

## 2) LC/MS/MS による有毒キノコに由来する毒成分の迅速一斉分析法の検討

本田大輔 松本理世 富永純司 小林将英  
山口奈穂 西名武士\* 福島宏暢

### 要旨

有毒キノコによる食中毒発生時に迅速な原因特定を行うため、有毒キノコに由来する 11 種類の毒成分を対象とし、食品試料及び生体試料（血清及び尿）を用いて LC/MS/MS による一斉分析法の検討を行った。また、上記分析法について、妥当性評価ガイドラインに準拠した妥当性評価試験を行ったところ、良好な結果が得られた。

**キーワード：LC/MS/MS, 食中毒, 有毒キノコ, 迅速一斉分析法**

#### はじめに

有毒キノコによる食中毒は全国において過去 10 年間（平成 20~29 年）で 447 件、患者数は 1,286 名であり<sup>1)</sup>、本県においても、過去にツキヨタケやドクツルタケを原因とする食中毒が発生している。毎年のように食中毒事例が報告されていることから、厚生労働省では「有毒な野生キノコによる食中毒の注意喚起について」（平成 30 年 9 月 25 日付け薬生食監発 0925 第 6 号）<sup>2)</sup>において、食用のキノコと確実に判断できないキノコ類の採取、譲渡、販売及び喫食を行わないよう注意喚起を行っている。

食中毒発生時には、一刻も早く原因を特定し、早期治療を行うことが重要であるが、有毒キノコによる食中毒の場合、調理過程を経て原型を留めていない場合も多い。この場合、原因特定には食品残品（以下「食品試料」という。）、又は血清や尿（以下「生体試料」という。）から有毒キノコに由来する毒成分の検出が必要となる。

近年、食中毒の原因特定のためのキノコ毒成分の一斉分析法は多数報告されている<sup>3-6)</sup>が、食品試料と生体試料の両方を対象とした分析法の検討事例はない。

そこで、有毒キノコが原因と疑われる食中毒発生時に、食品試料及び生体試料中からキノコ毒成分を迅速に検出することを目的に、高感度かつ選択性の高い LC/MS/MS を用いたキノコ毒成分の迅速一斉分析法の検討を行った。また、本法について「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」

7)（以下「ガイドライン」という。）に準拠した妥当性評価試験を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

#### 実験方法

##### 1 分析対象成分

過去に食中毒が多く発生している有毒キノコに含有されている主な毒成分（計 11 種類）を分析対象とした（表 1）。

##### 2 試薬等

###### 2.1 標準品

β-amanitin, phalloidin, phalloidin, propargylglycine, muscimol 及び muscarine : Sigma-aldrich 製  
ibotenic acid 及び L-canavanine sulfate : 富士フィルム和光純薬（株）製  
α-amanitin : Calbiochem 製  
γ-amanitin : Enzo Life Sciences 製  
illudin S : 林純薬工業（株）製

###### 2.2 標準溶液

各分析対象成分の標準品を秤量し、メタノール（ただし、L-canavanine sulfate は水）に溶解し、100µg/mL の標準溶液を調製した。（ただし、muscarine は他の成分と比較して感度が高かったため、10µg/mL とした。）また、各標準溶液を混合し、混合標準溶液を調製した。

###### 2.3 その他の試薬等

アセトニトリル（ACN , HPLC 用）、イソプロピル

\* 現健康福祉部薬務衛生課

アルコール (IPA, HPLC 用), メタノール (MeOH, HPLC 用) 及びギ酸 (LC/MS 用): 富士フィルム和光純薬 (株) 製

ギ酸アンモニウム (特級): 関東化学 (株) 製

ろ過フィルター (Econofltr PTFE 0.2µm): Agilent 製

バイアル (ガラス製, 1.5mL): Thermo 製

表1 分析対象成分と含有毒キノコ例

成分名	含有毒キノコ例
1 α-amanitin	ドクツルタケ
2 β-amanitin	タマゴテングタケ
3 γ-amanitin	
4 ibotenic acid	テングダケ ベニテングタケ
5 illudin S	ツキヨタケ
6 L-canavanine sulfate	クロハツ ニセクロハツ
7 phalloidin	タマゴテングタケ
8 phalloidin	ドクツルタケ タマゴテングタケ
9 propargylglycine	テングダケ コテングタケモドキ
10 muscimol	テングダケ クサウラベニタケ
11 muscarine	テングダケ クサウラベニタケ

