ノート

食用の天然および栽培キノコに含まれる発熱性物質について

(平成 17 年 10 月 14 日受理)

奥村 正直*[†] 都築 秀明* 富田 伴一*

Study on Pyrogen in Natural and Cultivated Edible Mushrooms

Masanao OKUMURA[†], Hideaki TSUZUKI and Ban-ichi TOMITA(Aichi Prefectural Institute of Public Health: 7-6, Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan; [†] Corresponding author)

We examined endotoxin and pyrogen contents in several kinds of natural and cultivated edible mushrooms, as well as some cultivated vegetables. According to the Japanese Pharmacopoeia, 14th Ed., two types of endotoxin (gel-clot *Limulus* amoebocyte lysate) test and the pyrogen test were performed using natural edible mushrooms collected in Aichi Prefecture and cultivated mushrooms and vegetables purchased at a market. The endotoxin contents of natural mushrooms were apparently higher than those of cultivated mushrooms or vegetables. The endotoxin contents in the cultivated mushrooms were slightly higher than those in the vegetables. Similar results were obtained in the pyrogen test.

(Received October 14, 2005)

Key words: 発熱性物質 pyrogen; キノコ mushroom; エンドトキシン試験 endotoxin test; 発熱性物質試験 pyrogen test

緒言

平成 16 年 9 月から 10 月にかけて、新潟県や山形県などでスギヒラタケを原因食とする急性脳症が発生したとの報告に続いて、他県でも同様な症状を持つ患者の発生事例が散発した¹⁾。この食中毒は、当初、スギヒラタケを食べた腎透析患者に、発熱、意識障害あるいは痙攣などいわゆる急性脳症の症状を呈したため、厚生労働省は当該キノコの摂食を避けるよう注意を喚起した¹⁾が、その後、一般住民に対しても摂食を控えるよう通知²⁾がなされた。

中毒症状などから、従来報告されてきたキノコに起因する神経や消化器に症状を呈する食中毒^{3), 4)}とは異なることから、その原因物質の究明あるいは発生機序の解明が待たれるところである。

急性脳症の主な症状の 1 つに発熱があり、キノコの摂食と患者の症状の発現において、中枢神経に作用して急性の発熱症状を惹起する発熱性物質の関与を疑った。しかし、食用キノコにおける発熱の原因物質となる発熱性物質の含有に関する調査はこれまでなされていない。そこで、食用とされる天然および栽培キノコに含まれる発熱性物質の有無について検討を行った。

実験方法

1. 検体

食用となる天然キノコとして、スギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*, 2 検体)、ショウゲンジ (*Rozites caperata*) およびハナイグチ (*Suillus grevillei*) (以上、採取期日: 平成 16 年 11 月, 採取地: 愛知県豊田市足助町大字明川地内)、ヌメリイグチ (*Suillus luteus*) およびウラムラサキ (*Laccaria amethystea*) (以上、採取期日: 平成 17 年 10 月, 採取地: 同上)、栽培キノコとして、エノキタケ (*Flammulina velutipes*, JA 全農長野)、エリンギ (*Pleurotus eryngii*)、ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*)、マイタケ (*Grifola frondosa*) (以上、ホクト(株))、ハナビラタケ (*Sparassis crispa*, はなびらたけ普及会) の 10 種 11 検体を、対照とした野菜には、キャベツ (生産者不明)、ホウレンソウ (JA 愛知西)、チンゲンサイ (JA とびあ浜松)、ピーマン (JA そお鹿児島) およびナバナ (JA 全農みえ) の 5 種 5 検体を用いた。

2. 試薬および器材

エンドトキシン 100 標準品 (日本薬局方(局方)標準品, 140 Endotoxin Unit (EU)/バイアル, 国立医薬品食品衛生研究所), パイロテル (感度 0.125 EU/mL, 生化学工業(株)), リムルス ES-II テストワコー (感度 0.015~0.06 EU/mL, 和光純薬工業(株)), 局方注射用水 (大塚蒸留水, 大塚製薬(株)), ドライサーモユニット (DTU-1B, タ

