

キノコ中毒における有毒成分の分析法の検討

食品薬品部

松下 和裕 若林 勇輝 駒場 直行 徳田 侑子 飯野 聡子
渡辺 真美子 泉 聡美 堀 亜裕美 黒崎 かな子

要旨

ドクツルタケ及びドクツルタケを含む調理品を細切し、メタノール中で超音波処理により抽出後、煩雑な精製操作を必要とせず、ろ過により試料溶液を得る迅速・簡便な前処理により、アマニタトキシン類を分析する方法を確立した。本法を用いて未調理のドクツルタケに含まれるアマニタトキシン類の分布を調べたところ、 α -アマニチン、 β -アマニチン及びファロイジンのいずれについても濃度・含量ともに「かさ」の部分で最も高い値を示した。また、ドクツルタケを加えた「うどん」を調理し、調理後のアマニタトキシン類の分布を調べたところ、ドクツルタケに残存するよりも多くのアマニタトキシン類がドクツルタケ以外の「麺」、「具」及び「汁」に移行していた。このことから、キノコ中毒発生時に毒キノコの残品がなくても、その他の調理残品からアマニタトキシン類を検出可能であること、ドクツルタケを直接喫食しなくても健康被害を及ぼす危険性があることが示された。

キーワード：ドクツルタケ、アマニタトキシン類、 α -アマニチン、 β -アマニチン、ファロイジン、調理残品

1 はじめに

栃木県は植物性自然毒による食中毒の発生件数が多く、そのほとんどが毒キノコを原因とするものである¹⁾。毒キノコによる食中毒では通常、患者の臨床症状や調理残品のキノコの形態的な特徴から原因食品(キノコ)の特定が行われるが、調理残品のキノコが得られない、あるいは調理の影響により形態からの鑑別が困難な場合がある。

そこで本研究では、キノコ中毒における原因食品(キノコ)の特定に有用な情報を得るため、毒キノコに含まれる有毒成分の分析法について検討を行った。

2 実験方法

2.1 対象キノコ

毒キノコのうち、本県において過去に食中毒が発生し、死亡事例のあるドクツルタケを対象とした。

2.2 分析項目

ドクツルタケに含まれる有毒成分のうち、 α -アマニチン、 β -アマニチン及びファロイジン(以下、これら3成分をまとめて「アマニタトキシン類」という。)を対象とした。

2.3 試料

栃木県林業センターより譲受したドクツルタケを用いた。また、模擬調理品の調製には市販の肉、野菜、麺及び調味料等を使用した。

2.4 標準物質

α -アマニチン及び β -アマニチンはSigma-Aldrich社製のものを、ファロイジンは和光純薬工業(株)製・生化学用を使用した。

2.5 試薬

市販の特級、アミノ酸自動分析用及び高速液体クロマトグラフィー用の試薬を用いた。

2.6 装置及び測定条件²⁾

装置及び測定条件を表1に示した。

表1 装置及び測定条件

【装置】

SCIEX 3200 Q TRAP[®] LCMSMSシステム

【測定条件】

分析カラム	： Mightysil RP-18 PA(2.0×150 mm, 3 μ m)		
移動相	： (A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム-酢酸緩衝液(pH5.0)		
	： (B) アセトニトリル		
カラム温度	： 40°C		
流速	： 0.2 mL/min		
注入量	： 10 μ L		
グラジエント条件	： (A):(B) 85:15 (3 min hold)— 75:25 (6 min, 4 min hold)— 85:15 (10 min, 5 min hold)		
イオン化法	： ESI法		
モニターイオン	： α -アマニチン	Precursor ion : m/z 919.3	Product ion : m/z 86.2
	： β -アマニチン	Precursor ion : m/z 920.3	Product ion : m/z 259.2
	： ファロイジン	Precursor ion : m/z 789.3	Product ion : m/z 86.0

2.7 前処理方法

久野らの方法³⁾を参考に検討した。ただし、迅速かつ簡便な分析を行うため、固相抽出による精製操作を行わない方法とした(図1)。

2.8 調理品マトリックスによる影響

調理品として、肉や野菜など、様々な食材を含み、複雑なマトリックスを生成すると予想される「肉野菜炒め」を2種類、また、水分が多く、キノコ中毒事例の多い「うどん」を調製した。なお、「うどん」については、嗜好により香辛料の使用が想定されることから、参考までに七味の有/無の2種類を調製した。

マトリックスによる影響は、調理品の一部を採取し、図1に従って前処理を行い、得られた試料溶液にアマニタトキシン類を添加して調製したマトリックス標準液(以下、「M-STD」と)、マトリックスを含まない標準液(以下、「n-STD」)について、ピーク面積を比較して評価した。

