

テングタケ類に含有されるイボテン酸及びムッシモールの分析

Analysis of Ibotenic Acid and Muscimol in *Amanita* Mushrooms

佐藤 正幸 姉帯 正樹*

Masayuki SATO and Masaki ANETAI

Key words : *Amanita* sp. (テングタケ類); ibotenic acid (イボテン酸); muscimol (ムッシモール); cooking (調理)

テングタケ科テングタケ属テングタケ *Amanita pantherina*, イボテングタケ *Amanita ibotengutake* 及びベニテングタケ *Amanita muscaria* は夏から秋に針葉樹林や広葉樹林の地上に発生する毒キノコである。毒成分はいずれもイボテン酸及びムッシモール (図1) 等で、腹痛、嘔吐、下痢、幻覚等を引き起こす¹⁾。

北海道では平成20~24年に毒キノコによる食中毒が16件発生した (表1)。内訳を見ると、テングタケ類が9件 (テングタケ5, イボテングタケ3, ベニテングタケ1) と全体の56%を占めた。しかし、当所では現有機器による毒キノコの毒成分分析法は確立されていなかった。そこで、これらの毒キノコによる食中毒が発生した際に原因物質の迅速な化学的鑑定を可能とするため、毒成分であるイボテン酸及びムッシモールの分析法を検討し、上記3種のキノコについて毒成分を定量した。さらに毒キノコを調理した時の毒成分残留量に関する基礎的データを得るため、油炒めにした時及び茹でた時のイボテン酸及びムッシモールを定量した。

方 法

1. 試料

2009年9月~2012年11月、道内 (札幌市, 北広島市, 七飯町) で採取したテングタケ, イボテングタケ及びベニテングタケ地上部を分析時まで冷凍保存した。

2. 試薬

イボテン酸 (生化学用), ムッシモール (生化学用), トリフルオロ酢酸 (TFA, 特級), ギ酸アンモニウム (特級), アンモニア水 (特級), ギ酸 (LC/MS用), アセトニトリル (高速液体クロマトグラフ用) 及びメタノール (高速液体クロマトグラフ用) は和光純薬工業 (株) 製を用いた。調理用の水を含め、水は蒸留脱イオン水を用いた。

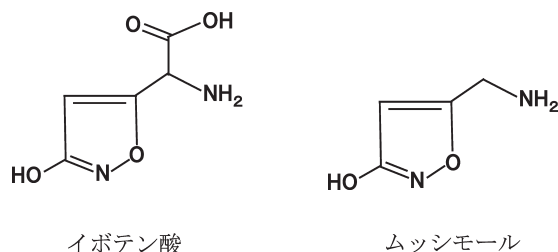


図1 イボテン酸及びムッシモールの構造式

Oasis HLB Plus カートリッジ (225 mg, Waters 社製, 以下オアシス HLB プラスと略記) はあらかじめアセトニトリル 2 mL, 1.5% TFA/アセトニトリル (1 : 9) 2 mL で順次洗浄した後, 使用した。Discovery DSC-SCX カートリッジ (500 mg, SUPELCO 社製, 以下 DSC-SCX と略記) はあらかじめアセトニトリル 5 mL, メタノール 5 mL, 水 5 mL, 1.5% TFA/アセトニトリル (1 : 9) 5 mL で順次洗浄した後, 使用した。

3. 標準溶液

イボテン酸及びムッシモール 1.0 mg をそれぞれアセトニトリル/水 (1 : 1) 1.0 mL に溶解し, イボテン酸及びムッシモール標準原液 (1,000 μ g/mL) とした後, これをアセトニトリル/水 (1 : 1) または HPLC 移動相で適宜希釈し, 使用した。

4. 試料の調製

調理試験に用いた試料は, 冷凍個体を各々縦に2等分し, 片方を未調理品 (対照試料), 残りの片方を調理用試料とした。調理試験用以外の試料については, 冷凍個体をオスターブレンダーで粉碎した。

