

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450235

研究課題名(和文) 加齢性疾患に対する高次機能性きのこ栽培技術の開発とその効能評価

研究課題名(英文) The development of cultivation technology of highly advanced functional mushroom for age-related diseases and the evaluation of its efficacy

研究代表者

江口 文陽 (EGUCHI, FUMIO)

東京農業大学・地域環境科学部・教授

研究者番号：60337467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化に伴う各種疾患は問題となっている。本研究は、加齢に伴う疾患の予防と治療に対するきのこの効果を検証した研究である。きのこの栽培法や成長ステージによって機能性成分は変化する。その生体に対する影響を精査した。加齢に伴う病理所見は、炎症や免疫の低下などが最初に発現する。きのこの摂取量、きのこの加工法、きのこの摂取方法が血流と炎症などの改善に関するメカニズムを明確にした。また、きのこの多機能性の要因は、比較的低分子の糖鎖とアミノ酸が血液脳関門を通過し、脳内モノアミンの産生や脳幹に作用して酵素やホルモンの分泌を促進し、各受容体に作用することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Various diseases associated with aging pose problems. This study verified the efficacy of mushroom on the prevention and treatment of age-related diseases. The functional ingredients of mushroom vary according to the cultivation method and growth stage of it. We precisely examined its influence on the living body. Pathological findings associated with aging are initially manifested in inflammation, decline of immunity, or the like. We clarified the mechanism by which the intake amount, processing method, and intake method of mushroom were involved in the improvement of blood flow, inflammation, etc. In addition, we verified that the multifunctionality of mushroom was attributed to the fact that relatively low molecular carbohydrate chains and amino acids passed through the blood brain barrier, acted on the production of monoamine in the brain and the brainstem, promoted the secretion of enzymes or hormones, and acted on each receptor.

研究分野：木質科学

キーワード：きのこ 菌類 加齢性疾患 機能性きのこ 生活習慣病 栽培技術 モミガラ 資源循環システム

1. 研究開始当初の背景

きのこの品種や栽培法にこだわった研究の重要性は注目されているものの、機能性がある品種のある株で確認されると同一名のきのこ全てがあてはまるかのごとくヒトは同品種に殺到する。同一名のきのこでも数十以上の菌株があるとともに栽培方法も産地で千差万別であり、株間の機能性は大きく異なる。

きのこの機能性評価は、菌株や栽培方法に特化して、その総合的な機能性発現を評価することが極めて重要である。福島原発事故以来、木粉の放射性物質汚染は問題となっており、その代替資材を用いての新規栽培法による生産物の機能性を科学的に評価し、付加添加物などによっての高次機能化栽培法を確立することも急務である。

本研究は米と牡蠣殻の農林水産バイオマス資源を活用し、骨粗しょう症、生活習慣病などの疾患に対応するきのこ生産法の確立を目指した。

2. 研究の目的

きのこ栽培においては、子実体の形態が第一の指標となっており、機能性関与成分の量比や機能性効果に特化した生産技法の確立はなされていない。本研究に関する研究ストラテジーは、これまで曖昧に議論されてきた食効作用のある天然物の農林科学的な解析、すなわち日本の基幹作物であるコメ栽培におけるバイオマス資源としてのモミガラ、米ぬか、稲ワラを循環利用してきのこを生産することである。

コメ生産のバイオマス資源を利用してきのこ栽培をおこなうことを目的としている。さらに機能性能が豊富であることが期待できる野生タイプのヒラタケ属きのこの栽培を目指す。すなわち各種培地添加物(貝化石、牡蠣殻、微細藻類等)の添加によりカルシウム、食物繊維量が豊富になることを期待して、機能性成分を強化する栽培技術を確認することを目的とした。

目的達成のために 菌株の特定、栽培培地(原材料および培養方法)の選定、栽培環境の固定をベースにして再現性を担保した上で食効作用の解析を試みた。

一例を挙げれば、きのこの栽培培地原材料の木粉(木質系培地)を対照として稲ワラ、モミガラなどの(非木質系培地)それぞれの基材に変えて栽培したきのこ(ヒラタケ属)子実体熱水抽出物を、ヒト血漿および繊維芽細胞を用いての解析、血小板凝集抑制作用およびケモカイン遺伝子発現抑制、抗骨粗鬆症効果などの効果が、培地原材料により有意に異なるかを精査した。

