

健康被害の防止 食品衛生対策に関する調査研究（平成 28 年度）

ツキヨタケ中の毒性成分イルジン S の分析について

今野 祿朗 松渕 亜希子

ツキヨタケ (*Omphalotus guepiniformis*) 中の毒性成分イルジン S を液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) によって分析した。試料をメタノールで抽出し、固相抽出カラムを用いて精製した試験溶液を LC-MS/MS で測定した。添加回収試験では回収率約 80% と、分析法として有用であることが確認された。本分析法を用いて実試料の分析を行ったところ、281~383 $\mu\text{g/g}$ と高濃度のイルジン S が検出された。煮物を想定した加熱調理試験を行った結果、イルジン S の約 75% がキノコ本体から煮汁へと移行しており、また、調理前後でイルジン S の減少は見られなかった。

1. はじめに

ツキヨタケ (*Omphalotus guepiniformis*) はキシメジ科ツキヨタケ属の有毒キノコであり、シイタケ、ヒラタケなどの食用キノコと間違いやすく¹⁾、食中毒事例が多い。2006 年から 2015 年までの間に全国で 206 件、秋田県で 3 件の食中毒事例が報告されている²⁾。

ツキヨタケの主な毒性成分はイルジン S (図 1) であり、嘔吐などの中毒症状を引き起こすことが報告されている³⁾。ツキヨタケによる食中毒事例ではイルジン S の定性・定量が迅速な原因特定に有用であり、機器分析を用いたイルジン S の分析の検討が行われてきた⁴⁻⁸⁾。

当センターでは 2015 年に秋田県内で起きたツキヨタケによる食中毒事件を受け、LC-MS/MS によるイルジン S の分析法の検討を行った。また、本法を用いて、秋田県内で採取されたツキヨタケの実試料の分析及び加熱調理によるイルジン S の変化を検証したので、その結果について報告する。

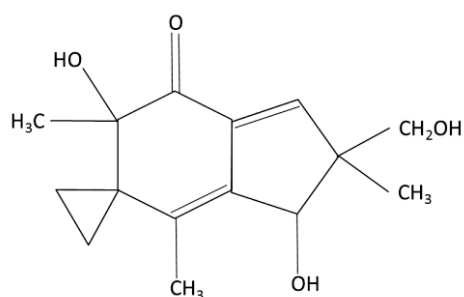


図 1 イルジン S 構造式

2. 方法

2.1 試料

ツキヨタケは 2015 年 9 月に秋田県横手市及び 2015 年 10 月に秋田県由利本荘市で採取されたものをそれぞれ試料とした。試料は使用するまで -30℃ で凍結保存した。試料は解凍後ミキサーで細切し、50 mL ポリプロピレン製遠沈管に 5 g を量り採った。シイタケ、ヒラタケは市販品を用い、ツキヨタケと同様に処理した。

2.2 標準品及び試薬等

イルジン S 標準品は、山形県衛生研究所から譲渡された 100 $\mu\text{g/mL}$ メタノール溶液を使用した。

溶媒は、和光純薬製のメタノール (LC/MS 用、以下 MeOH)、水 (LC/MS 用) を用いた。試薬は和光純薬製のギ酸 (LC/MS 用) を用いた。

精製用カラムは Waters 社製の Oasis HLB (500 mg/6mL) を使用した。

除粒子用メンブランフィルターは Whatman 社製 13 mm GD/X シリンジフィルター (孔径 0.45 μm , PTFE) を用いた。

2.3 器具及び装置

ミキサーは岩谷産業製ミルサー IFM-650D、ハンドホモジナイザーは KINEMATICA 社製 POLYTRON RT1200E を用いた。遠心分離機は久保田製作所製 KUBOTA8850 を用いた。アルミブロック恒温槽は、EYELA 社製 MG-2100 を用いた。

LC-MS/MS は Agilent Technologies 社製 Agilent 1100 (高速液体クロマトグラフ、以下 HPLC)

