

氏名	付子棟
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第930号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	スギヒラタケ( <i>Pleurocybella porrigens</i> )の有害成分に関する研究
論文審査委員(主査)	太田 富久(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副主査)	御影 雅幸(自然科学研究科・教授), 垣内 信子(自然科学研究科・助教授), 塚本 佐知子(自然科学研究科・助教授), 寺沢なお子(教育学部・助教授)

スギヒラタケ(*Pleurocybella porrigens*)はキシメジ科に分類される一属一種のキノコであり、北半球温帯以北に分布する。子実体は材上生のヒラタケ型であり、多くは白色でときに肌色を帯び、はじめほぼ円形であるがしだいに成長して耳形～扇形あるいはへら形になる。秋に針葉樹、特にスギの古い切り株・倒木などに多数重なり合って生える。マツなどにも発生するが、スギ林の中では類似の危なそうなキノコもなく、初心者でも安心して採取できることから、東北や日本海域の山で得られる野生の可食キノコの中では最も愛されてきたものの一つである。

2004年秋、東北・日本海域で、主として腎障害を持つ人がスギヒラタケを食べて脳症を起こす例が多発し、大きな社会事件となった。脳症はスギヒラタケを摂食後数日してから発症することや、内臓への直接的な障害は起こさないことから食中毒(キノコ中毒)とは認定されていない。2004年中に「スギヒラタケ関連脳症」患者は59名が発症し、死亡者は19名に上った。遡った調査では2003年と1997年にそれぞれ1件、同様の脳症の発症例があったが、このような脳症の集中的な発生は前例がなく、病因も臨床像も明確ではないことから治療法も確立していない。これまでにスギヒラタケによって中毒を起こした症例が知られていなかったことや、本種から毒性に関連する成分が見出されたとする研究報告例はないことから、その原因は不明のままであった。そこで、本研究において2004年に中毒例がある秋田、宮城及び石川県内で採取されたスギヒラタケについて、熱水抽出エキスを作製し、この急性毒性についてマウスを用い評価を行った。

#### 【実験・結果】

スギヒラタケの400g(湿重量)に精製水1,000mLを加え90℃あるいは100℃にセットしたオートクレーブで30分間加熱して抽出を行った。抽出終了後に、それぞれの煎液を綿栓濾過して残渣を除いた後に凍結乾燥し、抽出温度条件の異なるそれぞれの濃縮エキスを得た。なお90℃の温度条件で得られたエキス重量は3.22gであり(暗灰色の粉末)、100℃では2.87gであった(暗灰色の粉末)。

4℃における水を用い、湿重量400gのスギヒラタケから水抽出エキスが平均4g得られた。エキス(7g)を初めに透析して3gの高分子画分と0.2gの低分子画分を得た。高分子画分(3g)をSephadex G-100を用いるゲル濾過クロマトグラフィーによって分画し、Fr.1(32.0mg)、Fr.2(702.7mg)、Fr.3(976.8mg)及びFr.4(214.0mg)の4フラクションを得た。細胞毒性が最も高かったFr.2をFr.2をさらに排出限界30kDaの限外濾過法によって分画し、Fr.5(638.8mg)及びFr.6(63.9mg)を得た。Caco-2細胞に対する毒性評価を行った結果、細胞毒性はFr.5に偏り、Fr.6は毒性を示さなかった。したがって、細胞毒性は分子量3万以上(>30kDa)の成分であることが分かった。電気泳動による分析結果、37kDaに明確なバンドが確認された。

これらの方法に従って作製した2種類のスギヒラタケ熱水抽出エキスについて、100～10,000mg/kgの用量になるように用時、無菌の生理食塩水に溶解し(0.1ml/10g体重)、1日1回、7日間かそれ以上にわたってマウスに腹腔内投与あるいは経口投与した。

スギヒラタケを熱水抽出したエキスを正常マウスに投与し、行動、致死、血液、肝臓および腎への影響を観察して毒性評価を試みた。その結果、90℃抽出のエキスを投与(1,000mg/kg)した

C57BL/6N マウスでは 24 時間以内に 70%以上が死亡した。さらにこの致死毒性には用量依存性が認められ、500 mg/kg の用量では死亡するマウスはなかった。

行動所見では、90℃抽出のエキスを腹腔内に投与すると、マウスは直ちに腹部のよじり運動を起し、30 分を経過するころより行動が顕著に鈍化した。時間の経過とともに垂涎、流涙、立毛が起き、6-10 時間後には昏睡のまま死にいたるのが観察された。なお、痙攣や振戦などのヒトにおける中毒で認められた症状は誘発しなかった。剖検の結果、消化管内出血を認めないが死亡したマウスの 90%に腹腔滲出液の増加、肝鬱滞、消化管虚血の所見が認められた。

スギヒラタケを 100℃で熱して抽出したエキスは、90℃抽出のエキスと同じ用量(1,000 mg/kg)を投与しても C57BL/6N マウスに対してまったく致命的な毒性を示さなかった。

