてよく振盪した後、2000 rpmで10分間遠心処理し、n-ブタノール層溶液の吸光度525 nmを測定して過酸化脂質量とした。試料の代わりに10% DMSOを用いて対照区とした。また、それぞれのブランク区として紫外線照射しないものを用いた。対照区より試料

区の吸光度を差し引き、対照区の吸光度に対する割合を過酸化脂質形成抑制率とした。

なお、実験を2回繰り返して、その平均値を測定値とした。

### 5) ACE阻害作用

ACEは、血圧を上昇させるアンジオテンシン II を生成する。ACE阻害作用はACEの作用を妨げ、高血圧予防に関連する<sup>7)</sup>。ACE阻害作用は以下の方法で測定した<sup>8)</sup>。ACEはウシ肺由来を用いた。試料30  $\mu$ lと0.002 U/ml ACE 200  $\mu$ lを混合して37°Cにて15分間予備加温する。その後、5 mMヒプリルヒスチジルロイシン200  $\mu$ lを加えて、37°Cにて30分間加温し、0.1 M NaOH 1.6 ml, 15 mM o-フタルアルデヒド・メタノール溶液80  $\mu$ lを加えて室温で15分間放置し、1.5 Mリン酸溶液320  $\mu$ lを加え、励起波長360 nm, 蛍光波長450 nmにおける蛍光強度を測定した。試料の代わりに0.1 M HEPE S緩衝液を用いて対照区として蛍光強度を測定した。また、それぞれのブランク区として酵素液の代わりに同緩衝液を用いた。対照区より試料区の蛍光強度を差し引き、対照区の蛍光強度に対する割合をACE阻害率とした。

なお、実験を2回繰り返して、その平均値を測定値とした。

### 6) グリケーション阻害作用

グリケーション阻害作用は、老化や糖尿病慢性合併症の発症、進展の原因になるグリケーション作用を妨げる作用であり、以下の方法で測定した<sup>9)</sup>。

試料、50 mg/ml BSA, 200 mMフラクトースを濾過除菌し、それぞれ0.3 ml, 1.2 ml, 1.5 mlを分注して混合し、37°Cで7日間、暗黒下で静置し、励起波長360 nm, 蛍光波長450 nmにおける蛍光強度を測定した。試料の代わりに10% DMSOを用いて対照区とした。また、それぞれのブランク区としてフラクトース溶液を除いたものを用いた。対照区より試料区の蛍光強度を差し引き、対照区の蛍光強度に対する割合をグリケーション阻害率とした。

なお、実験を2回繰り返して、その平均値を測定値とした。

### 7) ヒアルロニダーゼ阻害作用

ヒアルロニダーゼ阻害作用は、肥満細胞からのヒスタミン遊離に関連するヒアルロニダーゼを阻害する作用であり、抗アレルギー作用の指標になっている<sup>10)</sup>。ヒアルロニダーゼ阻害作用は、以下の

表一 1 ヤマブシタケ子実体の生育に伴うエタノール抽出物並びにフェノール性成分の含有量

生育ステージ	子実体中のエタノール抽出物 (mg/g 生重)	子実体中のフェノール性成分 (μg/g 生重)	エタノール抽出物中のフェノール性成分 (μg/mg)
S1	35.1	178.1	5.07
S2	35.5	174.9	4.93
S3	35.4	160.1	4.52
S4	37.6	137.0	3.64

方法で測定した<sup>11)</sup>。試料 0.1ml, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0), 同緩衝液 0.1ml に溶解したヒアルロニダーゼ (110U) を加え, 37°C で 20 分間放置後, 50% compound 48 / 80 0.2ml を加え, 0.008% ヒアルロン酸ナトリウム 0.5ml を加えて 37°C で 40 分間加温処理し, 0.4N NaOH 0.2ml 加えて氷冷し 4.95% ホウ酸溶液 (pH9.1) 0.2ml 加えて 3 分間沸騰する。氷冷後, 1%p-DAB (ジメチルアミノベンズアルデヒド) 試薬 6ml を加えて 37°C で 20 分間加温した後, 585nm の吸光度を測定する。試料の代わりに 0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.0) を用いて対照区として吸光度を測定した。また, それぞれのブランク区として酵素液の代わりに同緩衝液を用いた。対照区より試料区の吸光度を差し引き, 対照区の吸光度に対する割合をヒアルロニダーゼ阻害率とした。

