

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）  
令和6年度 分担研究報告書

汎用性の高い植物性自然毒（きのこ）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

有毒植物や有毒きのこ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で期待される。先の厚生労働科学研究（H30-食品-一般-008 及び 21KA1005）において、わが国で食中毒の発生件数が多い植物性自然毒を対象として、有毒植物の毒成分の一斉分析法と、毒きのこの毒成分一斉分析法1及び2の3つの分析法を開発した。本研究は、毒きのこの毒成分一斉分析法1及び2について、実際の毒きのこを含む模擬試料を用いて試験室間共同試験を実施し、分析法の汎用性を検証することを目的とする。

毒きのこの毒成分一斉分析法1

ドクツルタケを含むきのこシチューを模擬試料として、試験室間共同試験を実施した。参加11機関は、模擬試料に含まれる $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの2種類の毒成分を正しく同定することができた。またこの2成分の定量結果を解析したところ、それぞれ回収率は102%、84.7%、併行精度（ $RSD_r$ ）は2.1%、1.2%、室間精度（ $RSD_R$ ）は6.6%、7.3%、HorRat値は0.7、0.8となり、農林水産省の分析法の妥当性確認に関するガイドラインに適合した。複雑なマトリックスを多く含む食品を用いて試験室間共同試験により分析法の妥当性が確認されたことから、本法の汎用性が示された。

毒きのこの毒成分一斉分析法2

市販のシイタケを用いて1 mg/kgと10 mg/kgの2濃度での添加回収試験を行い、単一試験室で妥当性確認を行った。各濃度において、分析対象の5成分（ムスカリン、イボテン酸、ムシモール、プロパルギルグリシン、アシルグリシン）の真度は74.6-108%、92.2-113%、併行精度（ $RSD_r$ ）は $\leq 2.9\%$ 、 $\leq 2.8\%$ 、室内精度（ $RSD_{WR}$ ）は $\leq 7.0\%$ 、 $\leq 8.1\%$ となり、厚生労働省の農薬等の妥当性評価ガイドラインに適合した。本法はアセタケ科のきのこやテングタケ属のきのこによる食中毒の際に適用可能な分析法であることが示唆された。

研究協力者

竹内 浩	岐阜県保健環境研究所	野村千枝	大阪健康安全基盤研究所
友澤潤子	滋賀県衛生科学センター	吉岡直樹	兵庫県立健康科学研究所
谷口 賢	名古屋市衛生研究所	原 有紀	三重県保健環境研究所
山口瑞香	大阪健康安全基盤研究所	吉村英基	三重県保健環境研究所

小郷沙矢香	静岡県環境衛生科学研究所	藤田結美	福井県衛生環境研究センター
木村亜莉沙	静岡市環境保健研究所	細野加芳	愛知県衛生研究所
佐原甲一	浜松市保健環境研究所	深津浩佑	名古屋市衛生研究所
有沢拓也	富山県衛生研究所	茅原田一	岐阜市衛生試験所
川端陽子	金沢市環境衛生試験所		

## A. 研究目的

厚生労働省の食中毒統計によると、令和6年の植物性自然毒の発生件数は41件で、22件が有毒植物、19件が毒きのこによるものであった。いずれの事例も患者数は10名以下で細菌やウイルスによる食中毒と比較すると小規模である。しかし、長野県で毒きのこにより1名の死者が発生するなど、令和5年に続き毒きのこによる死者が発生している。

令和6年の毒きのこの食中毒の原因となったきのこ種を見ると、例年と同様にツキヨタケの事例が9-11月にかけて10件と最も多く発生した一方で、熱帯性のきのこであるオオシロカラカサタケによる食中毒が4件、テングタケ属のきのこによる食中毒が3件発生した。1名の死者を出した食中毒において原因と推定されたドクツルタケやコテングタケモドキもテングタケ属のきのこである。オオシロカラカサタケやテングタケ属のきのこは6-7月の梅雨の季節にも多く発生する。令和5年には、夏の暑い盛りの8月に愛知県でニセクロハツの食中毒も発生した。このように、近年の毒きのこの食中毒は、9-11月の秋のきのこシーズンだけでなく、6-8月の梅雨から夏の季節も注意が必要である。

食中毒の際に有毒植物や毒きのこは、そのまま食されるわけではなく、調理されて食される事例がほとんどであり、その調理法は実に様々である。食中毒事件の発生時に、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、植物種や毒成分の同定を行っているが、調理済みの残品からの成分の同定、DNAの抽出は困難である。また、特にきのこの場合、形態による鑑別が困難で、原因となったきのこ種が不明となった事例も散見される。

当分担ではこれまで、突発的に発生する植物性自然毒に対応可能な分析法として、様々な調理品から多様な化学構造を持つ植物性自然毒を同定・定量する手法の開発に取り組んできた。先の厚生労働科学研究（H30-食品-一般-008及び21KA1005）において、わが国で食中毒の発生件数が多い植物性自然毒を対象として、有毒植物の毒成分の一斉分析法と、毒きのこの毒成分一斉分析法1及び2の3つの分析法を開発した。有毒植物の毒成分の一斉分析法は、添加回収試験や実際の有毒植物を含む模擬試料を用いた妥当性確認を実施して良好な結果が得られており、既にいくつかの食中毒事例において適用されている。中毒事例

や死亡事例が多いドクツルタケのアマニトキシソ類などを対象とする毒きのこの毒成分一斉分析法 1 は、市販のシイタケとブナシメジを用いた 6 機関による添加回収試験により室間の再現性が確認された。またテングタケのイボテン酸やムシモールなどの高極性の毒成分を誘導体化して分析する毒きのこの毒成分一斉分析法 2 については、単一試験室において 7 種の市販きのこを用いた添加回収試験を実施し、分析法の性能を評価した。

本研究では、毒きのこの毒成分一斉分析法 1 及び 2 について、実際の毒きのこを含む模擬試料を用いて試験室間共同試験を実施し、分析法の汎用性を検証することを目的とする。令和 6 年度は、ドクツルタケを含むきのこシチューを模擬試料として、試験室間共同試験により毒きのこの毒成分一斉分析法 1 の妥当性確認を実施した。また、毒きのこの毒成分一斉分析法 2 について、市販のシイタケを用いた添加回収試験により単一試験室における妥当性確認を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 毒きのこの毒成分一斉分析法 1

#### 1.1 試薬・試液

$\alpha$ -アマニチン、ファロイジン（富士フィルム和光純薬（株）製）、 $\beta$ -アマニチン、 $\gamma$ -アマニチン（Enzo Life Sciences 社製）の 4 成分は、メタノールに溶解し 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の標準原液を調製した。これらを混合し、メタノールで希釈して 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 4 種混合標準溶液を調製した。

