

図6 スギヒラタケと各種キノコ中の脂肪酸分析

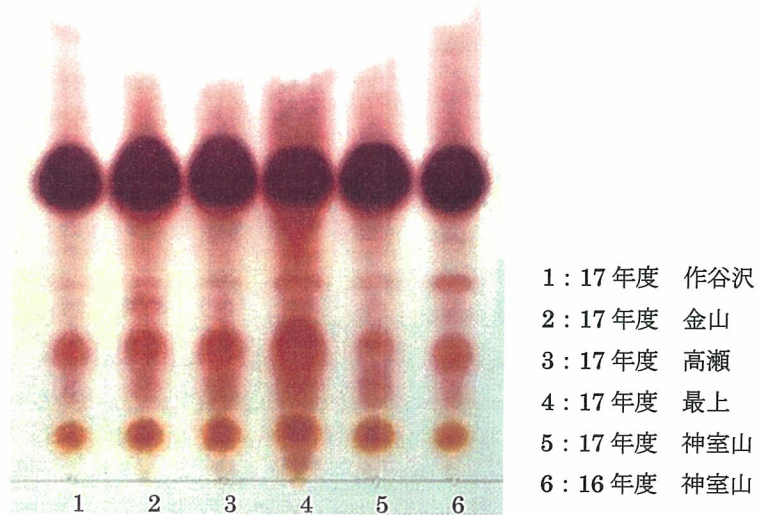


図 7-1 山形県内サンプル由来アルカロイド画分の TLC 比較

TLC : Kieselgel 60 F₂₅₄

展開溶媒 : 1-ブタノール-酢酸-水 (4 : 0.5 : 2) の上層

発色試薬 : ニンヒドリン試薬

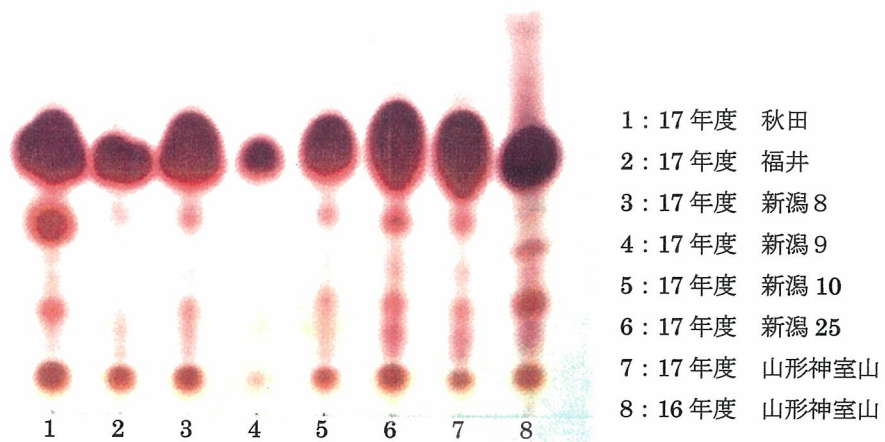


図 7-2 各産地別サンプル由来アルカロイド画分の TLC 比較

TLC : Kieselgel 60 F₂₅₄

展開溶媒 : 1-ブタノール-酢酸-水 (4 : 0.5 : 2) の上層

発色試薬 : ニンヒドリン試薬

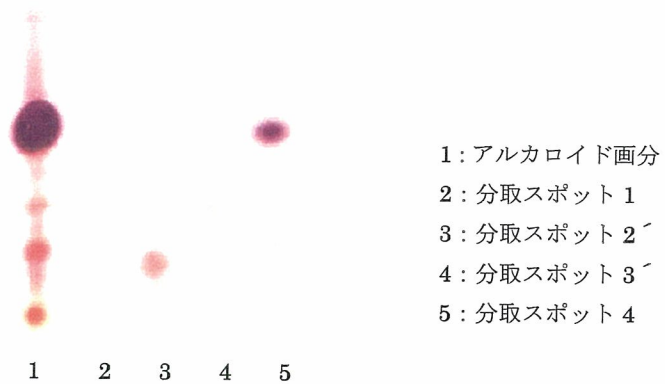


図 8 アルカロイド画分のプレパラティブ TLC

TLC : Kieselgel 60 F₂₅₄

展開溶媒 : 1-ブタノール-酢酸-水 (4 : 0.5 : 2) の上層

発色試薬 : ニンヒドリン試薬

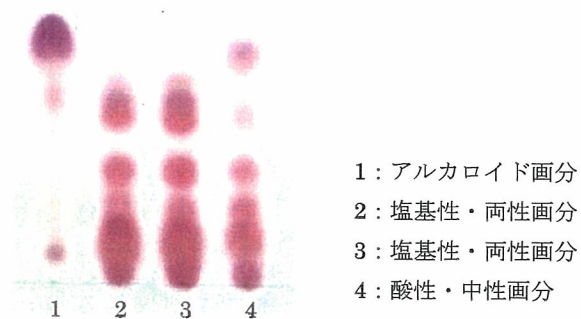
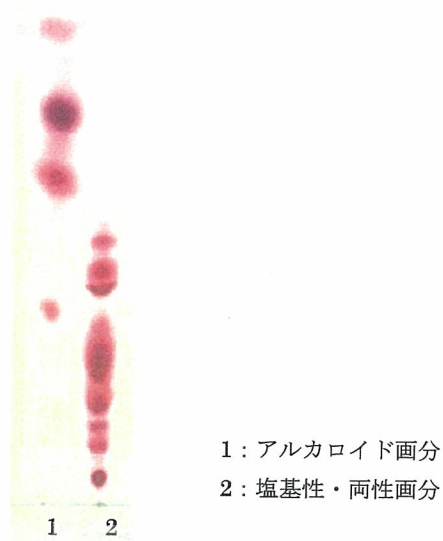