調理品の試料は以下のとおり調製した。

1) 油炒めにした試料

ホットプレート (株象印マホービン製 EA-ZA45, 加熱温度 200°C) 上にラード 1 g 及び試料を載せ, 5 分間炒め

*現 北海道大学次世代ポストゲノム研究センター

表1 北海道における毒キノコによる食中毒事例（平成20～24年）

発生日	原因キノコ	発生場所	摂食者数	患者数
20. 9. 6	テングタケ	北広島市	1	1
20. 9. 9	クサウラベニタケ（推定）	釧路市	2	2
20. 9. 20	テングタケ	網走市	1	1
20. 10. 6	ベニテングタケ（推定）	旭川市	1	1
20. 10. 17	ツキヨタケ	日高町	16	12
21. 9. 16	カキシメジ	平取町	2	2
21. 9. 25	クサウラベニタケ（推定）	富良野市	10	8
22. 10. 29	オオキノハダトマヤタケ（推定）	乙部町	1	1
23. 9. 5	イボテングタケ	夕張市	2	1
23. 9. 21	テングタケ	旭川市	6	6
23. 9. 22	テングタケ	幌加内町	2	2
23. 9. 24	イボテングタケ	札幌市	1	1
23. 9. 27	イッポンシメジ	苫小牧市	1	1
23. 10. 3	テングタケ	森町	1	1
24. 9. 26	イボテングタケ	石狩市	3	1
24. 10. 29	ムラサキシメジ類の一種	苫小牧市	2	2

た後、ペーパータオルで試料表面の油を取り除いた。

2) 茹でた試料

ビーカーに水100 mLを入れ、ホットプレート上で加熱した。水が沸騰後、試料を加え、5分間茹でた後、水切りした。

5. 試験溶液の調製

1) 未調理品及び調理品

試料（調理試験用以外の試料については5 g）に1.5% TFA/アセトニトリル（1：9）80 mLを加え、ホモジナイズ抽出した。吸引ろ過後、ろ液に1.5% TFA/アセトニトリル（1：9）を加え、100 mLに定容し抽出液とした。オアシス HLB プラスカラムに抽出液2.0 mLを注入後、1.5% TFA/アセトニトリル（1：9）2 mLで毒成分を溶出し、連結したDSC-SCXに吸着させた。DSC-SCXを5 mM ギ酸アンモニウム2 mLで洗浄し、メタノール1 mLでイボテン酸を溶出した（Fr. 1）。更に5% NH₄OH/メタノール5 mLを注入し、減圧下、1分以内にイボテン酸及びムッシモールを溶出させた（Fr. 2）。それぞれ減圧乾固後、HPLC移動相2.0 mLに溶解し試験溶液I-1及びI-2（未調理品）、II-1及びII-2（油炒め）、III-1及びIII-2（茹で試料）とした（図2）。

2) 茹で汁

茹で汁に水を加え、100 mLに定容した後、その2.0 mLに3% TFA 2.0 mL及びアセトニトリル36 mLを加え攪拌後、全量をオアシス HLB プラスカラムに注入した。1.5% TFA/アセトニトリル（1：9）2 mLで毒成分を溶出し、以下、前項と同様に操作し、試験溶液IVとした。

6. イボテン酸及びムッシモールの熱安定性試験

1) 200°Cで5分間加熱

イボテン酸及びムッシモール標準溶液（100 µg/mL）20 µLを各々三角フラスコに入れ、窒素気流下で乾固後、目盛を200°Cに設定したホットプレート上で5分間加熱し

た。冷後、残留物をHPLC移動相200 µLに溶解し、試験溶液V及びVIとした（n=3）。

2) 沸騰水中で5分間加熱

マイクロ試験管に水200 µLを入れ、沸騰水上で5分間加熱した後、イボテン酸またはムッシモール標準溶液（100 µg/mL）20 µLを加え、5分間放置した。冷後、HPLC移動相を加え500 µLに定容し、試験溶液VIIまたはVIIIとした（n=3）。

7. HPLCの測定条件

装置：(株)島津製作所製 LC-10 システム及びクロマトパック C-R5A

カラム：ジーエルサイエンス(株)製 Inertsil Amide (2.1×150 mm, 3 µm)