### 3 試料

#### 3.1 前処理法検討用試料

食品試料として、ツキヨタケとの誤食事例が多いシイタケをフードプロセッサで細切したものを用いた。生体試料として、健常者の血清及び尿を用いた。血清は、血液を遠心 (3,000rpm, 5min) し、上清を分取したものを用いた。

#### 3.2 妥当性評価試験用試料

食品試料として、シイタケ、シイタケの炒め物及びシイタケを入れたみそ汁を用いた。それぞれフードプロセッサで細切後、10µg/g となるように混合標準溶液を添加したものを用いた。生体試料として、健常者の血清及び尿に、100ng/mL となるように混合標準溶液を添加したものを用いた。なお、各試料の添加濃度は、過去の食中毒事例におけるキノコ毒成分の含有量及び生体試料中濃度を参考にした。

#### 3.3 実試料

県内で採取された有毒キノコ (ツキヨタケ, ドクツルタケ及びコテングタケモドキ) をフードプロセッサで細切したものをを用いた。

## 結果及び考察

### 1 LC/MS/MS 測定条件の検討

まず、分析対象成分の各標準溶液をインフュージョンでそれぞれ MS 部へ導入し、イオン化条件を検討した。イオン化は ESI 法で行い、その結果、ポジティブモードにおいて全成分のイオン化が確認された。また、この結果からプロダクトイオンの検索を行い、感度及び選択性が高いものを 2 つずつ選び、定量イオン及び定性イオンとした (表 2)。

表2 分析対象成分 MRM 条件

成分名	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)
α-amanitin	919.1	86.0	191	129
	919.1	259.0	191	51
β-amanitin	920.2	259.0	91	53
	920.2	86.1	91	157
γ-amanitin	903.1	86.1	196	125
	903.1	243.0	196	49
ibotenic acid	159.0	112.8	76	15
	159.0	41.8	76	29
illudin S	265.0	217.0	40	15
	282.0	217.0	40	20
L-canavanine sulfate	177.2	75.9	41	21
	177.2	71.9	41	27
phalloidin	847.1	130.1	31	127
	847.1	811.1	31	29
phalloidin	788.9	753.1	196	25
	788.9	86.0	196	123
propargylglycine	113.9	73.8	26	13
	113.9	68.0	26	13
muscimol	114.9	97.8	46	15
	114.9	97.8	46	20
muscarine	174.1	56.9	141	25
	174.1	43.1	141	51

次に、用いる分析カラム及び移動相は既報<sup>5)</sup>を参考とし、移動相中のギ酸及びギ酸アンモニウムの濃度及び注入量について条件検討を行った。なお、分析対象成分は極性の範囲が広く ibotenic acid, propargylglycine, muscimol 及び muscarine は、試験溶液中の MeOH 濃度

により分析カラムへの保持時間に違いが確認された。そこで試験溶液中の MeOH 濃度を検討したところ、25%MeOH でこれらの成分が良好に保持し、分離されたため、試験溶液の組成は MeOH:水 (1:3) とした。

以上の検討から、得られた LC/MS/MS 測定条件を表 3 に、各成分 (10ng/mL) のクロマトグラフを図 2 に示す。(ただし、muscarine は 1ng/mL)

