

Phellinus linteus 菌糸体の培養と免疫賦活能 Culture of *Phellinus linteus* Mycelium and Immunostimulatory Activity

長山 純子¹, 齋藤 貴^{2*}
JUNKO NAGAYAMA and TAKASHI SAITO

¹ 神奈川工科大学大学院工学研究科 〒243-0292 神奈川県厚木市下荻野 1030

² 神奈川工科大学工学部応用化学科 〒243-0292 神奈川県厚木市下荻野 1030

* TEL: 046-291-3113 FAX: 046-291-3113

* E-mail: saito@chem.kanagawa-it.ac.jp

¹ Graduate School of Engineering, Kanagawa Institute of Technology,
1030 Shimoogino, Atsugi, Kanagawa 243-0292, Japan

² Kanagawa Institute of Technology Department of Applied Chemistry,
1030 Shimoogino, Atsugi, Kanagawa 243-0292, Japan

(原稿受付 2018年9月3日 / 2019年1月17日)

Phellinus linteus of basidiomycetes has been found to have a high antitumor activity, but it is not practical because it requires a long time to form fruiting bodies. When 5.0×10^{-3} vol% of *Ginkgo biloba* leaf extract as a growth promoter was added into a culture medium, the amount of mycelia produced increased about 4 times as compared to that not added. It was revealed that the *Ginkgo biloba* leaf extract is effective as a factor of promoting growth of *Phellinus linteus* mycelium.

When macromolecular polysaccharides was treated with macrophages, the cells are activated, and finally tumor necrosis factor and NO are produced. Therefore, NO production ability was used as an indicator to evaluate immunostimulatory activity. As a result, it was found that the *Phellinus linteus* mycelium have a high NO production ability in those extracts at 60 to 70°C, which was 10.4 to 10.6 μ M.

キーワード: メシマコブ, ギンコライド, 菌糸体, 免疫賦活活性
Key words: *Phellinus linteus*, *Ginkgo biloba*, mycelium, immunostimulatory activity

1. 緒 言

いくつかの薬用キノコの熱水抽出物がマウス腹水腫瘍細胞であるサルコーマ 180 に対しての抗腫瘍活性を持つ¹⁾ことが報告されて以来, キノコの持つ抗腫瘍活性に注目が集まっている。

メシマコブ (*Phellinus linteus*) はヒダナシタケ目タバコウロコタケ科キノコ属のキノコで, 桑の木に選択的に寄生する木材腐朽菌の一つである。漢方薬物名では桑黄と呼ばれ, 古くから薬用として用いられてきた。近年では *Phellinus linteus* の持つ生理活性に対する研究が進み, *Phellinus linteus* が抗腫瘍活性を有し²⁾, マウス皮膚二段階発がんを抑制することが報告されている³⁾。また, 血糖値上昇抑制効果を有することも明らかとなっており, 糖尿病の予防に有効であることも示唆されている⁴⁾。しかし近年, 養蚕産業の減少と共に桑の樹木が減少し, 子実体の入手が困難となっている。*Phellinus linteus* 子実体は多年生のため人工栽培が困難であり, 通常 10 cm 程度に成長するには約 10 年程度要

すると言われている。しかし, 担子菌類は固形培地を用いた子実体誘発に関する研究は行われているが⁵⁾, 液体培地での大量培養に関する実施例は報告されておらず, 培養条件の検討も見られない。

一方, 細胞に対してある種の植物抽出物が成長促進効果を示すという例が知られている。例えば, 植物抽出物が蚕の成育に与える影響について調査した報告⁶⁾があり, これによると一部の植物抽出物は蚕の成育を促進させる効果を持つことが認められている。しかし, 植物抽出物を菌糸体培養に応用した例は見受けられない。イチョウ葉 (*Ginkgo biloba* leaf) は一般にヒトに対して抗酸化作用, 血液凝固抑制作用, 脳機能障害の改善など高い生理活性を有していることが知られている^{7,8)}。そこで, イチョウ葉抽出物の様々な生理活性能によって, 通常生育が遅い *Phellinus linteus* のような菌糸体の成長を促進させることができるものと考え, 培養時の添加効果について検討した。また, 得られた条件で生育した *Phellinus linteus* 菌糸体の免疫賦活能を評価した。

