ベニテングタケ抽出物のマウスに及ぼす生化学的影響

(昭和 58 年 5 月 2 日受理)

山 浦 由 郎^{*1} 込 山 茂 久^{*1} 福 原 守 雄^{*2}
高 畠 英 伍^{*3} 橋 本 隆^{*4}

Biochemical Effects of *Amanita muscaria* Extract in Mice

Yoshio YAMAURA^{*1}, Shigehisa KOMIYAMA^{*1}, Morio FUKUHARA^{*2},
Eigo TAKABATAKE^{*3} and Takashi HASHIMOTO^{*4}

(*¹Nagano Research Institute for Health and Pollution: 1978, Komemura, Amori, Nagano, Japan; *²The Institute of Public Health: 6-1, Shirokanedai 4-chome, Minato-ku, Tokyo, Japan; *³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University: 45-1, Nagaotoge, Hirakata, Osaka, Japan; *⁴Shinshu University, School of Medicine: 1-1, Asahi 3-chome, Matsumoto, Nagano, Japan)

The biochemical effects of mushroom extracts were studied in order to classify poisonous mushrooms in terms of their biochemical effects; this would provide useful information for clinical treatment. The species of mushrooms studied were *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina* and *Amanita rubrovolvata*, which are known to cause nervous system disorder in man.

After intraperitoneal injection of aqueous extract of *A. muscaria* into male mice, biochemical changes in the serum and liver were noted within 3 hours, but the values returned to normal within 6 hours after the injection. The activity of serum cholinesterase was decreased moderately at 30 minutes after the injection. The liver glycogen was decreased at 1 hour after the injection. The blood glucose level was increased at 1 hour and decreased at 3 hours after the injection. The blood urea nitrogen was decreased significantly, but serum transaminase activities were unaffected. Among the poisonous mushrooms examined, *A. rubrovolvata* was the most potent.

(Received May 2, 1983)

Key word: 毒キノコ poisonous mushroom; ベニテングタケ *Amanita muscaria*; 生化学的影響 biochemical effect; 血清コリンエステラーゼ serum cholinesterase; 肝グリコーゲン liver glycogen; 血糖 blood glucose; 尿素窒素 urea nitrogen

はじめに

我が国において食用とされるキノコは種類も量も多いが、その反面毒キノコによる食中毒も毎年数多く発生している¹⁾。特に長野県では発生件数が全国平均と比べ極めて多く、全食中毒の約 30% を占めている^{2),3)}。

キノコ中毒は症状が多様多様であり、キノコの種類に

よってその治療法を決める必要がある。しかし中毒に関してはそのメカニズムがほとんど解明されていないため治療にも支障を来すことが多い。そこで著者らは中毒治療に役立つ基礎資料をつくることを目的として、キノコの種類ごとにその生化学的作用を検討している。すでに摂食後 6 時間以上の潜伏期があり、嘔吐、下痢、脱水などいわゆるコレラ様の中毒症状が発現する致死率の高い有毒キノコについて報告した^{4),5)}。今回は摂食後比較的短時間に胃腸症状、視力障害、虚脱、狂騒的興奮など、主に神経系の中毒症状が起こるキノコについて検討したので報告する。

*¹ 長野県衛生公害研究所: 長野市安茂里米村 1, 978

*² 国立公衆衛生院: 東京都港区白金台 4-6-1

*³ 摂南大学薬学部: 大阪府枚方市長尾峠町 45-1

*⁴ 信州大学医学部: 長野県松本市旭 3-1-1

実験材料及び方法

1. 実験材料

1.1 使用キノコ

長野県内の山林で 1981 年 9~10 月にかけて採取した
テングタケ科のベニテングタケ (*Amanita muscaria*),
テングタケ (*Amanita pantherina*), ヒメベニテングタ
ケ (*Amanita rubrovolvata*) を使用した。