内部標準のバージニアマイシン B（Santa Cruz Biotechnology 社製）は、メタノールに溶解し、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の標準原液を調製した。これをメタノールにより希釈し、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の内部標準溶液とした。

10%トリクロロ酢酸（TCA）水溶液はナカライテスク（株）製又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。精製カートリッジは、Agilent Technologies 社製の Captiva EMR-Lipid（3 mL, 300 mg）を使用した。

検量線用標準溶液の希釈に用いた 0.2%TCA 含有 60%メタノール水溶液は、10%TCA 水溶液 2 mL 及びメタノール 60 mL を量り採り、水で 100 mL に定容して調製した。

その他試験溶液の調製及び LC-MS/MS 測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用又は LC-MS 用を使用した。

#### 1.2 模擬試料

試験室間共同試験の模擬調理試料として、Jansson らの報告<sup>1)</sup>に準拠してドクツルタケを含むきのこのシチューを調製した。ドクツルタケは、2023 年 10 月に岐阜県内の山林で採取後、 $-20^{\circ}\text{C}$  以下で冷凍してあったものを使用した。

#### きのこのシチュー

原材料：マッシュルーム 770 g、シイタケ 165 g、ヒラタケ 110 g、ナメコ 55 g、バター 913 g、小麦粉 36.3 g、生クリーム（乳脂肪分 35%）462 mL、オリーブオイル 5.5 mL

調理法：弱火でバターを溶かし、小麦粉を入れ混ぜたところに、細切して冷凍したきのこを入れ、全体がしんなりとするまで 10 分くらい加熱した。生クリームを入れ、弱火で 5 分加熱しながら混ぜた。仕上げにオリーブオイルを加えた。これをフードプロセッサーにより粉砕均質化した。

#### 模擬試料

ドクツルタケ 10 本のうち 3 本について  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの含有と濃度を確認した ( $\alpha$ -アマニチン濃度：365~425 mg/kg、ファロイジン濃度：169~348 mg/kg)。この含有量を目安として、別途調製均質化したきのこシチュー 950 g にドクツルタケを 140 g 加えて加熱、混和し、常温に戻してフードプロセッサーを用いて均一化した。

### 1.3 装置及び測定条件

試験室間共同試験に参加した 11 機関は、いずれもトリプル四重極型の高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた。各機関の測定条件を表 1-1 に示した。

### 1.4 試験溶液の調製

毒きのこの毒成分一斉分析法 1 の試験溶液調製法の概略を、Scheme 1 に示した。

#### 1.4.1 抽出

試料 5.0 g を 50 mL のポリプロピレン (PP) 製遠心沈殿管に量り採り、10%TCA 水溶液 10 mL 及びメタノール 10 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした後、ホモジナイザーの刃をメタノールで洗い、さらにメタノールを PP 製遠心

沈殿管の 50 mL の標線まで加えた。転倒混和後、常温、 $2,000\times g$  で 5 分間遠心分離し、上清をメスフラスコに採り、メタノールを加えて正確に 50 mL とした。

#### 1.4.2 精製

抽出液を 2 mL 採り、遠心沈殿管 (10-15 mL 容) にセットした 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。このカートリッジを別のガラス製の遠心沈殿管 (10 mL 容) にセットして、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%メタノール水溶液を用いて、10 mL に定容したものを試験溶液とした。

### 1.5 定量

10  $\mu\text{g/mL}$  の 4 種アマニタトキシン混合標準溶液を 60%メタノール水溶液で 10 倍希釈した後、0.2%TCA 含有 60%メタノール水溶液により希釈して 1-50 ng/mL の検量線用の標準溶液を調製した。内部標準溶液を共注入で使用する場合は、同様に 10  $\mu\text{g/mL}$  の内部標準溶液を 60%メタノール水溶液で 10 倍希釈した後、0.2%TCA 含有 60%メタノール水溶液により希釈して 10 ng/mL の溶液を調製した。それぞれ 5  $\mu\text{L}$  (機関 E は 2  $\mu\text{L}$ ) 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た。

### 1.6 標準添加法による模擬試料の値付け

あらかじめ絶対検量線法により求められた模擬試料中の  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの濃度 (x mg/kg) をもとに、

試料中の添加濃度が 0、0.5x、x、1.5x、2x、2.5x、3x と 7 濃度になるように  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンを模擬試料に添加した。**B.1.4 試験溶液の調製**に従い抽出・精製し、LC-MS/MS により分析した。毒成分の添加量に対するピーク面積をプロットしたデータを最小二乗法により直線回帰し、その x 切片から抽出液中の毒成分の濃度を求めた。また、x 切片の標準偏差に係数として 2.571 を乗じることにより、95%信頼限界を求めて不確かさとした。

### 1.7 均一性試験、安定性試験

模擬試料をそれぞれ 25 g ずつ量り採り、24 個のポリエチレン製容器に取り分けた。このうち 6 個の容器をランダムに選択し、1 容器につき 2 本ずつ分析用試料を定量した。Thompson らの報告<sup>2)</sup>に従い、F 検定により均一性を確認した。

試験室間共同試験の実施期間前後において、模擬試料の  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンを 2 併行で定量し、模擬試料に含まれる測定対象化合物の実施期間中の安定性を評価した。

### 1.8 ブランク試験

模擬試料の調製に用いたドクツルタケを加える前のきのこのシチューを、**B.1.4 試験溶液の調製**により抽出・精製し、LC-MS/MS により分析して、妨害ピークの有無を確かめた。

### 1.9 試験室間共同試験

実施期間は令和 6 年 10 月 1 日-11 月 25 日の約 2 か月間とした。4 種混合標準溶液、内部標準溶液、及び模擬試料を参加 11 機関に配布した。参加機関は標準

溶液に含まれる 4 種の毒成分 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -アマニチン及びファロイジン) の中から試料に含まれる 2 種の毒成分を同定したうえで 2 併行の定量試験を行い、分析条件と定量結果を報告した。

各機関の分析条件を精査してデータのスクリーニングを行い、Cochran 検定と Grubbs 検定により外れ値を棄却した<sup>3)</sup> (図 1)。このデータから回収率 (%)、併行精度 ( $RSD_r$ , %) 及び室間精度 ( $RSD_R$ , %) を求めた。回収率は **B.1.6 標準添加法による模擬試料の値付け**で求めた真の値の推定値に対する定量値の平均値の百分率とした。HorRat 値は室間精度 ( $RSD_R$ , %) と Horwitz の式から予測される室間精度の ( $PRSD_R$ , %) の比とした。これらの 4 つのパラメーターを **B.1.8 ブランク試験**により求めた選択性ととも、農林水産省の分析法の妥当性確認に関するガイドライン<sup>4)</sup> (以下、農水省のガイドライン) に従って評価した。また、3 機関のデータについて内部標準補正の有無による定量値の比較も行った。