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル/20 mM ギ酸アンモニウム (pH 3.0) (3：1)

流速：0.2 mL/min

測定波長：228 nm

注入量：5 µL

8. 添加回収試験

ベニテングタケ試料1.0 gにイボテン酸及びムッシモール標準原液（各1,000 µg/mL）500 µLを添加後、直ちに抽出操作を開始した。試行数は無添加試料については1回、添加試料については3回とした。

結果及び考察

1. 分析法の検討

ベニテングタケ中のイボテン酸及びムッシモールの定量法として、含水メタノールで抽出後、陰イオン交換樹脂カラム及びアルミナを積層したシリカゲルカラムにより精製し、HPLC分析する方法²⁾、誘導体化後HPLC³⁾またはGC/MS⁴⁾分析する方法、イオンペア試薬を用いHPLC分

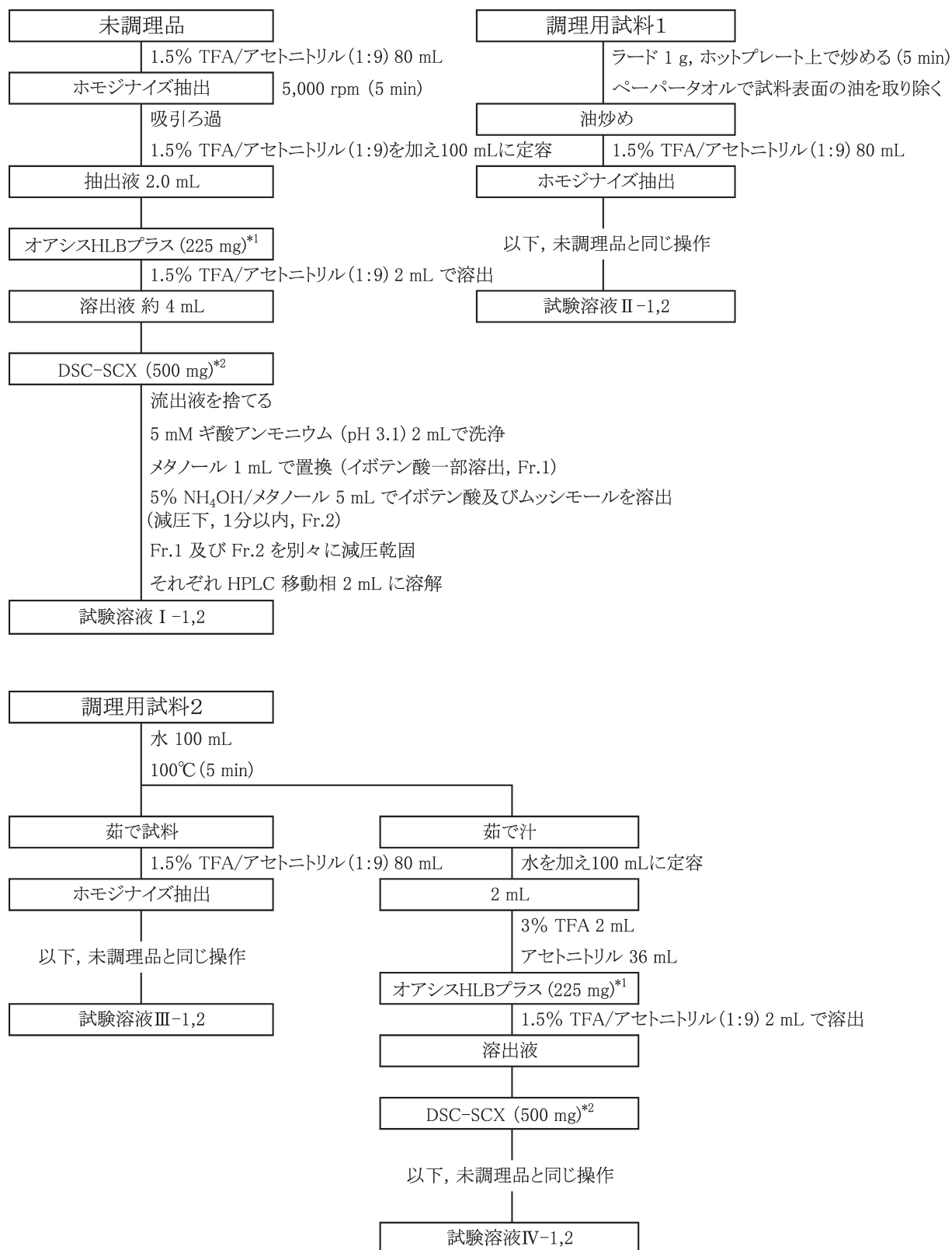


図2 イボテン酸及びムッシモール試験溶液の調製法

*¹アセトニトリル 2 mL, 1.5%TFA/アセトニトリル (1:9) 2 mL で洗浄後, 使用

*²アセトニトリル 5 mL, メタノール 5 mL, 水 5 mL, 1.5%TFA/アセトニトリル (1:9) 5 mL で洗浄後, 使用

析する方法⁵⁾が報告されている。多田らはキノコ中のムッシモールの簡便な分析法として、1.5% (v/v) TFA/アセトニトリル (1 : 9) 抽出後、遠心分離し、上澄液をC18ミニカラムで精製後、高極性物質の保持可能な親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) カラムによりLC-MS/MS分析する方法を報告している⁶⁾。

今回筆者らはアミノ酸であるイボテン酸についてもHILICカラムに保持可能であると考え、多田らの方法を基に調理品についてもHPLCにより分析可能な方法を検討した。

