41．有毒キノコを原因とする食中毒における迅速な毒成分分析法の開発

○吉岡 直樹、小林 直子、林 幸子、三橋 隆夫（兵庫県立健康生活科学研究所）

【目的】

近年のアウトドアブームや自然食志向等により、キノコに十分な知識を持たない一般の人による毒キノコの採取や、食用キノコと誤って販売された例などによる、食中毒事例が多く発生している。厚生労働省の統計[1)] によると、キノコ類による食中毒発生件数は全国において、平成 22 年で 91 件（患者数 263 人）、平成 23 年で 37 件（同 98 人）であり、毎年のように中毒事例が報告されている。キノコ類による食中毒の場合、調理前の残品が少量、あるいは全く残っていない場合が多く、形態学的な同定が不可能な場合も多い。

このような背景から、キノコ毒成分の理化学的分析を行い、有毒キノコの同定を行うことにより、食中毒の原因物質を確定し、中毒患者の治療に役立つ迅速分析法を開発する必要性がある。

今回、数種のキノコ毒成分の一斉分析を目的として、高速液体クロマトグラフィー/飛行時間型質量分析装置（LC/TOF-MS）を用いた迅速スクリーニング分析法について検討を行ったので報告する。

【方法】

1. 標準物質

キノコ毒成分として、イボテン酸（サンタクルーズバイオテクノロジー製）、DL-プロパルギルグリシン・ムシモール・(±)-ムスカリンクロリド水和物・α-アマニチン・β-アマニチン・ファロイジン・ファラシジン（シグマアルドリッチ製）、塩化コリン（和光純薬製）を用いた。

2. 試薬等

メタノール・ギ酸は和光純薬製高速液体クロマトグラフ用を用いた。Oasis HLB (1 cc / 30 mg, Waters 製）は、メタノール 1 mL および水 1 mL でコンディショニングしたものを使用した。