[†] 連絡先

* 愛知県衛生研究所: 〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7-6

イテック(株))および自動体温計測装置(K-923, 宝工業(株))を使用した。

3. 方 法

(1) 被験液

検体を水道水で水洗後、滅菌タオルで軽く水切りした後、滅菌したハサミで検体5gを50 mL コニカルチューブ(日本ベクトン・ディッキンソン(株))に採って細切し、15 mLのエンドトキシンを含まない局方注射用水(大塚製薬(株))を加えて水浴中で加熱抽出処理(100°C, 15分)した。さらに、室温放冷して遠心(3,000回転/分, 5分)し、上清をメンブレンフィルター(0.22 μm, Millex-GV, 日本ミリポア(株))で限外ろ過処理した。その後、局方注射用水で10倍に段階希釈して被験液とした。

(2) エンドトキシン試験

エンドトキシン試験に使用したパイロテルおよびリムルスES-IIは、第十四改正日本薬局方のエンドトキシン試験(ゲル化法)⁵⁾に従って感度試験を行った。次いで、各被験液の段階希釈液について試験を2回行い、2回ともゲル化を認める最大希釈倍率から各検体に含まれるエンドトキシン量を求めた。

その原理は、ゲル化を促す因子であるC因子(主にグラム陰性細菌の細胞壁を構成するリポ多糖(LPS)が関与する)とG因子(主に真菌類の細胞壁成分であるβ-グルカンが関与する)の2つの因子に反応してカプトガニ血球成分(*Limulus* amoebocyte lysate; LAL)の凝固が促進される⁶⁾。真菌類であるキノコにはβ-グルカンが多いとされる⁷⁾ので、エンドトキシン試験へのβ-グルカンの関与を考慮して、C因子とG因子のいずれにも反応するパイロテルと、LPSに特異的なC因子のみに反応するリムルス

ES-IIの2種のエンドトキシン試験を行った。

(3) 発熱性物質試験

局方注射用水で10倍希釈した各被験液について、局方の発熱性物質試験⁵⁾を準用して試験を行った。すなわち、2匹のウサギ(Std: JW/CSK (Clean), 1.7~2.0 kg, 雄, 日本エスエルシー(株))を用いて、被験液を1 mL/kgの割合で耳静脈より投与し、基準体温に対する体温上昇の平均値を求めた。

結 果

1. エンドトキシン試験

ゲル化法による感度試験の結果、各々の感度はパイロテルでは0.125 EU/mL およびリムルスES-IIは0.03 EU/mLであった。

各被験液のエンドトキシン試験の結果をFig. 1に示した。

パイロテルでは天然キノコ5種(6検体)は、いずれも 3.8×10^4 EU/gであったのに対して、栽培キノコでは $3.8 \times 10^2 \sim 3.8 \times 10^3$ EU/gで平均値は 2.4×10^3 EU/gとなり、平均値で比較すると天然キノコの約1/16のエンドトキシン量であった。また、対照の野菜でも $3.8 \times 10^2 \sim 3.8 \times 10^3$ EU/gで平均値は 1.0×10^3 EU/gとなり、平均値で比較すると天然キノコの約1/40であり、栽培キノコの約2/5となった。なお、検体を洗浄した水道水のエンドトキシンは1.3 EU/mLであった。一方、リムルスES-IIでは、天然キノコは $9.0 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^4$ (平均値 8.8×10^3 EU/g)とパイロテルと同様に高く、一方、栽培キノコではすべて 9.0×10 EU/g および野菜では $9.0 \times 10 \sim 9.0 \times 10^2$ EU/g (平均値 3.5×10^2 EU/g)であり、野菜が栽培キノ

Fig. 1. Relationship between endotoxin contents found with two types of endotoxin test and average body-temperature increase in the pyrogen test for natural/cultivated mushrooms and cultivated vegetables

コよりも平均値で約4倍高い結果となった。

2. 発熱性物質試験

発熱性物質試験の結果を Fig. 1 に示した。天然キノコでの平均体温の上昇は0.8~1.4℃(平均値1.2℃)と、明らかな陽性反応を示したのに対し、栽培キノコでは0.0~0.2℃(平均値0.1℃)とほとんど体温上昇を認めなかった。しかし、野菜では0.1~0.8℃(平均値0.3℃)と、栽培キノコよりやや高めの平均体温の上昇を示した。なお、陰性対照とした局方注射用水では0.1℃の体温上昇であった。