## 2. 毒きのこの毒成分一斉分析法 2

### 2.1 試料

添加回収試験用に、シイタケ (生、市販品) を用いた。

### 2.2 試薬・試液

(+)-ムスカリン塩酸塩、イボテン酸は Sigma-Aldrich 社製の標準試薬を用いた。ムシモールは Tronto Research Chemicals 社製の標準試薬を用いた。L-プロパルギルグリシン及び L-アリアルグリシンは Combi-Blocks 社製の標準

試薬を用いた。内部標準は東京化成工業（株）製の *O*-Methyl-D-tyrosine (MTY) を用いた。それぞれ、50%メタノール水溶液に溶解し 500 µg/mL の標準原液を調製した。このうち、ムスカリン塩酸塩、イボテン酸、ムシモール、L-プロパルギルグリシン及びL-アシルグリシンの5つの標準原液を混合し、50%メタノール水溶液で希釈して 100 及び 10 µg/mL の5種きのこ毒混合標準溶液を調製し添加回収試験に用いた。

抽出に用いた 10%TCA 水溶液は、ナカライテスク（株）製の特級試薬を用いて調製した。精製カートリッジは、Agilent Technologies 社製の Captiva EMR-Lipid (3 mL, 300 mg) を使用した。誘導体化に用いたほう酸緩衝液は、富士フイルム和光純薬（株）製の APDS タグワコー用ほう酸緩衝液を用いた。誘導体化試薬溶液（AQC 試薬アセトニトリル溶液 (3 mg/mL)）は、Waters 社製の AccQ-Tag™ Ultra Derivatization Kit 付属のカルバミン酸 6-アミノキノリル-*N*-スクシイミジル (AQC) 3 mg を、同キット付属の脱水アセトニトリル 1 mL に溶解して、3 mg/mL の溶液を調製して用いた。

検量線用標準溶液の希釈に用いた 2%TCA 含有 80%メタノール水溶液は、10%TCA 水溶液 20 mL にメタノールを加えて 100 mL に定容して調製した。

その他試験溶液の調製及び LC-MS/MS 測定に用いた有機溶媒は、市販

の残留農薬試験用又は LC-MS 用を用いた。

## 2.3 装置

ホモジナイザーは、（株）マイクロテック・ニチオン製のヒスコトロン NS-51 (ジェネレーターシャフト NS-10P (10.5 mm φ×140 mm)) を用いた。アルミブロックヒーターは、Thermo Fisher Scientific 社製の Reacti-Thermo™ Heating Module を用いた。LC-MS/MS 装置は、Sciex 社製の Exion LC AD-5500+ QTRAP Activated を用いた。

## 2.4 LC-MS/MS 測定条件

きのこ毒 5 成分及び内部標準 1 成分の測定条件を表 2-1 及び 2-2 に示した。

## 2.5 試験溶液の調製

きのこの分析法 2 の試験溶液調製法の概略を、Scheme 2 に示した。

### 2.5.1 抽出

試料 5.0 g を 50 mL の PP 製遠心沈殿管に量り採り、10 µg/mL の内部標準 (MTY) 溶液 0.5 mL を添加し、混和後 30 分間静置した。10%TCA 水溶液 10 mL 及びメタノール 10 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした後、ホモジナイザーの刃をメタノールで洗い、さらにメタノールを PP 製遠心沈殿管の 35 mL の標線まで加えた。常温、2,000×*g* で 5 分間遠心分離し、上清を 50 mL メスフラスコに採った。遠心沈殿管の残渣にメタノールを 15 mL 加えて混和後、常温、2,000×*g* で 5 分間遠心分離して、上清を採り、先のメスフラスコに合わせ、メタノールを加えて正確に 50 mL とした。

### 2.5.2 精製

抽出液を 2 mL 採り、遠心沈殿管 (10-15 mL 容) にセットした 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。このカートリッジを別の遠心沈殿管にセットして、さらに抽出液 1 mL を負荷し、同様に遠心分離して溶出液を採取した。

### 2.5.3 誘導体化

2 mL の不活性処理済みガラス製スクリーバイアルに、**B.2.5.2 精製** で得られた溶出液 100  $\mu\text{L}$  を 量り採り、ほう酸緩衝液 300  $\mu\text{L}$  を加えて混和後、さらに AQC 試薬アセトニトリル溶液 (3 mg/mL) 100  $\mu\text{L}$  を加えて混和した。スクリーキャップを閉めて密閉後、アルミブロックヒーターで 55°C、10 分間加熱した。室温に戻した後、水 500  $\mu\text{L}$  を入れて混和したものを試験溶液とした (0.01 g sample/mL)。

### 2.6 定量

検量線用標準溶液の調製のため、最初に以下の溶液を調製した。

#### ① 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5 種きのご毒混合標準溶液

10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5 種きのご毒混合標準溶液 1 mL 及び 10%TCA 水溶液 2 mL に、メタノールを加えて 10 mL に定容した。

(この溶液の組成は 2%TCA 含有 75%メタノール水溶液となる。)

#### ② 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5 種きのご毒混合標準溶液

①の 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5 種きのご毒混合標準溶液を 2%TCA 含有 80%メタノール水溶液で 10 倍希釈した。

#### ③ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内部標準 (MTY) 溶液

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内部標準 (MTY) 溶液を 2%TCA 含有 80%メタノール水溶液で 100 倍希釈した。

①又は②と③を混合し、2%TCA 含有 80%メタノール水溶液で希釈することにより、内部標準 (MTY) 100 ng/mL を含有する、0、10、20、50、100、200 ng/mL の 5 種きのご毒混合標準溶液を調製した。これらの 6 溶液 100  $\mu\text{L}$  を 2 mL の不活性処理済みガラス製スクリーバイアルにそれぞれ量り採り、**B.2.5.3 誘導体化** に従って誘導体化したものを検量線用標準溶液とした (0、1、2、5、10、20 ng/mL)。それぞれ 5  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS に注入し、ムスカリン塩酸塩は絶対検量線により、その他の 4 成分は絶対検量線法と内部標準補正法の両方で定量を行った (内部標準補正は試験溶液を希釈しない場合のみ)。

