

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590848

研究課題名(和文) スギヒラタケ中青酸産生メカニズムと急性脳症発症との因果関係について

研究課題名(英文) Study of the mechanism of acute encephalopathy caused by cyanogenic mushroom

研究代表者

権守 邦夫 (Gonmori, Kunio)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：10006744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：平成16年秋の原因不明急性脳症では患者が55名に達し17名が死亡した。スギヒラタケの関与が疑われ、研究代表者らはスギヒラタケ中に青酸が含有されていること。スギヒラタケ中青酸濃度に年による変動があることなどを明らかにした。そして青酸が急性脳症の発症に関与していることを推定し、その発症メカニズムについて検討してきた。平成23年から3年間、同一地点できのこを採取したが天候不順により平成24年以外はきのこの発生が十分でなく、スギヒラタケ中の青酸濃度を測定することは困難であった。天然の材料を用いた研究は、天候などの環境により影響を受けるためスギヒラタケを人工栽培することを試みた。

研究成果の概要(英文)：In autumn 2004, 59 cases of acute encephalopathy were reported across 9 prefectures in Japan. We concluded that encephalopathy experienced caused by was the cyanogenic mushroom, Pleurocybella porrigens. We study the mechanism of the acute encephalopathy by cyanogenic mushroom, Pleurocybella porrigens. For three years from 2011, we collect the mushrooms at a same point. But the occurrence of mushroom is not enough except 2012 by unseasonable weather. It is difficult to study with natural materials is affected by the environment such as weather. We tried to artificial cultivation the Pleurocybella porrigens.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：きのこ中毒 急性脳症 青酸 スギヒラタケ 培養

## 1. 研究開始当初の背景

2004年秋、秋田県、山形県、新潟県を中心とした日本海側の地方で、原因不明の急性脳症患者が発生した。これら3県の患者数は55名で、そのうち死亡者は19名と高い致死率であった。当初、感染症の疑いと報告されたが疫学的調査の結果否定されることになった。多くの患者が共通で摂取しているものとしてスギヒラタケが疑われることになり厚生労働省は食用としないように警告した。ところがスギヒラタケは発生地点に間違いやすい毒きのこがないため、東北地方では昔から食用きのことしてもっとも一般的に食べられていたきのこの一つで、多くの人々を不安に陥れることになった。

## 2. 研究の目的

我々は先の科学研究費による研究でスギヒラタケに青酸が含有されることを明らかにしてきたが、スギヒラタケ中で青酸が産生するメカニズムについては明らかになっていないため、従来よりも高感度な測定方法のイオンクロマトグラフィを用いて青酸産生メカニズムを明らかにしようとした。また、青酸の代謝酵素のロダナーゼ量を健常者と透析患者とで比較し、急性脳症の原因がスギヒラタケ中の青酸であることを証明することを研究の目的とした。研究の後半では研究材料としてのスギヒラタケが気候の変動を受け安定的に採取できないために栽培方法について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1)きのこの採取

秋田県内の急性脳症発症患者が採取した地点を中心とした山林にてスギヒラタケを採取した。平成23年、平成24年、平成25年に同一地域に入山しスギヒラタケを採取した。当初、採取地点を他県を含めて計画していたが、初めて入った地点でのスギヒラタケの採取は困難であるため秋田県内の同一

地点のスギヒラタケに絞ることにした。

### (2)スギヒラタケ中青酸濃度の比較

スギヒラタケ中の青酸濃度は、各種環境変化により変動することが考えられる。実際に同一採取年であっても、採取地やきのこ個体により青酸濃度に差が観察されている。そのため、多数の原因不明急性脳症が発生した2004年とその後のスギヒラタケ中青酸濃度を比較する目的で同一採取地での採取を毎年行った。それらについてガスクロマトグラフィで分析を行った。

分析方法は

ガスクロマトグラフ：HP-6890

カラム：Supel-Q PLOT (30 m x 0.53 mm)、

温度：カラム 50 (1分) (10 /分) -

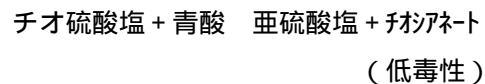
120 (6分) 注入口：200、検出器：250、

キャリアーガス：He 3.6 ml/min、検出器：

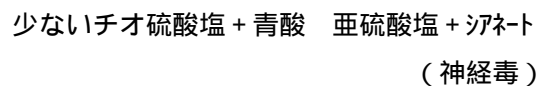
NPD

### (3)チオシアネート、シアネートの測定

体内に摂取された微量の青酸は生理的状態では



しかし、基質となるチオ硫酸塩は生体内で硫黄を含むアミノ酸から合成されるため、腎不全患者のような動物性タンパク質の摂取が少ない場合などはチオ硫酸塩が不足し、



となり、神経毒のシアネートが原因となり急性脳症を発症したものと考えられる。そのため、血清中チオシアネート、シアネートの測定を試みた。人工透析患者および健常者の血清について検査を行った。

リン酸緩衝液中でチオ硫酸ナトリウム、青酸カリウム、血清を混合し、30 で約 20 分

間反応させ、ホルムアルデヒドで反応を停止。ミリQ水で希釈後、イオンクロマトグラフィで測定した。30 で反応させる前にホルムアルデヒドを加えたものを対照として考察した。

イオンクロマトグラフ：日本ダイオネクス  
カラム：IonPac ICE-AS1(9 x 250mm)

溶離液：10mM 硫酸 流量：1.0 mL/min

サプレッサー：AMMS-ICEII ポストカラム駅  
0.5M NaOH 検出器：電気化学検出器(ED40)

