

ではフラグメントパターンが異なり、点線のようなフラグメントでの検索はできなかった。

次に、キノコはアミノ酸含量が多いので各アミノ酸でマスキロマトグラムを書いて検討したところ、Trp (m/z 205), Tyr (182), Phe (166), Glu (148)が認められた。

以上の結果から、2-7 分はアミノ酸が多い、13 分は Trp の可能性大、10-25 分の主なピークは、スギヒラタケ以外キノコにも含有していることから以後は 32 分のピークに絞った。⑤-図 3 に示したように、多くの神経細胞受容体結合性化合物はグルタミン酸骨格を有し、カルボキシル基を持つ。そこで、この 32 分のピークが-COOH 基を持っているかどうかを検討した。方法は、秋田サンプルをトリメチルシリルジアゾメタン TMSCHN₂ でメチル化し、MS 分析した。

秋田サンプル (10 mg) in anhyd. MeOH 0.5 ml

↓
0.5 ml(excess) TMSCHN₂
30 min, rt
evap in vacuo
1 ml water

メチル化反応した秋田産スギヒラタケを LC-TOF MS で分析、マススペクトルを確認したところ、保持時間 32 分のピークは、メチル化反応により 1Me, 2Me, 4Me, 5Me 体である可能性が示唆された(⑤-図 4)。さらに、1Me のピークは 2 本あり、ともに同じ質量を持つことが確認できたことから異性体と考えられる。また、1~5Me 体に相当するピークは、反応前の秋田産スギヒラタケには存在しないことを確認した。この結果から、保持時間 32 分のピークは、カルボキシル基を 5 個持つこと

が示唆された。反応前の保持時間 32 分のピークは、精密質量を測定したところ positive モード $[M+H]^+$ で 611.2826 であった(⑤-表 1)。この数値を基に組成式推定をし、文献検索したところ、カルボキシル基を 5 個持つ化合物は発見できなかった。この保持時間 32 分のピークは、LC-TOF MS で高感度に検出され、マススペクトルもきれいであったため単一成分と期待したが、単離した 2 mg を NMR 測定したところ、他の成分の共存が見られ、 $[M-H]^-$ で 661.2826 の成分は量的にはさらに少量であると考えられた。そこで、構造解析を行うためには十分な量を確保して、移動相を変えて再精製したサンプルを調整する必要がある、検討中である。

⑥レクチン分析

⑥-1 赤血球凝集活性

各抽出液における赤血球凝集活性の力価は⑥-表 1 は示すようになった。またトネイン法により測定したタンパク質濃度は次のように、あまり産地による差がなかった。

新潟(非加熱): 0.462 mg/ml

新潟(加熱): 0.196 mg/ml

岐阜(非加熱): 0.576 mg/ml

福井(非加熱): 0.476 mg/ml

福井(加熱): 0.145mg/ml

茨城(非加熱): 0.478mg/ml

茨城(加熱): 0.059mg/ml

⑥-表 1 各抽出液における赤血球凝集活性の力価

抽出液タンパク質濃度の産地による差は小さいが、加熱による変性沈殿により減少する量には差があることが示唆された。抽出液を SDS-PAGE 分析したところ、産地による差は

あまりみられなかったが、新潟産のみがやや異なるタンパク質パターンを示した(再現性確認の必要があるため、データ示さず)。

この結果から、岐阜、福井、茨城産の非加熱処理の抽出液に凝集活性があり、スギヒラタケ中にレクチンの存在が示された。また新潟産では 1 価レクチン様物質の存在が示唆された。

また、どの産地の抽出液においても、加熱処理によって凝集活性が失活し、このレクチンは熱処理によって凝集活性を失うことが示唆された。

⑥-2 スギヒラタケ抽出液の糖鎖プローブ結合性

新潟、岐阜、茨城産のスギヒラタケを用いて、様々な糖鎖プローブとの結合試験を行った結果を⑥-図2に示した。13種類の市販BP-糖プローブおよび調製した BPL-コロミン酸プローブに比べて BPL-LNT プローブが、スギヒラタケ抽出液に著しく高い結合性を示すことが示された。⑥-図2 に示した以外にも10種類の BP-糖プローブを用いて結合試験を行ったが、いずれも非常に低い結合性しか示さなかった(データ示さず)。BPL-LNT はスギヒラタケ抽出液に対して、濃度依存的に結合したが、他のすべてのプローブは、結合性が弱いため、明確な濃度依存性が示されなかった。この結果から、スギヒラタケ抽出液中には LNT に特異的に結合する物質の存在が示唆された。

⑥-3 スギヒラタケ産地および加熱処理による BPL-LNT との結合性比較

スギヒラタケ中の LNT 結合物質と BPL-LNT との結合性について、産地および加熱処理によ

る差を調べた結果を⑥-図3に示した。加熱した抽出液では、非加熱の抽出液に比べて BPL-LNT との結合性が約20%低下した。また、LNT 結合性は、新潟と福井で岐阜産よりもやや高いが、産地によって大きな差はないことが示された。

この結果から、スギヒラタケ中の LNT 結合物質は熱を加えても、結合性はかなり安定であると考えられた。

⑥-4 スギヒラタケ抽出液と LNT プローブ結合の糖による阻害試験

BPL-LNT との結合性が糖鎖認識によるものかどうかを調べるため、阻害糖存在下でのスギヒラタケ抽出液と糖鎖プローブとの結合試験を行い⑥-図4に示した。その結果、福井産、岐阜産の非加熱抽出液では、0.3 M ラクトース、0.2 M LNT、0.3 M α -メチルマンノピラノシドによってほぼ同等に阻害された。しかし、新潟産のスギヒラタケでは、福井産、岐阜産と比べ、この3種類の糖による阻害が小さく、特に LNT では阻害されず、加熱後のみ顕著な阻害が認められた。抽出液中の熱不安定なレクチン妨害物質(内在性阻害剤の可能性もある)の影響が考えられる。このことは、赤血球凝集活性測定で新潟産の非加熱スギヒラタケ抽出液のみ、他の抽出液と異なる血球結合性を示したこととも関連があるかもしれない。

一方、新潟産、福井産の加熱抽出液でもラクトース、LNT、 α -メチルピラノマンノシドによって阻害されており、LNT 結合性物質が熱に対して安定なレクチンであることが示唆された。

0.2 M ジ-N-アセチルキトビオースならびに

0.2 M キトオリゴ糖を加えた時に、吸光度が増加する結果が得られたが、キトオリゴ糖自身のこの波長領域における吸光度が高く、不純物が ELISA にて洗浄によっても除ききれなかったためと考えられる。ジ-N-アセチルキトビオースおよびキトオリゴ糖標品のどちらもこの問題があったが、ジ-N-アセチルキトビオースの方が顕著である。

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

スギヒラタケ抽出液中の LNT 結合レクチンを、LNT カラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製を試みた。液体窒素による凍結法で調製した抽出液を使用した。十分な結合量を得るため、LNT-ゲルとのバッチ法による結合反応後、カラムに詰めて溶出し、280 nm での吸光度と、溶出画分の BPL-LNT 結合活性を⑥-図 5 に示した。今回、0.2 M ラクトース溶液と 0.1 M キトオリゴ糖溶液、または 50mM LNT で溶出を行った。0.2 M ラクトースによる溶出画分に、LNT 結合性があることが、BPL-LNT との結合試験から示された。0.1 M キトオリゴ糖溶液による溶出画分については、上記のキトオリゴ糖自身の吸収による問題があるため断定しにくい、⑥-図 4 での A490 における吸光度増強が 1.5 倍程度であることを考慮すると、特に福井産ではレクチンが溶出されていることが推測される。

