

キノコ類抽出物のラジカル消去活性スクリーニング

—第1報—

森田康文*、長谷川怜勇**

Screening of Radical Scavenging Activity for Mushroom Extracts

MORITA Yasufumi*

HASEGAWA Reo**

We analyzed antioxidant activity in 22 mushrooms by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. In 22 mushrooms, *Naematoloma sublateralitum*, and *Hydnellum aurantiacum* had the strong antioxidant activity. *Sparassis crispa*, *Coprinus comatus*, *Agaricus arvensis*, *Cortinarius armillatus*, *Abortiporus biennis*, *Astraeus hygrometricus*, *Clitocybe nebularius*, and *Rhizina undulata* had moderate antioxidant activity.

キーワード：担子菌類，子囊菌類，抗酸化，ラジカル消去活性，DPPH 法

1. 緒言

キノコ類は分類学的にカビに属し、森林や草地、枯れ木などで菌糸を繁殖させ子孫を残すための子実体を形成し、胞子を飛散して増殖する。その子実体は古くから食用あるいは漢用として利用されてきた。近年健康に関心が高まる中、キノコを単なる食物としてではなく、それらの持つ薬理活性あるいは生活習慣を改善する機能性食品としての研究が盛んに進められている。例えば前者については、抗腫瘍活性¹⁻⁴⁾、抗ウィルス活性^{4,5)}、抗細菌活性⁶⁻⁸⁾、抗炎症作用⁹⁾など様々な生理活性を示すキノコ類、さらにそれらの活性を示す代謝産物についての報告がなされている。一方で、コレステロール低下作用¹⁰⁻¹³⁾、血圧降下作用¹⁴⁻¹⁶⁾、免疫増強強化^{17, 18)}のように生活改善への適用を指摘する報告も多い。

その中でキノコ類の抗酸化活性についても数多く報告されている^{15, 19-23)}。抗酸化とは好氣的な生物

*一般教養科

**物質化学工学科

が生命活動を遂行する上で必須の防御機能である。すなわち、エネルギー代謝の過程で必要となる酸素のうち、一部が様々な要因（紫外線や喫煙など）によって変化し活性酸素種になることで生体膜やDNAなどを攻撃し、シミやしわ、あるいはガン誘発といった生体にとっての異常現象を引き起こす。これを防ぐため好氣的生物は酵素カタラーゼやスーパーオキシドディスムターゼなどで防御するが、現代病とも言えるストレスがそれらの効果を抑制しているといわれ^{24, 25)}、したがって活性酸素種は生活習慣病に起因する主たる要素の一つとされる。

キノコ類に関する抗酸化活性の報告は、個々のキノコ成分研究の過程で調べられたもの^{15, 19-23)}や、食用に範囲を限定して食品化学的に調査されたもの^{26, 27)}などが多く、広範囲に調べられた例は数が少ない²⁸⁾。そこで筆者らはキノコ類が有する抗酸化活性を実験方法から検討し、スクリーニングすることにした。抗酸化活性を評価する方法は測定原理が異なるいくつかの方法が報告されている²⁹⁻³³⁾。主なものとしてORAC法、ESR法、DPPH法などがあるが、本調査はスクリーニングが主たる

目的であること、および必要な分析機器を含めランニングコスト面を考慮した結果、より簡便でコストが低い DPPH 法を採用することとした。さらに対象試料の極性に考慮し、多く報告されている DPPH 法を改良し、本調査の活性評価に用いることとした。