#### (4)スギヒラタケの人工栽培について

きのこのような天然の材料を用いた研究は、天候やその他の環境による影響を受けるため研究材料を集めることは容易ではない。実際に3年間の研究期間で実際にスギヒラタケが採取できたのは1年だけであった。そのため本研究材料のスギヒラタケを人工栽培することが可能かどうか検討を始めた。この検討は京都市立芸術大学の辻山駒子博士に協力していただき行われた。これまで人工栽培は試みられてきたが、栽培法は確立されていない。そこで採取した菌糸について希釈平板法により単孢子分離を行った。試験用菌株を作成し培地に移し菌糸の増殖を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1)スギヒラタケの採取

本研究によるスギヒラタケの採取は平成23年度から3年間毎年行われてきたが、平成24年度以外は天候不順によりスギヒラタケの発生や生育状況が良くなく、採取が困難で研究期間の3年間および以前の研究結果と比較するのは困難であった。

#### (2) スギヒラタケ中青酸濃度の比較

以前の研究結果から平成17年度、平成18年度、平成20年度のスギヒラタケに含有する青酸濃度は明らかに年とともに減少していた。本研究により平成23年度、24年度、

25年度のスギヒラタケ中青酸濃度を測定することで、年々減少していることをさらに証明することを目指したが、天候等の影響により明らかにすることができなかった。しかし、先の3年間の結果からだけ見ても平成16年度のスギヒラタケ中青酸濃度が異常に高かった可能性を示唆している。

#### (3)スギヒラタケの人工栽培について

スギヒラタケの人工栽培は菌株を使って、おが粉培地での人工栽培試験を試みた。菌糸の集まりである菌糸の培養は成功したが、きのこ(子実体)を発生させることはできなかった。きのこの子実体発生には、温度、水分(湿度)、栄養素、光、ガス環境などの因子が関わっており、さらに詳細な条件設定を検討しなければならないが、今後の研究課題となった。

#### (4) チオシアネート、シアネートの測定

血清中のチオシアネートおよびシアネートをイオンクロマトグラフィで測定したが、血液透析患者と健常者の間には有意差は見られなかった。患者の病歴など条件を統一したのではないため確定した結果ではなく、今後も条件を整えて精査する必要がある。

#### (5) 他の研究者による研究状況

スギヒラタケと急性脳症を直接結びつける研究は見られないが、スギヒラタケに含有される細胞毒性成分ポリゲニックアシドを検出した研究やスギヒラタケからビタミンD類似物質を検出したことにより、急性脳症との因果関係を考察する研究などがある。2004年秋以外にスギヒラタケの急性脳症発症の報告は全く見られず、そのため真の原因究明は困難になっている。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Gonmori K, Hasegawa K, Fujita H, Kamijo Y, Nozawa H, Yamagishi I, Minakata K, Watanabe K, Suzuki O: Analysis of ibotenic acid and muscimol in Amanita mushrooms by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 30(2), 168-172, 2012
  2. Gonmori K, Minakata K, Suzuki M, Yamagishi I, Nozawa H, Hasegawa K, Wurita A, Watanabe K, Suzuki O: MALDI-TOF mass spectrometric analysis of  $\alpha$ -amanitin,  $\beta$ -amanitin, and phalloidin in urine. *Forensic Toxicology*. 30(2), 179-184, 2012
  3. Minakata K, Nozawa H, Yamagishi I, Gonmori K, Hasegawa K, Suzuki M, Wurita A, Watanabe K, Suzuki O: A new approach in tandem mass spectrometric simultaneous determination of perchlorate, thiocyanate, and iodide using their ternary complexes with tris(1,10-phenanthroline)iron(II) chelate. *Forensic Toxicology*. 30(2), 156-161, 2012
  4. Gonmori K, Fujita H, Yokoyama K, Watanabe K, Suzuki O: Mushroom toxins: a forensic toxicological review. *Forensic Toxicol*, 29: 85-94, 2011
  5. Minakata K, Nozawa H, Gonmori K, Yamagishi I, Suzuki M, Hasegawa K, Watanabe K, Suzuki O: Determination of cyanide in blood by electrospray ionization tandem mass spectrometry after direct injection of dicyanogold. *Anal Bioanal Chem*, 400: 1945-1951, 2011
1. Gonmori K, Minakata K, Suzuki M, Hasegawa K, Yamagishi I, Nozawa H, Wurita A, Watanabe K, Suzuki O: MALDI-Q-TOF mass spectrometric determination of alpha-amanitin, beta-amanitin, and phalloidin in urine. The 51th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists 2013, Funchal, Madeira, Portugal
  2. Minakata K, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I, Hasegawa K, Wurita A, Watanabe K, Suzuki O: Determination of azide in gastric fluid and urine by flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists 2012, Hamamatsu, Japan.
  3. Hasegawa K, Wurita A, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I, Minakata K, Suzuki O, Watanabe K: A sensitive and fully automated method for GC-MS analysis of volatile organic compounds in whole blood using large volumes of headspace vapor. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists 2012, Hamamatsu, Japan.
  4. Gonmori K, Hasegawa K, Fujita H, Kamijo Y, Nozawa H, Yamagishi I, Minakata K, Watanabe K, Suzuki O: Analysis of ibotenic acid and muscimol in Amanita mushrooms by hydrophilic interaction LC-MS-MS with solid-phase extraction. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists 2012, Hamamatsu, Japan.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

権守 邦夫 (Gonmori, Kunio)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：10006744

### (2)研究分担者

鈴木 修 (Suzuki, Osamu)

浜松医科大学・医学部・理事

研究者番号：70093044

渡部 加奈子 (Watanabe, Kanako)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：70288546