



Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Walid, Husein Ali Ahmed メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1952

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 5 7 6 号	学位授与年月日	平成 22 年 3 月 15 日
氏 名	Walid Husein Ali Ahmed		
論文題目	Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析法による毒キノコ中の α -アマニチン、 β -アマニチンならびにファロイジンの同時分析に関する研究)		

博士(医学) Walid Husein Ali Ahmed

論文題目

Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry

(液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析法による毒きのこ中の α -アマニチン、 β -アマニチンならびにファロイジンの同時分析に関する研究)

論文の内容の要旨

[はじめに]

毒きのこ類には色々の種類があり、含まれる毒素の種類も様々である。最も毒性の強いものの一つとして *Amanita* 属のきのこ類で、その代表的なものとしてドクツルダケ (*Amanita virosa*) がある。このきのこ 1 本で、成人数人を中毒死させることができるといわれる。これらのきのこを食用きのこ間違え、食することによる中毒事例は毎年後を絶たない。自分で採取しさらに摂取して死亡するならば中毒事故死となるが、採取し、家族や他人に提供し、それを食して死亡した場合には過失致死罪が適用され、法的に問題となり、摂取後に残されたきのこ類や、死亡者の胃内容物・血液・尿・臓器からのきのこ毒の検出が必要となる。今回の研究では最も毒性の強いきのこ毒 α -アマニチン、 β -アマニチンならびにファロイジンについて、最新の分析機器である高速液体クロマトグラフィー (LC) —飛行時間型質量分析法 (TOFMS) を用いて、抽出から機器分析に至るまでの詳細な分析法を確立し、その方法の信頼性について検証を行った。現在までに *Amanita* 毒素を TOFMS を用いて分析した報告はない。

[材料と方法]

α -アマニチン、 β -アマニチンはシグマ社製のものを入手し、ファロイジンと IS であるミクロシスチン RR は和光社製のものを入手した。ドクツルダケ (*Amanita virosa*) は滋賀県もしくは京都府山中にて採取し、 -80°C にて保存したものを用いた。きのこ毒素を含まないきのこ材料として市販の生しいたけ (*Lentinula edodes*) を用いた。

細かく切碎した 100 mg のきのこに 100 ng の内部標準 (IS) を加え、さらに 5 ml の酸性メタノール (0.1%トリフルオロ酢酸含有) を加え、ポリトンホモジナイザーでホモジナイズした。この際、必要に応じて信頼性検証用実験では必要な量のアマニチン類とファロイジンも加えた。よく攪拌した後、遠沈除タンパク後、上清を遠沈凍結乾燥器にて溶媒類を蒸発除去した。残渣を 200 μl の純水に溶かし次の固相抽出に用いた。固相抽出には Oasis HLB 3 cc (60 mg) カートリッジ (Waters 社製) を用い、カートリッジに上述のサンプル溶液 200 μl を流し込んだ。その後 1 ml の 5%メタノールを含むクロロホルム液にてカートリッジを洗浄し、目的毒素と IS は 100%メタノールで溶出した。溶出液は凍結乾燥器で溶媒を蒸発除去して得られた残渣に 30 μl の LC 移動相 (アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム, 50: 50, v/v) に溶解し、その 5 μl を LC-TOFMS 分析に供した。

LC -エレクトロスプレーイオン化 (ESI) -TOFMS 分析は 1200LC -SL システム (アジレント社製) を QSTAR XL TOFMS 機器 (アプライドバイオシステム社製) に連結させたものを用いた。LC には、TSK - gel Amide-803 μm 順相カラム (150 \times 2.0 mm、東ソー社製) を用いた。移動相の流速は 1 ml/min で勾配溶離法により分離を行った。

[結果]