図 9-1 イオン交換クロマト分画

TLC : Kieselgel 60 F₂₅₄

展開溶媒 : 1-ブタノール-酢酸-水 (4 : 0.5 : 2) の上層

発色試薬 : ニンヒドリン試薬



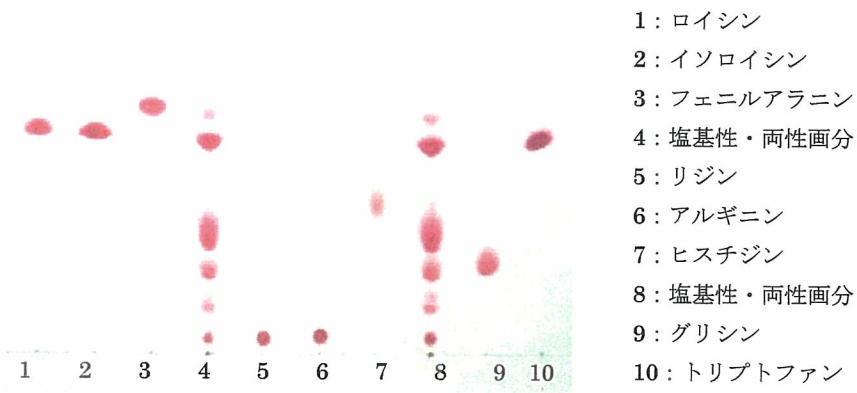
- 1: アルカロイド画分
- 2: 塩基性・両性画分

図 9・2 イオン交換クロマト画分

TLC: Kieselgel 60 F₂₅₄

展開溶媒: クロロホルム: エタノール: 17%アンモニア: 水 (2: 1: 1: 2)

発色試薬: ニンヒドリン試薬



- 1: ロイシン
- 2: イソロイシン
- 3: フェニルアラニン
- 4: 塩基性・両性画分
- 5: リジン
- 6: アルギニン
- 7: ヒスチジン
- 8: 塩基性・両性画分
- 9: グリシン
- 10: トリプトファン

図 10 イオン交換の塩基性・両性画分とアミノ酸の TLC 比較

TLC: Kieselgel 60 F₂₅₄ アルミニウムシート

展開溶媒: クロロホルム: エタノール: 17%アンモニア: 水 (2: 1: 1: 2)

発色試薬: ニンヒドリン試薬

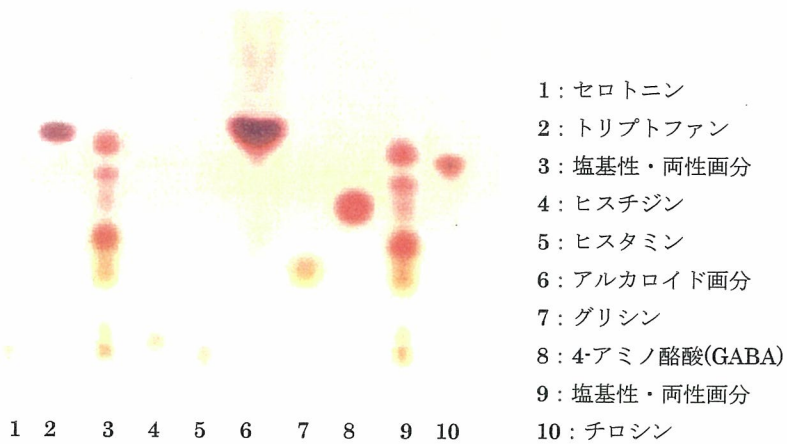


図 11-1 イオン交換の塩基性・両性画分及びアルカロイド画分とアミノ酸の TLC 比較

TLC : Kieselgel 60 F₃₅₄
 展開溶媒 : 1-ブタノール-酢酸-水 (4 : 2 : 2)
 発色試薬 : ニンヒドリン試薬

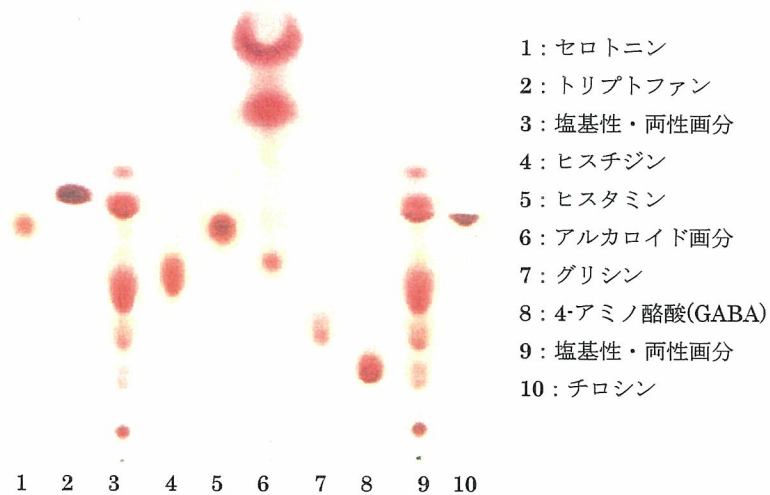


図 11-2 イオン交換の塩基性・両性画分及びアルカロイド画分とアミノ酸の TLC 比較

TLC : Kieselgel 60 F₃₅₄ アルミニウムシート
 展開溶媒 : クロロホルム : エタノール : 17%アンモニア : 水 (2 : 1 : 1 : 2)
 発色試薬 : ニンヒドリン試薬

