

担子菌由来物質による生活習慣病予防に関する研究 (第1報)

Studies on Prevention against the Life-Style Related Disease
by Ingredients of Basidiomycetes (I)

坂倉 元¹⁾, 西井 孝文¹⁾, 苔庵 泰志²⁾,
古市 幸生³⁾, 久松 眞³⁾

Hajime SAKAKURA, Takafumi NISHII, Yasushi KOKEAN,
Yukio FURUICHI and Makoto HISAMATSU

要旨: 三重県産のきのこの機能性成分の調査を行った。その結果、食物繊維量は、原木シイタケが最も多かったが、それに匹敵するハタケシメジ野生株もあった。遊離アミノ酸含量は、ハタケシメジの亀山1号株が多かった。ACE阻害活性は、ばらつきが多く、一層の資料収集が必要と思われた。一方、きのこを動物に食べさせる実験を行ったところ、ヒラタケのみに抗腫瘍作用が、ハタケシメジと原木シイタケの肝機能障害抑制作用が、ブナシメジの脂質代謝改善作用が明らかになった。

はじめに

近年、我が国で増加している生活習慣病（ガン、高血圧、心疾患、糖尿病等）を回避するには、日頃の食生活や習慣を改善する健康づくりや定期的検診など、保健予防の推進が不可欠である。なかでも我々が毎日口にする食品は、最近、単なる栄養成分としての認識だけではなく、その機能性にまで国民の関心は高まっている。古くから食べられているきのこは、食物繊維を多く含むため便秘に良いとされ、健康食品として有名であるが、さらなる機能性を探求する試みが全国各地でなされている。我々も、平成10年から3カ年間、県内産のハタケシメジ亀山1号株について、血圧上昇抑制作用、抗腫瘍作用、抗コレステロール作用等の有効性を明らかにしてきた（卯川ら2001a, 2001b）。これらの研究成果を踏まえ、三重県産のきのこの機能性成分の調査、および現在三重県で生産されている主なきのこを動物に食べさせた場合の抗腫瘍作用、肝機能障害抑制作用および脂質代謝改善作用について検討した。

本文に先立ち、本研究の動物実験にご協力いただいた岩出菌学研究所の伊藤均先生に深謝する。

¹⁾ 三重県科学技術振興センター林業研究部
〒515-2602 三重県一志郡白山町二本木 3769-1
²⁾ 三重県科学技術振興センター工業研究部
〒514-0819 三重県津市高茶屋5丁目5-45
³⁾ 三重大学生物資源学部
〒514-8507 三重県津市上浜町 1515

材料と方法

1. 三重県産きのこの機能性成分

1. 1 食物繊維量

食物繊維量の測定は、ハタケシメジが、栽培品種亀山1号（ビン栽培）、野生株 LD 96-5 と LD 97-1（以上ビン栽培）、LD 96-6，LD 96-8，LD 99-4，LD 99-12（以上菌床埋込栽培）、シイタケ（菌床栽培・原木栽培）、ヒラタケは 208 号菌株（ビン栽培）、エノキタケは市販品（ビン栽培）の子実体を用いた。きのこの子実体は、50℃で 48 時間乾燥し、粉碎して供試した。

試料 1 g を 500 ml の三角フラスコに精秤し、0.08 mol/l リン酸緩衝液（pH 6.0）50 ml，ターマミル液 0.1 ml を加えた。三角フラスコにアルミ箔でふたをし、沸騰水中で 30 分間振とうしながらインキュベートした。30 分経過後氷水中で放冷し、0.275 mol/l NaOH 溶液で pH 7.5±0.1 に調整後、プロテアーゼ溶液 0.1 ml を加えた。これにアルミ箔でふたをし、60℃の水中で 30 分間インキュベートした。氷水中で放冷後、0.325 mol/l 塩酸で pH 4.3±0.3 に調整し、アミログルコシターゼ液 0.1 ml を加えた。さらにこれにアルミ箔でふたをし、60℃の水中で 30 分間インキュベートした。この液に 60℃に温めておいた 95% エタノール 280 ml を加え、沈殿を生成させた後 3,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を除き、残った沈殿を 80% のエタノールで 2 回洗浄後、少量のアセトンで乾燥ろ紙上に洗い落としした。この沈殿の乾燥重量から灰分を差し引いたものを、食物繊維量とした。