初めにベニテングタケで肝臓及び血液の生化学検査を
行い、その中で影響が認められたものを中心に 3 種類
のキノコで検討した。

1.2 検液の調製

前報⁴⁾に準じて調製し、その粗抽出液を検液とした。

1.3 実験動物

ddY 系 SPF 雄マウスを(株)静岡実験動物協同組合よ
り 5 週令で購入し、1 週間予備飼育した後、体重 28~
30 g のものを使用した。

2. 実験方法

2.1 肝臓及び血液の生化学検査

実験方法は前報⁴⁾に準じた。すなわちキノコの粗抽出
液 0.2 ml (キノコの湿重量にしてマウス当たり 0.05 g
相当量) をマウスに腹腔内投与し、10, 30 分及び 1, 3,
6, 12 時間後に各々マウスをエーテルで浅く麻酔し、股
動脈から血液を採取、次いで肝臓を摘出して下記の各成
分及び酵素の測定用試料とした。なお対照群には生理食
塩水を投与した。食餌は投与後絶食させた。

血液: 血清コリンエステラーゼ (Ch-E) 活性値はベ
ンゾイルコリンを基質とする酵素法、血糖はグルコース
オキシダーゼによる酵素法、尿素窒素は Fearon 反応に
よる比色法、血液中アンモニアはジオキシジフェニルア
ミンによる比色法で、おのおの和光純薬工業(株)製キ
ットを用いて、またグルタミン酸・オキサロ酢酸トランス
アミナーゼ (GOT), グルタミン酸・ピルビン酸トランス
アミナーゼ (GPT) は可視部吸光度法 (ペーリンガ
ー・マンハイム社製キット) により測定した。

臨床生化学検査は中性脂肪、総タンパク、高比重リ
ポタンパク、アルブミン、総コレステロール、尿酸、 γ -グ
ルタミルトランスペプチダーゼ、総ビリルビン、アルカ
リホスファターゼ、乳酸脱水素酵素、GOT, GPT の 12
成分を Technicon Auto Analyzer SMA-12/60 により
測定した。

肝臓: 常法に従ってホモジネート及びマイクロゾームを
調製し、グリコーゲンはアンスロン試薬による比色法⁶⁾,
マイクロゾームタンパクは Folin 試薬による比色法⁷⁾, ト
リグリセライド (TGL) はクロモトロフ酸発色による比
色法⁸⁾, グルタチオンは 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic
acid) 法⁹⁾, グルコース-6-ホスファターゼ (G-6-Pase)
は Swanson 法¹⁰⁾, グルコース-6-リン酸脱水素酵素
(G-6-P DH) は Glock と McLean 法¹¹⁾ により測定
した。

Fig. 1. Time course of serum cholinesterase activity after the injection of mushroom extract
Mean $\pm$ S.E. of 5 mice * $P < 0.05$

2.2 尿生化学検査

ベニテングタケ抽出液投与後24時間の尿をメタボリッ
クケージ ((株)杉山元理器製) を用いて採取し、尿素
窒素、尿酸、クレアチン、クレアチニンの定量には栄研
化学(株)製キットを使用した。なお対照群には生理食塩
水を投与した。食餌は検液投与後から絶食させた。

実験結果

1. 一般症状の観察

キノコ抽出液投与 5 分後から流涎が始まり、30 分後
には激しくなり、鼻腔からも分泌物を流出し、眼漏 (眼や
鼻腔からの分泌物が漏れる状態)、さらに腹這い歩行を
呈する。これらの症状は 1~2 時間続くが、3 時間後
には回復した。その後鎮静傾向がみられたが、外部刺激
に対しては異常に運動が亢進した。

2. 血清コリンエステラーゼ活性値の経時変化

キノコ抽出液投与後 12 時間の血清 Ch-E の経時変化
を Fig. 1 に示す。

Ch-E 活性は投与 30 分後有意の低下を示したが、以
後急速に回復し 3 時間後には投与前値に戻った。

3. 肝グリコーゲン、血糖の経時変化及び糖代謝系酵素への影響

キノコ抽出液投与後12時間の肝グリコーゲン、血糖の
経時変化を Fig. 2, 3 に示す。

肝グリコーゲンは投与後間もなく減少し始め、1 時間
後に最低値を示した。また血糖は投与 1 時間後有意の増
加がみられたが、3 時間後有意に減少した。

キノコ抽出液投与 1 及び 3 時間後における肝ミクロゾ
ーム G-6-Pase, 可溶性画分 G-6-P DH を測定し、その
結果を Table 1 に示す。

