

オオワライタケの培養に関する研究

黒野 吾市, 酒井 健, 梶折 妍子
(生薬学教室)

Studies on the Culture of *Pholiota spectabilis* Fr. (Japanese big laughing toadstool).

By Goichi Kurono, Takeshi Sakai, and Kenko Tochiori.

1952年9月23日、富山県の山間地東礪波郡利賀村字大豆谷、高田茂吉方一農業一において自宅裏山で採集した茸を夕食にお汁として食したところ10~20分後に中毒症状を発現、同村診療所医師野松義愚氏の診断によつてワライタケ様中毒とされた。中毒の概況は次の如くである。

即ち夕食の膳を下げるか下げないかに1家5人、その程度に軽重の差はあるけれども、それぞれ中毒症状を呈するに至つた。呼吸器、循環器系及び消化器系には別に支障なく、心気発揚してただむやみに愉快になり笑声をあげ、又幻覚を生じた。この症状は夕食をとつてから(午後6~7時頃)翌日の午前2時頃迄続き、その間に失禁した。午前2時を過ぎてから眠りはじめ、約12時間ぶつ通して眠つた。眠りからさめた後は平常に戻つていて後遺症が見られなかつた。

この中毒菌の発生地は山林を切りひらいて耕

したところで、その畑の一隅の十数年前に切りたおしたというカシの根元に問題の茸が束生していた(着生ではない)(Photo. 1)

茸の菌蓋及び菌柄は濃黄色で、菌柄は黄色であり、その胞子は黄色であつた。茸の大きさは蓋は径5~7cm、柄は径1~3cm、高さは10~15cmである。柄は上部に鏢を有し、蓋は半球状及び管笠状で、子実体は写真でみる通り束生している。なお、この茸は国立科学博物館小林義雄氏によつて、オオワライタケ、*Pholiota spectabilis* Fr. と同定された。

われわれはこの菌を人工的に培養しようとして培地の検索を試みた。その目的は有毒成分研究の材料を大量に獲得することにあつた。先ず各種天然培地、人工培地等を作り、それら培地における発育の状態を比較したが、その結果をTable I に示す。

Table I Cultural Results of *Pholiota spectabilis* Fr.

Media				Time of Incubate (days)					
Additional Elements	C Sources	N Sources	Vitamines and Others	2	5	8	11	14	17
				3	6	9	12	15	18
Base Medium									
Potato Extracts	Glucose	—	—	+	+++	+++	+++	+++	+++
Dried Yeast Extracts	Glucose	—	—	++	+++	+++	+++	+++	+++
	"	NaNO ₃	Syn. Cul. I	++	++	+++	+++	+++	+++
	"	Glut.-Na	"	++	++	+++	+++	+++	+++
	"	"	Syn. Cul. III	++	++	+++	+++	+++	+++

