

表3-1 つづき

No.	農 薬	RT (min)	モニターイオン(amu)			添加 濃度 (μ g/g)	回収率(%), n=3			LOD (μ g/g) S/N=3	LOQ (μ g/g) S/N=10
			1	2	3		平均	SD	RSD		
7	cyproconazole-1,2	16.94	<u>222.0</u>	224.0		0.05	105.7	3.3	3.1	0.0007	0.002
		16.97	<u>222.0</u>	224.0							
8	dichlofluanid	14.41	<u>223.9</u>	123.0		0.05	64.4	1.9	2.9	0.003	0.01
9	2,4-dichloroaniline	7.75	<u>160.9</u>	162.9		0.05	43.9	0.6	1.4	0.0008	0.003
10	dicloran	12.04	<u>205.9</u>	176.0		0.05	100.5	4.6	4.6	0.003	0.01
11	difenoconazole-1,2	23.16	<u>323.0</u>	264.9		0.05	99.3	3.3	3.4	0.0007	0.002
		23.25	<u>323.0</u>	264.9							
12	diphenylamine	10.97	<u>169.1</u>	168.1		0.05	85.6	4.5	5.2	0.0006	0.002
13	fenarimol	20.14	<u>219.0</u>	250.9		0.05	102.3	2.6	2.6	0.002	0.007
14	fludioxonil	16.35	<u>248.0</u>			0.05	104.7	3.8	3.6	0.0009	0.003
15	flusilazole	16.63	<u>233.0</u>	206.0	234.0	0.05	104.4	2.7	2.6	0.0003	0.0009
16	flutolanil	16.27	<u>323.1</u>	173.0		0.05	111.9	5.7	5.1	0.0006	0.002
17	imazalil	16.37	<u>215.0</u>	172.9		0.25	106.9	4.3	4.1	0.0008	0.003
18	imibenconazole	24.98	<u>375.0</u>	377.0		0.05	93.2	4.2	4.5	0.0005	0.002
19	imibenconazole des benzyl	16.71	<u>235.0</u>			0.25	99.4	2.9	2.9	0.004	0.01
20	iprodione	18.75	<u>313.9</u>			0.25	95.7	2.4	2.5	0.001	0.004
21	iprodione metabolite	19.42	<u>329.0</u>			0.25	110.3	3.3	3.0	0.004	0.01
22	kresoxim-methyl	16.64	<u>116.0</u>	206.0		0.05	107.0	5.6	5.3	0.001	0.004
23	lenacil	17.98	<u>153.0</u>			0.05	101.5	5.6	5.5	0.002	0.005
24	mefenacet	19.83	<u>192.0</u>	136.1		0.05	94.9	3.2	3.4	0.0008	0.003
25	mepronil	17.57	<u>269.1</u>	119.1		0.05	107.4	4.5	4.1	0.0005	0.002
26	metalaxyl	13.91	<u>206.1</u>			0.05	101.9	6.0	5.9	0.001	0.004
27	metolachlor	14.53	<u>162.1</u>	238.0		0.05	97.0	5.4	5.6	0.0003	0.001
28	myclobutanil	16.59	<u>179.0</u>			0.05	107.3	4.0	3.7	0.002	0.005
29	paclobutrazol	16.00	<u>236.0</u>	238.0		0.05	107.8	3.6	3.4	0.0005	0.002
30	penconazole	15.34	<u>248.1</u>			0.05	107.2	3.7	3.5	0.0002	0.0007
31	pendimethalin	15.20	<u>252.1</u>	253.0		0.05	97.4	3.2	3.3	0.0005	0.002
32	pretilachlor	16.38	<u>238.1</u>	202.1		0.05	103.4	4.7	4.5	0.0005	0.002
33	procymidone	15.60	<u>283.0</u>			0.05	100.3	1.9	1.9	0.0007	0.002
34	propanil	13.56	<u>161.0</u>	163.0	217.0	0.05	104.8	0.5	0.5	0.008	0.028
35	propiconazole-1,2	17.89	<u>259.0</u>	172.9	174.9	0.05	103.8	1.9	1.8	0.0009	0.003
		18.01	<u>259.0</u>	172.9	174.9						
36	pyridaben	20.90	<u>147.1</u>	309.0		0.05	97.6	3.4	3.5	0.0004	0.001
37	(E)-pyrifenoxy	15.91	<u>261.9</u>			0.05	102.6	4.2	4.1	0.0002	0.0007
38	(Z)-pyrifenoxy	15.41	<u>261.9</u>			0.05	102.5	3.9	3.8	0.0002	0.0007
39	pyrimidifen	22.35	<u>184.0</u>	186.0		0.05	92.3	2.9	3.1	0.0002	0.0008
40	pyriproxyfen	19.74	<u>136.0</u>	226.1		0.05	101.6	2.7	2.7	0.0003	0.001
41	tebuconazole	18.31	<u>250.0</u>	125.0		0.05	103.1	1.7	1.7	0.0009	0.003
42	tebufenpyrad	19.20	<u>318.0</u>			0.05	103.6	3.2	3.1	0.0002	0.0008
43	thienylchlor	18.22	<u>288.0</u>	127.0		0.05	105.8	3.8	3.6	0.0007	0.002
44	thiabendazole	15.65	<u>201.0</u>	174.0		0.25	104.1	2.8	2.7	0.005	0.02
45	triadimefon	14.78	<u>208.0</u>	210.0		0.05	105.0	5.1	4.9	0.002	0.008
46	triadimenol	15.62	<u>168.1</u>	112.1		0.05	106.9	4.0	3.7	0.001	0.004
47	tricyclazole	16.49	<u>188.9</u>	161.9		0.25	94.7	2.6	2.8	0.003	0.01
48	triflumizole	15.62	<u>278.0</u>			0.05	99.1	4.2	4.2	0.0007	0.002
49	trifluralin	11.27	<u>306.1</u>	264.0		0.05	86.7	2.1	2.4	0.00008	0.0003
50	vinclozolin	13.69	<u>212.0</u>	285.0		0.05	101.6	5.5	5.4	0.001	0.004
その他の農薬											
1	benfuresate	13.48	<u>163.0</u>	256.0		0.05	104.0	1.5	1.4	0.001	0.004
2	biphenyl	8.33	<u>154.1</u>	153.1		0.05	69.2	5.2	7.5	0.0003	0.001
3	bromopropylate	18.99	<u>340.9</u>			0.05	101.3	2.4	2.4	0.0006	0.002

表3-1 つづき

No.	農 薬	RT (min)	モニターイオン(amu)			添加 濃度 (μ g/g)	回収率(%), n=3			LOD (μ g/g) S/N=3	LOQ (μ g/g) S/N=10
			1	2	3		平均	SD	RSD		
4	dimethipin	12.29	<u>118.0</u>	54.1		0.05	89.2	5.9	6.6	0.01	0.04
5	methoprene	15.67	<u>73.1</u>	111.0		0.05	108.7	3.8	3.5	0.002	0.007
6	<i>o</i> -phenylphenol	9.80	<u>170.1</u>	169.1		0.05	88.9	4.2	4.8	0.0005	0.002
7	piperonyl butoxide	18.42	<u>176.1</u>	177.1		0.05	104.1	3.0	2.9	0.0002	0.0006
8	propargite-1,2	18.31	<u>350.1</u>	173.1		0.05	104.6	2.3	2.2	0.0008	0.003
		18.34	<u>350.1</u>	173.1							

nd: not detected.

下線: 定量イオン.

* dicofolの分解物(4,4'-dichlorobenzophenone)

表3-2 検討対象農薬の保持時間及びモニターイオン, スギヒラタケ試料を用いた添加回収実験結果
[グループ2]

