

## ツキヨタケ入りキノコ汁中の illudin S の分析

徳島県立保健製薬環境センター

中西 淳治・高瀬 真紀・豊田 正仁

安永 恵<sup>\*1</sup>・白石 泰郎<sup>\*2</sup>・影山 温子<sup>\*3</sup>

Analysis of illudin S in mushroom soup including *Omphalotus guepiniformis*

Junji NAKANISHI, Maki TAKASE, Masahito TOYOTA, Megumi YASUNAGA, Tairou SHIRAIISHI and Atsuko KAGEYAMA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

### 要 旨

ツキヨタケ入りキノコ汁による食中毒事件を想定し、キノコ汁中の illudin S を LC/MS/MS を用いて定量する方法を検討した。まず、事前検討として、illudin S を添加したシイタケ等入りキノコ汁を作製し、3 種類の固相抽出ミニカラムを組み合わせた 4 通りの精製方法について添加回収試験を行った。その結果、いずれも良好な回収率を得たことから、C18 あるいは HLB ミニカラムを単独で使用する 2 通りの方法を採用した。次に、本試験として、illudin S 含量が既知のツキヨタケを用いてキノコ汁を作製し、illudin S を定量したところ、同様に良好な回収率が得られたことから、調理加工したツキヨタケにも十分適用可能であることが分かった。

**Key words :** ツキヨタケ *Omphalotus guepiniformis*, イルジン S illudin S, 液体クロマトグラフィー質量分析法 LC/MS/MS

### I はじめに

四国では「四国はひとつ」の理念のもと、平成 15 年度から種々の連携事業を実施しており、地方衛生研究所においても研究所間の連携強化を目指して様々な事業を実施してきた。平成 27 年度は「植物性自然毒に関する検査技術等の向上」をテーマとした事業が採択され、ツキヨタケ中の illudin S を対象とした分析法の検討を行うこととなり、当センターは調理品に含まれる illudin S の分析法の検討を担当した。

illudin S は、キシメジ科ツキヨタケ属ツキヨタケに含まれる有毒成分で、喫食すると 30 分から 1 時間程で嘔吐、下痢、腹痛などの消化器系の中毒症状が現れる。幻覚痙攣を伴う場合もあるが、翌日から 10 日ほどで回復する<sup>1)</sup>。

ツキヨタケによる食中毒事件は毎年全国で発生しており、その原因はシイタケ、ヒラタケ、ムキタケなどと誤認し、調

理することによるものが多い<sup>1)</sup>。厚生労働省が作成している食中毒発生状況によると、平成 27 年度に発生した毒キノコによる食中毒事件は 38 件あり、ツキヨタケが原因の食中毒事件は 14 件と全体の 4 割近くを占めている<sup>2)</sup>。

illudin S の検査方法は、公定法として示されていないが、笠原らによる LC/MS/MS を使用した方法<sup>3),4)</sup>、Kanamori-Kataoka らによる GC/MS を使用した方法<sup>5)</sup>などが報告されている。

本研究では、ツキヨタケ入りキノコ汁による食中毒事件を想定し、事前検討としてシイタケ等を用いたキノコ汁における illudin S の添加回収試験を行った。また、本試験として四国 4 県の担当者が集まり、ツキヨタケを用いたキノコ汁における illudin S の定量を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

<sup>\*1</sup> 香川県環境保健研究センター <sup>\*2</sup> 愛媛県立衛生環境研究所

<sup>\*3</sup> 高知県衛生研究所

## II 方法

### 1 分析対象物質

分析対象物質は、図1に示す illudin S ( $C_{15}H_{20}O_4$ , MW264.1) とした。

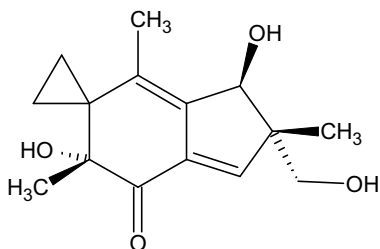


図1 illudin S の構造式

### 2 試料

ツキヨタケは高知県衛生研究所から供与されたものを用いた。なお、ツキヨタケ中の illudin S 含量は 203.1  $\mu\text{g/g}$  である。

