

4. カキシメジの毒成分ウスタル酸の単離ならびに分析法 の確立

○渡部 淳, 石田 恵崇, 中島 克則, 長岡 由香 (山形県衛生研究所)

【研究目的】

毒キノコであるカキシメジによる食中毒の発生件数はツキヨタケ、クサウラベニタケに次いで3番目に多い¹⁾。山形県内のカキシメジ中毒の発生件数は過去10年間で2件であり、原因物質(キノコ)別発生状況は全国と同様である²⁾。現在、カキシメジの毒成分であるウスタル酸(図1)は市販されておらず、

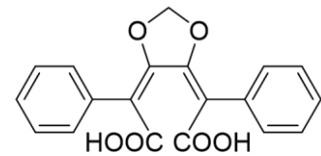


図1 Ustalic Acid

標準品の入手が困難なため、当所では分析法が確立できていない。そこで我々は、カキシメジからウスタル酸を単離し、分析法を確立するために本研究を行うことにした。

【研究の必要性】

山形県では毒キノコを食用キノコと誤認したことに起因する食中毒が毎年発生しており、都道府県別の発生件数は全国トップクラスである。毒キノコが原因と疑われる食中毒が発生した際、未調理のキノコが残っていれば形態から種の判別が可能な場合もあるが、調理され形態的な特徴が失われた場合は非常に困難である。機器分析法を確立することで、このような状況における速やかな原因の特定が可能になるが、カキシメジにおいては、ウスタル酸の市販品がないため、分析法を確立できていない。そのため、カキシメジからウスタル酸を単離し、分析法を確立することは山形県の主要な毒キノコ中毒に対応できる検査体制を構築する上で必要である。

【研究計画】

当初はカキシメジからウスタル酸を単離し、単離したウスタル酸を用いて分析法を確立する計画であったが、近年はキノコ子実体の確保が難しく、ウスタル酸含有量が微量なこともあり、次のとおり計画を変更した。はじめに、分析法の確立に取り組み、確立した分析法によりカラムクロマトグラフィーで得られた画分中のウスタル酸を確認しながら単離を試みた。なお、本研究では河岸ら³⁾が単離したウスタル酸精製品を標準品に用いた。

1. ウスタル酸分析法の確立

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた分析法を確立する。ウスタル酸標準品を用いてイオン化条件を最適化後、液体クロマトグラフでの分離条件を決定し、定量可能な濃度範囲を明らかにする。

2. ウスタル酸の単離

Sano ら³⁾の報告を参考に、カキシメジから含有成分をエタノール抽出後、カラムクロマトグラフィー精製によりウスタル酸を精製する。このとき、自動精製中圧分取クロマトグラフ (EPCLC) を使用することで、既報³⁾より高収率かつ高純度な精製品が得られる方法を確立する。また、得られた精製品は各種スペクトル解析により構造および純度を確認する。

3. 前処理法の検討

分析に供するキノコの前処理法を確立する。

【実施内容・結果】

1. ウスタル酸分析法の確立

ウスタル酸標準溶液を用いてフローインジェクションにより最適化した。イオン化には極性化合物に適したエレクトロスプレーイオン (ESI) 法を選択し、Multiple Reaction Monitoring (MRM) のネガティブモードで最も良好な結果が得られた。脱プロトン化した分子をプレカーサーイオンとしたところ、 m/z 337.0→117.0 および m/z 337.0→218.8 にイオンを検出した。定量イオンには最も強度の強い m/z 337.0→218.8 を選択し、定性イオンを m/z 337.0→117.0 とした。

また、LC-MS/MS の測定条件は表 1、表 2 に示した条件とした。

2. ウスタル酸の単離

本研究には 2016 年から 2020 年にかけて山形県内で採取し、冷凍保存していたカキシメジ 409.57 g および生検体 112.44 g の計 522.01 g を使用した。

2-1. 抽出

既報³⁾を参考に、細切したカキシメジを 85 %エタノールに浸漬し、室温で抽出した。ろ過したエタノール抽出液にクロロホルムを加えて分液後、有機層を分取した。さらに同様にして得られた有機層を合わせて濃縮乾固し、エキス 4.06 g を得た。

2-2. EPCLC 精製

EPCLC 精製には山善 (株) 製 EPCLC-W-Prep 2XY を用いた。はじめに、標準品を用いて薄層クロマトグラフィー (TLC) を行い、順相および逆相における分離条件を検討した。順相 TLC ではブタノール-酢酸-水系とクロロホルム-メタノール系を比較した。前者ではブタノールの比率を変更し条件検討を行ったが、 R_f 値が比較的の高い傾向にあり、ウスタル酸を十分に保持できなかった。一方、後者では R_f 値 0.65 と良好に保持された。TLC 上のスポ

表1 LC-MS/MS測定条件 (LC部)