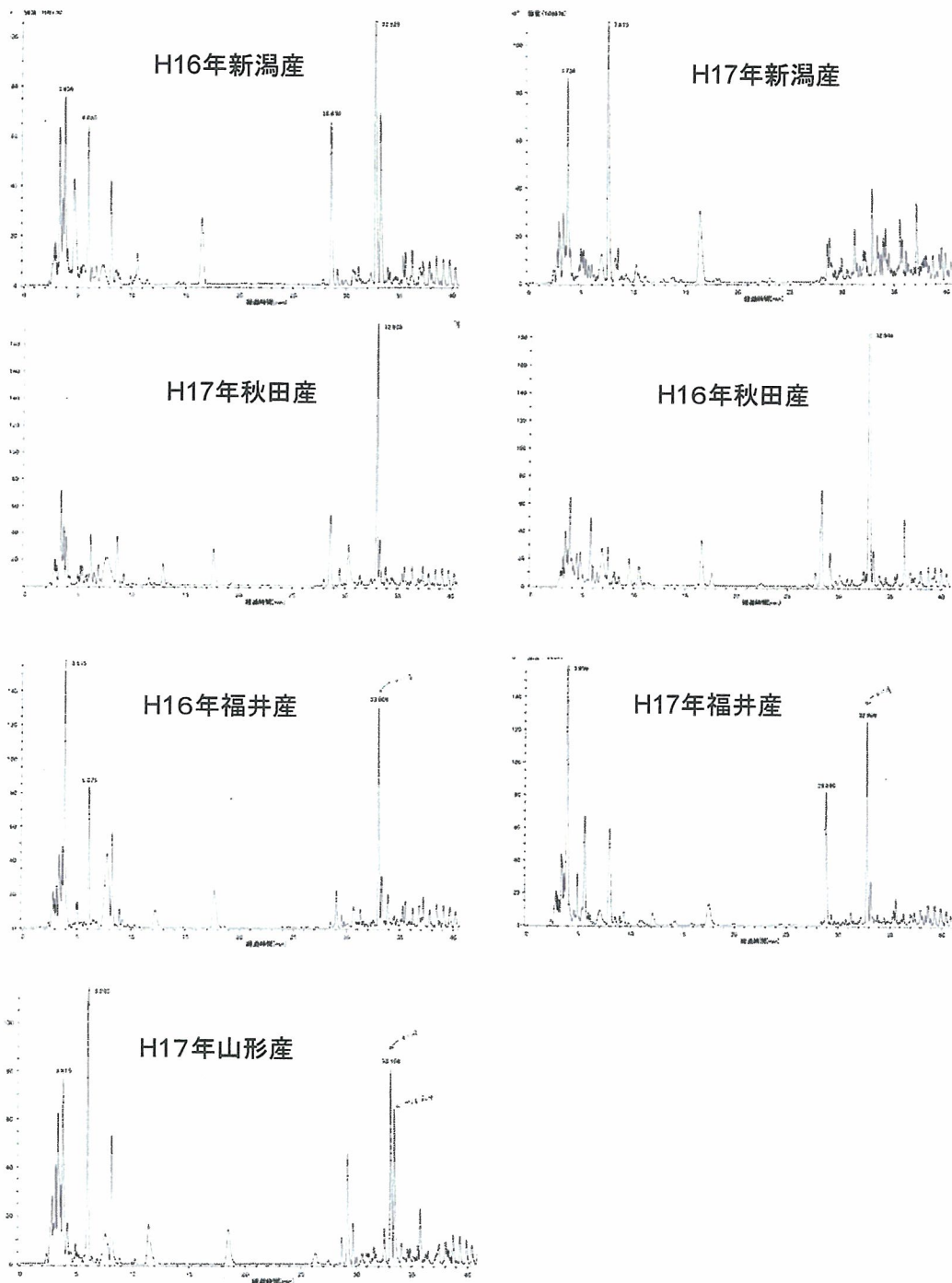
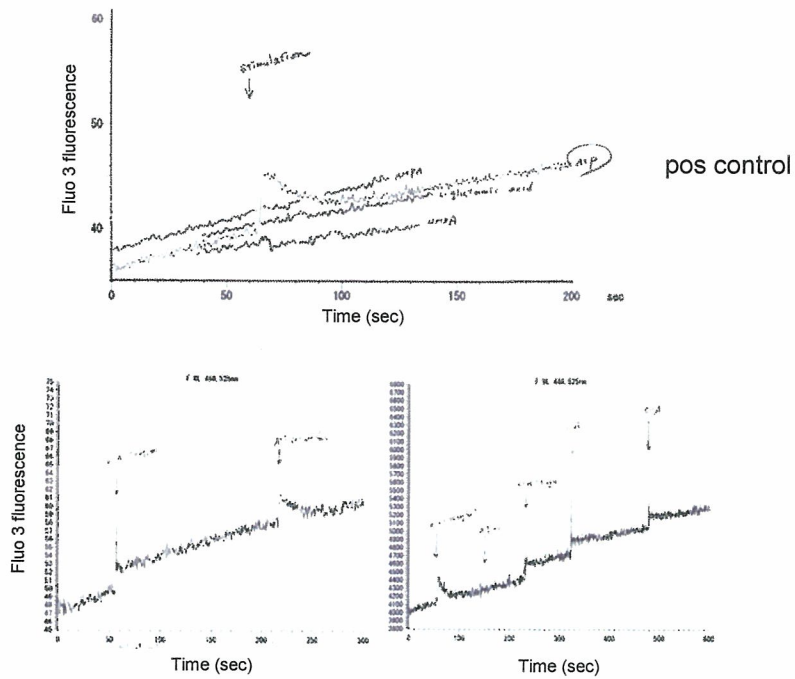