### 3 試薬

illudin S 標準品は山形県衛生研究所から供与されたツキヨタケ抽出品 100  $\mu\text{g/mL}$  メタノール溶液を用いた。標準品を適宜メタノールで希釈して標準溶液とした。メタノールは関東化学(株)製 (HPLC 用) を用いた。固相抽出用ミニカラムは次の3種類を用いた。①Waters 社製 Oasis HLB 3 cc (60 mg) (以下「HLB」という。), ②VARIAN 社製 BONDELUT LRC-C18, 500 mg (以下「C18」という。), ③SUPELCO 社製 ENVI-Carb II/PSA 500 mg/500 mg/6 mL (以下「ENVI-Carb II/PSA」という。)

### 4 装置及び測定条件

#### (1) 装置

高速液体クロマトグラフ：SHISEIDO SI-2 (資生堂社製)  
質量分析装置：Thermo Quantum Ultra (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)

#### (2) 測定条件

カラム：Scherso SM-C18 2 mm  $\times$  150 mm, 3  $\mu\text{m}$  (Imtakt 社製)

移動相：(A 液) 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液  
(B 液) メタノール

A/B = 90/10 (0-0.2 min)  $\rightarrow$  10/90 (5-10 min)  $\rightarrow$  90/10 (10.1-15 min)

流速：0.2 mL/min, カラム温度：40°C, 注入量：5  $\mu\text{L}$

イオン化：ESI 法 positive, 測定モード：MRM

スプレー電圧：5000 V, イオン源温度：300°C

定量イオン (コリジョンエネルギー) :

$m/z$  265.0 > 217.2 (10 eV)

確認イオン (コリジョンエネルギー) :

$m/z$  265.0 > 200.7 (10 eV)

### 5 試料溶液の調製

illudin S を対象としたキノコの前処理方法には、固相抽出ミニカラムを用いて精製する方法が報告されている<sup>3)-6)</sup>。事前検討では精製工程を4通りの方法で行った。また、本試験では精製工程を2通りの方法で行った。詳細は「III 結果」に記載する。

### 6 検量線および定量

illudin S 標準品をメタノールで希釈し、10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ng/mL になるように調製し、その 5  $\mu\text{L}$  を LC/MS/MS に注入した。LC/MS/MS の測定で得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。試料中の illudin S は試料溶液 5  $\mu\text{L}$  を LC/MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を用いて定量した。

## III 結果

### 1 事前検討 (当センターが実施)

シイタケ他2種類のキノコを用いてキノコ汁を作製し、これを検体として illudin S の添加回収試験を行った。

#### (1) 試料溶液の調製

##### ① キノコ汁調製方法

シイタケ (5 g) に、illudin S (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 200  $\mu\text{L}$  を添加した。これにマイタケ (10 g) とシメジ (10 g) を合わせて細切し、だし汁 (水 100 mL + 醤油 4 mL + 砂糖 0.3 g) に入れ、10 分間沸騰させ、キノコ汁を作製した。これを具と汁に分けて検体とした (図2)。

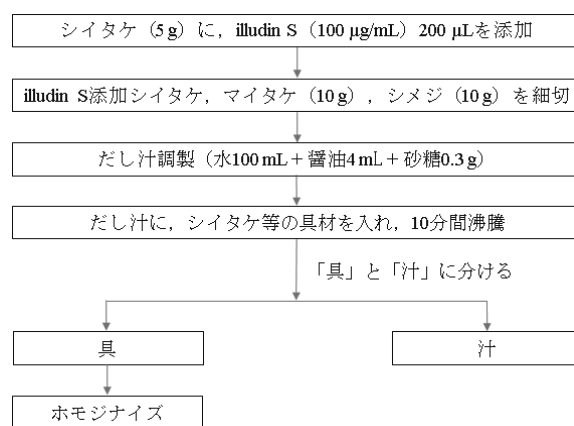


図2 キノコ汁調製方法 (事前検討)