表3 LC/MS/MS 測定条件

LC 部 Nexera X2(島津製作所製)	
分離カラム	Scherzo SS-C18(50×2.0mm, 粒子径 3μm) (インタクト(株)製)
カラムオープン	40℃
移動相	A 液(水), B 液(MeOH), C 液(0.5% ギ酸含有水), D 液(50mM ギ酸アンモニウム含有水)
グラジエント条件	(表 4 及び図 1 参照)
流量	0.3mL/min
注入量	10μL
洗浄液	R0(水), R1(MeOH), R2 及び R3(ACN:IPA:MeOH:水(1:1:1:1))
MS/MS 部 TRIPLE QUAD5500(AB SCIEX 製)	
Curtain Gas	15 psi
Collision Gas	10 psi
Temperature	550 °C
Ion Source Gas 1/2	70/50 psi
Ion Spray Voltage	5500 V
Entrance Potential	10 V
MRM 条件	(表 2 参照)

表4 各移動相のグラジエント条件

時間 (min)	A 液 (%)	B 液 (%)	C 液 (%)	D 液 (%)
0	95	0	5	0
0.5	95	0	5	0
2.5	40	55	5	0
2.6	0	55	45	0
8	20	55	5	20
8.1	0	0	5	95
12	0	0	5	95
12.1	95	0	5	0
20	95	0	5	0