Synthetic Culture I.	Sucrose	Glut.-Na	All Vitamines	±	±	+	+	+	+
	"	"	—	±	±	+	+	+	+
	Glucose	NaNO ₃	All Vitamines	±	+	++	+++	+++	+++
	"	"	—	±	+	+	++	+++	+++
	"	"	V. B ₆	±	+	++	++	++	++
	"	"	Nicotinic Acid	±	+	++	++	+++	+++
	"	Glut.-Na	All Vitamines	+	+	+++	+++	+++	+++
	"	"	—	+	++	++	+++	+++	+++
	"	"	V. B ₆	±	+	+	+	+	+
	"	"	Nicotinic Acid	+	++	++	+++	+++	+++
	"	"	V. B ₆ +Nicotinic Acid	+	+	+	+	+	+
	"	"	V. B ₁	+	++	+++	+++	+++	+++
	"	"	V. P ₂	±	+	+	++	++	+++
	"	"	Panthenic Acid B ₁ , B ₂ , C, Pa., B ₆ , Ni. A., Bio.	±	±	++	++	++	++
		—	—	All Vitamines	—	—	±	±	±
	Dextrin	Glut.-Na	"	—	—	+	+++	+++	+++
	Glycerin	"	"	—	±	+	+	+++	+++
Synthetic Culture II.	Glucose	NH ₄ NO ₃	All Vitamines	+	++	+++	+++	+++	+++
	"	"	—	+	+	++	++	++	++
	"	"	Nicotinic Acid	±	+	++	++	++	++
	"	"	V. B ₆	±	±	±	±	±	±
	"	"	Ni. A. + V. B ₆	±	±	±	±	±	±
	"	Glut.-Na	All Vitamines	+	++	++	+++	+++	+++
	"	"	—	+	+	++	++	++	++
	"	"	Nicotinic Acid	+	+	++	++	++	++
	"	"	V. B ₆	±	±	±	±	±	±
"	"	V. B ₆ +Ni. A.	+	+	+	+	+	+	
Synthetic Culture III.	Glucose	Glut.-Na	All Vitamines	±	++	+++	+++	+++	+++
	"	"	—	±	+	+	++	+++	+++
	"	"	V. B ₆	+	+	++	++	++	++
	"	"	Without Fe Methylen Blue	—	+	—	+++	+++	+++
	"	"	V. B ₁	±	++	+++	+++	+++	+++
	"	"	V. B ₂	±	±	++	++	+++	+++
	"	"	Panthenic Acid B ₁ , B ₂ , C, Pa. B ₆ , Bio, Ni. A.	±	±	++	++	++	++
	"	"	All Vitamines	—	++	+++	+++	+++	+++
	Sucrose	"	"	—	±	++	++	+++	+++
	Dextrin	"	"	—	—	+	+	+++	+++
Glycerin	"	"	"	—	—	+	++	+++	

—, ±, +.....indicates the comparison of the growth of the mycelium with control (Potato-Glucose-Medium).

The contents of each medium and those abbreviations are shown in Table II.

Table II. Composition of Each Medium

Base Media.

Synthetic Culture I (Zapeck)

K_2HPO_4	1g	} in dist. water 1L
$HgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5g	
$FeSO_4$	0.01g	
KCl	0.5g	

Synthetic Culture II (Peeffer)

NaH_2PO_4	0.2g	} in dist. water 1L
$FeCl_3$	trace	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.5g	
KCl	0.2g	

Synthetic Culture III (one of the cultures for Tuberculo bacilli)

NaH_2PO_4	0.5g	} in dist. water 1L
Na_2HPO_4	0.5g	
KCl	1.0g	
$MgSO_4$	0.5g	
$FeCl_3$	trace	

Additional Elements

Vitamines

A Drug Containing All Sorts of Vitamine (Pan-Vitan "Takeda") 1~2g/L in medium

Vitamin B ₁	(B ₁)	2.5mg/dl	"
Vitamine B ₂	(B ₂)	4.0mg/dl	"
Pantothenic Acid	(Pa.)	5.0mg/dl	"
Vitamine B ₆	(B ₆)	10.0mg/dl	"
Nicotinic Acid	(Ni.A.)	25.0mg/dl	"
Vitamin C	(C)	100.0mg/dl	"
Biotin	(Bio)	10.0mg/dl	"

Carbon Sources

Glucose	(G.)	30.0g/L	"
Suger	(S)	30.0g/L	"
Glycerin	(Gly)	30.0g/L	"

Nitrogen Sources

$NaNO_3$		2.0g/L	"
NH_4NO_3		10.0g/L	"
Glutamic Acid Na (Glut.)		2.5g/L	"

この比較は最も成績が良いと思われる3%ブドウ糖—ジャガイモ培地が基準となつているので、この培地における菌糸の発育速度を大まかな表現ではあるが、示すと、一白金耳の菌糸は2日目で約1cm, 4日目で4.5cm, 6日目で6.5cm, 10日目で約10cmの直径を有する菌叢に生長する。

