

Ⅱ．分担研究年度終了報告書

(7) 紅麴製品に由来する化合物の発生机序の解明に関する研究

(7-1) プベルル酸産生菌の性状及び紅麴製品への 混入メカニズムの解析

研究分担者 伊藤 美千穂

令和6年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発のための研究

分担研究年度終了報告書

（7）紅麹製品に由来する化合物の発生機序の解明に関する研究 （7-1）ペベルル酸産生菌の性状及び紅麹製品への混入メカニズムの解析

研究分担者 伊藤 美千穂 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

研究要旨

2024年3月下旬、紅麹を含む健康食品の摂取により健康被害が生じていることが、当該健康食品の製造元より公表され、国立衛研において健康被害の原因究明を実施した。健康被害の原因物質は *Penicillium* 属真菌が産生する二次代謝産物のペベルル酸 (PA) であることが明らかとなったが、我々は、その PA 汚染の原因を解明するため、製造工場において PA 産生菌を探索した。その結果、PA 産生性を有する *Penicillium adametzioides* を分離した。本研究では、分離した *P. adametzioides* について、代謝物プロファイル解析して分布実態を推定するための情報を得ること、及び紅麹の産生に用いる *Monascus pilosus* との共培養試験を実施してどのような培養環境で PA に汚染された紅麹が産生されるかを明らかにすることを目的とした。紅麹の製造工場から分離された *P. adametzioides* が米培地で産生する代謝物を解析した結果、PA が確認された。また、既知の3化合物の存在も確認された。千葉大学に保存されていた *P. adametzioides* の臨床分離株も米培地において同様の代謝物を産生したことから、PA とこれら3種の化合物の産生能を有する *P. adametzioides* が日本に分布している可能性が考えられた。*P. adametzioides* と *M. pilosus* の共培養試験は、紅麹培養品ロットの生産工程を踏まえ、*P. adametzioides* の混入経路として、前培養開始時、本培養開始時、本培養中、本培養後の4つの混入モデルを想定して実施した。その結果、前培養開始時混入モデル、本培養開始時混入モデルで pH が中性の米培地を用いた場合、及び本培養後混入モデルで乾燥を行わない紅麹米を用いた場合に *P. adametzioides* は、*M. pilosus* とともに米培地で生育し、PA を産生した。この結果より、工場に生息していた PA 産生性を有する *P. adametzioides* が紅麹培養品ロット生産のいずれかの工程で混入し、紅麹の PA 汚染の原因となったと考えられた。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所
吉成知也

A. 研究目的

健康被害を生じた健康食品の原料である紅麹のペベルル酸 (PA) 汚染の原因を明らかにするために、2024年4月に紅麹培養品ロットを生産し

ていた製造工場において PA の産生菌を探索した。その結果、工場の様々な箇所の拭き取り検体から PA を生産する *Penicillium adametzioides* が分離された¹⁾。この株が紅麹生産のいずれかの工程で混入し、紅麹の PA 汚染を引き起こした可能性が高いと考えられた。本研究の目的は、工場に生息していた *P. adametzioides* の代謝物プロファイル解析し、その分布実態を推定する

ための情報を得ること、及び紅麹培養品ロットの PA 汚染に関与した可能性を調べるために、紅麹の生産に用いる *Monascus pilosus* と *P. adametzioides* の共培養試験を実施し、どのような培養環境において PA に汚染された紅麹が生産されるかを明らかにすることである。

B. 研究方法

1. 試薬及び器具

HPLC グレードのアセトニトリルと水、特級のトリフルオロ酢酸 (TFA)、メタノール、酢酸、塩酸、酢酸エチル、スクロース、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレートは富士フィルム和光純薬 (株) から購入した。NMR 溶媒の重水素化ジメチルスルホキシド- d_6 及びクロロホルム- d は、メルクから購入した。精白米 (日本産ジャポニカ米) は神奈川県内のスーパーマーケットから購入した。*M. pilosus* NBRC 4520 及び *P. adametzioides* 11-1 株は当該健康食品の製造元から、*P. adametzioides* IFM68223 は千葉大学真菌医学研究センターから入手した。

2. 機器

- ・HPLC: LC-20A シリーズ ((株) 島津製作所)
- ・質量分析器: Q Exactive Orbitrap ハイブリッド質量分析計及び Dionex UltiMate 3000 RSLC システム (Thermo Fisher Scientific)
- ・NMR: JNM-ECZ600 (日本電子 (株))

3. 孢子懸濁液の調製

M. pilosus NBRC 4520 及び *P. adametzioides* 11-1 株をそれぞれ米培地及びポテトデキストロース (PD) 寒天培地で培養した。2 週間後、各培養物に 0.05% ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート水溶液 10 mL を加え、スクレーパーで孢子を回収した。孢子懸濁液をガーゼで濾過し、菌糸を除去した。孢子懸濁液の希釈系列液を調製し、PD 寒天培地に撒いた。4 日後、出現したコロニーを数え、コロニー形成単位 (cfu) を測定した。各孢子懸濁液を 0.05% ポリオキシエ

チレン (20) ソルビタンモノラウレートで希釈し、*M. pilosus* (3.3×10^2 及び 3.3×10^3 cfu/ μ L) 及び *P. adametzioides* (3.3 cfu/ μ L) の孢子懸濁液を調製した。

4. 液体米粉培地と米培地の調製、PA の抽出及び精製

液体米粉培地は、30 mL の精製水を入れた 100 mL 容三角フラスコに、1.5 g の精白米または紅麹米を粉碎したものを加え、オートクレーブ滅菌して調製した。米培地は、精白米 (10 g) と精製水 3 mL を 100 mL 容三角フラスコに入れ、1.5 時間浸漬後、オートクレーブ滅菌して調製した。米培地から PA を抽出するために、75% メタノール 40 mL を加えてホモジナイズした。抽出液をろ紙でろ過し、ろ液 600 μ L を 1.5 mL 容プラスチックチューブに分取し、遠心エバポレーターで乾固した。残渣を 300 μ L の塩酸水溶液 (1 mol/L) に懸濁し、懸濁液を 300 μ L の酢酸エチルで 2 回抽出した。酢酸エチル層を蒸発乾固し、残渣を 1% 酢酸を含む 30% アセトニトリル水溶液 150 μ L に溶解した。遠心分離 (12,000 $\times$ g、5 分) 後、上清 10 μ L を HPLC 分析に供した。生成された PA の量は、10 g の精白米から調製した米培地あたりの量とした。

5. PA の分析条件

HPLC カラムは Triart C18 カラム (250 mm $\times$ 4.6 mm、粒子径 5 μ m、(株) ワイエムシー) を用いた。分離条件は以下である。移動相: A 溶媒 0.1% TFA を含む精製水 - B 溶媒 アセトニトリル、カラムオープン温度: 40°C、グラジエント: 溶媒 B の割合を 10% から 80% へ 25 分間で上昇させた後、5 分間溶媒 B を 80% で固定、流速: 1.0 mL/分、検出: フォトダイオードアレイ検出器 (190-500 nm の範囲に設定)。PA の定量のための検量線は、標準物質 (0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ g) を注入し、358 nm で測定したピーク面積をプロットすることによって作成した。標準物質は、*P. adametzioides* 11-1 株の米培地培養物から精製し、精密質量解

析と NMR 解析を行ったものを用いた¹⁾。

6. *P. adametzioides* の代謝物の解析

P. adametzioides 11-1 株を「4.」に記載の方法で、10 の米培地(精白米 100 g 分)で培養した。培養液を 75%メタノール 400 mL で抽出し、抽出液をろ紙でろ過した。ろ液をエバポレーターで蒸発乾固し、残渣を 30 mL の塩酸水溶液(1 mol/L)に懸濁した。この懸濁液を 30 mL の酢酸エチルで 3 回抽出した。酢酸エチル層を減圧乾固し、残渣を 3 mL の 75%メタノールに懸濁した。懸濁液を 3 等分し、それぞれを 0.1%TFA を含む精製水(20 mL)で平衡化した HF Mega BE-C18 (5 g)カートリッジ(Agilent Technologies)に供した。20 mL の精製水、10%アセトニトリル水溶液、25%アセトニトリル水溶液、50%アセトニトリル水溶液(いずれも 0.1%TFA を含む)を用いて段階溶出を行った。PA 以外の 3 種の未同定の代謝物は、主に 50%アセトニトリル水溶液画分に回収された。各フラクションを減圧乾固した。50%アセトニトリル水溶液画分の残渣(70 mg)を、Triart C18 カラム(内径 250 mm×10 mm、粒子径 5 µm、(株)ワイエムシー)を用いて分取 HPLC に供した。0.1%TFA を含む 33%アセトニトリル水溶液によるアイソクラティック溶出(4.0 mL/min)による分離を行い、化合物 1 (保持時間 8.0 分)、2 (保持時間 9.4 分)、3 (保持時間 14.4 分)を得た。それぞれの化合物について、精密質量解析と NMR 解析を行った。NMR 解析においては、¹H、¹³C、¹³C DEPT135、¹H-¹H COSY、HSQC、HMBC スペクトルを 25°Cにて ¹H は 600 MHz、¹³C は 151 MHz で取得した。

7. 共培養試験

7-1. 共培養試験モデル 1 の培養条件

M. pilosus と *P. adametzioides* の孢子懸濁液を液体米粉培地に添加し、25°Cで 5 日間、200 rpm で振とう培養した。0.4 mL の培養液を、2 mL の水または塩酸(1%)と酢酸(0.68%)の混合溶液とともに米培地に接種した。25°Cで 3 日間静置培養

した後、各培養液に 1 mL の水を加え、培養を続けた。

7-2. 共培養試験モデル 2 の培養条件

M. pilosus の孢子(10⁶ cfu)を液体米粉培地に添加し、25°Cで 5 日間、振とう培養(200 rpm)した。0.4 mL の培養液を、*P. adametzioides* の孢子(100 cfu)と共に米培地に接種した。さらに 2 mL の水または塩酸(1%)と酢酸(0.68%)の混合液を加えた。25°Cで 3 日間静置培養した後、各培地に 1 mL の水を加え、培養を続けた。

7-3. 共培養試験モデル 3 及び 4 の培養条件

精白米(100 g)を 500 mL 容の三角フラスコに入れ、30 mL の水に 1.5 時間浸漬した後、オートクレーブ滅菌した。*M. pilosus* の孢子懸濁液(10⁶ cfu)と、塩酸(1%)と酢酸(0.68%)の混合液 20 mL を米培地に添加した。25°Cで 14 日間静置培養した後、生成した紅麴米を 10 g ずつ、100 mL 容の三角フラスコに分注した。未処理、オートクレーブ処理、またはオートクレーブ処理後 90°Cで 3 時間乾燥させた紅麴米に、*P. adametzioides* の孢子懸濁液(100 cfu)をそれぞれ加え、25°Cで静置培養を行った。

C. 研究結果

1. *P. adametzioides* の代謝物の解析

製造工場から分離された *P. adametzioides* 3 株(S02-10、N08-12、S05-22)が米培地にて産生した代謝物の HPLC クロマトグラムを図 1A~C にそれぞれ示した。いずれの株のクロマトグラムにおいても、PA のピークの他に、未知化合物 1(保持時間 16.7 分)、2(保持時間 17.2 分)、3(保持時間 18.9 分)の 3 つのピークが認められた。千葉大学で保存されている *P. adametzioides* IFM68223 の代謝物のクロマトグラムにも、PA 及び化合物 1、2、及び 3 のピークが観察された(図 1D)。これらの菌株の特徴を明らかにするため、3 種の未同定の化合物の解析を行った。

P. adametzioides 11-1 株を精白米 100g から調製した米培地で 1 週間培養した。培養液の 75%メタノール抽出液を酢酸エチルを用いた液々抽

出、C18 カートリッジ、逆相 HPLC で精製し、PA (18 mg)、**1** (15 mg)、**2** (18 mg)、**3** (11 mg) を単離した。LC-Q TOF-MS を用いた精密質量解析及び NMR スペクトルから、**1**、**2**、**3** をそれぞれ aspergillusol A、lapatin A、glyantrypine と同定した。質量分析の結果を表 1、NMR スペクトルの解析結果及び各化合物の構造式を表 2～4 に示した。なお、いずれの化合物も既知であったことから、立体構造については解析を行わなかった。

2. 共培養試験

製造工場における紅麴米の生産工程の概要を図 2 にまとめた。前培養は、*M. pilosus* を液体紅麴米粉培地に接種し、振盪培養により行う。米を加えた本培養用のタンクを滅菌後、前培養液を接種し、紅麴を生産する。培養途中でサンプリングと加水を行う。本培養終了後、タンクを滅菌する。紅麴を乾燥後、粉碎し、袋詰めされて別の工場に出荷され、錠剤化される。この生産工程を踏まえ、*P. adametzioides* の混入経路として、前培養開始時、本培養開始時、本培養中、本培養後の 4 つを想定した。紅麴が PA に汚染される機構を明らかにするために、各経路を反映した 4 つのモデルを用いて *M. pilosus* と *P. adametzioides* の共培養試験を行った(図 2)。