装置	: SCIEX社製 ExionLC
カラム	: GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1×150 mm, 5 μm)
移動相	: 0.1 %ギ酸溶液-アセトニトリル = 6:4 (isocratic)
流量	: 0.2 mL/min
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 5 μL

表2 LC-MS/MS測定条件 (MS部)

イオン化法	: ESI(-)
測定イオン(定量)	: m/z 337.0→218.8
(定性)	: m/z 337.0→117.0
キャピラリー電圧	: -4500 V
コーン電圧	: -15.0 V
コリジョンエネルギー	: -10.0 V
脱溶媒温度	: 400 °C

ットはテーリングしていたが酢酸を加えることで改善した。また、逆相 TLC ではメタノール-水系で良好に保持された。これらの結果を踏まえ、2-1 で得られたエキスを表 3、表 4 の条件で順次精製した。LC-MS/MS 分析によりウスタル酸の含有が確認された画分を濃縮乾固し、乾固物

348.1 mg を得た。さらに、ウスタル酸は π 共役系を有することから、UV 吸収を持つと予想されたため、LC-MS/MS に付属した多波長検出器で測定を行ったところ、337 nm に吸収極大を有していることが判明した。UV チャートでは不純物と考えられる複数のピークが検出されたため、HPLC により更なる分離精製を行うこととした。

2-3. HPLC 精製

標準品および EPCLC 精製品を表 5 の条件で測定し、溶出の挙動を確認した。標準品は保持時間 20 分、34 分にピークが検出された。一方、精製品では複数のピークが検出されたため、標準品のピーク

と保持時間の近い 20 分、34 分の比較的強度の大きな両ピークを分取した（以下、分取した画分を Rt=20、Rt=34 とする）。分取した画分

を LC-MS/MS で分析したところ、質量分析 (MRM) では両画分からウスタル酸が検出された (図 2)。また、多波長検出器による UV335-340 nm の測定でも同様に両画分からウ

スタル酸が検出された (図 3)。両画分から 2 つのピークがみられたため、これらについて SCAN モードによる測定を行った。マススペクトル解析の結果、図 3 における保持時間 5.5 分のピークにウスタル酸から変化したと考えられる pulvinic acid (図 4) 由来のイオン

表3 順相EPCLC分離条件

移動相	: クロロホルム-メタノール-酢酸 = 100:5:1 (isocratic)
流量	: 10 mL/min

表4 逆相EPCLC分離条件

移動相	: A) 0.1 %トリフルオロ酢酸溶液 B) メタノール
グラジエント	: 5 % (0 min)-5 % (3 min)-
条件 (B液)	100 % (13 min)-100 % (27 min)
流量	: 10 mL/min

表5 HPLC分離条件

カラム	: GL Sciences Inertsil ODS-3 (10×250 mm, 5 μ m)
移動相	: 0.1 %ギ酸溶液-アセトニトリル = 6:4 (isocratic)
流速	: 2 mL/min
カラム温度	: 40 °C
検出波長	: 337 nm

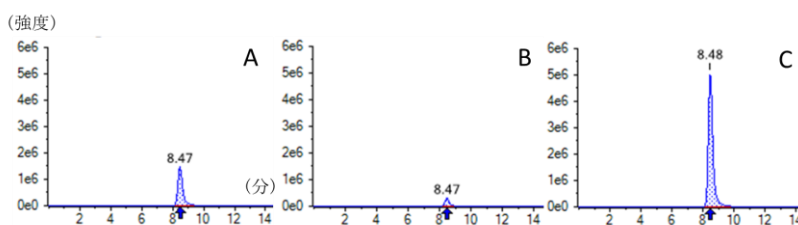


図2 LC-MS/MS測定結果 (m/z 337.0→218.8)
A) ウスタル酸標準品, B) Rt=20, C) Rt=34

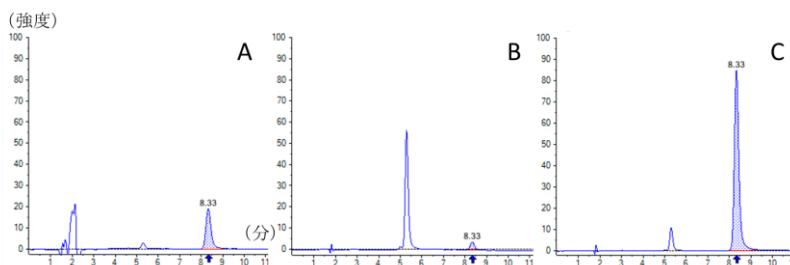


図3 UV335-340 nm測定結果
A) ウスタル酸標準品, B) Rt=20, C) Rt=34

を、保持時間 8.3 分のピークにウスタル酸由来のイオンを確認した。これらの結果を踏まえ、ウスタル酸が主成分と考えられる Rt-34 を濃縮乾固することで、黄色のウスタル酸粗精製物 6.3 mg を得た。