1. 2 きこのアミノ酸含量

原木シイタケとハタケシメジの亀山1号（ビン栽培）および野生株 LD 99-12（埋込栽培）の総アミノ酸含量の測定は、アルギニン、リジン、ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、バリン、アラニン、グリシン、プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオリン、アスパラギン酸、トリプトファン、シスチンについて行った。この結果に基づき、原木シイタケとハタケシメジの亀山1号（ビン栽培）および野生株 LD 96-8（菌床埋込栽培）について、含有量が比較的多く、味覚と関係がある遊離アミノ酸のアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸の含量を調査した。試料は 1) と同様の方法で作成し、(財)日本食品分析センターで分析した。

1. 3 菌株別血圧抑制作用測定法

血圧抑制作用の測定は、ハタケシメジが、栽培品種亀山1号（ビン栽培・菌床埋込栽培）、野生株 LD 98-1，LD 99-12（以上ビン栽培・菌床埋込栽培）、LD 96-2，LD 96-3，LD 96-4，LD 96-5，LD 96-7，LD 96-10，LD 97-2，LD 98-4（以上ビン栽培）、LD 96-6，LD 96-8，LD 97-1，LD 99-4（以上菌床埋込栽培）、シイタケ（菌床栽培・原木栽培）、ヒラタケ（ビン栽培）、エノキタケ（ビン栽培）の子実体を用い、凍結乾燥後に粉碎した試料を超純水に溶解し試料液とした。

0.5 M NaCl と 6.5 mM ヒプリルヒスチジルロイシンを含む 0.2 M ホウ酸緩衝液（pH 8.3）150 μ l，アンジオテンシン I 変換酵素（以下 ACE と略す）溶液（0.1 unit/ml）15 μ l およびシリンジフィルター（DIS MIC-25 cs, 0.45 μ m）で濾過した試料液（10~50 mg/ml）30 μ l をマイクロチューブに入れ、37℃で 30 分間反応させた。次に、1 M HCl 0.25 ml を加えて反応を停止させた後、酢酸エチル 1.2 ml を加えて 15 秒間よく混合し、ACE により遊離するヒプリル酸を抽出した。酢酸エチル層を 0.8 ml 分取して 130℃で乾固後、1 ml の超純水に溶解し、228 nm の吸光度を測定した。阻害率は、試料液の吸収度を S，試料液の代わりに超純水を入れたときの吸光度を C，それについてあらかじめ反応停止液を加えて反応させたときの吸光

度をそれぞれ SB, CB として, 次式により求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{(C-CB) - (S-SB)}{C-CB} \times 100$$

上式によって求めた阻害率が 50%を示すときの反応液 1 ml 中のタンパク質濃度 (IC_{50}) または, 一定のサンプル濃度 (35 mg/ml) における阻害活性 (%) で示した。

2. きのを摂食させた場合の抗腫瘍作用

実験動物は, 4 週齢の ICR/SLC 系マウス (日本 S.L.C.株) を用いた。飼料は, 基礎飼料に 1) と同様の方法で作成したきこの乾燥粉末を 15% 添加した上, 水で練ってペレット状に成形し, 乾燥したものを使用した。処理区は, 対照区 (基礎飼料のみ), 原木シイタケ区, ヒラタケ区, ブナシメジ区, ハタケシメジ栽培系統 (亀山 1 号) 区, ハタケシメジ野生系統 LD 98-1 区, およびハタケシメジ野生系統 LD 96-8 区を設け, 各区 7~8 個体を供試した。

