

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

スギヒラタケの有害成分に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 米谷 民雄

平成18（2006）年4月

目 次

I. 総括研究報告書	
スギヒラタケの有害成分に関する研究	1
米谷 民雄	
II. 分担研究報告書	
1. スギヒラタケ成分の天然物化学的研究	5
近藤一成	
2. スギヒラタケ成分の衛生学的研究	27
穂山 浩	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	51

I. 総括研究報告書

スギヒラタケの有害成分に関する研究

主任研究者 米谷 民雄

平成17年度 厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
総括研究報告書

スギヒラタケの有害成分に関する研究

主任研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨：平成16年秋に、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が疑われる患者の報告が多数あり、共通因子を検索していくと、スギヒラタケ摂取と腎透析（腎障害）が浮上した。そこで、スギヒラタケ摂取が急性脳症の原因であるとの前提にたち、昨年度後半に緊急的にスギヒラタケに関連した有害成分について、農薬やカビ等も含めて、分析を開始した。しかし、研究期間が短いこともあり、原因化学物質の究明には至らなかった。そこで今年度は、スギヒラタケに元々含まれている成分に的をしぼり、有害成分の分析を継続した。①スギヒラタケ成分の天然物化学的研究においては、スギヒラタケ中のUV検出成分として、3種の新規共役ケトン型脂肪酸を単離した。平成17年度産試料中には、分子量610と考えられる成分の減少以外に、低分子化合物の年度による成分差はほとんど見られなかった。有毒成分ムシモール、イボテン酸、5-ヒドロキシトリプタミン、カイニン酸、ドーモイ酸、 α -アマニチンは含まれていなかった。冷水エキスのイオン交換カラム画分である酸性・中性画分に、マウス（ddY雄）致死活性が認められた（60g/kg i.p.）。脂溶性、アルカロイド両画分には活性はなかった。PC12細胞に対して毒性を発現する成分は見られなかった。②スギヒラタケ成分の衛生学的研究においては、スギヒラタケ中のシアンイオン及びチオシアン酸イオンを初めて定量した。平成16年度産は、17年度産に比べ比較的高値で検出されたと考えられた。また、新規スギヒラタケレクチンの詳細な糖結合特異性を解明し、赤血球表面などに含まれるポリラクトサミン鎖およびそれを含む糖タンパク質との相互作用を、定量的に示した。さらに、メタボローム手法を用いてスギヒラタケ中に含まれている代謝産物を網羅的に分析し、採取地域による代謝産物の差を検出し、その差異を地域間で比較することにより、原因成分の推測を行った。

分担研究者（番号は以下の研究内容に対応している）

①近藤一成（国立医薬品食品衛生研究所）

②穉山 浩（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者

①天倉吉章（国立医薬品食品衛生研究所）、伊藤秀之、波多野 力（岡山大学大学院医歯薬総合研究科）、笠原義正（山形県衛生

研究所）

②小川温子、吉田奈央（お茶の水女子大学大学院）、戸井田敏彦、酒井信夫（千葉大学大学院薬学研究科）、佐々木秀輝（日本ウォーターズ（株））、遠藤仁、市川敦子（（株）富士バイオメディックス）、長尾 拓（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

平成 16 年秋に、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が疑われる患者の報告が多数あり、その患者の共通因子を調べていくと、現段階でスギヒラタケ摂取と腎透析（腎障害）が浮かび上がってきた。

そこで、スギヒラタケ摂取が原因であるとの前提のもと、スギヒラタケについてその原因物質を追求することが喫緊の課題になったため、平成 16 年度の特別研究において、緊急的に汚染物質や当該キノコに元来含まれる成分等について、外部からの汚染が考えられる農薬および環境から吸収した有害金属、カビおよびカビが生産するカビ毒、キノコに元々含まれている成分、の 3 つの観点から化学分析を実施した。

しかし、研究期間が短いこともあり、原因化学物質の究明には至らなかった。そこで今年度は、スギヒラタケに元々含まれている成分に的をしぼり、①スギヒラタケ成分の天然物化学的研究、および②スギヒラタケ成分の衛生学的研究の観点から、有害成分の分析を継続した。

B. 研究方法

①スギヒラタケ成分の天然物化学的研究においては、スギヒラタケから抽出した UV 検出成分につき、患者発生地域からの試料に特異的な成分を分画、精製、同定した。また、毒キノコ成分、アルカロイド、アミノ酸成分につき、分析した。さらに、神経細胞に対して生物活性を示す化合物の検索のために、PC12 細胞を用いた *in vitro* 試験や、*in vivo* 動物実験を実施した。

②スギヒラタケ成分の衛生学的研究においては、スギヒラタケ中のシアンイオン

及びチオシアン酸イオンを定量し、また、スギヒラタケレクチンの特異性を検討し、さらに、メタボローム手法を用いてスギヒラタケ中に含まれる代謝産物を網羅的に分析した。

C. 研究結果

①UV 検出成分として、新規の 3 種の共役ケトン型脂肪酸を単離した。16 年産試料と比較して、17 年産では分子量 610 と考えられる成分の減少以外に、低分子化合物の年度による差はほとんど見られなかった。

有毒成分ムシモール、イボテン酸、5-ヒドロキシトリプタミン、カイニン酸、ドーモイ酸、 α -アマニチンは含まれていなかった。

冷水エキスのイオン交換カラム画分である酸性・中性画分には、マウス (ddY 雄) に腹腔内投与した場合に、致死活性が認められた (60g/kg i.p.)。また、この毒性には年度差が見られた。この画分については、低分子、高分子の両観点から解析した。一方、脂溶性、アルカロイド両画分には活性はなかった。

平成 16、17 年の秋田産および分子量 610 を含む粗精製画分の PC12 細胞を用いたアッセイにおいては、細胞内カルシウムの上昇、細胞内活性酸素生成やアポトーシス誘導作用など、神経細胞に影響を及ぼす指標には変化は見られなかった。

②事故が多発した 16 年度産のスギヒラタケ中のシアンイオンは N.D.:114.0 $\mu\text{g/g dry weight}$ で、17 年度産では 1.16-31.0 $\mu\text{g/g dry weight}$ の範囲であり、16 年度産では 17 年度産に比べ比較的高値で検出された。スギヒラタケ中のシアンイオン濃