一般的にみて乾燥酵母エキス添加培地群及び合成培地 III 群は基準培地(3%ブドウ糖—ジャガイモ培地)と同等或いはそれ以上にこの菌糸

を発育させる培地を含むが、それに反して合成培地 II 群は大部分のものがあまり菌糸を発育せしめない。合成培地 I 群は先ず普通である。

Table I からわれわれはこの菌の栄養要求の一端を知ることが出来る。即ちC源についてみると、ブドウ糖が一番よく、蔗糖、マンニット、デキストリン、グリセリンは一寸落ちる。N源としては有機性(グルタミン酸ナトリウムを使用)のものも無機性($NaNO_3$, NH_4NO_3 を使用)のものも殆んど差異がない。又ビタミン類の影

響はどうかとみると、一応結論的にいうと、菌の発育上からは先ず B₁ のみで充分である、といえる。乾燥酵母エキス培地において発育の良好なのは恐らくエキス中の豊富な B 群によるものであろう。なお、この菌は PO₃^{'''} を多量に含む培地においての方が良好に発育する。即ち PO₃^{'''} の少ない合成培地 II 群では菌糸は 5~6 日位迄は他の培地と同程度に発育するが、その後発育がとまってしまふ。これに対し PO₃^{'''} に富む合成培地 III 群では初め発育が遅いが、5~6 日後から急速に発育しはじめる。なお一般的にみて、合成培地 II 群ははじめよく発育するが、すぐ壊死するに至る。が合成培地 III 群ははじめは発育が遅いが後急速になり、又なかなか壊死しないという相違がある。

又 3%ブドウ糖—ジャガイモ培地(液体培地)を第 2 磷酸ナトリウム—第 1 磷酸カリウム緩衝液にて pH を調節して 4.5 から 8.3 の範囲の pH で培養を行つたところ pH 6 前後が最もよかつた。又この培地を用いて各温度で培養して至適温度をみたところ 25~30°C で最もよく発育した。40°C 以上では抑制的となる。(即ちはじめ 2~3 日はよく発育するが、その後はびたりと止まつてしまふ)。

さて、われわれは各種の培地のうちで最も成績のよいものの一つである 3%ブドウ糖—ジャガイモ培地を用いて子実体を発生せしめようとし、一応の結果を得た。以下その写真と共に報告する。

30°C の温度で培養すると菌糸は 7~10 日で

十分に発育し、ひろがる。そしてその後はこの菌糸は次第に組織化されていき、遂には白金エーゼは勿論、ガラス棒で突いても一寸破れないようになる。このような菌糸体を今迄培養していた温度より 15°C の温度のところに移し、約 3~7 日を経過すると子実体よりのものを発生する。このものは最初外観上菌蓋と菌柄との区別を有していない。そして大体は束生、ごく稀に単生する。1 週間で最盛期に達し、Photo 2. はその盛んな状態を示す。その後この子実体よりのものはその先端にいぼ状のものをつけるに至り遂には一夜にして菌蓋をつけるに至る。Photo 3. はこの状態を示すが、この写真の中央の黒い点のように見えるのが、子実体の先端についたいぼ状のものの少し発達したもので、そしてそれはこちらを向いている。子実体様のものを発生してから菌蓋をつける迄の期間は 10~15 日である。そして蓋をつけて 1 カ月程はその状態を保つが遂には枯死する。但し、これを 5°C 前後の温度のところに行った場合には数カ月間そのままの状態を保つことが出来る。

Photo 4. によつてはわれわれは菌蓋の欄をみる事が出来る。

このように培養した茸と最初に採集してきた茸とを比較すると形態上に相当に差異が認められる。これは環境の差異、つまり自然の気候及び栄養状態と人工のそれらとの差異のためと解すべきであろう。

最後に同定をお願いした国立科学博物館小林義雄氏に深謝する。

実験の部

培地の調製及び生長の比較 ジャガイモ培地；ジャガイモ 300~400g の水 1l を用いた煮汁の濾液。

乾燥酵母エキス培地；乾燥酵母 20g の水 1l を用いた煮汁の濾液。(乾燥酵母としてエピオス末を使用)。

その他の成分の組成は第 2 表の如くである。

各培地は寒天固型培地とした。

200cc のエーレンマイヤーフラスコ中に各培地 50cc 宛を分注して平板を作り、その平板の中心に一白金耳宛のオオワライタケ菌糸を接種し 30°C で incubation を行つて、各日数毎に菌叢の直径と厚さを 3%ブドウ糖—ジャガイモ平板培地の Control と比較した。



Photo. 1. Natural. The stump is oak and very old.