実験は, 基礎飼料で 1 週間予備飼育した後実験試料に切り替え, 8 日間自由摂食させた。その後 Sarcoma 180 固形ガンを右鼠頸部皮下へ移植し, 30 日間飼育した。移植 10 日後, 20 日後, 30 日後に腫瘍体積を測定し, 30 日目には, 腫瘍重量, 完全退縮率ならびに死亡率を求めた。なお, マウスの飼育条件は, 室温 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 明暗 12 時間ずつのライトサイクルで, 飼料および水は自由摂取とした。

腫瘍体積および腫瘍抑制率は, 次式により求めた。

$$\text{腫瘍体積 (cm}^3\text{)} = 3/4 \pi a^2 b / 2 \quad \text{但し, } a: \text{短径 (cm)} \quad b: \text{長径 (cm)}$$

$$\text{腫瘍体積抑制率 (\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

但し, T: 処理区のマウスの腫瘍体積の平均

C: 対照区のマウスの腫瘍体積の平均

$$\text{腫瘍重量抑制率 (\%)} = (1 - T'/C') \times 100$$

但し, T': 処理区のマウスの腫瘍重量の平均

C': 対照区のマウスの腫瘍重量の平均

3. きのを摂食させた場合の肝機能障害抑制作用

実験動物は, 6 週齢の ICR 雄性マウス (日本 SLC株) を用い, 処理区に 1-1) と同様に乾燥, 粉碎したハタケシメジまたは原木シイタケを, 基礎飼料に 15% 添加して与えた。対照区は, きこの粉末に代えてセルロースを添加した。試験飼料投与開始から 16 日目に各区を 2 群に分け, 急性肝障害を起こさせるため, 片方の群に四塩化炭素が 0.1 ml/kg となるように懸濁した大豆油 0.25 ml を経口投与した。他の群には大豆油のみを経口投与した。肝障害処理後 24 時間後に心臓から採血を行い, 得られた血液を室温において約 2,000 G で遠心分離後, 血清中の GOT, GPT, LDH および ALP を測定した。なお, マウスの飼育条件は, 室温 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 明暗 12 時間ずつのライトサイクルで, 飼料および水は自由摂取とした。

4. きのこを摂食させた場合の脂質代謝改善作用

実験動物は、4週齢の ddY 系雄性マウス、3週齢の SD 系雄性ラット（日本 SLC 株）を用い、1週間基礎飼料（オリエンタル酵母工業，MF）で予備飼育した後、試験飼料に切り替え、3週間飼育した。試験飼料は、ラード、コレステロールを含む高コレステロール飼料とし、対照区はセルロース粉末、処理区には原木シイタケおよびブナシメジの子実体を乾燥、粉碎したものを 15% 添加した。飼育条件は、室温 20±2°C、明暗 12 時間ずつのライトサイクルで、飼料および水は自由摂取とした。なお絶食は、サンプリングの 12 時間前に行った。また、マウスはサンプリング前 7 日分、ラットはサンプリング前 6 日分の糞を採取した。

飼育終了後、エーテル麻酔下で屠殺し、マウスは心臓から、ラットは腹部大動脈から採血を行った。得られた血液を室温において約 1,700 G、20 分で遠心分離し、血清画分をエッペンチューブおよび栄研チューブに移して -20°C で保存した。また、肝臓は屠殺後に摘出し、-30°C で保存し、それぞれ分析に供した。

血清の総コレステロール濃度、リン脂質濃度、トリグリセライド濃度および HDL コレステロール濃度の測定は、それぞれコレステロール C II - テスト、リン脂質 B - テスト、トリグリセライド G - テスト（以上、和光純薬工業株）および HDL - C II テスト（第一化学工業株）を用いた。

肝臓の総脂質は、Folch 法で抽出し、溶媒を除去後重量を測定して総脂質含量を求めた。総コレステロール濃度は、フタルアルデヒド - 硫酸法で、リン脂質濃度は、リン脂質 B - テスト（和光純薬株）で、トリグリセライド濃度は、トリグリセライド G - テスト（和光純薬株）を用いた。

