

令和4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

自然毒等のリスク評価のための研究

研究分担報告書

「汎用性の高い植物性自然毒の分析法の確立」

研究分担者 南谷臣昭 岐阜県保健環境研究所 食品安全検査センター

研究要旨

有毒植物や有毒キノコに含まれる植物性自然毒による食中毒の発生時に、地方衛生研究所（地研）は保健所と協力して原因究明にあたる。地研にとって有用な分析法の開発は、中毒原因の迅速な特定と正確なリスク評価を可能とし、新たな食中毒対策につながることを期待される。有毒植物に含まれる毒成分については、令和2年度までに国内の食中毒事例全般に対応することが可能な多成分分析法を構築した。

一方、有毒キノコに含まれる毒成分の有用な多成分分析法は未だ確立されていない。そこで、本研究では、主に国内での食中毒発生件数が多いキノコや死亡事例が多いキノコを対象として、含有毒成分を化学的性質により2系統に分類し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC/MS/MS）による分析法を確立することを目的に研究を行った。

令和3年度は、低極性のキノコ毒として、食中毒の発生件数や死亡事例が多い4キノコ群（ツキヨタケ、ドクツルタケ、カエンタケ、カキシメジ）に含まれるキノコ毒8成分とニセクロハツの指標成分であるシクロプロピルアセチル-(R)-カルニチン（CPAC）の1成分の9成分を対象とした分析法を開発した（分析法1）。令和4年度は、分析法1の汎用性を確かめるため、6機関による試験室間妥当性評価を実施した。分析対象化合物は、市販品として入手可能であったキノコ毒6成分と、令和3年度に合成したニセクロハツの指標成分であるCPACの7成分とした。

目標とする判定基準（ML）を1 mg/kgに設定し、検出限界（LOD）を評価したところ、全7成分でLOD ≤ 0.1 mg/kg (= ML · 1/10)となり、Codexの評価基準を満たした。また、シイタケとブナシメジを用いて1 mg/kgでの添加回収試験を実施したところ、絶対検量線で定量した6機関の平均添加回収率は80-110%、HorRat ≤ 2となり、Codexの評価基準を満たした。選択性を考慮に入れ、定量限界を1 mg/kgに設定することで、正確な定性と定量が可能な汎用性の高い方法として有効であることが確かめられた。

研究協力者

友澤潤子 滋賀県衛生科学センター

岩附綾子 岐阜県保健環境研究所

竹内 浩 三重県保健環境研究所

吉村英基 三重県保健環境研究所

谷口 賢 名古屋市衛生研究所

吉岡直樹 兵庫県立健康科学研究所

野村千枝 大阪健康安全基盤研究所

山口瑞香 大阪健康安全基盤研究所

阿部尚仁 岐阜薬科大学生薬学研究室

A. 研究目的

自然毒食中毒は、発生頻度や患者数の割合は低いものの症状が重篤化しやすく死に至る事例もあるため、食品衛生上の重要な課題とされてきた。特に近年、有毒植物や有毒キノコに含まれる植物性自然毒については、誤食による死亡事例が毎年発生している。厚生労働省の食中毒統計によると、平成29年—令和3年の5年間の植物性自然毒による死者数は9名で、その内訳は有毒植物が7名（イヌサフラン6名、グロリオサ1名）、有毒キノコ2名（ニセクロハツと種類不明の野生キノコ各1名）となっている。また、令和4年はイヌサフランを原因として2名、グロリオサを原因として1名が亡くなっている。このことから、食中毒発生時の迅速な原因究明とその予防対策が地方衛生研究所（地研）や保健所等の地方自治体衛生部局にとって重要な課題となっている。

食中毒事件の発生時に、植物性自然毒が原因と疑われる場合は、地研が中毒残品（患者が喫食したものの残品）の化学分析や遺伝子解析を行い、病因植物種や毒成分の同定を行っている。地研の分析結果は、正確な食中毒統計に欠かすことができない上、患者の治療や中毒の予防対策にとっても重要な科学的知見を提供するものであり、極めて重要である。

中毒事例の対応を通して開発された種々の分析法は、これまで地研のネットワークにより情報共有されてきた。その中で改良や分析精度の向上が図られてきたが、未だ課題が残されている。有毒植物に含まれる毒成分の化学分析については、先の厚

生労働科学研究（H30-食品-一般-008）において、食中毒の発生件数が多い28植物群の44の毒成分を対象とした多成分分析法を開発し、食中毒発生時に地研にとって有用な分析法となり得ることを示した。一方、有毒キノコについては、対象とする毒成分の化学的性質が多岐にわたること、毒成分の標準物質を確保することが困難であることといった理由により、未だに有効な多成分分析法は確立されていない。

本研究では、国内で食中毒の発生件数や死亡事例が多い有毒キノコの毒成分（または指標成分）を化学的性質により分類し、低極性の成分はそのまま、高極性の成分のうちアミノ基を有するものはカルバメート型誘導体化試薬によるプレカラム誘導体化により、それぞれ逆相クロマトグラフィー（RPLC）・タンデム質量分析（LC/MS/MS）により定量する2つの分析法を開発することを目的とした。

令和3年度は、低極性のキノコ毒として、食中毒の発生件数や死亡事例が多い4キノコ群（ツキヨタケ、ドクツルタケ、カエントケ、カキシメジ）に含まれるキノコ毒8成分とニセクロハツの指標成分であるシクロプロピルアセチル-(R)-カルニチン（CPAC）の1成分の9成分を対象として、分析法を開発した（分析法1）。令和4年度は、分析法1の汎用性を確かめるため、6機関による試験室間妥当性評価を実施した。分析対象化合物は、市販品として入手可能であったキノコ毒6成分と、令和3年度に合成したニセクロハツの指標成分であるCPACの7成分とした。