溶出画分を、限外ろ過により脱糖・濃縮して、タンパク質定量したところ、タンパク質濃度が非常に低く(<10 µg/ml)、SDS-PAGE 分析にかけて銀染色したが、明瞭なバンドが検出されなかった。精製に用いたスギヒラタケ

が 1 g と少なかったため、今後はスケールアップして大量精製する必要がある。また、2 段階溶出後の同カラムを、50 mM LNT で溶出したところ、A280 で 0.02 位のピークが溶出された。特異糖であるはずの LNT で 1 段階で溶出することにより、効率のよい溶出が期待されるが、LNT は高価でもあるので、溶出方法をさらに工夫する必要がある。

⑦シアン分析

スギヒラタケ試料について、シアン化物イオンの分析を行った。その結果、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 検体は陰性であった。

- #3 新潟産
- #5 秋田（患者さんより）
- #8 秋田（患者さんより）洗浄後冷凍
- #9 岐阜下呂市
- #18 茨城
- #19 福井（患者さんが採取した斜面と同一のもの）

分析結果（KCN として）

- #3 検出されず (1 pg/mg dry weight 以下)
- #5 0.033 ng(32.5 pg)/mg dry weight
- #8 6.97 ng/mg dry weight
- #9 20.9 ng/mg dry weight
- #18 6.54 ng/mg dry weight
- #19 検出されず

D. 考察

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

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。引き続き、特有の未知ピークについて同定を行いたい。

②アルカロイド抽出画分の分析

はじめに生物活性について検討した。その際に生のスギヒラタケを抽出して動物に与えなければならないので、エキスとして得る必要がある。そこで、山形産(神室山)のスギヒラタケを用いて、メタノールエキス、冷水エキス、熱水エキスについて ddY 系雄性マウスに経口投与し観察した。用いた用量は生重量換算で 30 g/kg (体重) になるようにした。我々は天然物で生物活性をみるときは、予試験の段階で材料換算で 1, 3, 10, 30 g/kg の用量を用いており、通常この用量で活性がないときは、作用はないと判断することになっている。結果として 30 g/kg では異常は認められなかった。単回投与では作用はなかったので引き続き 2 日間投与して 11 日間観察を行ったが、異常は認められなかった(②-Fig. 4, 5, ②-Table 1, 2)。

腎臓透析患者に症状が現れ、健常人には影響しない可能性があるので、腎不全マウスを使用することも考えたが、我々としては入手し難い。また、アデニンや PAN (puromycin amino nucleoside) を投与すると腎不全マウスを作製できるという文献はあるが、これを再現して使用するには時間が十分ではないと考え、4 週齢で購入した ddY 系マウスを予備飼育せず、飼育期間を 1 日とし、絶食して、ストレスを負荷してから用いた。腹腔内投与で 30 g/kg の用量で生物活性試験を行った結果、投

与直後から、冷水エキス、熱水エキス、メタノールエキスについては眼瞼下垂やうずくまる行動がみられた。しかし、1 時間もすると異常は認められなくなった。塩漬けエキスについては、投与直後から異常はなかった。しかし、約 24 時間後、冷水エキス投与マウスの眼から出血跡が認められ、下痢も観察された(②-Table 3)。このことの確認をとるために n=5 で追試を行ったところ、5 匹中 4 匹に眼から出血の跡が認められ、下痢もあった(②-Table 4)。さらに食用のシイタケとエリンギの冷水エキスについて生重量換算で 30 g/kg を腹腔内投与したところ、シイタケとエリンギには異常は認められず、スギヒラタケ冷水エキスに眼からの出血が認められた(②-Table 5)。以上のことから、生物活性を考慮しながら進めるには、冷水エキスを用いることが適しているとは判断した。なお、生物活性試験の検討を行うとエキスが回収できないことから、材料が十分にあるものについてのみ行った。

アルカロイド抽出方法としては、塩酸酸性抽出、酒石酸酸性エタノール抽出、スタッ・オットー法による抽出(②-Fig. 3, 4, 5)、その他、リン酸酸性による抽出等が考えられた。後に予試験として HPLC-UV で分析を行ったところ酒石酸エタノール抽出によるアルカロイド画分のピークが若干多いようであるが、検出ピークに大差はないと判断し、簡便な塩酸酸性抽出を行うことにした。スタッ・オットー法では②-Fig. 3 に示したように A₁ には強酸性物質、A₂ には弱酸性物質、B には中性物質、C₁ には塩基性物質の塩、C₂ には一般アルカロイド、C₃ にはフェノール性物質がくるので、物質を推定するには都合がよい

が、短期間で分析を行うには繁雑であると考えられた。

塩酸酸性で抽出して②-Fig. 1 の分画から得られたアルカロイド画分について、HPLC-UVを用いて分析を行った。また、この分析は予試験として、トリカブトのアコニチン系アルカロイドの分離条件と同じ 0.05 M リン酸緩衝液-THF-CH₃CN (80 : 15 : 5)で行ったものである。しかし、分析するアルカロイドは、標準品と比較する必要がある、HPLC-UV のみでは不可能であると考えられた。そこで得られた UV ピークを指標に分取して、これを LC/MS で分析し分子量を推定する必要があった。しかし、このままの条件で UV 吸収のあるピークを分取しても移動相にリン酸が含まれていれば LC/MS には適用できないので、リン酸の含まないものにしなければならない。そこで、水-CH₃CN 系の溶媒を検討し、水-CH₃CN(1 : 1), (1 : 4), (3 : 1)の溶離液を用いて UV でみられるピークを分取した。水-CH₃CN (1 : 1)で分取した Rt 33.8 分の UV のあるピークを LC/MS で分析すると TIC で Rt 16.9 分にピークが認められた。これの MS をみると 279 に(M+H)がみられ、205, 149 に強いフラグメントピークが認められた。これは、フタル酸ジブチルに特長的な MS スペクトルなので GC/MS で分析したところ確認された。これは抽出操作の際に混入したものと思われる。さらに、水-CH₃CN(1 : 4), (3 : 1)の条件で分取を行い各フラクションについて LC/MS の分析を行ったが、得られた情報から導き出される範囲では物質の構造まで結びつけることはできなかった。

山形神室山, 3 新潟, 5 秋田, 8 秋田, 9 岐阜,

18 茨城, 19 福井スギヒラタケのアルカロイド画分を LC/MS で分析し、標準品のムシモール、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、トリプトファンの分子イオンピーク(M+H)と Rt を指標に検討したが、これらは検出できなかった。