2.9 添加回収試験

調理品の一部を採取し、アマニタトキシン類を添加して添加試料(添加濃度:各1 μg/g)を調製し、図1に従って処理後、分析した。得られたピーク面積を、検体中のアマニタトキシン類濃度が1 μg/g相当となるように調製したn-STD又はM-STDのピーク面積と比較し、各有毒成分の回収率を算出した。なお、「うどん」については、実際の調理残品として想定され、水分が多い試料の例として「汁」のみを採取し、添加試料を調製した。

2.10 ドクツルタケ中アマニタトキシン類の分析

ドクツルタケ(1個体)を「かさ」、「軸」、「つぼ」の部位に分け、それぞれ一部を採取して分析し、各部位におけるアマニタトキシン類濃度を調べた。

定量にはM-STDで作成した検量線(濃度範囲:0.5~2.5 μg/g)を用いた。なお、検量線の上限を超えた場合は外

挿により濃度を算出した。

2.11 調理品中アマニタトキシン類の分析

2.10で用いたドクツルタケの残りを使い、「うどん」を調理した。調理後のドクツルタケの「かさ」、「軸」、「つぼ」及び「麺」、「具材」(ドクツルタケを除く)、「汁」の6つを試料として試料溶液を調製し、分析した。なお、定量値は2.10と同様に求めた。

3 結果

3.1 調理品マトリックスによる影響の検討

調理品マトリックスの存在下におけるアマニタトキシン類のピーク面積を比較した結果を図2に示す。調理品の種類、あるいは有毒成分の種類によってマトリックスによる影響の受け方は異なるが、M-STDのピーク面積はn-STDに対して75.4~137.3%の値を示した。なお、「うどん」については、七味を加えた場合の方が、ややピーク面積が小さくなる傾向が認められた。

3.2 添加回収試験

添加回収試験の結果を表2に示す。調理品の種類、あるいは有毒成分の種類によってn-STDに対する回収率とM-STDに対する回収率に差が認められるものがあつた。一方、n-STDに対する回収率は78.7~146.2%、M-STDに対する回収率は74.9~135.9%の範囲であり、大きな差は認められなかった。

3.3 ドクツルタケ中アマニタトキシン類の分析

アマニタトキシン類の部位別分布を表3に示す。α-アマニチン、β-アマニチン及びファロイジンのいずれについても「かさ」に最も高濃度かつ多量に含まれていた。また、α-アマニチン及びβ-アマニチンについては、「かさ」の濃度を1としたとき、「軸」の濃度は0.63及び0.59、「つぼ」の濃度は0.14及び0.13であり、同様

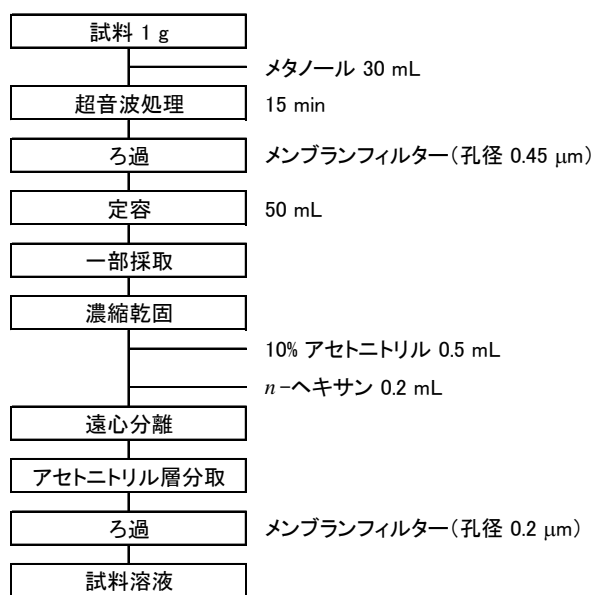
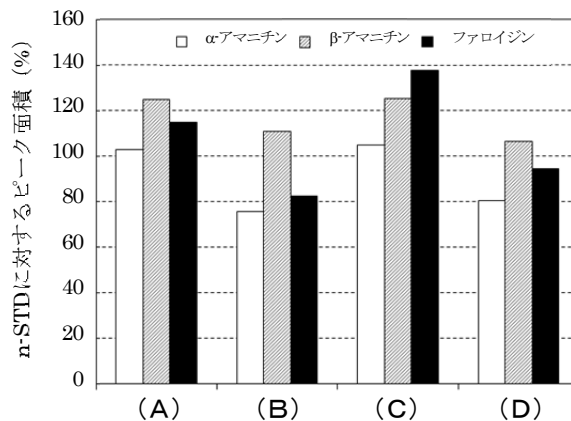


図1 前処理方法



(A) 肉野菜炒め (塩こしょう) (B) 肉野菜炒め (みそ)
(C) うどん (七味なし) (D) うどん (七味あり)