### 2.7 添加回収試験による妥当性確認

分析対象化合物を含まないことを確認したシイタケ 5 g に、5 種きのご毒混合標準溶液 (100 と 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 2 濃度) 及び内部標準 (MTY) 溶液 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) をそれぞれ 0.5 mL ずつ添加し、混和後 30 分間静置したものを添加試料とした (添加濃度 : 10 及び 1 mg/kg)。各濃度で 2 回併行 5 日間の添加回収試験を行い、**B.2.6 定量** で作成した検量線で定量した。一元配置の分散分析により真度 (%)、併行精度 ( $\text{RSD}_r$ , %) 及び室内精度 ( $\text{RSD}_{wr}$ , %) を求めて、厚生労働省の「食品中の残留農薬等の妥当性評価ガイドライン<sup>5)</sup> (以下、厚労省のガイドライン)」に従って評価した。

## C. D. 研究結果及び考察

### 1. 毒きのこの毒成分一斉分析法 1 の試験室間共同試験による妥当性確認

#### 1.1 試験に用いた模擬試料

ドクツルタケ (*Amanita virosa*、別名 Destroying Angel) は、わが国のきのこ中毒で最も死亡事例が多いきのこである。ドクツルタケを誤って食べると、比較的長い潜伏期間 (6時間~24時間) を経てコレラ様の症状 (嘔吐、腹痛、下痢) が現れる。いったん症状は治まるが、食後48時間過ぎから肝機能が悪化しはじめ、重症の場合は5日~8日後に肝不全を発症し、多臓器不全を経て死に至る<sup>6),7)</sup>。

ドクツルタケの毒成分はアマニタトキシシンと総称される複数の環状ポリペプチドである。アマニタトキシシンはドクツルタケ以外に、シロタマゴテングタケ (*A.veruna*)、タマゴタケモドキ (*A.subjunquillea*) などのテングタケ属のきのこや、コレラタケ (*Garerina fasciculata*) などのケコガサタケ属のきのこにも含まれており、これらの毒きのこによる中毒事例も報告されている<sup>6),8)</sup>。

今回、調理済みの中毒残品を想定した模擬試料として、Jansson らの報告<sup>1)</sup>をもとにドクツルタケを含む「きのこシチュー」を作製した。標準添加法による値付けの結果、 $\alpha$ -アマニチンは  $42.3 \pm 6.5$  mg/kg、ファロイジンは  $44.3 \pm 2.8$  mg/kg となった。 $\alpha$ -アマニチンの経口致死量はヒトで 5 mg と推定されていることから、今回のきのこシチューは約 120 g で致死量に達する高濃度のアマニタトキシシン

を含む試料である。これを市販の標準試薬の添加により作製した場合 400 万円以上と試算され、現実的ではない。しかし、今回は実際の毒きのこを使用して作製した模擬試料を値付けすることにより、実際の食中毒事例を反映した試験室間共同試験が実施可能となった。

#### 1.2 模擬試料の均一性と安定性

模擬試料に含まれる  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの容器間の分散比はそれぞれ、0.37 と 0.91 となり、F 境界値 (4.39) よりも小さく、十分に均一であることが確かめられた。

実施期間前後の定量値の比は、 $\alpha$ -アマニチンが 99.0%、ファロイジンが 105.1% となり安定性が確かめられた。

#### 1.3 有毒植物毒成分の妥当性確認

##### 1.3.1 各機関の定性結果と選択性

11 機関全てが模擬試料に含まれる  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの 2 種類の毒成分を正しく同定することができた。

ブランク試験においては、 $\alpha$ -アマニチン、ファロイジンのいずれのクロマトグラムにも定量を妨害するピークは検出されなかった。今回の模擬試料は、脂質やたんぱく質に加えきのこ由来の夾雑物質など、複雑なマトリックスを多く含む試料であったが、選択性は良好であった。

##### 1.3.2 データスクリーニングと外れ値検定

参加 11 機関の前処理操作フローは同一であった。しかし、使用した MS/MS のメーカーやスペックが異なり、イオン化特性や測定感度に大きな違いがある

と推測された。分析法の開発において使用した Sciex 社の MS/MS の場合、アマニトキシシン類は ESI(-)の方が S/N がより高かった。そのため、今回参加した機関のうち Sciex 社の MS/MS を使用した 5 機関は ESI(-)で測定を行った。一方で他メーカーの MS/MS を使用した 6 機関については、機関 E の $\alpha$ -アマニチンを除き、ESI(+ )での分析結果が報告された。これらの機関の MS/MS 測定においては、ESI(+ )の方が ESI(-)よりも測定感度が高かったと推測される。機関 E では標準溶液に含まれる $\beta$ -アマニチンの測定感度が ESI(+ )において十分ではなく、ESI(-)で測定した方が良好な感度となったため、 $\alpha$ と $\gamma$ -アマニチンとともに ESI(-)で測定した (表 1-1)。

データスクリーニングにおいては、試験溶液の希釈率について外れ値検定を行った上で、0.4-1 mg sample/mLの範囲内の希釈率で測定した9機関のデータを採用することとした。また、Cochran 検定により、機関Iの $\alpha$ -アマニチンのデータ、機関FとIのファロイジンのデータがそれぞれ棄却された (表1-2)。

### 1.3.3 各種パラメーターの評価

回収率、併行精度、室間精度、HorRat 値はいずれも農水省のガイドラインに適合していた (表1-2及び1-3)。

回収率は $\alpha$ -アマニチンで102%と良好な結果となったが、ファロイジンは84.7%となった。この理由として、ファロイジンは $\alpha$ -アマニチンより疎水性が高いため、抽出回数1回の本分析法ではファロイジンは十分に回収されず、低い

定量値となったことが考えられた。

この仮説を検証するため、模擬試料の1回抽出と2回抽出の定量値を比較した ( $n=12$ )。1回抽出のファロイジンの定量値の平均は34.7 mg/kgであったのに対して、2回抽出は36.0 mg/kgとなり、片側 t検定で有意差が認められた。ただしその差はわずかであり、抽出回数による影響は限定的と考えられた。

### 1.3.4 ファロイジンの異性化

試験室間共同試験に参加した機関H から、TCAを添加した標準溶液を長期保存した結果、ファロイジンのクロマトグラム上に保持時間の小さい別のピークが検出されたとの報告があった。これを検証するため、1 mg/kgの濃度の添加回収のクロマトグラムを確認したところ、ファロイジンと同一のSRM条件で、ファロイジン ( $t_R=7.2$  min)の前に異性体 ( $t_R=5.5$  min)と思われるピークが検出された。このピークは用時調製した標準溶液では見られず、TCAを含む溶媒 (0.2%TCA含有60%メタノール水溶液) で希釈した5日後にファロイジンの6.3%、50日後にファロイジンの60.9%までのピーク高さとなった。