栽培可能な天然物の食効作用の解析において、実験材料すなわち栽培方法にまで踏み込んだ効能解析に関する研究は、申請者らが微細藻類などの添加培地を用いて実施した研究など限られた成果しか得られておらず、

本研究においてこれまで以上に『培地原材料と発生する子実体の食効に関する食品科学、応用薬理学的知見』が構築される。

培地添加剤として貝化石や牡蠣殻、さらには栄養価に富み安全性が確認されている食品残渣の利用を栄養源として用いることでの環境に配慮したバイオマス有効利用の構築と特用林産物であるきのこをわが国の誇る有用資源として科学的評価のもとに確立し、生産者の生産意欲向上につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

稲作において発生する農業生産廃棄物(稲ワラ・モミガラ)とカルシウムリッチな水産廃棄物である牡蠣殻培地基材としたヒラタケ属きのこの栽培方法を開発した。栽培されたきのこの一般成分、安全性、機能性成分を精査するとともにそれらのきのこを活用した加工食品の試醸なども行い特用林産物の需要拡大の基盤となるエビデンスを構築する実験手法を用いた。すなわち、現代社会における高齢化による骨粗しょう症や生活習慣病(血流の低下と炎症)などの加齢性疾患は増加の一途をたどっており、この疾患を主たるターゲットとしてヒラタケ属きのこを稲ワラ、モミガラ、牡蠣殻培地で培養し高カルシウム含有きのこの生産法を確立する。また、木粉の代替培地資材を供試、生産子実体の機能性評価を *in vitro* と *in vivo* の評価系にて解析し、きのこの新規栽培手法の確立とともに高次機能性きのこ生産手法を慣行栽培法と比較した。

<具体的方法>

稲ワラ、モミガラ培地でのきのこ栽培技術の開発

農林水産廃棄物(モミガラ、稲ワラ、米ぬか、牡蠣殻等)を培地基材、あるいは添加剤として使用した低コストきのこ栽培方法を確立した。その際、本研究では、成果を一般農林家の参入を極めて容易にすることを目的として、販売戦略や輸出も視野に入れて、欧州、米国並びに東南アジアにおいて認知度と嗜好性の高い、ヒラタケ属きのこを供試した。また、海外日本産きのこの差別化、優位性を確保するために、市場流通しているシメジ状のヒラタケとは異なる自然界で発生している野生のものに近い形態で、ミネラルやアミノ酸が通常の栽培よりもリッチで、免疫機能向上や生活習慣病やガンなどに有効な成分を強化したヒラタケ属きのこの生産を目指した。また、これらの条件に適した菌株の効率的な選別方法の検討もおこなった。

具体的な栽培法は、木粉とフスマを重量比5:1の割合で混合したものをコントロールとした。コントロールの木粉を無加工もみ殻50、100%置換したものをもみ殻培地とした。850ml 容ポリプロピレン製培養瓶あるいは2.5 kg容ポリプロピレン製袋に各培地を充填し、オートクレーブ滅菌(121、60分間)後、

種菌を接種し、温度 26 ± 2 、湿度 $70 \pm 5\%$ の条件下で培養した。菌糸蔓延後、菌掻きおよび袋の開封をおこない、温度 14 ± 2 、湿度 $90 \pm 5\%$ の条件下で子実体を発生させた。

子実体の成分分析

発生した子実体について、温度 40 - 60 可変方式で通風乾燥後、公定分析法に準拠して各種成分の分析をおこなった。灰分は乾式灰化法、タンパク質はケルダール法、脂質はソックスレー抽出法、食物繊維はプロスキー法を用いた。糖質は計算値とし、全体から水分、灰分、タンパク質、脂質、食物繊維を差し引いた値を糖質とした。ミネラルについては、ICP 発光分析法で分析した。アミノ酸、ビタミンについては、HPLC 分析システムにより分析した。