なお, 実験を 2 回繰り返す, その平均値を測定値とした。

8) IC<sub>50</sub> 値の算出

IC<sub>50</sub> 値は各々の生理活性に関して, 阻害率 50% を示す反応液中の試料濃度であり, 本実験ではエタノール抽出物の濃度を算出した。

IC<sub>50</sub> 値を算出するために試料を 10% DMSO で 2, 3, 4 倍に希釈し, 活性酸素消失作用, 過酸化脂質形成抑制作用, ACE 阻害作用, グリケーション阻害作用, ヒアルロニダーゼ阻害作用に関して, 前述の実験方法の試料を各々の希釈試料に代えて阻害率を測定した。実験を 2 回繰り返す, その平均値を測定値とした。

阻害率と試料中のエタノール抽出物含量との回帰式 (指数曲線, R<sup>2</sup> > 0.95) を求めて阻害率 50% でのエタノール抽出物含量を算出し, さらに各々の生理活性試験における反応液中のエタノール抽出物濃度を算出した。

したがって, IC<sub>50</sub> 値は値が低いほど, その物質の生理活性が強いことを示す。

3. 結果

3.1 ヤマブシタケの生育特性

ヤマブシタケ子実体は, 培養基を発生室に移し, 10 日後に S 1 の状態になり, さらに 2 日後に S 2 に, S 2 の状態から 2 日後に S 3 となり, さらに 2 日後に S 4 の状態になった。市場で流通している子実体は, S 2 の状態で収穫していると考えられる。

3.2 エタノール抽出物, フェノール性成分含量

ヤマブシタケ子実体の生育に伴うエタノール抽出物並びにフェノール性成分の含量を測定した結果を表一 1 に示す。子実体中のエタノール抽出物は, S 1, S 2, S 3 では 35.1 ~ 35.5 (mg/g 生重) と同程度の含量であり, S 4 で 37.6 (mg/g 生重) とやや多くなった。子実体中のフェノール性成分含量, エタノール抽出物中のフェノール性成分含量は S 1 で最も多くなり, 生育ステージが進展するにつれて減少する傾向を示した。S 3 から S 4 の減少量は S 1 から S 3 にかけての減少量より大きくなった。

3.3 生理的機能性能

各々の生育ステージ毎に同量のヤマブシタケ子実体に対する生理的機能性能の阻害率を測定した結果を図一 2 に示した。抗酸化作用である活性酸素消失作用, 過酸化脂質形成抑制作用ともに S 1 で最も低くなり, 子実体の生育ステージが進展するに従い阻害率は高くなる傾向を示した。ACE 阻害作用は S 1 が 73% と最も低くなり, 子実体の生育ステージが進展するに従い阻害率は高くなる傾向を示し, S 4 では 100% となった。グリケーション阻害作用では, いずれの生育ステージでも 90% 以上の高い阻害率を示したが, S 1 が 90% となり, 子実体の針が 15mm 以上に発達した S 2 以降で S 1 より高い値を示した。ヒアルロニダーゼ阻害作用は, 生育ステージ間で顕著な差は認められなかったが, S 1 に比べて S 2, S 3, S 4 では阻害率がやや高くなった。