投与 1 時間後には G-6-Pase が有意に、また G-6-P
DH が増加傾向を示したが、3 時間後にはいずれも若干
減少傾向がみられた。

Fig. 2. Time course of liver glycogen after the injection of mushroom extract
Mean $\pm$ S.E. of 5 mice * P <0.01

Fig. 3. Time course of serum glucose after the injection of mushroom extract
Mean $\pm$ S.E. of 5 mice * P <0.05

Table 1. Effect of *A. muscaria* Extract on G-6-Pase and G-6-P DH Activities of the Liver

Time after i.p. injection (hr)	Group	<i>n</i>	G-6-Pase (Pi μ g/min/g)	G-6-P DH (μ mol/min/g)
1	Control	6	5.86 $\pm$ 1.19	727 $\pm$ 103
	Treated	6	8.15 $\pm$ 0.27*	903 $\pm$ 92
3	Control	6	6.43 $\pm$ 0.99	836 $\pm$ 85
	Treated	6	5.37 $\pm$ 0.38	783 $\pm$ 51

Values are mean $\pm$ S.E. * P <0.05

Fig. 4. Time course of SGOT and SGPT activities after the injection of mushroom extract
Mean $\pm$ S.E. of 5 mice

4. 血清トランスアミナーゼの経時変化及び肝臓中の成分、酵素への影響

キノコ抽出液投与後 12 時間の血清 GOT, GPT の経時変化を Fig. 4 に、投与 3 時間後における肝臓重量、ミクロゾームタンパク、TGL, グルタチオンの測定結果を Table 2-A に示す。

血清 GOT, GPT は投与後 12 時間では変化がみられなかった。また肝臓重量、ミクロゾームタンパク、TGL, グルタチオンについても変化が認められなかった。

5. 血中尿素窒素の経時変化及び血中アンモニア並びに尿中生化学的成分への影響

キノコ抽出液投与後 12 時間の尿素窒素の経時変化を Fig. 5 に示す。

尿素窒素は投与 1 時間後、対照の約 2 倍と著しく増加した。さらに投与 3 時間後にも有意の増加が認められたが、6 時間後には減少し、12 時間後では対照と同程度になった。

キノコ抽出液投与 3 時間後の血中アンモニアの測定結果を Table 2-B に示す。

アンモニアは対照の約 2 倍の増加が認められた。

キノコ抽出液投与後 24 時間尿中の尿素窒素、尿酸、クレアチン、クレアチニンの測定結果を Table 2-C に示す。

尿素窒素は対照の約 1/2 に減少し、尿酸も低下傾向が認められた。クレアチン、クレアチニンは変化がみられなかった。

6. 同属キノコ 3 種類の生化学的作用及び臨床血液生化学検査

ベニテングタケ、テングタケ、ヒメベニテングタケのキノコ抽出液投与 1 時間後の血清 Ch-E 及び投与 3 時間後の肝グリコーゲン、血糖、尿素窒素の測定結果を Table 3 に示す。

Ch-E 活性は 3 種類のキノコ抽出液投与群で減少傾向

Table 2. Effect of *A. muscaria* Extract on Hepatic, Serum and Urinary Parameters

	<i>n</i>	Control	Treated
A) Liver weight (g/100 g B.W.)	6	5.45±0.25	5.36±0.23
Microsomal protein (mg/g)	6	25.4±1.77	25.8±0.71
Triglyceride (mg/g)	6	5.04±0.68	5.50±0.25
Glutathione (μmol/g)	6	5.30±0.34	5.47±0.21
B) Serum ammonia (μg/dl)	5	63±7.1	119±2.8*
C) Urea nitrogen (mg/day)	5	173	86
Uric acid (mg/day)	5	3.68	2.60
Creatin (mg/day)	5	4.56	4.39
Creatinine (mg/day)	5	2.95	2.47

A), B) Values are mean±S.E. * $P<0.05$

Sacrificed 3 hr after the injection

C) Values were obtained from pooled samples.