及び Sciex 社製 API4000（質量分析装置）を用いた。

2.4 測定条件

分析カラムは Waters 社製の AtlantisT3（2.1 mm i.d.×150 mm, 粒子径 3μm）を使用した。

移動相は、A 液に 0.1% ぎ酸水溶液、B 液に MeOH を使用した。カラム温度は 40℃、流速は 0.2 mL/min、注入量は 5 μL とした。

イオン化法は ESI によるポジティブモードで行い、分析モードは Multiple Reaction Monitoring（MRM）とした。

イオンスプレー電圧は 5000 V とし、イオン源温度は 400℃とした。モニターイオンは 265>247 を定量イオン、265>217 を定性イオンとした。

HPLC のグラジエント条件は 0 min（B 液 30%）→10 min（90%）→15 min（90%）→15.1 min

（30%）→25 min（30%）とした。

2.5 試験溶液の調製

試験溶液の調製法を図 2 に示す。

試料 5 g に MeOH 30 mL を加えホモジナイズした。これを遠心分離（1300×g, 5 分間）し、上清を分取した。次に、残渣に MeOH 20 mL を加えホモジナイズ抽出した。遠心分離（1300×g, 5 分間）し、上清を合わせ 50 mL に定容し抽出液とした。精製のため、抽出液 2 mL を分取し、水を加え 20 mL に定容した。Oasis HLB カラムに MeOH 5 mL, 水 5 mL を順に注入しコンディショニングを行った。これに定容した液を負荷し、20%MeOH 5 mL で洗浄後、MeOH 5 mL で溶出した。溶出液を濃縮乾固し、1 mL の MeOH に溶解しフィルターを通し試験溶液とした。

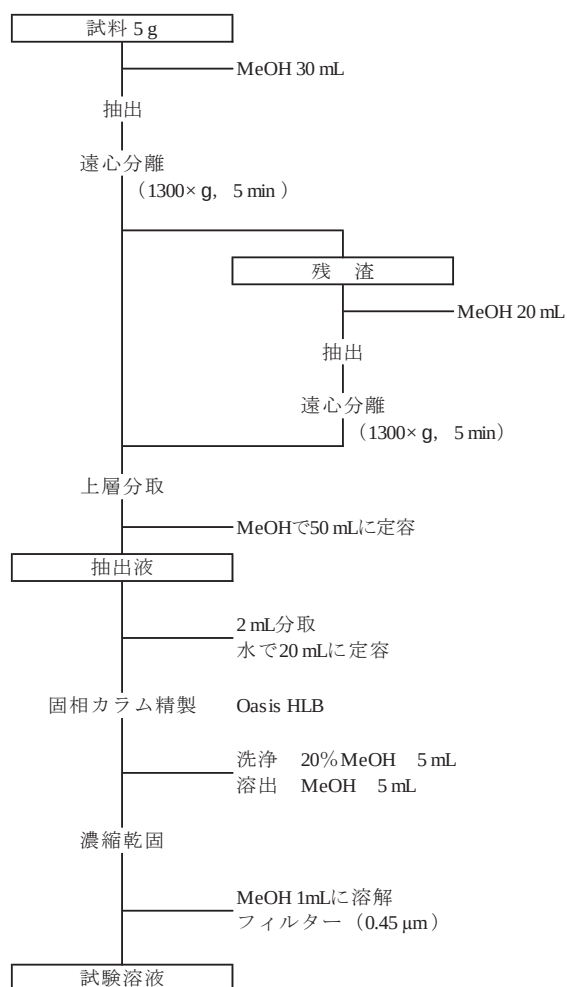


図 2 試験溶液調製フロー

2.6 定量法

イルジン S 標準液を MeOH で希釈し、0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 µg/mL の標準液を調製し、LC-MS/MS 分析で得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成し、絶対検量線法により定量した。

2.7 添加回収試験

シイタケ及びヒラタケに 1 µg/g の濃度になるようイルジン S 標準液を添加し、2.5 試験溶液の調製により試験溶液を調製した。それぞれ n=3 の試行数で行った。

3. 結果及び考察

3.1 イルジン S の測定

イルジン S の LC-MS/MS 測定条件を検討した。MRM 条件はイルジン S 標準溶液をシリンジポンプを用いて直接 MS/MS に注入し、自動最適化により決定した。自動最適化の結果、感度が最も良好であった 265>247 を定量イオン、265>217 を定性イオンに設定した。HPLC の条件は、日常的に残留農薬分析で使用している分析カラムを用いて、移動相及びグラジエント条件を変更することでイルジン S を測定することが可能であった。試験溶液の調製法は笠原らの方法⁴⁾を参考にし、試料を MeOH で抽出し、固相カラム Oasis HLB を用いて精製を行った。

分析法の精度を確認するためイルジン S の添加回収試験を行った。試料にはツキヨタケと外觀が似ており誤食の多いシイタケ及びヒラタケを用いた。分析の結果、回収率は 81.2~84.3% であった（表 1）。定量下限(S/N≥10)はシイタケで 0.24 µg/g、ヒラタケで 0.08 µg/g であった。

過去の分析例⁴⁻⁸⁾では 84~99% の回収率が報告されており、それに比較すると回収率は多少低めではあるが、本法はイルジン S の定性・定量分析に有用と考えられた。

表 1 イルジン S 添加回収試験結果

試料	回収率 (%) *
シイタケ	84.3±3.5
ヒラタケ	81.2±3.3

*平均値±標準偏差 (n=3)