【グループ2】

No.	農 薬	RT (min)	モニターイオン(amu)			添加 濃度 (μg/g)	回収率(%), n=3			LOD (μg/g) S/N=3	LOQ (μg/g) S/N=10
			1	2	3		平均	SD	RSD		
有機塩素系農薬											
1	chloroneb	9.59	192.9	190.9		0.05	87.9	4.0	4.6	0.003	0.009
2	fthalide	14.94	242.9	240.9		0.05	106.5	4.0	3.7	0.0005	0.002
ピレスロイド系農薬											
1	allethrin-1,2,3,4	15.36	123.1	136.0		0.05	98.2	1.4	1.4	0.003	0.009
		15.39	123.1	136.0							
		15.46	123.1	136.0							
		15.49	123.1	136.0							
2	esfenvalerate-1,2	22.57	419.1	181.0		0.05	99.2	3.5	3.5	0.001	0.004
		22.82	419.1	181.0							
3	flumethrin-1,2	32.87	239.0	206.0		0.1	86.6	1.6	1.8	0.03	0.1
		33.79	239.0	206.0							
カーバメート系農薬											
1	aldoxycarb-dec.	5.69	68.0	80.0		0.05	96.6	6.0	6.3	0.007	0.023
2	carbofuran-3-hydroxy	13.76	137.0	151.0		0.1	94.2	4.9	5.2	0.003	0.009
有機リン系農薬											
1	famphur	17.74	218.0	217.0		0.05	154.8	11.3	7.3	0.001	0.003
2	fenchlorphos	13.98	284.9	286.9		0.05	94.9	4.1	4.3	0.0001	0.0004
3	fenthion-sulfoxide (mesulfenfos)	17.19	279.0	278.0		0.05	159.0	10.8	6.8	0.002	0.006
4	naled	11.26	300.8	109.0		0.05	43.7	1.5	3.3	0.01	0.03
5	propetamphos	12.50	194.0	138.0		0.05	104.0	3.8	3.7	0.002	0.006
6	(Z)-tetrachlorvinphos	15.92	328.9	330.9		0.05	111.0	4.8	4.3	0.0002	0.0007
7	triazophos	17.60	172.1	177.0		0.05	113.9	3.3	2.9	0.003	0.009
有機窒素系農薬											
1	alachlor	13.78	188.1	160.1		0.05	98.3	1.9	1.9	0.0007	0.002
2	atrazine	12.26	200.0	215.1		0.05	102.8	4.1	4.0	0.0004	0.001
3	azoxystrobin	23.76	344.1	345.1		0.05	104.5	4.1	3.9	0.0003	0.001
4	bentazone	14.98	198.0	119.0		0.2	0.0	0.0		0.07	0.2
5	buprofezin	16.67	172.1	106.0		0.05	106.5	5.7	5.4	0.001	0.004
6	carboxin	16.71	143.0	235.0		0.05	85.6	3.7	4.3	0.001	0.005
7	chlorfenapyr	16.80	59.1	405.9		0.05	107.5	3.6	3.3	0.0007	0.002
8	cyromazine	12.42	151.0	165.0		0.4	25.8	1.4	5.3	0.01	0.04
9	difenzoquat	16.69	234.1	233.1		0.2	49.0	9.8	20.1	0.002	0.008
10	diflufenican	18.30	266.0	394.0		0.05	109.3	3.7	3.4	0.0002	0.0006
11	ethoxyquin	12.10	202.1	174.1		0.05	31.0	7.5	24.2	0.0003	0.001
12	etridiazole	9.00	210.9	212.9		0.05	78.8	3.3	4.2	0.0006	0.002
13	fenbuconazole	21.25	198.1	129.0		0.05	105.5	3.2	3.1	0.0006	0.002
14	fenbuconazole lactone A	22.20	100.1	101.1		0.05	114.6	3.8	3.3	0.002	0.005
15	fenbuconazole lactone B	21.86	256.0	103.0		0.05	101.5	2.7	2.7	0.001	0.005
16	fenoxaprop-ethyl	20.45	361.0	288.0		0.05	98.4	4.5	4.5	0.0004	0.001
17	fenpropimorph	14.71	128.1	303.2		0.05	106.9	3.5	3.2	0.0002	0.0006
18	fipronil	15.26	366.9	368.9		0.05	114.9	6.0	5.2	0.0001	0.0005
19	fluquinconazole	20.85	340.0	342.0		0.05	90.2	1.9	2.2	0.0003	0.001
20	fluridone	22.16	328.0	329.1		0.05	93.2	5.5	5.9	0.0004	0.001
21	flutriafol	16.21	219.0	164.0	83.0	0.05	114.1	3.0	2.6	0.001	0.004
22	hexazinone	18.13	171.1	172.1		0.05	106.0	2.5	2.3	0.0009	0.003
23	levamisole	14.90	204.1	148.1		0.05	79.1	4.3	5.5	0.005	0.02
24	metribuzin	13.63	198.0	144.0	103.0	0.05	70.0	4.3	6.2	0.0005	0.002

表3-2 つづき

No.	農 薬	RT (min)	モニターイオン(amu)			添加 濃度 (μ g/g)	回収率(%), n=3			LOD	LOQ
			1	2	3		平均	SD	RSD	(μ g/g) S/N=3	(μ g/g) S/N=10
25	metribuzin DA	13.33	<u>184.0</u>	199.0		0.2	nd			0.008	0.03
26	metribuzin DADK	9.92	<u>154.0</u>	169.0		0.2	53.4	23.8	44.6	0.006	0.02
27	metribuzin DK	11.53	<u>168.0</u>	114.0		0.2	19.7	8.2	41.5	0.008	0.026
28	morantel	16.40	<u>220.1</u>	219.1		0.6	nd			0.1	0.4
29	norflurazon	17.85	<u>303.0</u>	305.0		0.05	111.3	3.6	3.3	0.0009	0.003
30	oxadiazon	16.51	<u>174.9</u>	258.0		0.05	106.0	3.6	3.4	0.001	0.004
31	oxyfluorfen	16.60	<u>361.0</u>	252.0		0.05	106.7	7.4	7.0	0.0006	0.002
32	picolinafen	18.97	<u>376.0</u>	238.0		0.05	106.8	3.6	3.4	0.0002	0.0006
33	prochloraz	20.90	<u>180.1</u>	310.0		0.05	94.1	4.1	4.3	0.001	0.004
34	propyzamide	12.61	<u>172.9</u>	174.9		0.05	103.7	4.0	3.8	0.0004	0.001
35	quinoxifen	17.94	<u>237.0</u>	307.0		0.05	106.8	2.1	2.0	0.0006	0.002
36	simazine	12.17	<u>201.0</u>	186.0		0.05	105.3	2.3	2.1	0.001	0.004
37	spiroxamine-1,2	13.76	<u>100.1</u>	101.1		0.05	101.6	4.8	4.7	0.0006	0.002
		14.29	<u>100.1</u>	101.1							
38	terbutryn	14.23	<u>226.1</u>	241.1		0.05	108.0	3.3	3.0	0.0004	0.001
39	thiacloprid	22.40	<u>251.0</u>	101.1		0.2	92.4	2.7	2.9	0.02	0.07
40	thiacloprid-amide	16.00	<u>226.1</u>	228.0		0.2	95.5	2.6	2.8	0.007	0.02
41	tri-allyl	13.06	<u>268.0</u>	270.0		0.05	93.9	3.8	4.1	0.0006	0.002
その他の農薬											
1	coumatetralyl	20.81	<u>292.1</u>	188.1		0.05	nd			0.010	0.033
2	ethofumesate	14.29	<u>286.0</u>	207.1		0.05	103.2	4.8	4.7	0.0004	0.001
3	isoprothiolane	16.39	<u>290.0</u>	188.9		0.05	107.1	5.5	5.2	0.0007	0.002

nd: not detected.