2. 菌糸体および実験方法

2.1 供試菌株

Phellinus linteus NBRC6989 株は、(独)製品評価技術基盤機構より分譲されたものを使用した。この *Phellinus linteus* 菌糸体の外観を走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、その菌糸体の直径は 0.8~3.0 μm で、菌糸体組織は糸状の組織構造を有し、多数分岐していることが認められた。

2.2 培地と培養方法

Phellinus linteus 菌糸体の液体培養に適した培地を決定するため、一般に担子菌培養に用いられているペプトン培地、麦芽培地、酵母培地、麦芽・酵母培地の 4 種類の培地を用いて菌糸体生育への影響を調査した。

ペプトン培地 (D(+)-グルコース 20 g/L, Bacto™Pepton 5 g/L, 粉末酵母エキス 2 g/L, 硫酸マグネシウム七水和物 5 g/L, リン酸二水素カリウム 10 g/L), 麦芽培地 (麦芽エキス乾燥粉末 20 g/L), 酵母培地 (D(+)-グルコース 10 g/L, 粉末酵母エキス 2.5 g/L), 麦芽・酵母培地 (麦芽エキス乾燥粉末 20 g/L, 粉末酵母エキス 2 g/L) を 121°C で 20 分間滅菌して実験に用いた。滅菌後、放冷した各培地に、あらかじめマツタケ培地⁹⁾で平面培養した菌糸体を直径 5 mm の円状に打ち抜き、この菌糸体ディスクを上記の各培地に植菌した。30°C, 暗所下、振とう数 100 rpm の条件で 10 日間培養を行い、培養終了した菌糸体を回収して純水で洗浄し、凍結乾燥を行い得られた菌糸体の乾燥質量を測定した。

2.3 培養条件

前述の 2.2 項の 4 種類の培地種の中で *Phellinus linteus* 菌糸体の生育量 (乾燥質量) が最も高かった麦芽・酵母培地を用いて培養条件の検討を行った。

生育に対する pH の影響に関する実験では、1M-NaOH と 1M-HCl を用いて pH 4~8 の範囲で培地の pH を調整した。菌糸体の生育に対する温度の影響に関する実験では、培地を初発 pH 7 に調製し 25°C から 35°C まで

5°C 毎に温度設定して、菌糸体の生育を観察した。また、天然植物抽出物添加による成長促進効果の検討に際しては、培養温度 30°C, 初発 pH 7.0 の麦芽・酵母培地を用い、イチョウ葉総活性エキス (バイオ薬品株式会社) を 0.001~0.05 vol% の範囲で添加した。

2.4 免疫賦活能の評価

麦芽・酵母培地を用いて *Phellinus linteus* の液体培養を行い、得られた菌糸体 (3 g) を 10 倍量の純水 (30 mL) に加え、25~100°C の異なった抽出温度で抽出した。得られた抽出液を凍結乾燥したところ、褐色状の粉末を得た。この褐色状の粉末抽出物 0.1 g を純水に溶解して全量 10 mL に定容し、グリース法¹⁰⁾にて NO 産生能の測定に用いた。

3. 結果および考察

3.1 培地種の比較

ペプトン培地、麦芽培地、酵母培地および麦芽・酵母培地の各培地ごとに生育した菌糸体の乾燥質量を比較した。その結果、麦芽・酵母培地において菌糸体の生育量が最も高く、麦芽培地、ペプトン培地および酵母培地に対して、それぞれ、1.5、1.9 および 2.0 倍の菌糸体が得られることが明らかとなった (Fig. 1)。

3.2 培養条件

(1) 培地の初発 pH が菌糸体の生育に与える影響

担子菌の生育に伴う最適 pH, 発育可能な pH 範囲などは菌種によって異なり、*Phellinus linteus* 菌糸体に関して至適 pH が 5.5 である報告¹¹⁾ や、4.0 である報告¹²⁾ などが見られる。そこで本法では、初発 pH 4~8 の範囲で菌糸体生育における至適初期 pH の検討を行った。