度は各種食用キノコの含量に比べ10-1000倍高く、各種グリコシダーゼ処理を用いて検討した結果、シアノ配糖体ではなく、遊離の無機イオンとして存在する可能性が示唆された。

一方、スギヒラタケレクチン(PPL)の大量精製のために、精製方法の改良を行い、また、PPLの詳細な糖結合特異性を明らかにし、赤血球表面などに含まれるポリラクトサミン鎖およびそれを含む糖タンパク質との相互作用を定量的に示すことができた。

さらに、LC/TOF-MSにより検出できた全てのピークレスポンスの主成分分析を行った結果、脳症事例の報告例が多い地域群のスギヒラタケに共通して検出され、脳症報告がない地域群では検出されないピークとして、3成分のプロビタミンD関連化合物が浮上してきた。

D. 考察

①脳症が報告されている地域からのスギヒラタケに特有な分子量610と考えられる成分は、16年度産スギヒラタケの方が17年度産より多く含有していた。マウス致死活性がイオン交換カラムの酸性・中性画分に見られること、その毒性に年度差が見られること、また、マウス致死活性が脂溶性画分にはなく、水溶性画分にあることから、今後、同一産地での成分の年度間差を精査することで、原因物質解明の手がかりが得られる可能性があると考えられた。

②本研究によりシアニオンが比較的高値で検出されたことと、急性脳症の症例報告の病態を考慮すると、スギヒラタケ摂取の急性脳症の原因の候補として、シアン

中毒の可能性が、可能性としては考えられた。従って、慢性腎障害患者におけるシアニオンの多量摂取と急性脳症との関連について、今後検討する必要があると思われる。

E. 結論

スギヒラタケ摂取による急性脳症と関連する可能性がある物質として、シアニオンなどいくつかの候補が浮上してきたが、原因究明のためには、さらに今後の研究が必要である。

F. 健康危険情報

スギヒラタケによると思われる脳症の原因が未解明であるため、平成17年のスギヒラタケ摂取の時期の前に、スギヒラタケ摂取について再度注意喚起を行うことが必要と考えられ、平成17年8月23日に厚生労働省が通知したところである。平成18年にも同様の通知が必要であるか、検討されたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Determination of cyanide and thiocyanate in Sugihiratake mushroom using HPLC method with fluorometric detection. H. Akiyama, T. Toida, S. Sakai, Y. Amakura, K. Kondo, Y. Konishi, T. Maitani, J. Health Science, 52, 73-77 (2006).

2. Long-chain fatty acid composition of *Pleurocybella porrigens*. Y. Amakura, K. Kondo, H. Akiyama, H. Ito, T. Hatano, T. Yoshida, T. Maitani, submitted.

3. Conjugated ketonic fatty acids from

Pleurocybella porrigens. Y. Amakura, K. Kondo, H. Akiyama, H. Ito, T. Hatano. T. Yoshida, T. Maitani, submitted.

2. 学会発表

1. 吉田奈央、佐野琴音、竹原弥生、佐藤慶子、穂山浩、吉岡靖雄、米谷民雄、小川温子：シュードプロテオグリカンプローブを用いたスギヒラタケレクチンの探索と精製 第25回日本糖質学会年会(2005, 7)
2. 穂山浩、天倉吉章、近藤一成、吉岡靖雄、米谷民雄 酒井信夫、戸井田敏彦：スギヒラタケ中の成分分析について 第90回日本食品衛生学会 (2005.10)
3. 穂山浩、戸井田敏彦、酒井信夫、天倉吉章、近藤一成、小西良子、米谷民雄：スギヒラタケ中のシアニオン及びチオシアン酸イオンの定量 日本薬学会第126年会 (2006.3)
4. 天倉吉章、近藤一成、穂山 浩、伊東秀之、波多野 力、米谷民雄：スギヒラタケ含有成分について 日本薬学会第126年会 (2006.3)
5. 佐々木秀輝、穂山浩、近藤一成、天倉吉章、笠原義正、米谷民雄：スギヒラタケ中成分のUPLC/TOF MS によるメタボロミクス解析 日本薬学会第126年会 (2006.3)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅱ．分担研究報告書

1. スギヒラタケ成分の天然物化学的研究

分担研究者 近藤一成

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究）

スギヒラタケの有害成分に関する研究

分担研究報告書

スギヒラタケ成分の天然物化学的研究

分担研究者 近藤一成（国立医薬品食品衛生研究所食品部）

研究要旨

スギヒラタケが原因と考えられる急性脳症の原因物質を解明するために、各産地スギヒラタケについて天然物化学的研究を行った。スギヒラタケに含まれる UV 検出成分について、HPLC および TLC の検討から、oleic acid, palmitic acid, linoleic acid, eleostearic acid, stearic acid の脂肪酸, adenine, tryptophan, *trans*-cinnamic acid, ostopanic acid, α -eleostearic acid, β -eleostearic acid, methyl α -eleostearate, ergosterol, triolein を同定した。さらに、新規共役ケトン脂肪酸 [(14*RS*)-(10*E*,12*E*)-14-hydroxy-9-oxo-10,12-octadecadienoic acid, (12*RS*)-(8*E*,10*E*)-12-hydroxy-7-oxo-8,10-octadecadienoic acid, (10*E*,12*E*)-9,14-dioxo-10,12-octadecadienoic acid] を単離した。毒キノコの含有成分であるムシモール、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、エモジン、ヒスタミン、セロトニン、 γ -アミノ酪酸は含有していなかった。また、マウスの死亡や眼から出血するという生物活性が、冷水エキスをイオン交換カラムに通した酸性・中性画分に濃縮されることが分かった。その活性は脂溶性、アルカロイド両画分には活性はなかった。脳症の被害が多かった秋田、新潟産スギヒラタケに多く含まれた分子量 610 の物質は、平成 17 年産のものでは減少していた。平成 16、17 年「秋田産および分子量 610 を含む粗精製画分の PC12 細胞を用いたアッセイでは、細胞内カルシウム上昇、細胞内活性酸素生成やアポトーシス誘導作用など、神経細胞へ影響を及ぼす指標に変化は見られなかった。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所 天倉吉章
岡山大学大学院医歯薬総合研究科
伊藤秀之、波多野 力
山形県衛生研究所 笠原義正