図12 各産地別スギヒラタケの年度による成分差

A



B

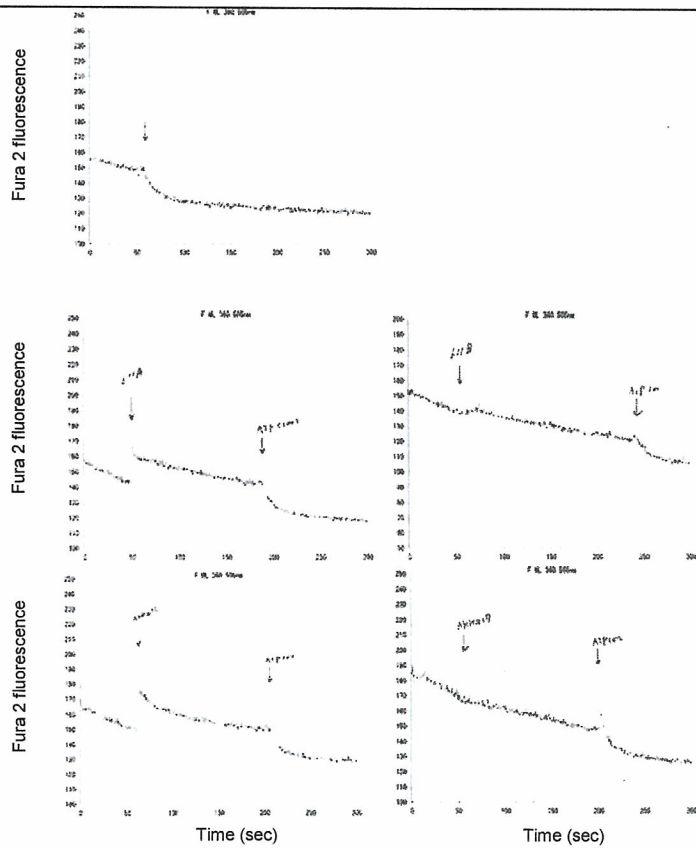


図 13 スギヒラタケ成分の細胞内カルシウム濃度に与える影響

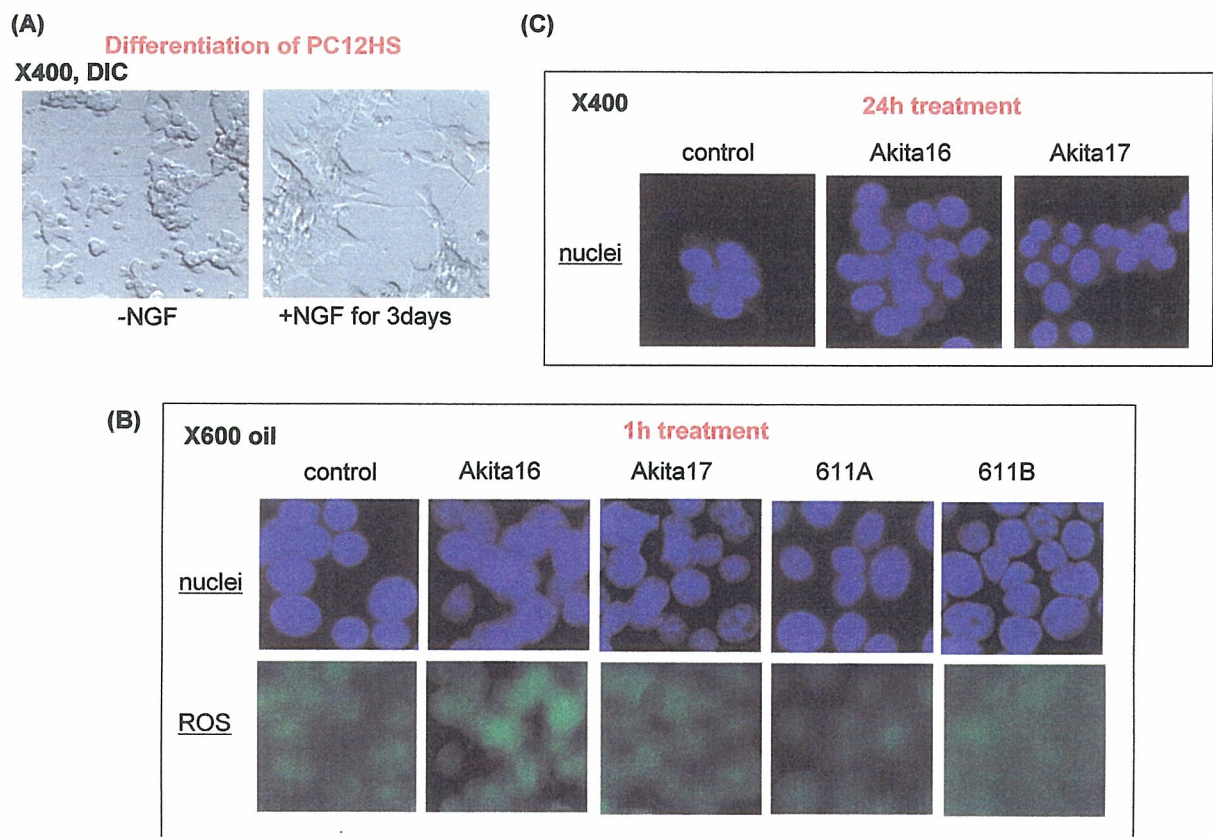


図 14 スギヒラタケ成分の細胞内活性酸素生成と核に与える影響

表 1 山形神宮山尻ギヒラタケの薄層掃き取りスポット1におけるピークのリテンションタイム (Rt) と主なフラグメントイオン

Rt (min.)	主なフラグメントイオン
12.90	392.3, 376.0, 360.4
15.52	277.3, 149.3
15.78	279.3, 270.3, 205.1, 141.9
16.15	284.4, 279.5, 149.1

表 2 山形神宮山尻ギヒラタケの薄層掃き取りスポット2におけるピークのリテンションタイム (Rt) と主なフラグメントイオン

Rt (min.)	主なフラグメントイオン
12.87	392.1, 376.4, 360.1
13.58	564.0, 532.2, 392.1
14.95	331.4, 309.5, 229.3, 143.1
15.90	389.5, 351.3
17.09	373.5, 351.3
18.87	669.5, 625.5, 581.3, 537.5, 493.5, 449.3

表 3 山形神宮山尻ギヒラタケの薄層掃き取りスポット4におけるピークのリテンションタイム (Rt) と主なフラグメントイオン

Rt (min.)	主なフラグメントイオン
14.40	553.2, 537.5, 162.3
15.16	653.5, 220.3, 162.4, 105.1
15.69	204.1, 202.3, 142.4
15.75	202.3, 164.4
15.88	681.7, 234.3, 202.3
17.13	267.3, 242.3

表 4 神室山及び新潟 8 のスギヒラタケの生物活性試験（腹腔内投与）

サンプル	用量 ^{a)} (g/kg, i.p.)	所見	死亡
対照	-	異常なし	0
17年度 神室山冷水エキス	60	異常なし	4/5
17年度 新潟冷水エキス	60	異常なし	3/5
17年度 神室山冷水エキス(C57BLマウスを使用)	60	異常なし	1/3

a) 各サンプルは生重量換算、単回投与（n=5, C57BL マウスはn=3）

表 5 各種スギヒラタケ冷水抽出エキスの生物活性試験（腹腔内投与）

サンプル	用量 ^{a)} (g/kg, i.p.)	所見	死亡 /5匹中
対照	-	異常なし	0
16年度 神室山(山形)	60	目から出血4/5	0
17年度 神室山(山形)	60	下痢2/5, 振戦2/5	3
17年度 高瀬(山形)	60	目から出血3/5	2
17年度 作谷沢(山形)	60	目から出血2/5	1
17年度 秋田	60	特になし	4
17年度 新潟	60	目から出血4/5	1
17年度 新潟0	60	目から出血1/5	3
17年度 新潟25	60	特になし	3
17年度 福井	60	目から出血3/5	3

a) 各サンプルは生重量換算、単回投与（n=5）

表 6 平成17年度神室山スギヒラタケ各種分画の生物活性試験（腹腔内投与）

サンプル	用量 ^{a)} (g/kg, i.p.)	所見	死亡 /5匹中
対照	-	異常なし	0
17年度 神室山メタノールエキス	60	異常なし	0
17年度 神室山アルカロイド画分	60	異常なし	0
17年度 神室山糖質エチル層	60	異常なし	0
17年度 神室山水層	60	下痢3/5	4
17年度 神室山イオン交換(中・酸性部)	60	下痢1/5	4
17年度 神室山イオン交換(塩基性酸性部)	60	異常なし	0