最初に α -アマニチン、 β -アマニチンならびにファロイジンの TOFMS スペクトルの報告がないため、各毒素のスペクトルを直接流入法で測定した。single stage TOFMS 測定では、 α -アマニチンで m/z 919、 β -アマニチンで m/z 920、ファロイジンで m/z 789 にそれぞれ $[M+H]^+$ の基準ピークを認めた。さらに強度は低い、いずれの毒素においても $[M+H-H_2O]^+$ のピークも同時に観察された。高分解能測定を行うと、 $[M+H]^+$ ピークには必ず同位体ピークがはっきりと分離して現れ、それらの各ピークの精密質量数は、例えば α -アマニチンにおいては m/z 919. 3603、920. 3667 ならびに 921. 3610 と測定され、 α -アマニチンの分子組成 $C_{39}H_{54}N_{10}O_{14}S_1+H$ の理論値から算出される同位体各ピークの質量数とごく近似していることが判明した。 β -アマニチン、ファロイジンに関しても同様な結果が得られた。すなわち TOFMS 高分解能測定ではプロトン付加分子イオンとその同位体スペクトルのみで *Amanita* 毒素の同定が可能となることも利点であることが分かった。さらに四重極—TOFMS のタンデム MS による各毒素のタンデム MS スペクトルを測定したところ、 α -アマニチン、 β -アマニチン、共に m/z 259 に強いフラグメントイオンが出現し、ファロイジンでは m/z 330 に強いプロダクトイオンピークを認めた。

上記 3 種の *Amanita* 毒素と IS であるミクロシスチン RR はいずれも特殊な環状ペプチドであり、抽出操作や LC カラムの最適化に時間を要したが、前記の抽出法の分析法を確立した。しいたけに IS と各濃度の *Amanita* 毒素を添加したものを用いて検量線を作成したところ 100-1000 ng/g で良好な直線性が得られた。また回収率も 53.1 - 69.6% で満足できるものであった。再現性についても良好な結果を得た。本法を用いて実際の *Amanita virosa* 毒きのこから各毒素を検出・定量できた。

[考察]

本研究では、きのこ毒の中で最も毒性の強い α -アマニチン、 β -アマニチン、ファロイジンについて LC-TOFMS 分析法の詳細を確立した。きのこ毒中毒事件では、まずきのこ自体からの毒素の検出から始まり、解剖例では胃内容に残存するきのこ片からの毒素検出も重要となる。本法はきのこ自体の分析のみならず、ヒトの尿、血液、臓器中の *Amanita* 毒素検出にも使用可能と考えられる。TOFMS の最大の特徴は高分解能で分析できることである。本法では single stage TOFMS のプロトン付加分子イオンの同位体プロファイルで毒素の同定が可能であることが分かった。

TOFMS 分析は、未知の代謝物の構造推定や、多チャンネル分析による薬毒物スクリーニングなど法医学・法中毒学での応用が可能だと考えられる。

論文審査の結果の要旨

毒キノコを摂食することによる中毒事故は毎年後を絶たない。採取した毒キノコをそれとは知らずに家族や知人に提供することによって死亡事故につながる場合には過失致死罪が適用されることになる。そのため、摂食後に残された毒キノコの分析法、あるいは死亡者の血液、尿、臓器からのキノコ毒の検出法の開発は極めて重要である。

申請者は、最も毒性の強いキノコ毒である α -アマニチン、 β -アマニチン、およびファロイジンを分析するために、ドクツルダケ (*Amanita virosa*) からこれらの *Amanita* 毒素を固相抽出する条件を確立し、液体クロマトグラフィー (LC) —飛行時間型質量分析法 (TOFMS) による分析法について

検討した。

これまで *Amanita* 毒素の TOFMS スペクトルの報告例がないために、申請者はまず直接流入法によってこれらの毒素のスペクトルを測定した。得られたスペクトルはいずれの毒素においても $[M+H]^+$ の基準ピークに加えて $[M+H-H_2O]^+$ ピークを示し、質量スペクトルから容易にこれらの毒素を識別できた。また、各毒素について計算から得られる $[M+H]^+$ とその同位体ピークを実測した質量スペクトルと比較したところ、よく一致しており、TOFMS 高分解能測定のみで *Amanita* 毒素の同定が可能であることがわかった。さらに、四重極-TOFMS で測定されたタンデム質量スペクトルはそれぞれの毒素に特徴的な強いフラグメントイオンを示した。

Amanita 毒素の定量を行うために、内部標準としてマイクロシスチン RR を添加し、固相抽出や LC 分離条件の最適化に関する検討を行い、その分析条件を確立した。開発された分析法の検量線の直線範囲は 100-1000 ng/g, 回収率は 53-70% で満足できるものがあった。本法を用いて実際のドクツルダケから各毒素の定量分析が可能であった。

申請者が開発した分析法は毒キノコ自体の分析のみならず、ヒトの尿、血液、臓器の *Amanita* 毒素の検出・定量に適用できると考えられる。

以上により、本論文は博士(医学)の学位にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	藤本 忠蔵		
	副査	梅村 和夫	副査	瀬藤 光利