

〈技術〉

高速液体クロマトグラフィーによる毒キノコ成分 α -アマニチンの検出と定量に関する検討

岡田 光貴¹⁾、福田 篤久²⁾、竹下 仁¹⁾

Detection and Quantification of the Mushroom Toxin α -Amanitin using High Performance Liquid Chromatography

Kohki Okada¹⁾, Atsuhisa Fukuda²⁾, Hitoshi Takeshita¹⁾

Summary *Amanita virosa* (*A. virosa*) produces a lethal toxin α -amanitin (AMA). Laboratory medicine for patients with AMA poisoning has not yet been developed. In this study, we established a high-performance liquid chromatography (HPLC) method to detect and quantify AMA in biological samples, and evaluated the usefulness of this assay for laboratory medicine. In addition, we evaluated the efficiency of this method in distinguishing *A. virosa* from other mushrooms. The HPLC system, using a gel filtration chromatography column, could detect AMA in acetonitrile solution within a range of 200 to 2 μ g/mL. An accurate calibration curve was obtained using these concentrations. We then determined the levels of AMA in different mushroom extracts; AMA was only detected in the extracts of *A. virosa*. The AMA in urine was undetectable, possibly because components such as urea conceal the AMA chromatogram. On the contrary, AMA in deproteinized serum was detectable, and its concentration could be calculated to a certain extent. In conclusion, our HPLC analysis method may be useful for the detection and quantification of AMA in deproteinized serum samples for laboratory medicine. Moreover, this method can be applied for the examination of wild mushrooms and identification of *A. virosa*.

Key words: α -amanitin, *Amanita virosa*, high performance liquid chromatography

¹⁾ 京都橘大学 健康科学部 臨床検査学科
〒607-8175 京都府京都市山科区大宅山田町34

²⁾ 大阪医科薬科大学三島南病院 臨床検査科
〒569-0856 大阪府高槻市玉川新町8-1

連絡先：岡田 光貴
京都橘大学健康科学部臨床検査学科
Tel: +81-755-71-1111 (ex.4938)
E-mail: okada-ko@tachibana-u.ac.jp

¹⁾ Department of Medical Technology and Sciences,
Faculty of Health Sciences, Kyoto Tachibana
University, 34 Yamada-cho Oyake, Yamashina-ku,
Kyoto-shi, Kyoto, 607-8175, Japan

²⁾ Department of Medical Technology, Osaka Medical
and Pharmaceutical University Mishima-Minami
Hospital, 8-1 Tamagawashinmachi, Takatsuki-shi,
Osaka, 569-0856, Japan

受付日：2021年6月11日

採択日：2021年9月3日

I. 緒言

ドクツルタケなどの毒キノコが含有する成分 α -アマニチン (AMA) は致死性の自然毒として危険視されている。AMAが原因の食中毒は重度の肝・腎不全を引き起こすため^{1,2)}、患者には早期の対応が望まれる。一方で、生体試料中におけるAMAの検出と定量を目的とした臨床検査法は無いため、医療現場では患者や家族の聴取、および症状などを基に病期や重症度の判定が行われる。この様に診断基準が曖昧な状況は誤診や対応の遅れに繋がるため、対策が必要と思われる。即ち、生体試料中AMAの測定に有用な臨床検査法の樹立が望まれる。

AMAの検出には、古くからMeixner試験が有用とされていた。この手法は、リグニンを含む試験紙 (新聞紙や電話帳など) に液体試料を滴下し、さらに濃塩酸を反応させ青色呈色が生じるかどうかで、試料中AMAの有無の簡易判定を行うものである³⁾。一方、Meixner試験では、AMAに構造が類似する成分が試料中に混在する場合、偽陽性の原因となることが指摘されている⁴⁾。ヒトの生体内成分でもセロトニン等、Meixner試験で陽性と判定される物質があり^{3,4)}、本試験を臨床検査に応用することは困難と思われる。また、Meixner試験におけるAMAの検出可能濃度は $\geq 200 \mu\text{g/mL}$ とされており^{3,4)}、臨床検査法として評価した時、この感度は低いと言わざるを得ない。そこで、我々は以前、AMAの検出に有用な酵素結合免疫吸着法 (ELISA) を構築し、その性能を評価した。結果、ELISAによるAMAの定量限界は $2 \mu\text{g/mL}$ 程度とMeixner試験より遥かに高感度であったが、測定時間を要し、高コストであることが問題に挙げられた⁵⁾。