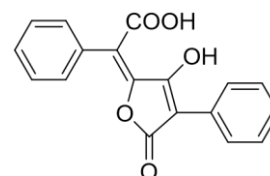


図4 Pulvinic Acid

2-4. 分取 TLC および固相ミニカラムによる精製

ウスタル酸精製物を $^1\text{H-NMR}$ で測定したところ、不純物とみられるシグナルが検出されたため、いくつかの精製操作により不純物の除去を試みた。はじめに、シリカゲルプレートを用いた順相の分取 TLC により、ウスタル酸と考えられる UV 吸収スポットを掻き取り、メタノール抽出を行った。続いて、得られた抽出物を陰イオン交換樹脂 (PSA) のミニカラムにより精製した。このとき、洗浄にはメタノールを、溶出には 0.1 mol/L 塩酸含有メタノールを用い、TLC によりウスタル酸の有無を確認した。最後にウスタル酸画分を濃縮乾固し、淡黄色のウスタル酸精製物 4.0 mg を得た。

2-5. $^1\text{H-NMR}$ による構造確認

2-4 で得た精製品を $^1\text{H-NMR}$ で測定したところ次のようなデータが得られ、既報³⁾データとの一致を確認した。

NMR (CDCl_3 , 500 MHz) : δ 7.43 (4H, d, $J=7.5\text{ Hz}$), 7.39 (4H, t, $J=7.25\text{ Hz}$), 7.34-7.31 (2H, m), 5.42 (2H, s);

また、不純物とみられるシグナルも小さく、高純度のウスタル酸を得ることに成功した。

【考察と今後の課題】

本研究において、カキシメジ 522 g からウスタル酸 3.6 mg (収率 0.00069 %) を単離した。先行研究では、カキシメジ 30.3 kg から単離したウスタル酸は 191.4 mg (収率 0.00063 %)³⁾ であり、より収率よく目的成分を得ることができた。今回単離したウスタル酸は淡黄色である一方、Hayakawa らが合成したウスタル酸は白色固体であり⁴⁾、異なる結果となった。この原因として、化合物が色素と強固に結合している、もしくは、極性が近いために分離できてない可能性が示唆された。実際に有毒成分の抽出から各精製過程において、ウスタル酸を含む画分で着色がみられた。特に、分取 TLC においてウスタル酸含有スポットは黄色を呈しており、PSA の各フラクションはウスタル酸画分のみ着色がみられた。

次に、各分析において単一成分が得られなかった理由として、ウスタル酸の一部が分解し、得られたウスタル酸ジヒドロキシ体がラクトン環の形成により pulvinic acid が生成したためと推測した⁵⁾。

また、近年は研究に使用するカキシメジの確保が困難であり、生検体を用いた検討が十分にできなかった。本研究では主に冷凍保存していたカキシメジを使用した。そのほとんどが採取後 3 年以上経過しており、経年的に毒成分が分解している可能性も考えられる。そのため、十分量の生検体を使用し、今回と同様の結果が得られるか確認が必要である。ウスタル酸の一部が分解しているのであれば、分解条件の解明や分解物と食中毒発生原因

との関係性についても調査が必要と考える。これらに加え、種々の検討を行う上で必要となる量の標準品を確保するために、生のキノコ子実体を多量に入手することが非常に重要な課題である。

最後に、本研究では EPCLC に加え、分取 TLC および固相ミニカラムを組み合わせることで高純度のウスタル酸を得ることができたが、その一方で先行研究³⁾に比べ精製に工程数を要した。今後は、高効率かつ高収率でウスタル酸を得られるよう精製法の見直しを図っていく。また、今回の研究期間で行うことができなかった前処理法および LC-MS/MS による定量分析法について引き続き検討を行っていく。

【謝辞】

ウスタル酸精製品を提供していただいた河岸洋和教授(静岡大学農学部応用生命科学科)に心より感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) 登田ら, わが国における自然毒による食中毒事例の傾向 (平成元年~22年), 食品衛生学雑誌, 2012, **53**, 105-120.
- 2) 厚生労働省食中毒統計資料 (平成23年~令和2年)
- 3) Sano, Y. *et al.* Ustalic acid as a toxin and related compounds from the mushroom *Tricholoma ustale*, *Chem. Commun.*, 2002, 1384-1385.
- 4) Hayakawa, I. *et al.* Synthesis of ustalic acid, an inhibitor of Na⁺, K⁺-ATPase, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 5873-5877.
- 5) Athanasellis, G. *et al.* Tetramic and Tetronic Acids as Scaffolds in Bioinorganic and Bioorganic Chemistry, *Bioinorganic Chemistry and Application*, 2010, Article ID 315056.

【経費使途明細】

使 途	金 額
EPCLC 用カラム	81,004 円
分析用スクリーバイアル	24,640 円
各種溶媒	24,035 円
保管用バイアル等	10,230 円
各種溶媒	9,790 円
HPLC 分取用カラム	126,940 円
保管用バイアル	3,361 円
合 計	280,000 円
大同生命厚生事業団助成金	280,000 円