a) 各サンプルは生重量換算、単回投与（n=5）

Ⅱ. 分担研究報告書

2. スギヒラタケ成分の衛生学的研究

分担研究者 龜山 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衛生学的研究

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：平成16年に東北地方を中心に原因不明の急性脳症（脳炎）が60数例報告され、共通因子としてスギヒラタケ大量摂取と腎透析（腎障害）の関連が示唆された。このことから、その原因解明のためのスギヒラタケ中成分の衛生学的研究を行った。スギヒラタケ中のシアニオン及びチオシアン酸イオンを初めて定量した。2004年度産の各地スギヒラタケ中のシアニオンは N.D.-114.0 $\mu\text{g/g dry weight}$ 、チオシアン酸イオンは 0.1-17.0 $\mu\text{g/g dry weight}$ の範囲で検出された。2005年度産の各地スギヒラタケ中のシアニオンは、1.16-31.0 $\mu\text{g/g dry weight}$ 、チオシアン酸イオンは 0.2-6.4 $\mu\text{g/g dry weight}$ の範囲で検出された。2004年度産は、2005年度産に比べ比較的高値で検出されたと考えられる。スギヒラタケ中のシアニオン濃度は各種食用キノコの含量に比べ、10-1000倍高い値を示した。スギヒラタケ中に検出されるシアニオンは、各種グリコシダーゼ処理により検討した結果、シアノ配糖体としてではなく、遊離の無機質として存在する可能性が示唆された。スギヒラタケレクチンの改良精製とその糖特異性の研究では、スギヒラタケレクチン(PPL)の大量精製のため、精製方法を改良した。また PPL 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。UPLC/TOF MS で検出できた全てのピークレスポンスを MarkerLynx ソフトウェアで計算し、主成分分析を行った。この結果、「スギヒラタケ群と市販きのこ群（シイタケ、マイタケおよびシメジ）」とが群で分けられ、さらにスギヒラタケ群は「脳症報告例なし」、「数件の報告例がある」、「（死者を含む）多数の報告例がある」の3群に分類できた。「多数の報告例がある」地域群のスギヒラタケで共通して検出され、「脳症報告なし」地域群で検出されないピークを抽出したところ、 m/z 473.361 (レスポンスの平均値: 9,200 cps), 413.340 (1,080 cps x 2 ピーク), 415.353 (1,085 cps x 2 ピーク), 475.376 (2,370cps), 326.469 (3,935 cps), 340.318 (6,600 cps), 368.318 (1,470 cps) および 852.736 (2,210 cps) の計 10 ピークがそれぞれ 20 倍以上の比で観測された。「多数の報告例がある」地域群のスギヒラタケで共通して検出され、「脳症報告なし」地域群で検出されないピークを抽出したところ、3成分のプロビタミンD類似関連化合物が考えられた。

協力研究者

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

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、昨年度の研究では、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った。その結果スギヒラタケ中にシアン化

イオンが存在することを初めて見出した。また新規レクチンを検出した。

本年度は、シアン分析とレクチン分析を継続して行った。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主成分分析により検出し、その差異を地域間で比較することにより原因成分を推測した。

B. 研究方法

シアン化物イオンの分析に関する検討

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。300~500mg 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晚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、ピリジン-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）。

スギヒラタケレクチンの改良精製とその糖特異性の研究

1. 材料と方法

材料 キシメジ科スギヒラタケ属のスギヒ

ラタケは、厚生労働省食品安全部を通じて地方自治体より提供された、2004年冬に新潟で採取され、凍結保存された試料を主に使用した。ウシ赤血球グリコホリンは、東京農大・天野研究室より提供された黒毛和牛血液から、遠心分離した赤血球を材料にゴーストを調製し、既報の方法²¹⁾に従い抽出した。酵素合成された lacto-N-neotetraose (LNnT、Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) は、協和発酵東京研究所より提供された。種々の糖BP-probe は Lectinity Holdings, Inc. (Moscow, Russia) から購入した。HBS-EP buffer、CM5 sensor chip は BIACORE (Tokyo, Japan) より購入した。

2. スギヒラタケレクチン (PPL) の精製

1) 酸処理 Sepharose 6B カラムを用いる精製

酸処理 Sepharose 6B は、水洗した Sepharose 6B を 0.1 M HCl 中で 40°C、2 時間振とうして緩和酸水解し、0.1 M NaOH で洗浄し、ついで十分水洗してカラムにつめた。以下のすべての操作は 4°C で行った。解凍したムジナタケ 100 g に 5 倍容(v/w)の 10 mM HEPES (pH 7.4) -0.14 M NaCl-1 mM CaCl₂-1 mM MgCl₂ (buffer B) -0.5 mM PMSF を加えて、ワーリングブレンダーを用いてホモジナイズし、その後 4°C で一晩、攪拌抽出した。粗抽出液を 10,000 rpm、30 分間の冷却遠心分離にかけて残渣を除き、スギヒラタケ抽出液を得た。そのほぼ全量を、buffer B で平衡化した酸処理 Sepharose 6B カラム (4 cm×17.5 cm) に向け、buffer B で洗浄後、0.4 M Gal-buffer B で溶出した。280 nm の吸光度が高い画分を集め、排除分子量 10,000 の限外濾過膜(YM-10) と攪拌セ

ル (amicon ultrafiltration cell, NMWL : 10,000, MILLIPORE) を用いて濃縮し、純水に置換した。

2) スギヒラタケ抽出液中からの LNnT カラムを用いる精製

すべての操作は 4°C で行い、バッファーは 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 晩振とうしながらバッチ吸着を行った。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 0.1 M キトオリゴ糖溶液と 50mM LNnT 溶液各 0.5 ml で溶出した。280 nm の吸光度で検出し、1) と同様にして脱塩置換した。

3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE と CBB 染色は Laemmli 法²²⁾に従って行った。0.025 M Tris、0.192 M グリシン (pH 8.3)、0.1 % SDS の泳動バッファー中でゲル 1 枚 (7×9 cm) あたり 15 - 25 mA の定電流で電気泳動を行った。銀染色はシルバーステインキット AE-1350 (ATTO) を使用した。

3. アミノ酸組成と配列分析

酸処理 Sepharose または LNnT-Sepharose を用いて精製した PPL の 10~20 pmol を、6 M HCl 中、フェノールとメルカプトエタノール共存下で減圧窒素置換し、110°C、24 時間酸加水分解して、WatersPICOTAG アミノ酸分析計でアミノ酸組成を分析した。システインの定量は、還元ピリジルエチル化後加水分解し、Trp はメタンスルホン酸中の加水分解を行い分