きのこの機能性解析

抗骨粗しょう症、メタボリックシンドローム、抗炎症効果等の機能性評価試験による機能性・差異性の確定をおこなうため、ヒラタケを生活習慣病予防効果の高い機能性をもった新規天然素材食品添加物とすることを、子実体およびその抽出物に対して、骨粗しょう症改善効果、脂質異常症改善効果、高血圧抑制効果、抗炎症効果等機能性評価試験を行ってヒラタケの機能性、他のきのこのことを明確にした。

各種疾患の初期臨床の発現は、血流の悪化と炎症によることが多い。したがって、各種栽培法で生産された子実体を網羅的に解析した。すなわちその具体的な方法は、

)ヒト多血小板血漿 (PRP) および乏血小板血漿 (PPP) の調整: ヒト血液を遠心 (1100rpm、20 分間、室温) し、上清を多血小板血漿 (PRP と略記) として採取した。PRP の一部に対してさらに遠心 (3000rpm、5 分間、室温) を行い、当該上清を乏血小板血漿 (PPP と略記) として採取した。

)血小板凝集率の測定方法

前記方法で調整した PRP (各 $223 \mu\text{l}$) を 37 で予備加温した後、試験物質を $2 \mu\text{l}$ 添加し、さらに 37 で 3 分間保温した。その後、アラキドン酸ナトリウム、PAF および ADP または (PAF) を終濃度がそれぞれ $1 \mu\text{M}$ 、 50nM となるように添加し、血小板凝集を惹起した。血小板が凝集後の透過率をアグリゴメーターで測定した。凝集物質添加前の PRP の透過率を 0%、PPP の透過率を 100% に設定して、凝集物質添加後 PRF 透過率の最大凝集時を血小板凝集率 (%) とした。

)ケモカイン遺伝子発現抑制効果の測定

ヒト皮膚線維芽細胞を 10% ウシ胎児血清が含有された DMEM 培地 (ダルベッコ変法イーグル培地) を用いてコンフルエントになるまで培養した (培地量 10ml / 6cm 培養皿)。試験物質を $50 \mu\text{l}$ 添加した後、TNF- (終濃度 1ng/ml) を添加して 37 で 6 時間培養した。その後、常法に従って細胞から RNA 抽出・cDNA 合成を行った。得られた cDNA を用いて定量的 PCR 法 (TaqMan PCR 法) を行い、IL-8 お

よび RANTES 遺伝子の発現量を解析した。当該遺伝子の発現量は、GAPDH (グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素) を内部標準遺伝子として発現量の補正を行った。

研究成果の目標値としては、一日の適正摂取用量の規定、機能性に関する最少有効用量・最大有効用量を明確化することとした。特に天然物生物学的曲線の算出と中央有効用量の数値化を達成し開発食品への添加量などを決定した。

子実体と開発食品の機能性評価試験

骨粗しょう症改善効果に対する骨芽細胞の骨形成マーカーアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性による骨形成促進因子解析試験を実施した。

きのこの安全性解析

Vista-PRO ICP 発光分光分析装置を用いて As、Cd、Cr、Cu、Hg、Pb などの重金属を分析した。また LC/MS/MS を用いて残留農薬を分析した。変異原性試験 (エームテストまたはウムラック法)、モデル動物を用いた毒性試験 (急性・亜急性など) のほか医薬品との相乗・相加効果や二次的害作用の発現の問題点にも着目した試験を実施した。

きのこの多機能性に関する機序解析

きのこの効能は数種疾患など多岐にわたって発現することからその作用メカニズムについてエノキタケなどを供試しておこなった。

4. 研究成果

栽培試験の評価

ヒラタケの栽培は、稲ワラ、モミガラ培地で可能であった。モミガラ培地で最も注意すべき点は、培地調製時の含水率調節であり、モミガラの撥水作用により含水率を 65% よりも多く含む培地では培養時に瓶や袋の底に水分層が形成され、収量の低下が起こることがわかった。きのこ生産現場レベルで簡易水分計で計測することが最良であるが、資材としてのモミガラの含水率を見極めた水分調整の注意を普及段階ではマニュアルに明記することが必要であることがわかった。図 1 は、木粉をモミガラに置換して栽培した子実体であり、生鮮・加工食品に用いる素材として十分な形状を有していることがわかる。



