

【資 料】

テングタケに含まれるムシモール及びイボテン酸のLC-MS/MSを用いた一斉分析法の検討

Development of simultaneous analysis for muscimol and ibotenic acid in *Amanita pantherina* by LC-MS/MS

難波順子, 藤本佳恵, 金子英史, 佐藤 淳, 繁田典子

NAMBA Junko, FUJIMOTO Kae, KANEKO Hidefumi, SATO Atsushi, SHIGETA Noriko

要 旨

テングタケに含まれる毒成分であるムシモール及びイボテン酸のLC-MS/MSを用いた一斉分析法を検討した。試料0.2 gを採り、0.5 %ギ酸含有メタノール5 mL及び水5 mLで順次抽出し、メタノール：水(1:1)溶液で10 mLに定容したものを抽出液とした。精製法には固相カラムはOasis PRiME HLB及びCaptiva EMR-Lipidを用い、希釈後、LC-MS/MSで測定する分析法を構築した。シイタケを用いて添加回収試験を行ったところ、良好な回収率が得られ、検討した前処理法はキノコ試料に適用可能であることが確認できた。凍結乾燥したテングタケを用いて検査を行ったところ、ムシモールが1500 µg/g、イボテン酸が9500 µg/g検出された。

[キーワード：植物性自然毒, キノコ, ムシモール, イボテン酸, 液体クロマトグラフタンデム質量分析計]

[Key words : Natural plant poison, Mushroom, Muscimol, Ibotenic acid, LC-MS/MS]

はじめに

毒キノコを食用キノコと誤認して採取、喫食したことによる食中毒が夏の終わりから秋にかけて多発するため、厚生労働省から例年、毒キノコによる食中毒発生予防が注意喚起される等の対策が進められている¹⁾。しかし、毒キノコによる食中毒は、平成24～令和3年の10年間に全国で302件発生し、820人が嘔吐や下痢などの症状を訴え、死亡数も3人に上っている。原因となる主な毒キノコは件数が多い順に、ツキヨタケ、クサウラベニタケ、テングタケであり、この3種類で7割以上を占めている¹⁾。

自然毒による食中毒発生時の原因物質の特定は、再発防止のための注意喚起はもとより、有効な治療法の選択にも非常に重要である。岡山県で毒キノコの喫食を疑う食中毒事例が発生した場合、調理残品のキノコを形態学的に同定しているが、高度な専門的知識を要するうえ、調理等による形状変化で同定不能となる恐れがある。そのため、LC-MS/MSを用いたキノコ中の毒成分の分析法の確立が必要不可欠である。

今般、検討に当たり毒キノコによる食中毒の中で比較的頻度が高く、標準物質の活用が可能なものをまずの対象とすることとし、テングタケを取り上げて検討を進めた。テングタケは、テングタケ科テングタケ属の毒キノコであり、初夏から秋にかけて広葉樹林の地上に発生し、

茶色の傘に白色のいぼが付く特徴を有している。毒成分としてはムシモール及びイボテン酸を含有し、人が経口摂取した場合、食後30分程で嘔吐、下痢、腹痛など胃腸消化器の中毒症状や、神経系の中毒症状であるめまい、痙攣などが現れる。症状は概ね1日程度で回復するが、重篤な場合は呼吸困難となり、古くは死亡例もある²⁾。今回、これら毒成分の一斉分析法を確立するとともに実サンプルへの適応を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

試料として、添加回収試験には市販のシイタケを用い、実サンプルには岡山県農林水産総合センター森林研究所から分与された凍結乾燥したテングタケを用いた。

2. 標準品、固相カラム及び試薬

標準品：富士フィルム和光純薬製ムシモール、

Sigma Aldrich製イボテン酸

標準原液：各標準品1 mgを精秤後、メタノール：水(1:1)溶液に溶解し、10 mLに定容して標準原液(100 µg/mL)を調製した。

混合標準原液：各標準原液(100 µg/mL)を各0.1 mLずつ分取して混合し、メタノール：水(1:1)溶液で10 mLに定容して1 µg/mLの混合標準原液を調製した。