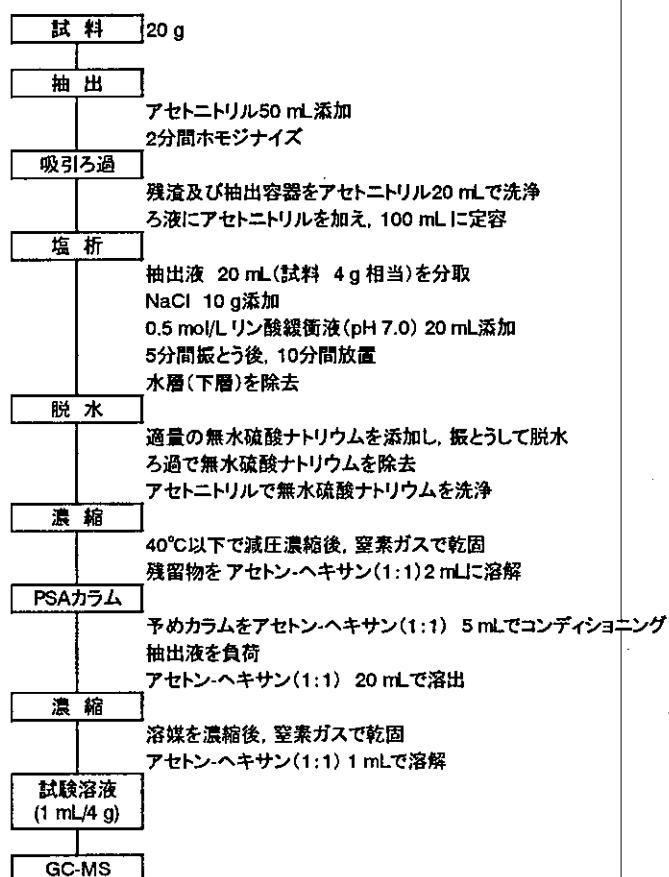


図1 残留農薬GC-MS一斉分析法の概略

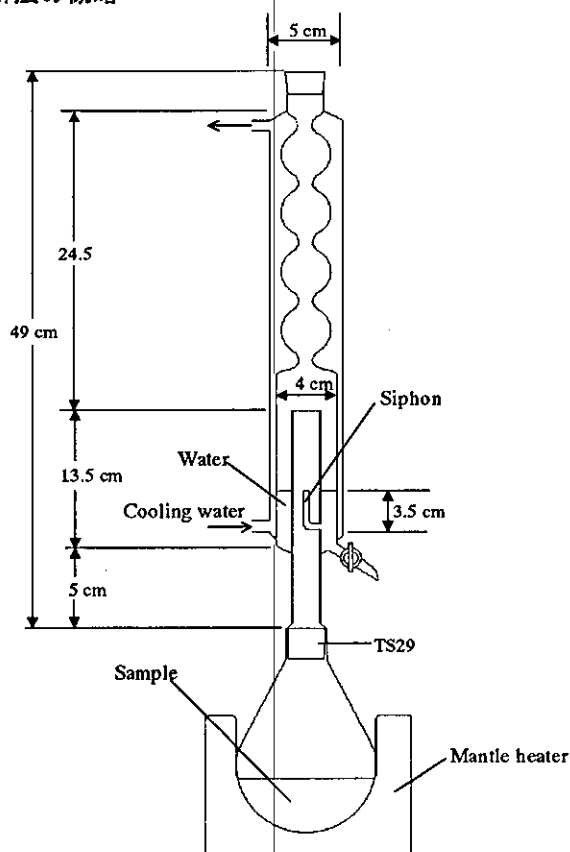


図2 水蒸気蒸留装置

表4. GC-MS一斉分析法によるスギヒラタケ中の農薬分析結果

試料	農 薬	濃 度 (μ g/g)	LOD (μ g/g) S/N=3	LOQ (μ g/g) S/N=10
No.5-14	DDT(合計)	0.009		
	<i>p,p'</i> -DDT	0.003	0.0006	0.002
	<i>p,p'</i> -DDE	0.003	0.00006	0.0002
	<i>o,p'</i> -DDT	0.002	0.0003	0.001
	dieldrin	0.004	0.0006	0.002
No. 8	DDT(合計)	0.013		
	<i>p,p'</i> -DDT	0.004	0.0006	0.002
	<i>p,p'</i> -DDE	0.005	0.00006	0.0002
	<i>o,p'</i> -DDT	0.003	0.0003	0.001
	dieldrin	0.006	0.0006	0.002
	chlordanes(合計)	tr		
	<i>trans</i> -chlordanes	tr	0.0001	0.0003
	<i>cis</i> -chlordanes	tr	0.0001	0.0003
No.19-1	DDT(合計)	0.009		
	<i>p,p'</i> -DDT	0.003	0.0006	0.002
	<i>p,p'</i> -DDE	0.004	0.00006	0.0002
	<i>o,p'</i> -DDT	0.002	0.0003	0.001
	dieldrin	0.005	0.0006	0.002
No.19-2	DDT(合計)	0.008		
	<i>p,p'</i> -DDT	0.003	0.0006	0.002
	<i>p,p'</i> -DDE	0.003	0.00006	0.0002
	<i>o,p'</i> -DDT	0.002	0.0003	0.001
	dieldrin	0.004	0.0006	0.002
No.27-20	DDT(合計)	0.010		
	<i>p,p'</i> -DDT	0.004	0.0006	0.002
	<i>p,p'</i> -DDE	0.004	0.00006	0.0002
	<i>o,p'</i> -DDT	0.002	0.0003	0.001
	dieldrin	0.004	0.0006	0.002
No.28-27	DDT(合計)	0.006		
	<i>p,p'</i> -DDT	0.002	0.0006	0.002
	<i>p,p'</i> -DDE	0.003	0.00006	0.0002
	<i>o,p'</i> -DDT	0.001	0.0003	0.001
	dieldrin	0.004	0.0006	0.002
No.28-34	DDT(合計)	0.019		
	<i>p,p'</i> -DDT	0.013	0.0006	0.002
	<i>p,p'</i> -DDE	0.004	0.00006	0.0002
	<i>o,p'</i> -DDT	0.002	0.0003	0.001
No.30	DDT(合計)	0.007		
	<i>p,p'</i> -DDT	0.003	0.0006	0.002
	<i>p,p'</i> -DDE	0.003	0.00006	0.0002
	<i>o,p'</i> -DDT	0.001	0.0003	0.001
	dieldrin	0.003	0.0006	0.002
	chlordanes(合計)	0.0004		
	<i>trans</i> -chlordanes	0.0004	0.0001	0.0003
	<i>cis</i> -chlordanes	tr	0.0001	0.0003

LOD: 検出限界. LOQ: 定量限界. tr: $\geq$ LOD, $<$ LOQ.

表5. LC-MS一斉分析各工程における回収率及びスギヒラタケへの添加回収実験の結果

No.	農 薬 ¹⁾	各工程 ²⁾ の回収率(%), n = 3						スギヒラタケ 添加回収試験 ³⁾		
		塩析			Envi-Carb/LC-NH2			回収率(%), n = 3		
		平均	SD	RSD	平均	SD	RSD	平均	SD	RSD
1	abamectin B1a	91.8	1.8	2.0	91.4	1.9	2.1	143.5	3.0	2.1
2	acetamipride	108.9	2.6	2.4	120.8	6.4	5.3	87.4	1.0	1.1
3	anilofos	93.9	1.4	1.5	99.4	1.5	1.6	78.5	0.6	0.8
4	azamethiphos	95.4	3.2	3.3	84.9	2.5	2.9	89.5	1.0	1.1
5	azinphos-methyl	95.8	3.5	3.7	104.5	3.0	2.9	65.5	0.6	0.9
6	benzobicyclon	93.1	0.9	1.0	75.7	4.5	6.0	85.4	0.8	0.9
7	benzofenap	87.9	0.4	0.5	98.0	0.7	0.7	58.4	1.9	3.2
8	butafenacil	95.8	0.6	0.6	100.1	1.0	1.0	98.5	1.0	1.0
9	chloridazon	92.0	2.9	3.1	102.6	4.2	4.1	79.2	0.8	1.0
10	chromafenozide	93.3	1.1	1.2	98.2	1.0	1.0	73.9	0.3	0.3
11	clodinafop-propargyl	96.5	1.1	1.1	99.7	2.0	2.0	75.0	0.8	1.1
12	clomeprop	94.6	0.9	1.0	96.7	1.4	1.5	70.9	2.0	2.8
13	cloquintocet-mexyl	94.7	1.5	1.6	91.5	1.8	2.0	86.5	0.7	0.8
14	clothianidin	90.0	6.1	6.8	101.0	3.4	3.3	54.1	2.7	5.0
15	cyazofamid	92.5	1.6	1.7	100.1	1.0	1.0	76.4	0.6	0.8
16	cyflufenamide	92.1	5.5	6.0	100.1	1.4	1.4	60.5	1.3	2.1
17	dimethirimol	85.8	1.4	1.7	35.1	1.2	3.5	81.7	1.4	1.8
18	emamectin B1a	114.4	2.2	2.0	21.9	2.6	11.8	68.1	0.4	0.6
19	fenoxycarb	94.7	0.8	0.8	100.3	0.5	0.5	77.3	0.4	0.6
20	ferimzone E	92.3	1.0	1.1	96.2	2.4	2.5	94.0	2.8	2.9
21	ferimzone Z	90.6	3.8	4.2	103.6	0.8	0.8	62.0	1.7	2.7
22	formetanate hydrochloride	49.8	5.0	10.1	96.9	2.0	2.0	82.7	0.9	1.1
23	furathiocarb	91.1	1.5	1.6	97.2	0.3	0.3	84.0	0.8	0.9
24	imidacloprid	90.2	8.4	9.4	101.1	8.4	8.3	75.0	2.7	3.6
25	indoxacarb	93.4	1.2	1.3	108.1	5.3	4.9	75.5	2.2	2.9
26	iprovalicarb	93.2	1.3	1.4	99.2	0.2	0.2	85.5	0.4	0.4
27	isoxaflutole	97.5	2.0	2.1	97.7	1.8	1.8	79.3	0.5	0.6
28	lactofen	91.0	1.2	1.4	97.9	0.7	0.7	69.8	1.5	2.2
29	methoxyfenozide	93.6	0.7	0.8	99.4	1.9	1.9	84.4	0.6	0.8
30	milbemectin A3	89.3	3.7	4.2	94.6	2.8	3.0	100.5	2.2	2.2
31	milbemectin A4	88.7	3.1	3.4	92.4	3.5	3.8	101.5	5.7	5.6
32	morantel	96.1	3.3	3.5	91.0	15.6	17.2	36.3	2.8	7.7
33	naproanilide	91.7	1.1	1.2	99.6	1.0	1.0	66.4	1.2	1.8
34	oryzalin	91.2	1.5	1.6	99.5	3.7	3.7	92.5	2.5	2.7
35	oxycarboxin	87.9	4.0	4.5	96.7	7.3	7.5	81.8	3.5	4.3
36	oxydemeton-methyl	64.6	5.6	8.6	97.6	5.5	5.7	57.4	1.3	2.3
37	phenmedipham	95.6	1.4	1.5	102.0	3.4	3.3	78.7	1.0	1.3
38	propham	71.8	13.4	18.7	43.0	4.1	9.4	84.8	3.5	4.1
39	pyrazolynate	92.4	2.0	2.2	81.1	5.3	6.5	84.2	2.4	2.9
40	pyrifthalid	93.8	2.7	2.8	100.7	4.4	4.3	61.8	0.5	0.9
41	pyrithiobac-sodium	66.2	2.2	3.4	0.5	0.4	89.2	63.0	1.1	1.7
42	quizalofop-p-tefuryl	88.8	2.1	2.4	99.7	0.4	0.4	59.9	1.8	3.1
43	simeconazole	93.2	0.9	1.0	101.4	4.4	4.4	66.8	0.8	1.3
44	thiabendazole	90.6	1.1	1.3	83.2	2.7	3.2	80.8	2.4	3.0
45	thiacloprid	87.8	4.2	4.8	101.6	5.6	5.5	79.8	0.9	1.2
46	thiamethoxam	85.6	5.4	6.3	103.6	9.1	8.8	65.6	0.7	1.0
47	thiophanate-methyl	0.3	0.1	43.3	38.5	3.4	8.8	Not tested		
48	tralkoxydim	77.8	0.8	1.0	79.9	2.4	3.0	57.8	0.8	1.4
49	tridemorph	96.4	1.4	1.5	93.7	1.5	1.6	89.9	3.5	3.9
50	triticonazole	92.7	2.5	2.7	95.7	2.4	2.5	62.4	0.4	0.7