今回用いた溶出条件では各標準品の Rt が短いので、後半に溶出される条件を考える必要がある。そこでカラムの長さや移動相の溶媒を若干変更して検討したが、Rt が大きく変わることはなかった。カラムの種類や移動相の溶媒変更が必要と考えられるが、LC/MS 分析なので Rt が近くても区別は可能であると判断した。さらに、材料(サンプル)の違いによる解釈の検討を行った。すなわち、5 秋田, 8 秋田および 19 福井のサンプルは患者が摂食したものと同様のものと言うことであるから、5 秋田, 8 秋田, 19 福井とその他の 3 新潟, 9 岐阜, 18 茨城について TIC を比較することを考えた。また、5 秋田, 8 秋田, 19 福井の TIC はほぼ同じパターンを示したので、5 秋田の TIC を代表にして、3 新潟, 9 岐阜, 18 茨城の TIC にはなく、5 秋田の TIC にあるピークまたは他より強度の大きいピークについて詳しく調べた。②-Fig. 27 の分子量 300 から 400 の TIC で Rt が 22.55 分のピークは他にはなく、5 秋田に特徴的なので解析してみると、分子量 312.5 に分子イオンピークと考えられるものと 249.4, 186.6 のフラグメントピークが見られた。312.3 はドーモイ酸の分子量であるが、Rt が異なるので別の物質であると考えられる。さらに、Rt が 24.49 分のピークも特徴的であり解析の結果 382.5, 369.4, 279.4 のフラグメントが

見られた。分子量 200 から 300 の TIC では Rt 26.96 分に 410.5 の分子イオンピークと思われるものと、368.4 のフラグメントが見られた。Rt 28.49 分には 438.9 の分子イオンピークと思われるものと、315.5, 279.4 のフラグメントが見られた。しかし、これ以上の解析は今のところ難しい。

以上のように HPLC の分析用カラムを用いて分取するにしても、アルカロイド画分を分析するにしても量的に微量なので、標準品との比較での同定のみ可能である。アルカロイドを調べるには大量に分取して精製し、NMR や質量分析等で分析する必要がある。そこで、山形産スギヒラタケを用いて、シリカゲルカラム等で分離するための予試験として、シリカゲル TLC を行ったが、アルカロイド画分のスポットが通常の溶媒では原点から上昇しなかった。これはアルカロイドが配糖体やリン酸塩などの形になっていると考え、配糖体など極性の高いものに用いる展開溶媒であるブタノール-酢酸-水(4:0.5:2)の上層を用いたところ原点が上昇し、大きなスポットが 4 つ明確に認められた。これらの発色にはドラゲンドルフ試薬を用いたところ、Rf 値 0.11, 0.35, 0.55 のスポットが橙色となった。Rf 値 0.68 のスポットは若干橙色であったがはっきりしなかった。そこでアミノ酸やペプチド、アミン、タンパク質も呈色するニンヒドリン試薬を用いてみたところ、②-Fig. 24 に示すように 4 つのスポットが認められたので、これを指標にプレパラティブ TLC で分離を試みた。これらの分取したスポットについては、ニンヒドリンの呈色だけを指標にしたので単一物質である確証はないが精製の 1 つの方法

である。さらに精製をくり返せば純粋になると考えられる。

プレパラティブ TLC のスポット 1 (Rf 値 0.11), スポット 2 (Rf 値 0.35), スポット 3 (Rf 値 0.55), スポット 4 (Rf 値 0.68) を分取したものについて LC/MS の分析を行ったところ、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amaniチン、ファロイジン、トリプトファンの分子イオンピーク(M+H)と Rt を指標に検討したが、いずれも用いた標準品とは一致しなかった。

さらに、山形神室山, 3 新潟, 5 秋田, 8 秋田, 9 岐阜, 18 茨城, 19 福井のスギヒラタケのアルカロイド画分をシリカゲル TLC に付してニンヒドリン試薬で呈色し、スポットを比較したところ、山形神室山, 3 新潟, 19 福井のパターンが似ており、5 秋田, 8 秋田, 9 岐阜が類似パターンであった。5 秋田, 8 秋田, 9 岐阜には Rf 値 0.35 のスポット 2 が多く含まれていた。18 茨城ではスポット 2 はほとんどなくスポット 4 の下に新たなスポットが認められた(②-Fig. 37, 38)。患者が摂食したと思われる 5 秋田, 8 秋田のサンプルにはスポット 2 が多く含まれていることから、このスポットの LC/MS 分析を中心に行った。

スポット 2 に含まれていて、他のスポットには見られないピークは分子量 400 から 500 の TIC では Rt 13.62 分のピークと分子量 600 から 700 の TIC で Rt 22.9 分のピークであった(②-Fig. 33)。そこで Rt 13.62 分のピークを詳しく調べると、627.5, 605.5, 583.5, 561.3, 539.3, 517.3, 495.6, 473.5, 451.4, 429.9 にフラグメントがみられたが分子イオンピークは分らない。Rt 22.9 分のピークについても

680.8, 663.5, 620.5 にフラグメントはみられるが構造に結びつけることはできなかった。さらに、分取したスポット 1～4 については他の情報を得るために NMR, MS, IR 等を解析中である。前述したがこれらについて LC/MS 分析をしても構造に関する確かな情報は得られなかった。単一物質の量の確保が必要である。また、生のスギヒラタケ 500 g (山形神室山) から粗アルカロイド画分が約 20 mg しか得られず、これを精製していく段階でロスしていくことが考えられるため、さらに大量に抽出して分離する必要がある。

最後に確認のために、アルカロイドを抽出するための塩酸酸性抽出 (②- Fig. 1) の各フラクションについて、生物活性試験を行ってみた。つまり、②- Fig. 1 のエーテル層、クロロホルム層 (アルカロイド画分)、水層について腹腔内投与で 60 g/kg (初めのエキスでは 30 g/kg なのでロスを見込んで倍量にした) の用量を用いた。その結果、すべての層に生物活性が認められなかった (②- Table 17)。水層についてはアルカリ性のまま濃縮したので物質が分解していると考え、別に分画した水層を塩酸で中和した後に再度生物活性試験を行ったところ、24 時間後、水層を投与したマウスの 5 匹中 1 匹に眼からの出血を認めた (②- Table 18)。また、下痢をしているマウスも認められた。中和の際に塩化アンモニウムが生成していると考えられるので、念のために、塩化アンモニウム 1 g/kg を腹腔内投与したところ、1 匹が 30 分以内に死亡、残りの 4 匹中 3 匹に下痢がみられた。しかし、眼からの出血は 1 匹も認められなかった (②- Table 18)。以上のことから生物活性物質は水層に移行している

可能性が考えられる。しかし、通常行われるマウスの致死生物活性と、今回行った生物活性は同じとは限らない。別の生物活性をみている可能性がある。さらに、活性のあった冷水エキスを②- Fig. 36 に示したようにヘキサン、酢酸エチルで分画してヘキサン層、酢酸エチル層、水層について腹腔内投与で生物活性をみたところ、眼から出血するという活性は、水層と酢酸エチル層に移行した。生物活性をみるためには、水層と酢酸エチル層を検討しなければならない。しかし、物質を単離し特定するには大量の材料が必要である。

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をさらに逆相カラムによりステップワイズ分画したところ、60%メタノール画分にドウモイ酸 ELISA キットの抗体に交差反応性を示す画分を見出した。今後、この画分をさらに単離し精製する予定である。

④二次元 HPLC による解析

秋田、新潟では急性脳症患者が多数発症したことを考え合わせると、スギヒラタケ特有のピークは原因物質候補の可能性が考えられた。現在これらのピーク産物の構造解析を行うため、大量に精製中である。

⑤LC-TOF による解析

今回見いだした分子量 610 の化合物は他のキノコ (シイタケ、シメジなど) には含有されておらず、新規化合物である可能性がある。本化合物の構造解析および毒性評価を行えばキノコの安全性評価に結びつく。