B. 研究方法

1. 分析対象化合物

試験室間妥当性評価の分析対象化合物としたキノコ毒（または指標成分）7成分を表1および図1に示した。

2. 試料

添加回収試験にシイタケ及びブナシメジ（生、市販品（菌床栽培品））を用いた。

3. 試薬・試液

α -アマニチン、ファロイジン（富士フィルム和光純薬（株）製）、 β -アマニチン、 γ -アマニチン（Enzo Life Sciences 社製）の標準品4成分は、メタノールに溶解し100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準溶液を調製した。サトラトキシシン H（CAYMAN CHEMICAL 社製）の標準品は、アセトニトリルに溶解し100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準溶液を調製した。イルジン S は、林純薬工業（株）製の1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ メタノール溶液を用いた。ニセクロハツの指標成分である CPAC は、松浦らの報告¹⁾（Matsuura et al. (2016)）に基づき、化学合成したものを分取 HPLC により精製し、NMR により構造を確かめたものを、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のメタノール溶液として用いた。これらの7成分を混合し、メタノールにより希釈して、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の混合標準溶液を調製した（キノコ毒7種混合標準溶液）。

内部標準は、安定同位体標識化合物のイソバレリル L-カルニチン-d9 塩酸塩（Cambridge Isotope Laboratories 社製）、バージニアマイシン B（Santa Cruz Biotechnology 社製）、ジアセトキシスシルペノール（富士フィルム和光純薬（株）製）を用いた。ジアセトキシスシルペノールはアセトニトリルに、その他の化合物は

メタノールに溶解して200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を調製した。これら3種の内部標準溶液を混合して、メタノールにより希釈し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の混合標準溶液を調製した（3種内部標準混合溶液）。これを希釈して100 ng/mL の混合標準溶液を調製して、試験溶液と検量線用標準溶液の調製に使用した。

精製に用いたカートリッジは Agilent Technologies 社製の Captiva EMR-Lipid（3 mL、300 mg）を使用した。

10%(w/v)トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液はナカライテスク（株）製または富士フィルム和光純薬（株）製の特級試薬を用いて調製した。その他試験溶液の調製および LC-MS/MS 測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用または LC-MS 用を用いた。

4. 装置

LC-MS/MS 装置は以下の高速液体クロマトグラフトリプル四重極タンデム質量分析計を用いた。

・機関①: Exion LC AD (Sciex)-5500+ QTRAP Activated (Sciex)

・機関②: Exion LC AD (Sciex)-5500+ QTRAP Activated (Sciex)

・機関③: Exion LC AD (Sciex)-5500+ QTRAP Activated (Sciex)

・機関④: LC-20A (SHIMADZU) -API4000QTRAP (Sciex)

・機関⑤: Exion LC AC (Sciex) -QTRAP4500 (Sciex)

・機関⑥: ACQUITY UPLC I class plus (Waters) -Xevo TQ-XS (Waters)

5. LC-MS/MS 測定条件

分析対象化合物としたキノコ毒 7 成分および内部標準 3 成分の LC-MS/MS 測定条件を表 2-1~2-4 および図 2 に示した。

6 機関のうち機関①-⑤は Sciex 社の MS/MS、機関⑥は Waters 社の MS/MS であったことから、分析条件はそれぞれを代表して機関①および機関⑥の分析条件を示した。

分析カラムは、Waters 社製の XBridge Shield RP18 (2.1 mm ϕ × 150 mm, 3.5 μ m) を用い、0.05% ギ酸溶液とメタノールの 2 液グラジエントによる RPLC により分析を行った。質量分析のイオン化は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法で行った。

6. 試験溶液の調製

分析法 1 の試験溶液調製法を Scheme 1 に示した。

6.1. 抽出

試料 5.0 g を 50 mL のポリプロピレン製遠心沈殿管に量り採り、10%TCA 溶液 10 mL およびメタノール 10 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした後、常温、2,000 \times g で 5 分間遠心分離し、上清を採り、メタノールを加えて正確に 50 mL とした。

6.2. 精製

抽出液を 2 mL 採り、Captiva EMR-Lipid カートリッジに負荷し、常温、1,000 \times g で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てた。さらに抽出液 1 mL を負荷し、同様に遠心分離して得られた溶出液を採り、60%メタノール溶液を用いて、以下のとおり定容したものを試験溶液とした。バイアルは不活性処理済みガラス製バイアルを用いた。

<機関①-③>

- ・試験溶液の定容量：10 mL
- ・3 種内部標準混合溶液：60%メタノール溶液、100 ng/mL、1 mL

<機関④-⑥>

- ・試験溶液の定容量：5 mL
- ・3 種内部標準混合溶液：60%メタノール溶液、100 ng/mL、0.5 mL

7. 定量

3 種内部標準混合溶液が 10 ng/mL となるように加え、0.2%TCA 含有 60%メタノール溶液 (機関①-③) または 0.4%TCA 含有 60%メタノール溶液 (機関④-⑥) により、0.1-50 ng/mL の標準溶液を調製した。それぞれ 5 μ L (機関⑥は 2 μ L) を LC-MS/MS に注入して絶対検量線法または内部標準法により定量値を求めて比較した。内部標準の割り当ては表 2-1 または表 2-3 に従った。

8. 機器分析の検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ) の推定

B.7. 定量で作成した検量線について、各濃度に対するクロマトグラムのピーク面積をプロットし、最小二乗法による直線回帰して得られた検量線の傾き (a) を求めた。さらに、各濃度のクロマトグラムから、LOD に近い濃度の試験溶液を選択して 7 回繰り返し測定し、ピーク面積の標準偏差 (σ) を求めた。LOD は $3\sigma/a$ により、LOQ は $10\sigma/a$ により算出した。

9. 試験室間妥当性評価の実施方法と添加回収試験

粉碎均質化したシイタケおよびブナシメジを 5 g ずつ 50 mL のポリプロピレン製遠心沈殿管に量り採り、-20 $^{\circ}$ C 以下で冷

凍保管した。ブランク試験用に各 1 本ずつと、添加回収試験用に各 2 本ずつ、計 3 本ずつを-18℃以下で各機関に配布した。キノコ毒 7 種混合標準溶液 (10 µg/mL) および 3 種内部標準混合溶液 (10 µg/mL) も-18℃以下で各機関に配布した。