1) 各農薬の検出限界: 1 ng/g, 2) 各農薬の添加量: 400 ng, 3) 各農薬の添加濃度: 100 ng/g

表6. スギヒラタケ及びその他キノコ中の重金属分析結果

試料番号	採取地	状況	分析値（生重量当たり）（mg/kg）									
			Cu	Zn	Pb	Cd	Fe	Mn	As	Se	Hg	Tl
スギヒラタケ												
2-1	秋田	生	1.49	5.6	<0.05	0.16	4.2	0.52	0.030	0.020	0.032	<0.001
2-7	秋田		1.26	6.0	<0.05	0.08	8.5	0.66	0.010	0.009	0.060	<0.001
3-C	新潟	生	1.54	4.8	0.12	0.24	15.5	1.34	0.074	0.024	0.037	<0.001
8	秋田	生(洗浄)	0.88	5.7	<0.05	0.14	10.1	0.61	0.020	0.008	0.072	<0.001
19-1	福井	生	1.37	7.0	0.09	0.06	31.3	0.96	0.020	0.007	0.072	<0.001
19-2	福井	生	1.20	4.9	<0.05	0.03	17.4	1.45	0.013	0.015	0.042	<0.001
21	京都	生	1.73	7.9	0.05	0.11	13.1	1.16	0.012	0.018	0.124	<0.001
22-1	京都	生	1.40	4.9	<0.05	0.05	5.0	0.94	0.015	0.011	0.110	<0.001
24-1	栃木	塩漬け	3.71	6.9	<0.05	0.02	41.5	0.40	0.007	0.053	0.126	<0.001
25	秋田	塩漬け	1.70	5.1	<0.05	0.02	8.2	0.12	0.006	0.003	0.094	<0.001
27-20	新潟	塩漬け	2.05	9.0	<0.05	<0.02	8.3	0.16	0.007	0.015	0.109	<0.001
28-15	新潟	生	1.46	7.4	<0.05	0.14	7.4	1.74	0.033	0.010	0.039	<0.001
28-27	新潟	生	1.33	6.9	0.08	0.12	12.2	1.60	0.034	0.021	0.051	<0.001
30	福島	缶詰	1.43	5.6	0.08	0.07	6.5	0.28	0.005	0.026	0.057	<0.001
全14試料の平均濃度(mg/kg)			1.61	6.3	0.08	0.10	13.5	0.85	0.020	0.017	0.073	<0.001
患者関連6試料の平均濃度(mg/kg)			1.38	6.5	0.08	0.08	14.3	0.84	0.017	0.015	0.067	<0.001
その他の8試料の平均濃度(mg/kg)			1.79	6.1	0.09	0.10	12.9	0.86	0.023	0.019	0.078	<0.001
その他のキノコ												
スギタケ		根つき	2.42	3.7	0.14	0.26	140	4.47	0.056	<0.002	0.009	<0.002
ナラタケ		生	0.41	1.8	0.07	0.10	2.3	0.31	0.002	<0.002	0.003	<0.002
ムキタケ		生	0.19	2.4	<0.05	0.03	6.6	2.47	0.008	<0.002	0.002	<0.002
ナメコ		生	0.45	2.3	<0.05	0.17	6.4	0.32	0.002	<0.002	0.002	<0.002
天然ユキノシタ		生	0.47	2.7	<0.05	0.14	2.6	0.79	0.001	<0.002	<0.002	<0.002
天然エノキ		生	4.94	8.9	0.07	<0.02	13.2	3.68	0.047	0.010	0.021	<0.002
ムラサキシメジ		生	0.63	2.6	0.05	0.05	16.0	2.17	0.022	0.022	0.009	<0.002
生椎茸(n=5):文献値			1.05	3.7	0.26	0.06		3.1	<0.01		0.01	
エノキダケ(n=3):文献値			0.84	6.0	<0.05	0.02		0.6	0.05		0.01	

スギヒラタケ試料番号8、27-20及び30は患者が摂取したもの。19-1、19-2及び28-27は患者が摂取したものと同一地域で採取したもの
 その他のキノコは2004年10月及び11月に秋田市で購入したもの

文献値: 田中之雄ら, 「食品中の重金属の含有量について第5報」, 食品衛生学雑誌, 18, 75-85, 1977

表7. スギヒラタケ100 g 摂取時の農薬摂取量の推定

No.	スギヒラタケ100 g 摂取時の農薬摂取量(μg)		
	DDT	ディルドリン	クロルデン
5-14	0.872	0.365	0
8	1.255	0.633	tr
19-1	0.930	0.496	0
19-2	0.814	0.442	0
27-10	0.989	0.421	0
28-27	0.629	0.439	0
28-34	1.876	0.000	0
30	0.727	0.325	0.035
平均	1.012	0.446	0.035
全食品からの1日摂取量(μg/人/日)*	0.424	0.218	—
農薬摂取量の比:スギヒラタケ/全食品(倍)	2.4	2.0	—
ADI(μg/人/日, 体重50kg)	250	5	—

*全食品からの摂取量:2003年TDS調査による1日摂取量の平均値(nd=1/2LOQで算出した場合, n=10)
 (厚生労働科学研究「食品中の有害物質等の評価に関する研究」平成13年度～15年度総合研究報告書, 主任研究者 松田りえ子から引用)

表8. スギヒラタケ100 g 摂取時の重金属摂取量の推定

No.	スギヒラタケ100 g 摂取時の重金属摂取量(μg)									
	Cu	Zn	Pb	Cd	Fe	Mn	As	Se	Hg	Tl
2-1	149	560	*5	16	420	52	3.0	2.0	3.2	*0.1
2-7	126	600	*5	8	850	66	1.0	0.9	6.0	*0.1
3-C	154	480	12	24	1550	134	7.4	2.4	3.7	*0.1
8	88	570	*5	14	1010	61	2.0	0.8	7.2	*0.1
19-1	137	700	9	6	3130	96	2.0	0.7	7.2	*0.1
19-2	120	490	*5	3	1740	145	1.3	1.5	4.2	*0.1
21	173	790	5	11	1310	116	1.2	1.8	12.4	*0.1
22-1	140	490	*5	5	500	94	1.5	1.1	11.0	*0.1
24-1	371	690	*5	2	4150	40	0.7	5.3	12.6	*0.1
25	170	510	*5	2	820	12	0.6	0.3	9.4	*0.1
27-20	205	900	*5	*2	830	16	0.7	1.5	10.9	*0.1
28-15	146	740	*5	14	740	174	3.3	1.0	3.9	*0.1
28-27	133	690	8	12	1220	160	3.4	2.1	5.1	*0.1
30	143	560	8	7	650	28	0.5	2.6	5.7	*0.1
平均	161	626	6	9	1351	85	2.0	1.7	7.3	0.1
全食品からの1日摂取量(μg/人/日)**	1190	8667	23.4	26.1		3209	188		8.9	
重金属摂取量の比:スギヒラタケ/全食品(%)	13.5	7.2	25.6	34.5		2.7	1.1		82.3	