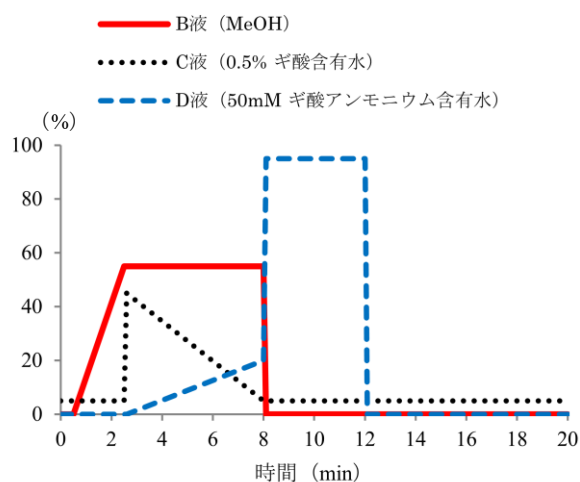


図1 グラジエント条件

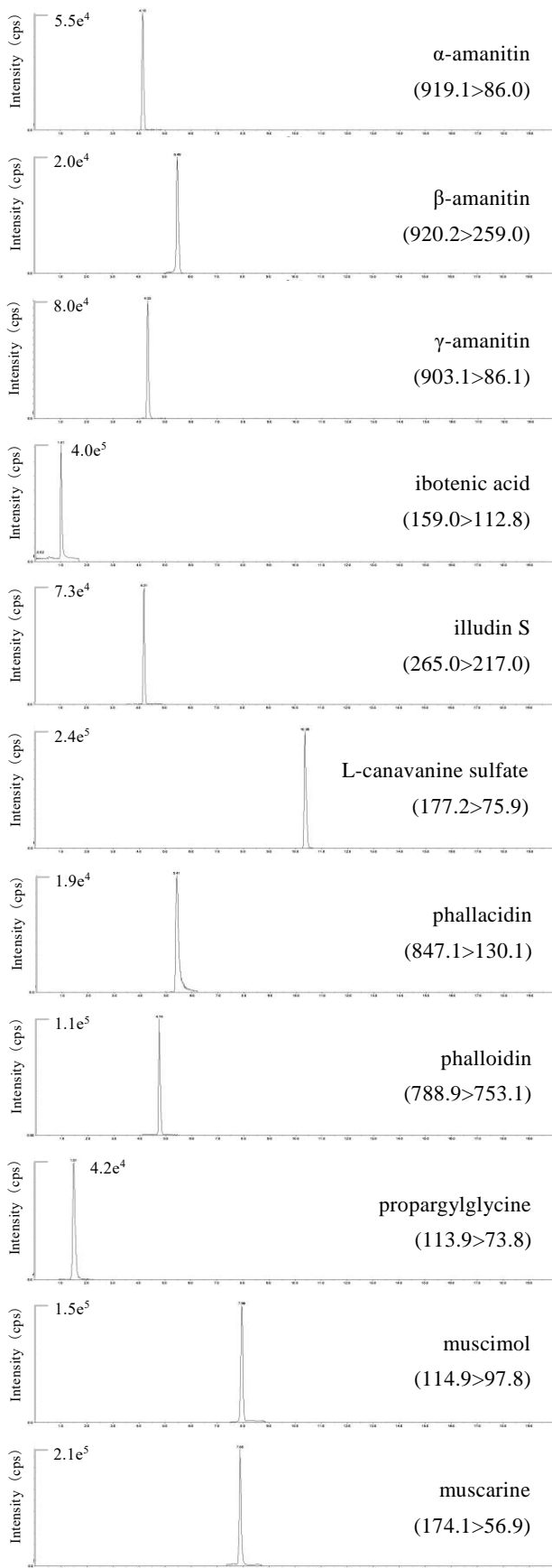


図2 各成分のクロマトグラフ

## 2 定量範囲

定量範囲を設定するため、0.1, 0.5, 1, 5, 10 及び 50ng/mL に希釈した混合標準溶液を本条件で測定した。各成分の保持時間 (min), 定量下限値 (ng/mL, S/N $\geq$ 10) 及び検量線の相関係数 (r) は表 5 のとおりである。なお, 表 5 に示すとおり, すべての成分で良好な相関 (r  $\geq$ 0.9990) が得られたため, この範囲で定量可能であると考えられた。

表5 各成分の保持時間, 定量下限値及び検量線の相関係数

成分名	保持時間 (min)	定量下限値 (ng/mL)	相関係数 (r)
$\alpha$ -amanitin	4.17	0.1	0.9999
$\beta$ -amanitin	5.60	0.1	0.9993
$\gamma$ -amanitin	4.36	0.1	0.9990
ibotenic acid	1.01	0.1	0.9994
illudin S	4.22	0.1	0.9990
L-canavanine sulfate	10.50	0.1	0.9990
phalloidin	5.52	0.1	0.9998
phalloidin	4.77	0.1	0.9998
propargylglycine	1.60	0.1	0.9996
muscimol	8.19	0.1	0.9992
muscarine	8.04	0.01	0.9994

## 3 前処理法の検討

### 3.1 食品試料の前処理法

まず, 食品試料を対象とした前処理法の検討を行った。食品試料はキノコ毒成分を含有する場合, 一般的にその濃度が高く, 定量範囲に入る程度の希釈が必要である。そこで, 前処理法は迅速性及び簡便性に優れた希釈法<sup>8)</sup>で行うこととした。しかし, 希釈法では精製過程を省略するため, 試料又は成分によっては試験溶液中の夾雑物の影響で分析対象成分のイオン化が促進又は抑制(以下「マトリックス効果」という。)され, 測定値に影響を与える可能性が考えられる。また, 一般的にキノコ毒成分を含まない食品試料は入手困難である場合が多く, マトリックス検量線等のマトリックス効果を補正するための手法を用いることは難しいと考えられる。これらのことから, マトリックス効果を見逃すことができる希釈倍率を検証する必要があるためと考えられたため, 希釈倍率とマトリックス効果の検証を行った。なお, 用いる抽出溶媒は, 既報<sup>9)</sup>を参考にギ酸含有 MeOH とし, その濃度を検討した結果, ギ酸濃度 1% で最も良好な結果が得られたため, 1% ギ酸含有 MeOH を用いることとした。

食品試料 1.0g を採り, 1% ギ酸含有 MeOH 5.0mL を加え, 超音波抽出 (5min) 後, 遠心 (3,000rpm, 5min)