第一に、前培養開始時の混入を想定したモデル(モデル 1)を検証した。*P. adametzioides* が *M. pilosus* の存在下で液体紅麴米粉培地中で生育できるかどうかを調べるため、*M. pilosus* と *P. adametzioides* の孢子懸濁液を同時に培地に添加し、生育を調べた。図 3B に示すように、液体紅麴米粉培地は暗赤色に濁っており、菌の増殖を目視で確認することは困難であった。そこで、白色の液体米粉培地を使用することとした。液体米粉培地中でかびが成長すると、培地中で色素が生成されたため、培地の色の変化で菌の増殖を見ることができた。100 cfu の *P. adametzioides* または 10^4 cfu の *M. pilosus* を接種した液体米粉培地は、カナリアイエローまたはローズピンクに変化した(図 3A ID: I 及び II)。100 cfu の *P.*

adametzioides と 10^4 cfu の *M. pilosus* を同時に接種すると、培地はクロムイエローに変色した(図 3A ID: III)。 10^6 cfu の *M. pilosus* を接種した米粉培地は、*P. adametzioides* の接種の有無にかかわらず、ルビーレッドに変色した(図 3A ID: IV 及び V)。液体紅麴米粉培地に孢子懸濁液を接種した場合、培地の色は最初の濁った暗赤色から変化しなかった(図 3B)。次に、液体紅麴米粉培地における培養液を米培地に移し、いずれのかびが培養液中で優勢になっているかを調べた。紅麴の生産工程における本培養は、酸性化した米培地で行われていたため、米培地での試験は中性及び酸性の二条件下で行った。酸性米培地は、塩酸と酢酸の混合液(pH 0.5)を加えることで調製した。液体紅麴米粉培地における培養液を接種した中性米培地を図 3C に示す。*P. adametzioides* のみを含む培養液を加えると、米は *P. adametzioides* の緑色の孢子で覆われた(図 3C ID: I)。*M. pilosus* のみが生育した 2 種の培養液をそれぞれ接種すると、紅麴米が生産された(図 3C ID: II 及び IV)。4 種の共培養の培養液をそれぞれ接種したところ、*P. adametzioides* のみが生育し、*M. pilosus* の cfu に関係なく、米が緑色の孢子で覆われた(図 3C ID: III 及び V)。緑色の孢子で覆われたこれらの米培地からは、PA が検出された(図 4)。中性の米培地を用いて得られた結果とは対照的に、*P. adametzioides* のみを接種した液体紅麴米粉培地の培養液を酸性米培地に接種した場合、*P. adametzioides* は生育できなかった(図 3D ID: I)。*P. adametzioides* とは異なり、*M. pilosus* は酸性米培地上で生育した(図 3D ID: II 及び IV)。4 種類の共培養の培養液をそれぞれ酸性米培地に添加したところ、9 日間の培養期間では *M. pilosus* のみが増殖した(図 3D ID: III 及び V)。培養を続けた結果、*P. adametzioides* が増殖し、紅麴米は緑色の孢子で覆われた(図 3E ID: III)。これらの培養物からは PA が検出された(図 5A 及び B)。また、緑色の孢子が部分的に付着した紅麴米(図 3E ID: V 左)からも PA が検出されたが、*P. adametzioides*

がわずかに生育した紅麴米(図 3E ID: V 右)からは PA は検出されなかった(図 5C 及び D)。なお、液体米粉培地による培養液を米培地に添加した結果、上述の液体紅麴米粉培地の結果と同様の結果が得られた(図 6)。

第二に、本培養開始時の混入を想定したモデル(モデル 2)を検証した。*P. adametzioides* が米培地中で *M. pilosus* とともに生育できるかを調べるため、液体米粉培地における *M. pilosus* の培養液と *P. adametzioides* の孢子懸濁液(100 cfu)を同時に米培地に接種し、生育を調べた。モデル 1 と同様に、米培地での培養は中性及び酸性条件下で行った。中性条件下では、*P. adametzioides* を 100 cfu 添加した米培地は 7 日目に緑色の孢子で覆われた(図 7A ID: I)。*M. pilosus* の培養液を接種した米培地では、紅麴米が産生された(図 7A ID: II)。共培養を行った米培地では、7 日目には両菌とも培地上で生育したが、14 日目には *P. adametzioides* の緑色の孢子が米培地を覆った(図 7A ID: III)。酸性条件下では、*P. adametzioides* の生育は 7 日目には見られなかったが(図 7B ID: I)、*M. pilosus* は培地上に菌糸を伸長させた(図 7B ID: II)。共培養を行った米培地では、*M. pilosus* の増殖のみが観察された(図 7B ID: III)。培養 14 日目の結果は 7 日目と同様であった。

第三に、本培養中の混入を想定したモデル(モデル 3)を検証した。本培養中のサンプリング時や加水時に米培地が *P. adametzioides* に汚染された可能性が考えられた。*P. adametzioides* の孢子懸濁液(100 cfu)を紅麴米に接種したところ、14 日間の培養期間中、*P. adametzioides* の増殖は観察されなかった(図 8A)。35 日間の培養後、*P. adametzioides* の菌糸が付着した米粒がわずかに認められた(図 8B)。

最後に、本培養後の混入を想定したモデル(モデル 4)を検証した。紅麴の生産工程では、本培養後、オートクレーブ滅菌、乾燥、粉碎、袋詰めされ、出荷まで保管される。本培養後に混入が起きた可能性を推測するため、オートクレー

ブ後に乾燥させた紅麴米に *P. adametzioides* (100 cfu) の孢子懸濁液を接種し、生育を調べた。14 日後、紅麴米上では *P. adametzioides* の増殖は観察されなかった(図 8C)。一方、オートクレーブ処理後に乾燥しなかった紅麴米に *P. adametzioides* を接種したところ、*P. adametzioides* の緑色の孢子が紅麴米を覆い(図 8D)、その培養物から PA (2.2~3.0 mg/10 g) が検出された。

D. 考察

PA に関する最初の報告は、1932 年にイギリスの研究グループによってなされた²⁾。トウモロコシの病原菌の 1 種である *Penicillium puberulum* の培養物中に検出された組成式 $C_8H_6O_6$ で表される化合物が「プベルル酸」と名づけられた。その後の解析により、PA はトロポロンを基本骨格とする構造であることが明らかになったが、その生物活性についてはほとんど報告が無い。

P. adametzioides は、果実の腐敗を引き起こす環境菌として知られている。*P. adametzioides* の最初の記載は、1956 年に日本の研究者によって発表された論文にある³⁾。その後、韓国、イタリア、パキスタンの研究者によって、ブドウやザクロなどの腐敗した果実から菌株が分離された。中国の研究グループは、海綿から分離した *P. adametzioides* AS-53 の代謝物を分析した⁴⁾。その結果、lapatin A と gyantrypine の産生は認められたが、PA の生産は報告されていない。一方、千葉大学で保存されている *P. adametzioides* IFM 68223 は、2022 年に日本においてヒトの肺検体から分離された株であるが、製造工場から分離された株と同様に PA、aspergillusol A、lapatin A 及び gyantrypine を産生した。別途実施した分子系統解析の結果において、製造工場から分離された *P. adametzioides* 全株と IFM68223 は同一の分岐群に含まれた¹⁾。これらの結果より、工場からの分離株と IFM68223 と同一分岐群を形成し、PA を産生する *P. adametzioides* が日本に分布している可能性が考

えられた。

次に、紅麹における PA 汚染の仕組みを明らかにするため、共培養試験を行った。各試験では、*P. adametzioides* (100 cfu) をかび汚染のモデルとした。モデル 1 の結果では、*M. pilosus* と *P. adametzioides* を共培養した液体米粉培地の色が、*M. pilosus* のみを培養した培地の色と異なっていた。液体米粉培地又は液体紅麹米粉培地で共培養を行った試料を中性米培地に接種したところ、*P. adametzioides* が優勢となり、*M. pilosus* の生育は抑制された。これらの結果は、培地中の *P. adametzioides* の cfu が *M. pilosus* よりもはるかに少なかったとしても、*P. adametzioides* は液体米粉培地及び液体紅麹米粉培地中で *M. pilosus* とともに生育できることを示した。中性条件下で得られた結果とは対照的に、*P. adametzioides* は酸性米培地においては生育できなかったが、*M. pilosus* は生育した。一般に、*Penicillium* 属真菌や *Monascus* 属真菌は、中程度の酸性条件には耐えるが、酢酸を含む酸性溶液で培地の pH を下げると、*M. pilosus* は培地上で選択的に増殖することが報告されている⁵⁾。紅麹生産工程における他の微生物による汚染は、*M. pilosus* のこの性質を利用することで防止されてきたと考えられる。一方で、液体紅麹米粉培地で共培養を行った検体を酸性米培地に接種した場合、紅麹米が *P. adametzioides* の緑色の胞子で覆われた(図 3E ID: III 及び V)。*M. pilosus* が酸性の米培地で生育することで、培地の pH が上昇した可能性がある。その後、生き残っていた *P. adametzioides* が *M. pilosus* の菌体の上から増殖し、PA を産生したと考えられる。

モデル 2 の結果では、*M. pilosus* が十分に増殖した培養液を加えた中性米培地に *P. adametzioides* を 100 cfu だけ接種したところ、*P. adametzioides* が米培地で優勢的に増殖した。中性米培地における *P. adametzioides* の増殖速度は、*M. pilosus* の増殖速度よりもはるかに大きかった。しかし、100 cfu の *P. adametzioides* を酸性の米培地に接種すると、*M. pilosus* の存在にかか

わらず、*P. adametzioides* は増殖しなかった。この結果は、*M. pilosus* と比較して、*P. adametzioides* にとって酸性条件下での生存はかなり困難であることを示している。

モデル 3 の結果では、*P. adametzioides* を接種した未処理の紅麹において、*P. adametzioides* の胞子形成は 14 日間の培養では観察されなかった。35 日目において、*P. adametzioides* のわずかな菌糸成長が観察された。一方、オートクレーブ処理した紅麹においては、14 日後には *P. adametzioides* の緑色の胞子で覆われた。生きた *M. pilosus* は *P. adametzioides* の生育を阻害すると考えられた。

モデル 4 の結果では、*P. adametzioides* はオートクレーブ処理した紅麹米上で生育したが、オートクレーブ後に乾燥処理した紅麹米上では生育しなかった。このことは、*P. adametzioides* の生育には十分な水分が必要であることを示している。

E. 結論

本研究課題において、紅麹培養品ロットの製造工場から分離された *P. adametzioides* が産生する代謝物の解析と、*M. pilosus* との共培養試験を実施した。工場から分離された *P. adametzioides* と千葉大学の保存株の *P. adametzioides* の代謝物のパターンはほぼ同様であったことから、PA を産生する *P. adametzioides* が日本に分布している可能性が考えられた。共培養試験の結果においては、工場から分離された *P. adametzioides* は、複数の培養条件(前培養開始時混入モデル、本培養開始時混入モデルにて中性の米培地を行った場合及び本培養後混入モデルで乾燥を行わない紅麹米を用いた場合)において *M. pilosus* とともに米培地で生育し、PA を産生した。紅麹の製造工場では、本培養は大きなタンクで行われていた。タンク内の培養条件は、本実験で使用した小さな三角フラスコ内の培養条件とは大きく異なるため、*P. adametzioides* の混入経路を今回実施した

共培養試験の結果のみから特定することは困難である。しかし、本研究の結果から、紅麹における PA 汚染の原因が、紅麹の製造工場に生息していた *P. admetzioides* であること、及び紅麹の生産工程における *P. admetzioides* の混入は、前培養の開始から本培養後までのいずれかの時点で発生した可能性が明らかとなった。

F. 参考文献

- 1) Yoshinari T, Watanabe M, Aoki W, Tanaka S, Masumoto N, Ito M, Ohnishi T.: Mechanism of puberulic acid contamination in red yeast rice tablets that caused a serious food poisoning outbreak in Japan. Proc Jpn Acad Ser B. Accepted
- 2) Birkinshaw JH, Raistrick H.: Studies in the biochemistry of micro-organisms: Puberulic acid $C_8H_6O_6$ and an acid $C_8H_4O_6$, new products of the metabolism of glucose by *Penicillium puberulum* Bainier and *Penicillium aurantio-virens* Biourge. With an appendix on certain dihydroxybenzenedicarboxylic acids. Biochem. J. 26, 441–453 (1932)
- 3) Abe S.: Studies on the classification of the Penicillia. J. Gen. Appl. Microbiol. 2, 1–194 (1956)
- 4) Liu Y, Li XM, Meng LH, Jiang WL, Xu GM, Huang CG, Wang BG.: Bisthiodiketopiperazines and acorane sesquiterpenes produced by the marine-derived fungus *Penicillium admetzioides* AS-53 on different culture media. J. Nat. Prod. 78, 1294–1299 (2015)
- 5) Tarui S, Kadoya T, Tanabe N. inventor; Gunze Ltd, assignee.: Production of 'benikoji' using rice as raw material for producing koji. Japan patent JPH01171476A (1989)

G. 研究業績

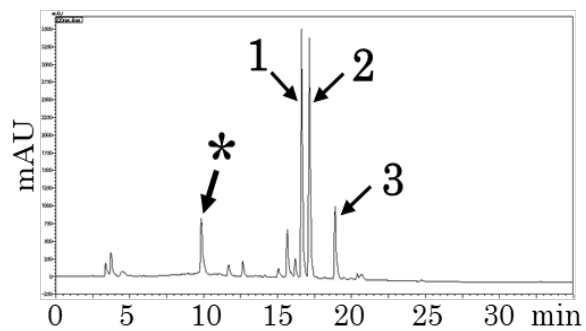
1. 論文発表

- 1) Yoshinari T, Watanabe M, Aoki W, Tanaka S, Masumoto N, Ito M, Ohnishi T.: Mechanism of puberulic acid contamination in red yeast rice tablets that caused a serious food poisoning outbreak in Japan. Proc Jpn Acad Ser B. Accepted

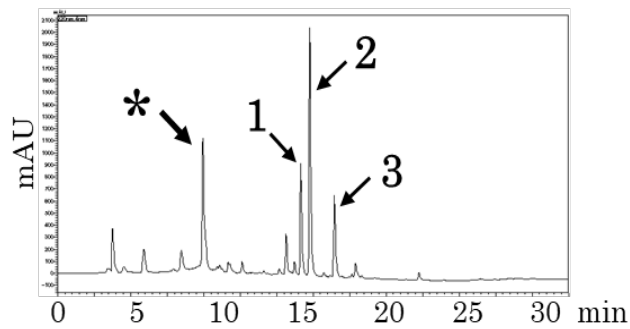
2. 学会発表

- 1) 吉成知也:紅麹配合食品における健康被害事例の原因探索. 第 49 回カビ毒研究連絡会 (2024.9)
- 2) 吉成知也:紅麹サプリメントによる健康被害の原因究明について. 令和 6 年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸支部衛生化学部会 (2025.2)

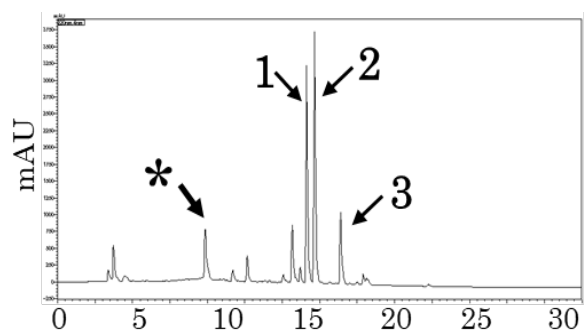
(A)