析した。アミノ酸配列は、Shimadzu PPSQ-10 プロテインシーケンサーを用いて分析した。

4. レクチンの糖結合活性の分析

1) ビオチンヒドラジドグリコホリン糖鎖プローブの調製

ウシ赤血球膜ゴーストから抽出したグリコホリンを純水に溶解し、BCA protein assay kit (PIERCE) を用いてタンパク質定量した。BSA 標準溶液 0 - 2 mg/ml から得た検量線をもとにタンパク質濃度を算出した。グリコホリン 1.05 mg の溶液をガラス試験管中でよく乾燥し、ヒドラジン分解により糖鎖を遊離させた後、*N*-アセチル化し、イオン交換樹脂を用いて脱塩した。グリコホリン糖鎖に 0.1 M 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) 525 μ l を加えて溶解し、50 mM ビオチンヒドラジド-DMSO 溶液 58 μ l を加え、室温で 4 日間反応させた。反応後、ホルミル Sepharose ゲルカラムにかけて未反応のビオチンヒドラジドを除去した後、遠心濃縮機で濃縮乾固し、100 μ l の純水に溶解した。調製したプローブのビオチン導入は、ドットブロッキングにより確認した。2 μ g のジャガイモレクチン (STA) またはヒマ種子レクチン (RCA-I) を PVDF 膜にスポットし、室温で 2 時間 3% BSA 中でブロッキング後、パラフィルム上で 200 - 50,000 倍希釈の調製したプローブ各 20 μ l を加え、室温で 2 時間反応させた。0.1 % Tween-PBS で 5 分間 3 回ずつ洗浄後、再度ブロッキングを 2 時間行った。その後、2 μ g/ml の ABC-HRP/3% BSA と室温で 2 時間反応させた。前と同様に洗浄後、DAB を用いて検出した。

2) ELISA 法による糖 BP-プローブ、ビオチンヒドラジドグリコホリン糖鎖プローブとの結合試験 96 穴マイクロタイタープレート (Immulon IB) の各ウェルに、10 mM HEPES-0.14 M NaCl (buffer C) に希釈した精製 PPL (0-1 μ g/ml) を 100 μ l 加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩固定化した。排液後、3 % BSA/buffer C を 300 μ l ずつ加え、4 $^{\circ}$ Cで 2 時間ブロッキングした。排液後、10 μ g/ml の BP-糖プローブまたはビオチンヒドラジドグリコホリン糖鎖プローブ 100 μ l を加え、4 $^{\circ}$ Cで 1 時間反応させた。buffer C で 3 回ずつ洗浄後、0.67 μ g/ml ABC-HRP/buffer C 溶液を 100 μ l 加え室温で 1 時間反応させた。前と同様に洗浄後、0.04 % OPD-0.02 % H₂O₂ を含む 50 mM クエン酸リン酸バッファー 200 μ l を加えて発色させ、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。2.5 M 硫酸を 50 μ l 加えて発色を停止させた後は、490 nm の吸光度を測定した。

3) 表面プラズモン共鳴法 (SPR) によるグリコホリンとの相互作用解析

BIACore2000 (BIACORE, Tokyo, Japan) を用いて、25 $^{\circ}$ Cで測定した。グリコホリンと PPL または LEA との相互作用解析には、レクチンをアミンカップリング法でセンサーチップ CM5 に固定化した。1:1 の *N*-ヒドロキシスクシンミド (NHS) と *N*-エチル-*N*'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド (EDC) 混合溶液を 10 μ l/min で流し活性化を 21 分間行った。続いて 10 mM AcONa (pH 4.3) に溶解した PPL (0.5 mg/ml) 及び 22 mM AcONa (pH 6.0) に溶解した LEA (0.25 mg/ml) を 21 分間注入し、固

定化した。残存 *N*-ヒドロキシスクシンイミドエステルは、1.0 M のエタノールアミン (pH 8.5) を 21 分間流すことによりブロックし、10 mM HCl で洗浄を行った。コントロールには 10 mM AcONa (pH 4.3) に溶解した BSA (0.1 µg/ml) を固定化したフローセルを用い、バックグラウンドを補正した。アナライトとして、1 µM-5 µM のグリコホリン溶液を 20 µl/min の流速で 30 µl 流した。ランニングバッファは 10 mM HEPES-0.14 M NaCl (pH 7.4) を用いた。各結合パラメーターは、BIAevaluation software version 3.1 を用いて算出した。

メタボローム TOF-MS 手法を用いた解析

凍結乾燥粉末を 10 mg 秤量後、1 ml のメタノールを加え、10 分間超音波で抽出した後、上清を試料とし UPLC/TOF MS で分析した。UPLC 条件：(システム) Acquity UPLC、(カラム) Acquity BEH C18 100 x 2.1 mm I.D., 1.7 µm、(移動相) 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液とメタノールによるグラジェント、(流速) 0.3 ml/min、(カラム温度) 40°C、(注入量) 5 µl。TOF 条件：(システム) LCT-Premier、W モード (分解能約 10,000)、ESI ポジティブによるイオン化、ロックスプレー使用 (0.1 µg/ml Leu-enkephaline)、脱溶媒ガス温度 300°C、脱溶媒ガス流量 1,200 l/Hr、キャピラリー電圧 4,000 V、スキャン時間 0.2 sec。

両腎摘出ラットにおけるシアンカリウム投与の検討

腎臓全摘術

動物は約 30 mg/kg のペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル®、共立製薬株式会社)

社) 腹腔内投与で麻酔した。

腎臓側最終肋骨の 1 cm 後方腹膜を約 2 cm 切開し、副腎と腎臓を一括して取り出し、副腎は分離後、腹腔に戻した。腎動静脈を結紮し、腎包膜を基部に向かって剥がした後、腎包膜の上部を剪刀で切断して腎臓を摘出した。術部を縫合する。反対側の腎臓も同様に摘出した。

血液の処理

血中濃度測定用

予め重量を測定しているマイクロチューブに血液約 200 µL を入れ、速やかに 0.1N NaOH を 20 µL 加え、タッチミキサーでよく攪拌させた。再度、マイクロチューブの重さを測定し、採取した血液量を算出後、-30°C のフリーザーで凍結保存した。