ヤマブシタケ子実体の生育に伴う生理的機能性能

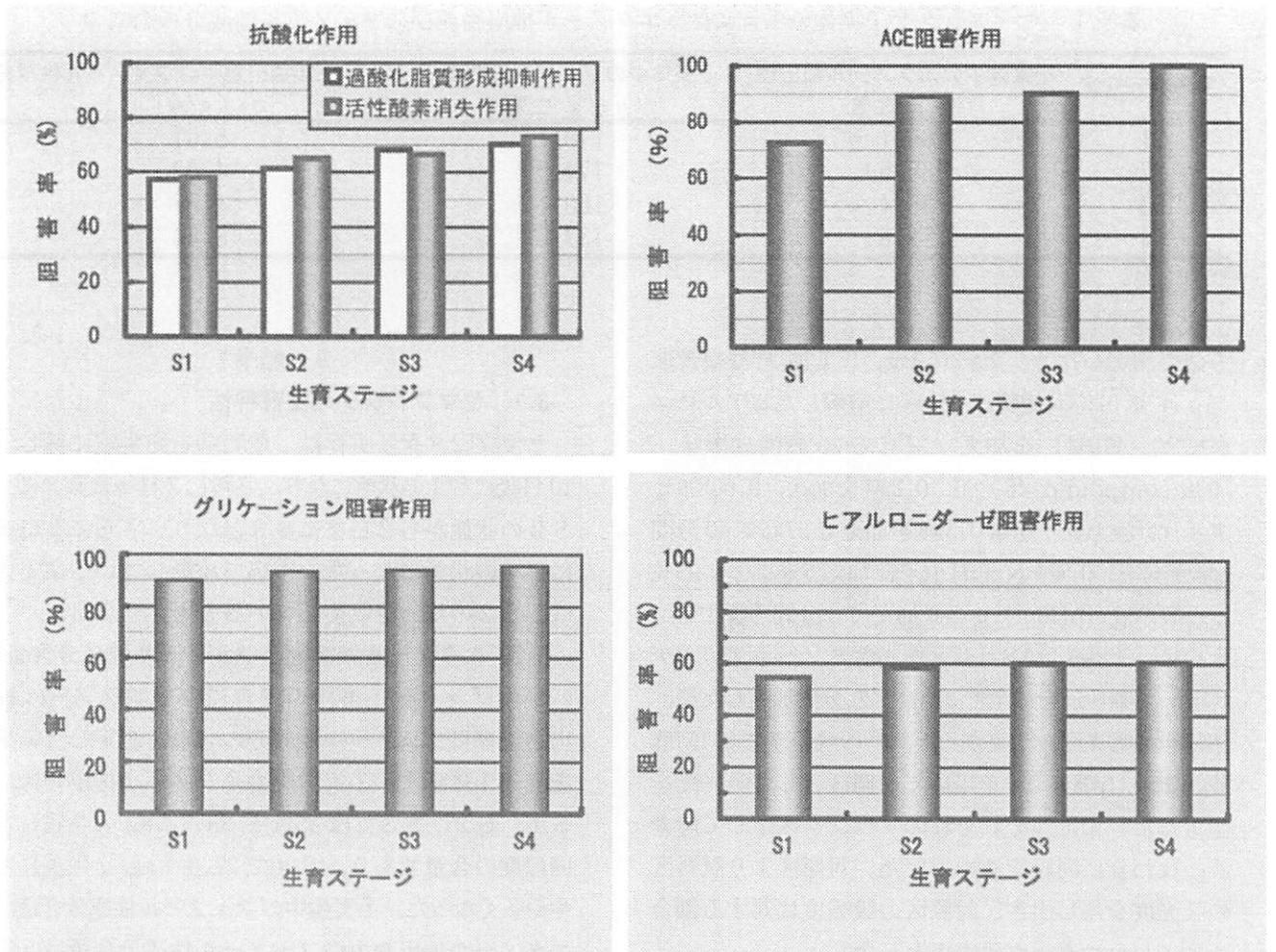


図-2 ヤマブシタケ子実体の生育に伴う数種生理的機能性能の阻害率の変化

の  $IC_{50}$  値を算出した結果を表-2に示す。抗酸化作用に関して活性酸素消失作用はS1で9.16 mg/mlとなりS2, S3と生育ステージが進展すると8.19 mg/ml, 7.90 mg/mlと作用が強くなり, S4では7.82 mg/mlと, さらに強くなった。過酸化脂質形成抑制作用はS1で24.66 mg/mlとなり, 生育ステージが進展するにつれて強い作用を示し, S4では17.41 mg/mlとなった。ACE阻害作用はS1で9.14 mg/mlとなり, 生育ステージが進展するにつれてS2, S3で7.51 mg/ml, 7.24 mg/mlと強い阻害作用を示し, S4では3.14 mg/mlと, さらに強い作用を示した。グリケーション阻害作用はS1で12.20 mg/mlとなり, 生育ステージが進展するにつれてS2, S3で5.43 mg/ml, 5.48 mg/mlと強い阻害作用を示し, S4では3.15 mg/mlと, さらに強い阻害作用を示した。ヒアルロニダーゼ阻害作用は, S2が25.31 mg/mlと最も強い作用を示し, その後生育ステージが進展するにつれて弱くなり, S4では