添加回収試験において、ファロイジンの異性化の影響がどの程度あるかを検証するため、異性体のピークを合算して求めた定量値から回収率を求めた。異性体を含めない場合の回収率が91.9%であったのに対して、異性体を含めた回収率は95.7%となり3.8%上昇した。試験溶液の調製においては、10%のTCA水溶液を加えてホモジナイズする操作がある

ため、標準溶液に比してより異性化が進行しやすいと推測される。同時に添加回収試験を行った $\alpha$ -アマニチンの回収率96.5%と同等であったことから、ファロイジンの異性化の影響が $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの回収率の差につながったことが示唆された。

### 1.3.5 内部標準補正について

3機関のデータについて内部標準補正の有無による定量値の比較を行った。バーニアマイシン BをLC-MS/MS測定時の内部標準として用いて補正した定量値は、 $\alpha$ -アマニチン、ファロイジンともに内部標準補正なしの結果と比較して大きな差はなく、回収率、併行精度、室間精度、HorRat値はいずれも農水省のガイドラインに適合していた（表1-4及び1-5）。今回の内部標準はLC-MS/MS測定の測定感度の変動を補正する目的で使用したが、システムの違いに由来する保持時間の差を予測する上でも有効な指標となるため、使用が推奨される。

## 2. 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 の単一試験室における妥当性確認

本法は、アセタケ類をはじめとする広い範囲のきのこに含まれるムスカリンと、テングタケ属のきのこに含まれるイボテン酸、ムシモール、プロパルギルグリシン、アシルグリシンを同時に測定する分析法として開発した。先の厚生労働科学研究（21KA1005）において、7種の市販きのこを用いた添加回収試験（添加濃度：1 mg/kg、n=3）の結果について報告した。7種全てのきのこにおいて、対象とした5成分の選択性は良好で、回

収率はいずれも50-150%の範囲内であり、相対標準偏差は5%以内となったことから、きのこ中に1 mg/kgの濃度で含まれる毒成分を誤りなく識別することが可能であることを示した。また一部きのこで回収率が低下する主な原因がイオン化抑制であることが明らかとなった。

今回、市販のシイタケを用いて2濃度（添加濃度：1及び10 mg/kg）の添加回収試験を行い、単一試験室における真度（%）、併行精度（RSD<sub>r</sub>, %）及び室内精度（RSD<sub>wr</sub>, %）を求めた（表2-3及び2-4）。1 mg/kgの添加回収試験の結果は、絶対検量線法と内部標準法の両方とも、厚労省のガイドラインに適合しており、良好な結果となった。10 mg/kgの添加濃度においては、検量線の範囲に収まるように、試験溶液を10倍希釈して定量を行った。したがって内部標準補正法は実施していない。1 mg/kgで回収率が74.6%と比較的低かったムシモールが、10 mg/kgでは92.2%と改善しており、希釈によるイオン化抑制の回避が認められた。

以上により、本法はアセタケ類などのきのこによるムスカリン中毒や、テングタケ属のきのこによる食中毒の際に適用可能な分析法であることが示唆された。今後、分析法1と同様に、実際の毒きのこを含む模擬調理試料を用いて試験室間共同試験を行い、汎用性を検証する予定である。

## E. 結論

わが国の毒きのこによる食中毒の原因究明に有用な分析法として開発した2つの分析法について妥当性確認を実施した。

毒きのこの毒成分一斉分析法1は、中毒事例や死亡事例が多い5きのこ群（ツキヨタケ、ドクツルタケ、カエントケ、カキシメジ、ニセクロハツ）の9成分を対象とする分析法である。複雑なマトリックスを多く含む試料として「きのこのシチュー」を調製し、これに実際の毒きのこであるドクツルタケを加えることで、食中毒事例の残品を想定した模擬試料を作製した。標準添加法による値付けを行った上で参加11機関に配布し、試料に含まれる毒成分の同定と定量を行った。いずれの機関も模擬試料に含まれる $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの2種類の毒成分を正しく同定することができた。分析法の妥当性確認を行った結果、 $\alpha$ -アマニチンとファロイジンともに農水省のガイドラインに適合していた。脂質やたんぱく質に加え、きのこ由来の夾雑物質など、複雑なマトリックスを多く含む食品を用いて試験室間共同試験により分析法の妥当性が確認されたことから、本法の汎用性が示された。

毒きのこの毒成分一斉分析法2は、アセタケ類をはじめとする広い範囲のきのこに含まれるムスカリンと、テングタケ属のきのこに含まれるイボテン酸、ムシモール、プロパルギルグリシン、アリルグリシンを同時に測定する分析法である。シイタケを用いて1 mg/kgと10 mg/kgの添加回収試験を行い、単一試験

室で妥当性確認を行った結果、分析対象の5成分全てが厚労省のガイドラインに適合していた。本法は実際の食中毒の原因究明に適用可能な分析法であることが示唆された。

## 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) 南谷臣昭：アマニタトキシンの化学と毒性、地方衛生研究所東海・北陸ブロック理化学部門専門家会議、岐阜市、2024年9月
- 2) 南谷臣昭：汎用性の高い植物性自然毒の分析法の開発、地方衛生研究所北海道・東北・新潟ブロック専門家会議、山形市、2024年10月
- 3) 竹内浩、南谷臣昭、谷口賢、有沢拓也、堀井裕子、中山恵理子、土屋小百合、林克弘、木村亜莉沙、竹田正美、三野真輝、海野明広、茅原田一、池谷実穂、宮城島利英、鈴木敏之、登田美桜、遠藤利加：有毒植物の模擬調理試料を用いた試験室間共同試験（アトロピン、スコポラミン）、第61回全国衛生化学技術協議会年会、堺市、2024年11月
- 4) 竹内浩、南谷臣昭、遠藤利加：食中毒残品を想定した模擬調理試料中のアマニタトキシンの定性・定量、