Urine was collected for 24 hr after the injection.

Fig. 5. Time course of serum urea nitrogen after the injection of mushroom extract
Mean±S.E. of 5 mice * $P<0.05$ ** $P<0.01$

を示した。肝グリコーゲン、血糖は3種類のキノコ投与群で有意に減少し、ヒメベニテングタケの作用が最も強く現われた。また尿素窒素は3種類のキノコ抽出液投与群で対照の約2倍の増加が認められた。

3種類のキノコ抽出液投与3時間後の臨床血液生化学検査結果をTable 4に示す。

TGLがベニテングタケ、テングタケで低下し、高比

重リボタンパクは3種類のキノコ抽出液で増加した。尿酸はテングタケ、ヒメベニテングタケで増加した。

考 察

ベニテングタケは世界中に広く分布し、一般的に最もよく知られたキノコである¹²⁾。このキノコの傘は深紅色または赤色であり、食用キノコと誤食することは稀であるが、“うま味”成分を含む^{13),14)}ため、食用としている地方もあり、長野県内でも時々中毒事例が発生する²⁾。

ベニテングタケによる中毒症状は複雑で^{15),16)}、通常摂食後30分から3時間位の比較的短時間に嘔吐、下痢など軽度の胃腸症状で始まり、多量の発汗、流涎、流涙、視力障害(散瞳または縮瞳で一定しない)が発現する。重症では強い興奮状態、狂騒、昏迷が起こり、さらに間代性及び強直性ケイレン、昏睡状態となるが、死亡例は少なく致死率は数%である。

ベニテングタケ抽出物のマウスへの作用は、一般症状としてはヒトにおける場合と同様、様々の神経症状が観察された。また生化学的变化は経時的には投与後3時間以内に発現し、血清Ch-E活性値の低下、肝グリコーゲン及び血糖など糖代謝関連成分の変動、さらに血中尿素窒素、アンモニア、尿酸の増加及び尿中の尿素窒素、尿

Table 3. Effect of the Various Mushroom Extracts on Serum Cholinesterase, Serum Glucose, Blood Urea Nitrogen and Liver Glycogen

Species	<i>n</i>	S-Ch-E ^{a)} (IU/L)	S-glucose ^{b)} (mg/dl)	BUN ^{b)} (mg/dl)	Liver glycogen ^{b)} (mg/g liver)
<i>Amanita muscaria</i>	5	285±33.5	158±7.1*	27.0±2.02**	9.04±0.97*
<i>Amanita pantherina</i>	5	245±15.3	168±7.7*	28.3±1.86**	9.13±1.53*
<i>Amanita rubrovolvata</i>	5	286±24.2	151±8.0**	26.2±0.97**	8.57±1.04**
Control	5	313±35.1	190±5.1	14.1±1.09	12.5±0.65

Values are mean±S.E. * $P<0.05$ ** $P<0.01$

a) Serum Ch-E activity was assayed 1 hr after the injection.

b) Sacrificed 3 hr after the injection

Table 4. Effect of the Mushroom Extracts on Serum Components and Enzymes

Species	TG-R (mg/g)	TP (g/dl)	HDLC (mg/dl)	ALB (g/dl)	CH (mg/dl)	UA (mg/dl)	γ -GTP (mu/dl)	TBL (mg/dl)	ALP (u/L)	LDH (u/L)	GOT (u/L)	GPT (u/L)
<i>Amanita muscaria</i>	147	4.8	102	2.9	132	1.5	6	0.3	234	531	98	42
<i>Amanita pantherina</i>	138	4.5	93	2.7	120	2.1	6	0.3	207	486	111	48
<i>Amanita rubrovolvata</i>	177	4.5	92	2.9	120	2.1	5	0.3	231	630	128	45
Control	183	4.8	75	2.9	132	1.4	5	0.3	243	459	108	54

Values were obtained from pooled samples of 6 mice.