食中毒が発生した際の調理品残品については、分析を妨害する種々の夾雑物の含有が考えられることから、1.5% TFA/アセトニトリル (1 : 9) 抽出後、吸引ろ過により除蛋白し、油などの除去には、筆者らが従来使用してきたオアシス HLB プラスカラム⁷⁾を用いることにした。抽出液をオアシス HLB プラスカラムに注入したところ、イボテン酸及びムッシモールの一部がカラムに保持されたため、1.5%TFA/アセトニトリル (1 : 9) 2 mL で溶出することにした。さらに、イボテン酸及びムッシモールのアミノ基を有することから、アミノ基を有するプロカインアミドやアセトアミノフェンなどに対し適用可能なSCXミニカラム⁸⁾により精製することにした。DSC-SCXで処理する際、5 mM ギ酸アンモニウムで洗浄後、直ちに5% NH₄OH/メタノールで溶出した場合、ムッシモールの約7割しか溶出されなかった。この原因としてカラム中にギ酸アンモニウムが残存したため、アルカリによる溶出が不十分であったことが考えられた。そこで、イボテン酸の一部は溶出するが、メタノールによりギ酸アンモニウムを溶出 (Fr. 1) させた後、イボテン酸及びムッシモールをアルカリで溶出 (Fr. 2)、それぞれ減圧乾固後、HPLC 移動相に溶解し分析することにした。なお、イボテン酸の定量値はFr. 1及びFr. 2の値の合計により算出した。また、アルカリで溶出する際に自然落下 (約1 mL/min) させた場合、イボテン酸及びムッシモール以外に充填剤由来と考えられる妨害ピークが多数出現した。妨害物質を除去するため、カラムを使用する前に5% NH₄OH/メタノールによる繰り返し洗浄も行ったが、妨害ピークを消失させることは出来なかった。妨害物質は固相に対する保持力が強く、長時間アルカリと接触することにより徐々に溶出されることが考えられたため、イボテン酸及びムッシモールを減圧下、高速 (約10 mL/min) で溶出させたところ、妨害物質の大部分はカラムに保持され、イボテン酸及びムッシモールの定量が可能となった (図3)。そこで、アルカリで溶出させる際には、減圧下、高速で溶出させることにした。なお、試験溶液をHPLC分析する際、イボテン酸及びムッシモールのピーク近くに妨害ピークが出現 (図4) したことから、定量はピーク高法により行うことにした。定量下限 (S/N=10) はイボテン酸 0.4 µg/mL、ムッシモール 0.2 µg/mL であった。

