

ツキヨタケに含まれる有毒成分の分析法の検討

食品薬品部

若林 勇輝 松下 和裕¹ 黒崎 かな子 川嶋 亜裕美
齋藤 仁美² 大山 周子 市本 範子

(¹現栃木県南健康福祉センター ²前栃木県保健環境センター)

1 はじめに

栃木県では植物性自然毒による食中毒の発生件数が多く¹⁾、そのほとんどが毒キノコを原因とするものである。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。そこで当センターでは、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調査研究を行っている。

本県において食中毒発生事例の多い毒キノコの一つであるツキヨタケは、その形状からシイタケやヒラタケと誤食されることが多い。今回、ツキヨタケについて、調理品から有毒成分であるイルジンSを迅速・簡便に分析する方法を確立し、また、模擬調理品を調製して有毒成分の分布を調べたところ、いくつかの知見が得られたので報告する。

2 実験方法

2.1 分析項目

ツキヨタケに含まれる有毒成分であるイルジンSを対象とした。

2.2 試料

ツキヨタケ：栃木県林業センターから譲受したものを
用いた。複数個体を無作為に採取し、それぞれスライスした後、攪拌により十分に均一化した。

調理品A：キノコとしてしいたけを用いた肉野菜炒め及びうどん。うどんは、全体、麺、具材、汁に分けた。

調理品B：キノコとしてツキヨタケを用いた肉野菜炒め及びうどん。肉野菜炒めはツキヨタケ及びツキヨタケ以外、うどんはツキヨタケ、麺、具材(ツキヨタケ以外)、汁に分けた。

ツキヨタケ以外の調理品の材料は全て市販品を用いた。

2.3 標準物質

林純薬工業株式会社製・食品分析用のイルジンSを用いた。

2.4 試薬

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

2.5 装置及び測定条件

液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計を用いて測定を行った。なお、装置及び測定条件を表1に示した。

2.6 前処理方法

既報²⁾に従い操作した。ただし、試料によってはメンブランフィルター(孔径0.45µm)が目詰まりを起こし、ろ過が困難である場合があったため、フィルターろ過の前にNo.2ろ紙によるろ過の操作を加えた(図1)。

2.7 調理品A及びBの調製

調理品として、肉や野菜など様々な食材を含み、複雑なマトリクス(試料由来成分)の影響が予想される肉野菜炒め、及び、水分が多く、キノコ中毒事例の多いうどんを調製した。使用した食材は表2のとおりである。また、試料に付着した汁等の水分については、実際に喫食

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 条 件：Mightysil RP-18PA (2.0×150 mm, 3 µm)

移 動 相：(A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム - 酢酸緩衝液 (pH 5.0)
(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 µL

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：イルジンS Precursor ion：m/z 265.2 Product ion：m/z 201.1

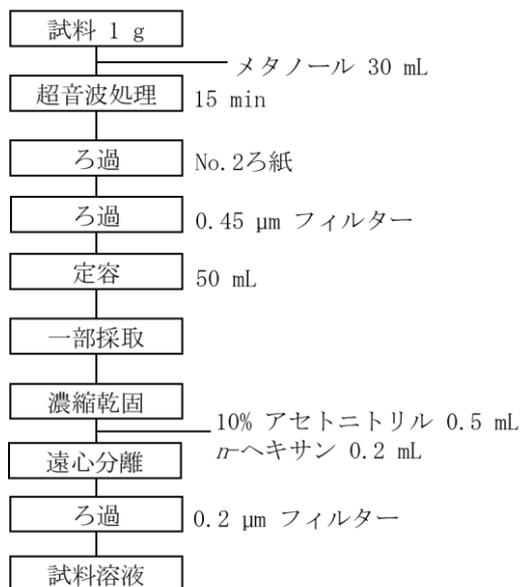


図1 前処理方法

する状況を参考に自然落下する分のみ除去した。

2.8 マトリクスの影響

調理品Aの試料をそれぞれ細切・混合した後、一部を採取し、2.6に従って前処理を行い、得られた試料溶液に標準物質を2.5 μg/g (定量下限値の2倍) になるよう添加してマトリクス標準液 (M-STD) を調製した。