令和6年度地方衛生研究所全国協議  
会東海・北陸支部衛生化学部会、四  
日市市、2025年2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) Jansson, D, Fredriksson, S,  
Herrmann, A and Nilsson, C.  
*Forensic Sci. Int.*, 221, 44-49  
(2012)
- 2) Thompson, M. and Wood, R. *J.*  
*AOAC Int.* 76, 924-940 (1993)
- 3) Appendix D: Guidelines for  
Collaborative Study Procedures  
To Validate Characteristics of a  
Method of Analysis, *AOAC Int.*  
(2002)
- 4) 分析法の妥当性確認に関するガイ  
ドライン、農林水産省、令和元年  
10月
- 5) 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  
の一部改正について、厚生労働省  
医薬食品局食品安全部長通知（食  
安発 1224 第 1 号、平成 22 年 12  
月 24 日）
- 6) Garcia, J., Costa, V., Carvalho,  
A., Baptista, P., Pinho, P., Bastos,  
M. and Carvalho, F. *Food Chem.*  
*Toxicol.* 86, 41-55 (2015)

7) Barbosa, I., Domingues, C.  
Ramos, F. and Barbosa R. *J.*  
*Pharm. Biomed. Anal.* 232,  
115421 (2023)

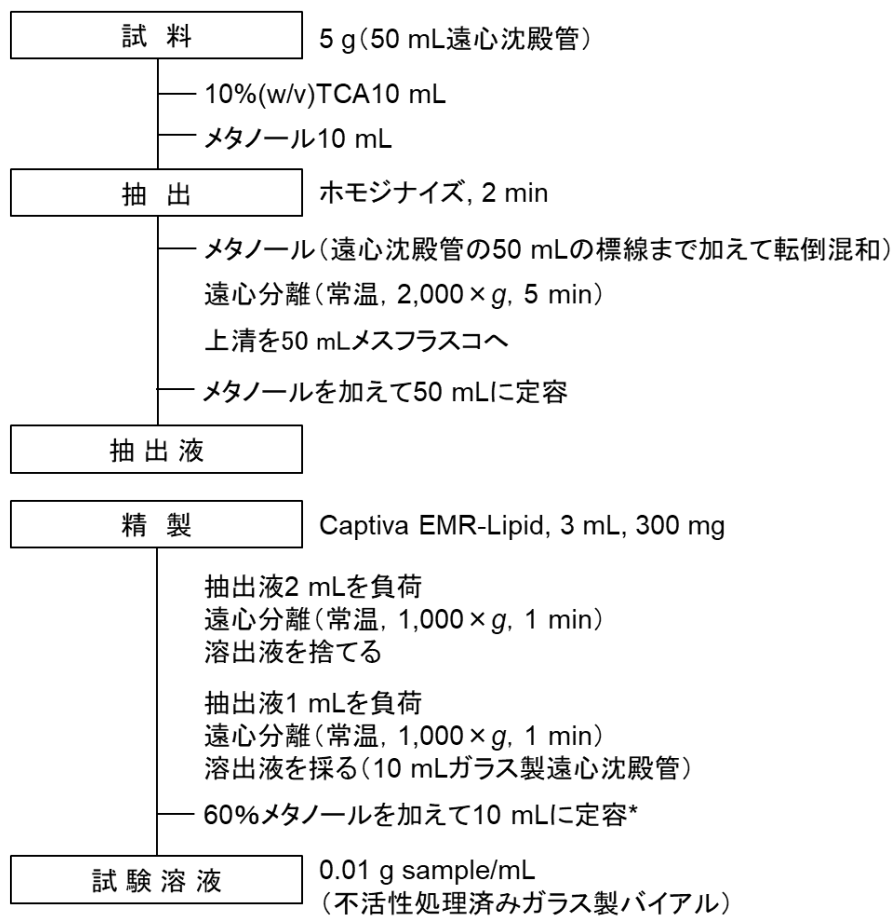
8) 大作晃一、吹春俊光、吹春公子 お  
いしいきのこ毒きのこハンディ図  
鑑、東京、主婦の友社、2016

表 1-1 試験室間共同試験参加 11 機関の LC-MS/MS 測定条件

Laboratory		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
LC	Manufacturer	Shimadzu	Shimadzu	Sciex	Waters	Waters	Waters	Waters	Agilent	Shimadzu	Sciex	Sciex
	Instrument	LC20AD	LC-40D XR	Exion LC 2.0+	ACQUITY UPLC H-Class	ACQUITY UPLC H-Class	ACQUITY UPLC H-Class	ACQUITY UPLC I-Class Plus	1260 Infinity II	LC20AD	Exion LC AD	Exion LC AD
MS/MS	Manufacturer	Sciex	Shimadzu	Sciex	Waters	Waters	Waters	Waters	Agilent	Sciex	Sciex	Sciex
	Instrument	API4000	8045	QTRAP4500	Xevo TQ-S micro	Xevo TQ-S micro	Xevo TQ-XS	Xevo TQ-S micro	6470 LC/MS	4000Q TRAP	Triple Quad 5500+	Triple Quad 5500+
Column		Xbridge Shield RP18 (Waters)										
		2.1×150 mm, 3.5 μm										
Mobile phase	Solvent A	0.05% Formic acid										
	Solvent B	Methanol										
Gradient method	% of solvent B	10%(0 min) → 100%(10 min, 2 min hold) → 10%(12.1 min) → 10%(20 min)										
Flow rate (mL/min)		0.2										
Column temperature (°C)		40										
Injection volume (μL)		5				2		5				
Dilution factor (mg sample/mL)		0.5	1	0.5	0.5	0.4 *	0.4	2	10	1	1	0.5
Electrospray ionization (+/-)		-	+	-	+	-/+ **	+	+	+	-	-	-
Precursor ion (m/z)	α-Amanitin	917.4	919.5	917.3	919.6	917.3	920.0	919.6	919.4	917.3	917.3	917.3
	Phalloidin	787.4	789.4	787.3	789.3	789.3	789.7	789.3	789.3	787.3	787.3	787.3
Quantifier ion (m/z)	α-Amanitin	899.3	86.1	899.4	86.2	205.0	85.9	86.2	86.1	899.4	899.4	899.4
	Phalloidin	743.3	130.1	743.3	86.2	86.2	85.9	86.2	789.3	743.4	743.4	743.4

\* A value reflecting the reduction in injection volume

\*\* -: α-Amanitin, +: Phalloidin



\* 内部標準を入れる場合は10 ng/mLの内部標準溶液をHPLCのオートサンプラーで5 μL共注入  
(共注入の機能が無いHPLCの場合は定容前に100 ng/mLの内部標準溶液を1 mL添加)