試料を解凍後、キノコ毒 7 種混合標準溶液 (10 µg/mL) を 0.5 mL 添加、混和して 30 分間静置して添加試料とした (添加濃度 : 1 mg/kg)。各機関 2 回併行の添加回収試験を行い、**B.7. 定量**で作成した検量線で定量した結果を報告した。同時にブランク試験 1 試行を行い、定量を妨害するピークの有無を確認し、そのピーク面積を報告した。

10. 試験室間妥当性評価の評価項目と評価基準

目標とする判定基準 (ML) を食品中の濃度として 1 mg/kg に設定した。

LOD、LOQ、平均添加回収率、室間精度 (HorRat 値) の 4 項目は、Codex の手順書²⁾に記載されている評価基準により評価した。Codex の評価基準がない選択性と併行精度は、厚生労働省通知の妥当性評価ガイドライン³⁾ (以下、ガイドライン) の評価基準により評価した。

C. D. 研究結果および考察

1. 分析対象化合物と目標とする ML

日本において過去の食中毒発生件数が最も多いキノコはツキヨタケで、次いでクサウラベニタケ、カキシメジとなっており、現在もこの 3 種のキノコの誤食による食中毒が毎年数多く発生している。また、過去の食中毒の死亡事例は、ドクツルタケが最も多く、次いでシロタマゴテングタケ、

ニセクロハツ、カエンタケとなっている⁴⁾ (登田ら. (2012))。分析法 1 の分析対象化合物とした 7 成分は、これらの有毒キノコのうちクサウラベニタケとカキシメジ以外のものに対応しており、致死的な食中毒事例をはじめ、多くの事例に対応することが可能であると考えられる。

食中毒の発生件数が多いカキシメジの毒成分のウスタル酸は、市販の標準品が入手できなかったため、今回実施した試験室間妥当性評価の分析対象化合物に含めなかったが、令和 3 年度に実施した分析法の検討の際に、日本大学の早川教授から提供された合成品を用いて、1 機関での添加回収試験を実施したところ、良好な添加回収率と併行精度が得られている (添加濃度 0.5 mg/kg ($n=3$), 添加回収率 85.1%, 併行精度 4.2% (内部標準 (2, 2'-ビフェニルジカルボン酸) 補正あり); 添加回収率 82.0%, 併行精度 1.7% (内部標準補正なし))。また、クサウラベニタケの毒成分は、消化器症状の原因となる溶血性タンパク質や神経症状の原因となるムスカリンとされるが、後者については、現在検討中の高極性のキノコ毒の分析法の対象化合物 (分析法 2) としている。

食中毒時の原因究明において、中毒残品に含まれる毒成分の濃度とその摂食量から、毒成分の摂取量を推定して、中毒の原因かどうかを判断することが、化学分析の目的である。しかし、中毒残品中の毒成分の濃度は、事例ごとに大きく異なる上、各毒成分の最小毒性量 (LOAEL) について、十分な知見が得られているわけではない。したがって、中毒原因かどうかを判断する

基準 (ML) をどこに設定するかというところは議論のしようがない。しかし、これまでに植物性自然毒中毒において、未調理の中毒残品に含まれる毒成分の量は 10 mg/kg 以上となることが多く、調理済み残品においても、0.1 mg/kg 以上となる事例が多いことから、ML の目標値を 1 mg/kg、LOD の目標値を 0.1 mg/kg 以下に設定して試験室間妥当性評価を実施した。

2. 試験溶液の調製

試験溶液の定容量は、測定機器の測定感度に応じて、10 mL (0.01 g sample/mL、機関①-③) と 5 mL (0.02 g sample/mL、機関④-⑥) の 2 つを選択した。それぞれ、試験溶液の組成は、0.2%TCA 含有 60%メタノールと 0.4%TCA 含有 60%メタノールになっていると仮定して、検量線用の標準溶液はこれらの溶媒を希釈溶媒として調製した。

3. 機器分析の LOD および LOQ の推定

6 機関のうち機関①-⑤は Sciex 社の MS/MS、機関⑥は Waters 社の MS/MS であった。7 成分のうち、アマニタトキシン類の 4 成分 (α -アマニチン、 β -アマニチン、 γ -アマニチンおよびファロイジン) は、ESI のポジティブモード (ESI(+)) とネガティブモード (ESI(-)) の両極性で分析が可能であった。しかし、アマニタトキシン類の測定感度は、Sciex 社の MS/MS では ESI(-) が優れていたのに対して、Waters 社の MS/MS では ESI(+)) が優れていたため、機関①-⑤は ESI(-) を、機関⑥は ESI(+)) を採用した (表 2-1 および 2-3)。その他の 3 成分はいずれの機関も ESI(+)) が適していた。

6 機関の機器分析の LOD および LOQ を表 3 に示した。LOD は、いずれの機関も 0.1 mg/kg を満たしていた。LOQ は、機関⑥のイルジン S において、0.4 mg/kg とやや高かったが、その他の機関は 0.2 mg/kg を下回り、ML に対して十分に低い LOQ を担保することが可能であった。

Codex の評価基準は、ML 1 mg/kg に対して、 $LOD \leq 0.1 \text{ mg/kg}$ 、 $LOQ \leq 0.2 \text{ mg/kg}$ であるが、機関⑥のイルジン S の LOQ を除き、問題ないと考えられた。

4. 試験室間妥当性評価

4.1. 選択性

選択性の評価結果は、機関①-③と機関④-⑥で大きく異なっていた。機関①-③は Sciex 社の同一機種である。測定感度は、同じく Sciex 社の機器を使用した機関④と⑤よりも良好ではあるが、クロマトグラムのベースラインが高くノイズも大きかった。したがって、機関①-③については、ブランク試料のクロマトグラムにおいて、明らかな妨害ピークを認めた CPAC 以外について、分析対象化合物の保持時間付近のノイズについても、ピークと誤認するおそれがある場合はシグナルとみなし、ピーク面積を算出した (表 4-1 および 4-2)。一方で、機関④-⑥では、ベースラインが低く、CPAC 以外の成分でノイズをピークと誤認するおそれはなかった。