以上の背景から、既存のAMA検出法には弱点があると言わざるを得ない。そこで、我々は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に注目した。HPLCは試料中成分がカラムを通過する際の移動速度の差に基づき、目的成分を分離・検出する手法である⁶⁾。即ち、AMAの検出に理想的なHPLCの分析条件を設定できた場合、その手法は臨床検査、および野生キノコの鑑別や同定に応用が可能であると考えた。本研究では、ゲル濾過クロマトグラフィー (GFC) を原理と

するカラムを用いたHPLC分析により、キノコの成分抽出液や生体試料からのAMAの検出と定量を試みる。

II. 材料と方法

1. 材料

コスモ・バイオ株式会社 (東京) より、健康なヒトの血清および尿として、Human Serum pool (血清試料)、およびUrine, Single Male Donor, Human (尿試料) を供した。富士フィルム和光純薬株式会社 (東京) より、AMAおよび各種一般試薬を供した。また、毒キノコ (6種10サンプル) は、日本きのこセンター菌蕈研究所 (鳥取) により採取・同定されたものを供した。子実体は肉眼あるいは顕微鏡的特徴を調査、原色日本菌類図鑑⁷⁾に基づき種が同定された。内訳は、ドクツルタケ (*Amanita virosa*; *A.virosa*) が5サンプル (AV1~5)、フクロツルタケ (*A. volva*: OS1)、ヘビキノコモドキ (*A. spissacea*: OS2)、テングタケ (*A. pantherine*: OS3)、コタマゴテングタケ (*A. citrina*: OS4)、およびオオツルタケ (*A. cheelii*: OS5) が各々1サンプルである。なお、これら毒キノコは、我々が以前に報告した論文内で使用した子実体と同じものであり、AV1~5はAMAを含有し、OS1~5はAMAを有しないことをELISAおよびMeixner試験で確認している⁵⁾。

2. 方法

1) 検体の調製

中毒患者の生体試料を入手することは困難であるため、市販のAMAをHPLCの移動相用の溶液 (超純水:アセトニトリル=35:65、以降solution Aと記載)、尿試料、あるいは血清試料に溶解したものを検体とした。特に血清はタンパク質の含有量が多く、そのまま検体として使用すると、目的成分の検出の妨害やカラムの詰まりに繋がる。そこで、有機溶媒であるアセトニトリルを含むsolution Aを血清に等量加えることで除タンパク処理を施し、遠心分離 (1,191 G、10分) 後の上清を検体に用いた。また、各種キノコは、先行研究で最も毒成分の含有が多く認められた傘 (Pileus) の部位を検体に用いた⁵⁾。キノコの傘を約1 g計量後、それを細切れ

にし、15 mLチューブに入れ-80℃で凍結、それらを解凍後によく絞って遠心分離（1,191 G、10分）後に得られた上清を抽出液検体とした。検体の種類と調製法を簡略的に図示したものがFig. 1である。

2) HPLC分析

株式会社島津製作所（京都）の汎用HPLC装置 Prominenceに、株式会社昭和電工（東京）のGFC用カラムPROTEIN KW-803とガードカラムPROTEIN KW-G 6Bを接続し、HPLCによる分析を実施した。本研究のHPLC分析では、カラムオープンで20℃、流速を1.0 mL/minに固定し、移動相としてsolution Aを展開した。分析に用いる検体の液量は全て100 μLとした。検体の注入後は、30分間の保持時間（Retention Time;RT）における波長280 nmで検出した波形を記録した。測定後は、装置に付随するソフトウェアLabSolutionsを用いて、検出した波形の解析を行なった。

その後、解析ソフトウェアを用いて各波形の下側面積を算出した。AMAの検出を示す波形とその下側面積は比例傾向にあるため、そこからAMAの検量線作成と検体中AMA濃度の定量を試みた。

3) 統計解析

全ての実験で5回測定を実施し、数値データはその平均値（Ave）をプロットした。グラフ内のエラーバーは各測定の標準偏差（SD）、即ち $\pm 1 \times SD$ を示す。また、精密度の評価に際しては、同一AMA濃度の検体を改めて10回測定し、変動係数（CV, %）を算出した。さらに、AMAの添加回収試験を実施し、回収率（Recovery, %）を算出することで、正確さを評価した。検出限界（LoD）および定量限界（LoQ, 本研究ではCVが10%以内に収まる限界濃度とした）の濃度は、日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会の報告⁸⁾に掲載された計算式から算出した。各パラメータの相関性は統計ソフトEasy R⁹⁾を用いて、ピアソンの積率相関係数（R）を算出することで検証した。

Ⅲ. 結果

1. HPLC分析によるAMAの検出

本HPLC分析系を用いてAMAの波形を検出し、そこからAMAの定量性能を評価した。まず、solution Aで希釈したAMAの14段階希釈系列（200 - 0.1 μg/mL）をHPLC分析した。200 μg/