*不検出の試料は検出限界値で摂取量を計算した。

**全食品からの摂取量:2003年TDS調査による1日摂取量の平均値(nd=1/2LOQで算出した場合, n=10)
 (厚生労働科学研究「食品中の有害物質等の評価に関する研究」平成13年度～15年度総合研究報告書, 主任研究者 松田りえ子から引用)

Ⅱ．分担研究報告書

2．きのこ成分の分析

分担研究者 穂山 浩

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

スギヒラタケ中の有害成分の分析に関する研究

分担研究報告書

きのこ成分の分析

分担研究者 穂山浩（国立医薬品食品衛生研究所食品部）

研究要旨：東北地方を中心に原因不明の急性脳症（脳炎）が50数例報告され、共通因子としてスギヒラタケ摂取との関連が示唆されたことから、その原因解明のためのスギヒラタケ中成分の化学分析をおこなった。低分子物質の解析では、各都道府県から入手したスギヒラタケ水抽出画分において紫外吸収される物質をHPLC、LC-MS、LC-TOF等の機器解析を行った。①ODSカラム及びフォトダイオードアレイモニターにより分析可能な成分の同定：日本各地から採取したスギヒラタケについて、UV検出逆相HPLCによる含有成分の検討を行った結果、数ピークが共通して検出された。それらを同定する目的で、カラムクロマトによる単離、精製を繰り返し、tryptophan, linoleic acid, oleic acid, isoamylamineを同定した。②アルカロイド抽出画分の分析：スギヒラタケ中にはキノコ毒あるいは症状から原因と考えられるような既知物質であるムシモール、ベタイン、イボテン酸、カイニン酸、ドウモイ酸、 α -アマニチン、ファロイジンに含まれていないことが判明した。③高極性物質の分析：スギヒラタケの50%メタノール抽出画分にドウモイ酸に対する抗体と交差反応性を示す画分を見出した。④二次元HPLCによる解析：2次元HPLCによる分析により、スギヒラタケに特徴的なピークが検出された。⑤LC-TOFによる解析：各産地別スギヒラタケの熱水抽出サンプルを、LC/TOF MSを用いて成分を比較検討した。その結果、被害が多かった秋田、新潟産サンプルに含量が多い分子量610の化合物を見いだした。⑥レクチン分析：スギヒラタケの糖結合性タンパク質（レクチン）を発見し、その少糖特異性を解明し精製した。⑦シアン分析：シアン化物イオンの分析を行ったところ、分析した6検体のうち、3検体から高濃度のシアン化物イオンが、1検体から微量のシアン化物イオンが検出された。2検体は検出限界以下であった。

協力研究者

天倉吉章, 近藤一成, 吉岡靖雄（国立医薬品食品衛生研究所食品部）

小川温子, 吉田奈央（お茶の水女子大学大学院）

笠原義正（山形県衛生研究所）

戸井田敏彦, 酒井信夫（千葉大学大学院薬学研究科）

ぎの切り株や倒木に多数重なって発生する。

東北、北陸、中部地方では古くから食用キノコとして食べられている。

2004年9月から11月にかけて、新潟県、秋田県、山形県など東北地方を中心に原因不明の急性脳症（脳炎）が50数例報告された。共通するものとして、重篤な痙攣重積で発症すること、比較的高齢者に多いこと、そして、患者の多くが慢性腎疾患で維持透析を受けていることが判明した。新潟県では最初の発症報告を受け、厚生労働省に連絡、そして日本中毒情報センターが毒性物質による中毒の

A. 研究目的

スギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*) は、キシメジ科 (*Tricolomataceae*) のキノコで白色、時に有色であり、耳形や扇形をしており、ス

可能性、また国立感染症研究所が感染症による急性脳炎の可能性についての調査を開始した。まず判明したことの一つに、多くの患者に認められたのが「スギヒラタケを摂食していること」であった。しかし、本来このスギヒラタケは食用として以前から新潟県や秋田県など日本北部では一般的に食されており、これまで食中毒などの報告はない。しかし2004年は台風上陸が多かったように、異常気象による環境の変化が、本来安全とされているスギヒラタケに何らかの変化を及ぼした可能性なども示唆されている。もともとあらゆるキノコにはわずかではあるが毒性を持つ成分が含まれていることも指摘された。これらのことから、原因不明の急性脳症が、スギヒラタケ摂取に起因すると考え、その原因解明を目的として他のキノコ類に存在する既知の神経毒等の天然有害毒について、HPLC、LC/MS、LC-TOFの各種機器分析等により、スギヒラタケ中の成分分析を行う。また、それら構造類似体について単離・同定を試みる。またスギヒラタケ中にシアニ化水素が存在するという報告やレクチンが存在するという報告があることから、シアニ化水素とレクチンについても各種機器分析を用いて分析を行う。

さらに上記中で分析された成分に関し、昨年に採取されたサンプルと本年に採取されたサンプルの差異についても検討する。

B. 研究方法

①ODS カラム及びフォトダイオードアレイモニタにより分析可能な成分の同定

条件検討：

①-1 抽出条件

抽出溶媒として、含水アルコール[エタノール：水（6:4）、メタノール：水（1:1）]、アセトン、酢酸エチル、水について検討した。また、還流処理の有無について比較した。具体的には①-図1に従い処理した。尚、抽出後、ろ過処理を行い、残渣を取り除いた試料溶液を減圧濃縮、凍結乾燥したものを抽出物、ろ過処理なしで残渣を含んだ状態で濃縮、凍結乾燥したものを処理物とした。

①-2 試料作成

冷凍保存された各産地由来のスギヒラタケを解凍後、水洗し、水分をよく切り、(1)の条件に従い処理し、表1のように試料を作成した。尚、処理法の番号(1～4)は、①-図1の番号に対応する。

①-3 分析条件

検討の結果、以下の条件で分析を行うこととした。

使用機器：HPLC（島津 VP シリーズ）、カラム：ODS 系カラム（L-Column ODS □ 4.6 x 150 mm：化学物質評価機構製）、溶媒（移動相）：A: 3%酢酸、B: アセトニトリル[5% B→95% B (0→50 min)]、検出波長：210, 260, 280 nm. 新潟 A での結果(280 nm)を①-図2に示す。

①-4 分画

生鮮試料 1 kg を 50%メタノール（6 L）でホモジナイズ後、ろ過し、ろ液を集めた。残渣をさらに 50%メタノール（3L）でホモジナイズ後、一晚室温放置し、ろ過後、ろ液を最初のろ液にあわせて減圧濃縮した。濃縮後、抽出物（6 g）を Diaion HP-20（三菱化学製）カラムにより分画（H₂O→20%メタノール→40%メタノール→60%メタノール→メタノール各 500 mL で順次溶出し、溶出液をそれぞれ減圧

濃縮し、各画分を得た(①-図3)。得られた各画分について、それぞれ MCI-gel CHP20P (三菱化学製) カラム ($H_2O \rightarrow 10\% \text{メタノール} \rightarrow 20\% \text{メタノール} \rightarrow 30\% \text{メタノール} \rightarrow 40\% \text{メタノール} \rightarrow 50\% \text{メタノール} \rightarrow \text{メタノール}$) で順次溶出し、HPLC によるモニターにより、ピークパターンの同じフラクションを集めた。得られた各フラクションについて、分取 HPLC により最終精製を行い、化合物を得た。

②アルカロイド抽出画分の分析

②-1 分析試料

山形県最上町の神室山から 11 月上旬に採取したスギヒラタケ(山形神室山)およびスギヒラタケ試料(3 新潟, 5 秋田, 8 秋田, 9 岐阜, 18 茨城, 19 福井)を用いた。すべて生を凍結したものを使用した。

②-2 エキスの調製

山形神室山のスギヒラタケについて予試験的にエキスを作製した。すなわち、生重量 50g をメタノール、冷水、熱水で抽出した。メタノール、冷水については2倍量を1日浸漬し2回抽出した。熱水については、2倍量で10分間沸騰させ、これを2回行った。得られたエキ스는、エバポレータで減圧濃縮し、メタノールエキス(収率 2.5%)、冷水エキス(収率 3.0%)、熱水エキス(収率 2.2%)を得た。

②-3 装置

高速液体クロマトグラフ (HPLC) : ポンプ PU980, 検出器 UV970, デガッサー DG980-80, データ処理装置インテグレーター 807IT(以上, 日本分光(株)), カラム恒温槽 MODEL556(GL Sciences 社)。HPLC 条件: 分析カラム: TSK Gel ODS 80 T_s (4.6 mm i.d. ×

150mm), 測定波長: 245 nm, カラム温度: 30°C, 移動相: 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 2.7) - テトラヒドロフラン (THF) - アセトニトリル (CH_3CN) (80 : 15 : 5), 流速: 0.7 ml/min, 注入量: 10 μ L