##### ② 試料溶液の調製方法

前処理は多田らの方法<sup>6)</sup>を参考にし、精製工程に3種類の固相抽出ミニカラムを組み合わせる [1] C18, [2] C18+HLB, [3] C18+ENVI-Carb II/PSA, [4] HLB の4通りの方法で検討を行った。試料溶液の調製方法は図3のとおりである。

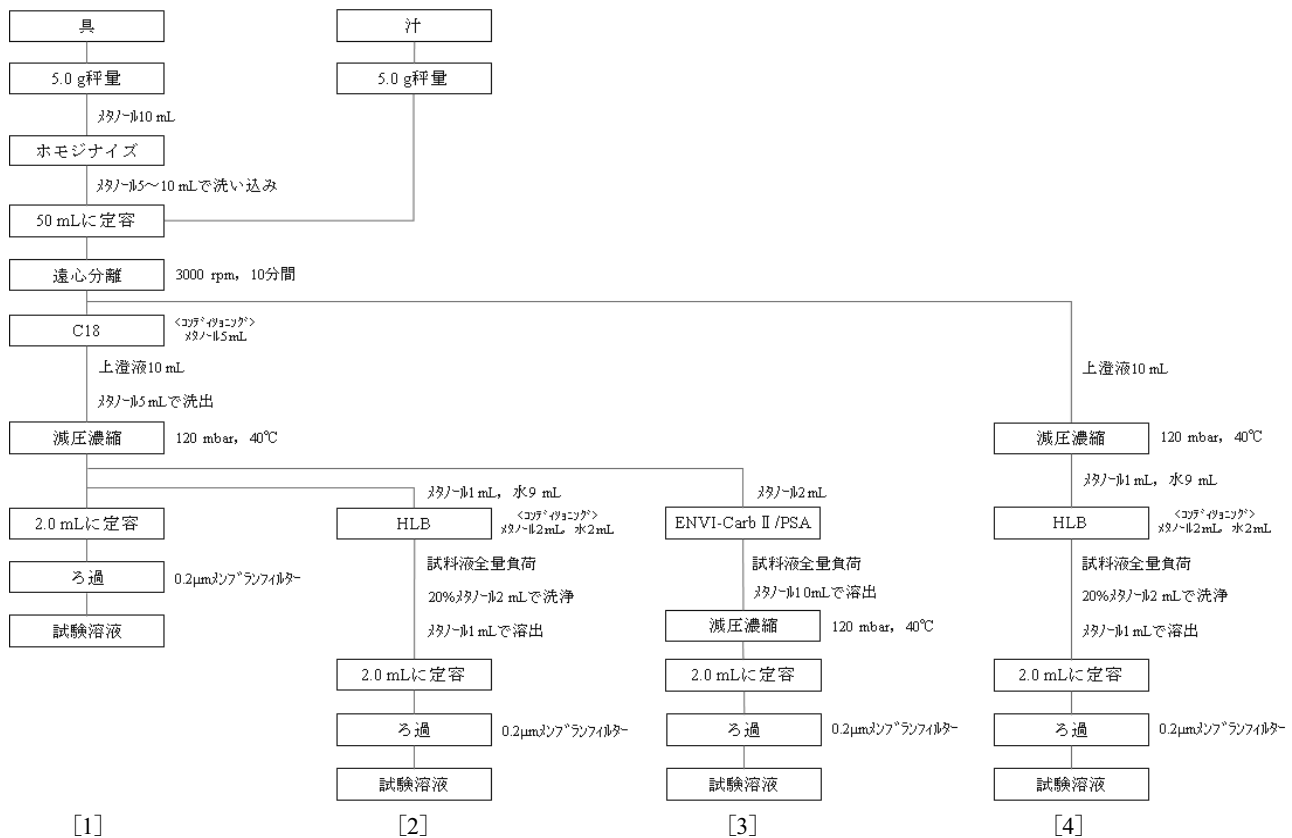


図3 試料溶液の調製方法

(2) クロマトグラムと検量線

図4に illudin S 標準溶液 1000 ng/mL のクロマトグラム(定量イオン)を、図5に検量線を示す. illudin S は約7分に溶出し、ピーク形状も良好なクロマトグラムが得られた. また、検量線は10-1000 ng/mL の範囲で $r^2 = 0.9988$  の良好な直線が得られた.