シイタケとブナシメジについて、ガイドラインに基づき、選択性を評価した結果を表 4-1 および 4-2 に示した。機関①-⑥のいずれも、シイタケおよびブナシメジで、CPAC の保持時間付近に妨害ピークが認められたが、その大きさは、目標とした

ML の 1 mg/kg に相当するピーク面積の 1/10 未満となった。

機関①-③では、機器分析の LOQ が 0.2 mg/kg 以下となったが、シイタケのブランク試料で、機関①の α -アマニチン、機関②の β -アマニチンがガイドラインの許容範囲を超えていた。LOQ を ML の 1 mg/kg に設定した場合は、ガイドラインの許容範囲内であったことから、LOQ を 1 mg/kg に設定することとした。

4.2. 添加回収率

ML の 1 mg/kg における 6 機関の平均添加回収率は、内部標準補正がない場合、シイタケで 82.2-96.1%、ブナシメジで 85.8-96.8%となった(表 5-1 および 5-2)。また内部標準補正を行った場合は、シイタケで 78.0-93.0%、ブナシメジで 80.0-95.6%となった(表 5-3 および 5-4)。

Codex の評価基準は添加濃度 1 mg/kg で 80-110%であるが、内部標準補正を行った場合にシイタケのイルジン S で 78.0%となり、唯一評価基準を下回った。内部標準は、各毒成分の個別の分析法に関する文献^{5), 6)}や化学構造の類似性等を考慮して選択した。イルジン S は適切な内部標準がなく、アマニタトキシシン類の内部標準として用いたバージニアマイシン B を仮に選択したが、今回の結果からは適切な内部標準とはいえず、より適切な内部標準が求められる。

4.3. 併行精度

ML の 1 mg/kg における 6 機関の併行精度 (RSD_r) は、内部標準補正がない場合、シイタケで 2.6-6.4%、ブナシメジで 2.0-9.7%となった(表 5-1 および 5-2)。ま

た内部標準補正を行った場合は、シイタケで 3.6-10.8%、ブナシメジで 2.9-8.2%となった(表 5-3 および 5-4)。

ガイドラインの目標値は添加濃度 1 mg/kg で 10%未満であるが、内部標準補正を行った場合にシイタケのサトラトキシシン H で 10.8%となり、目標値をやや上回ったが、それ以外は良好な結果であった。

4.4. 室間精度

ML の 1 mg/kg における 6 機関の室間精度 (RSD_R) は、内部標準補正がない場合、シイタケで 7.5-21.5%、ブナシメジで 7.4-18.7%となった(表 5-1 および 5-2)。また内部標準補正を行った場合は、シイタケで 11.5-27.1%、ブナシメジで 7.6-22.2%となった(表 5-3 および 5-4)。

Codex の評価基準は、添加濃度 1 mg/kg で HorRat 値 ≤ 2 であり、いずれの場合も評価基準を満たした。

E. 結論

食中毒の発生件数や死亡事例が多い 4 キノコ群 (ツキヨタケ、ドクツルタケ、カエンタケ、カキシメジ) に含まれる毒成分 8 成分とニセクロハツの指標成分であるシクロプロピルアセチル-(R)-カルニチン (CPAC) の 9 成分の分析法として開発した分析法 1 について、市販の標準品が入手可能であった 7 成分を用いて、6 機関による試験室間妥当性評価を実施した。目標として設定した ML 1 mg/kg に対して、LOD ≤ 0.1 mg/kg (= ML \cdot 1/10)、シイタケとブナシメジを用いた 1 mg/kg での添加回収試験の平均添加回収率は、絶対検量線で定量した場合 82.2-96.8%、HorRat 値 ≤ 2 となり、Codex の評価基準を満たした(表 6)。

選択性を考慮に入れ、定量限界を 1 mg/kg に設定することで、正確な定性と定量が可能な汎用性の高い方法として有効であることが確かめられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

3. 行政関係者向け説明会

- 1) 友澤潤子、南谷臣昭、岩附綾子、竹内浩、吉村英基、谷口賢、吉岡直樹、野村千枝、山口瑞香、阿部尚仁、鈴木敏之、登田美桜：わが国の主な有毒きのこの多成分分析法、第 59 回全国衛生化学技術協議会年会、川崎市、2022 年 10 月
- 2) 南谷臣昭：健康危機管理事案を想定した植物毒の一斉分析について、令和 4 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会、Web 開催／京都市、2022 年 11 月

4. 市民向け発表会

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

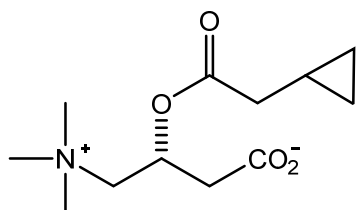
特になし

H. 参考文献

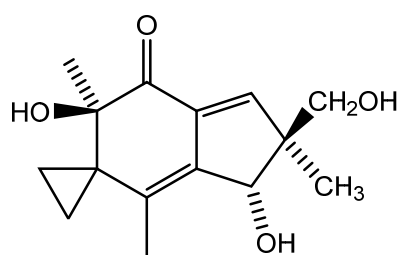
- 1) Matsuura, M., Kato, S., Saikawa, Y., Nakata, M. and Hashimoto, K. *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 602–608 (2016).
- 2) CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL 27th ed. (2019).
- 3) 厚生労働省通知「「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(改正：平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号)。
- 4) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福肇, 森川馨. *食品衛生学雑誌*, **53**, 105–120 (2012).
- 5) Nomura, M., Suzuki, Y., Kaneko, R., Ogawa, T., Hattori, H., Seno, H. and Ishii, A. *Forensic Toxicol.* **30**, 185–192 (2012).
- 6) Ohta, H., Watanabe, D., Nomura, C., Saito, D., Inoue, K., Miyaguchi, H., Harada, S. and Aita, Y. *Forensic Toxicol.* **39**, 101–113 (2021).