図 1 ヒラタケ子実体のモミガラでの栽培
左から木粉培地、モミガラ 25%、モミガラ 50%、モミガラ 75%、モミガラ 100% の各培地

安全性の評価

稲ワラとモミガラ残留農薬がある一定の値を超えると菌糸の成長に影響を及ぼすことが明らかになった。今回分析したモミガラからは最大で使用農薬が 0.2ppm 検出された。しかしながら、収穫した子実体からは使用農薬は検出されなかった。

重金属分析の結果、菌糸体及び子実体ともに健康に被害をおよぼす重金属は検出されなかった。復帰変異原性試験の結果も陰性を呈した。

収穫したきのこの成分及び機能性に関する評価

コントロール培地と各種モミガラ培地の間で一般成分、血小板凝集抑制効果、ケモカイン遺伝子発現抑制効果、 α -グルコシダーゼ阻害活性、ACE 阻害活性、リパーゼ阻害活性を分析したところ、慣行の木分培地と比較して有意な差が発現することはなかった。稲ワラやモミガラを使用しても慣行栽培法と同等な子実体が生産されることを確認した。

貝化石や牡蠣殻を添加した培地でのヒラタケ生産

貝化石や牡蠣殻の培地への混合は 5%程度であれば生産上何ら問題はないことがわかった。また、慣行栽培のものよりも子実体のカルシウム含有量が 10%程度増加されることも確認された。なお、この子実体の安全性も上記の解析結果と同様に確認されたことから高付加価値化を目指したきのこ生産に寄与するものと考えられる。

骨粗しょう症改善効果

食餌性カルシウム欠乏症マウスを用いた前臨床試験の結果、骨芽細胞の骨形成マーカーアルカリフォスファターゼ(ALP)活性評価は良好であり、骨形成促進因子に対して研究によって開発された栽培法(稲ワラおよびモミガラ培地への貝化石や牡蠣殻添加)によって生産されたヒラタケは機能性きのことして利用できることがわかった。

きのこの多機能性の解明

ヒラタケ、エノキタケを用いてきのこの多機能性のメカニズムを探ったところ、きのこの糖とタンパク質の複合成分は、腸管吸収され脳内に到達し、脳内モノアミンなどに作用しているのではないかといった仮説が想像できる結果を得た。また、きのこの脂質代謝異常症の改善は、キノコキトサンなどの成分が脂肪細胞上の α -受容体に結合すると、Gタンパク質を介してアデニル酸シクラーゼが活性化され、次に ATP が cyclic AMP へ変換され、cyclic AMP がプロテインキナーゼ A (PKA) に結合すると、PKA がホルモン感受性リパーゼ(中性脂肪分解酵素)を活性化する。さらに、中性脂肪はモノグリセリドと遊離脂肪酸へ分解され、遊離脂肪酸は血中へ出て、肝臓や褐色脂肪細胞へ運ばれ、燃焼される脂肪分解メカニズムがあることを見出した。

きのこの機能は、きのこの持つ成分が生体内のホルモンや酵素に作用して発現するこ

とから多機能性を有するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1) Reyes R.G., Umagat M.R., Dulay R.R., Kalaw S.P., Sumi R., Mori N., Eguchi F., Comparative elemental Composition and antioxidant activity of the fruiting bodies of *Pleurotus djamor* cultivated on sawdust and rice straw-based formulations, *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 査読有 5(10) 2572-2580 (2016).

2) Yoshimoto H., Miyazawa N., Sumi R., Kimura K., Seyama T., Eguchi F., Effect of *Agaricus spent* compost on the productivity and soil environment for low-input cultivation of forage rice, *Japanese Society of Mushroom Science and Biotechnology*, 査読有 23(4) 173-178 (2016).

3) 江口文陽, きのこの多機能性を科学する, 木材保存, 査読有 42(1)12-17(2016).