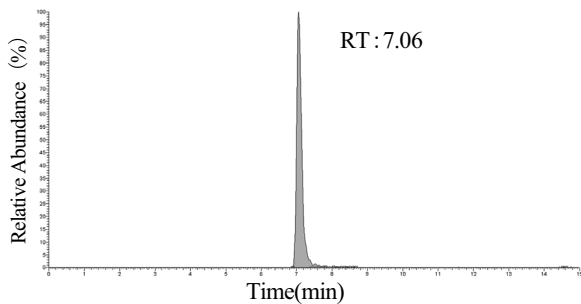


図4 illudin S 標準溶液 1000 ng/mL のクロマトグラム (定量イオン)

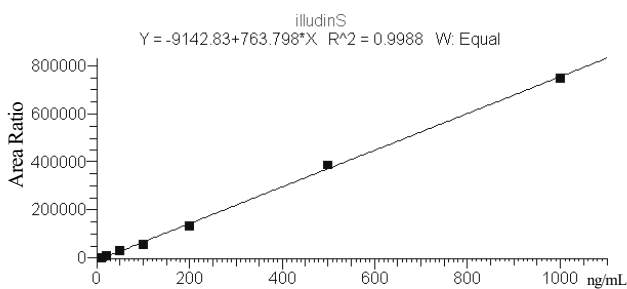


図5 illudin S 標準溶液の検量線

(3) 事前検討結果

事前検討は4通りの方法について具及び汁それぞれ3検体ずつ行い、具及び汁中の illudin S 量の平均値を足し合わせ、添加量から回収率を求めた(表1). 各方法の回収率は65.5~74.8%であったが、illudin S は15分間の沸騰加熱で15%が分解するという報告<sup>3,4)</sup>があり、この影響を考慮すると良好な結果が得られたと考えられる. また、回収率は、固相抽出ミニカラムの組み合わせによる大きな差はなく、妨害ピーク、イオン化抑制等も見られなかったことから、本試験では精製工程の操作が簡便な [1] C18, [4] HLB の2通りの方法で行うこととした.

表1 事前検討結果

固相抽出ミニカラム	回収率 (%)
C18	65.5
C18+HLB	71.9
C18+ENVI-Carb II/PSA	68.4
HLB	74.8

2 本試験 (4 県合同で実施)

本試験は4県の担当者が集まり、合同で実施した. illudin S 含量が既知のツキヨタケを用いてキノコ汁を作製し、これを検体として illudin S の定量を行った. また、事前検討と同様の添加回収試験を行った.

(1) 試料溶液の調製

① キノコ汁調製方法

ツキヨタケ (25 g) , マイタケ (50 g) , シメジ (50 g) を細切し, だし汁 (水 500 mL + 醤油 20 mL + 砂糖 1.5 g) に入れ, 10 分間沸騰させ, 本試験用キノコ汁を作製した. これを具と汁に分けて検体とした (図 6) . また, 添加回収用キノコ汁については, 事前検討と同様の方法で作製した (図 2) .

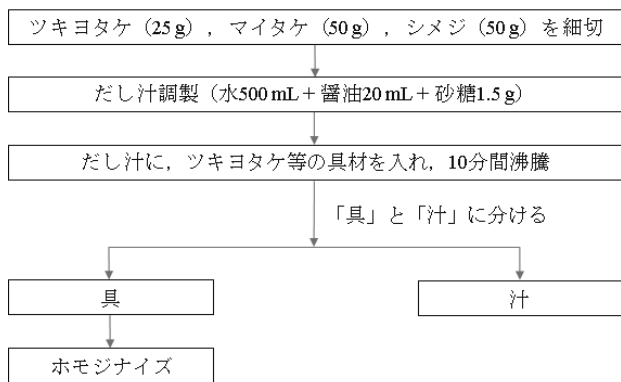


図 6 キノコ汁調製方法 (本試験)

② 試料溶液の調製方法

本試験は図 3 の [1] C18, [4] HLB の 2 通りの方法で行った.

(2) 添加回収試験

添加回収試験は具及び汁それぞれ 1 検体ずつ行った. 回収率は C18 では 71.5%, HLB では 82.6% となった.