マウスとラットの糞中の胆汁酸は、凍結乾燥して乾物重量を測定した糞を粉碎後、99% エタノールで 3 回抽出し、遠心分離した上清を凍結保存した。この糞抽出液を、Hydroxystroid dehydrogenase を用いて測定した。

結果と考察

1. 三重県産きのこの機能性成分

1. 1 食物繊維量

乾物当たりのきのこの食物繊維量を、表-1 に示した。栽培品種である亀山 1 号より有意に多い野生株が、LD 96-6、LD 99-4 の 2 菌株あった。また、原木シイタケは、ハタケシメジの亀山 1 号、LD 97-1、LD

表-1. きのこの食物繊維量

	亀山 1号ビン	96-5ビン	97-1ビン	96-6埋込	96-8埋込	99-4埋込	99-12埋込	菌床 シイタケ	原木 シイタケ	ヒラタケ 208	エノキ 市販	(乾物%)
ハタケシメジ亀山 1 号ビン				∇		∇			∇			57.29
ハタケシメジ 96-5 ビン栽培												52.08
ハタケシメジ 97-1 ビン栽培									∇			54.59
ハタケシメジ 96-6 菌床埋込栽培										>	>>	61.16
ハタケシメジ 96-8 菌床埋込栽培									∇	>		58.50
ハタケシメジ 99-4 菌床埋込栽培									∇	>	>	59.70
ハタケシメジ 99-12 菌床埋込栽培												56.52
菌床シイタケ										>		60.18
原木シイタケ										>>	>>	64.55
ヒラタケ 208												51.57
エノキ市販												56.37

(注) A>>B : B より A が有意に多い (P<0.01)
A>B : B より A が有意に多い (P<0.05)

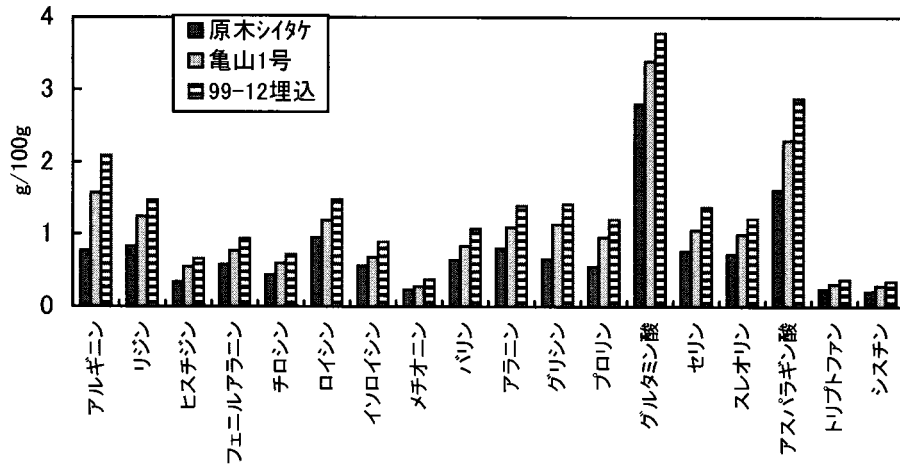


図-1. きのこの総アミノ酸含量 (乾物当たり)