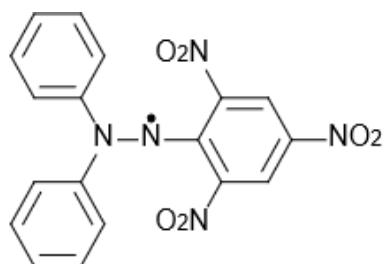


図1 DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル)の構造

2. 試料および実験方法

2. 1 試料、試薬および測定機器

本研究に用いたキノコ類は、担子菌類に属する種としてスッポンタケ *Phallus impudicus*、ムレオオフウセンタケ *Cortinarius praestans*、ヒトヨタケ *Coprinus atramentarius*、ハナビラタケ *Sparassis crispa*、ササクレヒトヨタケ *Coprinus comatus*、シヨウゲンジ *Rozites caperata*、カキシメジ *Tricholoma ustale*、シロオオハラタケ *Agaricus arvensis*、マツオウジ *Lentinus lepideus*、テングタケ *Amanita pantherina*、ツバフウセンタケ *Cortinarius armillatus*、クリタケ *Naematoloma sublateralitium*、ニクウチワタケ *Abortiporus biennis*、ヒラタケ *Pleurotus ostreatus*、コテングタケモドキ *Amanita pseudoporphyria*、アイセンボンタケ *Psilocybe fasciata*、ツチグリ *Astraeus hygrometricus*、オニフスベ *Lanopila nipponica*、ハイイロシメジ *Clitocybe nebularius*、およびキハリタケ *Hydnellum aurantiacum* の 20 種、子囊菌類に属するツチクラゲ *Rhizina undulata*、およびシャグマアミガサタケ *Gyromita asculeuta* の 2 種、併せて 22 種は

主に富山県および長野県にて採集した新鮮な子実体を用いた。1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH、図1) は東京化成 (株) 製、ジメチルスルホキシド (DMSO)、エタノール、酢酸ナトリウム、酢酸、トロロックス、および比較対照としての α -トコフェロールは和光純薬工業 (株) 製・特級を用いた。吸光度測定に用いた分光光度計は APEL 社製 PD-303S を用いた。

2. 2 試料の抽出

キノコ類の成分抽出は以下のようにして行った。22 種をメタノールまたはエタノールに浸漬し、減圧下水層まで濃縮したのち酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出液は常法を用いて、中性部 (N)、酸性部 (A)、塩基性部 (B)、および水溶画分 (W) に分画した。なお収量が少量など、活性試験に供するには不十分な量のフラクションについては活性試験を実施しなかった。

2. 3 ラジカル消去活性測定 (DPPH 法)

入角ら³⁴⁾の方法を改変し、以下に示す方法により行った。試料を 0.4, 0.3, 0.2, および 0.1mg/ml となるように DMSO/エタノール (50:50) 混合溶媒に溶解した。試料溶液 1.0 ml に 1.0 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 1.0 ml、および 0.50 mM DPPH/エタノール 0.50 ml を加えて、50℃、30 分加温したのち、ガラスセルに入れ 520nm の吸光度を測定した。それぞれの吸光度から以下のようにラジカル消去活性を算出した。

$$\text{ラジカル消去活性 (\%)} = (1 - B/A) \times 100 \quad (1)$$

A: 試料を加えていない DPPH と溶媒のみの吸光度
B: 試料を添加した反応液の吸光度

さらに各フラクションの IC₅₀ (μg/ml) を求め、ラジカル消去活性を比較した。基準化合物トロロックス (図2) は 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, および 0.005 mg/ml となるように調製し、同様に測定することで IC₅₀ (μg/ml) を算出し、以下の計算により、各フラクションのトロロックス当量 (μg TE/mg sample) を

算出した。

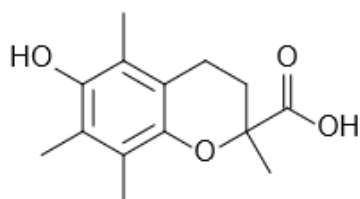


図2 トロロックスの構造

$$\text{Trolox 当量 } (\mu\text{g TE/mg}) = \frac{\text{IC}_{50} \text{ Trolox}}{\text{IC}_{50} \text{ sample}} \quad (2)$$

3. 結果および考察

キノコ類各フラクションのラジカル消去活性を表に示す。特に強い活性を示したのは、クリタケ *N. sublateritium* 酸性部、キハリタケ *H. aurantiacum* 酸性部の2フラクションで、それぞれ IC_{50} が $44.0 \mu\text{g/ml}$ 、および $75.5 \mu\text{g/ml}$ であった。これらのフラクションは脂溶性であるため、同様に脂溶性で抗酸化活性を示す α -トコフェロール（ビタミンE）