多いことなどが明らかとなった。種々の調査の結果、スギヒラタケ摂取が急性脳症発症のひとつの因子と考えられている。そこで昨年を引き続きスギヒラタケに含まれる成分分析を中心に天然物化学的研究を行った。

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、スギ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た。昨年度、新潟、秋田、山形等で急性脳症が多発し、その原因を究明する過程で透析を受けている高齢者が多いこと、発症した患者にスギヒラタケを摂食した例が

UV 検出できる成分の単離、毒キノコに含まれている代表的成分である、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、ドーモイ酸などの成分の確認、神経細胞モデルとして汎用される PC12 細胞を用いた *in vitro* 試験およびマウスを用いた *in vivo* 試験により、スギヒラタケ中の活性成分を検索した。

B. 研究方法

1. 試料

① UV 検出成分の単離, 構造解析には, 平成 16, 17 年秋に採取されたスギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*) を用いた. また, 属の異なるキノコとして, エノキ (*Flammulina velutipes*), エリンギ (*Pleurotus eringii*), ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*), ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*), ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*), マイタケ (*Grifola frondosa*), マッシュルーム (*Agaricus bisporus*), シイタケ (*Lentinula edodes*) は東京都内のスーパーマーケットで購入したものを用いた.

抽出 1 (成分分取用) - 冷凍保存されたスギヒラタケ (平成 16 年新潟県内で採取) を解凍後, 水洗し, 水分をよくきり, その 1 kg を 50% 含水メタノール 6 L 中でホモジナイズし, ろ過後, 残渣をさらに 50% 含水メタノール 3 L 中でホモジナイズ後, 室温で一晩放置した. ろ過後, ろ液を最初のろ液と併せて減圧濃縮し, 抽出物 (6 g) を得た.

抽出 2 (成分比較分析用) - スギヒラタケ (平成 16, 17 年, 新潟, 山形, 福井, 秋田, 石川県内で採取) 及びエノキ, エリンギ, ブナシメジ, ハタケシメジ, ヒラタケ, マイタケ, マッシュルーム, シイタケ各 10 g をホモジナイズ後, 50% 含水メタノール 50 mL 中で超音波処理を 20 分間行い, ろ過後, ろ液を減圧濃縮して各抽出物とした.

抽出 3 (脂肪酸分析用) - スギヒラタケ及び各種キノコ各 10 g をホモジナイズ後, メタノール 50 mL 中で超音波処理を 20 分間行い, ろ過後, ろ液を減圧濃縮し, 各抽出物とした.

分画精製

抽出 1 により得られた抽出物 (6 g) を Diaion HP-20 (三菱化学製) カラム (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 で溶出) で分画後, 溶出液をそれぞれ減圧濃縮し, 各画分を得た. 得られた画分について, MCI-gel CHP20P (三菱化学製) カラム (H₂O→10%メタノール→20%メタノール→30%メタノール→40%メタノール→50%メタノール→メタノール) で順次溶出し, UV 検出器付き HPLC (次ページの HPLC 条件 1) にてモニターしながらフラクションを集めた. 各フラクションについて, 分取 HPLC (次ページの HPLC 条件 3) により最終精製を行った.

② 毒キノコ成分およびアルカロイドおよびアミノ酸成分の検索には, 山形県内から平成 17 年度に採取した山形産スギヒラタケ (場所: 作矢沢, 金山, 高瀬, 最上, 神室山) および秋田, 福井, 新潟産 (採取した県内の地域別に 8, 9, 10, 25 と番号を付けた) の生を凍結保存したものを使用した. エキスは, 各分析試料について試料の 2 倍量のメタノールまたは冷水に 1 日浸漬し 2 回抽出した. 得られた抽出液をあわせてエバポレータで減圧濃縮し, メタノールエキスと冷水エキスを得た.

アルカロイドの分画は, 凍結した生のスギヒラタケを細切し, 1 N 塩酸で pH 3 に調整して超音波で 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配した. 水層を分離した後, 水層に 10% アンモニア水で pH 10 に調整し, クロロホルムと分配した後, クロロホルム層を濃縮してアルカロイド画分を得た (図 1)

アミノ酸の分画は, イオン交換樹脂 Amberlite IR-120 を 1 N 塩酸で活性化し, スギ

ヒラタケの冷水エキス 1g を以下のように分離した。つまり、水で溶出する酸性・中性画分と 1%アンモニア水で溶出する塩基性・両性画分に分離した。さらに酸性・中性画分は、Amberlite IRA-900 のイオン交換樹脂で水で溶出する中性部と 1%酢酸で溶出する酸性部に分けた (図 2)。

③PC12 細胞を用いた *in vitro* 試験には、前ページの抽出 1 および 2 で得た、平成 16 年および 17 年秋田産、新潟産、福井産、山形産スギヒラタケの凍結乾燥品を用いた。また、分子量 610 (TOF MS 分析で positive モード m/z 611 を与える) の画分は、16 年秋田産から 611A および 17 年新潟産から 611B を分画し、実験に用いた。

2. 装置

UV 検出できる成分の単離、構造解析には、高速液体クロマトグラフ HPLC : 島津 VP シリーズ、核磁気共鳴装置 NMR : Varian INOVA AS600 及び JEOL ECA-500、質量分析装置 MS : Waters Micromass ZMD, JEOL JMS-700 及び JEOL JMS-T100LC。

HPLC 条件

条件 1 - カラム : L-column ODS (4.6×150 mm, 化学物質評価機構製), 移動相 1 : A: 3%酢酸, B: アセトニトリル [5% B→95% B (0→50 min)], 移動相 2 : 3%酢酸-アセトニトリル (15:85), 流速: 1.0 mL/min, 検出波長: 280 nm.

条件 2 - カラム : YMC-Pack FA (6.0×250 mm, ワイエムシィ製), 移動相 : アセトニトリル-水 (85:15), 流速 : 1.2 mL/min, 検出波長 : 400 nm.