3.2 実試料の測定

本法を用いて、2015 年 10 月に秋田県由利本荘市内で採取したツキヨタケ 3 本についてイルジン S の定量分析を行った。それぞれ分析を行った結果、イルジン S の濃度は 281~383 µg/g であった（表 2）。過去の報告例^{4-5,8)}では 1.9~776.2 µg/g の濃度でイルジン S が検出されており、今回の結果は過去の報告の範囲内であった。

イルジン S の中毒量は明らかにされてはいないが、約 1 mg 程度の摂取により中毒症状を起こす可能性が示唆されており⁴⁾、今回採取したキノコの場合 3~4 g の摂食で中毒症状を起こす可能性があると考えられた。

また採取したキノコの解凍時にはドリップと考えられる水分 120 mL が生じたため、それについてもイルジン S の定量を行った。水分中の濃度は 316 µg/g であり、水分からもキノコと同程度の濃度でイルジン S が検出された。イルジン S は水溶性が高く、キノコから水分に溶出しやすいと考えられる。

表 2 ツキヨタケ中のイルジン S の分析結果

検体名 (重量)	イルジンS濃度 (µg/g) *
ツキヨタケA (122 g)	383±14
ツキヨタケB (109 g)	319±5
ツキヨタケC (183 g)	281±1
水分 (120 mL)	316±4

* 平均値±標準偏差 (n=3)

3.3 加熱調理試験

ツキヨタケを煮物にした場合を想定して、加熱調理によるイルジン S の挙動を確認した。2015 年 9 月に秋田県横手市で採取し、柄を除いたツキヨタケ（重量 45.0 g、イルジン S 含量 248.7 µg/g）を試験に用いた。ツキヨタケに水 300 mL、醤油 30 mL 及び砂糖 5 g を加え 10 分間沸騰加熱により煮物を作製し、キノコと煮汁についてそれぞれイルジン S の定量を行った（表 3）。キノコのイルジン S 濃度は 56.6 µg/g で、煮汁では 37.5 µg/g であった。この結果からそれぞれの総量を算出するとキノコのイルジン S 量は 2.8 mg、煮汁中のイルジン S 量は 8.9 mg となり、約 75% が煮汁へと移行したことになる。ツキヨタケによる食中毒ではキノコ本体を摂食しなくとも、煮汁のみの摂食で中毒を起こす危険があることが考えられた。

また、調理前のイルジン S 総量は 11.2 mg なので回収率は 104% であり、イルジン S の総量は減少していなかった。笠原らの報告⁴⁾ではキノコ汁を想定した調理試験での回収率が 75%

とイルジン S は加熱に対して比較的安定であることが確認されており、今回の結果と合わせ加熱調理ではツキヨタケ中のイルジン S はほとんど減少しないことが示唆された。

4. まとめ

LC-MS/MS を用いてツキヨタケ中の毒性成分イルジン S の分析法の検討を行った。添加回収試験では約 80% の回収率となり、本分析法はイルジン S の定性・定量に有用であった。本分析法を用いて実試料の分析を行い、281～383 µg/g の高濃度でイルジン S を検出した。煮物を想定した加熱調理試験を行ったところ、ツキヨタケ中のイルジン S の 75% が煮汁に流出しており、調理前後でイルジン S の総量は減少していなかった。

5. 謝辞

イルジン S 標準物質を提供していただきました山形県衛生研究所の皆様に深く感謝いたします。

表 3 加熱調理試験結果

	試料	重量 (g)	イルジンS濃度* (µg/g)	総量 (mg)	回収率 (%)
調理前	ツキヨタケ	45.0	249	11.2	—
	水+醤油	300+30	—	—	
調理後	ツキヨタケ	49.5	56.6	2.8	104
	煮汁	237	37.5	8.9	

* 平均値 (n=2)

参考文献

- 1) 工藤伸一：東北きのこ図鑑，家の光協会，2009，258.
- 2) 厚生労働省ホームページ，
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-3>
- 3) 笠原義正他：ツキヨタケの胃腸管毒性及び塩蔵による減毒，食品衛生学雑誌，37，1996，1-7.
- 4) 笠原義正他：LC/MS/MS によるツキヨタケ及び食中毒原因食品中の illudin S の分析，食品衛生学雑誌，50，2009，167-172.
- 5) 和田章伸他：ツキヨタケの中毒成分 illudin S の LC/MS/MS による分析，山形県衛生研究所報，43，2010，1-5.
- 6) 多田裕之他：LC-MS/MS によるキノコ及び魚介類の中毒成分迅速分析法，岐阜県保健

環境研究所報, 21, 2013, 1-7.

- 7) 善光寺なおみ他：毒キノコ及びチョウセンアサガオに含まれる有毒成分のLC-MS/MSを用いた一斉分析法の検討, 埼

玉県衛生研究所報, 48, 2014, 29-34.

- 8) 青柳光敏他：胃洗浄液及びツキヨタケ中イルジンSの分析法の検討, 北海道衛生研究所報, 65, 2015, 25-28.