一方、標準物質をM-STDと同濃度になるよう10%アセトニトリル水溶液に溶かし、マトリクスを含まない標準液 (n-STD) を調製した。このようにして得たM-STDとn-STDについてイルジンSの測定を行い、ピーク面積を比較してマトリクスによる影響を評価した。

2.9 添加回収試験

調理品Aの各試料1gに2.5 μg/gになるよう標準物質を添加して添加試料を調製し、2.6に従って前処理後、分析した。得られたピーク面積を、n-STD及びM-STDのピーク面積と比較し、イルジンSの回収率を算出した。

2.10 調理前後のイルジンSの分析

2.2に示すツキヨタケ及びその一部を材料として調製した調理品Bの各試料を細切・混合した後、一部を採取し、2.6に従って前処理後、分析した。得られたピーク面積を、n-STDのピーク面積と比較し、イルジンSの濃度を算出した。さらに重量を加味し、各試料中のイルジンSの含有量を算出した。

3 結果

3.1 前処理方法

既報²⁾の方法にNo.2ろ紙を用いたろ過を追加することにより、メンブランフィルター (0.45 μm) によるろ過の操作性が向上した。工程数は増加したが、メンブランフ

表2 使用した食材

肉野菜炒め		うどん	
キノコ※	50 g	キノコ※	50 g
豚肉	46 g	ゆで麺	180 g
野菜ミックス	125 g	油揚げ	41 g
ナス	25 g	ネギ	40 g
油	適量	めんつゆ	60 mL
塩	適量	水	300 mL
こしょう	適量	(加熱 10分)	
(加熱 8分)			

※ 調理品Aでは「しいたけ」
調理品Bでは「ツキヨタケ」

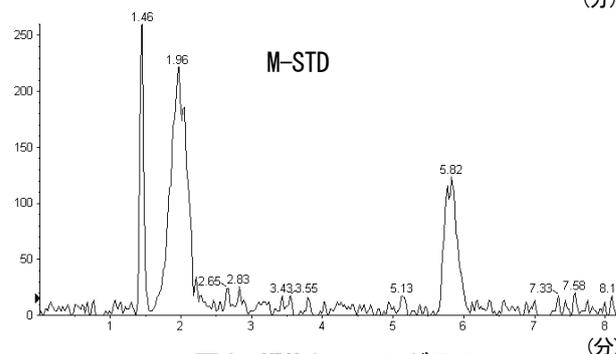
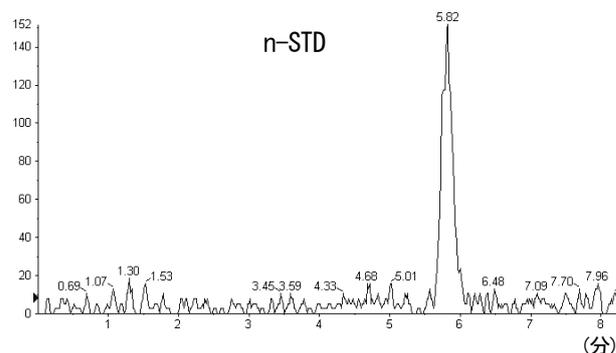


図2 MRMクロマトグラム

ィルターの目詰まりが解消され、前処理時間は増加しなかった。

3.2 マトリクスの影響

マトリクス存在下におけるM-STDのイルジンSのピーク面積をn-STDと比較した結果を表3に示す。試料によってマトリクスの影響は異なるが、n-STDに対するピーク面積比は96.8~109.6%であった。

また、n-STD及びM-STDのMRMクロマトグラムを図2に示す。両者共に保持時間5.8分にイルジンSのピークを確認した。

3.3 添加回収試験

添加回収試験の結果を表3に示す。試料によって、n-STDで評価した回収率とM-STDで評価した回収率とに差が認められるものがあったが、その差は10%以内であった。

3.4 調理前後のイルジンSの分布の比較

表3 マトリクスの影響及び添加回収試験

調理品A	試料	マトリクスの影響 (%)		添加回収試験 (%)	
		ピーク面積比 (M-STD / n-STD)	対n-STD (A)	対M-STD (B)	差 (A) - (B)
肉野菜炒め	肉野菜炒め	101.9	97.4	95.6	1.8
	うどん全体	109.6	91.7	83.6	8.1
うどん	麺	100.0	118.6	118.6	0.0
	具材	108.3	92.3	85.2	7.1
	汁	96.8	98.7	102.0	-3.3