**Scheme 1** 毒きのこの毒成分一斉分析法 1 前処理操作フロー

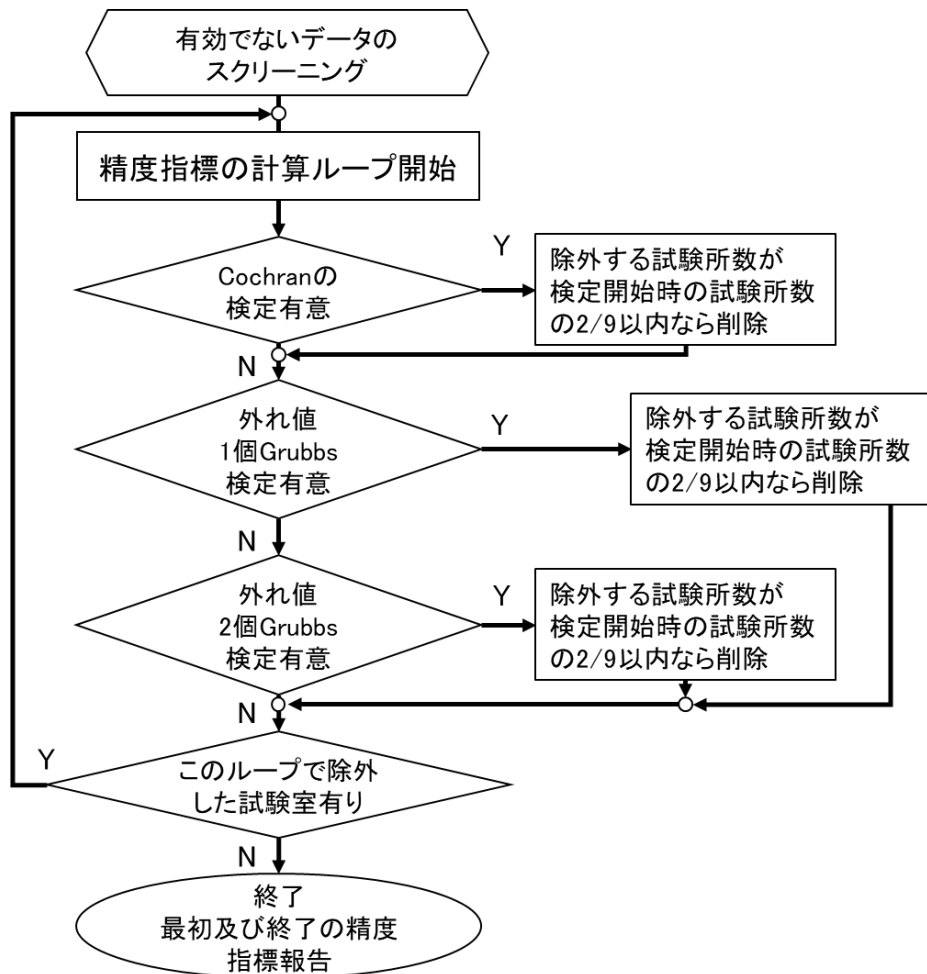


図1 試験室間共同試験のデータのスクリーニング及び検定のフローチャート

表 1-2 試験室間共同試験の結果

Laboratory	α-Amanitin		Phalloidin	
	A	44.4	46.4	41.1
B	44.4	42.9	36.2	36.4
C	43.8	43.8	34.5	34.9
D	41.0	41.0	35.8	35.7
E	40.4	40.9	35.8	36.9
F	43.4	43.4	32.7*	29.1*
I	36.2*	43.6*	47.5*	36.2*
J	47.4	47.0	41.2	41.2
K	37.3	39.8	36.5	37.3
Mean (mg/kg)	43.0		37.5	
Mean recovery (%)	102		84.7	
Outlier (Cochran parameters)	1		2	
Outlier (single Grubbs parameters)	0		0	
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		0	
Repeatability relative SD [RSD <sub>r</sub> , %]	2.1		1.2	
Reproducibility relative SD [RSD <sub>R</sub> , %]	6.6		7.3	
Predicted reproducibility relative SD [PRSD <sub>R</sub> , %]	9.1		9.3	
HorRat value	0.7		0.8	

\*Outliers of the Cochran test

表 1-3 試験室間共同試験のクライテリア（農水省のガイドラインをもとに作成）

Matrix	Mushroom stew			
	Unit	Recovery(%)	RSD <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)
Recovery Repeatability Reproducibility	≧ 100 mg/kg	90~107	≦ 16	≦ 5.3
	≧ 10 mg/kg	80~110	≦ 22	≦ 7.3
	≧ 1 mg/kg	80~110	≦ 32	≦ 11
	HorRat value ≦ 2			

表 1-4 3 機関による試験室間共同試験の結果- $\alpha$ -アマニチン/内標補正の有無の比較

Laboratory	IS(-)		IS(+)	
	E	40.4	40.9	41.6
J	47.4	47.0	43.1	45.6
K	37.3	39.8	35.3	38.7
Mean (mg/kg)	42.1		41.0	
Mean recovery (%)	99.6		96.9	
Repeatability relative SD [RSD <sub>r</sub> , %]	2.5		3.2	
Reproducibility relative SD [RSD <sub>R</sub> , %]	10.9		6.1	
Predicted reproducibility relative SD [PRSD <sub>R</sub> , %]	9.1		9.1	
HorRat value	1.2		0.7	