⑥レクチン分析

スギヒラタケ抽出液に LNT 結合性レクチンが存在することが明らかになった。しかし、

阻害糖存在下での BPL-LNT の結合試験の結果より、LNT や LNT に良く似た構造のラクトースだけでなく α -メチルマンノピラノシドによっても阻害されたため、その糖結合特異性はまだ明らかではない。同レクチンの糖鎖結合特異性を明らかにするためには、精製品で検討する必要がある。このためには、本研究で試みた LNT セファロース 4B を用いる精製方法が有効と考えられる。

一方、赤血球凝集活性の検出されない新潟産抽出液でも、同レクチンが存在することから、他の特異性をもつレクチンも存在している可能性や、内在性阻害剤の存在、または熱処理の他、何らかの理由でレクチンの解離が起こり多価でなくなるため凝集活性を失うことなどが考えられるので、この点も明らかにする必要がある。また、予備的な毒性調査から、非加熱抽出液でも、マウスに対して毒性が検出されなかったため、この点も検討する必要がある。精製レクチンが得られれば、毒性との関わりを追究したいと考えている。

⑦シアン分析

シアン化物は通常体内でロダニース (rhodanese) によりチオシアネート (SCN-) へと無毒化するが、タンパク質の摂取量が少ない場合、シアン化物を変換するロダニースが不足し、神経毒であるシアネート (OCN-) が産生されると言われている。現在のところ急性脳症 (炎) の原因物質としてスギヒラタケが疑われているが、スギヒラタケはシアン生成菌として既に知られている。今のところシアンによる急性中毒ではなく、腎疾患や他の病気により体力が衰えている患者で、通常なら影響を与えないような微量のシアンだと

しても、脳症へ導くような作用がある可能性が考えられる。今回、分析されたシアン化イオンの存在状態は、シアン配糖体として存在するか、シアンイオンの遊離状態で存在するか疑問であるが、今回アルカリ抽出で分析した条件下では、シアン配糖体であるリナマリンやアミグダリンはシアンが遊離してこないことから、スギヒラタケ中では、ナトリウム塩かカリウム塩の状態で存在していると考えられた。

E. 結論

① ODS 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

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

スギヒラタケの冷水エキスを 30 g/kg を腹腔内投与すると、下痢と眼からの出血跡が認められた。アルカロイド画分にはムシモール、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、トリプトファンは含まれていないことがわかった。しかし、他のアルカロイドを特定するまでには至らなかった。眼から出血するという生物活性は、水溶性画分と酢酸エチル画分に移行し、アルカロイド画分にはなかった。

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をさらに逆相カラムによりステップワイズ分画

したところ、60%メタノール画分にドウモイ酸 c ELISA キットの抗体に交差反応性を示す画分を見出した。今後、この画分をさらに単離し精製を試みたい。

④二次元 HPLC による解析

他の食用キノコにはなく、スギヒラタケに特有のUV検出ピークを確認した。今後、単離・精製を試みたい。

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

スギヒラタケ抽出液に LNT 結合性レクチンが存在することが明らかになった。また糖

鎖結合性を利用して、簡便なスギヒラタケレクチン精製法の基礎を確立した。

⑦シアン分析

さらにシアン化物イオンの分析を行ったところ、分析した6試料のうち、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。