高速液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC/MS) : LC 部: ポンプ G1312A, カラムオーブン G1316A, デガッサー-1379A, オートサンプラー G1367A (アジレント社製)。カラム: ODS-HG-3 (2 mm i.d. × 50 mm, 5 μ m), カラム温度 40°C, 流量: 0.2 mL/min, 移動相溶媒: A 液: 5mM 酢酸アンモニウム, B 液: THF - CH_3CN (3 : 1), グラジエント条件: 90% A 液 (2 min) $\rightarrow$ 20% B 液 (18 min) $\rightarrow$ const (10 min), 注入量: 5 μ L。MS 部: API 2000 (アプライドバイオシステムズ社製), イオン化法: ESI (Positive),

イオンスプレー電圧: 4.2kV, イオン温度: 450°C。

②-4 生物活性試験

Std: ddY 系雄性マウスを4週齢で購入し(日本エスエルシー(株))4~5 日飼育してから使用した。もしくは、1日飼育後6時間絶食して用いた。経口投与の場合はエキスを水に、腹腔内投与では生理食塩水に溶解または懸濁して被検液とした。投与量は生のスギヒラタケ換算(湿重量換算)で表した。すなわち、30 g/kg (体重) または 60 g/kg を用いた。経口投与または腹腔内投与後、直ちにマウスの行動や症状を観察した。なお生物活性試験については量を確保できる山形神室山産スギヒラタケについてのみ行った。

②-5 アルカロイドの分画

塩酸酸性による抽出: 凍結した生のスギヒラ

タケを細切り、1 N 塩酸で pH3 に調整して 60℃で 10 分間抽出または超音波で 5 分間抽出し、これにエーテルを加え、エーテル層と水層に分け、さらに、水層を 10%アンモニア水で pH10 に調整し、クロロホルムで抽出し、アルカロイド画分のクロロホルム層を得た(②-Fig. 1).

酒石酸酸性エタノール抽出 凍結した生のスギヒラタケを細切り、エタノールを加えて 10%酒石酸で pH3 に調整した後 60℃で 60 分間還流して、溶媒を留去後、水に溶解しエーテルで分液した。得られた水層を 10%アンモニア水で pH10 に調整してクロロホルムで抽出し、アルカロイド画分を得た(②-Fig. 2).

タッソットー法による抽出

凍結した生のスギヒラタケを細切り、タッソ・オットー法により酸・塩基性画分を得た(②-Fig. 3).

②-6 HPLC を用いたアルカロイド画分の分析および分取

・分析 カラムは逆相系の TSK Gel ODS 80 T_s を使い、移動相は 0.05 M リン酸緩衝液-THF-CH₃CN(80 : 15 : 5)で流速 0.7 ml/min.とした。UV の波長は 245 nm とし、10 μL 注入した。

・分取 分析用カラム TSK Gel ODS 80 T_s をそのまま用い移動相と注入量 20 μL 以外は分析と同じ条件で行った。分取を行う前に移動相の検討を行った。また、後に LC/MS で分析することを考え、リン酸や THF を用いず、水-CH₃CN 系の溶媒を用いた。

②-7 薄層クロマトグラフィー (TLC) によるアルカロイドの分析および分取

アルカロイド画分について TLC を行うため

に各種担体、展開溶媒の検討を行った。シリカゲル TLC (Kieselgel 60 F₂₅₄ : Merk)を用いて展開溶媒 クロロホルム、クロロホルム-メタノール(50 : 1), (20 : 1), (10 : 1), (3 : 1), (1 : 1), (1 : 3), メタノール, n-ヘキサノール-酢酸エチル(1 : 1), 酢酸エチル, n-ブタノール-酢酸-水(4 : 1 : 2), (4 : 0.5 : 2)の上層について検討した。さらに、アルミナ TLC (Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ : Merk)を用い、クロロホルム-メタノール(3 : 1)で、逆相 TLC (DC-Alufolien RP-18 F₂₅₄ : Merk)を用い、メタノール, 水-メタノール(1 : 1)で展開した。発色はドラーゲンドルフ試薬, ニンヒドリン試薬を用いた。n-ブタノール-酢酸-水(4 : 0.5 : 2)の分離がよかったので、この展開溶媒を用い、アルカロイド画分を高濃度にしてスポットして分析と同じ TLC シートを使用して 5 回(5 枚)くり返して展開し、R_f 値 0.11, 0.35, 0.55, 0.68, のスポットを分取した。かきとったスポットを含むシリカゲルはアセトンで抽出し、ろ過後、エバポレートし分析に用いた。

②-8 LC/MS を用いたアルカロイド画分と標準品の分析

カラムは ODS-HG-3 を使用し、移動相 A 液: 5mM 酢酸アンモニウム, B 液: THF-CH₃CN(3 : 1)で、グラジエント条件, 90% A 液(2 min) → 20% B 液(18 min) → const(10 min)を用い、以下の 1), 2), 3) の LC/MS 分析を行った。

1) 形神室山, 3 新潟, 5 秋田, 8 秋田, 9 岐阜, 18 茨城, 19 福井のアルカロイド画分

2) 形神室山スギヒラタケアルカロイド画分の HPLC 分取画分

3) プレパラティブ TLC 分取画分の分析

用いた標準品は、ムシモール、ベタイン、イボテン酸、5-ヒドロキシトリプタミン (5-HT), カイニン酸, ドーモイ酸, α -アマニチン, ファロイジン, トリプトファンである。

③高極性化合物の分析

試料：高極性代表 4 標準成分系試料 (シュウ酸：0.3 mg/ml, マロン酸・コハク酸・グルタル酸：1.5 mg/ml), スギヒラタケ試料：3 mg/ml

UV-HPLC 分析条件：移動相 0.1%ギ酸, 流速 1.0ml/min.

④二次元 HPLC による解析

各産地別 (秋田, 新潟, 福井, 茨城) スギヒラタケ (*Pleurocyella porrigens*) 熱水抽出物の凍結乾燥品を, 20mM Tris-Acetate に 50 mg/ml になるように溶解し, サンプルとした。また, スギヒラタケ成分の年度比較のために, 平成 15 年度, 16 年度秋田および福井産水煮缶詰を用いた。他のキノコとしてマイタケ (*Grifola frondosa*), シメジ (*Hypsizygus marmoreus*) を用いた。分析は, 2D-HPLC (M&S Instrument) を用いた。1次元目のイオン交換 HPLC 条件は, 移動相; A: 20mM Tris-Acetate (pH7.8), B: 20 mM Tris-Acetate, 1M NaCl A : B = 10 : 0→10 : 0 (5 min) →0 :10 (45 min) 1 ml/min, 500 μ l injection, Develosil Packed Column (2.0 mm X 250 mm) (NOMURA CHEMICAL)。2次元目の逆相 HPLC 条件は移動相; A: 0.1% TFA, 10% Acetonitril, B: 0.1% TFA, 100% Acetonitril A : B = 9.5 : 0.5→9.5 : 0.5 (5 min), 6 : 4 (30 min), 0 : 10 (40min), 0.2 ml/min, 100 (l injection, Bio Basic AX (4.6 mm X 250 mm) (Thermo ELECTRON CORPORATION)。

⑤LC-TOF による解析

脳への移行性を考慮すると, 原因物質が低分子有機化合物である可能性が示唆された。そこで, 各産地 (秋田, 秋田で患者より提供されたもの, 新潟, 福井, 岐阜, 茨城産) スギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*) 熱水抽出物の凍結乾燥品を, 水に 10 mg/ml になるように溶解し, 多糖など高分子を除去するために限外濾過 (分子量 3000 以下カット) を行ったものを分析用サンプルとした。また, スギヒラタケ成分の年度比較のために, 平成 15 年度, 16 年度秋田および福井産水煮缶詰を用いた。分析は, 未知成分の検索であることから, より多くの構造情報が得られ, スキャン感度も高い LC TOF MS (JEOL AccuTOF) を ESI イオン化モードで pos で用いた。LC 条件は, 移動相 : 0.1% HCOOH-CH₃CN=95-5 →50-50 linear gradient, 0.2 ml/min, 2 μ l injection, Capcell pak AQ (2.0 mm i.d. X 250 mm)。

⑥レクチン分析

⑥-1 BPL-糖鎖プローブの調製

コロミン酸 (Col, (NeuAc α 2-8)_n), またはラクト-N-ネオテトラオース (LNT, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) と, ポリ L-リシン (PLL) とを, 還元アミノ化法でカップリングし, ビオチン基を導入して, ビオチニル PLL (BPL) -糖鎖プローブを調製した。糖鎖の固定化率を上げるために, 還元剤の量, または反応時間を変えて検討し, 最も高い固定化量をもつプローブを用いた。