(B)



(C)



(D)

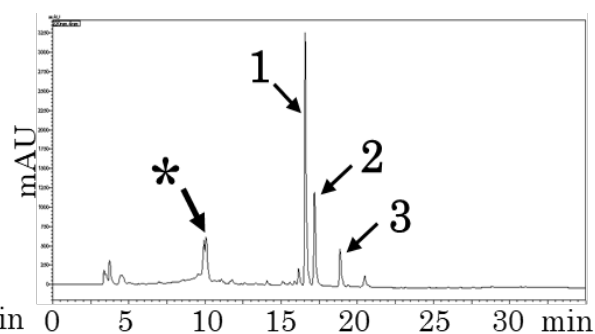


図 1 *Penicillium adametzioides* の米培地における代謝物の HPLC クロマトグラム (検出波長 220 nm)
(A) S2-10 株、(B) N08-12 株、(C) S05-22 株、(D) IFM68223

*: プベールル酸

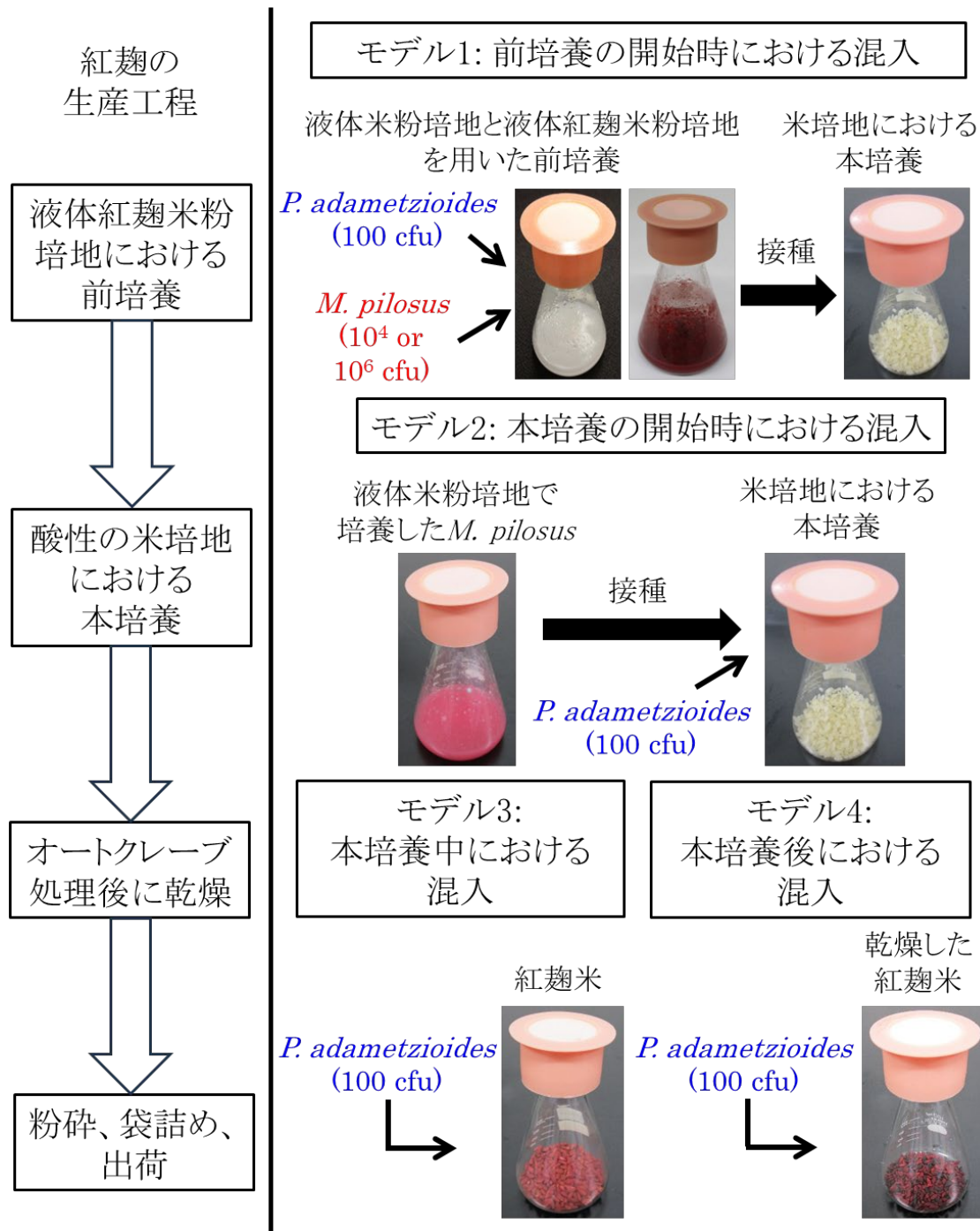


図2 紅麴の生産工程と各工程を反映した混入モデル

紅麴は、左側に示した工程で生産された。この工程を基に、*Penicillium adametzioides* の4パターンの汚染経路を想定し、*Monascus pilosus* との共培養試験を行った。モデル1は、前培養の開始時における汚染を想定したもので、*M. pilosus* と *P. adametzioides* の孢子懸濁液を液体米粉培地と液体紅麴米粉培地に添加した。その後、本培養に使用した米培地に接種した。モデル2は、本培養の開始時における汚染を想定したもので、液体米粉培地で培養した *M. pilosus* の培養液を、*P. adametzioides* の孢子懸濁液とともに米培地に接種した。モデル3及び4は、それぞれ本培養中及び本培養後における汚染を想定したもので、*P. adametzioides* の孢子懸濁液を未処理及びオートクレーブ処理後に乾燥処理を行った紅麴米にそれぞれ接種した。

Sample ID	I	II	III	IV	V
<i>P. adametzioides</i> (cfu)	100	0	100	0	100
<i>M. pilosus</i> (cfu)	0	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶

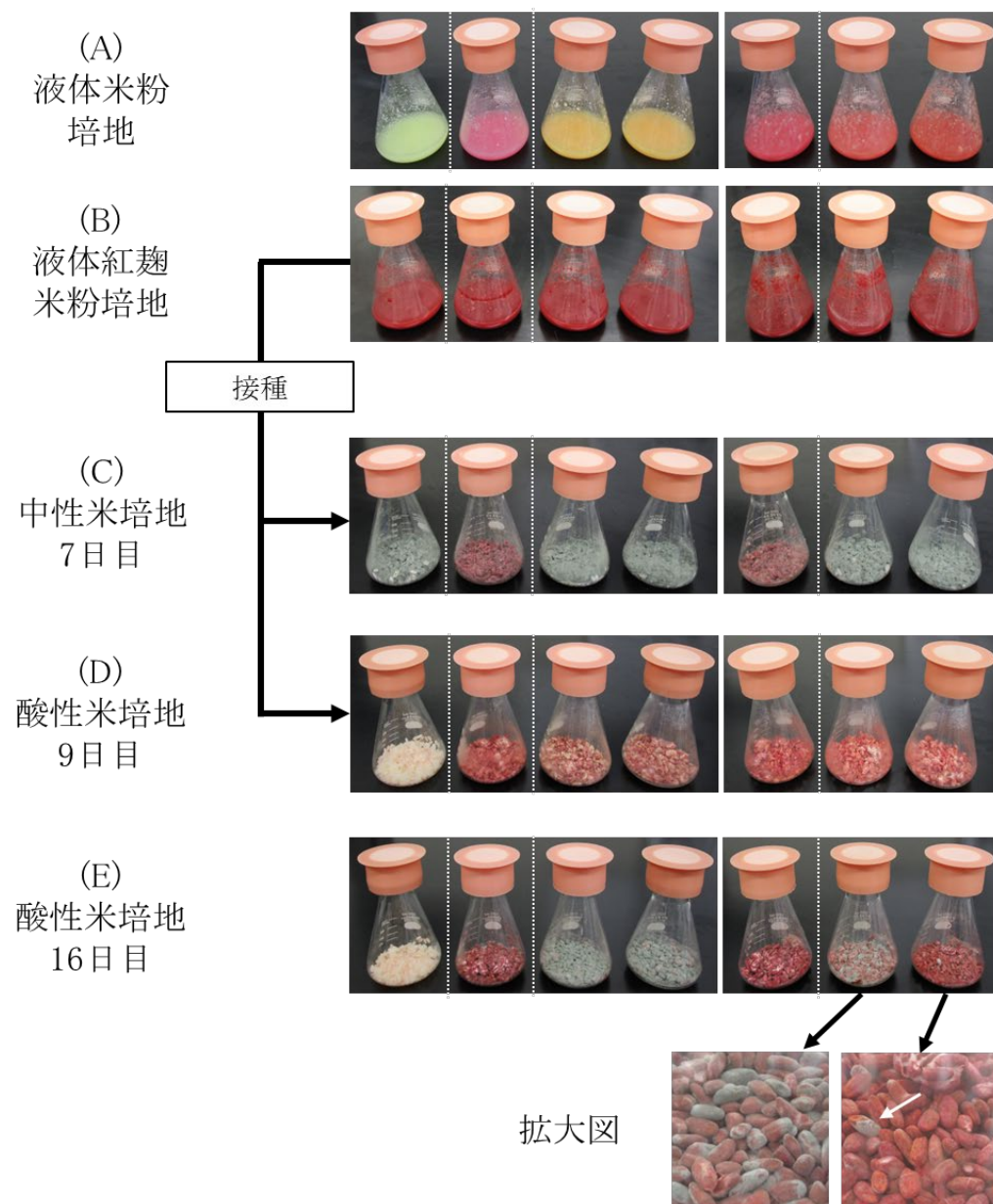


図3 共培養試験モデル1の結果

Monascus pilosus 及び *Penicillium adametzioides* の孢子懸濁液を、液体米粉培地(A)及び液体紅麴米粉培地(B)に添加した。各培地に添加した孢子懸濁液の cfu は上部の表に記載した。5 日間の培養後、培養液を観察した。サンプル ID III と V については、それぞれ 2 検体ずつ調製した。(C)液体紅麴米粉培地の各培養液を中性米培地に接種した。7 日間培養後、培地を観察した。(D)液体紅麴米粉培地の各培養液を酸性の米培地に接種した。9 日間培養後、培地を観察した。(E)酸性の米培地での培養を 16 日目まで続け、培地を観察した。緑色の孢子で部分的に覆われていた 2 つの検体の拡大図を示す。白い矢印は *P. adametzioides* で覆われた紅麴を示す。

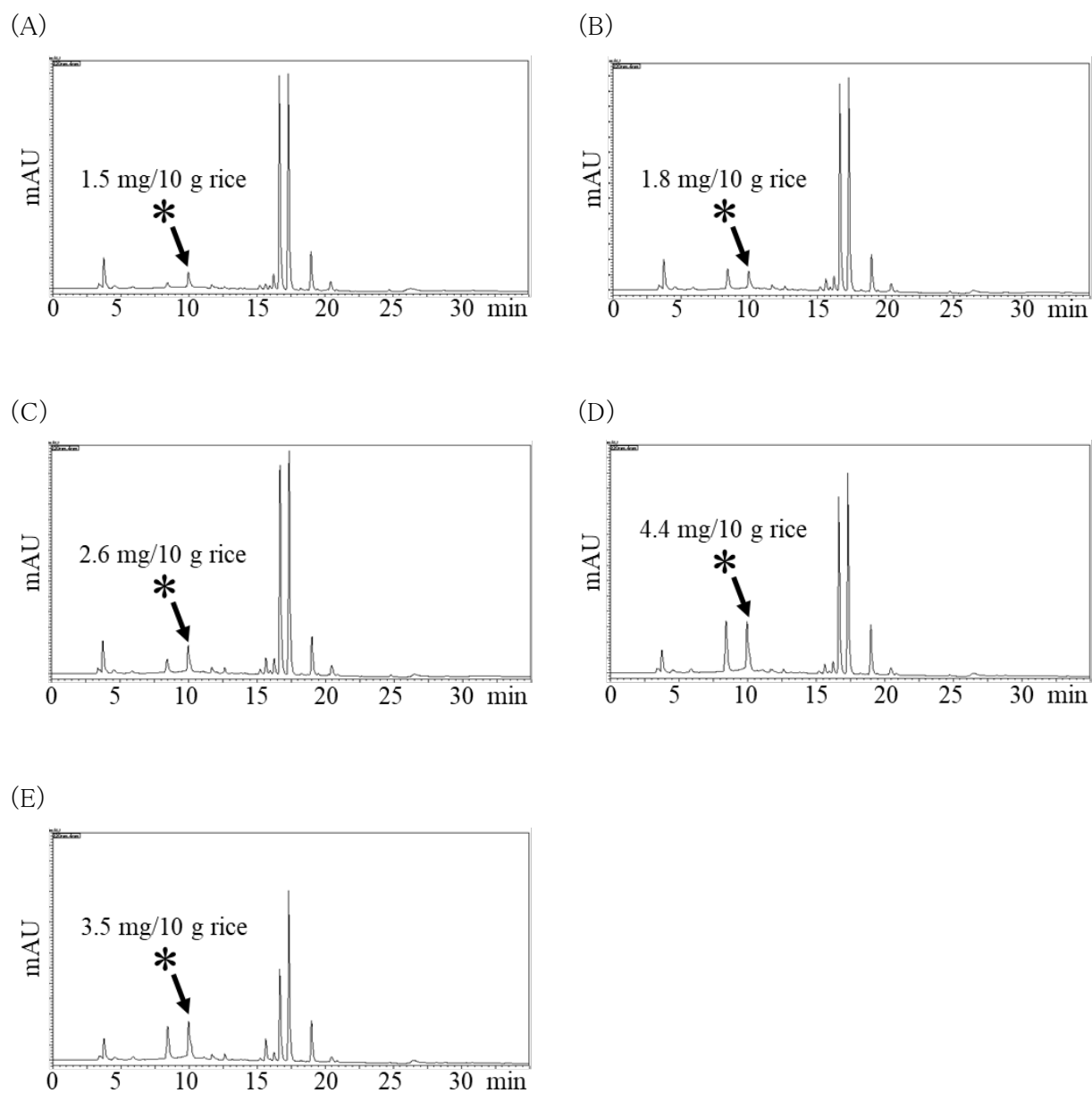


図4 共培養試験モデル1における中性米培地の培養物のHPLCクロマトグラム(検出波長 220 nm)