F. 健康危険情報

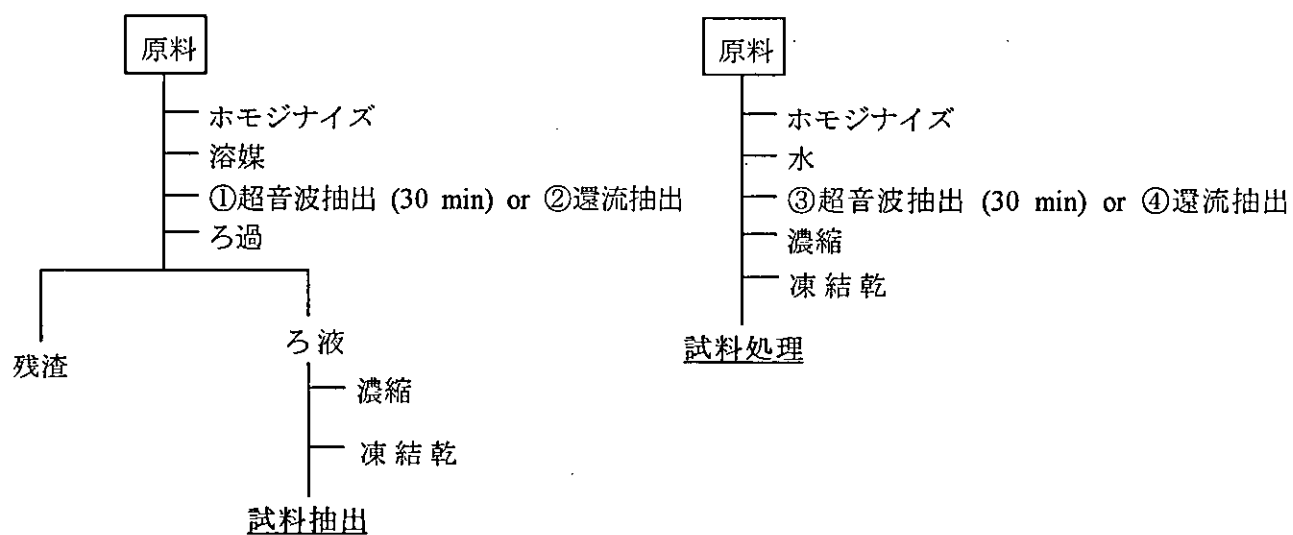
特になし

G. 研究発表

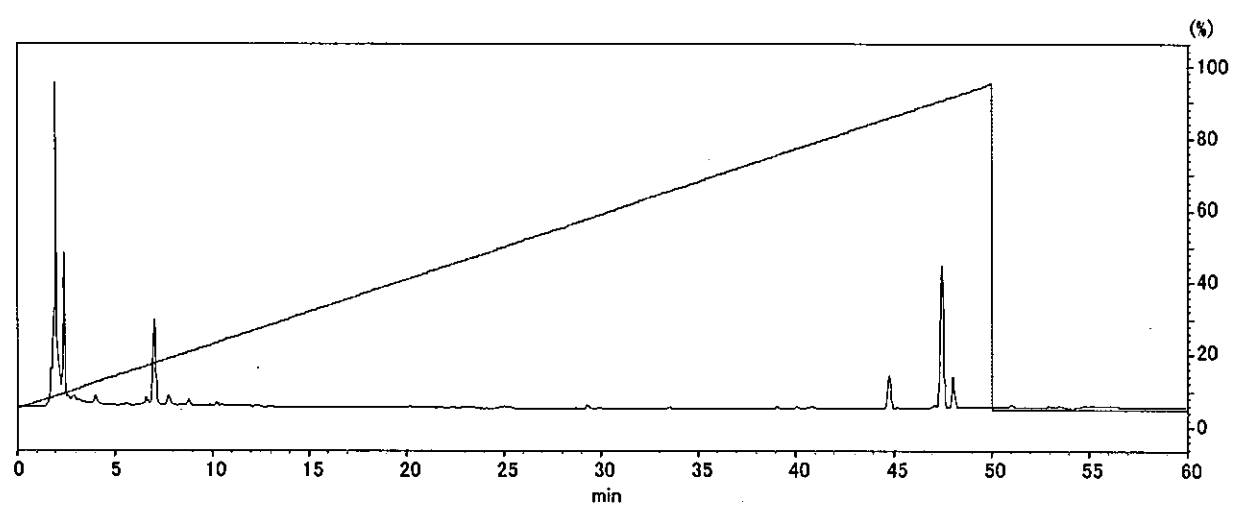
特になし

H. 知的財産権の登録

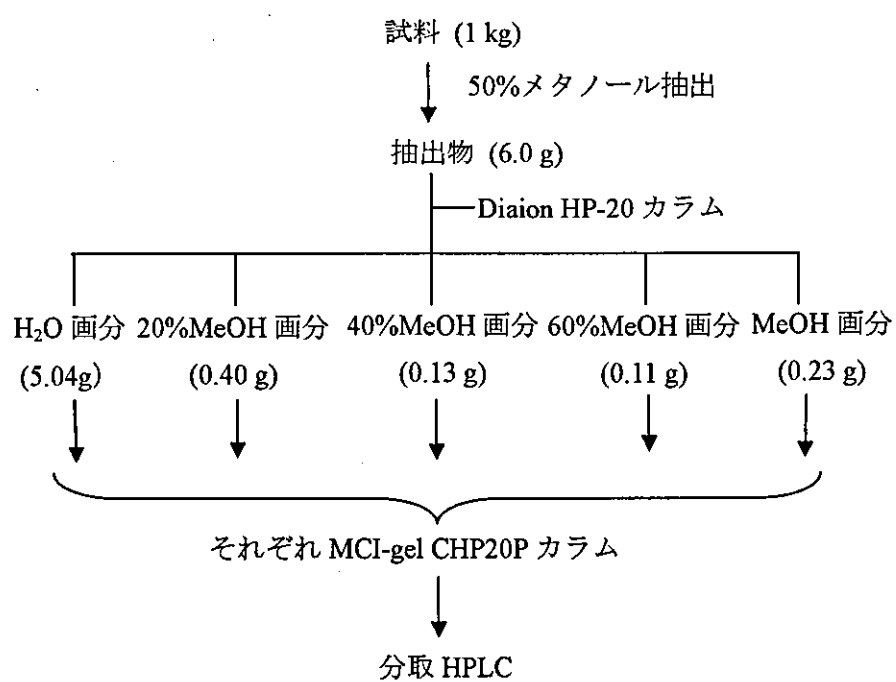
なし



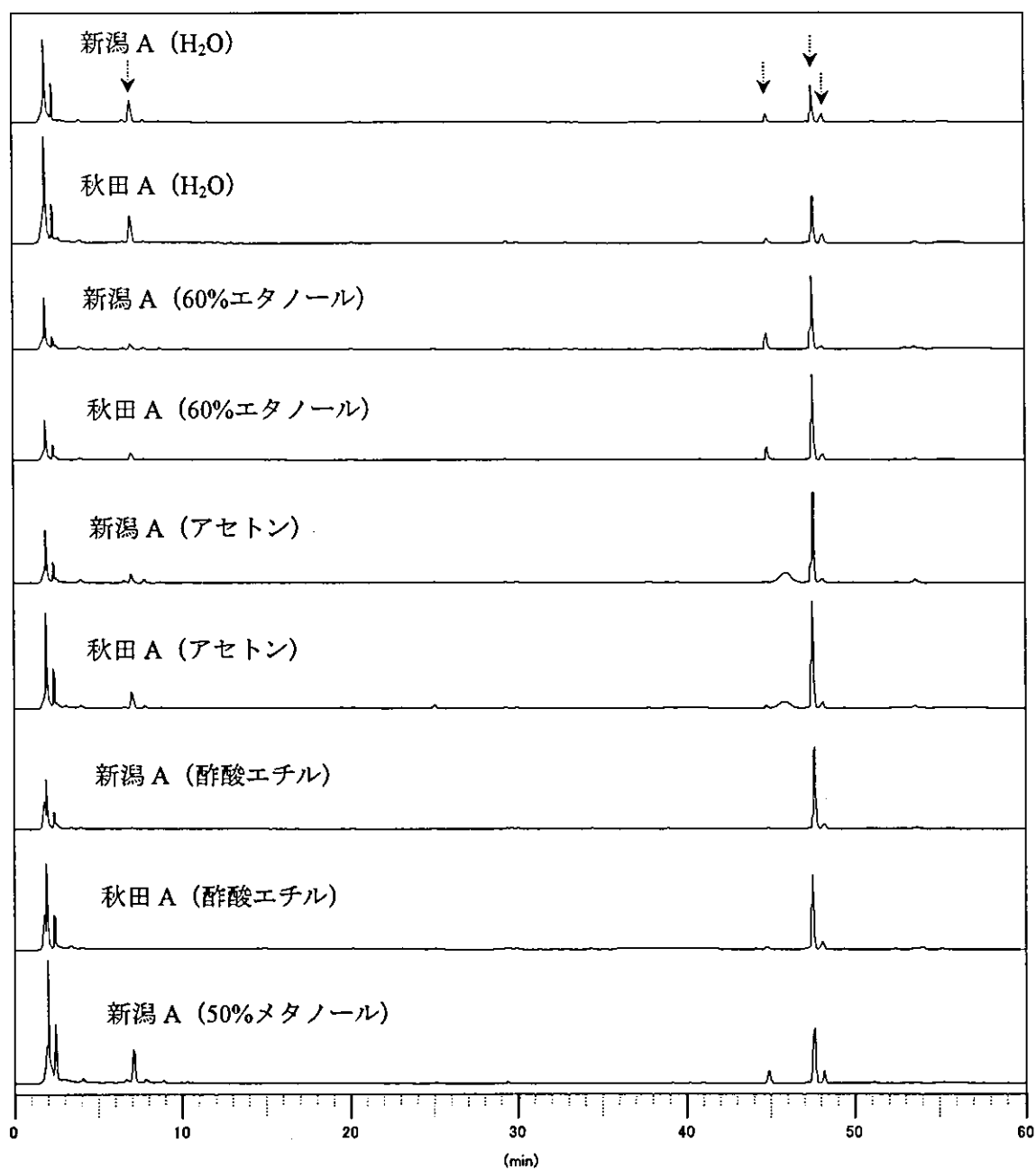
①—図 1



①—图 2

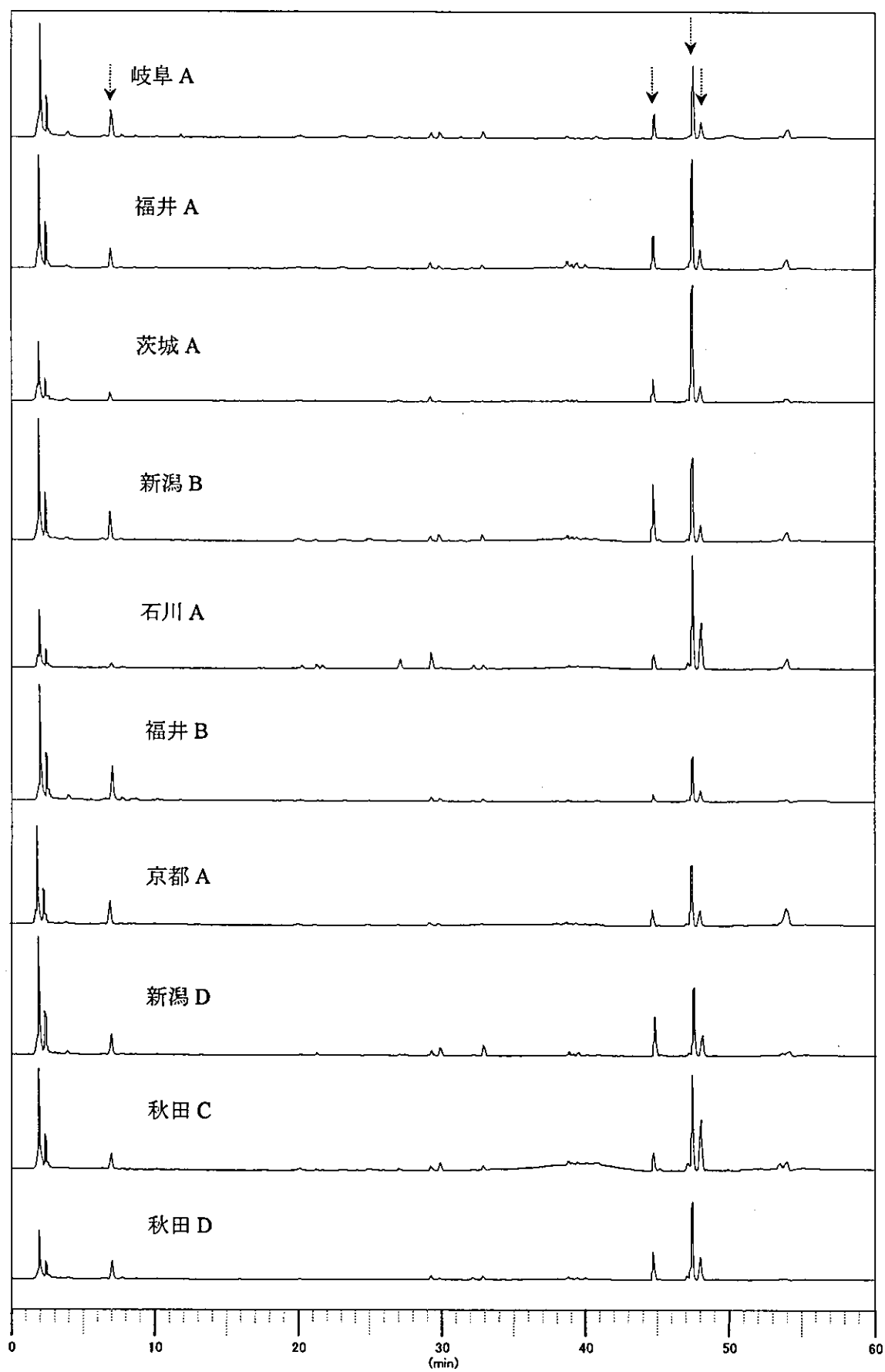


①—図 3



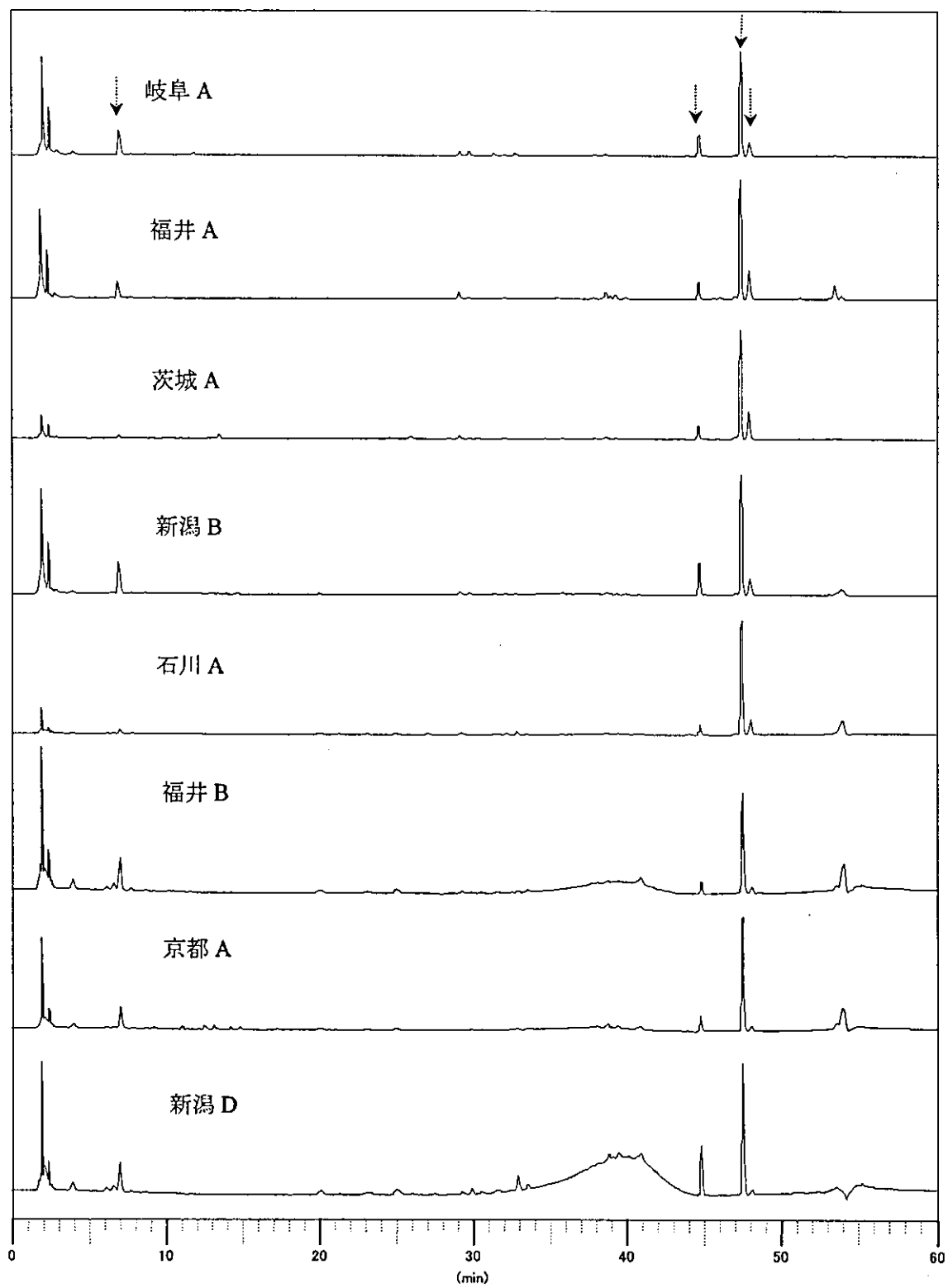
①-図 4

還流あり

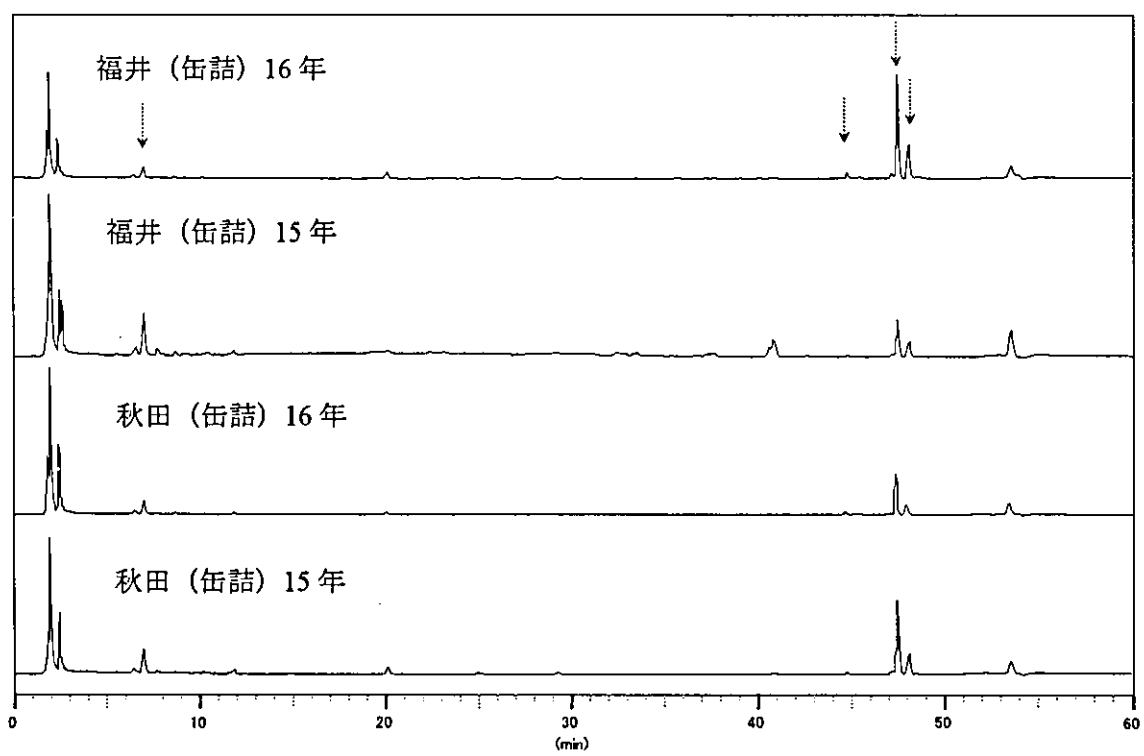


①-図 5-1

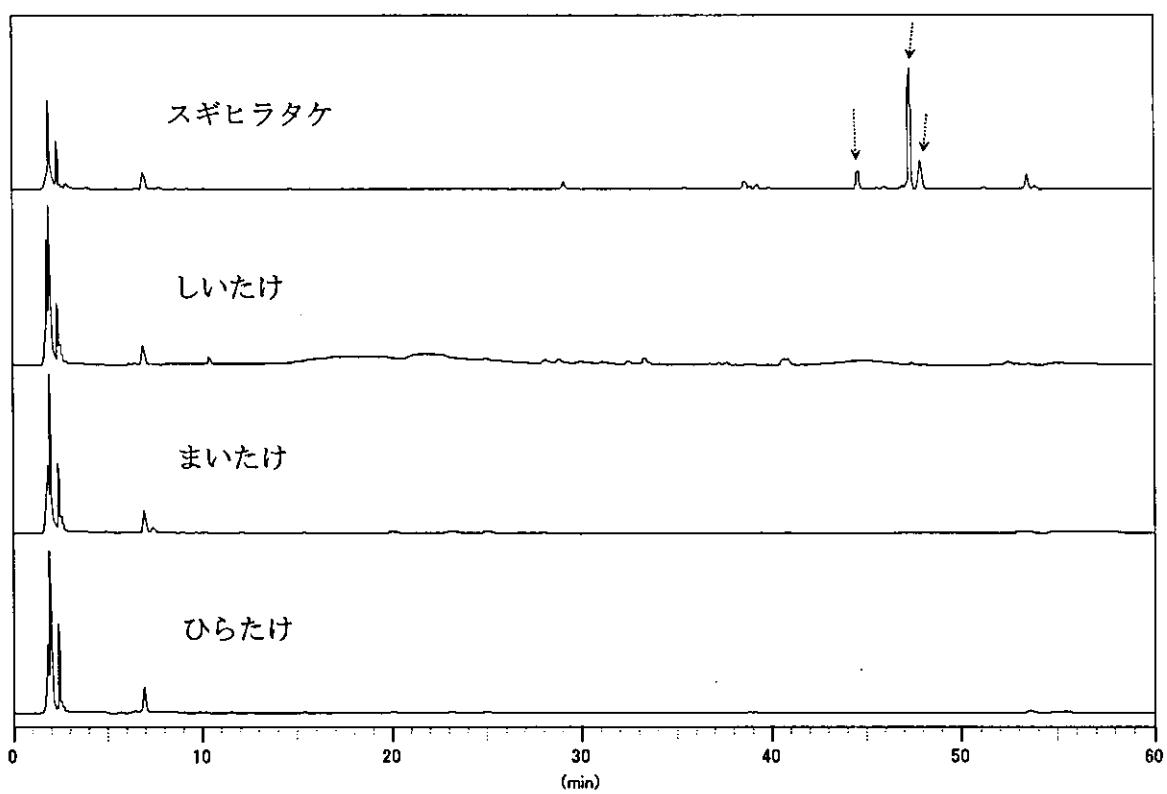
還流なし



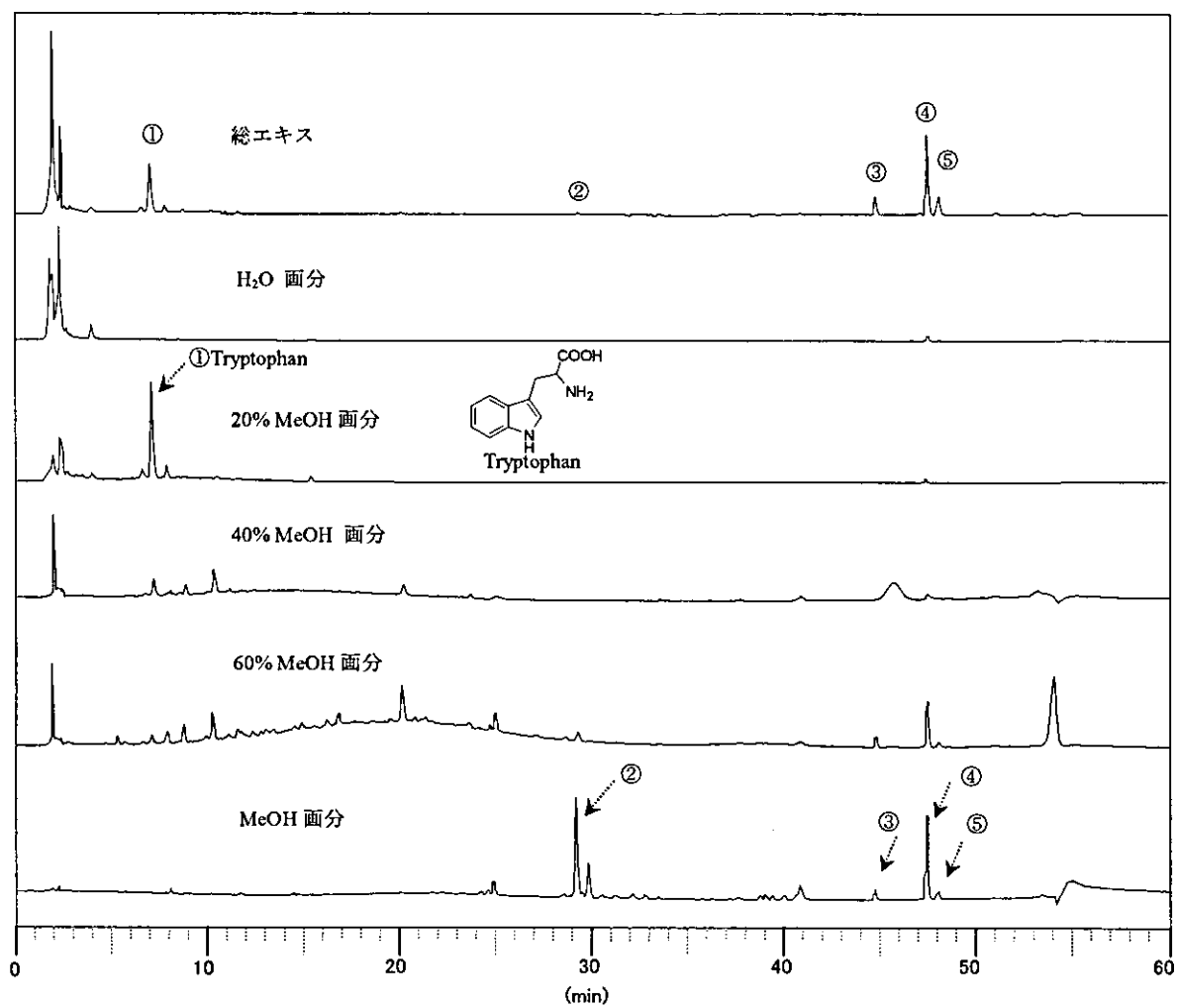
①—図 5 - 2



①—図 6



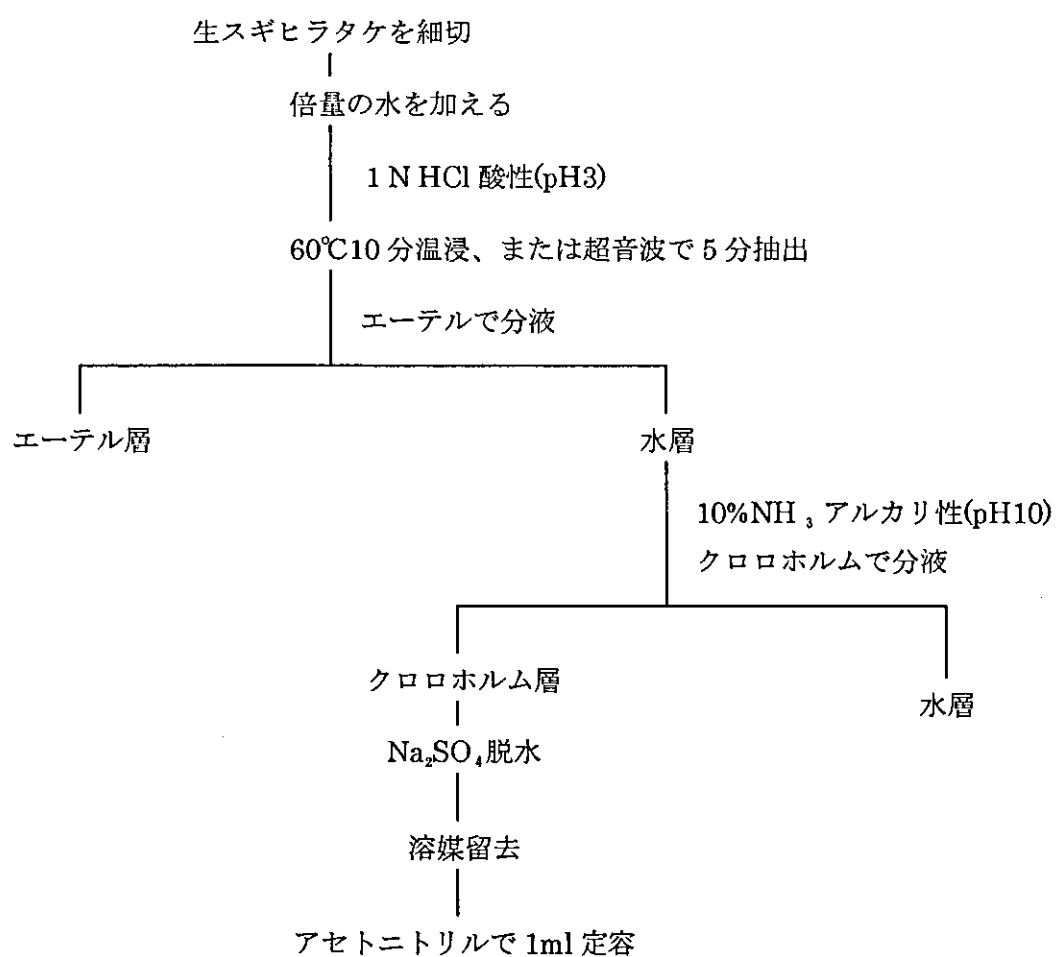
①-☒7



①—図 8

①—表 1

	試料	溶媒	処理法