比較を行った培地種の中で最も生育が速かった麦芽・酵母培地を用いて、初期 pH が菌糸体の生育に与える影響を調べた。麦芽・酵母培地の初発 pH を 4~8 の間で 15 日間菌糸体を培養して生育量を比較したところ、いずれの pH 域でも生育が認められ、特に pH 7 において

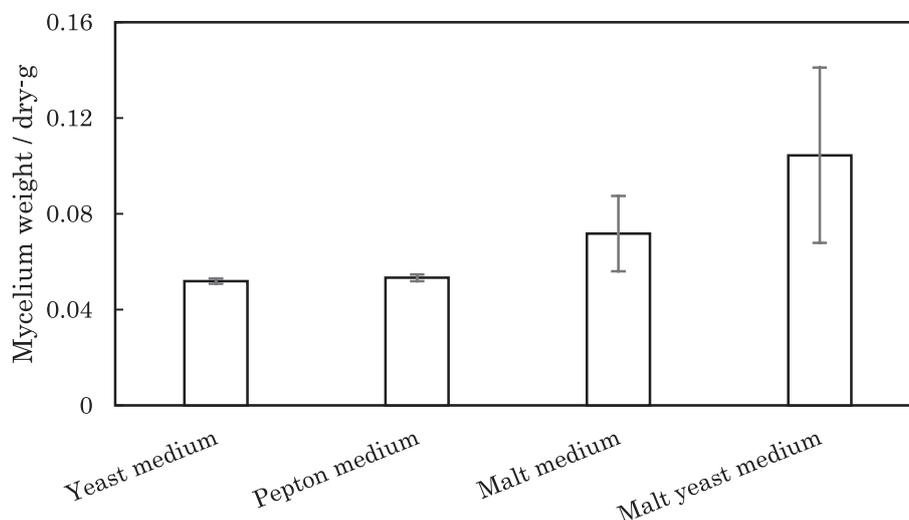


Fig. 1. Effect of culture medium on growth of *Phellinus linteus* mycelium for 10 days.

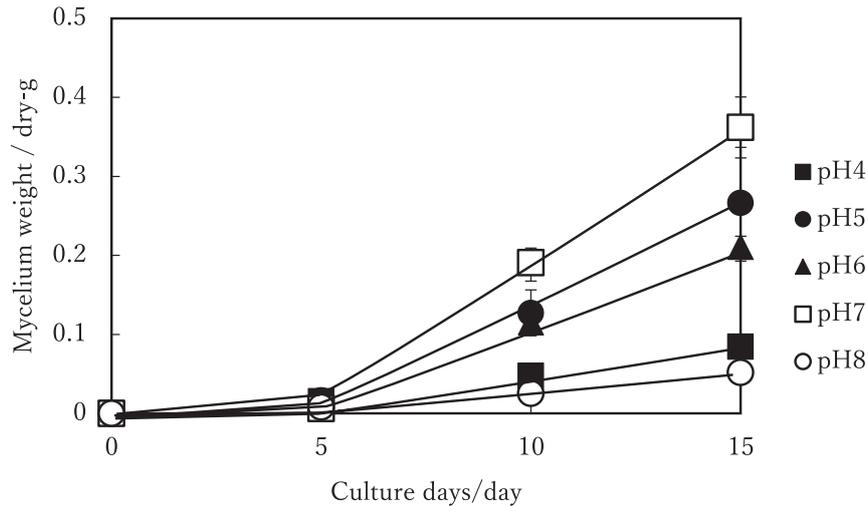


Fig. 2. Effect of initial pH for medium on growth of *Phellinus linteus* mycelium. Mycelium growth at pH 4 (black squares), pH 5 (black circles), pH 6 (black triangles), pH 7 (white squares) and pH 8 (white circles).