3. 試料

兵庫県内で採取された、テングタケ・タマシロオニタケ・ドクツルタケ等のキノコを－40℃で冷凍保存したものを使用した。

4. 試験溶液の調製

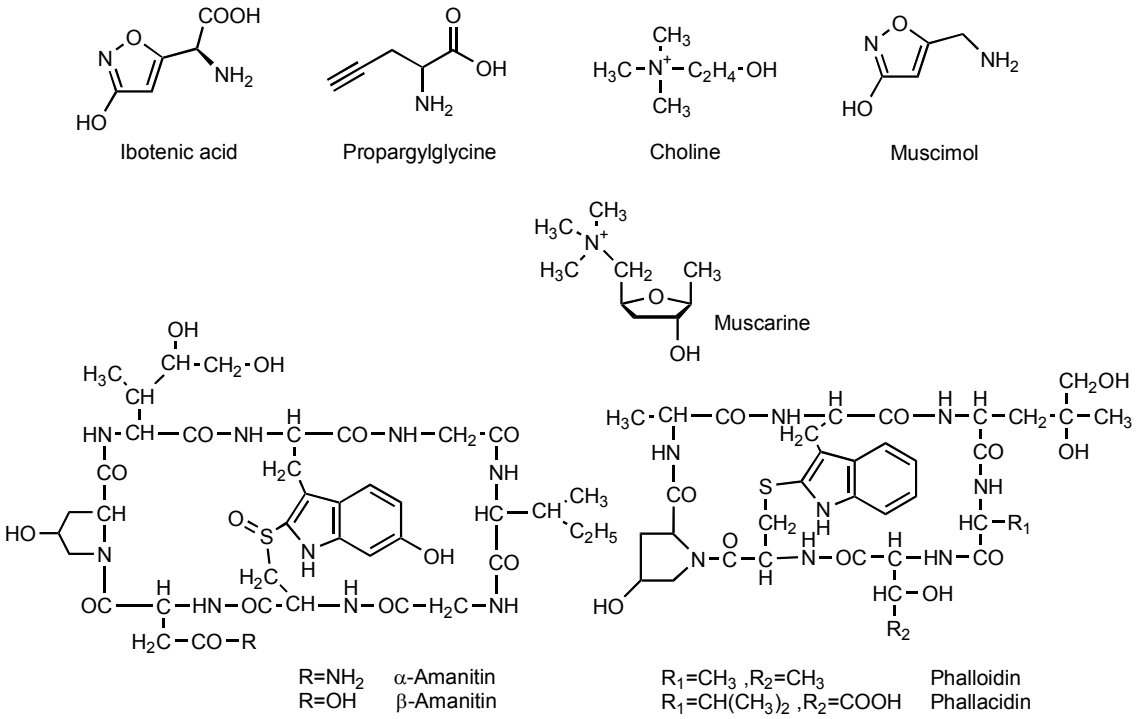

Fig.1　9 種キノコ毒成分の構造式

キノコ試料 0.2 g に 0.5 %ギ酸含有メタノール 2.5 mL 加え、30 秒間ホモジナイズし、1 分間超音波抽出を行った。これを 3 分間遠心分離した後、上清を取った。残渣に水 2.5mL を加え、同様に抽出操作を行い、得られた上清を併せて混合した。これに 50%メタノールを加え 5mL に定容した。この溶液を約 1 mL 取り、Oasis HLB ミニカラムに負荷し、最初に溶出する 0.5 mL を捨て、残りを試験溶液とした。また、この溶液を一部取り、50%メタノールで 20 倍希釈した（20 倍希釈溶液）。

5. 装置および測定条件

装置：Agilent 1200 series LC + 6210MSD-TOF

カラム：SUPELCO Ascentis Express F5 (100 mm×2.1 mm, 2.7 μm)

移動相：A) 0.1% ギ酸水溶液　B)メタノール

A:B = 100:0 (0 分) → 100:0 (3 分) → 40:60 (18 分) → 40:60 (30 分)

流速：0.2 mL/min　　カラム温度：40℃　　注入量：5 μL

イオン化法およびキャピラリー電圧：ESI（Positive, 4000 V）

乾燥ガス：10 L/min（350℃）　　ネブライザー圧力：50 psig

フラグメンター電圧：125 V および 175 V（1 分～16 分）

125 V および 350 V（16 分～30 分）

定量イオンおよび確認イオン：Table 1

Table 1　9 種キノコ毒成分のモニターイオン

	Retention time (min)	Monitor ion and fragmentor voltage			
		Target		Qualifier	
Ibotenic acid	2.50	159.0400	125 V	113.0346	175 V
Propargylglycine	2.53	114.0550	125 V	(114.0550)	175 V
Choline	2.63	104.1070	125 V	(104.1070)	175 V
Muscimol	2.67	115.0502	125 V	98.0237	175 V
Muscarine	12.96	174.1489	125 V	115.0754	175 V
α-Amanitin	17.61	919.3614	125 V	901.3509	350 V
β-Amanitin	17.88	920.3455	125 V	902.3349	350 V
Phalloidin	21.69	789.3236	125 V	616.2548	350 V
Phallacidin	22.33	847.3291	125 V	674.2603	350 V

【結果および考察】

1. イオン化条件の検討

キノコ毒成分には、代表的なものとして、コリン・ムスカリン・ムスカリジン（クサウラベニタケ）、ウスタリン酸（カキシメジ）、イルジン S（ツキヨタケ）、アマニチン類・ファロイジン・ファラシジン（ドクツルタケ）、イボテン酸・ムシモール（テングタケ）、プロパルギルグリシン（タマシロオニタケ）等があるが、市販試薬として入手可能なものは限られている。今回、日本で試薬として購入可能な 9 種類の化合物について、検討を行った。