⑥-2 BPL-糖鎖プローブを用いたスギヒラタケ抽出液の調製

新潟, 岐阜, 福井, 茨城産のスギヒラタケ各 1 g を, 乳鉢と乳棒ですりつぶし, 3 ml の

0.15 M NaCl を加えて一晩抽出した。冷却遠心分離 (3000 rpm, 20min) により、得られた上清を抽出液とした。また、抽出液の半量を、湯浴上で 100 °C で 1 時間加熱処理をした。この方法で得られたタンパク質濃度は 0.5mg/ml 程度であったため、その後、スギヒラタケを乳鉢中で液体窒素を加えて凍結後、乳棒粉碎する方法を用いて抽出する方法に変え、精製の実験からこちらを用いた。

⑥-3 血球凝集活性測定

赤血球液はウマ血液を 10 mM PBS で洗浄し、4、または 2% 懸濁液としたものを用いた。

U 底マイクロタイタープレートに 0.15 M NaCl で各スギヒラタケ抽出液の希釈列(各 20 μ l) を調製し、各ウェルに 20 μ l の赤血球液を加えて、混合した。その後、室温で 30 分静置し、凝集の様子を肉眼で観察した。

⑥-4 スギヒラタケ抽出液と糖鎖プローブとの結合試験 (ELISA 法)

次の実験操作において、バッファーは 10 mM PBS (pH 7.7)を用いた。スギヒラタケ抽出液について 4-1024 倍の範囲で 4 倍希釈列を調製し、マイクロタイタープレートへ 100 μ l ずつ加え、4 °C、一晩固定化した。各ウェルに 3 % BSA を 300 μ l 加えてブロッキングした。排液した後、PBS 300 μ l を用いての洗浄を 3 回繰り返し、調製した BPL-糖鎖プローブ、もしくは市販 BP-糖プローブ(10 μ g/ml)を 100 μ l 加え、室温で 1 時間反応させた。次に、ABC-HRP (1 μ g/ml)を 100 μ l 加え、室温で 1 時間反応させた。OPD 発色液を 200 μ l 加えて発色させ、2.5 M 硫酸 50 μ l を加えて停止した。その後、A490 を測定した。阻害試験では、

0.1~0.3 M の糖溶液を 100 μ l 加えて 1 時間室温で静置した後、ここに BPL-糖鎖プローブ、もしくは市販 BP-糖プローブ(10 μ g/ml)を加えて反応させた。以後は同じ操作で、結合プローブ量を測定した。

⑥-5 スギヒラタケ抽出液中からの LNT 結合レクチンの精製

すべての操作は 4 °C で行い、バッファーはすべて 10 mM PBS (pH 7.7)を用いた。遠心管中で、新潟、福井産のスギヒラタケ 1 g からの抽出液に LNT セファロース 4B (当研究室で調製)を加え、1 晩振とうしながらパッチ吸着を行った。このゲルをカラムにつめ、PBS で洗浄後、0.2 M ラクトース溶液で溶出し、その後 0.1M キトオリゴ糖溶液と 50 mM LNT 溶液各 0.5 ml で溶出した。溶出画分の LNT 結合性を、BPL-LNT との結合試験により調べた。

⑦シアンの分析

凍結保存状態で提供された試料を凍結乾燥機で水分を除き、粉碎機により粉末あるいは細かな断片にする。300~500 mg 秤量後、15.0 mL の 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムにより室温にて一晩攪拌放置しシアン化物イオンを抽出する(本条件下にてシアノ配糖体由来シアン化物イオンがどれ程分解抽出されるかは今後検討しなければならない)。ここから 2.0 mL を採り、コンウエー微量拡散捕集器を用いて塩酸酸性条件下室温に放置し、捕集器中央皿に置いた 1.0 mL 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムにシアン化物イオンをシアン化水素として捕集する。この溶液について、ブランク、シアン化物イオン標準溶液を対象に用い、ビリジーン-バルビツール酸蛍光法によりシアン化物イオンの定量を行った(励起波長 583 nm, 蛍光波

長 607 nm) .

C. 研究結果

①ODS カラム及びフォトダイオードアレイモニターにより分析可能な成分の同定

①-1 抽出条件の検討

溶媒：水，60%エタノール，50%メタノールで抽出した場合，ピークの大小はあるが共通したピーク検出が認められた(①-図4)．
還流の有無：還流ありの試料(①-図5-1)と，還流なしの試料(①-図5-2)を比較した結果，ピークの大小はあるが，共通してピークが検出された．

①-2 缶詰品の比較

15，16 年産の缶詰について検討した結果，ピークの大小はあるが，共通してピークが検出された(①-図6)．また検出されたピークは生鮮品と共通のものであった．

①-3 対照試料との比較

しいたけ，まいたけ，ひらたけとスギヒラタケの HPLC パターンを比較した結果，スギヒラタケ特有のピークが観察された(①-図7)．

①-4 分画，ピークの単離精製，同定

試料を 50%メタノールで抽出後，Diaion HP-20 カラムクロマトによる分画を行った．各画分の HPLC クロマトグラムを①-図8に示す．得られた画分を最終的に分取 HPLC により精製を行い，ピークの大小はあるが全ての試料に共通して検出されたピーク 1～5 の単離，同定を行うこととした．ピーク 1 については tryptophan と同定した．またピーク 4 は，本条件では 1 ピークであるが，別の HPLC 条件で混合物の存在が示され，それら混合物は脂肪酸である linoleic acid, oleic acid と同定

した．ピーク 4 のメインピーク及びピーク 2～3 について現在，同定を行っている．

②アルカロイド抽出画分の分析

②-1 エキスの生物活性試験(山形神室山産スギヒラタケのみ)

経口投与：予試験として山形神室山のスギヒラタケメタノールエキスを生重量換算で 30 g/kg を経口投与し，直後から観察した．その結果マウスの行動や状態に変化はみられず，死亡もしなかった．体重について 8 日間記録したところ減少傾向は見られるものの，比較として用いたブナハリタケのメタノールエキス 30 g/kg および対照群と大きな差はなかった(②-Fig. 4, ②-Table 1)．さらに，同様に冷水エキスと熱水エキスについて行い，24 時間後でも異常が認められなかったもので，同じ用量を 3 日間投与したが，異常は認められなかった(②-Fig. 5, ②-Table 2)．

腹腔内投与：山形神室山スギヒラタケのメタノールエキス，冷水エキス，熱水エキス，塩漬けのメタノールエキスについて各々 30 g/kg で腹腔内投与した(1 回投与)．投与直後，冷水エキス，熱水エキス，メタノールエキスについて，目を細めて，うずくまる症状が観察されたが 1 時間ぐらいで通常にもどった．塩漬けエキスでは異常は認められなかった．24 時間後に観察すると冷水エキス投与マウスは 3 匹中 3 匹が眼から出血した形跡があり，すべて下痢をしていた．しかし，メタノールエキス，熱水エキス，塩漬けエキスには出血も下痢も認められなかった(②-Table 3)．匹数を 5 匹にして冷水エキスについて再度同様な実験を行ったところ 5 匹中 4 匹に眼の出血跡および下痢がみられた(②-Table 4)．さらに再び，

冷水エキス、熱水エキスおよび食用のシイタケとエリンギの冷水エキスについても 30 g/kg で腹腔内投与を行ったところ、スギヒラタケの冷水エキスではすべてに眼からの出血跡、下痢がみられ、熱水エキスでも眼瞼下垂がみられた。食用のシイタケ、エリンギについては異常は認められなかった(②-Table 5)。

アルカロイド画分抽出: 3 つの方法について予試験を行った。塩酸酸性による抽出、酒石酸酸性エタノール抽出、スタス・オットー法による抽出をそれぞれ②-Fig. 1, ②-Fig. 2, ②-Fig. 3 に示す。

②-3 HPLC-UV によるアルカロイド画分の分析および分取

アルカロイド画分の分析: 逆相系のカラムで 0.05M リン酸緩衝液-THF-CH₃CN(80:15:5)で溶出し、波長 245 nm で、塩酸酸性抽出によるアルカロイド画分(②-Fig. 1)を分析したところ主要なピークがリテンションタイム(Rt)4.8 分, 6.5 分, 11.1 分, 27 分に認められた。酒石酸酸性エタノール抽出によるアルカロイド画分(②-Fig. 2)では主要なピークは Rt 4.7 分, 11.1 分, 16.7 分, 27.3 分にみられた。スタス・オットー法による抽出のアルカロイド画分(②-Fig. 3)では C₁ フラクシオンに Rt 3.1 分, 3.4 分, 4.7 分, 10.6 分, C₂ フラクシオンに Rt 4.7 分, 10.6 分, C₃ フラクシオンに Rt 3.2 分, 4.7 分, 10.7 分のピークが認められ、UV を指標にした場合、多少の差はあるが、どの画分にも同じようなピークがみられた。