溶媒混合標準溶液：混合標準原液を順次、メタノール：

水 (1:1) 溶液で希釈して調製した。

(5, 10, 50, 100, 200, 400 ng/mL)

固相カラム：Waters製 Oasis PRiME HLB 6 cc(500 mg)

(以下「PRiME500mg」という。)

Waters製 Oasis HLB 20 cc (1g)

(以下「HLB1g」という。)

Varian製 Bond Elut LRC-C18

(以下「LRC-C18」という。)

それぞれ、あらかじめメタノール5 mL, 水5 mL, メタノール：水 (1:1) 溶液5 mLで順次洗浄した後、使用した。

Agilent製 Captiva EMR-Lipid 1mL (40 mg)

(以下「Captiva」という。)

メンブレンフィルター：Millipore製 Millex-LCR 0.45 µm

その他の試薬は残留農薬・PCB用又はLC/MS用を用いた。

3. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は善光寺らの方法³⁾を参考にした。15 mLポリプロピレンチューブに細切した試料0.2 gを採り、0.5 %ギ酸含有メタノール5 mLを加えてホモジナイズし、5000 × gで10分間遠心分離し上清を分取した。残留物に水5 mLを加え、同様の抽出操作を行い、上清を合わせてメタノール：水 (1:1) 溶液で10 mLに定容したものを抽出液とした。抽出液1 mLを固相カラム PRiME500mgに通液させ、メタノール：水 (1:1) 溶液6 mLで溶出させた。負荷液を含めて溶出した液を水で10 mLに定容し、PRiME500mg精製液とした。その内1 mLをCaptivaに負荷し、2000 × gで2分間、室温で遠心分離し溶出した液を捨てた。次に、再度、PRiME500 mg精製液1 mLを負荷し、2000 × gで2分間、室温で遠心分離し溶出した液を採取し、メンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。更に、メタノール：水 (1:1) 溶液で適宜希釈し、LC-MS/MSで測定した。

4. LC-MS/MS分析

LCは島津製作所製LC-20A 高圧グラジエントシステムを使用した。MS/MSはAB SCIEX社製API3200 QTrapを使用した。LC-MS/MS測定条件は表1に示した。

5. 定量

LC-MS/MS(SRM) 測定で得られた標準溶液及び試験溶液のピーク面積から絶対検量線により試験溶液中の濃度を求め、試料中の含量を算出した。

6. 添加回収試験

シタケ中のムシモール及びイボテン酸の濃度が50 µg/g又は200 µg/gになるように混合標準原液を抽出液に添加したのについて、3併行で添加回収試験を行っ

た。精製法は3種類 (①~③) を比較した。精製法①はPRiME500mgに、抽出液1 mLを負荷後、メタノール：水 (1:1) 溶液6 mLで溶出させ、負荷液を含めて溶出した液を水で10 mLに定容した。このPRiME500mg精製液を希釈なし、2, 5倍希釈 (抽出液に換算すると10, 20, 50倍希釈) して測定した。精製法②はCaptivaを用い、抽出液1 mLをカラムに負荷、遠心後廃棄し、再び抽出液