LC/TOF-MS 分析条件について、まず MS のイオン化について検討を行った結果、9 種類すべての成分について ESI（エレクトロスプレーイオン化法）の正イオンモードで検出が可能であった。イボテン酸については ESI の負イオンモードの方が約 2 倍程度感度が高かったが、正負イオンの同時分析では全体的な感度が低下することから、すべての成分について正イオンモードで分析を行うこととした。またフラグメンター電圧 175V または 350V で確認イオンが得られるものについては、定量イオンとのピーク強度比で物質の存在の確認を行った。

2. 分離条件の検討

検討対象とした 9 種の化合物は、イオン性で極性が非常に高いもの（コリン・ムスカリン）、分子量の大きい環状ペプチド（アマニチン・ファロイジン・ファラシジン）など、それぞれ極性や分子量が非常に異なり、通常の ODS カラム等では一斉分析が困難であると思われた。今回は、まず極性化合物の保持に優れている Amide 系 HILIC（親水性相互作用クロマトグラフィー）カラムを用いて検討を行ったところ、ギ酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル系で良好な分離が得られたが、最適条件が移動相中の水の割合が 80%であり、水 50%以上の使用ではカラム充填剤の耐久性に問題があるため、別の条件を検討した。そこで、水 100%の移動相でも問題のない Pentafluorophenylpropyl (PFP) カラムを用いた結果、0.1%ギ酸-メタノール系のグラジエント分析で良好な結果が得られた。Fig.2 に LC/TOF-MS による標準物質のクロマトグラムを示した。