Sacrificed 3 hr after the injection

酸の低下など窒素化合物検査値の異常が確認され、腎排泄機能に対して何らかの影響を及ぼすことが示唆された。特に血中アンモニアの増加は昏睡の原因となりうる可能性もあり、临床上重要な問題と考えられる。しかしこれらの生化学的影響も今回の実験の投与量においては一過性であり、6時間後には正常に戻った。

キノコの有毒成分は低分子のアルカロイド又はペプチド性の毒素が多く、ベニテングタケには *ibotenic acid*^{13),14)}, *muscimol*¹⁷⁾, *muscarine*¹⁸⁾, *bufotenine*^{19),20)} などのアルカロイドの存在が確認されている。特に *muscarine* の含有量はカヤタケ属 (*Clitocybe*) やアセタケ属 (*Inocybe*) に比べ非常に少なく^{21),22)} 主成分でないが、一般症状として *muscarine* 様作用が著しく現われたため、血清 Ch-E 活性値を測定したところ、投与 30 分後には約 15% の活性抑制が認められたが、1時間後には外見症状の激しさに比し、顕著な低下はみられなかった。これは *muscarine* の Ch-E に及ぼす作用に関する報告²³⁾⁻²⁶⁾ でも活性抑制が必ずしも投与量に比例しないこと、また *muscarine* は作用メカニズムが複雑で²⁷⁾, Ch-E 酵素にのみ特異的に作用するのではないこと等が考えられた。また血糖の経時変化でみられた1時間値の増加と3時間値の減少は、これらの現象の持続が短時間であり、しかも G-6-Pase, G-6-P DH など糖代謝関連酵素の影響も少ないことから、毒成分の糖代謝への直接作用というより、*ibotenic acid* など中枢神経作用物質による影響と考えられる。このようにベニテングタケには *ibotenic acid* 及び *muscarine* と中枢神経系と副交感神経系の両方に作用する物質が含まれ、しかもそれらの含有量が産地により異なるため²⁸⁾, 中毒症状をさらに複雑にしていることが推察された。またベニテングタケと同属キノコであるテングタケ、ヒメベニテングタケについても同様の生化学的影響が認められ、3種類の中ではヒメベニテングタケの作用が若干強い傾向を示した。

著者らは毒キノコの生化学的作用による分類を試みているが、既に検討したコレラ様の症状を起こす有毒キノコと今回の神経症状を起こすキノコを比較すると、前者が投与6時間後に肝グリコーゲン、血糖など糖代謝関連成分の顕著な減少を示すのに対し、後者は投与1時間後

の肝グリコーゲンの減少及び血糖の1時間値の増加、3時間値の減少を示した。肝機能の指標としての血清 GOT, GPT は前者が増加し、腎機能の指標としての血中尿素窒素は後者が増加した。またこれらの生化学的变化は同一投与量において、前者は投与後24時間経過しても元に戻らなかったが、後者は一過性であり6時間後には回復した。

以上のようにキノコの種類によってその生化学的影響は相違し、また同属キノコでもその作用程度は異なっていた。今後も他の毒キノコによる反応と比較検討し、それぞれを生化学的に効率よく判別でき、かつキノコ中毒の治療に役立つ基礎資料としたい。