31.73 mg/mlとS1と同程度となった。

#### 4. 考察

ヤマブシタケ子実体の活性酸素消失作用, 過酸化脂質形成抑制作用, ACE阻害作用は, 子実体の生育ステージの進展に伴って高くなる傾向を示した。グリケーション阻害作用, ヒアルロニダーゼ阻害作用は, S1が最も低くなり, 子実体の針が15mm以上に発達したS2以降の状態では, ほぼ同程度の阻害率を示した。また, 供試した生理的機能性能では,  $IC_{50}$ 値は, ヒアルロニダーゼ阻害活性を除いた全ての生理的機能性能で, 子実体の生育ステージの進展に伴って活性が強くなった。これらのことは, 生理的機能性能の観点からヤマブシタケの収穫適期は生育ステージが進展したS4を示唆している。しかし, 子実体から胞子が落下したS4の状態では収穫するとヤマブシタケの商品としての寿命が他の生育ステージのものより短くなる。また, ヤマブシタケは他の栽培き

表一 2 ヤマブシタケ子実体の生育に伴う数種生理的機能性能の IC<sub>50</sub>値 (mg/ml) の変化

生育ステージ	抗酸化作用		ACE阻害作用	グリケーション阻害作用	ヒアルロニダーゼ阻害作用
	活性酸素消失作用	過酸化脂質形成抑制作用			
S1	9.16	24.66	9.14	12.20	31.48
S2	8.29	23.03	7.51	5.43	25.31
S3	7.90	20.42	7.24	5.48	28.48
S4	7.82	17.41	3.14	3.15	31.73

IC<sub>50</sub>値 (mg/ml) : 阻害率50%になる反応液中のエタノール抽出物濃度

のこに比べて日持ちが悪いきのこであるため、S4で収穫すれば店持ちの悪さが際だつこととなる。子実体を朝採りして即日販売するのであれば、収穫適期はS4が妥当であるが、市場流通では、店持ちを考慮に入れる必要がある。したがって、通常にはS3の状態、即ち子実体の針が十分に発達した時期が収穫適期と考えられる。

マンネンタケの2次代謝成分であるトリテルペン類は、菌柄部、傘肉部、管孔部では、管孔部で最も多く蓄積されている<sup>13)</sup>。生理的機能性能に関与するヤマブシタケ子実体成分も2次代謝成分が関与していると報告されていること<sup>3)</sup>から、それらの成分が子実層の発達とともに形成されるので、生育ステージの進展に伴って生理的機能性能も強くなったと推察される。

春日らは150種のきのこの抗酸化能を測定し、約3分の1のきのこに何らかの抗酸化能のあることを明らかにした<sup>14)</sup>。特にイグチ科ヌメリイグチ属の6種に強い抗酸化能を有し、色素成分が関与していることを明らかにした<sup>15)</sup>。葎田らはアントシアニン含有量の高い赤カブの品種が高い抗酸化作用を示し<sup>5)</sup>、ポリフェノール含有量と強い相関関係があることを明らかにした<sup>6)</sup>。また、メグスリノキ葉のメタノール抽出物にはグリケーション阻害作用を有し、ポリフェノール性成分の含有量とグリケーション阻害作用に相関関係があることが報告されている<sup>9)</sup>。ヤマブシタケ子実体の抗酸化作用、グリケーション阻害作用もフェノール性成分が関与していると推察される。しかし、ヤマブシタケ子実体中のフェノール性成分、エタノール抽出物中のフェノール性成分含有量は子実体の生育ステージが進展するにつれて減少した。また、エタノール抽出物の抗酸化作用、グリケーション阻害作用のIC<sub>50</sub>値は生育ステージが進展するにつれて減少し、強い阻害作用を示した。これらのことから、ヤマブシタケ子実体の抗酸化作用、グリケー