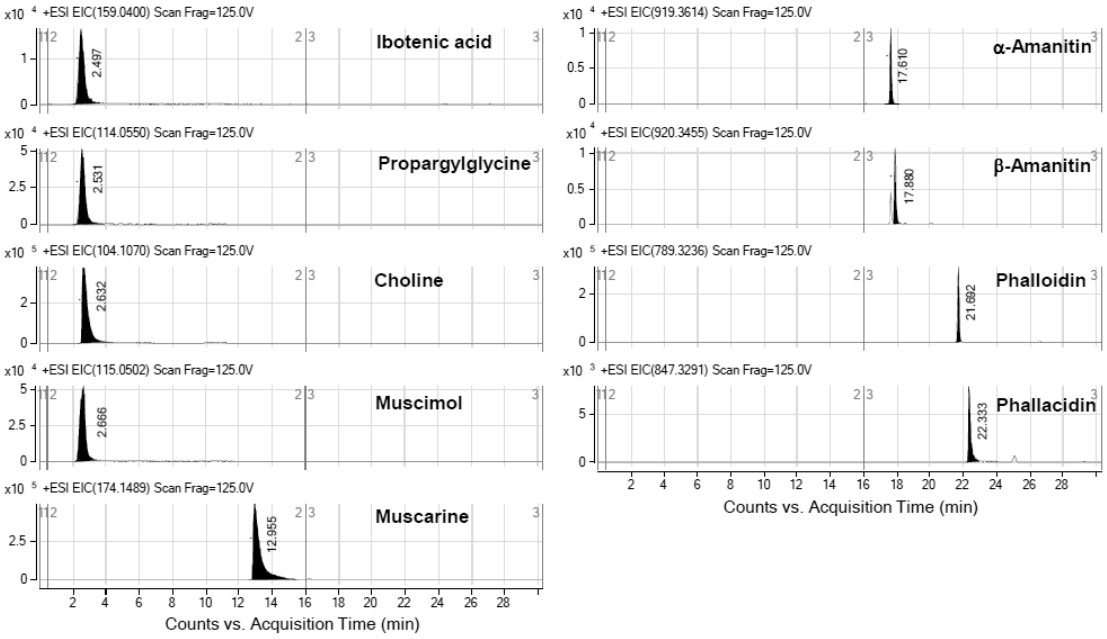

Fig.2　9 種キノコ毒標準物質のクロマトグラム

3. 抽出条件の検討

キノコからの各成分の抽出条件は、文献によると、イボテン酸・ムシモールは 50%～70% メタノール抽出 [2]、ムスカリンは水抽出 [3]、アマニチン・ファロイジン・ファラシジンは酸性条件下メタノール抽出 [4]の例が挙げられている。今回、9 種類の成分の同時抽出にあたり、これらの条件を考慮して 0.5%ギ酸含有メタノールおよび水の 2 回抽出を行った。次に抽出後の精製について、イオン交換、グラファイトカーボン、ODS 等の各種固相抽出ミニカラムの検討を行ったところ、9 種化合物の極性や pKa の幅が広いことから、すべての物質を効果的に精製できるものが少なく、逆相ポリマー系の Oasis HLB の回収率が最も高値であった。また、イボテン酸、プロパルギルグリシン、コリン、ムシモールについては、分析カラムの保持時間が短く、キノコの夾雑物質との相互作用によるマトリックスの影響により回収率が低下する傾向があったため、20 倍希釈した抽出液で定量を行った。また、添加回収実験に際して、コリンに関しては、ビタミン様物質であり、ほとんどの食品、特にキノコに多く含まれている（シイタケでの文献値 450 μg/g [5]）ため、高濃度の添加を行い、ブランク値を差し引いて計算した。Table 2 に、シイタケに各成分を 1～200 μg/g およびその 5 倍量（5～1000 μg/g）添加した時の回収率を示した。

4. 実サンプルへの適用

実際の毒キノコサンプルを用いて、毒成分の分析を行った結果、テングタケからイボテン酸（146 μg/g）および ムシモール（136 μg/g）、タマシロオニタケからプロパルギルグリシン（156 μg/g）、ドクツルタケからα-アマニチン（983 μg/g）・β-アマニチン（227 μg/g）およびファロイジン（328 μg/g）が検出された。

Table 2　添加回収率（シイタケ、$n = 5$）

	Spiked level (μg/g)	Recovery (%) mean ± S.D.			Spiked level (μg/g)	Recovery (%) mean ± S.D.		
Ibotenic acid *	20	99.8	±	5.9	100	72.5	±	3.5
Propargylglycine *	10	92.9	±	5.7	50	85.9	±	4.5
Choline *	200	106.5	±	4.4	1000	94.1	±	1.9
Muscimol *	10	101.4	±	5.4	50	81.5	±	4.7
Muscarine	1	96.2	±	3.6	5	101.0	±	5.1
α-Amanitin	1	105.1	±	5.3	5	103.7	±	8.2
β-Amanitin	1	100.8	±	5.5	5	103.1	±	3.6
Phalloidin	1	89.4	±	3.3	5	101.2	±	4.9
Phallacidin	1	97.9	±	5.8	5	97.8	±	6.7

*：20 倍希釈溶液を用いて測定

【まとめ】

9 種のキノコ毒成分について、LC/TOF-MS による一斉分析法を検討した。その結果、簡易な抽出・精製法ですべての成分が分析可能であり、添加回収率も良好であった。食中毒事例において、喫食残品がわずかしか残っていない場合でも、中毒原因物質の確定やキノコ種の同定が可能となり、中毒患者の治療に役立つものと考えられる。

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成を頂きました（公財）大同生命厚生事業団に心より感謝いたします。また、キノコ試料を提供して頂きました兵庫県立農林水産技術総合センター 森林林業技術センター 藤堂千景 主任研究員に厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

1) 厚生労働省 食中毒統計資料：http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-3
2) Gonmori, K. et al.：Forensic Toxicol. **30**, 168-172 (2012)
3) 岡山明子ら：奈良県衛生研究所年報, 30, 71-74 (1996)
4) Clarke, D.B. et al.：Anal. Methods, 4 1298-1309 (2012)
5) 豊沢功：栄養と食糧, **12**, 12-16 (1959)

【経費使途明細】

キノコ毒標準試薬	259,665 円
光熱水費	43,292 円
旅費	2,060 円
合計（助成金 30 万円、交通費 5000 円および預金利息 17 円含む）	305,017 円