ま と め

ヒトにおいて神経系の中毒症状が発現するベニテングタケ及びその同属キノコの熱水抽出物についてマウスを用いて検討し次の結果が得られた。

1) 一般症状は投与後間もなく流涎などの *muscarine* 様作用が発現したが3時間後には回復した。

2) 生化学的影響は、投与後3時間以内に発現し、6時間後には対照と同程度になった。

(1) Ch-E 活性値は投与1時間後に減少傾向が認められた。

(2) 肝グリコーゲンは投与1時間後有意に減少した。血糖は投与1時間後有意に増加したが、3時間後有意に減少した。

(3) 血中尿素窒素、アンモニア、尿酸は投与3時間後に増加し、一方24時間尿中の尿素窒素、尿酸は減少傾向を示した。

3) ベニテングタケ、テングタケ、ヒメベニテングタケの生化学的影響の比較では、ヒメベニテングタケの作用が他に比べ若干強く現われた。

謝 辞

本研究に御助言を賜った長野市鶴賀病院河原勲博士、キノコの鑑定をしていただいた滋賀大学教育学部横山和正助教授、オートアナライザー分析の御便宜を戴いた長野県総合健康センター松沢平吉氏に感謝の意を表します。

本研究の一部は(財)長野県科学振興会の研究助成金によって行ったものであり、謝意を表します。

なお本研究の一部は日本食品衛生学会第42回学術講演会(昭和56年11月, 豊中市)及び第53回日本衛生学会総会(昭和58年4月, 吹田市)において発表した。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局食品衛生課編: 全国食中毒事件録(昭和39~56年).
- 2) 長沢 武, 河原 勲: “長野県山菜・キノコ図鑑” p. 274~279 (1979) 信濃毎日新聞社.
- 3) 長野県衛生部食品衛生課編: 食品衛生課関係事業成績(昭和46~56年).
- 4) 山浦由郎, 前沢 久, 高島英伍, 橋本 隆: 食衛誌. **22**, 203~208 (1981).
- 5) 山浦由郎, 前沢 久, 高島英伍, 橋本 隆: 同上. **23**, 314~318 (1982).
- 6) Moris, D. L.: *Science* **107**, 254~255 (1948).
- 7) Miller, G. L.: *Anal. Chem.* **31**, 964 (1961).
- 8) Radin, N. S.: “Methods in Enzymology” **14**, p. 245~254 (1969) Academic Press, New York.
- 9) Ellman, G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70~77 (1959).
- 10) Swanson, M. A.: *J. Biol. Chem.* **184**, 647~659 (1955).
- 11) Glock, G. E., McLean, P.: *Biochem. J.* **55**, 400~408 (1953).
- 12) 小林義雄: 日菌報. **21**, 141~146 (1980).
- 13) 竹本常松, 中島 正, 佐久間礼子: 薬誌. **84**, 1233~1234 (1964).
- 14) 竹本常松: 遺伝. **23**, 22~25 (1969).
- 15) 田坂定孝: “臨床中毒学” p. 306~310 (1960) 金原出版.
- 16) 山村秀夫: “中毒ハンドブック” p. 546 (1979) 広川書店.
- 17) Müller, G. F. R., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta.* **48**, 910~926 (1965).
- 18) Eugster, C. H.: *ibid.* **39**, 1002~1023 (1956).
- 19) Wieland, Th., Motzel, W., Merz, H.: *Liebigs Ann. Chem.* **581**, 10~16 (1953).
- 20) Styne, T.: *Mitt. Gebiete. Levensm. Hyg.* **70**, 246~253 (1976).
- 21) 横山和正: 遺伝. **34**, 58~59 (1980).
- 22) 山崎幹夫: 医学のあゆみ **112**, No. 13, 912~913 (1979).
- 23) Keeser, E.: *Klin. Wschr.* **17**, 1811 (1938).
- 24) Ammon, R.: *Pflug. Arch. ges. Physiol.* **233**, 486~491 (1934).
- 25) Fraser, P. J.: *Brit. J. Pharmacol.* **12**, 47~52 (1957).
- 26) Kuenzle, C. C., Waser, P. G.: *Helv. Physiol. Acta.* **16**, 44~57 (1958).
- 27) 宮本高明: “薬物と生体” 現代生物科学 **14**. p. 213, 岩波書店 (1976).
- 28) Benedict, R. G.: “Mushroom toxins other than Amanita. in Kadis, S., Ciegler, A. and Ajl, S. J. (ed.) —Microbial Toxins—” **8**, p. 293~298 (1972) Academic Press, New York.