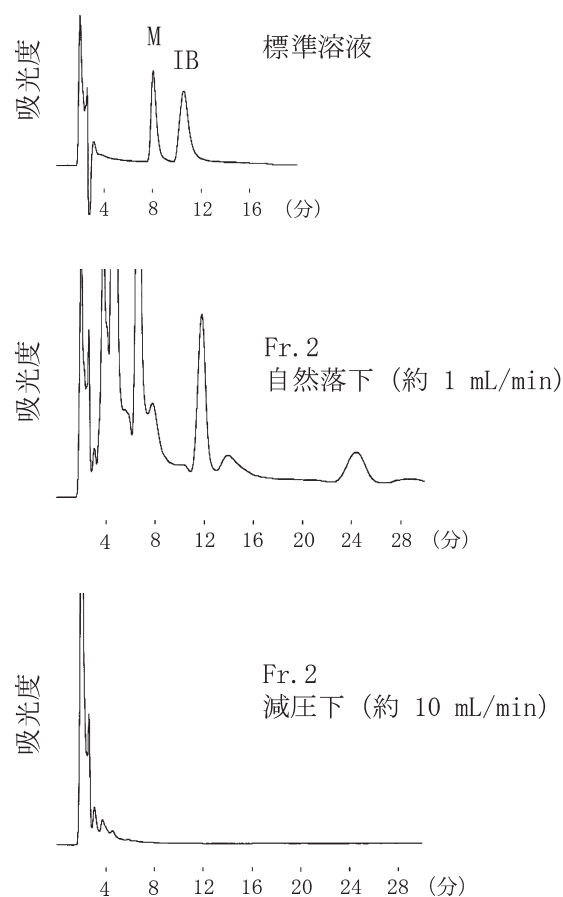


図3 DSC-SCX カラム溶出時のバックグラウンド
カラムに1.5%TFA/アセトニトリル (1 : 9) 4 mL を負荷
IB : イボテン酸, M : ムッシモール

2. 添加回収試験

イボテン酸及びムッシモールの回収率はそれぞれ91% (CV 11.4) 及び95% (CV 9.6) と良好な結果が得られた。

3. イボテン酸及びムッシモールの熱安定性試験

イボテン酸は水溶液中で加熱することにより脱炭酸してムッシモールを生成することが報告⁹⁾されている。そこでテングタケを加熱調理することを想定し、イボテン酸及びムッシモール標準品の熱安定性について調べた。

1) 200°Cで5分間加熱

イボテン酸標準品の場合、ほとんど残存せず (1%以下)、イボテン酸 4 ± 4% に相当するムッシモールが検出された。ムッシモール標準品の場合、7 ± 4% が残存した。以上の結果から、両毒成分とも200°C、5分間では不安定であり、標準品の残存量は1割以下となることが明らかとなった (図5)。

2) 沸騰水中で5分間加熱

イボテン酸標準品の場合、85 ± 1% が残存し、イボテン酸 5 ± 1% に相当するムッシモールが検出された。ムッシモール標準品の場合、91 ± 2% が残存した。込山らは加熱によるイボテン酸の脱炭酸について、沸騰水浴上の加熱1時間では60%、3時間では95%がムッシモールに変わる