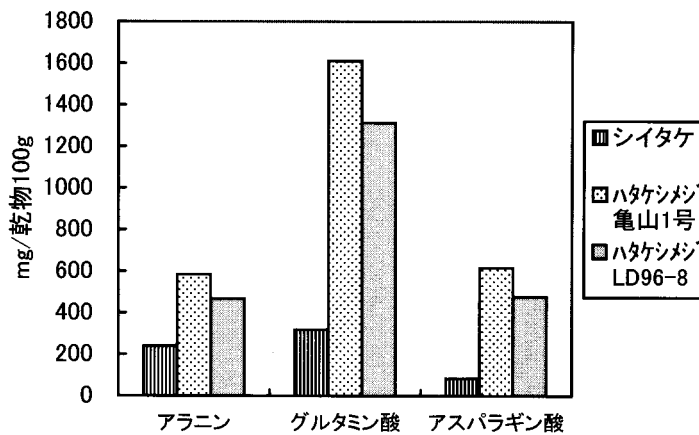


図-2. きのこの遊離アミノ酸

96-8, LD 99-4, ヒラタケ, エノキタケより有意に多かった。

抗腫瘍作用があるβ-グルカンを精製するためにはかなりの手間と時間を要し、分析には高度な機器と技術が必要である。β-グルカンは、食物繊維の主要な成分であり、食物繊維量は比較的容易に測定できることから、食物繊維量は、ハタケシメジなどの野生株から有用な菌株を選抜する手がかりとなると考えられる。もちろん、野生菌株を栽培するために必要である高度な技術や、子実体成分の個体差も考慮しなければならないが、今後は食物繊維量とβ-グルカン量との相関を確認する必要がある。

1. 2 きのこのアミノ酸含量

総アミノ酸含量は図-1に示したとおり、調査した全ての成分で、原木シイタケ<ハタケシメジ亀山1号<ハタケシメジ野生株LD 99-12であった。一方、遊離アミノ酸含量は、図-2に示したとおり、3つの成分ともハタケシメジ亀山1号が最も多かった。

味覚成分と味覚の関係は、人の味覚の評価が大変に難しいため、依然として明確ではない。従って、遊離アミノ酸とおいしさの関係も明らかにされておらず、含有量が多ければおいしいとは、必ずしも言えない。しかも、液体の場合とは異なり、固形物の味覚の評価にはテクスチャーの要素が加味されるため、さらに困難になる。食品分野における、味の評価に関する研究の発展に期待する。

1. 3 菌株別血圧抑制作用

きのこの ACE 阻害活性を表-2 に示した。ハタケシメジ野生株に阻害活性の強いものも見られたが、本実験に用いた試料の量があまり多くなかったことから、今後、さらに栽培と分析を繰り返す必要がある。また、栽培法の違いによる差は見られなかったが、この点についてもサンプル数を増やしたうえでの検討が必要である。

表-2. きのこの ACE 阻害活性

きのこの種類・菌株	ビン栽培	菌床埋込栽培
ハタケシメジ		
亀山1号		
I	1.9	0.61
II	—	1.5
LD 98-1	0.38	0.92
LD 99-12	0.61	1.8
LD 96-2	1.1	—
LD 96-3	1.5	—
LD 96-4	1.5	—
LD 96-5	1.3	—
LD 96-6	—	0.93
LD 96-7	1.7	—
LD 96-8	—	1.2
LD 96-10	2.4	—
LD 97-1	—	1.9
LD 97-2	1.9	—
LD 98-4	1.1	—
LD 99-4	—	1.6
ヒラタケ	2.2	—
エノキタケ	>10	—
	原木栽培	菌床栽培
シイタケ	3.5	2.8

2. きのこを摂食させた場合の抗腫瘍作用

腫瘍体積抑制率を図-3 に示した。腫瘍が抑制されていたのは、ヒラタケ区と腫瘍接種後 10 日目と 20 日目の原木シイタケ区および 30 日目のハタケシメジ野生系統 LD 98-1 であった。他の試験区は、対照区よ