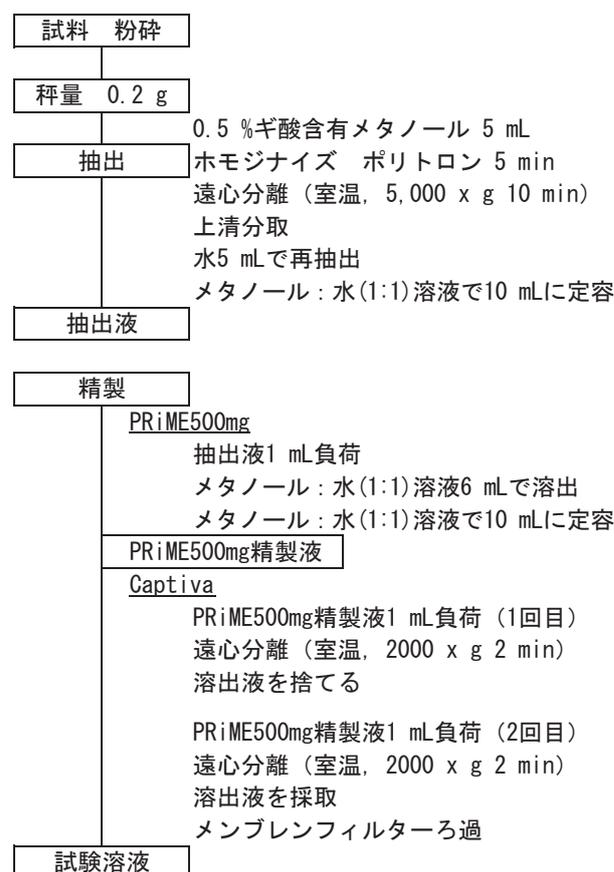


図1 分析フロー

表1 LC-MS/MS条件

| Parameter | Setting | | | | |
|-----------------------|--|------------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------------|
| LC Conditions | | | | | |
| LC column | Atlantis HILIC Silica 150 mm × 2.1 mm i.d. 3 µm | | | | |
| Mobile phase | A:0.5 % formic acid solution B:CH ₃ CN | | | | |
| Gradient (B%) | 70 % (0-3 min) → 40 % (21 min) → 70 % (22 min) → 70 % (25 min) | | | | |
| Column temperature | 40°C | | | | |
| Flow rate | 0.2 mL/min | | | | |
| Injection volume | 5 µL | | | | |
| MS Conditions | | | | | |
| Ionization mode | ESI (positive) | | | | |
| Ion-spray voltage | 5,500 V | | | | |
| Turbo gas temperature | 550°C | | | | |
| Ion source gas (GS1) | 70.0 psi | | | | |
| Ion source gas (GS2) | 50.0 psi | | | | |
| Transition | | | | | |
| Compounds | Precursor ion (m/z) | Product ion Quantifier (m/z) | Product ion Qualifier (m/z) | Collision energy (V) | Declustering potential (V) |
| muscimol | 115 | 68 | - | 27 | 26 |
| | | - | 98 | 17 | 31 |
| ibotenic acid | 159 | 113 | - | 15 | 26 |
| | | - | 114 | 21 | 26 |

1 mLをカラムに負荷、遠心後分取した。このCaptiva精製液を10, 20, 50, 100倍希釈（抽出液に換算すると10, 20, 50, 100倍希釈）して測定した。精製法③は①で得られたPRiME500mg精製液1 mLをCaptivaに負荷し、遠心後廃棄し、再び1 mLをカラムに負荷、遠心後採取した。このPRiME500mg及びCaptiva精製液を希釈なし、2, 5倍希釈（抽出液に換算すると10, 20, 50倍希釈）して測定した。以下は抽出液に換算した希釈倍率で示す。

7. 実サンプルへの適用

テングタケを用いて、精製法③で前処理を行い、試験溶液を5, 10, 50, 100, 200, 400倍希釈（抽出液に換算すると50, 100, 500, 1000, 2000, 4000倍希釈）して測定した。

結果及び考察

1. LC-MS/MS測定条件

LC-MS/MS測定条件の検討を行った。MS条件は、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）の（+）モードを用い、インフュージョンにより定量性及び感度良く測定できる条件を設定した。プリカーサーイオンとして、一番強度が強いイオンである〔M+H〕⁺を選択した場合に得られるプロダクトイオンの中で、一番強度が強いイオンを定量イオン、次に強度が強いイオンを定性イオンとした。LC-MS/MS測定条件を表1に示す。LC条件は、南谷の方法⁴⁾を参考に、分析カラムにAtlantis HILIC Silica（内径2.1 mm, 長さ15 cm, 粒子径3 μm：Waters社製）、COSMOSIL HILIC（内径2.1 mm, 長さ15 cm, 粒子径3 μm：ナカライテスク社製）及びPC HILIC（内径2.1 mm, 長さ15 cm, 粒子径3 μm：SHISEIDO社製）を用いて比較したところ、Atlantis HILIC Silicaを用いた場合にピーク面積が最大であり、形状も良好であったので採用した。