表 1 分析対象化合物と対応する主な有毒キノコ
(分析法 1、カキシメジのウスタル酸を除く)

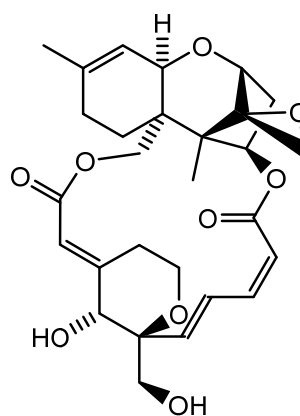
Group	No.	化合物名	CAS No.	主なキノコ種
1	1	シクロプロピルアセチル- (<i>R</i>)-カルニチン		ニセクロハツ
2	2	イルジン S	1149-99-1	ツキヨタケ
3	3	サトラトキシン H	53126-64-0	カエンタケ
4	4	α -アマニチン	23109-05-09	ドクツルタケ
	5	β -アマニチン	21150-22-1	シロタマゴテングタケ
	6	γ -アマニチン	21150-23-2	
	7	ファロイジン	17466-45-4	



Cyclopropylacetyl-(*R*)-carnitine

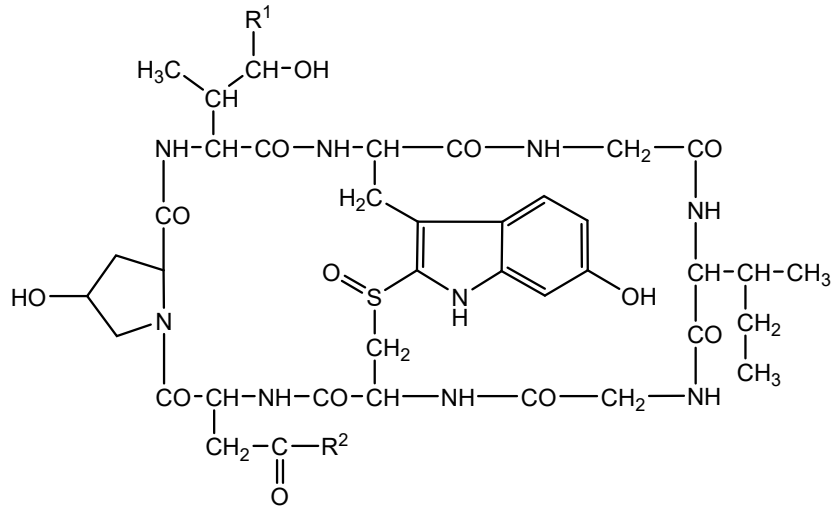


Illudin S



Satratoxin H

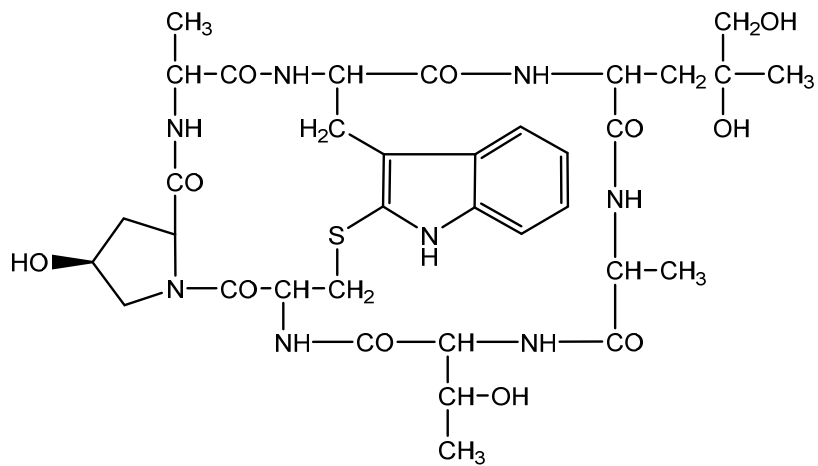
図 1 分析対象化合物の化学構造 (分析法 1)



$R^1 = \text{CH}_2\text{OH}$, $R^2 = \text{NH}_2$ α -Amanitin

$R^1 = \text{CH}_2\text{OH}$, $R^2 = \text{OH}$ β -Amanitin

$R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{NH}_2$ γ -Amanitin



Phalloidin

図 1 分析対象化合物の化学構造 (分析法 1) (つづき)

表 2-1 有毒キノコの毒成分の保持時間、SRM トランジション条件および内部標準の割り当て（分析法 1、機関①、保持時間順）

No.	化合物名 (和名)	化合物名 (英名)	分子式	分子量	モノアイソトピック 質量	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	内部標準
1	シクロプロピルアセチル- (R)-カルニチン	Cyclopropylacetyl-(R)- carnitine	C ₁₂ H ₂₁ NO ₄	243.30	243.1471	3.5	+	[M+H] ⁺	244.3	85.1	46	29	14	イソバレリルカルニチン-d9
									244.3	185.0	46	19	10	
2	α-アマニチン	α-Amanitin	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₄ S	918.97	918.3542	5.0	-	[M-H] ⁻	917.3	899.4	-135	-38	-21	バージニアマイシンB
									917.3	917.5	-135	-8	-19	
3	β-アマニチン	β-Amanitin	C ₃₉ H ₅₃ N ₉ O ₁₅ S	919.96	919.3382	5.4	-	[M-H] ⁻	918.3	900.5	-135	-42	-21	バージニアマイシンB
									918.3	918.5	-135	-10	-23	
4	イルジンS	Illudin S	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264.32	264.1362	5.4	+	[M+H] ⁺	265.1	217.2	41	13	14	バージニアマイシンB
									265.1	247.2	41	11	14	
5	γ-アマニチン	γ-Amanitin	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₃ S	902.97	902.3593	5.5	-	[M-H] ⁻	901.4	883.5	-140	-38	-15	バージニアマイシンB
									901.4	901.5	-140	-8	-19	
6	ファロイジン	Phalloidin	C ₃₅ H ₄₈ N ₈ O ₁₁ S	788.87	788.3163	6.8	-	[M-H] ⁻	787.3	743.4	-145	-44	-11	バージニアマイシンB
									787.3	787.5	-145	-10	-13	
7	サトラトキシシン H	Satratoxin H	C ₂₉ H ₃₆ O ₉	528.59	528.2359	8.8	+	[M+H] ⁺	529.4	231.3	81	25	12	ジアセトキシシルベノール
									529.4	245.2	81	23	14	