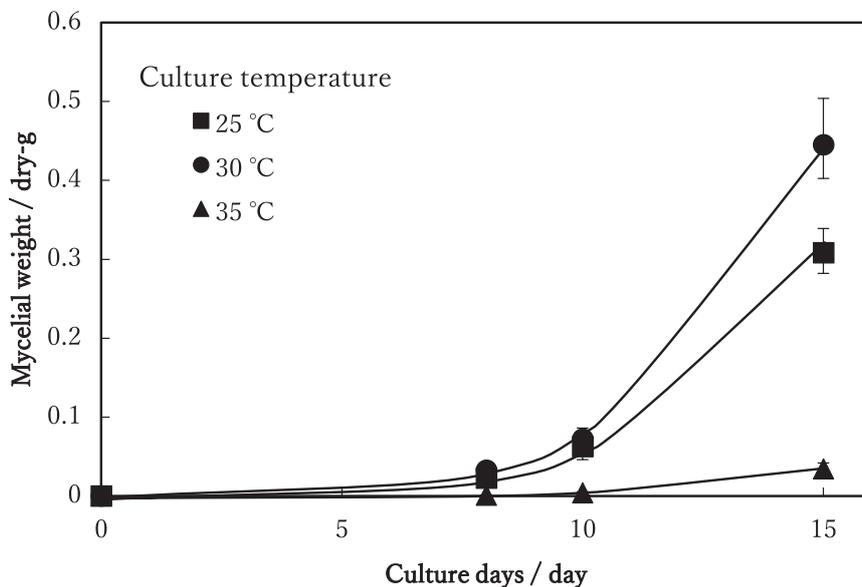


Fig. 3. Effect of culture temperature on growth of *Phellinus linteus* mycelium. Mycelium growth at temperature 25°C (black squares), 30°C (black circles), and 35°C (black triangles).

生育が最も速いことが分かった (Fig. 2)。このことから、麦芽・酵母培地を用いた *Phellinus linteus* 菌糸体の液体培養においては、初期 pH 7 が最も培養に適していることが明らかとなった。

(2) 培養温度の影響

担子菌の種類により生育に適した至適温度があり、近縁種であるカバノアナタケ (*Fuscoporia obliqua*) の至適温度は 25°C¹³⁾、サナギタケ (*Cordyceps militaris*) は 28°C¹⁴⁾、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) は 30°C¹⁵⁾ と報告されている。そこで、*Phellinus linteus* 菌糸体に関して、25~35°C の範囲で最適な培養温度の検討を行った。

最も生育が速かった初期 pH 7 の麦芽・酵母培地を用いて培養至適温度の調査を行った。pH 7 に調製した麦芽・酵母培地を用いて異なった培養温度で培養を行った結果、25°C から 35°C までの範囲で生育が認められ、特に

30°C において生育が最も速いことが分かった (Fig. 3)。一方、35°C で成長の急激な低下が確認された。

3.3 イチョウ葉抽出物の添加効果と至適濃度

菌糸体の培養時に生理活性の高い物質を加えることにより、菌糸体の生育に関わる代謝を高め、成長を促進させることができるものと考えた。そこで、生理活性の高い植物としてイチョウ (*Ginkgo biloba*) に着目した。イチョウ葉はヒトに対し、抗酸化作用、血液凝固抑制作用、脳機能障害の改善などの高い生理活性を持っていることが知られている^{7,8)}。

麦芽・酵母培地において、初期 pH 7、30°C で培養した際のイチョウ葉抽出物の *Phellinus linteus* 菌糸体への成長促進効果を検討したところ、培地に対する抽出物の含有率が 0.005 vol% において菌糸体の生育量が最大となったことから、0.005 vol% が至適濃度であることが明