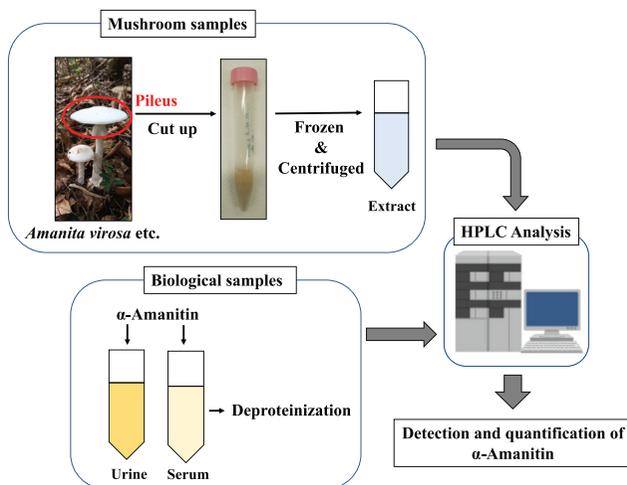


Fig. 1 Preparation of each sample. For the mushroom samples, pilei were cut up and frozen at -80℃ in 15 mL tubes. After defrosting, they were centrifuged at 3,500 rpm for 10 min, and the extracts were used as samples. For the biological samples, AMA powder preparations were dissolved in urine and serum derived from healthy volunteers. The samples were then analyzed using HPLC to detect and quantify the levels of AMA.

mLのAMAをHPLC分析したところ、RTが14分付近の箇所でAMAの波形が検出された (Fig. 2A)。それ以下の濃度のAMAも同様に分析したところ、0.5 $\mu\text{g/mL}$ まではAMAの波形が検出されたが (Fig. 2B-H、140 - 60 $\mu\text{g/mL}$ の結果は割愛)、0.1 $\mu\text{g/mL}$ では検出不可であった (Fig. 2I)。

2. AMAの検量線作成

Fig. 1の結果に基づき、AMAの検量線作成を試みた。解析ソフトウェアを用いてAMAの波形の下側面積 (Fig. 3A、赤色部分) を積分により算出し (Fig. 3A、青枠)、AMA濃度と波形面積の相関性から検量線の式を求めた (Fig. 3B)。本式の相関係数Rは0.998と非常に良好であった。さらに、本検量線に基づき、HPLC分

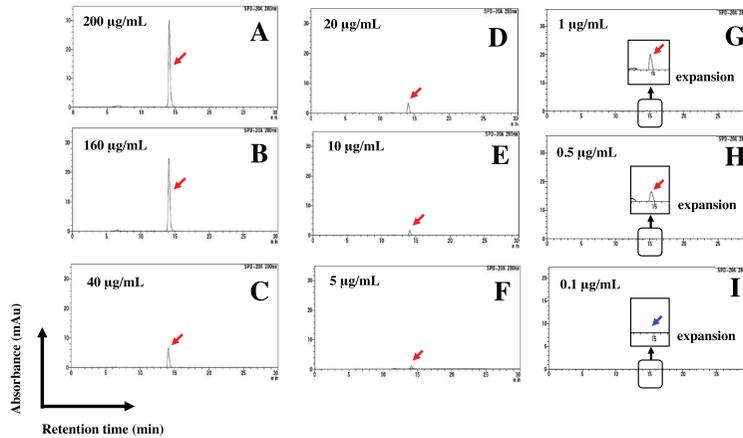


Fig. 2 Detection of AMA in solution A using HPLC. In panels (A–I), concentration of AMA in solution A is as follows ; A - 200 $\mu\text{g/mL}$, B - 160 $\mu\text{g/mL}$, C - 40 $\mu\text{g/mL}$, D - 20 $\mu\text{g/mL}$, E - 10 $\mu\text{g/mL}$, F - 5 $\mu\text{g/mL}$, G - 1 $\mu\text{g/mL}$, H - 0.5 $\mu\text{g/mL}$, and I - 0.1 $\mu\text{g/mL}$. Red arrows indicate that the peak of AMA in the chromatogram is detectable, while the blue arrow indicates that the peak is undetectable. The x-axis shows retention time, and the y-axis shows absorbance at 280 nm. Each experiment was performed in quintuplicate.