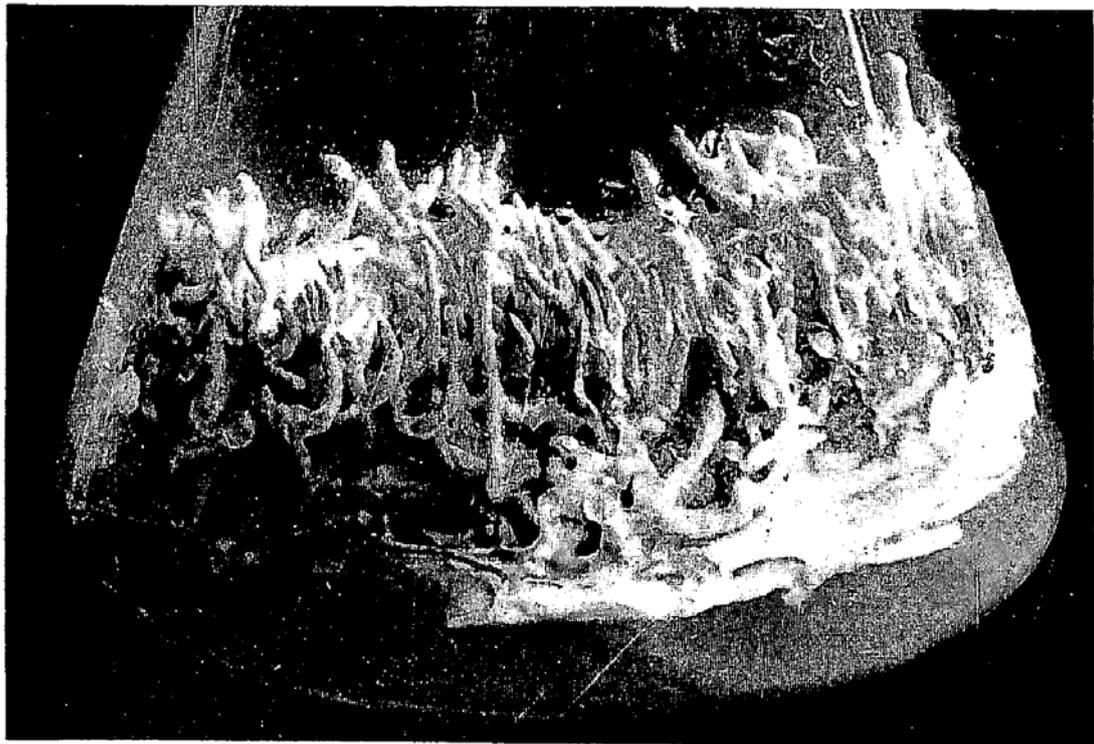


Photo. 2. Artificial. The fruit bodies are at the height of growth, but do not yet bear pileus.