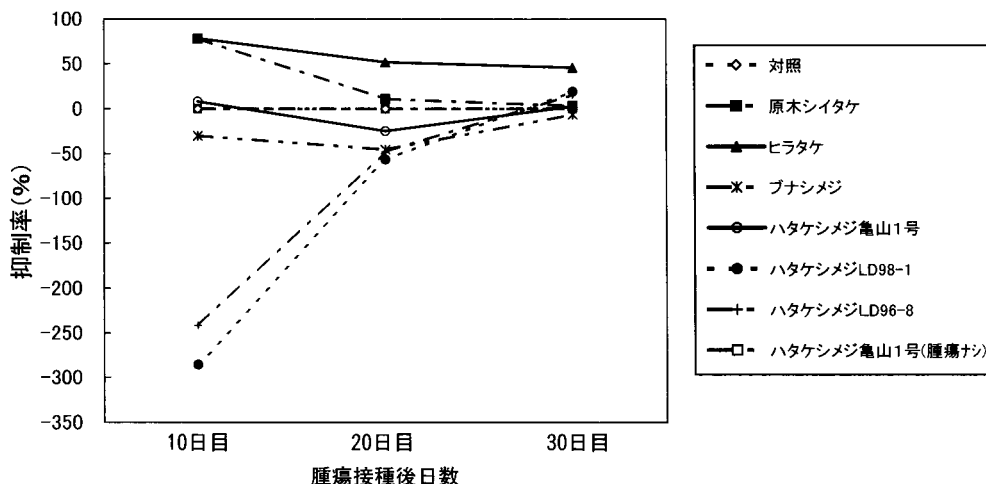


図-3. 腫瘍体積抑制率

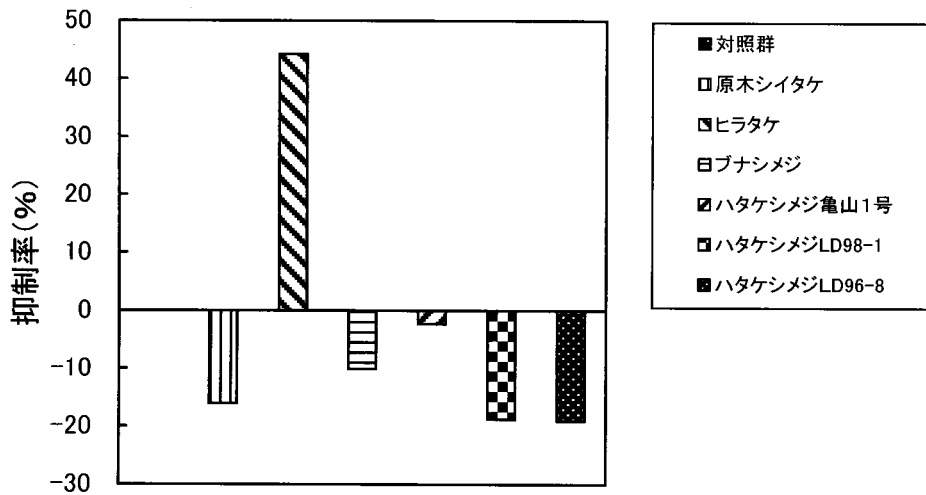


図-4. 腫瘍重量抑制率 (30 日目)

りも腫瘍の体積が大きかった。

腫瘍接種後 30 日目の腫瘍重量抑制率を、図-4 に示した。ここでも、ヒラタケ区においてのみ、44.2% と正の抑制率となった。

卯川ら (2001a, 2001b) が行った、マウスに Sarcoma 180 固形ガンを接種し、きのこの熱水抽出物を腹腔内に注射した実験では、ハタケシメジ、マイタケおよびシイタケに強い抗腫瘍作用が見られ、ブナシメジとヒラタケにも抗腫瘍作用が見られたが、本実験では、ヒラタケだけに腫瘍抑制作用が見られた。ヒラタケには食欲抑制作用があることが知られており、マウスの試験期間中の飼料摂取量がヒラタケ区のみ低く、体重が異常に軽かったのはこの作用ためと推察できる。従って、腫瘍にも栄養が十分に行き渡らず、結果的に腫瘍の成長が抑制されたものと考えられる。また、本実験を環境が余り清浄でない動物舎で行ったため、マウスの生育に悪影響が生じていた可能性も考えられる。従って、条件の良い実験施設で再試験を行うことや、きのこの熱水抽出物を経口投与する実験を行う必要がある。