表2 分析溶媒の組成によるピークの比較

| 分析溶媒 | MeOH : H ₂ O (1:1) | | | H ₂ O | | | MeOH | | | 5 mmol/L ギ酸アンモニウム | | |
|-------|-------------------------------|--------|--------|------------------|--------|--------|-----------|--------|--------|-------------------|--------|--------|
| | R. T. (分) | 面積 (%) | 高さ (%) | R. T. (分) | 面積 (%) | 高さ (%) | R. T. (分) | 面積 (%) | 高さ (%) | R. T. (分) | 面積 (%) | 高さ (%) |
| ムシモール | 4.64 | 100 | 100 | 4.61 | 101 | 78 | 4.67 | 98 | 117 | 4.16 | 61 | 181 |
| イボテン酸 | 3.13 | 100 | 100 | 3.09 | 87 | 79 | 3.19 | 82 | 116 | 3.06 | 87 | 73 |

表3 固相カラムからの溶出率 (%)

| 固相カラム | PRiME500mg | | | | | HLB1g | | | | | LRC-C18 | | | | Captiva | |
|-------|------------|-----|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|---------|-----|-------|-------|---------|-----|
| | 溶出液 | 負荷液 | 0-2mL | 2-4mL | 4-6mL | 合計 | 負荷液 | 0-2mL | 2-4mL | 4-6mL | 合計 | 負荷液 | 0-2mL | 2-4mL | | 合計 |
| ムシモール | | 0 | 87 | 5 | 2 | 94 | 0 | 1 | 75 | 10 | 86 | 0 | 0 | 0 | 0 | 95 |
| イボテン酸 | | 13 | 86 | 10 | 3 | 112 | 0 | 45 | 42 | 6 | 93 | 47 | 51 | 3 | 100 | 108 |

2. 測定溶媒の組成

標準品を溶解する溶媒の検討を行った。メタノール：水 (1:1) 溶液に溶解した100 ng/mL混合標準溶液のピーク面積及び高さを100 %とし、水、メタノール及び5 mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液に溶解した100 ng/mL混合標準溶液のピーク面積及び高さの比を表2に示した。ピーク面積はムシモール及びイボテン酸共にメタノール：水 (1:1) 溶液に溶解した場合が概ね最大であった。ピーク高さは、ムシモールは5 mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液に溶解した場合、イボテン酸はメタノールに溶解した場合が最大であり、ピーク形状が良好であった。操作性やピーク面積を考慮して、メタノール：水 (1:1) 溶液を用いた。

3. 定量限界及び検量線の直線性

混合標準溶液をSRM測定したところ、全ての混合標準溶液でS/N>10を満たしていた。検量線は、5~1000 ng/mLの範囲で決定係数 (r²)0.996以上の直線性が認められた。

4. 前処理法の検討

抽出は善光寺らの方法³⁾を参考にして、試料0.2 gを採り、0.5 %ギ酸含有メタノール5 mL及び水5 mLで順次抽出し、メタノール：水 (1:1) 溶液で10 mLに定容したものを抽出液とした。

精製に用いる固相カラムの検討を行った。Captiva以外のカラムは、コンディショニング後にメタノール：水 (1:1) 溶液に、混合標準溶液を100 ng/mLとなるように添加した負荷液1 mLをカラムに負荷し、メタノール：水 (1:1) 溶液で溶出した。Captivaは負荷液1 mLをカラムに負荷、遠心後廃棄し、再び負荷液1 mLをカラムに負荷、遠心後分取した。結果を表3に示す。PRiME500mg及びHLB1gは溶出液6 mLに、Captivaは溶出液にムシモー

ル及びイボテン酸共に大部分が溶出した。LRC-C18はイボテン酸は溶出液4 mLで溶出したが、ムシモールは全く溶出しなかった。溶出液量及び操作性を考慮して、PRiME500mg及びCaptivaを採用した。

5. 添加回収試験結果

検討した前処理法の検証のため、抽出液に混合標準原液を添加したのについて、3併行で添加回収試験を行った。固相カラムと精製された試験溶液の希釈倍率の比較を行った結果を表4に示す。