ション阻害作用の阻害率が子実体の生育ステージの進展に伴って高くなったのは、フェノール性成分の含有量に依存するのではなく、フェノール性成分が質的变化したものと推察される。

ACE阻害作用はハタケシメジ、マイタケ、シイタケで強い作用を有し、ペプチドの関与が報告されている<sup>7)</sup>。このことからヤマブシタケ子実体のACE阻害作用にもペプチドが関与していると推察されるが、IC<sub>50</sub>値が子実体の生育ステージに伴って低くなっているため、ヤマブシタケ子実体のペプチド関連物質は子実体の生育ステージに伴って質的に変化したことが予想される。

#### 引用文献

- 1) 今関六也, 本郷次雄: 原色日本新菌類図鑑 (II), 保育社, 大阪, pp.108 (1989)
- 2) 菅原龍幸: きのこと健康, (社) 全国林業改良普及協会, 東京, pp.73-97 (2001)
- 3) 水野 卓, 川合正充: キノコの化学・生化学, 学会出版センター, 東京, pp.309-312 (1992)
- 4) 大森清寿, 小出博志編: キノコ栽培全科, 農文協, 東京, pp.216-219 (2001)
- 5) 葎田隆治, 村尾るみこ, 佐々木千博, 松浦信康, 生方 信: 赤カブにおける生体機能調節物質, 富山県立大学紀要, 9, 83-86 (1999)
- 6) 葎田隆治, 宝田千春, 荒木一登, 松浦信康, 生方 信: 赤カブの葉柄部における抗酸化能の評価, 富山県立大学紀要, 10, 103-108 (2000)
- 7) 卯川裕一, 安藤雅之, 古市幸生, 苔庵泰志, 西井孝文, 久松 眞: ハタケシメジのアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性および抗腫瘍活性, 日本食品科学工学雑誌, 48 (1), 58-63 (2001)
- 8) 久保義博, 松原利行, 松永孝之, 高橋 敏, 長谷川千佳, 小善圭一, 瀬戸陽一: II 資料 微細藻類等による有用物質 (医薬, 農薬, 食品等)

- の抽出・生産，平成10年度富山県薬事研究所年報，26，103-105 (1999)
- 9) 長谷川千佳，松永孝之：メグスリノキ葉抽出物のグリケーション阻害活性，平成9年度富山県薬事研究所年報，25，49-52 (1998)
- 10) 前田有美恵，山本政利，増井俊夫：ヒアルロニダーゼ阻害活性を指標とした柑橘類の抗アレルギー作用，静岡県衛生環境センター報告，34，19-23 (1991)
- 11) 久保義博，小善圭一，瀬戸陽一：海洋深層水由来珪藻抽出物のHyaluronidase阻害活性，海洋深層水研究，3 (2)，71-76 (2002)
- 12) Swain, T., Hills, W. E.: The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents, *J.Sci.Food.Agric.*, 10, 63-68 (1959)
- 13) 高島幸司：マンネンタケの子実体形成にともなう子実体およびその構成部位のトリテルペン類含有率の変化，富山県林技セ研報，11，16 (1998)
- 14) 春日敦子，青柳康夫，菅原龍幸：キノコ類抽出物の抗酸化活性，日本食品工業学会誌，40 (1)，56-63 (1993)
- 15) Kasuga, A., Aoyagi, Y., Sugahara, T.: Antioxydant activity of fungus *Suillus bovinus* (L:Fr.) O.Kuntze, *J.Food Sci.*, 60 (5), 1147-1150 (1995)

### Summary

Changes of some physiological functions with the development of fruit-bodies, *Hericium erinaceum*, were investigated in order to determine the time when those functions would be high. The inhibitory activities and IC<sub>50</sub> values of the active oxygen elimination effect, the peroxy lipid formation inhibitory effect, the angiotensin I-converting enzyme inhibitory effect, the inhibitory effect of glycation reaction and the hyaluronidase inhibitory effect were increased and decreased by the development of the growth stage of fruit-bodies, *H. erinaceum*, respectively. Therefore, it was concluded that when needles of fruit-bodies, *H. erinaceum*, were sufficiently developed, it was suitable for the optimum yield from the point of view of physiological functions.