3. きのを摂食させた場合の肝機能障害抑制作用

GPT 酵素活性を、図-5 に示す。四塩化炭素の投与によって GPT, GOT, LDH, ALP の値はどの区も

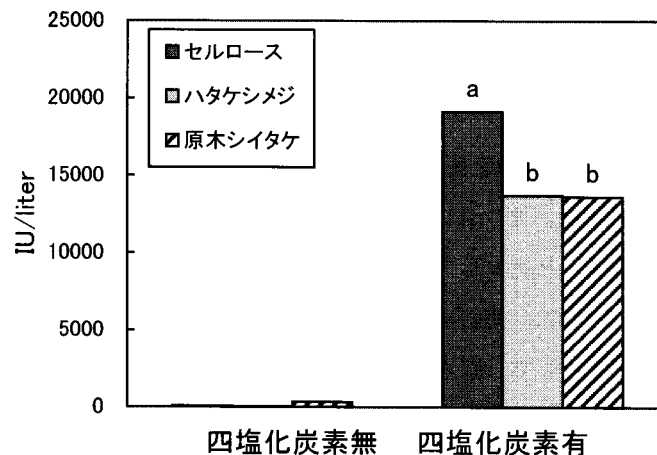
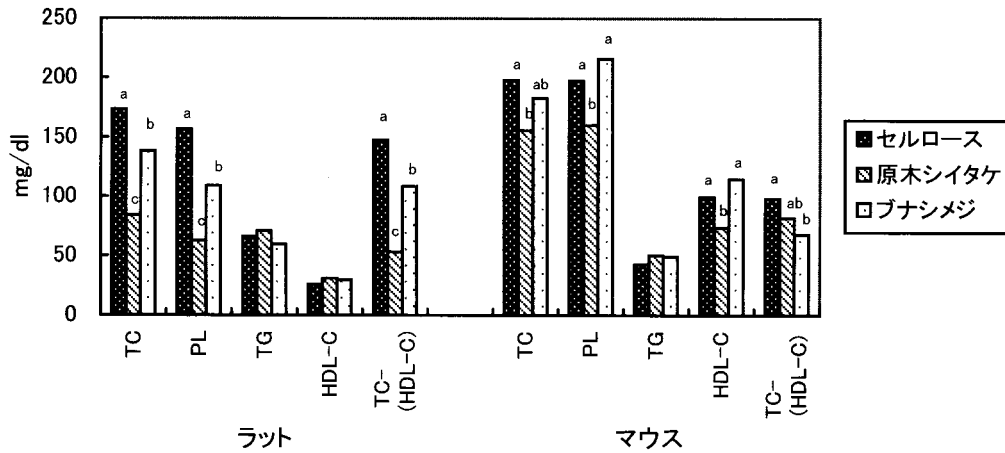


図-5. 四塩化炭素投与が GPT 活性に及ぼす影響



TC, total cholesterol; PL, phospholipids; TG, triacylglycerols; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; TL, total lipid.