条件 3 - カラム : L-column ODS (10×250 mm, 化学物質評価機構製), 移動相 : A: 3%酢酸, B: アセトニトリル [5% B→95% B (0→50 min)], 流速 : 2.5 mL/min, 検出波長 : 280 nm.

TLC 条件

条件 1 - 担体 : Silica gel 60F254 (メルク製), 展開溶媒 : クロロホルム-メタノール-酢酸 (95:5:0.03), 検出波長 : 254 nm.

条件 2 - 展開溶媒 : ヘキサン-酢酸エチル (9:1), その他は条件 1 と同じ.

長鎖脂肪酸分析

脂肪酸分析は脂肪酸分析キット(ワイエムシィ製)により、2-ニトロフェニルヒドラゾンへ変換後、HPLC 条件 2 を用いて HPLC 分析した。

毒キノコ成分とアルカロイドおよびアミノ酸の検索には、

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). 流速 : 1.0 ml/min, 注入量 : 60 μ L
分析カラム : CrestPak C18S (4.6×150 mm, 5 μ m), 測定波長 : 254 nm, カラム温度 : 40°C.

溶出条件 1 移動相溶媒 : A 液: 水, B 液: THF-CH₃CN (3 : 1), グラジエント条件 : 80% A 液 (2 min) → 20% B 液 (25 min) → const (10 min).

高速液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC/MS/MS) : LC 部 : ポンプ G1312A, カラムオープン 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 (2.0×150 mm, 5 μ m), カラム温度 40°C, 流量 : 0.2 mL/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.

溶出条件 2 (アルカロイド画分用) 移動相溶媒 : A 液: 5mM 酢酸アンモニウム, B 液: THF-CH₃CN (3 : 1), グラジエント条件 : 90% A 液 (2 min) → 20% B 液 (18 min) → const (10 min).

溶出条件 3 (アミノ酸画分用) 移動相溶媒 : A 液: 5mM heptafluoro-n-butyric acid, B 液: CH₃CN, グラジエント条件 : 95% A 液 (2 min) → 50% B 液 (10 min) → const (18 min).

高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いたアルカロイド画分の分取

分析用カラム CrestPak C18S を用い溶出条件 1 で UV のピークを指標にチャート (図 3) に示したように分取した。

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, Kieselgel 60 G : Merk)を用いて展開溶媒クロロホルム-メタノール系, *n*-ヘキサン-酢酸エチル系, *n*-ブタノール-酢酸-水(4 : 1 : 2), (4 : 0.5 : 2)の上層, クロロホルム-メタノール-17%アンモニア水-エタノール(2 : 1 : 1 : 2)等で検討した。発色はドラージェンドルフ試薬, ニンヒドリン試薬を用いた。

検討の結果, *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でスポットし, 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 (スポット 1),

0.21 (スポット 2'), 0.38 (スポット 3'), 0.48 (スポット 4) 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回収し, アセトンで抽出後, ろ過してから溶媒を濃縮し, 分析に用いた。

LC/MS/MS を用いた毒キノコ成分, アルカロイド画分, アミノ酸画分の成分分析

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, エモジン, ムスカリン, ヒスタミン, セロトニン, γ-アミノ酪酸, アミノ酸ではグリシン, ロイシン, イソロイシン, フェニルアラニン, トリプトファン, リジン, アルギニン, ヒスチジン, チロシンの標準品を用いて, それら成分の存在について調べた。

カラムは ODS-HG-3 を使用し, 溶出条件 2 (アルカロイド画分用), 溶出条件 3 (アミノ酸画分用) を用い以下の 1), 2), 3), 4) の LC/MS/MS 分析を行った。

- 1) 作矢沢, 金山, 高瀬, 最上, 神室山, 秋田, 福井, 新潟 8 のアルカロイド画分
- 2) 山形神室山スギヒラタケのアルカロイド画分の HPLC 分取画分
- 3) アミノ酸画分
- 4) プレパラティブ TLC 分取画分

3. 生物活性試験

in vivo 生物活性試験

ddY 系雄性マウスおよび C57BL/6J 系雄性マウスを 4 週齢で購入し (日本エスエルシー(株)) 1 日飼育後 6 時間絶食して用いた。被検液は生理食塩水に溶解し腹腔内投与した。投与量は生のスギヒラタケ換算 (湿重量換算) で表し, 60 g/kg を用いた。投与後, 直ちにマウスの行動や症状を観察した。

PC12細胞を用いた *in vitro* 試験および年度によるスギヒラタケ成分比較

LC/MS/MS : Agilent 1100 シリーズの HPLC 付き LC TOF-MS (JEOL AccuTOF) を positive モードで用いた。LC は、移動相 0.1% HCOOH:AcCN=95:5~50:50 のグラジエント条件で行った。カラムは、親水性成分の分析に適した Capcell pak AQ (2.0 X 250 mm, Shiseido) を用いた。

PC12 細胞 (JCRB0266) は、JCRB 細胞バンクより購入した。細胞の継代維持は、5% Fetal bovine serum (FCS) + 10% Horse serum 存在下 Dulbec's modified Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) で行った。神経細胞への分化は、無血清下 Nerve growth factor (NGF) 50ng/ml 存在下で 3 日間 D-poly-lysine coated flask (75 ml) を用いて行った。この細胞を用いて、細胞内カルシウム実験および細胞内活性酸素生成、アポトーシスの検討を行った。細胞内カルシウムは、Fura 2-AM および Fluo 3-AM を用いて、蛍光分光光度計 (Hitachi F-2500) で、専用のソフトウェアを用いて測定した。細胞内活性酸素は DCFH-AM を用い、アポトーシス様作用の検出は、細胞核を Hoechst 33342 および Propidium iodide (PI) で染色し、冷却 CCD カメラ付き蛍光顕微鏡 (Olympus OX-71) で観察した。

また、細胞の固定には、4% formaldehyde を、染色に必要な細胞の透過には 0.2% Triton X-100 を用いた。

C. 研究結果

UV 検出成分の同定

抽出 2 により得られたスギヒラタケ抽出物 (新潟) と各種キノコ抽出物について、HPLC (条件 1 の移動相 1 及び 2) で測定したクロマトグラムを図 4 に示す。本測定条件において、