し、上清を分取した。残渣に 1%ギ酸含有 MeOH 4.0mL を加え、同様の抽出操作を行い、上清を合わせて 1%ギ酸含有 MeOH で 10mL に定容したものを出出液とした。その抽出液を 25%MeOH で最終希釈倍率 1,000, 2,000, 5,000, 及び 10,000 倍に希釈した後、混合標準溶液を 1ng/mL になるように添加したサンプルと、1ng/mL の混合標準溶液を LC/MS/MS で測定し、それぞれのピーク強度比 (%) を求めた。図 3 に結果を示す。α-amanitin, β-amanitin, γ-amanitin, illudin S, L-canavanine sulfate, phalloidin, phalloidin 及び muscarine は希釈倍率による強度変化はなかったが、1,000 倍希釈では propargylglycine, ibotenic acid 及び muscimol が正のマトリックス効果と考えられるピーク強度の増強がみられた。ただし、これらの成分も希釈倍率を大きくすると徐々にマトリックス効果が小さくなり、10,000 倍希釈するとピーク強度比がほぼ 100% となったため、10,000 倍希釈することでマトリックス効果を見逃すことができると考えられた。なお、有毒キノコ中の毒成分は数 µg/g から数百 µg/g のものが多い<sup>3-7,9,10</sup>。このことから、試料を 10,000 倍希釈しても、試験溶液中の最終濃度は数 ng/mL 程度であるため、表 5 で示した定量下限値以上となり測定は可能と考えられる。

よって、希釈倍率は、マトリックス効果及び定量下限値を考慮し、10,000 倍とした。図 4 に食品試料中キノコ毒成分の分析フロー（以下「第 1 法」という。）を示す。