1	新潟 A	H ₂ O, 60%EtOH, Acetone, AcOEt	①ろ過あり/還流なし (抽出物)
2	秋田 A	H ₂ O, 60%EtOH, Acetone, AcOEt	①ろ過あり/還流なし (抽出物)
3	新潟 A	50%MeOH	①ろ過あり/還流なし (抽出物)
4	岐阜 A	H ₂ O	②ろ過あり/還流あり (還流抽出物)
5	福井 A	H ₂ O	②ろ過あり/還流あり (還流抽出物)
6	茨城 A	H ₂ O	②ろ過あり/還流あり (還流抽出物)
7	新潟 B	H ₂ O	②ろ過あり/還流あり (還流抽出物)
8	秋田 B	H ₂ O	②ろ過あり/還流あり (還流抽出物)
9	秋田 C	H ₂ O	②ろ過あり/還流あり (還流抽出物)
10	岐阜 A	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
11	福井 A	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
12	茨城 A	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
13	新潟 B	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
14	岐阜 A	H ₂ O	③ろ過なし/還流なし (処理物)
15	福井 A	H ₂ O	③ろ過なし/還流なし (処理物)
16	茨城 A	H ₂ O	③ろ過なし/還流なし (処理物)
17	新潟 B	H ₂ O	③ろ過なし/還流なし (処理物)
18	福井 (缶詰) 15 年	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
19	福井 (缶詰) 16 年	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
20	秋田 (缶詰) 15 年	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
21	秋田 (缶詰) 16 年	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
22	新潟 C	H ₂ O	②ろ過あり/還流あり (還流抽出物)
23	新潟 C	50%MeOH	③ろ過なし/還流なし (処理物)
24	石川 A	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
25	福井 B	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
26	京都 A	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
27	新潟 D	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
28	秋田 D	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
29	石川 A	H ₂ O	③ろ過なし/還流なし (処理物)
30	福井 B	H ₂ O	③ろ過なし/還流なし (処理物)
31	京都 A	H ₂ O	③ろ過なし/還流なし (処理物)
32	新潟 D	H ₂ O	③ろ過なし/還流なし (処理物)
33	秋田 D	H ₂ O	③ろ過なし/還流なし (処理物)
34	しいたけ	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
35	しめじ	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)
36	まいたけ	H ₂ O	④ろ過なし/還流あり (還流処理物)



②—Fig. 1. 塩酸酸性によるアルカロイド画分抽出