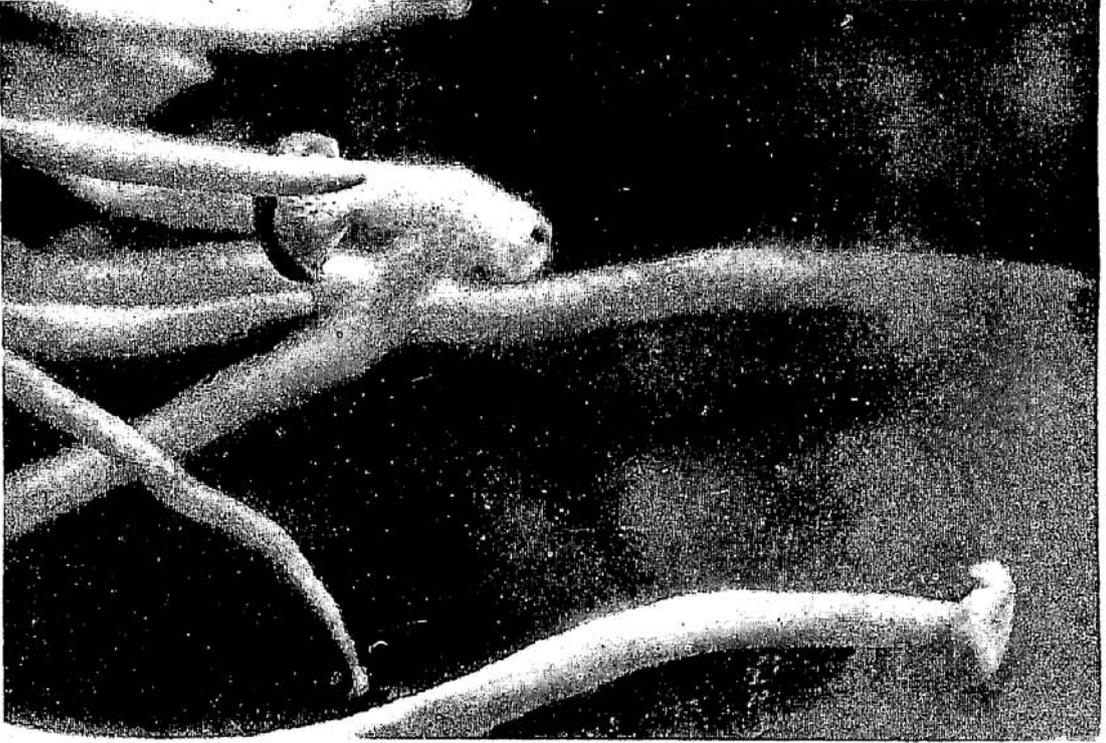


Photo. 4. Artificial. The gill of the pileus is shown.