上段：定量トランジション、下段：確認トランジション

表 2-2 内部標準の SRM トランジション条件（分析法 1、機関①、保持時間順）

No.	化合物名 (和名)	化合物名 (英名)	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	備考
IS1	イソバレリル L-カルニチン-d9	Isovaleryl L-carnitine-d9	4.0	+	[M+H] ⁺	255.3	85.1	51	31	14	シリンジスパイク
IS2	ジアセトキシ シルベノール	Diacetoxy- scirpenol	7.4	+	[M+NH ₄] ⁺	384.2	307.2	56	17	18	シリンジスパイク
IS3	バージニアマイシン B	Virginiamycin B	9.3	+	[M+H] ⁺	867.4	663.4	106	37	22	シリンジスパイク
				-	[M-H] ⁻	865.3	177.2	-120	-58	-3	

表 2-3 有毒キノコの毒成分の保持時間、SRM トランジション条件および内部標準の割り当て（分析法 1、機関⑥、保持時間順）

No.	化合物名 (和名)	化合物名 (英名)	分子式	分子量	モノイソトピック 質量	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3	Cone (V)	Coll (eV)	内部標準
1	シクロプロピルアセチル- (R)-カルニチン	Cyclopropylacetyl-(R)- carnitine	C ₁₂ H ₂₁ NO ₄	243.30	243.1471	3.5	+	[M+H] ⁺	244.3	85.1	20	20	イソバレルカルニチン-d9
									244.3	185.0	20	10	
2	α-アマニチン	α-Amanitin	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₄ S	918.97	918.3542	5.0	+	[M+H] ⁺	919.6	86.2	50	60	バージニアマイシンB
									919.6	919.6	50	20	
3	β-アマニチン	β-Amanitin	C ₃₉ H ₅₃ N ₉ O ₁₅ S	919.96	919.3382	5.4	+	[M+H] ⁺	920.6	86.3	40	60	バージニアマイシンB
									920.6	920.6	40	30	
4	イルジンS	Illudin S	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264.32	264.1362	5.4	+	[M+H] ⁺	265.0	95.0	15	10	バージニアマイシンB
									265.1	217.2	15	10	
5	γ-アマニチン	γ-Amanitin	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₃ S	902.97	902.3593	5.5	+	[M+H] ⁺	903.5	86.1	50	50	バージニアマイシンB
									903.5	903.5	50	10	
6	ファロイジン	Phalloidin	C ₃₅ H ₄₈ N ₈ O ₁₁ S	788.87	788.3163	6.8	+	[M+H] ⁺	789.3	86.2	50	50	バージニアマイシンB
									789.3	753.3	50	20	
7	サトラトキシ H	Satratoxin H	C ₂₉ H ₃₆ O ₉	528.59	528.2359	8.8	+	[M+H] ⁺	529.4	231.3	50	30	ジアセトキシスシルペノール
									529.4	245.2	50	20	

上段：定量トランジション、下段：確認トランジション

表 2-4 内部標準の SRM トランジション条件（分析法 1、機関⑥、保持時間順）

No.	化合物名 (和名)	化合物名 (英名)	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3	Cone (V)	Coll (eV)	備考
IS1	イソバレル L-カルニチン-d9	Isobavelyl L-carnitine-d9	4.0	+	[M+H] ⁺	255.3	85.1	30	20	シリンジスパイク
IS2	ジアセトキシ スシルペノール	Diacetoxy- scirpenol	7.4	+	[M+NH ₄] ⁺	384.2	105.0	20	30	シリンジスパイク
IS3	バージニアマイシン B	Virginiamycin B	9.3	+	[M+H] ⁺	867.4	134.0	40	30	シリンジスパイク

カラム XBridge Shield RP18 (Waters)
2.1 × 150 mm, 3.5 μm

移動相 (A) 0.05%ギ酸
(B) メタノール

グラジエント	Time/min	A (%)	B (%)
	0	90	10
	10	0	100
	12	0	100
	12.1	90	10
	20	90	10

流速 0.2 mL/min

カラム温度 40°C

注入量 5 μL

イオン源
(Sciex社製
Turbo-Vソース)

Parameter \ Porarity	ESI(+)	ESI(-)
Curtain gas (psi)	30	30
Collision gas (psi)	9	9
Ion Spray Voltage (V)	5000	-4500
Temperature (°C)	300	300
Ion Source Gas1 (psi)	60	60
Ion Source Gas2 (psi)	60	60