表 ラジカル消去活性 (IC_{50}) およびトロロックス当量

	菌名	Fr.	IC_{50}	Trolox 当量		菌名	Fr.	IC_{50}	Trolox 当量
			($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g TE/mg}$)				($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g TE/mg}$)
Basidiomycotina	スッポンタケ <i>Phallus impudicus</i>	N [#]	1000<	<20	Basidiomycotina	クリタケ <i>Naematoloma sublateritium</i>	N	1000<	<20
		A	795	34.9			A	44.0	632
		B	—	—			B	—	—
		W	1000<	<20			W	1000<	<20
	ムレオオフウセンタケ <i>Cortinarius praestans</i>	N	1000<	<20		ニクウチワタケ <i>Abortiporus biennis</i>	N	1000<	<20
		A	977	28.5			A	426	65.3
		B	1000<	<20			B	—	—
	ヒトヨタケ <i>Coprinus atramentarius</i>	W	1000<	<20			W	1000<	<20
		N	—	—		ヒラタケ <i>Pleurotus ostreatus</i>	N	1000<	<20
		A	1000<	25.7			A	1000<	24.0
		B	744	37.4			B	—	—
		W	1000<	<20		コテングタケモドキ <i>Amanita pseudoporphyria</i>	W	1000<	<20
	ハナビラタケ <i>Sparassis crispa</i>	N	1000<	<20			N	1000<	<20
		A	398	69.8			A	1000<	<20
		B	—	—			B	1000<	<20
	ササクレヒトヨタケ <i>Coprinus comatus</i>	W	1000<	<20			W	1000<	24.9
		N	1000<	<20		アイセンボンタケ <i>Psilocybe fasciata</i>	N	1000<	<20
		A	436	63.8			A	916	30.4
		B	—	—			B	—	—
	ショウゲンジ <i>Rozites caperata</i>	W	1000<	<20			W	—	—
		N	1000<	<20		ツチグリ <i>Astraeus hygrometricus</i>	N	1000<	<20
		A	575	48.3			A	229	121
		B	—	—			B	1000<	<20
		W	1000<	<20			W	1000<	<20

キノコ類のラジカル消去活性

菌名					菌名				
Fr.		IC ₅₀ (μg/ml)	Trolox 当量 (μg TE/mg)		Fr.		IC ₅₀ (μg/ml)	Trolox 当量 (μg TE/mg)	
Basidiomycotina	カキシメジ <i>Tricholoma ustale</i>	N	1000<	<20	Basidiomycotina	オニフスベ <i>Lanopila nipponica</i>	N	1000<	<20
		A	699	39.8			A	1000<	<20
		B	—	—			B	1000<	<20
		W	1000<	<20			W	1000<	<20
	シロオオハラタケ <i>Agaricus arvensis</i>	N	1000<	<20		ハイイロシメジ <i>Clitocybe nebularius</i>	N	1000<	<20
		A	371	75.0			A	386	72.1
		B	559	46.4			B	993	28.0
		W	1000<	<20			W	—	—
	マツオウジ <i>Lentinus lepideus</i>	N	1000<	<20		キハリタケ <i>Hydnellum aurantiacum</i>	N	1000<	<20
		A	1000<	<20			A	75.5	368
		B	1000<	<20			B	268	104
		W	1000<	<20			W	1000<	<20
	テングタケ <i>Amanita pantherina</i>	N	1000<	<20	Ascomycotina	ツチクラゲ <i>Rhizina undulata</i>	N	1000<	<20
		A	1000<	27.0			A	285	97.6
		B	1000<	25.7			B	—	—
		W	—	—			W	240	116
	ツバフウセンタケ <i>Cortinarius armillatus</i>	N	1000<	<20		シャグマアミガサタケ <i>Gyromita asculeuta</i>	N	1000<	<20
		A	324	85.8			A	680	40.9
		B	894	31.1			B	814	34.1
		W	—	—			W	1000<	<20
α-tocopherol									
52.4					531				

N: 中性部、A: 酸性部、B: 塩基性部、W: 水溶画分

— 少量のため活性未測定

を対照とした場合（表左下に表示）、クリタケ酸性部は 1.19 倍、キハリタケ酸性部は 0.69 倍の活性であり、粗抽出物であることを考慮するとかなり活性が強く、トロロックス当量も高い。クリタケは秋から晩秋にかけて発生する食用キノコであり、効果が期待される。キハリタケは不食だが毒性はなく、薬用として活用されることが期待される。

ハナビラタケ *S. crispa* 酸性部、ササクレヒトヨタケ *Coprinus comatus* 酸性部、シロオオハラタケ *Agaricus arvensis* 酸性部、ツバフウセンタケ *Cortinarius armillatus* 酸性部、ニクウチワタケ