まず、添加濃度を50 µg/gになるように添加して回収率を求めたところ、回収率は固相カラムの種類による顕著な相違は見られなかった。希釈倍率を上げるほど回収率が改善する傾向が認められ、ムシモールの平均回収率は10倍希釈で60 %程度であるが、100倍希釈で100 %程度と良好な値であり、イボテン酸の平均回収率は10倍希釈で40 %程度であるが、100倍希釈で80 %以上と良好な値となった。希釈することにより、イオン化抑制等のマトリックスの影響が低減し、回収率が改善したと推測された。

佐藤らが報告⁵⁾しているテングタケからの検出値は、ムシモールが230 ± 69 µg/g、イボテン酸が780 ± 170 µg/gと高濃度であるため、次に、添加濃度を200 µg/gになるように添加して回収率を求めた。回収率は、添加濃度50 µg/gの場合と同様に、固相カラムの種類による顕著な相違は見られなかった。ムシモールの平均回収率は50倍希釈で76 %以上、100、200倍希釈で80 %以上

となり、イボテン酸の平均回収率は50倍希釈で50 %以上、100、200倍希釈で72 %以上と良好な値であった。

これらの結果より、この前処理法は精製法①～③全てがキノコ試料に適応可能であること、抽出液を固相カラムで精製後、抽出液に換算して100倍以上希釈することにより定量が可能であることが確認できた。マトリックスの影響を極力低減させるため、精製法は③を選択することとした。なお、食中毒など緊急時には、①又は②を選択して迅速に対応することも考慮すべきと考えられる。

6. 実サンプルへの適用

食中毒の原因キノコであるテングタケを用い、精製法③を採用して前処理を行い、試験溶液を5、10、50、100、200、400倍希釈（抽出液に換算すると50、100、500、1000、2000、4000倍希釈）して測定した。希釈した試験溶液の濃度測定値にそれぞれ希釈倍率を乗じた値を算出し、4000倍希釈の値を100として比較した結果を表5に示す。ムシモール及びイボテン酸共に100倍以上の希釈で80 %以上、500倍以上の希釈で90 %以上となり、希釈によるマトリックスの影響の低減が認められた。シイタケで検討した結果よりも感度が高い結果が得られたが、これはマトリックスの違いのためと推測される。検体中の濃度は、ムシモールが1500 µg/g、イボテン酸が9500 µg/gであった。今回、凍結乾燥した検体であり、キノコ本来の水分含量が不明であるが、シイタケ及びまいたけの水分含量（86 %及び91 %⁶⁾を参考として、テングタケの水分含量を90 %と仮定して算出すると、テ

表4 シイタケを用いた添加回収試験の回収率 (%)

| 添加濃度 | 50 µg/g | | | | | | | | | | | |
|-------|---------|----|----|-----|----|----|----|-----|----|----|----|-----|
| 精製法 | ① | | | | ② | | | | ③ | | | |
| 希釈倍率 | 10 | 20 | 50 | 100 | 10 | 20 | 50 | 100 | 10 | 20 | 50 | 100 |
| ムシモール | 62 | 75 | 81 | 103 | 62 | 72 | 64 | 100 | 61 | 74 | 84 | 99 |
| イボテン酸 | 38 | 45 | 56 | 83 | 39 | 46 | 45 | 87 | 38 | 42 | 52 | 87 |

| 添加濃度 | 200 µg/g | | | | | | | | |
|-------|----------|-----|-----|----|-----|-----|----|-----|-----|
| 精製法 | ① | | | ② | | | ③ | | |
| 希釈倍率 | 50 | 100 | 200 | 50 | 100 | 200 | 50 | 100 | 200 |
| ムシモール | 82 | 84 | 100 | 76 | 80 | 89 | 82 | 82 | 101 |
| イボテン酸 | 62 | 73 | 78 | 50 | 72 | 75 | 63 | 73 | 81 |