スギヒラタケ (新潟) 成分としては、矢印で示した 9 のピークがメインピークとして検出された。このピークは他の産地 (山形, 福井, 秋田, 石川) のスギヒラタケにおいても同様に検出され、また水還流抽出物においても認められた。このピークは他の 8 種のキノコからは検出されず、スギヒラタケに特徴的なものであった。さらに、このピークは図 4 右に示すような特徴的な UV 吸収曲線を示した。そこで、これら UV 検出成分を単離、構造解析する目的で、抽出 1 (分取用) により得られたスギヒラタケ抽出物について各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、1 から 11 に示すピークを単離することが出来た (図 4)。単離した化合物について、NMR, MS 等の機器を用いて構造解析を行った。

その結果、メインピークであった 9 は、共役トリエン構造を有する α -eleostearic acid [(9Z, 11E, 13E)-9, 11, 13-octadecatrienoic acid] であると同定した。その他、1 : adenine, 3 : tryptophan, 4 : trans-cinnamic acid, 8 : ostopanic acid [(8E, 10E)-7,12-dioxo-8,10-octadecadienoic acid], 10 : β -eleostearic acid, 11 : methyl α -eleostearate, と同定された。図 5 に化学構造式を示す。2 は図 5 に示すような、リボースを部分構造として有することが明らかであるが、その他については構造解析中である。一方、5 から 7 は文献未収載の化合物で、各種機器分析データに基づき、5 : (14RS)-(10E,12E)-14-hydroxy-9-oxo-10,12-octadecadienoic acid, 6 : (12RS)-(8E,10E)-12-hydroxy-7-oxo-8,10-octadecadienoic acid, 7 : (10E,12E)-9,14-dioxo-10,12-octadecadienoic acid といった 8 と構造が類似した共役ケトン脂肪酸であることが判明した。

一方、TLC による UV 検出成分についても検討を行った。抽出 2 で得られたスギヒラタケ抽出物について TLC (条件 1) により検討した

ところ、Rf 値 0.58 に明瞭なスポットが確認された。これについて分取 TLC による精製を行ったところ、白色粉末が得られた。各種機器分析データをもとに構造解析を行ったところ、**12** : ergosterol と同定された。またその精製過程で、アルコールに不溶の油状成分が得られた。これについても同様に構造解析を行ったところ、**13** : triolein であると同定された。

長鎖脂肪酸の分析

UV 検出成分の精製過程で、脂肪酸の含有が示唆された。一般にキノコは脂肪酸を含むことが知られているため、スギヒラタケについても検討を行った。分析は抽出3で得られた各抽出物について 2-ニトロフェニルヒドラジドへ変換後、HPLC (条件2) で分析した。図6はスギヒラタケ及び他8種キノコのHPLCクロマトグラムを示したものである。スギヒラタケ中には、oleic acid をメインに、palmitic acid, linoleic acid, eleostearic acid, stearic acid が検出された。産地の異なるスギヒラタケの結果においても、同様の傾向が示された。

HPLC-UV によるアルカロイド画分の分析

逆相系のカラムでグラジエント溶出し、波長 254nm で、アルカロイド画分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)12.3分、16.7分、20.2分、21.1分、24.2分に認められた。

(図3)。

薄層クロマトによるアルカロイド画分の分析 および分取

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つた。しかし、*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。図7-1に示したように山形県内から採取したサンプルについてはニンヒドリン呈色スポットはほぼ同じパターンを示した。メインのスポットは Rf 値 0.11, 0.21, 0.38, 0.42 の4つである。

図7-2に示したように秋田産サンプルでは Rf 値 0.42 の下に大きなスポットがあり、福井産は Rf 値 0.11, 0.42 がメインで、新潟産 8, 9, 10, 25 については濃度の差はあるがほぼ同じパターンと考えられる。そこで、材料が十分にあり山形神室山のスギヒラタケについて生重量で 500g を図1と同様に分画し、アルカロイド画分約 62.3mg を得た。この半量 (30mg) をシリカゲル TLC に付してニンヒドリン試薬で発色させ、Rf 値 0.11 (スポット1), 0.21 (スポット2'), 0.38 (スポット3'), 0.48 (スポット4) のスポットをかきとり、各々シリカゲルからアセトンで抽出して分離した。収量はスポット1が 0.9mg, スポット2' が 0.6mg, スポット3' が 0.2 mg, スポット4が 1.0mg である (図8)。スポット3' については時間がたつと消滅し、スポット4と同じものが増えた。

LC/MS/MS を用いた分析

1) 各種スギヒラタケエキスのアルカロイド画分の分析

各種スギヒラタケ(作矢沢, 金山, 高瀬, 最上, 神室山, 秋田, 福井, 新潟 8)の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、溶出条件2 (アルカロイド画分用) で分析した。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)を得たが、各サンプルともクロマトパターンに大きな違いは認められなかつた。

山形神室山スギヒラタケのアルカロイド画分の HPLC 分取フラクションの分析

チャート (図 3) に示した(Rt): 12.3 分, 16.7 分, 20.2 分, 21.1 分, 24.2 分の分取したピークを分析したが, 構造に関して, 注目すべきデータは得られなかった。

アミノ酸画分の分析

TLC で種々の展開溶媒で分析してみると Rf 値の小さいものからリジン, アルギニン, グリシン, ヒスチジン, ロイシン, イソロイシン, トリプトファン, フェニルアラニン, γ -アミノ酪酸と考えられるスポットを得た (図 8, 図 9-1, 図 9-2)。そこで, この画分を LC/MS/MS で分析したところ, リテンションタイム (Rt) 12.06 分にイソロイシン (132.3), 12.40 分にロイシン (132.1), 12.90 分にフェニルアラニン (166.1), 13.6 分にトリプトファン (205.1) の分子イオンピーク (M+H) が認められ標準品との比較から存在を確定した。