(A)図3C サンプル ID I、(B)図3C サンプル ID III 左、(C)図3C サンプル ID III 右、(D)図3C サンプル ID V 左、(E)図3C サンプル ID V 右

*: プベールル酸のピーク

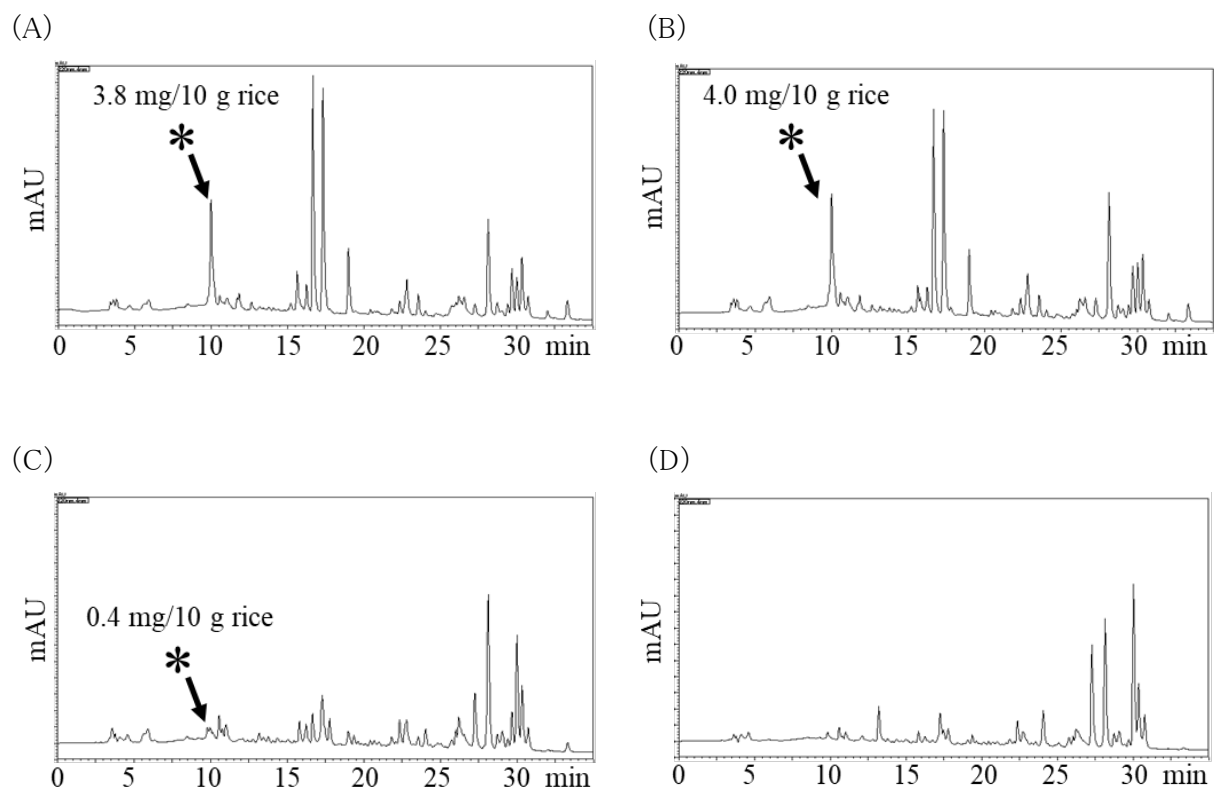


図5 共培養試験モデル1における酸性米培地の培養物のHPLCクロマトグラム(検出波長 220 nm)

(A)図3C サンプル ID III 左、(B)図3C サンプル ID III 右、(C)図3C サンプル ID V 左、(D)図3C サンプル ID V 右

*: プベルル酸のピーク((D)では検出されず。)

Sample ID	I	II	III	IV	V
<i>P. adametzioides</i> (cfu)	100	0	100	0	100
<i>M. pilosus</i> (cfu)	0	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶

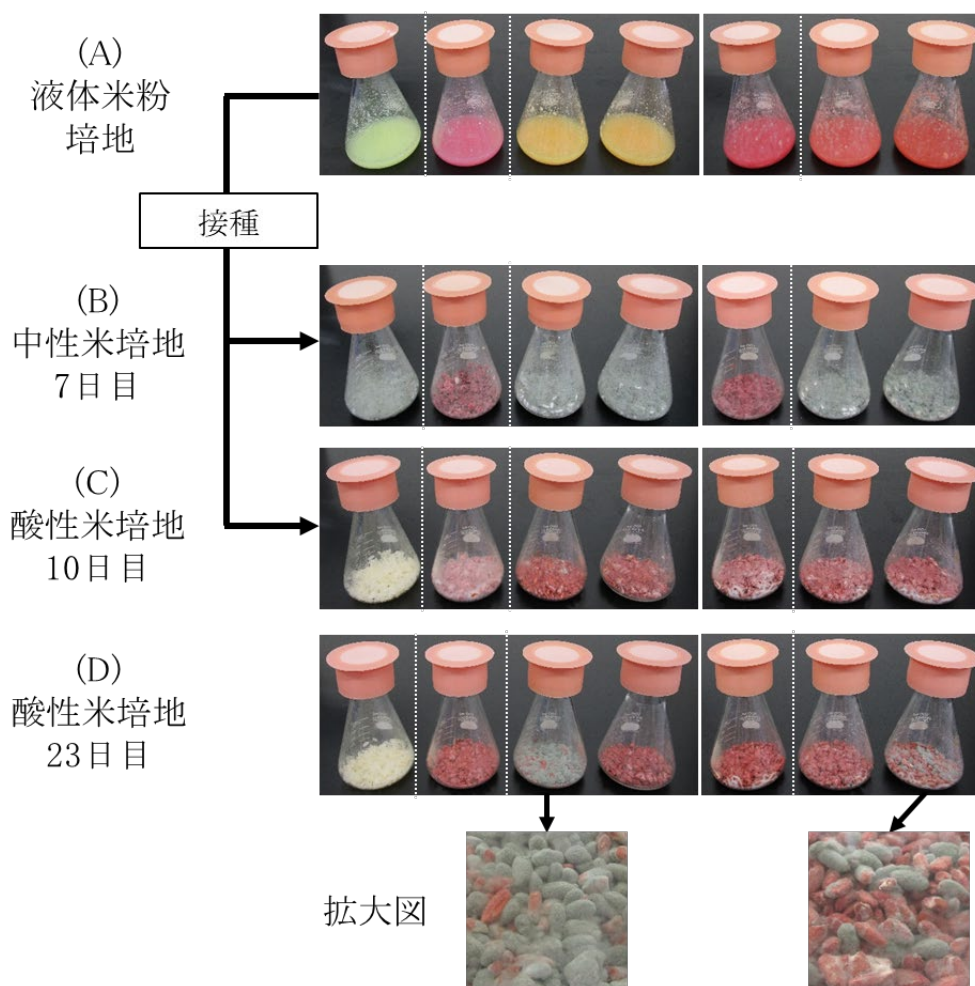


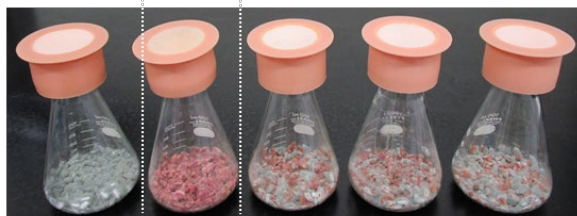
図6 共培養試験モデル1の結果(補足データ)

Monascus pilosus 及び *Penicillium adametzioides* の孢子懸濁液を液体米粉培地に添加した。各培地に添加した孢子懸濁液の cfu は上部の表に記載した。(A)5 日間の培養後、培養液を観察した。サンプル ID III と V については、それぞれ 2 検体ずつ調製した。(B) 各培養液を中性米培地に接種し、7 日間培養後、培地を観察した。(C) 各培養液を酸性米培地に接種し、10 日間培養後、培地を観察した。(D) 酸性米培地での培養を 23 日目まで続け、培地を観察した。緑色の孢子で部分的に覆われていた 2 つの検体の拡大図を示す。

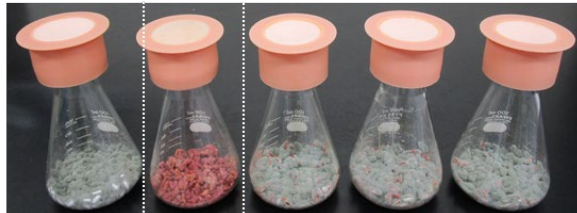
(A)

Sample ID	I	II	III
<i>P. adametzioides</i>	+	−	+
<i>M. pilosus</i>	−	+	+

7日目



14日目



(B)

Sample ID	I	II	III
<i>P. adametzioides</i>	+	−	+
<i>M. pilosus</i>	−	+	+

7日目



14日目

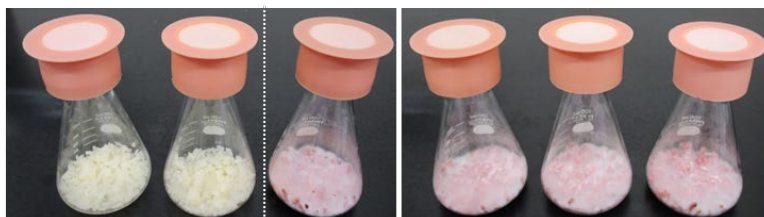


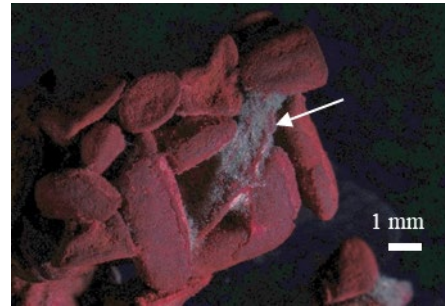
図7 共培養試験モデル2の結果

(A) *Penicillium adametzioides* の孢子懸濁液と *Monascus pilosus* の液体米粉培地における培養液を、上部の表に従って中性米培地に接種した。サンプル ID III については、3 検体調製した。7 日間及び 14 日間の培養後、培地を観察した。(B) *P. adametzioides* の孢子懸濁液と *M. pilosus* の液体米粉培地における培養液を、上部の表に従って、酸性米培地に接種した。サンプル ID I 及び III については、それぞれ 2 及び 3 サンプルを調製した。7 日間および 14 日間の培養後、培地を観察した。

(A)



(B)



(C)



(D)



図8 共培養試験モデル3及び4の結果

(A) 紅麴米に *Penicillium adametzioides* の胞子懸濁液を接種し、14 日間培養後、培地を観察した。
(B) 35 日間培養後、紅麴米に *P. adametzioides* の菌糸が付着した米粒が少量認められた。*P. adametzioides* の胞子懸濁液を、オートクレーブ処理後に乾燥させた紅麴米(C)と、オートクレーブ処理のみを行った紅麴米(D)に接種した。14 日間の培養後、培地を観察した。各実験は3連で行った。

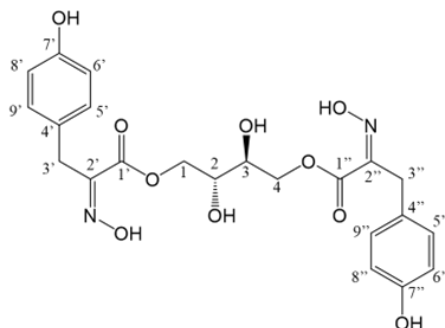
表 1 紅麹製造工場から分離された *Penicillium adametzioides* が
産生した代謝物の質量分析の結果

化合物名	Mass (<i>m/z</i>)		推定分子式
	測定値 / 理論値		
	ポジティブ モード	ネガティブ モード	
Aspergillusol A (1)	477.1499 / 477.1503	475.1357 / 475.1358	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₁₀
Lapatin A (2)	414.1553 / 414.1561	412.1414 / 412.1415	C ₂₃ H ₁₉ N ₅ O ₃
Glyantrypine (3)	345.1342 / 345.1346	343.1200 / 343.1200	C ₂₀ H ₁₆ N ₄ O ₂

表 2 Aspergillusol A (1)の NMR スペクトルの解析結果

Position ^a	δ_C^b	δ_H^b	(<i>J</i> in Hz)
1	66.7	4.12 4.31	dd (11.1, 5.7) d (10.8)
2	69.1	3.65	m
3	69.1	3.65	m
2-OH		5.15	brs
3-OH		5.15	brs
4	66.7	4.12 4.31	dd (11.1, 5.7) d (10.8)
1'	163.8		
2'	150.1		
2'=N-OH		12.36	s
3'	29.2	3.72	s
4'	126.5		
5'	129.7	7.02	d (8.4)
6'	115.2	6.64	d (8.4)
7'	155.8		
7'-OH		9.20	s
8'	115.2	6.64	d (8.4)
9'	129.7	7.02	d (8.4)
1''	163.8		
2''	150.1		
2''=N-OH		12.36	s
3''	29.2	3.72	s
4''	126.5		
5''	129.7	7.02	d (8.4)
6''	115.2	6.64	d (8.4)
7''	155.8		
7''-OH		9.20	s
8''	115.2	6.64	d (8.4)
9''	129.7	7.02	d (8.4)

^a炭素の位置は以下に示す。

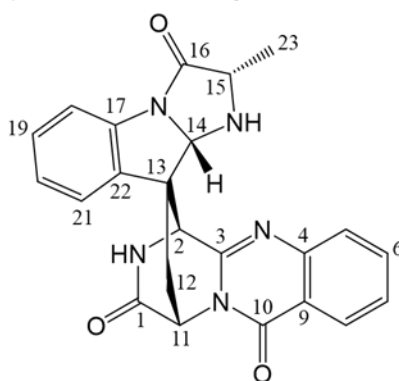


^bDMSO-*d*₆を用い、25 °C、600 MHz (¹H)/151 MHz (¹³C)で測定した。DMSO由来のシグナル (39.52 (¹³C)と2.50 (¹H) ppm)を用いてケミカルシフトを補正した。