表 1-5 3 機関による試験室間共同試験の結果-ファロイジン/内標補正の有無の比較

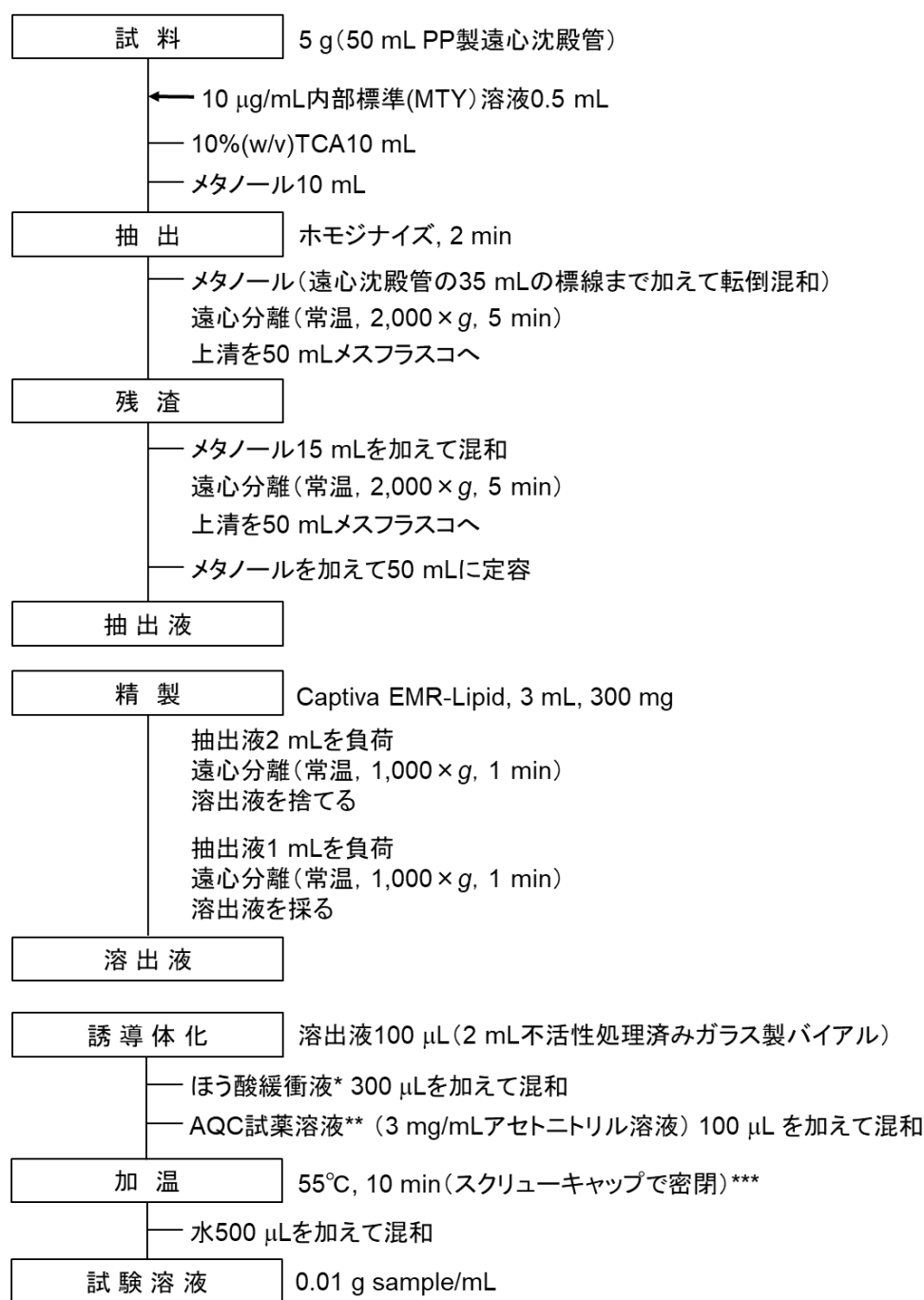
Laboratory	IS(-)		IS(+)	
	E	35.8	36.9	36.5
J	41.2	41.2	37.4	39.9
K	36.5	37.3	34.5	36.3
Mean (mg/kg)	38.2		37.2	
Mean recovery (%)	86.1		83.9	
Repeatability relative SD [RSD <sub>r</sub> , %]	1.5		3.9	
Reproducibility relative SD [RSD <sub>R</sub> , %]	7.0		5.2	
Predicted reproducibility relative SD [PRSD <sub>R</sub> , %]	9.2		9.3	
HorRat value	0.8		0.6	

表 2-1 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 の LC-MS/MS 測定条件

LC	Exion LC AD (Sciex)	
MS/MS	Triple Quad 5500+ · QTRAP Activated (Sciex)	
Column	Luna Omega Polar C18 (2.1×150 mm, 1.6 μm) (Phenomenex)	
Mobile phase	Solvent A	0.1% Formic acid
	Solvent B	0.1% Formic acid in acetonitrile
Gradient method	% of solvent B	2%(0 min)→10%(1 min) →30%(11 min)→95%(11.1-13 min) →2%(13.1-18 min)
Flow rate (mL/min)	0.4	
Column temperature (°C)	35	
Injection volume (μL)	5	
Parameter \ Porarity	ESI(+)	
Curtain gas (psi)	30	
Collision gas (psi)	9	
Ion Spray Voltage(V)	5000	
Temperature (°C)	600	
Ion Source Gas1 (psi)	60	
Ion Source Gas2 (psi)	60	

表 2-2 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 の SRM トランジション

No.	Compound name	RT (min)	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	Muscarin	2.2	174	57	51	31	6
			174	43	51	49	10
2	Ibotenic acid	3.4	329	171	90	30	10
			329	116	90	70	10
3	Muscimol	4.1	285	171	90	30	10
			285	116	90	70	10
4	Propargylglycine	4.9	284	171	90	30	10
			284	116	90	70	10
5	Allylglycine	5.8	286	171	90	30	10
			286	116	90	70	10
IS	MTY (Internal standard)	9.2	366.1	171	90	30	10
			366.1	116	90	70	10



\*APDSタグワコー用ほう酸緩衝液(富士フィルム和光純薬, 019-23151)を使用

\*\*AccQ•Tag™ Ultra Derivatization Kit (Waters, Part#. 186003836)を使用

AccQTag™ Ultra-2A (Reagent powder, 3 mg)にAccQTag™ Ultra-2B アセトニトリル100%を1 mL入れて1分間超音波で溶解

\*\*\*バイアルをアルミブロックに入れて加熱

## Scheme 2 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 前処理操作フロー

表 2-3 妥当性確認の結果（試料：シイタケ、添加濃度：1 mg/kg）

Analyte	Quantification by absolute calibration curve			Quantification by internal standard correction			Criteria*		
	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)
Muscarin	108	1.6	3.7	—	—	—	70-120	< 10	< 15
Ibotenic acid	86.7	2.9	4.2	87.7	2.5	2.6	70-120	< 10	< 15
Muscimol	74.6	2.2	2.5	75.1	1.7	3.2	70-120	< 10	< 15
Propargylglycine	96.8	1.8	3.0	97.7	1.4	3.4	70-120	< 10	< 15
Allylglycine	100	1.6	7.0	101	2.6	6.8	70-120	< 10	< 15

\*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の一部改正について（平成22年度12月24日厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第1224第1号）

表 2-4 妥当性確認の結果（試料：シイタケ、添加濃度：10 mg/kg）

Analyte	Quantification by absolute calibration curve			Quantification by internal standard correction			Criteria*		
	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)
Muscarin	113	2.8	3.7	—	—	—	70-120	< 10	< 15
Ibotenic acid	93.2	2.6	6.1	—	—	—	70-120	< 10	< 15
Muscimol	92.2	2.4	5.0	—	—	—	70-120	< 10	< 15
Propargylglycine	106	2.6	6.3	—	—	—	70-120	< 10	< 15
Allylglycine	92.4	2.7	8.1	—	—	—	70-120	< 10	< 15

\*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の一部改正について（平成22年度12月24日厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第1224第1号）