アルカロイド画分のプレパラティブ TLC 分取スポットの LC/MS/MS 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 1, 2', 4 について LC/MS/MS 分析を行った。その結果を表 1~3 に示した。いずれのスポットも HPLC 上単一ではなく, また今回用いた標準品と一致する成分はなかった。

in vivo 生物活性試験

山形神室山産と新潟産 8 のスギヒラタケ冷水エキスについて ddY 系雄性マウスで生物活性試験を行ったところ 60 g/kg で目を細めてうずくまる症状が見られ, 24 時間後に神室山では 5 匹中 4 匹が, 新潟 8 では 5 匹中 3 匹が死亡した。C57BL/6 マウスで神室山の冷水エキスについて行くと 3 匹中 1 匹が死亡した (表 4)。

そこで, 平成 16 年度の神室山, 17 年度の神室山, 17 年度の山形各地及びその他の産地のサンプルについて, 同様に毒性試験を行ったところ, 表 5 に示したように 16 年度神室山は死亡せず, 17 年度採取の神室山が死亡した。また, 他の産地のサンプルも 1 匹以上死亡した。

さらに, 17 年度採取の神室山について, 各種分画した画分について同様に毒性試験を行ったところ, 毒性は水層の酸性・中性部に移行することがわかった (表 6)。また, 解剖の結果, 腸内出血と肝臓の病変がみられ腎臓が萎縮していた。

スギヒラタケの年度, 産地による成分比較

秋田, 新潟, 福井産スギヒラタケについて, 平成 16 年産と 17 年産との成分比較を行った。その結果, 図 12 に示すように, 平成 17 年産新潟サンプルにおいて, 分子量 610 のピークが大きく減少している他は, 年度による差は認められなかった。また, 産地間による成分差も大きな違いが見られなかった。

PC12 細胞を用いた in vitro 試験

スギヒラタケ中に神経細胞に対して何からの生物活性を示す化合物が含まれていないかを検討するために, PC12 細胞を用いて細胞内カルシウム濃度上昇, 活性酸素生成, アポトーシス様作用の影響について, 平成 16 年産と 17 年秋田産スギヒラタケ, 分子量 610 を含む画分を用いて行った。細胞内カルシウム実験には, positive control として ATP (100 μ g/mL) を用いた。実験の結果を図 13A に示した。細胞内カルシウムは Fluo 3 を用いた場合, 分子量 610 を含む画分が細胞内カルシウム濃度の上昇を示したが, これは後に述べる Mn-queching 法による確認実験で, 細胞内カルシウム濃度上昇ではなく, Fluo 3 蛍光に直接影響を及ぼしていることによる擬陽性であることが分かった。次

に、分子量 610 の画分、平成 16, 17 年秋田産スギヒラタケエキスについて Mn-queching 法による細胞内カルシウム濃度を調べた。Fura 2 を用いるこの方法では、Fluo 3 の場合と逆に、細胞内カルシウム濃度が上昇すると Fura 2 (360 nm の不動点)の蛍光が減少する(これによりサンプル添加時の蛍光上昇による擬陽性が回避できる)。図 13B に示すように分子量 610 の 2 画分、平成 16, 17 年秋田産スギヒラタケエキスいずれも細胞内カルシウム濃度に影響を与えなかった。

細胞内活性酸素生成については、PC12 細胞を無血清条件 NGF 存在下で神経細胞様に誘導した後に(図 14A)、活性酸素検出用蛍光プローブ DCFH を細胞内に取り込ませたものを用いて検討した。その結果、図 14B に示すように、control, Akita16, Akita17, 611 いずれも活性酸素を生成しないためバックグラウンドレベルで差はなかった(その中では若干 Akita16 が他よりも蛍光があるように見られたが)。

アポトーシス様作用については、8-well の poly-lysine coated slide glass 上で神経細胞様に誘導した後に、秋田産サンプル(Akita16, Akita17)で 24 時間培養した。その後、細胞を固定して核を染色し、核の断片化の有無について観察した。その結果、control, Akita16, Akita17 いずれも各全体がきれいに染色されており、アポトーシスに特徴的な核の断片化や凝集は見られなかった。

D. 考察

これまで知られている代表的な毒キノコに成分、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)、カニン酸、ドーモイ酸、 α -アマニチン、ファロイジン、エモジン、ムスカリン、ヒスタミン、セロトニン、 γ -アミノ酪酸、について検討したところ、スギヒラタケ中にはそれら成分は含有

されていなかった。このことから、原因物質は既知化合物でない可能性が示唆された。

UV 検出成分の検討から、スギヒラタケに特徴的な主要成分 α -eleostearic acid [(9Z, 11E, 13E)-9, 11, 13-octadecatrienoic acid]を含む脂肪酸を数多く単離した。これらの成分について毒性は報告されていない。*in vivo* 試験から脂溶性部分に生物活性(毒性)は認められなかった。さらに、極性成分としてアデニン(adenine)、トリプトファン(tryptophan)を単離した。以上の結果から、スギヒラタケ中には、UV 検出成分として上記以外は検出できるレベルで含有されておらず、脂溶性部分には何らかの活性を示す成分が含有されている可能性は低いと考えられた。

アルカロイド成分の検討から、年度、産地間で成分に大きな差は見られなかった。また、*in vivo* 試験からアルカロイド画分には毒性は認められなかった。

そして、毒性が表 4~6 の結果より、毒性成分は冷水エキスの水層中の、中性、酸性部分にあることが示唆されたが、これらの画分は低分子から高分子化合物を含むため、原因物質の特定には更なる検討が必要と考えられた。

E. 結論

スギヒラタケ中には、既知の毒キノコ成分は含有していないが、毒性を示す成分が、冷水エキスの中性から酸性画分に存在することが考えられた。

F. 研究発表

1. Long-Chain Fatty Acid Composition of *Pleurocybella porrigens*.

Y.Amakura, K.Kondo, H.Akiyama, H.Ito, T.Hatano, T.Yoshida, T.Maitani. *J. Health Science submitted*

2. Conjugated Ketonic Fatty Acids from Pleurocybella porrigens. Y.Amakura, K.Kondo, H.Akiyama, H.Ito, T.Hatano, T. Yoshida, T.Maitani. Chem. Pharm. Bull. *submitted*

G. 参考論文

1. スギヒラタケ摂取後に腎不全患者に多発した脳症

加藤 丈夫他

脳神経, 56, 999-1007 (2004).