表4 調理前後のイルジンSの分布の比較

調理品B	試料	重量 (g)	イルジンS濃度 (µg/g)	イルジンS含有量 (µg)	イルジンS総量 (µg)
調理前	—	50.0	97.1	4855.0	4855.0
	肉野菜炒め	43.3	29.4	1273.0	1712.4
調理後	ツキヨタケ	151.5	2.9	439.4	
	ツキヨタケ以外	46.3	10.0	463.0	
	うどん	251.7	4.8	1208.2	3243.3
	具材 (ツキヨタケ以外)	102.8	3.9	400.9	
	汁	192.0	6.1	1171.2	

調理前後の各試料中におけるイルジンSの濃度及び含有量を表4に示す。

肉野菜炒めでは、調理前と比較し、「ツキヨタケ」中のイルジンSの濃度及び含有量は低下した。一方、「ツキヨタケ以外」から400 µg以上のイルジンSが検出された。含有量の総量は、調理前の4855.0 µgに対し、調理後は1712.4 µgであり、減少率は64.7%であった。

うどんでも、調理前と比較したところ、「ツキヨタケ」中のイルジンSの濃度及び含有量は低下する一方、「麺」、「具材 (ツキヨタケ以外)」、「汁」の全てから400 µg以上のイルジンSが検出された。また、「ツキヨタケ」に残存する量よりも「麺」及び「汁」に移行する量の方が多かった。含有量の総量は、調理前の4855.0 µgに対し、調理後は3243.3 µgであり、減少率は33.2%であった。

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前処理が簡便で、かつ、機器による測定時間が短く、調理品中の有毒成分を迅速に分析できる有用な方法であると考えられる。

本研究では、ツキヨタケに含まれる有毒成分イルジンSを対象に、分析方法を検討した。その結果、マトリクスの影響は試料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るものの、n-STD に対するピーク面積比は96.8~109.8%と、その影響は小さかった。また、表3に示したとおり、n-STDを対照に用

いた場合とM-STDを対照に用いた場合で、回収率の差は10%以内であり、大きな差は認められなかった。実際のキノコ中毒では検査対象となる調理品を予測することはできず、また、調理品のマトリクスを正確に再現することは極めて困難である。今回の検討結果から、マトリクスの影響は測定結果に大きな影響を及ぼすものではないと考えられることから、n-STDを対照に用い、本法を原因食品特定のための行政検査に活用することは妥当であると考えられる。

本法を用いて、調理前のツキヨタケに含まれるイルジンS並びにツキヨタケを加えて調理した肉野菜炒め及びうどん中のイルジンSの分布を調べたところ、「ツキヨタケ」からイルジンSが溶出し、調理品全体へ移行していることが確認できた。うどんの「汁」に高い濃度で検出されていることから、イルジンSは水に溶けやすく、肉野菜炒め及びうどんの水分を経由して全体に移行していることが推察される。

調理前後のイルジンSの総量を比較すると、うどんでは30%程度の減少であったが、肉野菜炒めでは60%程度の減少が認められた。イルジンSは熱に比較的安定なもの、100℃で15分加熱することにより約15%分解することが報告されている³⁾。肉野菜炒めでは高温での加熱調理により分解し、含有量が減少した可能性が考えられた。しかしながら、通常の調理では完全に分解することは難しいため、調理品を喫食した場合に健康被害を発生させる恐れがある。

うどんについてイルジンSの分布を調べたところ、「ツ

キヨタケ」に残存するよりも多くのイルジンSが「麺」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イルジンSを検出可能であること、ツキヨタケを直接摂取しなくても健康被害を発生させる可能性があることを示している。

5 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究材料の提供に御協力いただいた栃木県林業センターの関係者各位に深謝いたします。

6 参考文献

- 1) 笠原義正、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 (2010)
- 2) 松下和裕他、キノコ中毒における有毒成分の分析法の検討、栃木県保健環境センター年報、第21号、42-45、2016
- 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**、167 - 172 (2009)