Abortiporus biennis 酸性部、ツチグリ *Astraeus hygrometricus* 酸性部、ハイイロシメジ *Clitocybe nebularius* 酸性部、およびツチクラゲ *Rhizina undulata* 酸性部は中程度の活性を示した。いずれも酸性部で活性を示していることや、キノコ類にはフェノール類が多く報告されている³⁵⁻³⁸⁾ことからキノコ類が産生する抗酸化活性物質にはフェノール性化合物が関係していることが推察される。一方で、22 種のキノコ類すべてにおいて中性部は活性を示さなかった。Y. Cui らによると、カバノアナタケ *Inonotus obliquus* 菌核の酢酸エチル抽出物には、

アスコルビン酸（ビタミン C）を上回る強い抗酸化能力があるとの報告³⁰⁾がある。中性部はキノコ成分を大きく占めることから、したがってキノコ類中性部に全くの活性がないと断言できない。今後他種のキノコ類の成分について抗酸化活性を調査することで新たなキノコ類の活性を明らかにする。

4. 参考文献

- 1) T. Ikekawa *et al.*, *Cancer Res.*, **29**, 734 (1969)
- 2) 大熊ら、日本農村医学会誌、**31**(4), 650 (1982)
- 3) T. Ichimura *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**(3), 575 (1998)
- 4) Y. Yoshikawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 1772 (1973)
- 5) C. J. van Nevel *et al.*, *Arch. Tierernahr.*, **57**(6), 399 (2003)
- 6) H. Shibata *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**(12), 2450 (1998)
- 7) Y. Morita *et al.*, 富山高等専門学校紀要、**7**、in press
- 8) 寺下隆夫、きのこの生化学と利用、応用技術出版、138 (1988)
- 9) T. Kaminaga *et al.*, *Phytotherapy. Reseach*, **10**, 581 (1996)
- 10) 金田ら、栄養と食糧、**16**, 466 (1964)
- 11) T. Kaneda *et al.*, *J. Nutr.*, **90**, 371 (1966)
- 12) Y. Kabir *et al.*, *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **33**, 341 (1987)
- 13) 荒川ら、栄養と食糧、**30**, 29 (1977)
- 14) 山本ら、第 6 回日本補完代替医療学会学術集会、プログラム抄録集、66 (2003)
- 15) A. Morinaga *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**(7), 3025 (1986)
- 16) 長谷川ら、日本薬学会、第 123 年会、要旨集 2、123 (2003)
- 17) Y. H. Zang *et al.*, *Zhong Xi Ti Jie He Za Zhi*, **11**(4), 225 (1991)
- 18) T. Nakamura *et al.*, *International J. of Medicinal Mushroom.*, **5**, 163 (2003)
- 19) T. Ikekawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **40** (7), 1954 (1992)
- 20) D. Harman, “Free Radicals in Biology”, **5**, 255 (1982)
- 21) R. G. Cutler, *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**, 373S (1991)
- 22) 菅野ら、日本調理科学会誌、**50**(2), 54 (2017)
- 23) 山田ら、日本調理科学会誌、**43**(3), 201 (2010)
- 24) 春日ら、日本食品工業学会誌、**40**(1), 56 (1993)
- 25) 石渡ら、日本調理科学会誌、**39**, 267 (2006)
- 26) 永塚ら、日本調理科学会誌、**40**, 179 (2007)
- 27) 津志田ら、日食工誌、**41**, 611 (1994)
- 28) Y. Noda *et al.*, *Biocem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 35 (1997)
- 29) R. L. Prior, *J. Agric. Food. Chem.*, **53**, 4290 (2005)
- 30) Y. Cui *et al.*, *J. of Ethnopharmacology*, **96**, 79 (2005)
- 31) 村田、京都文教短期大学研究紀要、**55**, 93
- 32) 田村ら、日本食品化学会誌、**46**(9), 561 (1999)
- 33) 藪田ら、日本きのこ学会誌、**20**(2), 89 (2012)
- 34) 入角ら、鹿大農学術報告、**63**, 27 (2013)
- 35) 古川ら、化学と生物、**29**, 640 (1991)
- 36) 水野ら、キノコの化学・生化学、学会出版センター、183 (1992)
- 37) T. Goto *et al.*, *Tetrahedron*, **19**, 2079 (1963)
- 38) N. Ishii *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2918 (1988)