2. スギヒラタケ摂取後に発症した脳症の2例：脳画像の経時的変化および脳波所見

黒川克郎, 佐藤裕康, 中島凱夫, 川並 透, 加藤 丈夫

臨床薬理, 45, 111-116 (2005).

3. 腎機能障害患者がスギヒラタケ摂取後に発症した急性脳症

一新潟県, 県北地域における発端症例の検討

桑原武生夫, 新井亜希, 本間則行, 西澤正豊
臨床薬理, 45, 239-245 (2005).

4. 脳炎型スギヒラタケ関連脳症の1例

小原溝二, 大川 聡, 小林道雄, 高橋 聡, 渡辺純夫, 豊島 至

臨床薬理, 45, 253-256 (2005).

5. A novel type of encephalopathy associated with mushroom Sugihiratake ingestion in patients with chronic kidney diseases.

F.Gejoy, N.Homma, N.Higuchi et al.

Kidney International 68, 188-192 (2005).

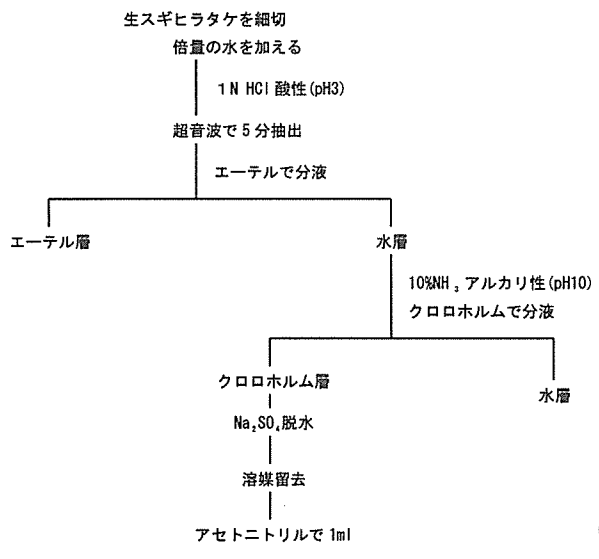


図 1. 塩酸酸性によるアルカロイド画分抽出

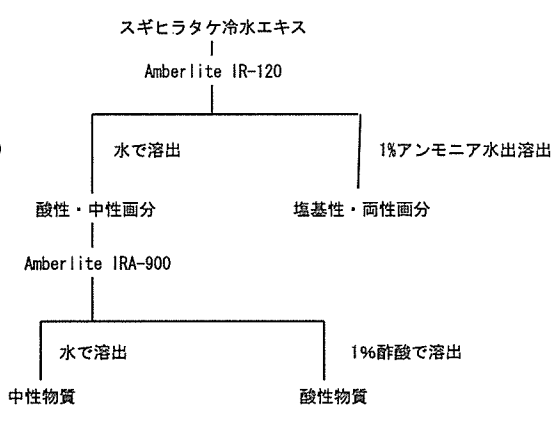


図 2. イオン交換によるスギヒラタケ水性画分の分画

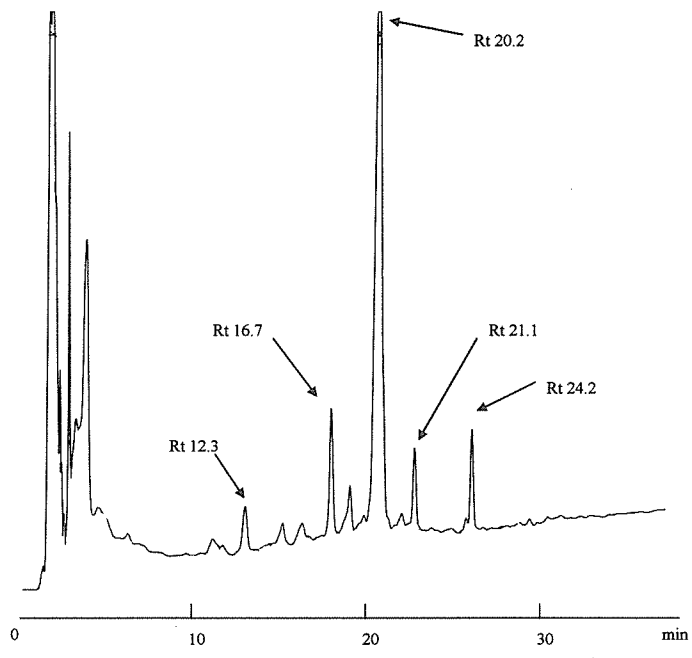


図 3 神室山アルカロイド画分の分析 (HPLC-UV)