表 3 Lapatin A (2)の NMR スペクトルの解析結果

Position ^a	δ_C^b	δ_H^b	(<i>J</i> in Hz)
1	170.2		
2	56.5	4.26	d (5.4)
3	152.7		
4	147.5		
5	127.3	7.71	d (8.4)
6	134.6	7.85	td (7.5, 1.5)
7	126.9	7.57	td (7.5, 1.5)
8	126.3	8.19	dd (8.4, 1.5)
9	120.4		
10	158.5		
11	53.1	5.49	m
12a	36.6	2.64	dd (14.7, 2.4)
12b		2.46	dd (14.7, 3.0)
13	51.3		
14	83.2	5.36	brs
15	59.0	4.02	m
16	170.6		
17	136.8		
18	114.3	7.47	d (7.5)
19	129.2	7.41	td (7.5, 1.2)
20	124.8	7.24	td (7.5, 1.2)
21	126.0	7.17	d (7.5)
22	137.9		
23	17.6	1.27	d (6.6)
1-NH		9.24	d (5.4)

^a炭素の位置は以下に示す。

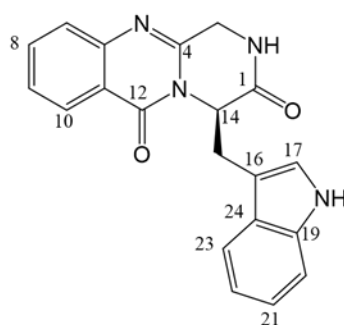


^bDMSO-*d*₆を用い、25 °C、600 MHz (¹H)/151 MHz (¹³C)で測定した。DMSO由来のシグナル (39.52 (¹³C)と2.50 (¹H) ppm)を用いてケミカルシフトを補正した。

表 4 Gylantrypine (3)の NMR スペクトルの解析結果

Position ^a	δ_C^b	δ_H^b	(<i>J</i> in Hz)
1	170.2		
2		6.59	brs
3	44.6	3.93 2.81	dd (16.8, 3.6) d (16.8)
4	149.1		
6	146.2		
7	126.4	7.58	brd (8.1)
8	135.6	7.81	td (8.1, 1.2)
9	127.8	7.57	td ^c
10	127.5	8.39	dd (8.1, 1.2)
11	120.3		
12	160.5		
13			
14	57.1	5.49	m
15	27.6	3.75 3.64	dd (15.0, 2.7) dd (15.0, 5.4)
16	109.2		
17	123.9	6.69	d (2.4)
18		8.21	brs
19	136.3		
20	111.7	7.31	d (7.7)
21	123.2	7.13	t (7.7)
22	120.6	6.92	t (7.7)
23	118.7	7.37	d (7.7)
24	127.4		

^a炭素の位置は以下に示す。



^bクロロホルム-*d*を用い、25 °C、600 MHz (¹H)/151 MHz (¹³C)で測定した。クロロホルム由来のシグナル (77.36 (¹³C)と7.26 (¹H) ppm)を用いてケミカルシフトを補正した。

^c他のシグナルと重なったため、カップリングの情報が得られなかった。

Ⅱ．分担研究年度終了報告書

(7) 紅麴製品に由来する化合物の発生機序の解明に関する研究

(7-2) 化合物 Y 及び化合物 Z の立体構造解明

研究分担者 伊藤 美千穂

令和6年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発のための研究

分担研究年度終了報告書

（7）紅麴製品に由来する化合物の発生機序の解明に関する研究 （7-2）化合物 Y 及び化合物 Z の立体構造解明

研究分担者 伊藤 美千穂 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

研究要旨

2024年3月下旬、紅麴を含む健康食品の摂取により健康被害が生じていることが、上記健康食品の製造元より公表され、国立衛研において健康被害の原因究明を実施した。その中で我々は、上記健康食品の原料を用いた網羅的分析を実施し、健康被害情報ありの製品原料に特徴的な3成分を見いだした。これら3成分のうち、化合物Y及び化合物Zについては、新規の天然化合物であることが判明し、その平面構造を2024年6月に公表した。しかし、上記健康食品中に含まれる化合物Y及び化合物Zの立体構造は明らかになっていなかったため、それらを突き止めるべく、UHPLC/HRMS、NMR法、スポンジ結晶法の三通りの分析法を利用し、様々な分析及び解析を実施した。Lovastatin acidから化学合成することで得た化合物Y合成物、化合物Z合成物について、NMR法及びスポンジ結晶法で分析を行った結果、それらの立体配置はlovastatin acidと同一であった。さらに、これらの合成物に加え、上記健康食品から単離精製して得られた化合物Y単離物、化合物Z単離物を用い、UHPLC/HRMS及びNMR法で分析した結果を単離物と合成物で比較した。その結果、化合物Y及び化合物Zについて、それぞれ単離物と合成物の立体構造が一致すると考えられ、健康被害情報ありの製品中に含まれた化合物Y及び化合物Zの構造が立体構造も含めて決定された。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

増本直子 田中誠司

A. 研究目的

2024年3月下旬、紅麴を含む健康食品の摂取により健康被害が生じていることが、上記健康食品の製造元より公表された¹⁾。健康被害の原因を究明するために、国立衛研では、当該健康食品の原料を用いて、複数の異なる原理の分析機器による網羅的分析を実施し、健康被害情報があるロットとそうでないロットを比較するなど様

々な調査を実施した。その結果、健康被害情報ありのロットからは、特徴的な3成分が見いだされた。厚生労働省は、これら3成分がそれぞれ図1に示すプベルル酸、化合物Y、化合物Zであることを2024年5月28日に公表した¹⁾。また、国立衛研では、この化合物Y及び化合物Zが新規の天然化合物であること及びその平面構造について、2024年6月4日に *Journal of Natural Medicines* 誌に公開した²⁾。上記の調査にて、化合物Y及び化合物Zは、共に lovastatin acid (モノコリン K (酸型)) の類縁体であることが判明したが、その立体構造は明らかになっていなかった。

本研究の目的は、UHPLC/HRMS、NMR 法、スポンジ結晶法の三通りの分析法を利用し、当該健康食品から検出された化合物 Y 及び化合物 Z の立体構造を明らかにすることである。

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

当該健康食品から単離精製した化合物 Y 及び化合物 Z を、それぞれ化合物 Y 単離物 (0.80 mg)、化合物 Z 単離物 (2.77 mg) として用いた。化合物 Y 合成物 (13.4 mg) 及び化合物 Z 合成物 (3.5 mg) は、アクセリード株式会社が化学合成したものを購入し用いた。Lovastatin 及び lovastatin acid は当該健康食品の製造元から入手した。重溶媒として用いた dimethyl sulfoxide- d_6 (DMSO- d_6) は、Acros Organics 社製の 100.00% D グレードのものを購入した。NMR 試料管は、対称形マイクロサンプルチューブ DMS-005J (Shigemi Co., Ltd.) 及び 535-PP-7 (Wilmad-LabGlass Co.) を用いた。0.1% (v/v) ギ酸-蒸留水、アセトニトリル、0.1% (v/v) ギ酸-アセトニトリルは関東化学製の LC/MS グレードをそれぞれ購入し用いた。メタノールは富士フイルム和光純薬製 LC/MS グレードのものをを用いた。水は Milli-Q Integral (Merck) で製したものをを用いた。

2. 機器

・UHPLC/HRMS

Q Exactive-Orbitrap MS 及び Dionex UltiMate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific)

・NMR

Ultra Cool CH probe 付き JNM-ECZ800

Ultra Cool HX probe 付き JNM-ECZL800

(日本電子)

3. UHPLC/HRMS 分析

3-1. 試験溶液の調製

化合物 Y 単離物、化合物 Y 合成物、化合物 Z 単離物、化合物 Z 合成物の全量をそれぞれ DMSO- d_6 400 μ L に溶解させ、試料原液とした。

各試料原液 100 μ L について、1.4 mL の 75% (v/v) メタノールで希釈したものを試料溶液とし、UHPLC/HRMS に供した。

3-2. UHPLC/HRMS 測定条件

1) UHPLC 条件

移動相 A: 0.1% (v/v) ギ酸-蒸留水,

移動相 B: 0.1% (v/v) ギ酸-アセトニトリル

グラジエント: B 20% (0 min) $\rightarrow$ B 100% (39 min)

カラム: ACQUITY UPLC HSS T3

(2.1 mm $\times$ 100 mm, 粒子径 1.8 μ m, Waters)

カラム温度: 40°C

オートサンプラー温度: 15°C

注入量: 2 μ L

流量: 0.3 mL/min

PDA 検出器データ採取範囲: 190-800 nm

2) HRMS 条件

イオン化: HESI (positive / negative)

Spray voltage: 3.5kV (+), 2.5kV (-)

Capillary temperature: 262.5°C (+), 256.25°C (-)

データ取得: scan 及び dd-MS

分解能: 70,000 (scan 時)、17,500 (dd-MS 時)

Scan range: 150-2000 m/z

解析ソフト: Xcalibur ver. 4.2 (Thermo Fisher Scientific)

4. NMR 分析

4-1. 試験溶液の調製

3-1 で調製した化合物 Y 単離物、化合物 Y 合成物、化合物 Z 単離物、化合物 Z 合成物の試料原液 250 μ L を NMR 試料管 (DMS-005J) に入れ試料溶液とした。また、lovastatin 及び lovastatin acid それぞれ 10 mg を DMSO- d_6 1 mL に溶解し、その 600 μ L を NMR 試料管 (535-PP-7) にとり、試料溶液とした。また、化合物 Z 単離物及び化合物 Z 合成物の試料溶液を、量比が単離物: 合成物 = 2:1 及び 1:5 の二通りになるよう混合し、化合物 Z 混合溶液を作製した。これらの試料溶液及び混合溶液を NMR 分析に供した。

4-2. NMR 測定条件

測定プログラム:¹H-NMR、¹³C-NMR

測定温度:25°C

解析ソフト:Delta ver. 6.3 (日本電子)、

Mnova ver. 15.0 (Mesetrelab Research)

4. NMR 分析

4-1. 試験溶液の調製

3-1 で調製した化合物 Y 単離物、化合物 Y 合成物、化合物 Z 単離物、化合物 Z 合成物の試料原液 250 μ L を NMR 試料管 (DMS-005J) に入れ試料溶液とした。また、lovastatin 及び lovastatin acid それぞれ 10 mg を DMSO-*d*₆ 1 mL に溶解し、その 600 μ L を NMR 試料管 (535-PP-7) にとり、試料溶液とした。また、化合物 Z 単離物及び化合物 Z 合成物の試料溶液を、量比が単離物:合成物=2:1 及び 1:5 の二通りになるよう混合し、化合物 Z 混合溶液を作製した。これらの試料溶液及び混合溶液を NMR 分析に供した。

4-2. NMR 測定条件

測定プログラム:¹H-NMR、¹³C-NMR

測定温度:25°C

解析ソフト:Delta ver. 6.3 (日本電子)、

Mnova ver. 15.0 (Mesetrelab Research)

5. スポンジ結晶法

テクモフ株式会社に依頼し、化合物 Y、Z 単離物及び化合物 Y、Z 合成物の 4 検体について、スポンジ結晶法を利用した X 線構造解析に供した。

C. 研究結果及び考察

1. 化合物 Y 及び Z の単離物と合成物の比較

当該健康食品から単離精製された化合物 Y 及び Z の立体構造を明らかにするため、lovastatin acid を元に化学合成した化合物 Y 及び Z の合成物入手し、UHPLC/HRMS 及び NMR を用いて分析結果を比較した。

1-1. UHPLC/HRMS

化合物 Y 単離物及び化合物 Y 合成物の試料溶液を分析した結果、どちらも約 28 分で溶出された (図 2)。また、その MS スペクトル及び MS/MS スペクトルを比較したところ、すべて一致した (図 3)。同様に化合物 Z 単離物及び化合物 Z 合成物についても分析を行った。その結果、どちらの試料溶液からも、保持時間 20 分に同じ MS スペクトル及び MS/MS スペクトルを持ったピークが得られた (図 4、図 5)。UHPLC/HRMS の結果から、化合物 Y、Z についてその単離物と混合物の平面構造は一致していると考えられた。非常に高い分離能をもつ UHPLC では、立体構造が一部異なるジアステレオマーの化合物については、保持時間がわずかに異なって溶出することが多い。そのため、立体構造についても、単離物と合成物は同じである可能性が高いと推測された。しかし UHPLC であっても、分析対象の構造、カラムの担体及び分離条件によっては、ジアステレオマーの化合物が同じ保持時間で溶出する可能性がある。そこで、次項に示す NMR 分析を実施した。

1-2. NMR 分析

化合物 Y 単離物及び化合物 Y 合成物、化合物 Z 単離物及び化合物 Z 合成物、lovastatin、lovastatin acid について ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR を行い、それぞれ表 1 及び表 2 の結果を得た。単離物と合成物の結果を比較したところ、化合物 Y、Z ともにほとんどのシグナルについて化学シフトが一致したが、¹H-NMR では 5' 位、¹³C-NMR では 5' 位、6' 位のシグナルについて、単離物と合成物で化学シフトが大きく異なった。合成物の 5' 位、6' 位のシグナルは、lovastatin acid のそれと近い値であったことから、合成物の立体配置は lovastatin acid と同一である可能性が高いと考えられた。一方で、単離物の 5' 位、6' 位のシグナルは化学シフトが大きく異なっていたことから、4' 位の不斉炭素に関する立体配置が単離物と合

成物では反対である可能性が考えられた(図 1)。

2. 化合物 Z 混合溶液の NMR 分析

前項での NMR 分析により、化合物 Y 及び Z の単離物と合成物の立体構造は、それぞれジアステレオマーの関係である可能性が生じた。ジアステレオマー同士の試料溶液を混合して NMR を測定した場合、立体配置の違いから生じた異なる化学シフトのシグナルについて、混合溶液からは両方のシグナルが得られる可能性が高い(図 6)。

そこで、二通りの混合比率で作成した化合物 Z 混合溶液の ^1H -NMR を行った。得られた ^1H -NMR スペクトル及びその一部についての拡大図を図 7-1-7-3 に示す。混合物の測定の結果、単離物と合成物でわずかに化学シフトが異なっていた 4' 位、1' 位、3' 位のシグナルで、これらのシグナルが 2 本ずつ観測されるのではなく、単離物とも合成物とも異なる位置にシグナルが観測された。また、二通りの混合比率の結果を比較すると、単離物と合成物の混合比率により、シグナルがシフトする値が異なっていた。図 6 に示すような結果は得られなかったことから、化合物 Z 単離物と化合物 Z 合成物の立体配置は一致している可能性が高いと考えられた。5' 位、6' 位の化学シフトの相違に関しては、単離物に含まれる不純物等が影響したものと考えられた。