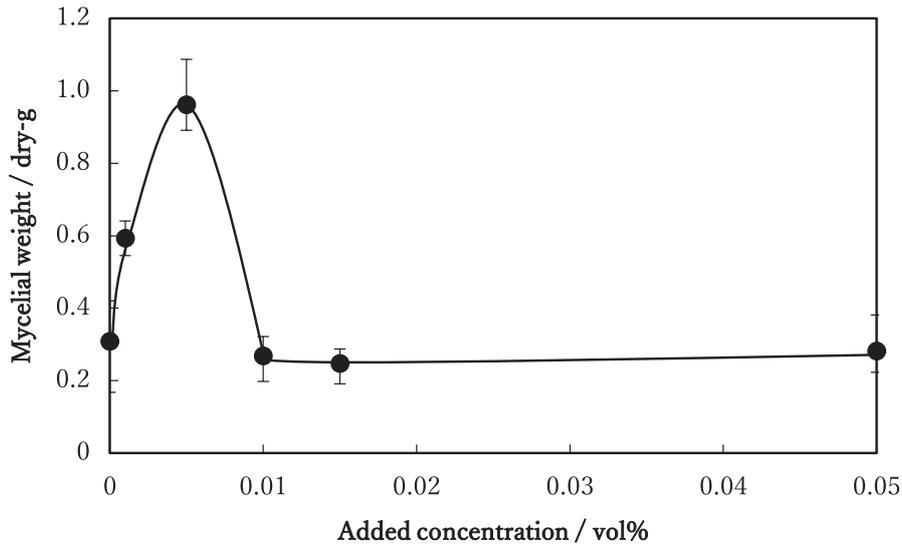


Fig. 4. Effect of addition of *ginkgo biloba* leaf extracts on culture for 10 days.

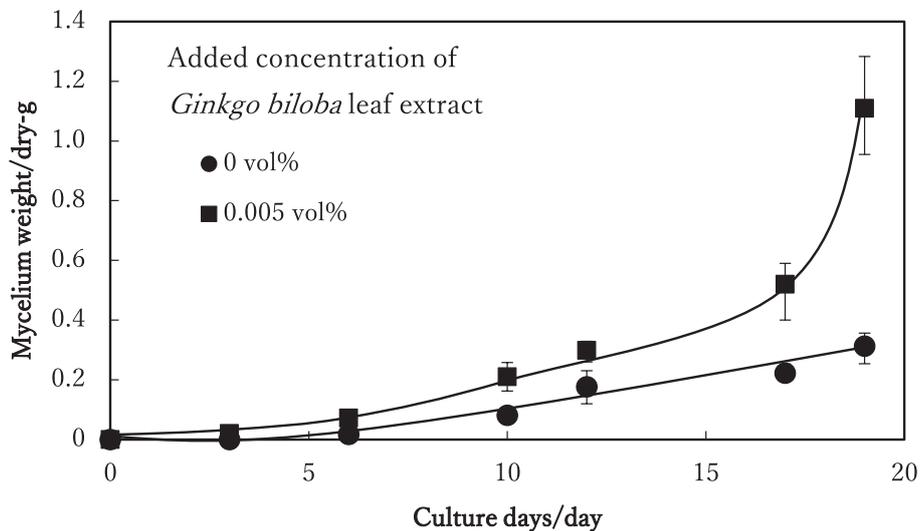


Fig. 5. Change of growth for *Phellinus linteus* mycelium culture addition *Ginkgo biloba* leaf extracts. Mycelium growth at 0.005 vol% of *ginkgo biloba* leaf extracts (black circles) and without extracts (black squares).

らかとなった (Fig. 4)。生育量の経時変化を確認したところ、培養開始から6日間までは菌糸体の生育はほとんど認められなかったが、培養開始から10日後にはイチョウ葉抽出物を0.005 vol%添加した菌糸体が無添加のものと比較して2.5倍、19日後では3.8倍となることが分かった (Fig. 5)。このことから、イチョウ葉抽出物が *Phellinus linteus* 菌糸体に対して効果的な成長促進作用を持つことが明らかとなった。

3.4 *Phellinus linteus* 菌糸体が細胞に与える NO 産生能

菌糸体内にはヒトの恒常性を高める高分子多糖類が含まれている。この高分子多糖類はマクロファージの一酸化窒素合成酵素 (NOS) の発現を誘導し、産生された一酸化窒素 (NO) には細菌やがん細胞を除去する効果があることが知られている¹⁶⁾。このことから、菌糸体抽出物とマウスの細網肉腫の腹水より樹立されたマクロファージ細胞株である J774.1 細胞 (JCRB 細胞バンク)

を用いて一酸化窒素産生を指標とした免疫賦活能の評価を行った。

マクロファージが活性化することにより、生体本来が持つ生体恒常性維持能力が高まる。そのなかでもマクロファージの NO 産生能は、細菌やウイルスなどの異物を排除する時に亢進する。そこで今回は、マクロファージ細胞株 J774.1 の NO 産生能を評価することで抽出物の有する自然免疫に対する機能を評価した。