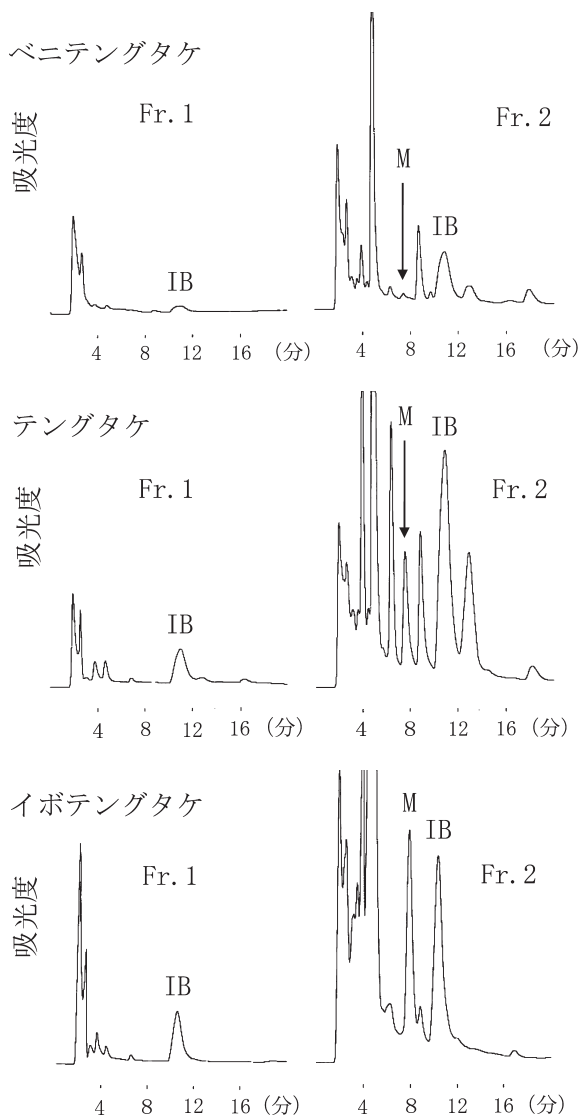


図4 試験溶液の高速液体クロマトグラム

IB：イボテン酸，M：ムッシモール

ことを報告²⁾している。今回の加熱時間は5分間であったが、加熱時間を延長した場合、イボテン酸及びムッシモールの残存率はさらに低下することが考えられた。

4. 毒キノコ中の毒成分量

テングタケ（子実体 25.5~60.2 g）、イボテングタケ（子実体 13.0~35.6 g）及びベニテングタケ（子実体

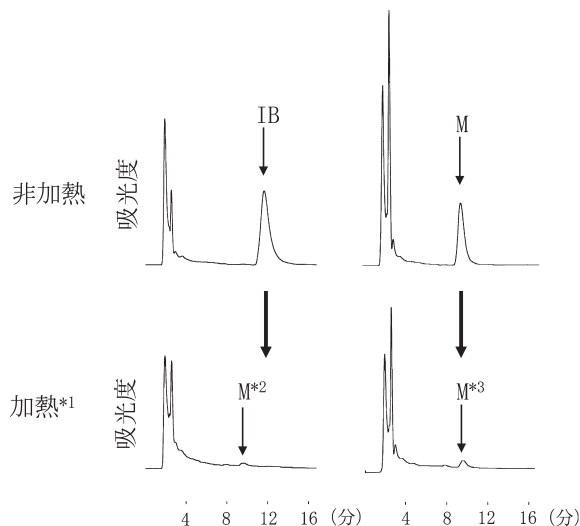


図5 加熱処理したイボテン酸(IB)及びムッシモール(M)標準品の高速液体クロマトグラム

*1ホットプレート（約200°C）上で5分間加熱，IB 10 µg/mL，M 10 µg/mL

*2イボテン酸 4 ± 4 % に相当，*3残存率 7 ± 4 %

71.7~196.6 g) 中のイボテン酸及びムッシモール含量を定量した。その結果、含量はそれぞれ 780 ± 170 µg/g 及び 230 ± 69 µg/g、950 ± 510 µg/g 及び 280 ± 160 µg/g、150 ± 49 µg/g 及び 12 ± 5.6 µg/g (n=3) であり、ベニテングタケが最も低い値を示した。

イボテン酸は経口摂取した場合、脱炭酸されムッシモールとなって吸収される¹⁰⁾。ムッシモールの致死量は 12 mg と言われている¹¹⁾。イボテン酸より変換するムッシモール量を考慮すると、ムッシモールの致死量に相当するキノコ量はテングタケで 15 g、イボテングタケで 12 g、ベニテングタケで 100 g に相当した（表 2）。