化合物 Y についてはサンプルの量が少なく、混合溶液の NMR 分析を行うことはできなかった。しかし、化合物 Y と化合物 Z では 5' 位、6' 位のシグナルの化学シフトについて、同様の傾向を示していた(表 1、表 2)。そのため、化合物 Y についても化合物 Z と同じく、lovastatin acid と同一の立体構造であると考えられた。

3. スポンジ結晶法

化合物 Y、Z 合成物について、スポンジ結晶法による X 線構造解析を実施した結果、全ての立体配置が lovastatin acid の立体配置と一致した

(図 8)。化合物 Y、Z 単離物についても同様の手順で解析を試みたが、立体構造の特定には至らなかった。単離物は合成物よりも量が少なく、また、不純物が多く含まれるため、本手法での構造解析が困難だったものと推測された。

D. 結論

本研究課題では、三つの手法での分析を行い、当該健康食品から検出された化合物 Y 及び化合物 Z の立体構造を明らかにした。NMR 及びスポンジ結晶法により、化合物 Y、Z 合成物の立体配置が lovastatin acid と一致することを確認した。また、UHPLC/HRMS 及び NMR により、単離物と合成物の立体配置が同一であると推定された。化合物 Y 及び化合物 Z は、紅麹と *Penicillium adametzioides* が同一環境にいたことで共培養により産生されたものと考えられている¹⁾。紅麹中の lovastatin や lovastatin acid が出発原料となり、化合物 Y 及び Z が生合成されたと推定すると、これらの立体構造が lovastatin acid と同じであることは妥当と考えられる。本研究の結果と生物的背景から総合的に考え、新規化合物 Y、Z は図 9 に示す構造であると決定した。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省 健康被害情報:「いわゆる健康食品」による健康被害事例 (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/daietto/index.html). Accessed March 24, 2025
- 2) Tanaka, S., Masumoto, N., Makino, T., Matsushima, Y., Morikawa, T., Ito, M.. Novel compounds isolated from health food products containing beni-koji (red yeast rice) with adverse event reports. *J Nat Med*, 78, 845-848 (2024)

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Tanaka, S., Masumoto, N., Makino, T.,

Matsushima, Y., Morikawa, T., Ito, M..
Novel compounds isolated from health food
products containing beni-koji (red yeast rice)
with adverse event reports. *J Nat Med*, 78,
845-848 (2024)

2. 学会発表等

- 1) 伊藤美千穂：紅麹関連製品に係る事案の
原因究明の取り組み状況について. 第67回
日本腎臓学会学術総会 (2024.6)
- 2) 伊藤美千穂：紅麹を含む健康食品の健康
被害事案原因究明チームのひとりとして働き
ました. 国立衛研・島津製作所 第4回技術
交流会 (2024.12)
- 3) 伊藤美千穂：紅麹を含む機能性表示食品
による事故の調査経緯について. 日本薬学
会第145年会 (2025.3)

表 1 それぞれの化合物の ^1H -NMR における各シグナルの情報 (δ in ppm, J in Hz)^a

Assignment	化合物Y 単離物	化合物Y 合成物	化合物Z 単離物	化合物Z 合成物	Lovastatin	Lovastatin acid
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
CH (1)	5.21 (1H, q, 3.2)	5.21 (1H, q, 3.2)	4.03 (1H, q, 3.2)	4.03 (1H, q, 3.2)	5.23 (1H, q, 3.3)	5.19 (1H, q, 3.2)
CH ₂ (2)	1.80 (1H, m)	1.81 (1H, dd, 14.7, 3.9)	1.70 (1H, m)	1.74 (2H, m)	1.83 (1H, dd, 15.0, 3.6)	1.84 (1H, dd, 14.9, 3.8)
	1.94 (1H ^b)	1.94 (1H, m)	1.74 (1H, m)		1.94 (1H, ddd, 14.8, 8.1, 2.4)	1.94 (1H ^c)
CH (3)	2.37 (1H, m)	2.39 (1H, m)	2.29 (1H, m)	2.29 (1H, m)	2.40 (1H, m)	2.40 (1H ^c)
CH (4)	5.48 (1H, t, 3.7)	5.49 (1H, t, 3.5)	5.38 (1H, t, 3.4)	5.39 (1H, t, 3.5)	5.50 (1H, t, 3.5)	5.48 (1H, t, 3.3)
C (4a)						
CH (5)	5.94 (1H, d, 9.7)	5.94 (1H, d, 9.7)	5.87 (1H, d, 9.6)	5.88 (1H, d, 9.7)	5.95 (1H, d, 9.6)	5.93 (1H, d, 9.7)
CH (6)	5.77 (1H, dd, 9.7, 6.0)	5.77 (1H, dd, 9.6, 6.1)	5.71 (1H, dd, 9.6, 6.0)	5.71 (1H, dd, 9.6, 6.0)	5.78 (1H, dd, 9.7, 6.0)	5.77 (1H, dd, 9.7, 5.8)
CH (7)	2.30 (1H, m)	2.31 (1H, m)	2.25 (1H, m)	2.26 (1H, m)	2.34 (1H, m)	2.32 (1H ^c)
CH (8)	1.52 (1H, m)	1.54 (1H, m)	1.68 (1H, m)	1.68 (1H, m)	1.60 (1H, m)	1.57 (1H ^c)
CH (8a)	2.24 (1H ^b)	2.26 (1H ^b)	1.94 (1H ^b)	1.94 (1H ^b)	2.31 (1H, m)	2.24 (1H, m)
CH ₂ (9)	1.10 (2H, m)	1.11 (1H, m)	1.01 (2H, m)	1.01 (2H, m)	1.27 (1H, m)	1.25 (2H ^c)
		1.32 (1H, m)			1.37 (1H, m)	
CH ₂ (10)	1.27 (1H, m)	1.27 (1H, m)	1.40 (1H, m)	1.40 (1H, m)	1.26 (1H, m)	1.38 (1H ^c)
	1.57 (1H, m)	1.59 (1H, m)	1.56 (1H, m)	1.58 (1H, m)	1.74 (1H ^b)	1.08 (1H, m)
CH ₃ (11)	1.01 (3H, d, 7.3)	1.01 (3H, d, 8.0)	1.13 (3H, d, 7.3)	1.13 (3H, d, 7.4)	1.02 (3H, d, 7.0)	1.01 (3H ^c)
CH ₃ (12)	0.80 (3H, d, 7.0)	0.82 (3H, d, 7.0)	0.79 (3H, d, 7.0)	0.79 (3H, d, 7.0)	0.85 (3H, d, 7.0)	0.83 (3H ^c)
CH (2')	4.76 (1H, m)	4.76 (1H, m)	4.81 (1H, m)	4.81 (1H, m)	4.47 (1H, m)	3.46 (1H, tt, 8.2, 4.3)
CH ₂ (3')	1.80 (2H, m)	1.76 (1H, m)	1.82 (2H, m)	1.86 (2H, m)	1.62 (1H, m)	1.39 (1H ^c)
		1.87 (1H, m)			1.76 (1H, dtd, 14.0, 3.6, 2.0)	1.49 (1H, m)
CH (4')	5.06 (1H, m)	5.08 (1H, m)	5.09 (1H, m)	5.10 (1H, m)	4.10 (1H, sext, 3.6)	3.95 (1H, m)
CH ₂ (5')	3.51 (2H, m)	2.47 (1H, dd, 16.0, 7.4)	3.50 (2H, m)	2.48 (1H, overlapped)	2.38 (1H, m)	2.19 (1H, dd, 14.9, 8.1)
		2.53 (1H, dd, 16.3, 5.5)		2.55 (1H, dd, 16.1, 5.4)	2.61 (1H, dd, 17.3, 4.5)	2.33 (1H ^c)
C (6')						
OH (6'a)	8.43 (brs)		8.39 (brs)			8.14 (brs)
C (1'')						
CH (2'')	2.25 (1H, m)	2.27 (1H, m)			2.30 (1H, m)	2.28 (1H ^c)
	1.38 (1H, ddd, 13.9, 8.2, 6.3)	1.37 (1H, m)			1.39 (1H, m)	1.55 (1H ^c)
CH ₂ (3'')	1.52 (1H, m)	1.53 (1H, m)			1.56 (1H, dt, 13.4, 7.4)	1.38 (1H ^c)
CH ₃ (4'')	0.80 (3H, t, 7.3)	0.81 (3H, t, 7.5)			0.83 (3H, t, 7.3)	0.82 (3H ^c)
CH ₃ (5'')	1.01 (3H, d, 6.9)	1.02 (3H, d, 7.0)			1.02 (3H, d, 6.8)	1.02 (3H ^c)
CH ₃ (1''')	1.96 (3H, s)	1.97 (3H, s)	1.98 (3H, s)	1.99 (3H, s)		
C (2''')						
CH ₃ (3''')	1.92 (3H, s)	1.95 (3H, s)	1.94 (3H, s)	1.96 (3H, s)		
C (4''')						

^a Recorded in 800 MHz (^1H) in DMSO- d_6 at 25 °C. Chemical shift scales were referenced to the DMSO signals in the deuterated solvent at 2.50 ppm.

^b Coupling information overlapped with another signal derived from itself was not described.

^c Coupling information for the signals of lovastatin acid overlapped with signals derived from lovastatin was not described. The spectra of the lovastatin acid reagent used in this study contained signals derived from lovastatin as minor signals.

表 2 それぞれの化合物の ^{13}C -NMR における各シグナルの情報 (δ in ppm)^a

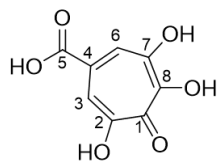
Assignment	化合物Y 単離物	化合物Y 合成物	化合物Z 単離物	化合物Z 合成物	Lovastatin	Lovastatin acid
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
CH (1)	67.4	67.3	62.8	62.9	67.5	67.5
CH ₂ (2)	32	32.0	35.7	35.68	31.8	31.9
CH (3)	26.9	26.9	27.6	27.6	26.9	26.9
CH (4)	129.2	129.2	129.3	129.4	129.0	129.2
C (4a)	131.5	131.4	131.9	131.8	131.8	131.5
CH (5)	128.2	128.2	128.9	128.9	128.2	128.2
CH (6)	133.1	133.0	132.6	132.6	133.3	133.0
CH (7)	30	30.0	30.2	30.1	30.2	30.1
CH (8)	36	36.0	35.3	35.3	36.5	36.0
CH (8a)	36.4	36.4	37.9	37.9	36.3	36.4
CH ₂ (9)	22.6	22.6	23.0	23.1	24.2	23.6
CH ₂ (10)	30.4	30.5	30.7	30.8	34.4	32.4
CH ₃ (11)	22.6	22.6	23.1	23	22.5	22.6
CH ₃ (12)	13.6	13.5	13.8	13.8	13.6	13.6

CH (2')	71.0	70.7	71.2	71.0	68.7	75.8
CH ₂ (3')	37.6	37.4	37.9	37.8	44.5	35.3
CH (4')	69.2	67.8	68.9	67.9	65.9	61.2
CH ₂ (5')	69.8	38.5	69.8	38.6	42.5	38.5
C (6')	165.3	171.3	165.3	171.4	173.0	170.2

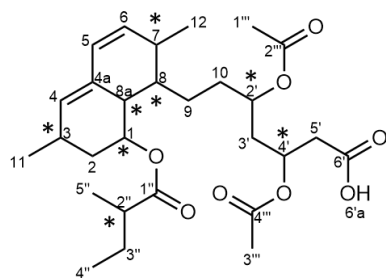
OH (6'a)						
C (1'')	175.4	175.4			175.5	175.5
CH (2'')	40.7	40.8			40.7	40.7
CH ₂ (3'')	26.4	26.3			26.3	26.3
CH ₃ (4'')	11.3	11.3			11.3	11.3
CH ₃ (5'')	15.9	16.0			16.0	16.0

CH ₃ (1''')	20.9	20.8	21.0	20.9		
C (2''')	169.8	169.9	170.0	170.1		
CH ₃ (3''')	21	20.8	21.0	21.0		
C (4''')	169.6	169.5	169.7	169.6		

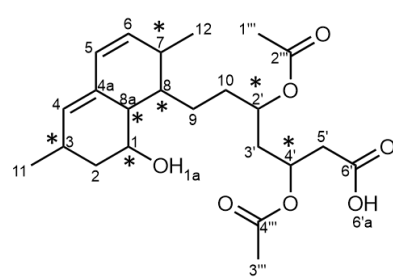
^a Recorded in 201 MHz (^{13}C) in DMSO- d_6 at 25 °C. Chemical shift scales were referenced to the DMSO signals in the deuterated solvent at 39.52 ppm.