初期 pH 7 の麦芽・酵母培地にイチョウ葉抽出物を 0.005 vol% 添加し 30°C で 20 日間培養した菌糸体を、25~100°C で抽出した。得られた *Phellinus linteus* 菌糸体抽出物の NO 産生能をそれぞれ測定したところ、60~70°C における抽出物において NO 産生能が高く、10.4~10.6 μM となった (Fig. 6)。また、*Phellinus linteus* 抽出物は 25°C 抽出では 0.6 g、60°C では 0.7 g 得られ、高い抽出温度ほど抽出物量が增大することが認められた。

Phellinus linteus 菌糸体と同条件にて培養を行った

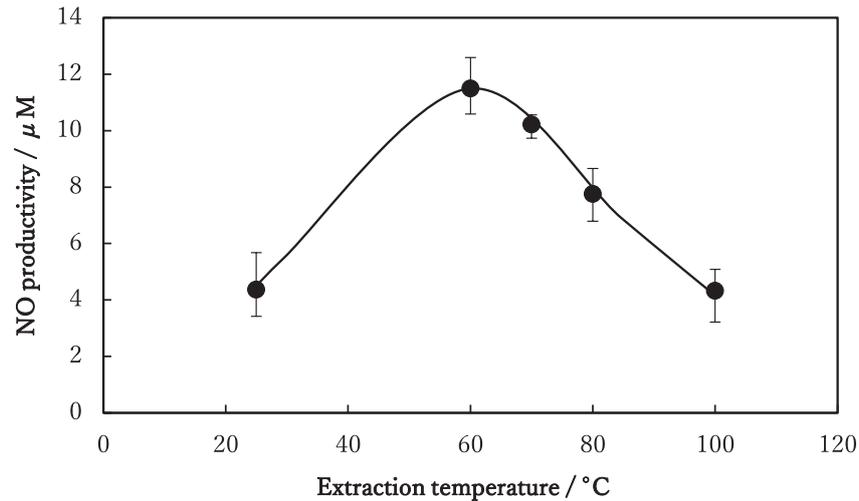


Fig. 6. NO productivity for mycelium extracts which obtained under different extraction temperatures.

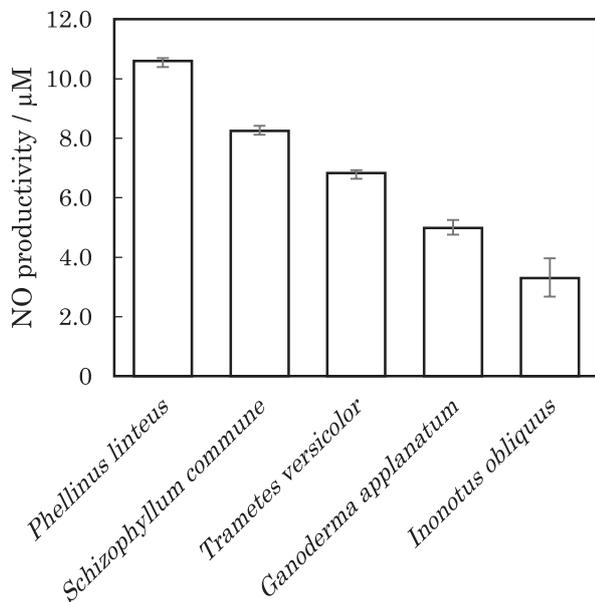


Fig. 7. Comparison of NO productivity with other mycelium extracts.

スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*), カワラタケ (*Trametes versicolor*), コフキササルノコシカケ (*Ganoderma applanatum*), カバノアナタケ (*Inonotus obliquus*) 菌糸体を 60°C にて抽出を行い NO 産生能を測定した。

その結果, *Schizophyllum commune* 菌糸体抽出物の 8.3 μM と比較しても *Phellinus linteus* 菌糸体は約 1.3 倍高い NO 産生能を示した (Fig. 7)。一方, キノコ子実体の NO 産生能では, マイタケ (*Grifola frondosa*) では 6.6 μM, シイタケ (*Lentinula edodes*) では 9.2 μM である¹⁷⁾ ことから, 他のキノコ類と比較しても *Phellinus linteus* 菌糸体抽出物はマクロファージの NO 産生能を増強させる効果を有するため, 自然免疫向上に効果が示唆された。