(3) ツキヨタケ入りキノコ汁中の illudin S の定量

ツキヨタケ入りキノコ汁中の illudin S の定量は具及び汁それぞれ 3 検体ずつ行った. 結果を表 2 に示す. C18 では具の illudin S 平均含量は 12.4 µg/g, 汁は 5.2 µg/g であった. これをキノコ汁全体に換算すると, 具の illudin S 量は 1.40 mg, 汁の illudin S 量は 2.47 mg で合計 3.87 mg となる. ツキヨタケ

(illudin S 含量: 203.1 µg/g) を 26.03 g 使用したことからキノコ汁中の理論上の illudin S 総量は 5.29 mg となり, 回収率は 73.2% であった. HLB では具の illudin S 平均含量は 13.2 µg/g, 汁は 5.4 µg/g であり, 具の illudin S 量は 1.49 mg, 汁の illudin S 量は 2.56 mg で, 合計 4.05 mg となり, 回収率は 76.6% であった. これらは添加回収試験と同様の結果であり, 同じように沸騰加熱での分解を考慮するとツキヨタケでも良好な結果が得られた.

表 2 ツキヨタケ中の illudin S 回収率

固相抽出 ミニカラム	試料	重量 (g)	平均濃度 ±標準偏差(µg/g)	総量 (mg)	合計 回収率(%)
C18	具	113	12.4 ± 0.6	1.40	73.2
	汁	479	5.2 ± 0.2	2.47	
HLB	具	113	13.2 ± 0.7	1.49	76.6
	汁	479	5.4 ± 0.3	2.56	

(検出限界: 0.02 µg/g)

IV まとめ

ツキヨタケ入りキノコ汁による食中毒事件を想定した分析法の検討を行った. 事前検討では夾雑物やマトリックスなどが添加回収に影響がないか, illudin S を添加したシイタケ等入りキノコ汁を用いて, 3種類の固相抽出ミニカラムを組み合わせた 4 通りの精製方法で検討を行った. その結果, いずれの方法も妨害ピークやノイズはなく, 回収率は 65.5~74.8% となり, 沸騰加熱での illudin S の分解を考慮すると良好な結果が得られた.

本試験では illudin S 含量が既知のツキヨタケを用いてキノコ汁を作製し, 精製工程の操作が簡便な C18 あるいは HLB ミニカラムを単独で使用する 2 通りの方法で検討を行った. 回収率は C18 が 73.2%, HLB が 76.6% と添加回収試験と同様に良好な結果が得られ, この 2 つの分析法は, 調理加工したツキヨタケにも十分適用可能であることが分かった. 以上により, ツキヨタケによる食中毒事件に対応可能な検査体制を整備することができた.

また, このような分析法の検討を 4 県合同で実施することにより, 各研究所の検査技術の向上と研究所間の連携強化に資するものとなったと思われる.

謝辞

四国 4 県連携事業を行うにあたり, 貴重な illudin S 標準品を提供していただきました山形県衛生研究所 笠原義正先生, また, 本検討をするにあたりご協力頂きました各県担当者の皆様に感謝申し上げます.

参考文献

- 1) 自然毒のリスクプロファイル: ツキヨタケ *Omphalotus guenpiniformis* (キシメジ科ツキヨタケ属), 厚生労働省ホームページ  
[http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/kinoko\\_det\\_06.html](http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/kinoko_det_06.html) (2016年8月29日現在)

- 2) 毒キノコによる食中毒に注意しましょう, 厚生労働省ホームページ  
[http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryous/hokuhin/kinoko/](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryous/hokuhin/kinoko/) (2016年8月29日現在)
- 3) 笠原義正 他 : LC/MS/MSによるツキヨタケおよび食中毒原因食品中のilludin Sの分析, 食品衛生学雑誌, **50** (4), 167-172 (2009)
- 4) 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**, 1-5 (2010)
- 5) Mieko Kanamori-Kataoka, *et al.* : Development of a Method for Determining Illudin S in Food by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Health Science*, **52** (3), 237-242 (2006)
- 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**, 1-7 (2013)