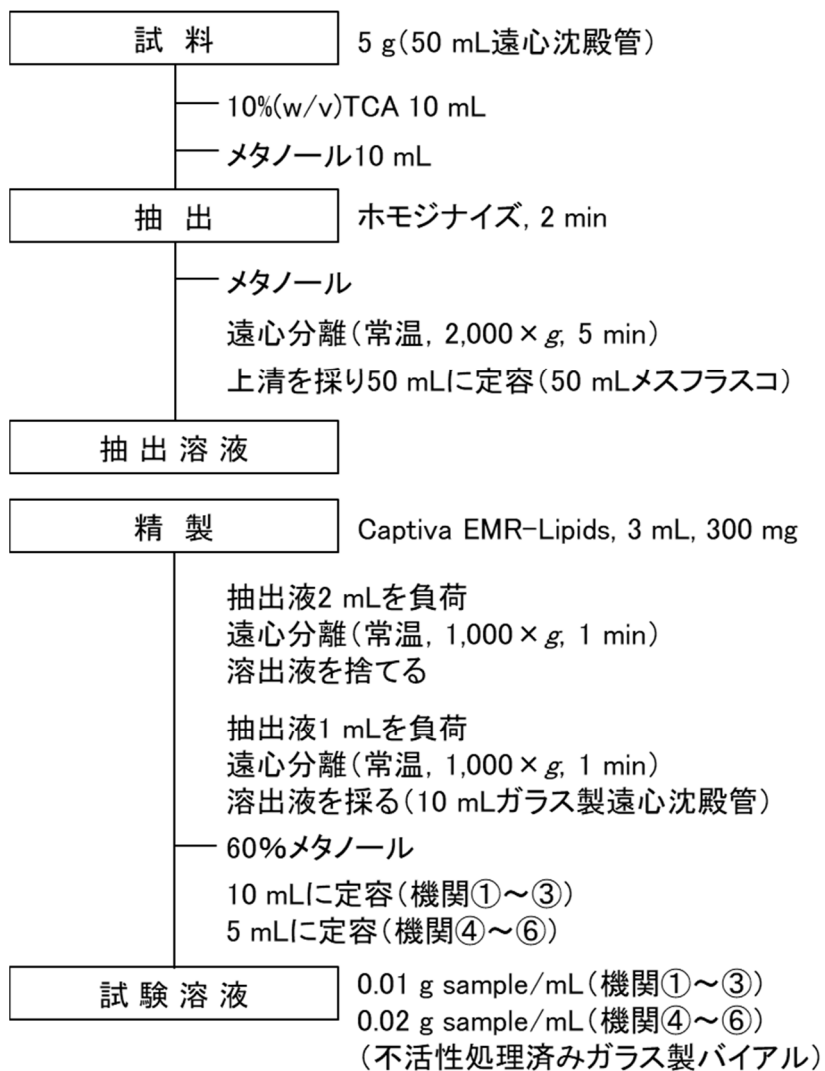
• 機関①-③はESI (+)/(-) switchingモード

イオン源
(Waters社製
UniSprayイオン源)

Parameter \ Porarity	ESI(+)
Capillary (kV)	0.5
Source Offset (V)	30
Source Temperature (°C)	150
Desolvation Temperature (°C)	600
Cone Gas Flow (L/hr)	200
Desolvation Gas Flow (L/hr)	1000
Collision Gas Flow (mL/min)	0.17
Nebuliser Gas Flow (bar)	7

• 機関⑥の設定

図 2 液体クロマトグラフおよび MS イオン源の条件 (分析法 1)



Scheme 1 有毒キノコの試験溶液調製法 (分析法 1)

表3 6機関の検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ)

No.	Compound name	Lab①		Lab②		Lab③	
		LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
1	CPAC	0.004	0.01	0.01	0.05	0.006	0.02
2	Illudin S	0.03	0.1	0.06	0.2	0.03	0.09
3	Satratoxin H	0.03	0.09	0.05	0.2	0.02	0.06
4	α -Amanitin	0.02	0.08	0.06	0.2	0.02	0.07
5	β -Amanitin	0.02	0.08	0.05	0.2	0.03	0.1
6	γ -Amanitin	0.02	0.06	0.05	0.2	0.05	0.2
7	Phalloidin	0.01	0.02	0.05	0.2	0.02	0.05

No.	Compound name	Lab④		Lab⑤		Lab⑥	
		LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
1	CPAC	0.02	0.08	0.005	0.02	0.0002	0.001
2	Illudin S	0.04	0.1	0.04	0.1	0.1	0.4
3	Satratoxin H	0.07	0.2	0.05	0.2	0.01	0.02
4	α -Amanitin	0.07	0.2	0.04	0.1	0.03	0.1
5	β -Amanitin	0.04	0.1	0.05	0.2	0.02	0.06
6	γ -Amanitin	0.03	0.1	0.04	0.1	0.04	0.1
7	Phalloidin	0.05	0.2	0.02	0.07	0.01	0.04

表 4-1 6 機関の選択性 (シイタケ)

No.	Compound name	Lab ①					Lab ②					Lab ③				
		Peak area (cps)					Peak area (cps)					Peak area (cps)				
		BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria
1	CPAC	85870	366900	○	1223000	○	32820	237800	○	792667	○	129689	910674	○	3035578	○
2	Illudin S	0	4495	○	14983	○	1083	9287	○	30957	○	0	7293	○	24309	○
3	Satratoxin H	0	17030	○	56767	○	252	8018	○	26727	○	0	28880	○	96265	○
4	α-Amanitin	5234	2647	×	8823	○	1711	4593	○	15310	○	0	8415	○	28051	○
5	β-Amanitin	1522	5411	○	18037	○	3428	3405	×	11350	○	750	5341	○	17803	○
6	γ-Amanitin	0	8887	○	29623	○	2817	5645	○	18817	○	4322	7724	○	25746	○
7	Phalloidin	0	31320	○	104400	○	501	19010	○	63367	○	0	26316	○	87720	○

No.	Compound name	Lab ④					Lab ⑤					Lab ⑥				
		Peak area (cps)					Peak area (cps)					Peak area (cps)				
		BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria
1	CPAC	5150	49566	○	165221	○	45263	371545	○	1238484	○	194773	1891187	○	6303958	○

MHLW Criteria: (LOQ ≤ ML · 1/3) BL peak ≤ ML peak · 1/10

(LOQ > ML · 1/3) BL peak ≤ LOQ peak · 1/3

表 4-2 6 機関の選択性 (ブナシメジ)