4. 結 論

Phellinus linteus 菌糸体の培養に最適な培地は, 麦芽・酵母培地であり, 最適な初発 pH は 7.0 であることが明らかとなった。培養時の至適温度は 30°C であり, 35°C では生育阻害を起こすことが分かった。成長促進剤としてイチョウ葉抽出物を培地に添加したところ, 0.005 vol% 濃度の際に高い成長促進効果があることが認められ, 未添加のものと比較して 3.8 倍菌糸体量が増加することが分かった。

Phellinus linteus 菌糸体抽出物が示す抗腫瘍活性について NO 産生能を指標として評価したところ, 本菌糸体では 10.4~10.6 μM が得られ, 他のキノコ類と比較すると高い NO 産生能を J774.1 細胞に与えることが明らかとなった。

文 献

- 1) Ikekawa, T., M. Nakanishi, N. Uehara, G. Chihara, and F. Fukuoka. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. GANN Jpn. J. Cancer Res. 59: 155-157.
- 2) 中嶋加代子, 岸本律子. 2009. 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. 28: 1-8.
- 3) 安川 憲, 北中 進, 高橋宏之, 平山秀樹, 重本 桂. 2007. 天然メシマコブ子実体のマウス皮膚における発癌プロモーション抑制効果. 生薬学雑誌. 61: 14-17.
- 4) 石原伸治, 渡辺敏郎, Mazumder Tapan Kumar, 永井史郎, 辻 啓介. 2005. ラットにおけるメシマコブ菌糸体の血糖値上昇抑制作用. 日本栄養・食糧学会誌. 58: 225-229.
- 5) Kues U., Y. Liu. 2005. Fruiting body production in basidiomycetes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 141-152.
- 6) 村越重雄, 張 清芬, 上門敏也, 田村三郎. 1975. 各種植物の抽出物がカイコの成育におよぼす影響について. 日本応用動物昆虫学会誌. 19: 208-213.
- 7) Jiang, X., B. Nie, S. Fu, J. Hu, L. Yin, L. Lin, X. Wang, P. Lu, and X.-M. Xu. 2009. EGb761 Protects hydrogen peroxide-induced death of spinal cord neurons through inhibition of intracellular ROS production and modulation of apoptotic regulating genes. Journal of Molecular Neuroscience. 38: 103-113.
- 8) Kleijnen, J., P. Knipschild. 1992. Ginkgo biloba. The Lancet. 340: 1136-1139.

- 9) 浜田 稔, 1964. マツタケおよび類縁菌の菌純粹培養法. マツタケ—研究と増産—. 97–100.
- 10) Sun, J., X. Zhang, M. Broderick, and H. Fein. 2003. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*. 3: 276–284.
- 11) Lee, J.W., S.J. Baek, and Y.S. Kim. 2008. Submerged culture of *Phellinus linteus* for mass production of polysaccharides. *Mycobiology*. 36: 178–182.
- 12) Hwang, H.-J., S.-W. Kima, J.-W. Choi, and J.-W. Yun. 2003. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 309–319.
- 13) Fukushima, R., R. Kodaira, M. Shimosaka and M. Okazaki. 2002. Studies on cultivation of the basidiomycete *Fuscoporia obliqua*. *Japanese Society of Mushroom Science and Biotechnology*. 10: 221–228.
- 14) Xie, C., G. Liu, Z. Gu, G. Fan, L. Zhang, and Y. Gu. 2009. Effects of culture conditions on mycelium biomass and intracellular cordycepin production of *Cordyceps militaris* in natural medium. *Annals of Microbiology*. 59: 293–299.
- 15) 金子周平, 石川景子. 2008. マンネンタケ (霊芝) の栽培授術開発と育種. 福岡県森林林業技術センター研究報告. 9: 1–7.
- 16) 小室 巖, 赤川清子. 2002. 微生物によるマクロファージ NO 産生誘導機構. *臨床免疫*. 37: 605–615.
- 17) 水野雅史. 2001. 食用キノコに含まれる機能性多糖の免疫学的測定法の確立とその応用. *日本食品科学工学会誌*. 48: 793–797.