5. テングタケ調理品中のイボテン酸及びムッシモール残留量

1) 油炒めにした場合

テングタケを油炒めにした場合のイボテン酸及びムッシモールの未調理品に対する割合（残存率）を表 3 に示した。イボテン酸及びムッシモールの残存率は平均 56% 及び 80% であった。前述のイボテン酸及びムッシモールの熱安定性試験の結果では、200°C、5分間加熱した場合の両毒

表2 ムッシモールの致死量に相当するキノコ量

毒キノコ	イボテン酸含量 (µg/g)	ムッシモール含量 (µg/g)			ムッシモールの致死量*に相当するキノコ量 (g)
		イボテン酸より変換する量	元の量	合計	
テングタケ	780	563	230	793	15
イボテングタケ	950	686	280	966	12
ベニテングタケ	150	108	12	120	100

*12 mg

表3 テングタケを油炒めにした場合のイボテン酸及びムッシモール残存率

番 号	採取量 (g)		未調理品に対する割合 (%)*	
	未調理品	調理品	イボテン酸	ムッシモール
1	12.4	10.9	45	62
2	10.1	15.1	55	80
3	17.4	13.6	66	97
平均	13.3	13.2	56	80
SD	3.7	2.1	10	18

*ホットプレート (約 200°C) 上でラード 1g と共に 5 分間加熱
未調理品の採取量に換算した値

表 4-1 テングタケを茹でた場合のイボテン酸残存率

番 号	採取量 (g)		未調理品に対する割合 (%)*			調理試料中の含量 (%)	
	未調理品	調理品	茹でた 子実体	茹で汁	合計	茹でた 子実体	茹で汁
1	6.1	6.2	19	92	111	17	83
2	13.9	13.1	49	151	200	25	75
3	21.4	23.2	81	173	254	32	68
平均	13.8	14.2	50	139	189	24	76
SD	7.6	8.6	31	42	72	7	7

*未調理品の採取量に換算した値

表 4-2 テングタケを茹でた場合のムッシモール残存率

番 号	採取量 (g)		未調理品に対する割合 (%)*			調理試料中の含量 (%)	
	未調理品	調理品	茹でた 子実体	茹で汁	合計	茹でた 子実体	茹で汁
1	6.1	6.2	15	63	77	19	81
2	13.9	13.1	30	30	60	50	50
3	21.4	23.2	17	104	121	14	86
平均	13.8	14.2	20	66	86	28	72
SD	7.6	8.6	8	37	32	19	19

*未調理品の採取量に換算した値

成分の残存率は 1 割以下であったが、油炒めした場合には 5 割以上が残存した。さらに、採取した子実体が大きくなるに従い、両毒成分の残存率は高値を示した。原因としては、子実体は水分を含有することから、子実体が大きいほど内部に熱が伝わりにくいためと考えられた。

2) 茹でた場合

テングタケを茹でた場合のイボテン酸及びムッシモールの未調理品に対する割合 (残存率) を表 4 に示した。茹でた子実体及び茹で汁における未調理品に対する割合はイボテン酸において平均 50% 及び 139%、ムッシモールにおいて平均 20% 及び 66% であった。前述のイボテン酸及びムッシモールの熱安定性試験の結果では、100°C、5 分間加熱した場合、両毒成分の残存率低下が認められたが、テングタケを茹でた場合、子実体及び茹で汁から検出されたイボテン酸の合計値は 100% を上回り、子実体が大きくなるに従い増加した。ムッシモールの合計値についても子実体が大きい場合、100% を上回った。細胞内にはイボテン酸の前駆体が存在する可能性がある。

調理試料におけるイボテン酸含量の割合は、平均子実体

24%、茹で汁 76%、ムッシモール含量の割合は、平均子実体 28%、茹で汁 72% であった。両毒成分は熱水に安定であり (回収率: イボテン酸 98%、ムッシモール 100%)、共に約 7 割が茹で汁に残存することから、煮汁のみを摂取した場合でも中毒を起こす危険性があると考えられた。