図2 調理品マトリックスによる影響

表2 添加回収試験

有毒成分	調理品	回収率(%)		
		対 n-STD (A)	対 M-STD (B)	差 (A)-(B)
α-アマニチン	肉野菜炒め(塩こしょう)	118.7	115.8	2.9
	肉野菜炒め(みそ)	84.5	112.2	▲27.7
	うどん汁(七味なし)	95.3	100.4	▲5.1
	うどん汁(七味あり)	82.3	105.6	▲23.3
β-アマニチン	肉野菜炒め(塩こしょう)	103.2	82.7	20.5
	肉野菜炒め(みそ)	108.2	97.8	10.4
	うどん汁(七味なし)	78.7	74.9	3.8
	うどん汁(七味あり)	89.2	124.4	▲35.2
ファロイジン	肉野菜炒め(塩こしょう)	126.8	110.4	16.4
	肉野菜炒め(みそ)	111.8	135.9	▲24.1
	うどん汁(七味なし)	146.2	98.9	47.3
	うどん汁(七味あり)	126.6	111.0	15.6

添加濃度:各 1 μg/g

表3 ドクツルタケ中アマニタトキシン類の分布

	α-アマニチン		β-アマニチン		ファロイジン	
	濃度(μg/g)	含有量(μg)	濃度(μg/g)	含有量(μg)	濃度(μg/g)	含有量(μg)
かさ	1362	6277	300	1381	177	817
軸	858	1939	178	402	115	260
つぼ	196	798	39	161	125	509

表4 調理品中アマニタトキシン類の分布

	α-アマニチン		β-アマニチン		ファロイジン	
	濃度(μg/g)	含有量(μg)	濃度(μg/g)	含有量(μg)	濃度(μg/g)	含有量(μg)
かさ	430	1032	91	218	53	127
軸	346	353	74	76	44	45
つぼ	98	265	21	56	61	163
麺	2.9	737	0.31	77	0.61	154
具材	6.1	865	1.3	180	0.96	137
汁	9.8	1735	2.0	344	1.7	293

の濃度分布を示した。一方、ファロイジンについては、 α -アマニチン、 β -アマニチンと比較して相対的に「つぼ」の濃度が高く(0.71)、異なる濃度分布を示した。

3.4 調理品中アマニタトキシン類の分析

調理品中のアマニタトキシン類の分布を表4に示す。調理前(表3)と比較してドクツルタケ中のアマニタトキシン類濃度が低下し、「麺」、「具材」、「汁」からいずれの有毒成分も検出された。

また、各部位の重量を加味してアマニタトキシン類の含量を求めたところ、いずれの有毒成分もドクツルタケに残存するよりも調理品中に移行する量が多かった。

4 考察

キノコ中毒発生時には原因となった毒キノコを特定し、患者に適切な処置を施すとともに、被害の拡大を防ぐことが最も重要である。この点において本法は迅速に調理品中から有毒成分を分析可能であり、有用な方法であると考えられる。

一方、今回の研究の結果、調理品マトリックスによる影響は有毒成分や調理品の種類によって異なり、ピーク面積や回収率に差が生じる場合が認められた。しかしながら、実際のキノコ中毒ではどのような調理品が検査対象となるか予測することはできず、また、調理品のマトリックスを正確に再現することは極めて困難である。加えて、表2に示したとおり、回収率の範囲はn-STDを対照にした場合(78.7~146.2%)とM-STDを対照にした場合(74.9~135.9%)で大きな差が認められないことから、n-STDを対照に用い、本法を原因食品を特定するための行政検査に活用することは可能であると考えられる。

本法を用いて未調理のドクツルタケに含まれるアマニ

タトキシン類の分布を調べたところ、いずれの有毒成分も「かさ」に最も高濃度かつ多量に存在していた。一方、「軸」や「つぼ」にもアマニタトキシン類が含まれており、部位にかかわらず摂取した場合には健康被害が生じる可能性がある。

また、ドクツルタケを加えた「うどん」を調理し、調理品中のアマニタトキシン類の分布を調べたところ、ドクツルタケからアマニタトキシン類が溶出し、調理品へ移行していることが確認できた。その溶出のパターンは有毒成分の種類よりも存在部位の違いが影響していると推察された。

調理後は、ドクツルタケに残存するよりも多くのアマニタトキシン類がドクツルタケ以外の「麺」、「具材」及び「汁」に移行していた。このことは、キノコ中毒発生時に毒キノコの残品が得られなかった場合でも、その他の調理残品からアマニタトキシン類を検出可能であること、ドクツルタケを直接摂取しなくても健康被害を及ぼす可能性があることを示している。

5 参考文献

- 1) 笠原正義、有毒植物による食中毒の最近の動向と今後の課題、食品衛生学雑誌、51、311-318、2008
- 2) 鈴木修、屋敷幹雄編、薬毒物分析実験ハンドブック、東京、じほう、405-406、2002
- 3) 久野恵子、高井靖智、橋爪崇、山東英幸、健康危機管理に対応した自然毒一斉分析法の検討—有毒植物および毒きのこ19成分—、第48回全国衛生化学技術協議会年会講演集、118-119、2011