腎障害指標用

血液約 1 mL を 1 時間室温放置後、4°C、3000 rpm、15 分間遠心して血清を採取した。

脳組織の処理：動物をエーテル麻酔下で腹大動脈から放血安楽死させる。

脳組織内濃度測定用

予め重量を測定しているスピッツ管に右大脳を入れ、重さを測定し、脳重量を算出した。脳と等量の 0.1N NaOH を加え、タッチミキサーでよく攪拌・懸濁させた。-30°C のフリーザーで凍結保存した。

C. 研究結果

シアン化物イオンの分析に関する検討

各産地スギヒラタケ (2004 年度採取) 中のシアンイオンおよびチオシアン酸イオンを初めて定量した。2004 年度産の各地スギヒラタ

ケ中のシアニイオンは N.D.-114.0 mg/g dry weight、チオシアン酸イオンは 0.1-17.0 mg/g dry weight の範囲で検出された。(表 2)

2005 年度産の各地スギヒラタケ中のシアニイオンは 1.2-31.0 mg/g dry weight、チオシアン酸イオンは 0.2-6.4 mg/g dry weight の範囲で検出された。(表 3) 2004 年度産スギヒラタケ中のシアニイオン濃度は、2005 年度産スギヒラタケ中のシアニイオン濃度に比べ比較的高値で検出されたと考えられる。

マッシュルーム (*Agaricus bisporous*)、シイタケ (*Lentinus edodes*)、ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*)、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) 中に 0.2-0.7 mg/g dry weight のシアニイオンが検出された。スギヒラタケ中のシアニイオン含量に比べ低値であった。(表 4)

本アルカリ抽出では、シアニ配糖体からシアニイオンは遊離されないことから、スギヒラタケ中にナトリウム塩あるいはカリウム塩として存在していることが示唆された。

シアニイオンは主に腎と肝に存在する解毒酵素ロダネーゼによりチオシアン酸イオンに変換されることが知られているが、腎疾患を罹患した場合に、スギヒラタケから体内に入るシアニイオンが害を生じることなくチオシアン酸イオンに代謝されるのか、原因究明のためには調査する必要があると考えられる。さらに、予想以上のチオシアン酸イオンがスギヒラタケに含まれることも今回の調査で明らかとなった。チオシアン酸イオンは、正常人の血液、尿中に見出される無機イオンであり、また、脳における濃度がヨードポンプの

働きにより厳密に制御されているとも言われている。腎疾患を罹患した場合に、脳のチオシアン酸イオン濃度は制御されているのか、あるいはヨードポンプの異常を惹起し、脳内濃度が異常値となったために脳症を発症するに至ったのか、など今後原因究明のためには検討する必要があるものと推察された。

スギヒラタケレクチンの改良精製とその糖特異性の研究

昨年度、当研究室において、スギヒラタケから新レクチンである PPL (*Pleurocybella porrigens* lectin) が見出された。しかし収率が非常に低かったため、本研究では、酸処理 Sepharose 6B を吸着体として用いて PPL の大量精製を試み、昨年度の LNnT-Sepharose を用いて精製した PPL との同一性をアミノ酸組成と配列分析で比較し、さらにその糖特異性を研究した。

1. PPL の精製

スギヒラタケ 100 g からの一晩抽出液を酸処理 Sepharose 6B カラムにかけてアフィニティークロマトグラフィーを行った。Fig. 1A に示すように、溶出液を A_{280} でモニターすると、0.4 M Gal によってタンパク質ピークが溶出された。タンパク質量から求められた PPL の量は約 8 mg で材料からの収率約 0.008 %、LNnT-Sepharose 6B カラムを用いる方法(収率 <0.001 %)より遥かに高収率で PPL が得られた。酸処理-Sepharose 6B からの PPL 画分を SDS-PAGE につけ銀染色した結果、Fig. 1B に示すように、約 14 kDa に単一バンドが見出され、LNnT-Sepharose 6B カラムによって得られ

た PPL の分子量と一致した。

2. アミノ酸組成とアミノ酸配列

LNnT-Sepharose 6B カラムならびに酸処理-Sepharose 6B カラムを用いて得られた PPL 画分について、酸加水分解後のアミノ酸組成を、Table 5 に示す。各 PPL の組成には有意差が認められなかった。N 末配列はいずれもブロックされていたことから、両レクチンは同一であると考えられた。

3. グリコホリンとの相互作用解析

PPL の糖特異性を調べるために、ELISA 法により糖-BP プローブまたはわれわれが調製したビオチンヒドラジドグリコホリン糖鎖プローブとの結合試験を行った (Fig. 2)。プレートに固定化する PPL の濃度範囲を検討して、比較的低濃度 (0-1 $\mu\text{g/ml}$ または 0-4 $\mu\text{g/ml}$) において結合試験を行った。結果の一部を Fig. 2 に示し、全体を Table 6 にまとめた。また Fig. 4 に、最近われわれが報告したウシ赤血球膜グリコホリンの代表的な糖鎖構造(23)とポリラクトサミン構造を示す。

PPL は ELISA 結合試験で、ビオチンヒドラジドグリコホリン糖鎖プローブおよび LacNAc (Gal β 1-4GlcNAc β) と最もよく結合し、LNnT、LNT (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) とも結合したことから、PPL はラクトサミン配列を含む糖鎖を認識するレクチンであることが強く示唆された。硫酸化コア 1 糖鎖、および単糖の α -Fuc、 β -Glc との結合性も認められた。

PPL とビオチンヒドラジドグリコホリン糖鎖プローブとの反応性が見られたことから、グリコホリンと PPL との相互作用解析を SPR

により行った。リガンドとして PPL、LEA を、コントロールとして BSA を固定化したフローセルの固定化量 (RU) はそれぞれ、9327、10934、461 RU であった。アナライトとしてグリコホリン溶液を流したところ、Fig. 3 に示すように PPL、LEA 共に濃度依存的な結合が見られた。算出した反応速度パラメーターを Table 3 に示した。PPL に対しては、 3.0×10^6 (M^{-1}) の結合定数が求められ、LEA の 1.1×10^6 (M^{-1}) と同等に高く、生物学的に有意な高い親和性と考えられた。10 mM HCl の再生条件では、LEA と結合したグリコホリンが十分に解離されなかったため、グリコホリンと LEA の親和定数はやや低く算出されている可能性がある。