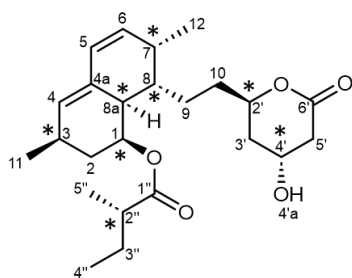
プベールル酸



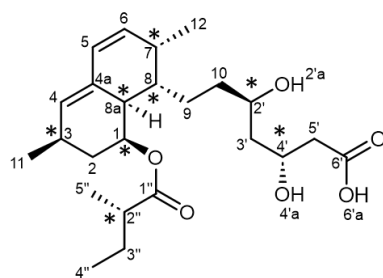
化合物Y



化合物Z



Lovastatin



Lovastatin acid

図 1 各化合物の構造式
*は不斉中心を示す

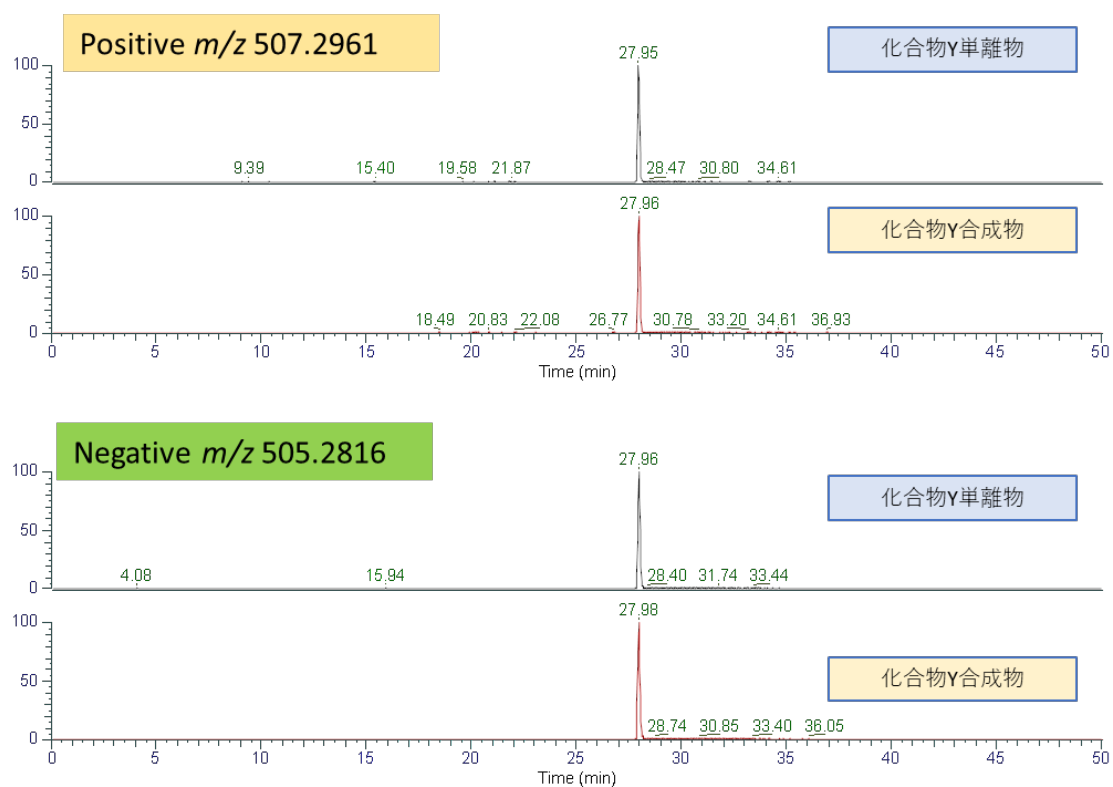


図 2 化合物 Y の UHPLC/HRMS クロマトグラム

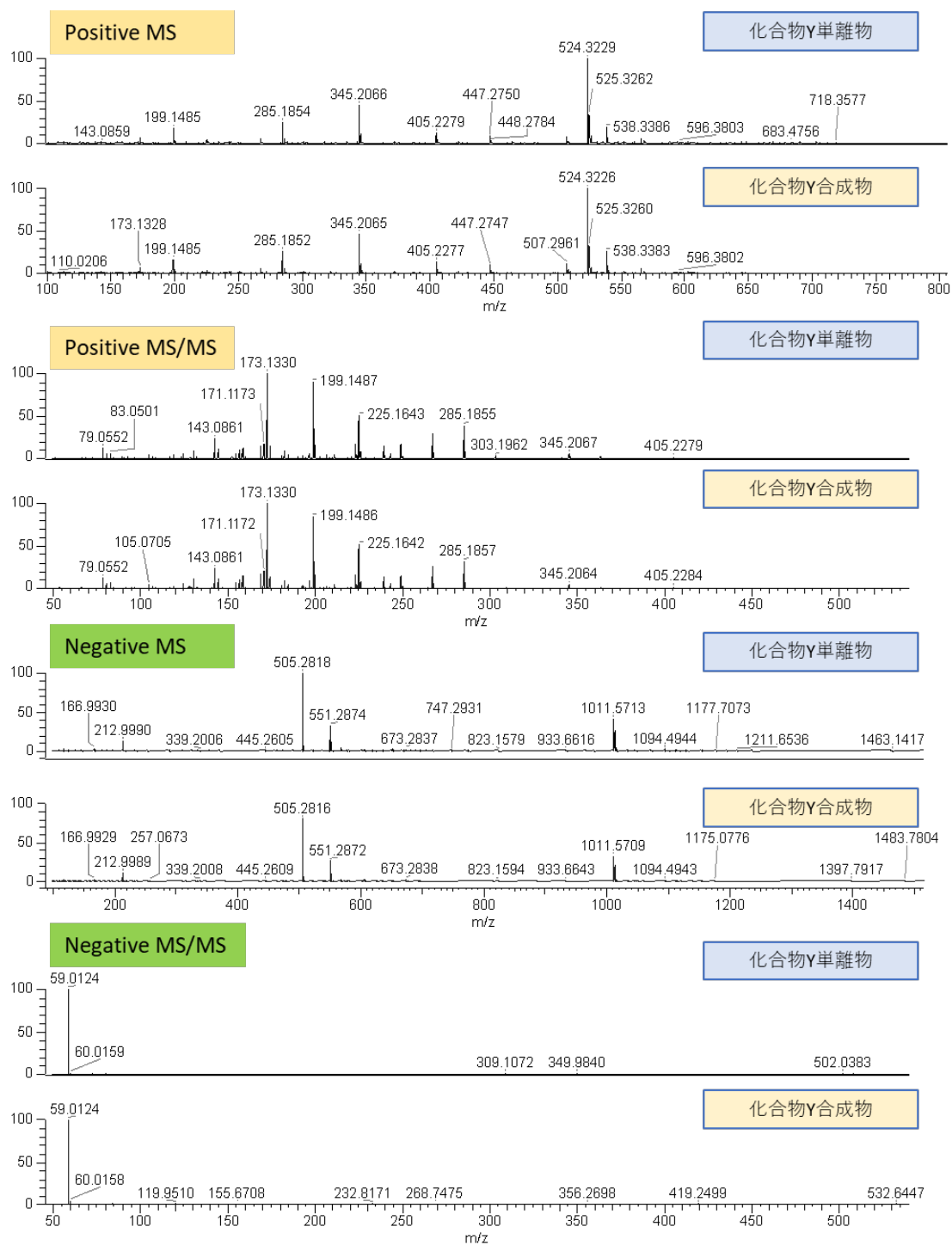


図 3 化合物 Y の MS 及び MS/MS スペクトル

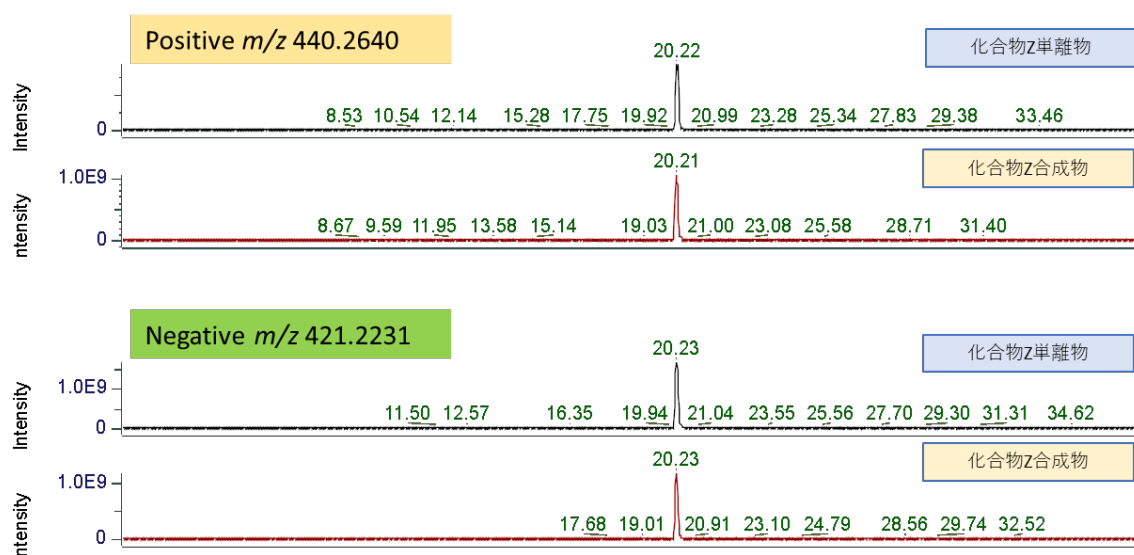


図 4 化合物 Z の UHPLC/HRMS クロマトグラム

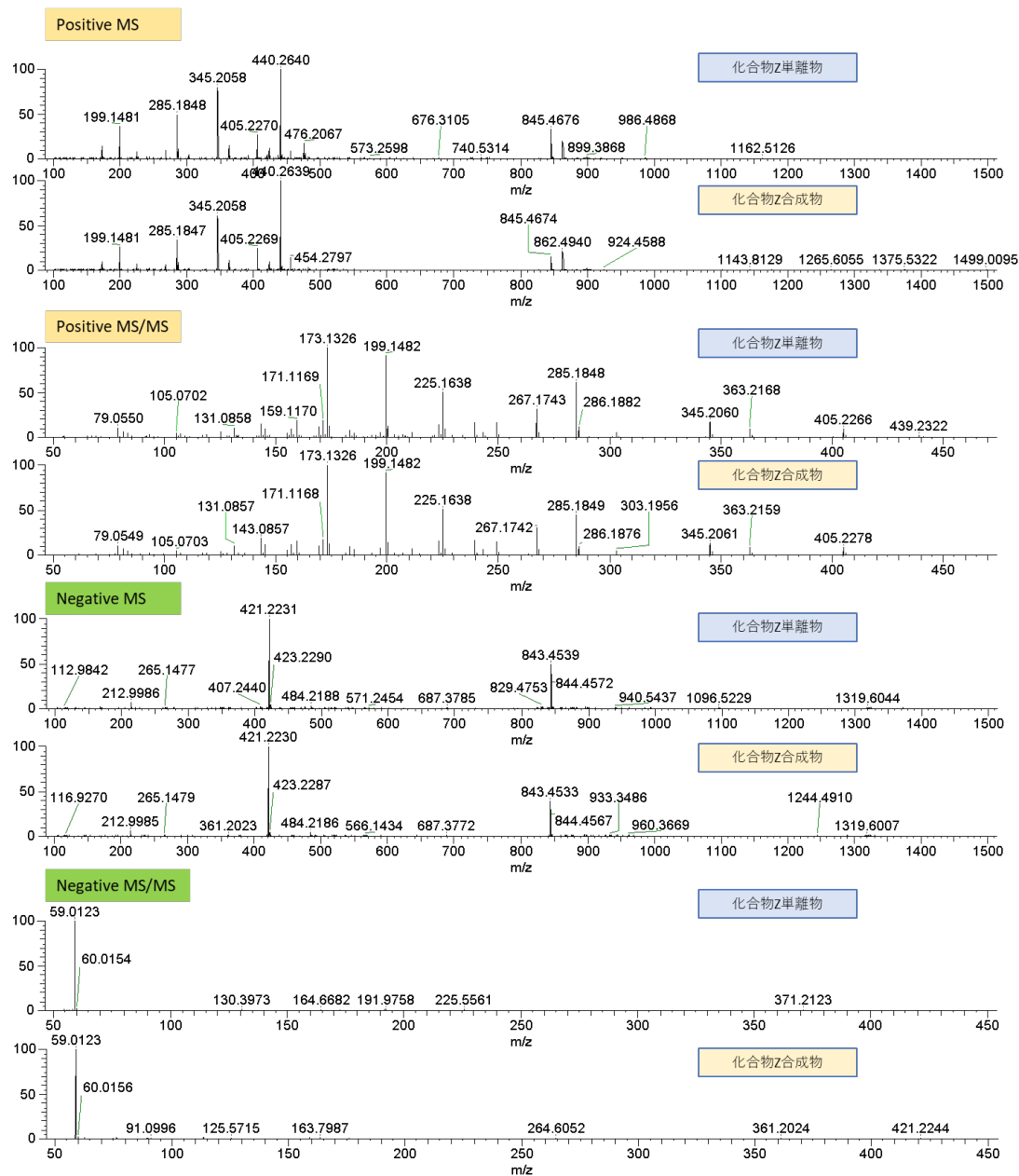


図 5 化合物 Z の MS 及び MS/MS スペクトル

立体構造が異なる2つの化合物を
混合した場合
NMRスペクトルは以下の様に変化する
可能性が高い

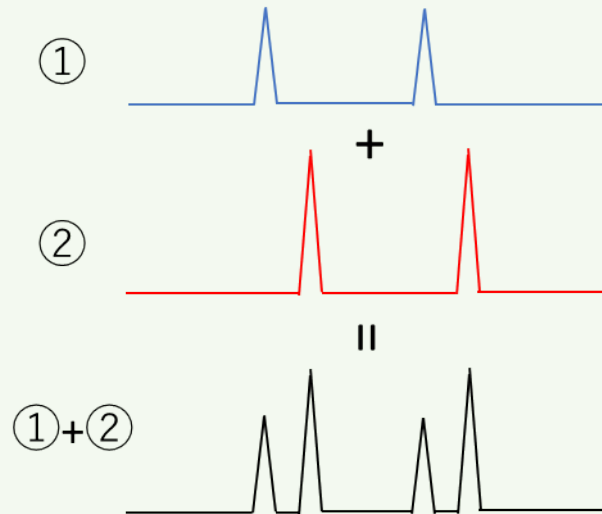