図-6. 血清脂質への影響

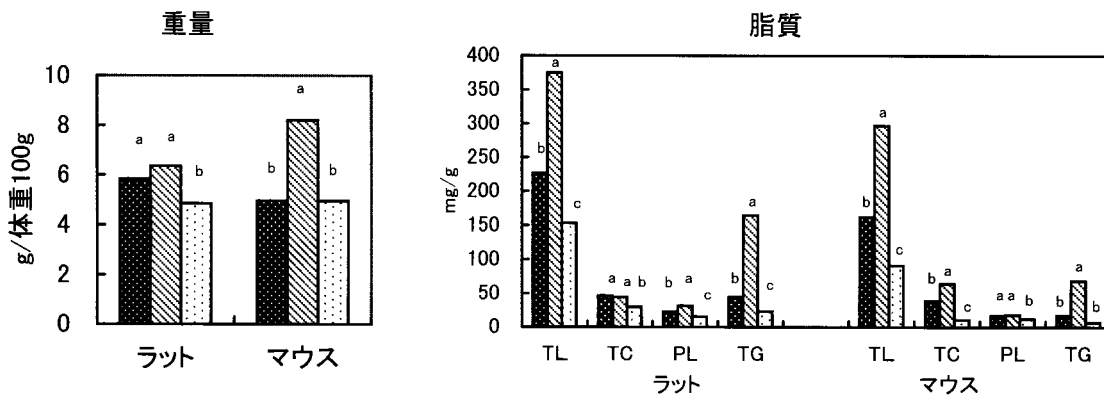


図-7. 肝臓への影響

- ・凡例は図-6 参照
- ・abc 異符号間に有意差あり (p<0.05)

上昇したが、GPTのみ、ハタケシメジと原木シイタケを投与した区が、セルロースを投与した区に比較して有意に上昇量が少なかった。GOT, LDH, ALPについても有意な差はなかったが、対照区よりは値が下がる傾向が見られた。

GPTの値が上昇すると、肝障害が疑われるが、ハタケシメジと原木シイタケは、四塩化炭素による肝障害を軽減する働きがあることが判明した。

4. きのを摂食させた場合の脂質代謝改善作用

血清脂質濃度を、図-6に示す。マウスでは、総コレステロール (TC), リン脂質 (PL) および HDL コレステロールにおいて、対照区と比較して、原木シイタケ区だけが有意に低くなった。なお、トリグリセライド (TG) においては、各区間に差は認められなかった。また、ラットでは、総コレステロールおよびリン脂質において、対照区に比較して、原木シイタケ区およびブナシメジ区が有意に低下した。

この結果は、河岸のシイタケのエリタデニンが血中コレステロール量を低下させるという報告 (河岸 1997) と一致することから、本試験の血中コレステロールの低下はこのエリタデニンの作用であると推定される。

肝臓脂質含量を図-7に示す。マウスでは、対照区と比較すると、原木シイタケ区において、総脂質、総

コレステロールおよび中性脂肪が、有意に低下した。これは、血中の総脂質や総コレステロールおよび中性脂肪が低かったことから、肝臓に蓄積されたものと推察する。また、ブナシメジ区では、総脂質、総コレステロール、リン脂質および中性脂肪が、有意に低くなった。一方、ラットでは、原木シイタケ区が対照区と比較して、総脂質、リン脂質および中性脂肪の増加が見られた。これも、血中の各成分が肝臓に蓄積したものと考えられる。また、ブナシメジ区において、総脂質、総コレステロール、リン脂質および中性脂肪が有意に低くなった。

このブナシメジの肝臓脂質含量を低下させる作用は、脂肪肝の予防につながる新しい知見であるため、今後さらに検討を続けたい。

おわりに

本研究では、三重県産のきのこについて、きのこの種類別やハタケシメジの菌株ごとの食物繊維量、アミノ酸含量および ACE 阻害活性を明らかにした。これらの結果は、今後の品種改良および選抜、さらなる機能性成分の検討の基礎資料となろう。また、三重県産の主なきのこを食べさせる動物実験を行った結果、ヒラタケの抗腫瘍作用、およびブナシメジの脂肪肝抑制作用に関する新たな知見を得た。今後もこの実験結果について、さらに詳細に検討を加えたい。一方、 β -グルカンの精製を行い、その効果について分析を進めたい。

文 献

- 河岸洋和. 1997. 生体機能調節物質. (菅原龍幸. 編:キノコの科学) pp 160-169. 朝倉書店, 東京.
- 卯川裕一・安藤雅之・古市幸生・苔庵泰志・西井孝文・久松 眞. 2001a. ハタケシメジのアンジオテンシンI 変換酵素阻害活性. 日本食品科学工学会誌, 48: 58-63.
- 卯川裕一・安藤雅之・古市幸生・苔庵泰志・西井孝文・久松 眞. 2001b. ハタケシメジの血漿コレステロール上昇抑制作用. 日本食品科学工学会誌, 48: 520-525.