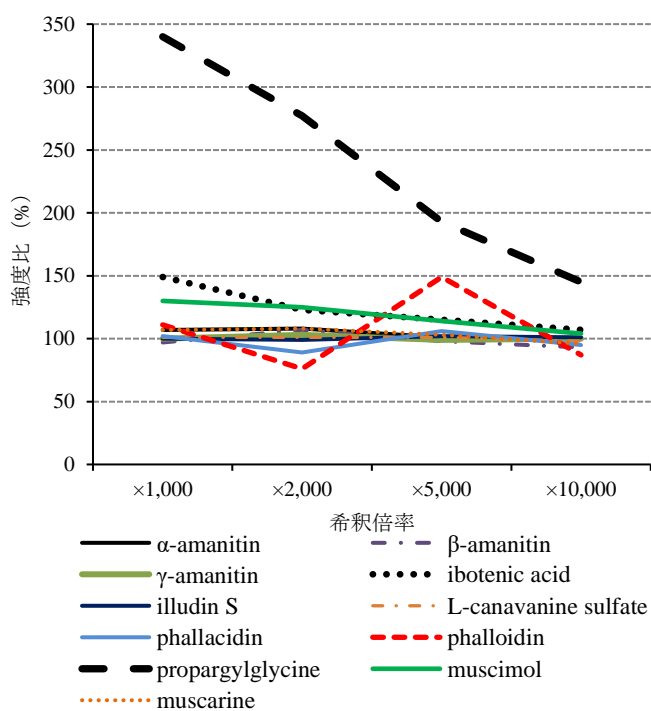


図3 マトリックス効果の検証

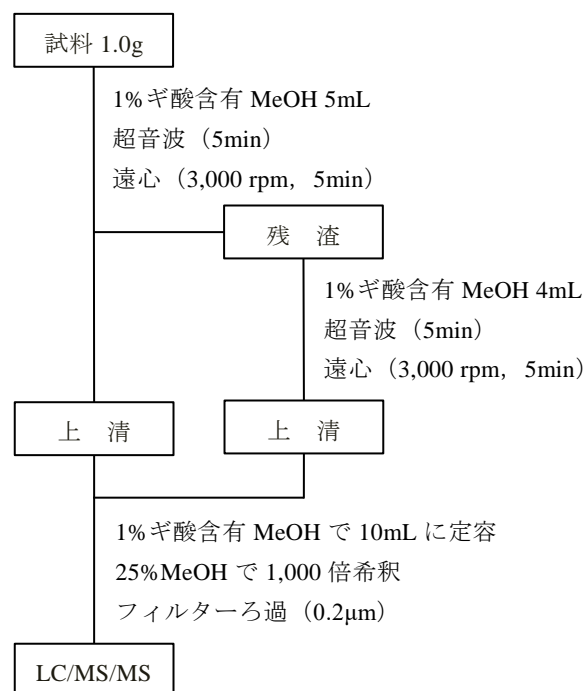


図4 食品試料中キノコ毒成分の分析フロー（第 1 法）

### 3.2 生体試料の前処理法

生体試料中のキノコ毒成分を分析した事例は少ないが、既報で食中毒患者の血漿中 α-amanitin 及び β-amanitin 濃度が 8~190ng/mL 及び 23.5~162 ng/mL であったこと<sup>11</sup>、また、食中毒患者の尿中 β-amanitin 濃度が 50~60 ng/mL であったこと<sup>12</sup>から、生体試料中から数 ng/mL 程度のキノコ毒成分を検出することが必要であると考えられる。しかしながら、第 1 法では試料を 10,000 倍希釈するため、キノコ毒成分の最終濃度が数 pg/mL 程度となり、表 5 で示した定量下限値未満になってしまうため、第 1 法は適用できないと考えられた。

一方、キノコ毒成分を含まない生体試料の入手は可能であると考えられることから、マトリックス検量線を用いることについて検討した。そこで、既に抽出効率等が明らかな第 1 法を準用し、2 回の遠心 (3,000rpm, 5min) 後、水で 5mL に定容したものをさらに遠心 (14,500rpm, 5min) し、その上清を分取し、希釈する方法に変更した。なお、希釈倍率は定量下限値を考慮した希釈倍率 (最終希釈倍率 100 倍) とし、図 5 に生体試料中キノコ毒成分の分析フロー（以下「第 2 法」という。）を示す。

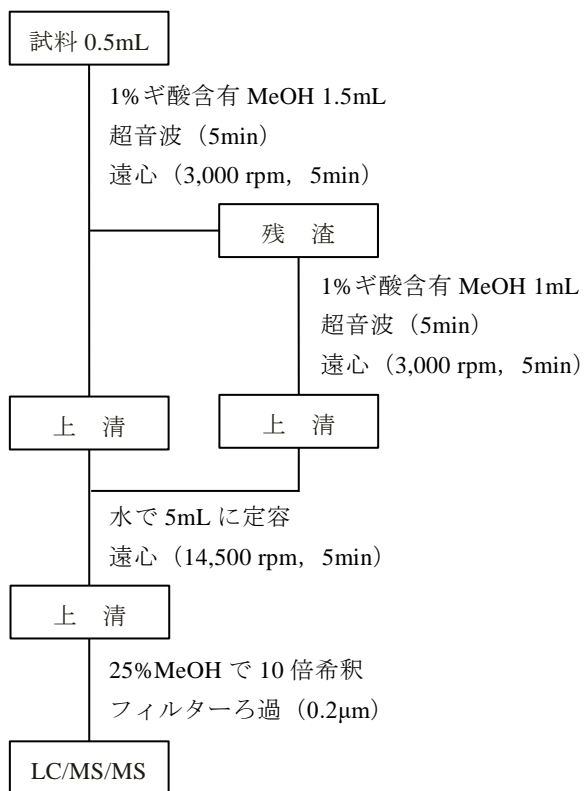


図5 生体試料中キノコ毒成分の分析フロー(第2法)

ここで、第2法により抽出した生体試料を用いたマトリックス検量線を血清と尿のそれぞれで作製し、定量下限値等を確認した(表6)。その結果、定量下限値は尿中の muscarine を除くすべてのキノコ毒成分濃度において 0.1ng/mL(血清中の muscarine は、0.01ng/mL)であり、生体試料中のキノコ毒成分も検出可能であると推察された。なお、尿中の muscarine については、試験溶液中の夾雑物の影響により分析ができなかった。