考 察

発熱性物質とは、発熱の原因となる物質の総称であり、細菌由来の毒素などに代表される外因性物質と生体内で外因性物質に反応して産生される内因性物質からなるが、とりわけ強力な発熱性物質はグラム陰性菌由来のLPSとされている⁸⁾。さらに、本研究で対象としたキノコは真菌類であり、その細胞壁を構成する β -グルカンも発熱性物質に含まれるため、その関与も考慮すべきと思われた。しかし、今回行った実験の結果では、エンドトキシン試験のC因子のみに特異的に反応するリムルスES-IIの結果と発熱性物質試験での結果が極めてよく対応していた。 β -グルカン自体の発熱活性は極めて低いとされている⁹⁾ので、パイロテルで得られた β -グルカン(G因子)の量はウサギでの発熱性には大きく反映されず、LPS(C因子)の量がほぼ反映されたものと思われる。

今回の実験では、発熱性物質量が栽培キノコでは極めて低く、野菜ではばらつきが見られたが栽培キノコと同等かやや高い結果であった。一方、天然のキノコには栽培キノコや市販の野菜に比べて明らかに多量の発熱性物質が含まれていたが、キノコなどの食品に含まれる発熱性物質量に関する調査報告はこれまでなされていない。したがって、これらに含まれる発熱性物質量を把握するためには、さらに例数を増やす必要があると思われる。なお、検出された発熱性物質は、それらが生育した環境中の土壌に生息する細菌に由来すると考えられるが、本研究では土壌の細菌相などを調査しておらず、その究明は今後の検討課題とした。

今回行った発熱性物質試験では、被験液を直接血管内投与しており、通常の消化過程での吸収とは相違しているため、キノコなどの摂食による生体影響については慎重に検討する必要がある。しかし、定期的に腎透析を受けている

患者では、透析液中への発熱性物質混入を完全に排除することはできない¹⁰⁾ことから、例えば、発熱には至らない程度の発熱性物質が透析などで血中に存在した場合に、食物に含まれる発熱性物質の生体への取り込みが相加的に作用して発熱の原因となる可能性も否定できない。事実の1つとして、スギヒラタケを原因とする急性脳症患者の多くが腎透析患者であったこと¹⁾からも、発熱性物質が急性脳症発現の要因の1つとして関与した可能性は十分考えられることから、さらに検討を加える予定である。

謝 辞

この調査にあたり、天然キノコを提供していただいた愛知県一宮保健所食品衛生課長の杉山博紀氏に感謝します。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局疾病対策課長および医薬食品局食品安全部監視安全課長通知“急性脳症を疑う事案の発生について”平成16年10月22日, 健疾発第1022005号/食安監第1022003号(2004).
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知“急性脳症を疑う事案の発生について”平成16年11月1日, 食安発第1119001号(2004).
- 3) Iwasaki, Y., Ohya, M., “Tyudokugaku—Kiso-Rinsho-Shakaikagaku—(Toxicology—Basic-Clinical-Social Medicine—)”, Araki, S. ed., Tokyo, Asakura Shoten, 2002, p. 177–179. (ISBN4-254-30060-3)
- 4) Anthony, T. T., “Zoku Minomawarinodoku (A sequel of Environmental Poison)”, Tokyo, Tokyo Kagaku Dojin, 1995, p. 23–33. (ISBN4-8079-1255-0)
- 5) 厚生労働省“第十四改正日本薬局方第二追補 一般試験法「エンドトキシン試験法」および「発熱性物質試験法」”平成16年12月28日, 告示第461号(2004).
- 6) Levin, J., Bang, F. B., Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics if its coagulation of endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **19**(1), 186–197 (1968).
- 7) Yamaguchi, H., “Byougenshinkintoshinkinsho (Pathogenic Fungus and Fungal Infection)”, Tokyo, Nanzan-do, 2003, p. 19–25. (ISBN4-525-16522-7)
- 8) 日本薬局方解説書編集委員会編“第十四改正日本薬局方解説書 一般試験法 —発熱性物質試験法—”東京, 廣川書店, 2001, p. B329–B838.
- 9) 日本薬局方解説書編集委員会編“第十四改正日本薬局方解説書 一般試験法 —エンドトキシン試験法—”東京, 廣川書店, 2001, p. B2–B8.
- 10) Ward, R. A., Ultrapure dialysate. *Semin. Dial.*, **17**(6), 489–497 (2004).