ベニテングタケ及びテングタケは乾燥や塩蔵などの処理を施し食されることもある¹²⁻¹⁵⁾ が、毒成分の含量は個体差があること、5 分間油炒めや茹でた場合でも毒成分は残存すること (油炒め: イボテン酸 56%; ムッシモール 80%、茹で汁: イボテン酸 50%; ムッシモール 20%)、道内においてテングタケ類による食中毒事例が多いことから、上記キノコを食することは推奨できない。

道内では毒キノコによる食中毒が有毒植物による事例数を上回っており、道及び札幌市ではホームページによる毒キノコに関する注意喚起や「野や山のきのこハンドブック」の配付など啓発活動を行っているが、毒キノコによる中毒事例は後を絶たない。しかし、当所及び道内各保健所における毒キノコの毒成分検査体制は未整備であり、検査

体制の強化が強く求められていた。今回、道内において誤食事例の多いテングタケ類の化学的鑑定法を確立することができた。今後これらの毒キノコ誤食による食中毒が発生した場合、毒成分の速やかな同定が可能となり、食中毒の原因究明や医療機関において患者に対する適切な治療に役立つと考えられる。

本研究は平成24～25年度に実施された一般試験研究「北海道産毒キノコの毒成分分析法に関する研究」の一環として行われたことを付記し、関係各位に深謝いたします。さらに、試料採取に御協力を頂いた札幌市保健所及び札幌キノコの会の関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 長沢栄史監修：日本の毒きのこ，学習研究社，東京，2003，pp.27, 29, 73
- 2) 込山茂久，山浦由郎，中澤裕之，藤田昌彦，梶澤洋三：高速液体クロマトグラフィーによるベニテングタケ中のイボテン酸及びムッシモールの定量．分析化学，34(4)，161-165 (1985)
- 3) Tsujikawa K, Kuwayama K, Miyaguchi H, Kanamori T, Iwata Y, Inoue H, Yoshida T, Kishi T : Determination of muscimol and ibotenic acid in *Amanita* mushrooms by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B, 852, 430-435 (2007)
- 4) Tsujikawa K, Mohri H, Kuwayama K, Miyaguchi H, Iwata Y, Gohda A, Fukushima S, Inoue H, Kishi T : Analysis of hallucinogenic constituents in *Amanita* mushrooms circulated in Japan. Forensic Science International, 164, 172-178 (2006)
- 5) Tsunoda K, Inoue N, Aoyagi Y, Sugahara T : Simultaneous Analysis of Ibotenic Acid and Muscimol in Toxic Mushroom, *Amanita muscaria*, and Analytical Survey on Edible Mushrooms. J. Food Hyg. Soc. Japan, 34(1), 12-17 (1993)
- 6) 多田裕之，南谷臣昭，神山恵理奈，河村 博：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)
- 7) 佐藤正幸，姉帯正樹：有毒植物スズラン調理品中のコンバラトキシン残留量．道衛研所報，62，55-59 (2012)
- 8) シグマアルドリッチジャパン：SupelTM-Select SCX SPE Supel-Select SAX SPE, http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/SAJ/Brochure/1/j_supelselect_scx_sax.pdf (確認：2014年8月8日)
- 9) 竹本常松，中島 正，横部哲朗：イボテン酸の構造．薬学雑誌，84(12)，1232-1233 (1964)
- 10) 鶴飼 卓監修：改訂 急性中毒処置の手引—必須220種の化学製品と自然毒情報—，薬業時報社，東京，1994，pp. 392-394
- 11) 厚生労働省 HP：自然毒のリスクプロファイル：テングタケ *Amanita pantherina* (テングタケ科テングタケ属) http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/kinoko_det_07.html (確認：2014年8月12日)
- 12) 清水大典，伊沢正名：きのこ 見分け方 食べ方，家の光協会，東京，1988，p.24
- 13) 山下 衛，古川久彦：きのこ中毒，共立出版，東京，1993，p.29
- 14) 安藤 裕監修：菅平高原誌，真田町教育委員会，真田，1990，p.56
- 15) 本郷次雄監修：信州のキノコ，信濃毎日新聞社，長野，1994，p.15