#### 4 妥当性評価試験

第1法及び第2法について、11種類のキノコ毒成分を対象とし、妥当性評価試験用試料(第1法は食品試料、第2法は生体試料)を用い、ガイドラインに準拠して、分析者5名、2併行の添加回収試験を実施し、真度、併行精度及び室内精度を求めた。その結果を表7に示す。尿中の muscarine を除くすべての成分において、真度及び精度がガイドラインの目標値(添加濃度 >0.1µg/g のとき:真度 70~120%, 併行精度 <10%, 室内精度 <15%, 0.01µg/g <添加濃度 ≤ 0.1µg/g のとき:真度 70~120%, 併行精度 <15%, 室内精度 <20%)を満す良好な結果が得られた。このことから、本法は、食品試料及び生体試料に含まれる 11種類のキノコ毒成分

を分析することが可能であると考えられた。

#### 5 実試料への適用

実際の有毒キノコ(ツキヨタケ、ドクツルタケ及びコテングタケモドキ)を用いて、第1法で分析したところ、各有毒キノコに含まれると考えられる毒成分を検出した(表8)。なお、検出値は既報<sup>3,9)</sup>と近い値であった。

#### まとめ

有毒キノコによる食中毒に対する原因特定のため、迅速なキノコ毒成分の検出を目的として、試料を 1%ギ酸含有 MeOH で抽出後、LC/MS/MS で測定する迅速一斉分析法の検討を行った。なお、本法について食品試料及び生体試料を用いて妥当性評価試験を行ったところ、尿中の muscarine を除くすべての成分についてガイドラインの目標値を満す良好な結果が得られた。

本法が対象とする 11種類のキノコ毒成分は、多種類の有毒キノコに含有されており、過去 10年間(平成 20~29年)に国内で発生したキノコによる食中毒の原因キノコの約 8割に対応し、食中毒が発生する可能性のある有毒キノコに幅広く適用できると考えられる。また、本法は 1検体当たりの前処理時間は 30分程度、LC/MS/MS での測定時間は 20分程度と短時間で、かつ、操作も簡便であるため、突発的に生じる食中毒に対して迅速に対応することができる非常に有効な手法であると考えられる。

#### 謝辞

本研究にあたり、有毒キノコを御提供いただき、また、有毒キノコの生態等について貴重な御指導・御助言をいただきました塩津孝博様に深謝いたします。

#### 文献

- 1) 厚生労働省ホームページ: 毒キノコによる食中毒に注意しましょう
- 2) 「有毒な野生キノコによる食中毒の注意喚起について」厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長通知: 平成 30年 9月 25日付け薬生食監発 0925 第 6号.
- 3) 松下和裕, 若林勇輝, 駒場直行, 他: 栃木県保健環境センター年報, 21, 42-45 (2016)
- 4) 多田裕之, 筑本貴郎, 神山恵理奈, 他: 岐阜県保健環境研究所報, 23, 8-12 (2015).
- 5) 善光寺なおみ, 長島典夫, 今井浩一, 他: 埼衛研所報, 48, 29-34 (2014).

- 6) 立野幸治, 藤原美智子, 三浦泉 : 山口県環境保健センター所報, 52, 54-57 (2009).
- 7) 「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドラインの一部改正について」厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 : 平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号.
- 8) 松本理世, 飛野敏明, 西名武士, 他 : 熊本県保健環境科学研究所報, 44, 28-36 (2014).
- 9) 笠原義正, 伊藤健 : 食品衛生学雑誌 50(4), 167-172, 2009
- 10) 厚生労働省ホームページ : 自然毒のリスクプロファイル
- 11) Jaeger A, Jehl F, Flesch F, 他 : Kinetics of amatoxins in human poisoning therapeutic implications. J Toxicol Clin Toxicol, 31, 63-80 (1993)
- 12) Robinson-Fuentes VA1, Jaime-Sánchez JL, García-Aguilar L, 他 : Determination of alpha- and beta-amanitin in clinical urine samples by Capillary Zone Electrophoresis. J Pharm Biomed Anal. 47, 913-7 (2008)