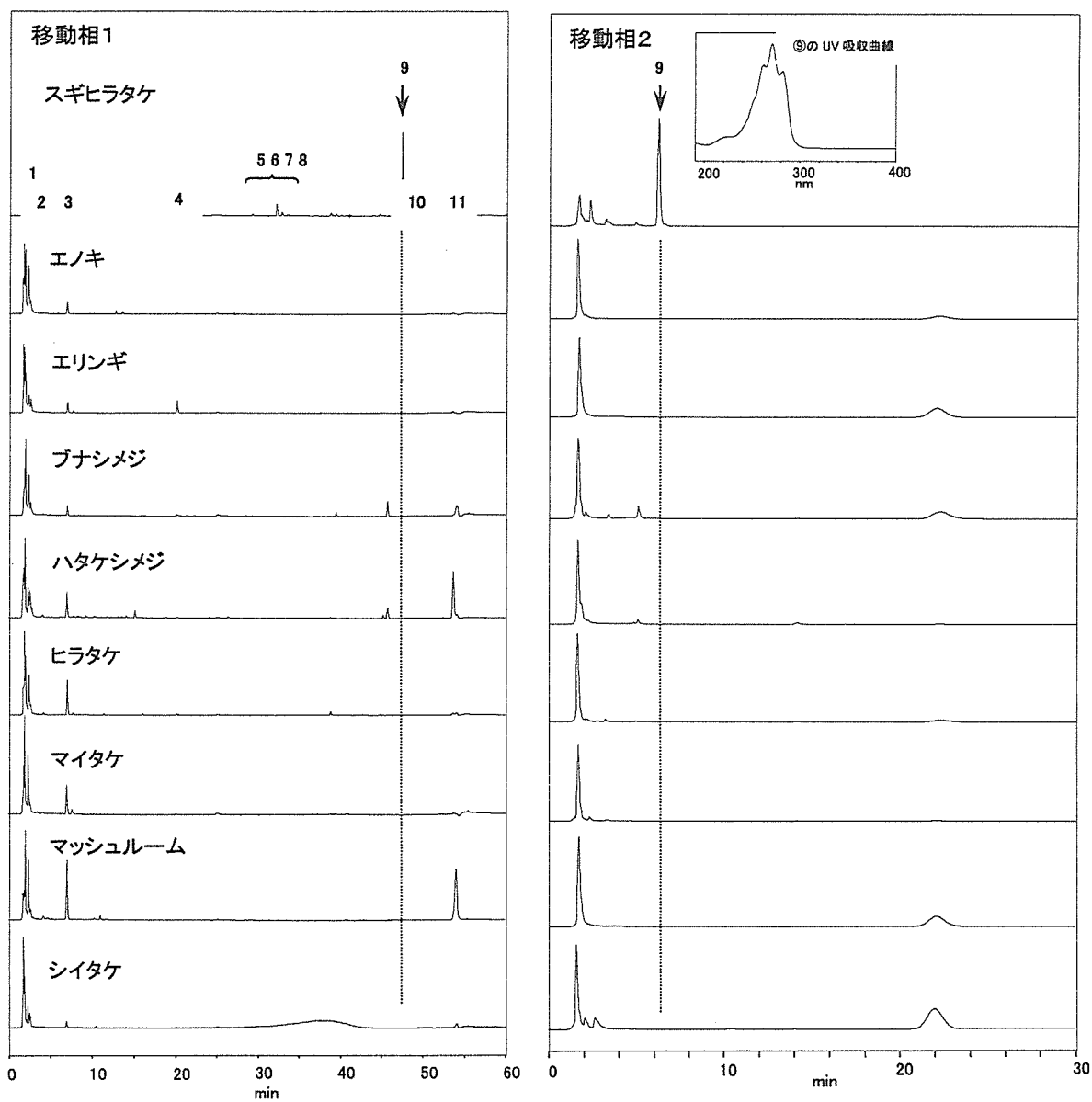


図 4 スギヒラタケ中の UV 検出成分

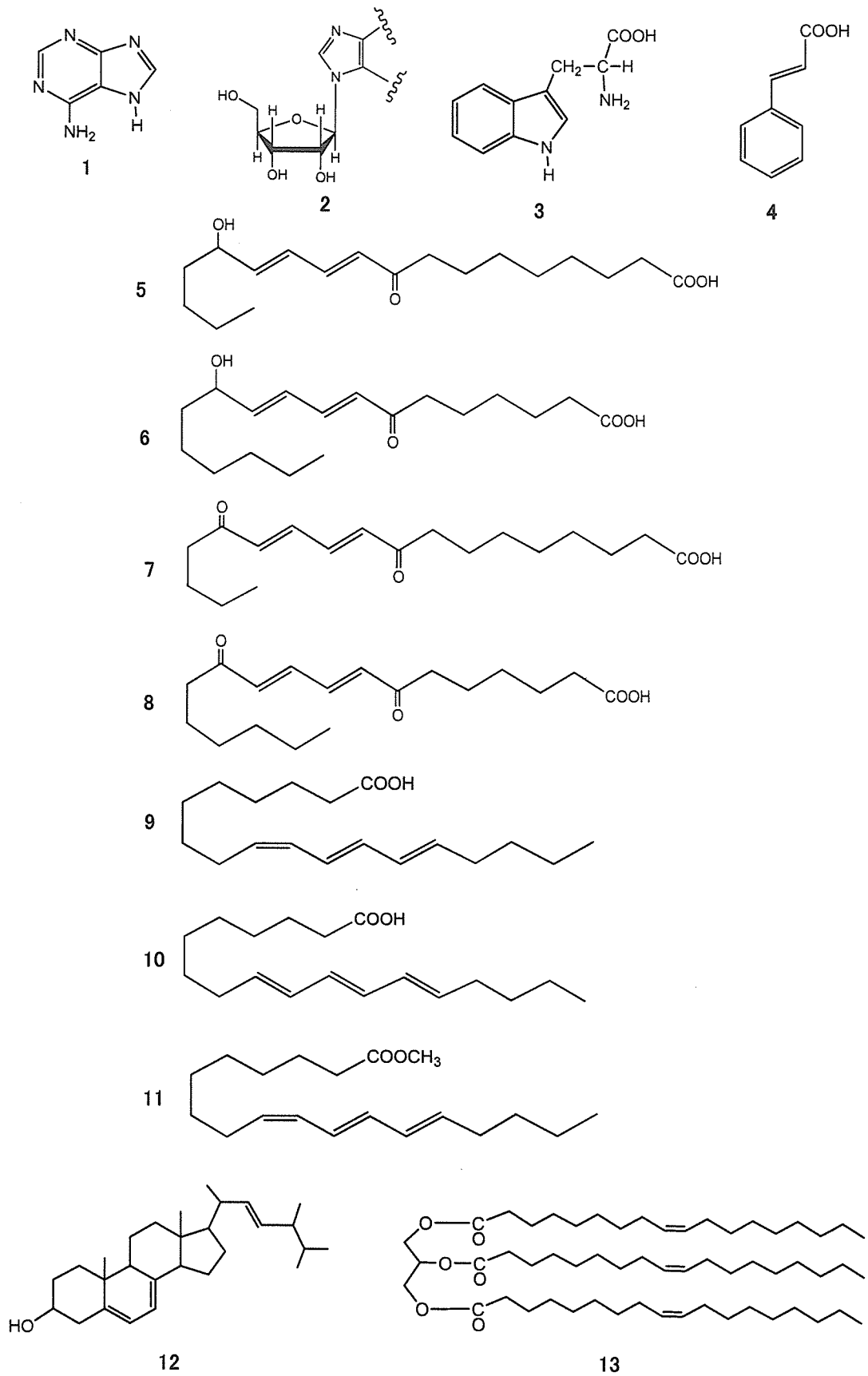


図5 スギヒラタケから単離した成分