メタボローム TOF-MS 手法を用いた解析

UPLC/TOF MS で検出できた全てのピークレスポンスを MarkerLynx ソフトウェアで計算し、主成分分析を行った。この結果、「スギヒラタケ群と市販きのこ群(シイタケ、マイタケおよびシメジ)」とが群で分けられ、さらにスギヒラタケ群は「脳症報告例なし」、「数件の報告例がある」、「(死者を含む) 多数の報告例がある」の 3 群に分類できた。

「多数の報告例がある」地域群のスギヒラタケで共通して検出され、「脳症報告なし」地域群で検出されないピークを抽出したところ、 m/z 473.361 (レスポンスの平均値: 9,200 cps), 413.340 (1,080 cps x 2 ピーク), 415.353 (1,085 cps x 2 ピーク), 475.376 (2,370cps), 326.469 (3,935 cps), 340.318 (6,600 cps), 368.318 (1,470 cps) および 852.736 (2,210 cps) の計 10 ピークがそれぞれ 20 倍以上の比で観測された。

これらをインターネット上の KEGG を用いて検索したところ、m/z 413.3403, 415.353 及び 475.376 の 3 成分でプロビタミン D 類似化合物がヒットした。レスポンスから類推して、これらの化合物の総量は乾燥スギヒラタケ 10 g あたり（小ぶりの乾燥シイタケで 5、6 枚）、およそ 1 mg のオーダーであると考えられた。

両側腎摘出ラットにおけるシアンカリウム投与の検討

両側腎摘出により、約 3 日間、ラットは生存できることが明らかになり、血中 BUN とクレアチニン、カリウム、リン等が手術前に比べて、手術後では増加することが判明した。この両側腎摘出ラットモデルを用いて、手術後 24 時間後にシアンカリウム (2.5 mg/kg と 5 mg/kg) の経口投与して、血中と脳中のシアンイオンとチオシアン酸イオンの定量を行った。

D. 考察

シアン化物イオンの分析に関する検討

予想以上にスギヒラタケにシアンイオンが含まれていることが明らかとなった。2004 年度産スギヒラタケ中のシアンイオン濃度は、2005 年度産スギヒラタケ中のシアンイオン濃度に比べ比較的高値で検出されたと考えられる。このことは、2004 年には天候や気象状況により、スギヒラタケ中のシアンイオンの産生が増加したのではないかと示唆された。

また、検出されたシアンイオンは当初予想したようなシアノ配糖体ではなく、無機物としてのシアンイオンである可能性を示していた。対照試料とした他の食用キノコからはほとんど検出されなかった。

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。

スギヒラタケレクチンの改良精製とその糖特異性の研究

本研究では、昨年度使用した LNnT カラムを用いる方法に代わり、酸処理 Sepharose 6B を吸着体として用いて PPL の精製を行ったところ、同じ分子量と組成をもつ PPL が高い収率で得られた。PPL の糖特異性については、LacNAc、LNnT、LNT の糖 BP-プローブと ELISA 法でよく結合したことから、PPL はラクトサミン配列を含む糖鎖を認識するレクチンであることが示された (Fig. 2, Table 2)。また、単糖レベルでは α -L-Fuc との反応性も見られたことから、PPL は H 抗原の Fuc 残基を認識すると考えられ、1995 年に報告された抗 H 凝集素²⁴⁾と同一の物質である可能性がある。また、SPR によるウシグリコホリンとの相互作用解析から、PPL は生物学的条件下において赤血球表面の糖タンパク質グリコホリンと

も有意に結合することが示唆された (Fig. 3, Table 7)。過去にマウスを使った実験で、スギヒラタケ中に赤血球や白血球を破壊して急性の貧血を起こす物質 (溶血素) の存在が示されており、本研究において、PPL とグリコホリンが相互作用することが示唆されたので、この結合が溶血誘導と関係することも考えられる。硫酸化コア 1 糖鎖との結合性も見出されたので、腸管粘膜ムチンを始めとする細胞膜表面のほかの糖鎖抗原との結合も推測され、摂取時の消化機能への影響にも興味もたれる。

現在、スギヒラタケ中のどの成分が急性脳症を誘発するのか、原因物質は明らかになってない。最近、スギヒラタケ抽出液を用いたの毒性実験の有効なモデルが得られたとのことなので、本レクチンの大量精製により、ぜひ *in vivo* での毒性調査を行いたいと考えている。

メタボローム TOF-MS 手法を用いた解析

主成分分析の結果から「スギヒラタケ群と市販きのこ群 (シイタケ、マイタケおよびシメジ)」とが群で分けられ、さらにスギヒラタケ群は「脳症報告例なし」、「数件の報告例がある」、「(死者を含む) 多数の報告例がある」の3群に分類できた。このことは、スギヒラタケは他のキノコと主成分の面で違っており、さらに症例の報告の有無の産地で主成分が違っている可能性があることを示唆している。

「多数の報告例がある」地域群のスギヒラタケで共通して検出され、「脳症報告なし」地域

群で検出されないピークを抽出したところ、3成分のプロビタミン D 関連化合物が考えられた。候補化合物群がビタミン D アゴニストである場合と、アンタゴニストである場合とで、2つの仮説が考えられた。

候補化合物はアゴニストと考えると、活性型ビタミン D₃ の慢性腎不全患者への処方量が 0.5~1 μ g/day であることから、患者はビタミン D 過剰摂取となった可能性が考えられた。ビタミン D が腸管からの Ca 吸収を促進し、かつ腎透析患者は沈降炭酸カルシウムを服用していることが多い事から、患者はスギヒラタケの大量摂取により急性の高カルシウム血症を引き起こし、さらに腎機能不全である事からカルシウムの尿中排泄が困難となった可能性が推測された。

候補化合物はアンタゴニストであると考え、検索でヒットした化合物の一つである Doxercarciferol は、血中 Ca レベルを変えずに PTH レベルを引き下げる (骨からの Ca 溶出を抑制)、との報告があることから、患者は元来腸管からの Ca 吸収が少ない上に、スギヒラタケの大量摂取により骨からの Ca 溶出も抑えられ、急性の低カルシウム血症を引き起こした可能性が推測された。

きわめて重度の高カルシウム血症は、錯乱、情動障害、意識の混濁、幻覚を伴う脳の機能障害を引き起こし、また筋力が低下し、不整脈から死に至る事もあるとされる。一方、低カルシウム血症の場合では、錯乱、記憶喪失、意識混濁、うつ、幻覚といった神経や心因性の症状を引き起こし、唇、舌、指、足にチクチ