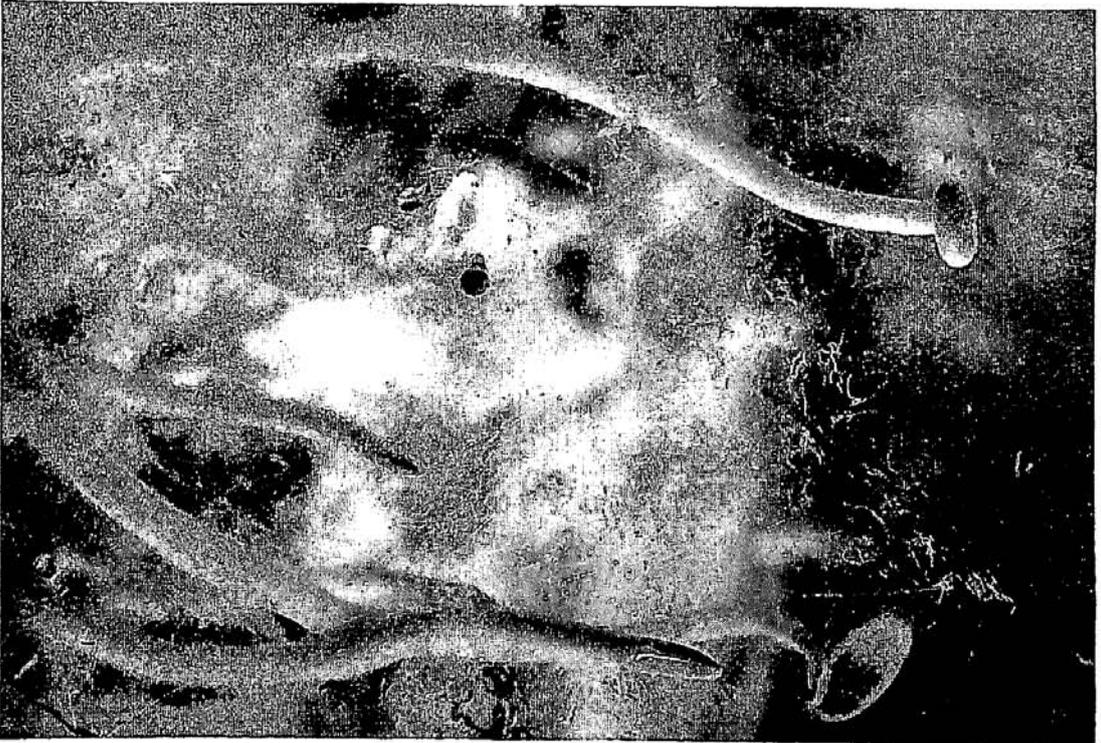


Photo. 3. Artificial. With the pileus.

至適 pH の選定 pH 緩衝液：第 2 燐酸ナトリウム—第 1 燐酸カリ緩衝液。

実施 pH 範囲；pH 4.5~8.3

測定；ガラス電極 pH メーター。

培養温度の選定 15°C 以下；菌糸発育せず。20°C まで；やや発育

25°C まで；少々発育

25°C~30°C；よく発育

30°C~40°C；大体よく発育

40°C 以上；はじめ 2~3 日はよく発育するが後抑制されるに至る。

Summary

On the 23rd, Sep. 1952, Mokichi Takada—the farmer at Ômamedani, Toga village, Toyama prefecture—and his family ate a fungus as Otsuyu (Japanese soup) in supper. After 10-20 minutes, the poisoning appeared them. The circumstances of poisoning are following.

The poisoning appeared Takada and his family as soon as the supper was over. In the respiratory organs, the blood-circulating system and the digestive organs, were not attacked. They became to the state like a drinkness, therefore became to be very pleasant, to laugh and to be visional. Afterward they slept for a half-day, after waked up, were no varied.

The fungus was identified as Ôwaraitake (Japanese big laughing toadstool: *Photiotia spectabilis* Fr.) by co-operation of Dr. Y. Kobayashi (National Scientific Museum).

We attempted to cultivate the fungus abundantly, then, tested for a variety of cultures and examined some favourable cultures for the growth of this fungus. The results showed in Table I. By viewing this table, we can see what are substances that the fungus need. That is glucose as C-source, (inorganic or organic as N-source), PO_3''' as inorganic and vitamine B_1 as micro-substance.

Now we tried to make the fruit bodies grow by using 3%-glucose-potato extract culture that is the one of the most favourable cultures, and succeeded as view in Photo. 2, 3, 4.

First, we began culture at 30°C, and the hypha grew well after 7-10 days. After that,

the mycelium formed a hard tissue and at length mycelium tissue became to be hardly broken even by a glass-rod. Then we transferred the culture flask to a place of lower temperature (15°C) than the culture temperature. After 3-7 days, we observed that fruit bodies were growing in the flask. These fruit bodies had no division of pileus and stipe, and in most cases grew in group, with a few exceptions under certain circumstances. In about a week, fruit bodies would arrive at the height of growth (Photo. 2). At this time, fruit bodies did not yet bear pileus. Before long fruit bodies would put on their extremities something like knobs, which grew gradually and at last would make pileus during one night. In Photo. 3., we can see that the right pileus has opened perfectly but not the left one, and the middle black point is the knob which has not yet grown. This state is kept up for about a month, and will at last wither. But if it is transferred to a place of 5°C temperature, it can keep up its former state for several months.

The form of the cultured fungns greatly differs from that of the collected ones. We consider that this fact is owing to the difference between natural and cultural environments, and those nutritional. conditions respectively.

At present, we are studying about the toxic components and metabolic products of the fungus with either mycelium or filtered culture solution.

昭和31年6月30日受理