No.	Compound name	Lab ①					Lab ②					Lab ③				
		ピーク面積(cps)					ピーク面積(cps)					ピーク面積(cps)				
		BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria
1	CPAC	301400	366900	○	1223000	○	21690	237800	○	792667	○	122796	910674	○	3035578	○
2	Illudin S	0	4495	○	14983	○	1009	9287	○	30957	○	0	7293	○	24309	○
3	Satratoxin H	0	17030	○	56767	○	405	8018	○	26727	○	0	28880	○	96265	○
4	α-Amanitin	0	2647	○	8823	○	1996	4593	○	15310	○	92	8415	○	28051	○
5	β-Amanitin	0	5411	○	18037	○	1429	3405	○	11350	○	82	5341	○	17803	○
6	γ-Amanitin	354	8887	○	29623	○	1583	5645	○	18817	○	1306	7724	○	25746	○
7	Phalloidin	0	31320	○	104400	○	862	19010	○	63367	○	0	26316	○	87720	○

No.	Compound name	Lab ④					Lab ⑤					Lab ⑥				
		ピーク面積(cps)					ピーク面積(cps)					ピーク面積(cps)				
		BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria	BL	ML・ 1/10	MHLW Criteria	ML・ 1/3	MHLW Criteria
1	CPAC	0	49566	○	165221	○	31745	371545	○	1238484	○	139101	1891187	○	6303958	○

MHLW Criteria: (LOQ ≤ ML · 1/3) BL peak ≤ ML peak · 1/10

(LOQ > ML · 1/3) BL peak ≤ LOQ peak · 1/3

表 5-1 6 機関の添加回収率、併行精度、室間精度および HorRat 値（シイタケ、内標補正なし）

No.	Compound	Mean Recovery (%)	Codex criteria	Repeatability (RSD _r (%))	MHLW criteria	Reproducibility (RSD _R (%))	HorRat value	Codex criteria
1	CPAC	93.1	○	6.1	○	20.3	1.3	○
2	Illudin S	82.2	○	6.2	○	21.5	1.3	○
3	Satratoxin H	89.6	○	4.1	○	7.5	0.5	○
4	α-Amanitin	93.2	○	6.2	○	12.3	0.8	○
5	β-Amanitin	91.3	○	2.6	○	11.1	0.7	○
6	γ-Amanitin	96.1	○	6.4	○	12.5	0.8	○
7	Phalloidin	91.7	○	4.2	○	9.4	0.6	○

Codex criteria: 80-110% MHLW criteria: < 10% Codex criteria: ≤ 2

表 5-2 6 機関の添加回収率、併行精度、室間精度および HorRat 値（ブナシメジ、内標補正なし）

No.	Compound	Mean Recovery (%)	Codex criteria	Repeatability (RSD _r (%))	MHLW criteria	Reproducibility (RSD _R (%))	HorRat value	Codex criteria
1	CPAC	96.8	○	2.6	○	18.7	1.2	○
2	Illudin S	85.8	○	4.0	○	16.2	1.0	○
3	Satratoxin H	88.8	○	2.0	○	6.1	0.4	○
4	α-Amanitin	90.4	○	9.7	○	13.3	0.8	○
5	β-Amanitin	94.3	○	6.1	○	12.3	0.8	○
6	γ-Amanitin	96.6	○	4.1	○	17.7	1.1	○
7	Phalloidin	89.7	○	2.0	○	7.4	0.5	○

Codex criteria: 80-110% MHLW criteria: < 10% Codex criteria: ≤ 2

表 5-3 6 機関の添加回収率、併行精度、室間精度および HorRat 値（シイタケ、内標補正あり）

No.	Compound	Mean Recovery (%)	Codex criteria	Repeatability (RSD _r (%))	MHLW criteria	Reproducibility (RSD _R (%))	HorRat value	Codex criteria
1	CPAC	93.0	○	6.7	○	19.1	1.2	○
2	Illudin S	78.0	✕	6.7	○	27.1	1.7	○
3	Satratoxin H	88.9	○	10.8	✕	14.5	0.9	○
4	α-Amanitin	90.0	○	6.7	○	16.1	1.0	○
5	β-Amanitin	88.4	○	3.6	○	15.1	0.9	○
6	γ-Amanitin	92.7	○	7.0	○	15.8	1.0	○
7	Phalloidin	88.3	○	4.2	○	11.5	0.7	○

Codex criteria: 80-110% MHLW criteria: < 10% Codex criteria: ≤ 2

表 5-4 6 機関の添加回収率、併行精度、室間精度および HorRat 値（ブナシメジ、内標補正あり）

No.	Compound	Mean Recovery (%)	Codex criteria	Repeatability (RSD _r (%))	MHLW criteria	Reproducibility (RSD _R (%))	HorRat value	Codex criteria
1	CPAC	95.6	○	3.2	○	18.2	1.1	○
2	Illudin S	80.0	○	5.4	○	22.2	1.4	○
3	Satratoxin H	90.5	○	2.9	○	8.1	0.5	○
4	α-Amanitin	87.4	○	8.2	○	11.5	0.7	○
5	β-Amanitin	91.3	○	5.5	○	13.5	0.8	○
6	γ-Amanitin	93.9	○	4.6	○	16.6	1.0	○
7	Phalloidin	87.2	○	3.3	○	7.6	0.5	○

Codex criteria: 80-110% MHLW criteria: < 10% Codex criteria: ≤ 2

表 6 試験室間妥当性評価 結果のまとめ

Analyte:	CPAC, illudin S, satratoxin H, α , β , γ -amanitin, phalloidin
Matrix:	Mushroom (<i>Shiitake</i> and <i>Bunashimeji</i>)
Internal standard	Isovalelyl L-carnitine-d9 (for CPAC) Diacetoxyscirpenol (for satratoxin H) Virginiamycin B (for α , β , γ -amanitin, phalloidin and tentatively for illudin S)
ML:	1 mg/kg
LOD:	≤ 0.1 mg/kg (= ML \cdot 1/10)
LOQ:	≤ 1 mg/kg (= ML)
Selectivity:	BL peak area \leq LOQ peak area \cdot 1/3
Recovery:	80-110% (except for illudin S of <i>Shiitake</i> , IS (+) (78.0%))
Repeatability:	RSD _r < 10% (except for satratoxin H of <i>Shiitake</i> , IS (+) (10.8%))
Reproducibility:	HorRat value ≤ 2