図 6 ジアステレオマーを混合した溶液についての NMR 分析の予測図

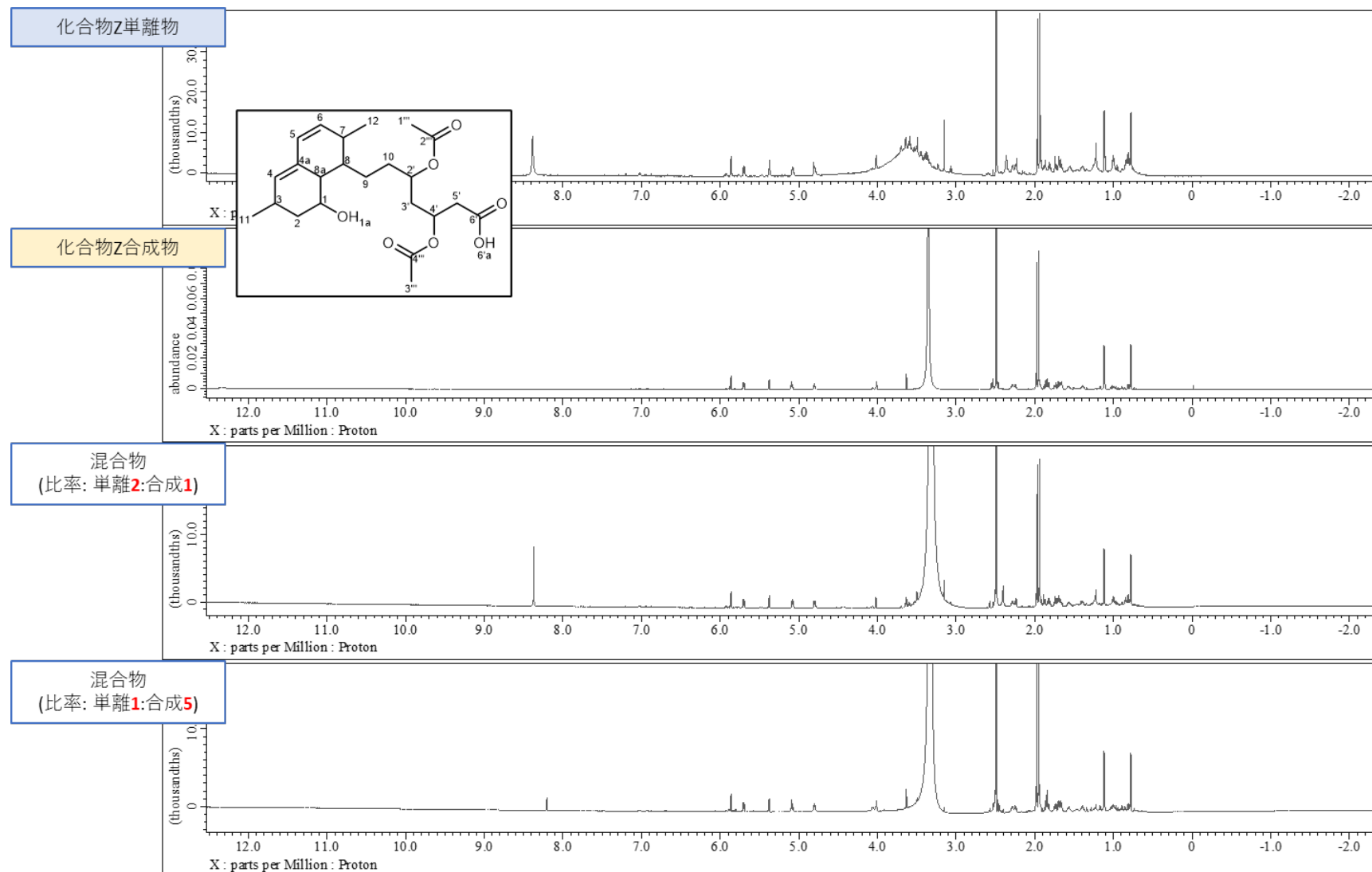


図 7-1 化合物 Z 混合溶液の ^1H -NMR 測定結果

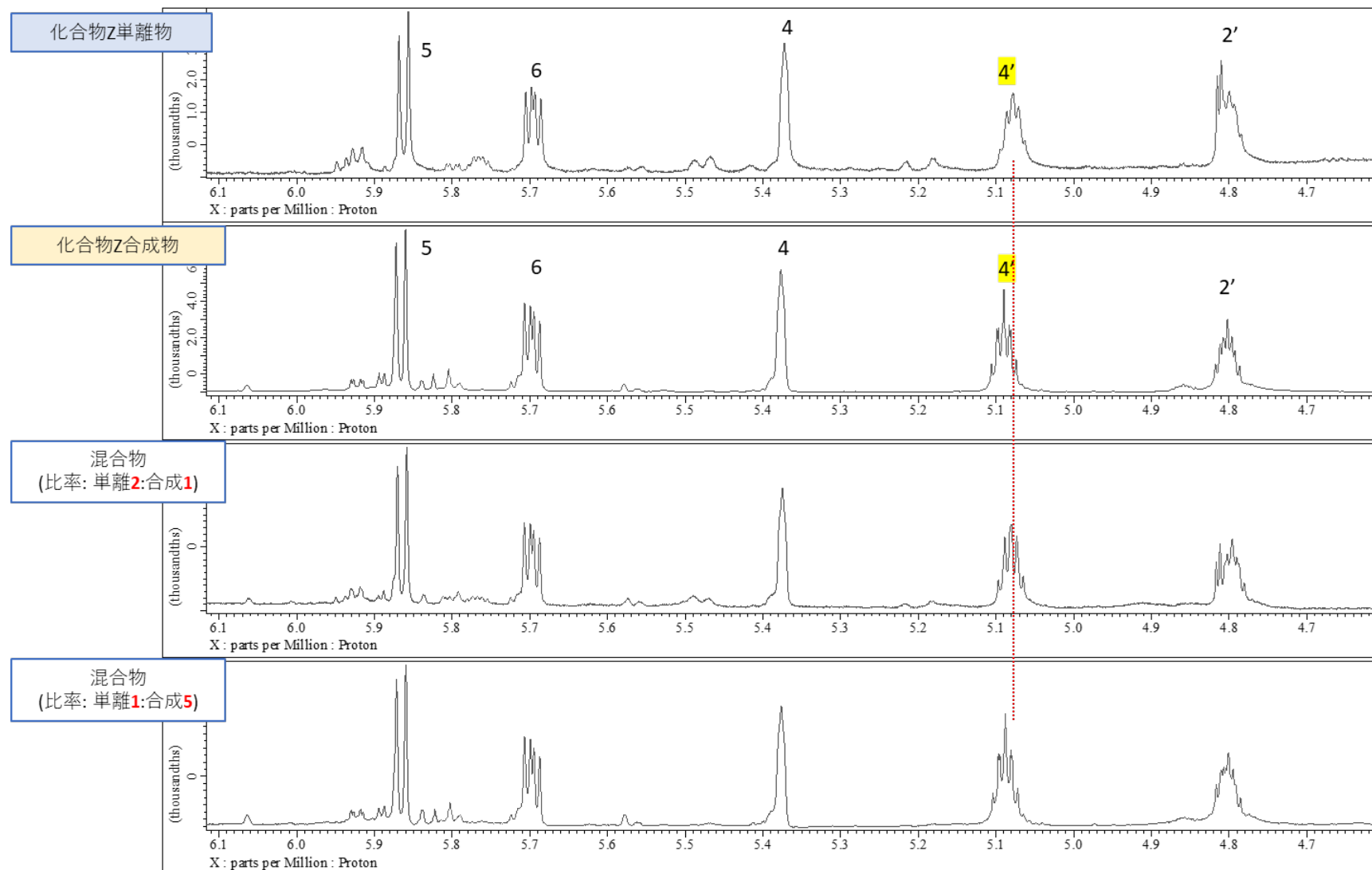


図 7-2 化合物 Z 混合溶液の ^1H -NMR 測定結果 (拡大図 4.6 ppm-6.1 ppm)

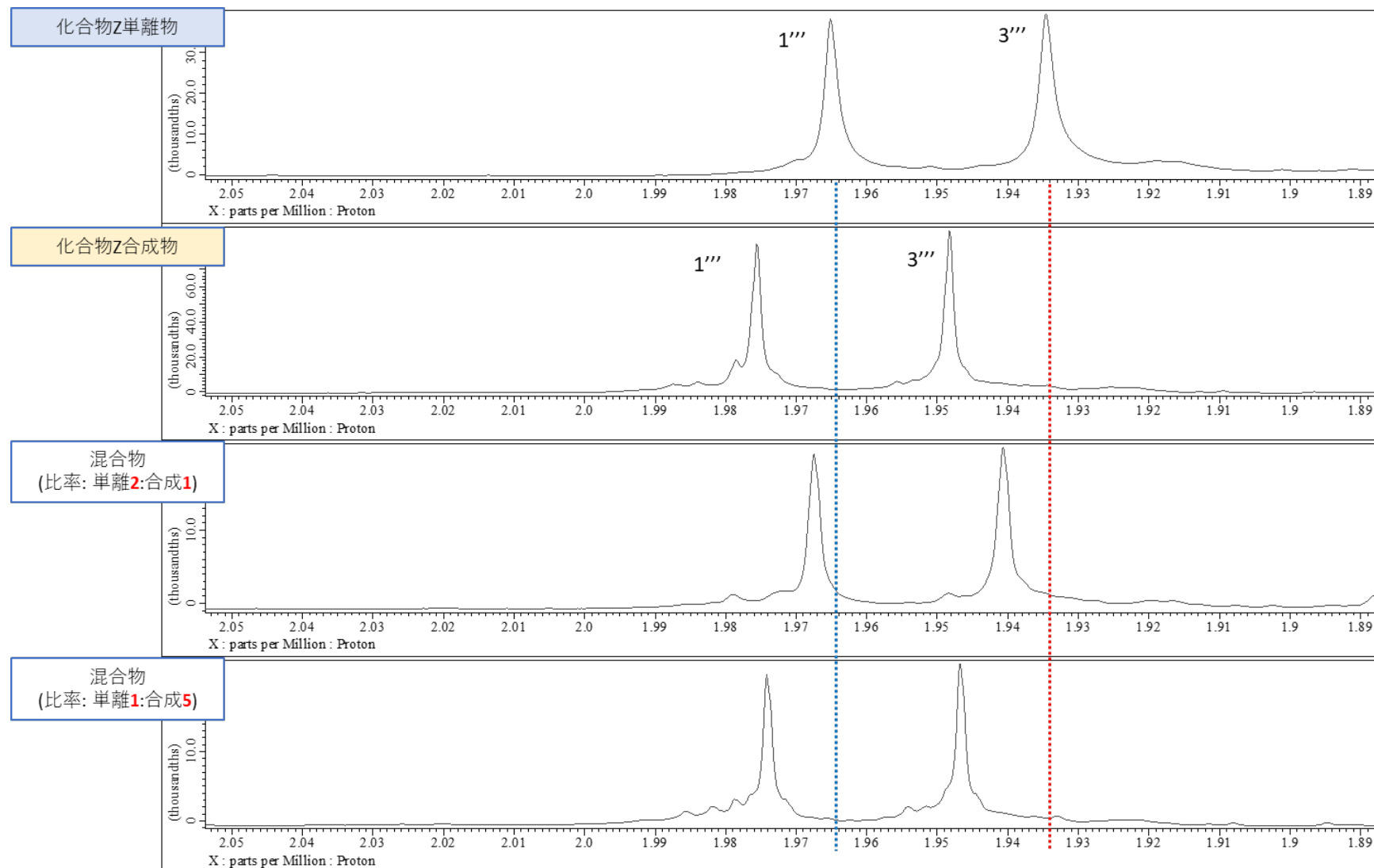
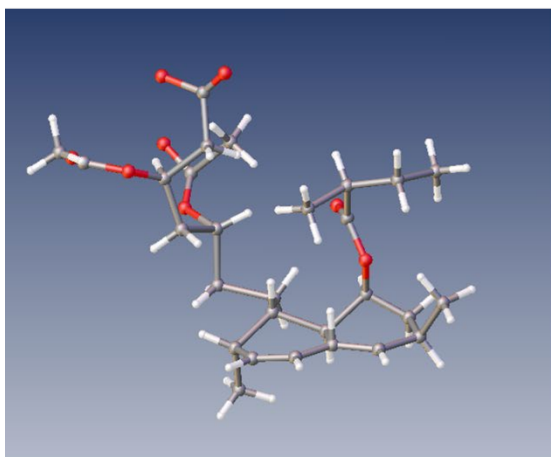
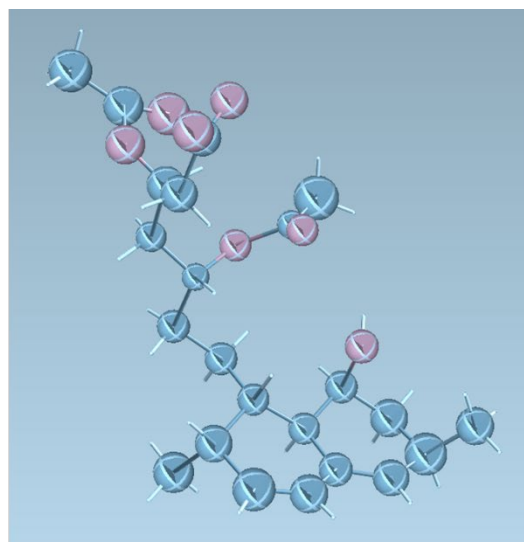


図 7-3 化合物 Z 混合溶液の ^1H -NMR 測定結果 (拡大図 1.9 ppm-2.1 ppm)

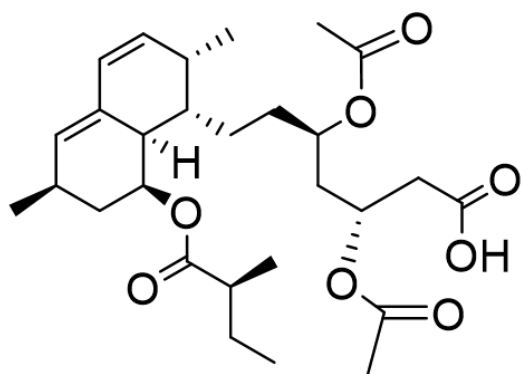


化合物Y合成物

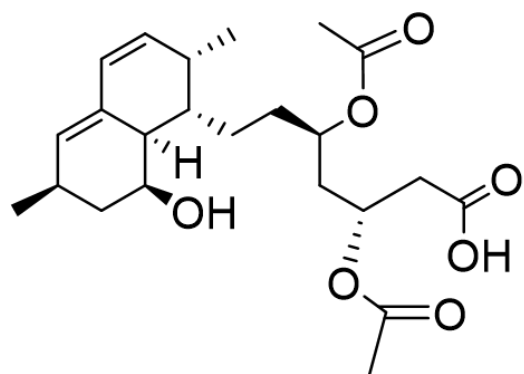


化合物Z合成物

図 8 化合物 Y 合成物及び化合物 Z 合成物のスポンジ結晶法による測定結果



化合物Y



化合物Z

図 9 決定した化合物 Y 及び化合物 Z の構造式