表6 マトリックス検量線の定量下限値及び相関係数

成分名	血清		尿	
	定量下限値 (ng/mL)	相関係数 (r)	定量下限値 (ng/mL)	相関係数 (r)
α-amanitin	0.1	0.9995	0.1	0.9996
β-amanitin	0.1	0.9996	0.1	0.9999
γ-amanitin	0.1	0.9998	0.1	0.9998
ibotenic acid	0.1	0.9999	0.1	0.9995
illudin S	0.1	0.9995	0.1	0.9999
L-canavanine sulfate	0.1	0.9999	0.1	0.9991
phalloidin	0.1	0.9994	0.1	0.9997
phalloidin	0.1	0.9991	0.1	0.9998
propargylglycine	0.1	0.9998	0.1	0.9999
muscimol	0.1	0.9993	0.1	0.9998
muscarine	0.01	0.9997	-	-

表7 妥当性評価試験結果

(1)食品試料

成分名	シイタケ			シイタケ炒め物			シイタケみそ汁		
	真度 (RSD%)	精度 (RSD%)		真度 (RSD%)	精度 (RSD%)		真度 (RSD%)	精度 (RSD%)	
		併行	室内		併行	室内		併行	室内
α-amanitin	101.6	3.2	3.2	92.5	1.9	3.5	92.1	4.2	4.2
β-amanitin	99.6	3.0	3.0	94.1	3.8	3.8	92.9	4.2	4.2
γ-amanitin	96.0	5.2	5.2	89.4	5.1	5.1	88.7	2.8	4.1
ibotenic acid	102.8	1.9	1.9	96.7	1.5	2.1	95.9	1.9	1.9
illudin S	104.2	4.7	4.7	100.0	3.3	4.2	97.3	2.8	4.7
L-canavanine sulfate	105.3	4.3	4.3	82.9	1.4	2.6	93.1	1.5	2.6
phalloidin	102.2	1.8	2.0	101.6	2.8	2.8	99.9	2.4	2.4
phalloidin	105.6	1.2	2.4	97.3	3.5	5.3	96.1	3.5	4.9
propargylglycine	96.6	1.1	1.8	98.5	2.4	2.5	97.2	2.4	2.4
muscimol	101.7	5.1	5.1	100.6	1.4	1.8	101.1	1.8	1.8
muscarine	102.1	2.0	2.1	99.7	1.4	1.7	100.3	0.9	1.5

(2)生体試料

成分名	血清			尿		
	真度 (RSD%)	精度 (RSD%)		真度 (RSD%)	精度 (RSD%)	
		併行	室内		併行	室内
α-amanitin	93.6	2.9	5.4	99.4	1.0	1.0
β-amanitin	86.6	5.9	8.1	97.6	2.3	3.5
γ-amanitin	90.1	1.2	5.1	101.0	1.3	1.5
ibotenic acid	86.5	3.9	3.9	94.7	3.7	3.7
illudin S	94.4	7.4	7.4	100.5	3.9	6.0
L-canavanine sulfate	95.1	3.0	4.5	107.5	3.0	4.1
phalloidin	85.9	6.1	6.1	101.1	2.2	3.7
phalloidin	86.4	7.4	10.2	90.7	5.8	8.6
propargylglycine	92.9	5.1	5.1	102.7	1.9	3.6
muscimol	90.1	4.9	5.4	99.6	2.2	2.2
muscarine	97.2	5.7	5.7	-	-	-

表8 実試料の分析結果

成分名	キノコ名 (μg/g)		
	ツキヨタケ	ドクツルタケ	コテングタケモドキ
α-amanitin	ND	344.5	ND
β-amanitin	ND	147.7	ND
γ-amanitin	ND	7.5	ND
ibotenic acid	ND	ND	ND
illudin S	8.5	ND	ND
L-canavanine sulfate	ND	ND	ND
phalloidin	ND	ND	ND
phalloidin	ND	221.8	ND
propargylglycine	ND	ND	96.8
muscimol	ND	ND	ND
muscarine	ND	1.8	ND

ND : not detected