4) Eguchi F., Dulay R.M.R., Kalaw S.P., Yoshimoto H., Miyazawa N., Reyes R.G., Nutrient composition and functional activity of different stages in the fruiting body development of Philippine paddy straw mushroom, *Volvariella volvacea* (Bull.:Fr.) Sing. AENSI Journals; *Advances in Environmental Biology*, 査読有 9(22), 54-65(2015).

5) Eguchi F., Dulay R.M.R., Kalaw S.P., Yoshimoto H., Miyazawa N., Seyama T., Reyes R.G., Antihypertensive activities of a Philippine wild edible white rot fungus (*Lentinus sajor-caju*) in spontaneously hypertensive rats as models. *AENSI Journals; Advances in Environmental Biology*, 査読有 8(24), 74-81(2014).

[学会発表](計8件)

1) 高嶋幸司, 吉本博明, 江口文陽, モミガラによる循環型きのこ栽培技術の開発 ヒラタケ菌床栽培におけるモミガラの培地適性, 日本木材学会第 66 回年次大会、愛知県・名古屋市(2016年3月27日)。

2) 岩淵耕樹, 野内春太, 吉本博明, 宮澤紀子, 高嶋幸司, 江口文陽, もみ殻の添加濃度を変えた培地での数種ヒラタケの栽培試験, 日本木材学会第 66 回年次大会、愛知県・名古屋市(2016年3月27日)。

3) 清宮晃太郎, 瀬山智子, 宮澤紀子, 吉本博明, 江口文陽, もみ殻を用いて栽培したきのこ味噌の試醸, 日本木材学会第 66 回年次大会、愛知県・名古屋市(2016年3月27日)。

4) 二村果穂, 宮澤紀子, 吉本博明, 江口文陽, もみ殻菌床培地によって栽培したヒラタケ

子実体の機能特性, 日本木材学会第 66 回年次大会、愛知県・名古屋市(2016 年 3 月 27 日).

5) 藤井大樹, 西島純基, 徳永冠哉, 吉本博明, 宮澤紀子, 江口文陽, 水稻栽培の生産性と土壌環境に対する 微細藻類を主とした肥料の効果, 日本木材学会第 66 回年次大会、愛知県・名古屋市(2016 年 3 月 27 日).

6) 吉本博明, 宮澤紀子, 二村果穂, 高島幸司, 江口文陽, もみ殻培地で生産したヒラタケ属子実体の機能特性(), 日本木材学会第 67 回年次大会、福岡県・福岡市(2017 年 3 月 17 日).

7) 高島幸司, 吉本博明, 江口文陽, モミガラによる循環型きのこ栽培技術の開発()モミガラを用いたヒラタケ無殺菌栽培, 日本木材学会第 67 回年次大会、福岡県・福岡市(2017 年 3 月 17 日).

8) 角田倭, 宮澤紀子, 吉本博明, 江口文陽, もみ殻培地で生産したきのこの安全性解析無殺菌栽培, 日本木材学会第 67 回年次大会、福岡県・福岡市(2017 年 3 月 17 日).

〔図書〕(計 2 件)

1) Eguchi F., Yoshimoto H., The functional effects of dietary fungi, 「Functional foods, nutraceuticals and natural products : Edited by Texas State University」DES Publications, Inc. (査読有) 683-690 (2016).

2) 宮澤紀子: きのこの教科書 きのこの基礎知識と美味しい食べ方「Mushroom Book」榎出版, 1-46(2016).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 文陽 (EGUCHI, Fumio)
東京農業大学・地域環境科学部・教授
研究者番号: 60337467

(2) 研究分担者

宮澤 紀子 (MIYAZAWA, Noriko)
東京農業大学・地域環境科学部・助教
研究者番号: 20348147

(3) 研究分担者

瀬山 智子 (Seyama, Tomoko)
東京農業大学・地域環境科学部・准教授
研究者番号: 20596697

(4) 連携研究者

吉本 博明 (YOSHIMOTO, Hiroaki)
第一工業大学・工学部・教授
研究者番号: 30516919

(5) 研究協力者

高島 幸司 (TAKABATAKE, Koji)
琉球大学・農学部・教授