アルカロイド画分の分取: 移動相を水-CH₃CN(1:1), (1:2), (1:4), (1:6), (2:1), (3:1), (4:1), (6:1)で分析したところ、水-CH₃CN(1:1), (1:4), (3:1)について分取

可能な分離を示した。そこで主要ピークを分取することにした。水-CH₃CN(1:1)で得られた Rt 33.1 分のピークを分取した(②-Fig. 6)。水-CH₃CN(1:4)で溶出したものは、Rt 8.2 分, 16.5 分, 21.7 分, 23.9 分のピークを分取した(②-Fig. 7)。水-CH₃CN(3:1)で溶出したものは Rt 3.7 分, 4.5 分, 7.0 分, 10.8 分, 26.1 分のピークを分取した(②-Fig. 8)。

②-4 プレパラティブ TLC によるアルカロイドスポットの分析および分取

分析: 山形神室山スギヒラタケのアルカロイド画分をシリカゲル TLC を用いて展開溶媒の検討を行ったところクロロホルム-メタノール系やヘキサン-酢酸エチル系の溶媒ではスポットが原点に留まり、またテーリングしてうまく展開できなかった(②-Fig. 9~18)。さらにn-ブタノール-酢酸-水(4:0.5:2)の上層を用いたところスポットが原点に残らずうまく展開した(②-Fig. 19, 20)。さらにアルミナ TLC や ODS の逆相 TLC を行ったが、うまくスポットが展開しなかった(②-Fig. 21~23)。

分取: 山形神室山のスギヒラタケを生重量で 500g を塩酸酸性で②-Fig. 1 にならって分画し、アルカロイド画分を約 20 mg 得た。これをシリカゲル TLC に付してドラージェントルフ試薬とニンヒドリン試薬で発色させ、ニンヒドリン試薬発色スポットの R_f 値 0.11 (スポット 1), 0.35 (スポット 2), 0.55 (スポット 3), 0.68 (スポット 4) のスポットをかきとり、アセトンで各々シリカゲルから抽出して分離した(②-Fig. 24)。収量はスポット 1 が 0.2 mg, スポット 2 が 0.2 mg, スポット 3 が 0.6 mg, スポット 4 が 3.1 mg である。

②-5 LC/MSを用いた分析

スギヒラタケの各種エキスのアルカロイド画分の分析: 各種スギヒラタケ(山形神室山, 3新潟, 5秋田, 8秋田, 9岐阜, 18茨城, 19福井)を②-Fig. 1に従って分画したアルカロイド画分について逆相系のカラム ODS HG 3を用い, 酢酸アンモニウム-THF-CH₃CN系の溶媒でグラジエントを行い分析した. ポジティブモードで得られた分子量別のトータルイオンクロマトグラム(TIC)を②-Fig. 25~31に示した. またその主要ピークのRtを②-Table 6~12に示した.

山形神室山スギヒラタケのアルカロイド画分分取フラクションの分析: 水-CH₃CN(1:1)分取のRt 33.8のピークの解析を行ったところ, 分子イオンピークと思われる279 (M+H)がみられ, 205, 149にフラグメントイオンが認められた. フタル酸ジブチルと考えられる. その他の分取フラクションについては絞り込める情報は得られなかった.

プレパラティブ TLC 分取スポットの分析: 神室山のスギヒラタケのアルカロイド画分をプレパラティブ TLC で分取したスポットについてLC/MSの分析を行った. ポジティブモードで得られた分子量別のTICを②-Fig. 32~35に示した. また, その主要ピークを②-Table 13~16に示した.

スタンダードのLC/MSの分析: ムシモール, ベタイン, イボテン酸, 5-HT, カイニン酸, ドーモイ酸, α -アマニチン, ファロイジン, トリプトファンについてLC/MS分析を行った結果, 今回用いた条件ではムシモールはRt 0.9分に分子イオンピーク115.3(M+H), ベタインはRt 0.88分に分子イオンピーク

118.5(M+H), イボテン酸はRt 0.89分に159.1(M+H), 5-HTはRt 0.92分177.1(M+H), カイニン酸はRt 0.88分に214.3(M+H), ドーモイ酸はRt 0.81分に312.3(M+H), α -アマニチンはRt 0.91分と1.70分に919.0(M+H), ファロイジンはRt 9.38分に789.0(M+H), トリプトファンはRt 0.90分と1.33分に205.1(M+H)が認められた.

②-6 エーテル層, クロロホルム層, 水層, およびヘキサン層, 酢酸エチル層, 水層の生物活性試験

②-Fig. 1に示すアルカロイド分画のエーテル層, クロロホルム層, 水層, および②-Fig. 36に示すヘキサン層, 酢酸エチル層, 水層について生物活性を腹腔投与で検討した. その結果, ②-Table 17, 18, 19に示したように水層と酢酸エチル層に生物活性が認められた.

③高極性成分の分析

スギヒラタケの50%メタノールでホモジナイズして抽出したサンプルをDiaionカラムに負荷し, ステップワイズでH₂O画分, 20% MeOH画分, 40%MeOH画分, 60%MeOH画分, 100%MeOH画分の5画分に分離した. 各画分のMW3000カット限外ろ過を通した画分をドウモイ酸測定キットにより, スクリーニングしたところ, 20%MeOH画分, 40%MeOH画分, 60%MeOH画分にドウモイ酸に対するポリクローナル抗体と反応性を示した. 既にドウモイ酸はLC/MS/MSで存在しないことを確認していることから, この画分に反応を示したものは, ドウモイ酸に対するポリクローナル抗体と交差反応性を示す物質であると考えられる. さらに20%MeOH画分, 40%MeOH画分, 60%MeOH画分に関して, 高極性分離カラムを用い

て、保持時間で5画分に分画し、ドウモイ酸測定キットにより反応性を追跡した(③-図1)。その結果、40%MeOH画分の最後の画分と60%MeOH画分の最初の画分に強い活性を示した。さらに40%MeOH画分の最終画分と60%MeOH画分の第一画分を保持時間で5画分に分画し(③-図2)、再度ドウモイ酸測定キットにより反応性を追跡した。スギヒラタケ熱水抽出液の抗菌活性も広域細菌で調査したが、すべて顕著な抗菌活性を示さなかった(③-表1)。

④二次元HPLCによる解析

各サンプルを2次元HPLCの1次元目においてイオン交換HPLCにより分画した。④-図1に示すように、茨城産では異なるものの、0-20分の間に溶出される主成分等にスギヒラタケ産地間の大差は見られなかった。他のキノコである、マイタケ、シメジにおいても非常に類似した溶出ピークを示した。また缶詰でも多少異なる溶出ピークを示すものの、年度間・産地間で大きな差は見られなかった。次に、1次元目で分画したサンプルをより詳細に解析するため、1次元目の0-30分の各分画を2次元目の逆相HPLCに供した。その結果、④-図2に示すように1次元目フラクション13、14において、秋田、新潟由来サンプルに特異的なピークが観察された。これらピークは、マイタケ、シメジではほとんど検出されなかった。また、データに示さないが、缶詰では年度・産地に関わらずこれらのピークは観察されなかった。

⑤LC-TOFによる解析

⑤-図1には、各産地別スギヒラタケおよび他のキノコのLC-TOFMS分析の結果をTIC

で示した。⑤-図1に示すように2-7分の間に溶出されるメジャー成分、13分付近、22分のピークなどにスギヒラタケ産地間の差は見られなかった。一方、32分前後のピークは、秋田産、秋田産で患者より提供されたサンプルで多く含まれているようであった。このピークは、他のキノコであるマイタケ(*Grifola frondosa*)、シメジ(*Hypsizygus marmoreus*)、シイタケ(*Lentinula edodes*)、アガリクス(*Agaricus blazei* Murill)では見られないスギヒラタケ特有成分と考えられる。さらに、昨年度収穫したものと事件が起きた今年度収穫したスギヒラタケを比較した。その結果、この32分のピークは福井産、秋田産ともに昨年度(H15年)よりも今年度(H16)の方が含量が多いことが判った(⑤-図2)。そのため、このピークについてさらに検討することにした。

脳症を起こしていることから、低分子極性物質で、⑤-図3に示すようなグルタミン受容体結合性のものを想定した。まず、そのモデル化合物としてkainic acid, domoic acidについて分析した。秋田サンプルにstd 10 ppm添加して回収率70%で検出できた。kainic acid(KA)は検出されず。同じRTに少しピークが見られるが、これは全く別のm/z 661を主とするものであった。domoic acid(DA)も検出されなかった。KA、DAの分子量でマスクロマトグラムを書いてもピークは見られなかったため、スギヒラタケには両化合物は含有されていないと考えられた。さらに、KA、DAの類似体検索を行うために、点線で示したKA、DAに共通のフラグメントが検出可能なLC/MS/MS(API-3000)で検討したが、KAとDA