低用量の投与によっては、致死を誘発しない一過性の弱い毒性が認められた。すなわち、スギヒラタケエキスの 100と 500 mg/kg/day は、一週間の連日投与でも致死を誘導しないが、投与開始の翌日から約 15%の体重減少が起こった。しかし、これらは投与日数が進むに従って穏やかに増加し、7 日後には投与時の体重にまで回復した。なお投与時に起こす立毛や行動のショックによる行動鈍化といった一般症状も、投与回数が増えるに従って誘発されなくなった。本種のエキスによって致死が誘発したマウスでは、ショック症状のほかにも赤血球とヘマトクリット値、さらにこれに伴うヘモグロビン含量が有意に低下していることが判明した。

毒性成分の探索における *in vivo* 毒性を指標とする目的で、小腸膜モデルとして使われている Caco-2 細胞に対する細胞障害性の有無を検討した。その結果、水抽出エキスの高分子画分に細胞毒性が認められ、ゲル濾過クロマトグラフィーと限外濾過法による精製を行うことにより、分子量 37kDa のタンパク性成分を含むフラクションを得た。このフラクションは、血液中の単球系を活性化させることに基づく非特異的な免疫反応の誘導を示している。

#### 【考察】

スギヒラタケによる急性致死の主因は溶血とショックであり、腎障害が関与した可能性は少ないと考えられる。しかし、著しい溶血や血栓は、腎障害や尿毒症性の脳症にも密接に関連していると考えられる。本研究結果、スギヒラタケの熱水濃縮エキスに由来する、マウスの急性のショック、溶血および致死を誘発する毒性は抽出する温度条件によって無毒化されることも明らかとなった。

低用量の投与によっては、致死を誘発しない一過性の弱い毒性が認められた。すなわち、低用量の投与は一週間の連日投与でも致死を誘導しないが、投与開始の翌日から約 15%の体重減少が起こり、これらは投与日数が進むに従って穏やかに増加し、7 日後には投与時の体重にまで回復した。投与時に起こす立毛や行動のショックによる行動鈍化といった一般症状も、投与回数が増えるに従って誘発されなくなった。なぜこのような現象が誘発されるのかについては明らかではないが、何らかの毒性耐性が誘導されたためであると考えられる。

本種のエキスによって致死が誘発したマウスでは、ショック症状のほかにも赤血球とヘマトクリット値、さらにこれに伴うヘモグロビン含量が有意に低下していることが判明した。このことは 90℃で抽出したスギヒラタケエキスが貧血を誘発させることを示唆する。血中の BUN、CR、AST、ALT などの血液検査の結果から判断すると、スギヒラタケエキスを投与されたマウスでは溶血が起こり、これによって急性の貧血が発症した可能性が高いと考えられる。

一方、毒性成分の探索における *in vivo* 毒性を指標とする目的で、小腸膜モデルとして使われている Caco-2 細胞に対する細胞障害性の有無を検討した。その結果、水抽出エキスの高分子画分に細胞毒性が認められ、ゲル濾過クロマトグラフィーと限外濾過法による精製を行うことにより、分子量 37kDa のタンパク性成分を含むフラクションを得た。このフラクションは、血液中の単球系を活性化させることに基づく非特異的な免疫反応の誘導を示している。ヒトにおいて高分子量の糖タンパクは抗原にはなりうるが、脳症の病変部位まで到達することは考えられない。しかし、毒成分の一部は糖タンパクあるいはタンパク多糖体で、これらあるいは消化物が直接、あるいは抗原として「脳症」の発症に関与していることが考えられる。

本研究において明らかにされた、スギヒラタケに由来する有害作用を示す糖タンパク成分について、スギヒラタケ脳症との関連性に関するさらなる探索研究が期待される。

## 学位論文審査結果の要旨

本研究はスギヒラタケ関連脳症の原因物質解明を目的として、脳症に関連する可能性があると考えられる有害成分の探索結果をまとめたものである。

スギヒラタケ関連脳症はスギヒラタケを摂取後数日してから発症することや、内臓への直接的な障害は起こさず、病因も臨床像も明確でないまま治療法も確立されていない。

ウィルスや炎症に起因する脳炎と異なり、脳症の原因は一般的に血液あるいは血管細胞の障害に起因することから、本研究においてはスギヒラタケの水抽出エキスをマウスに投与し、行動、致死、血液、肝臓および腎への影響を観察して毒性評価を行った。その結果、スギヒラタケの水エキスが溶血とショックを伴う致死を誘発することを見いだした。さらに、マウスに急性のショック、溶血および致死を誘発する毒性は、スギヒラタケの抽出温度条件によって無毒化されることも明らかにした。水抽出エキスの毒性成分として分子量 30 kDa 以上のタンパク性高分子成分の存在が SDS-PAGE による分析で認められたことから、毒性成分の探索を Caco-2 細胞に対する細胞障害性を指標として行い、37 kDa のタンパク性成分を得た。このような高分子成分は脳組織まで到達するとは考えられないが、血管障害を引き起こして、あるいは抗原として脳症の発症に関与していると考えられる。

以上の結果は病因が不明確なスギヒラタケ関連脳症の治療法確立へ示唆を与えるものであり、医療における薬学的研究の寄与を示すものとして本研究の意義は大きく、博士(薬学)に相当すると判断する。