① PRiME500mg
② Captiva
③ PRiME500mg + Captiva

表5 テングタケのキノコ毒検出値の希釈による比較 (%)

| 希釈倍率 | 50 | 100 | 500 | 1000 | 2000 | 4000 |
|-------|----|-----|-----|------|------|------|
| ムシモール | 78 | 81 | 94 | 94 | 97 | 100 |
| イボテン酸 | 72 | 80 | 96 | 98 | 101 | 100 |

ングタケ中の含有量は、ムシモールが150 µg/g、イボテン酸が950 µg/gとなった。報告されているテングタケ中の含有量は、善光寺らが報告³⁾しているムシモールが3.6~69 µg/g、イボテン酸が17~119 µg/g、佐藤らが報告⁵⁾しているムシモールが230 ± 69 µg/g、イボテン酸が780 ± 170 µg/g及び野田⁷⁾が報告しているムシモールが42~182 µg/g、イボテン酸が441~444 µg/gであり、正確な比較はできないが、今回の値と大きな相違はなく、テングタケ中のムシモール及びイボテン酸の含有量を定量する方法としての活用の可能性が示唆された。

今後は、更に低濃度での添加回収試験及び加工品を用いた添加回収試験を行うために、LC-MS/MS測定条件及び前処理法の再検討を行いたい。また、他の毒キノコの毒成分分析法の開発を進めたいと考える。

まとめ

LC-MS/MSを用いたキノコ中のムシモール及びイボテン酸の一斉分析法を検討した。試料 0.2 gを採り、0.5 %ギ酸含有メタノール5 mL及び水5 mLで順次抽出し、メタノール：水(1:1)溶液で10 mLに定容したものを抽出液とした。精製法に用いる固相カラムはPRiME500mg及びCaptivaを採用し、希釈後LC-MS/MSで測定する分析法を構築した。添加回収試験を行ったところ、以下の結果を得た。

- (1)ムシモール及びイボテン酸のSRMモードによるLC-MS/MS測定を行った。LCカラムにAtlantis HILIC Silicaを用い、感度良く測定できる条件とした。検量線は、5~1000 ng/mLの範囲で決定係数(r^2)0.996以上の直線性が認められた。
- (2)精製に用いる固相カラムはPRiME500mgのみの方法、Captivaのみの方法及びPRiME500mgの溶出液をCaptivaに負荷する方法を検討したが、回収率に相違はなかったため、PRiME500mgとCaptivaを併用する精製法を採用した。
- (3)シイタケを用いて添加回収試験を行ったところ、抽出溶液を固相カラムによる精製及び抽出液に換算して100倍以上希釈することにより、マトリックスの影響が低減され、良好な回収率が得られた。今回検討した前処理法はキノコ試料に適応可能であることが確認できた。
- (4)凍結乾燥したテングタケ検体中の濃度は、ムシモールが1500 µg/g、イボテン酸が9500 µg/gであり、水分含量等を考慮すると、過去の報告例に相当する濃度であると推定された。

謝 辞

毒キノコの供与に御尽力いただいた岡山県農林水産総合センター森林研究所林業研究室藤原直哉特別研究員に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ：健康・医療、毒キノコによる食中毒に注意しましょう、
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/kinoko/index.html (2023.4.5アクセス)
- 2) 厚生労働省ホームページ自然毒のリスクプロファイル：テングタケ (Amanita pantherina) テングタケ科テングタケ属、
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000142712.html> (2023.4.5アクセス)
- 3) 善光寺なおみ、長島典夫、今井浩一、大阪郁恵、石井里枝、高野真理子：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 29-34(2014)
- 4) 南谷臣昭：令和元年度厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業 植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究 研究分担報告書「植物性自然毒の多成分同時分析法の開発」
- 5) 佐藤正幸、姉帯正樹：テングタケ類に含有されるイボテン酸及びムシモールの分析、北海道衛生研究所報、64 27-33(2014)
- 6) 金井英男：小型凍結乾燥機を用いた博物館標本の作製、群馬県立自然史博物館研究報告、10 129-134(2006)
- 7) 野田拓史：毒キノコによる食中毒の検査体制の構築(第3報) 福井県衛生環境研究センター年報、19, 36-42(2021)