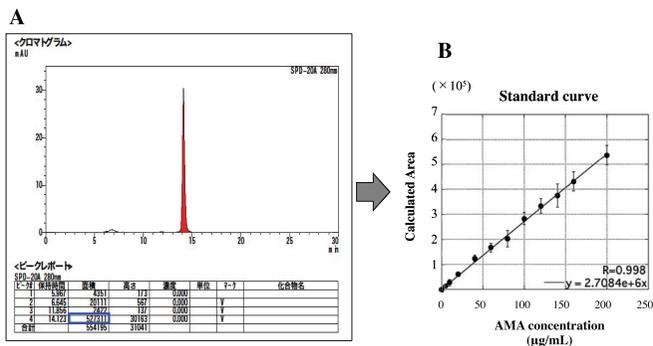


Fig. 3 Standard curve constructed based on the correlation between AMA concentration and chromatogram area. (A) Calculation of the chromatogram area of AMA. Red color depicts the chromatogram area, while the blue frame shows the calculation results. (B) Standard curve of AMA in solution A. The x-axis shows the concentration of AMA, and the y-axis shows the calculated area of AMA. Values for calculated area were plotted as mean \pm one standard deviation of the values obtained from quintuplicate experiments.

析によるAMA濃度（100、10、1 $\mu\text{g/mL}$ ）測定
の定量性能を評価した。AMA濃度1 $\mu\text{g/mL}$ 測定
のCVは10.7%であったが、100 $\mu\text{g/mL}$ および10
 $\mu\text{g/mL}$ 測定では10%以内であった（Table. 1）。
また、これらAMA濃度測定のリカバリは98.7～
109.5%、LoQは2.03 $\mu\text{g/mL}$ であった（Table. 1）。

3. ドクツルタケ以外のキノコ抽出液の分析

続いて、ドクツルタケ以外の毒キノコ（OS1-
5）の抽出液のHPLC分析を実施した。いずれ
の抽出液における分析結果においても、RTが
14分付近にAMAと思われる波形は検出されな
かった（Fig. 4）。

4. ドクツルタケの抽出液の分析

一方、ドクツルタケ（AV1-5）の抽出液の
HPLC分析を行なった結果、いずれもRTが14分
付近にAMAと思われる波形が検出された（Fig.
5A-E、赤矢印）。さらに、これら波形の面積を
算出し、検量線に当てはめることで、AV1-5の
傘におけるAMA濃度の推定が可能であった
（Fig. 5F）。なお、この値はキノコの傘を約1 g
切除した切片から得た抽出液中のAMA濃度で
ある。即ち、算出されたAMA濃度に傘の全重
量と全抽出液量を乗じることで、AV1-5の傘に
含まれるAMAの含有量の概算が可能であった
（Fig. 5G）。

Table 1 Measurement performance of AMA by HPLC analysis, based
on measuring solution A dilution series

Solvent	Solution A		
AMA concentration ($\mu\text{g/mL}$)	100	10	1
Ave ($\mu\text{g/mL}$)	104.1	9.87	1.10
SD	4.93	0.80	0.12
CV (%)	4.74	8.11	10.7
Recovery (%)	104.1	98.7	109.5
LoD ($\mu\text{g/mL}$)	0.47		
LoQ ($\mu\text{g/mL}$)	2.03		

(n=10 each)

Solution A; ultrapure water : acetonitrile = 35 : 65

Ave; Average, SD; Standard deviation, CV; Coefficient of variation

LoD: Limit of detection, LoQ: Limit of quantitation

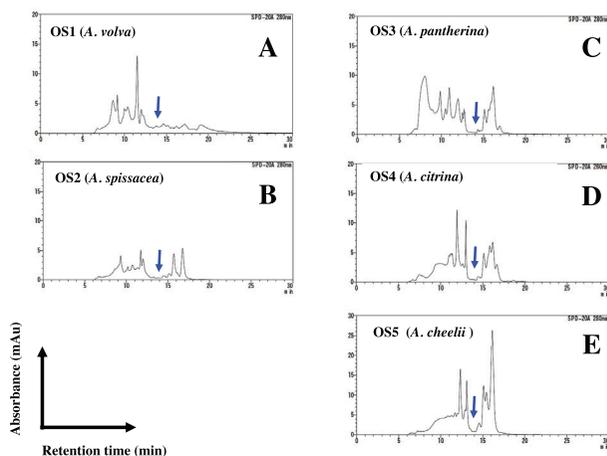


Fig. 4 HPLC analysis of the extracts of poisonous mushrooms. The mushroom extracts
used were as follows: A - *A. volva* (OS1), B - *A. spissacea* (OS2), C - *A. pantherina*
(OS3), D - *A. citrina* (OS4), E - *A. cheelii* (OS5). The x-axis shows retention time,
and the y-axis shows absorbance at 280 nm. Blue arrows indicate that the peak of
AMA is undetectable. Each experiment was performed in quintuplicate.

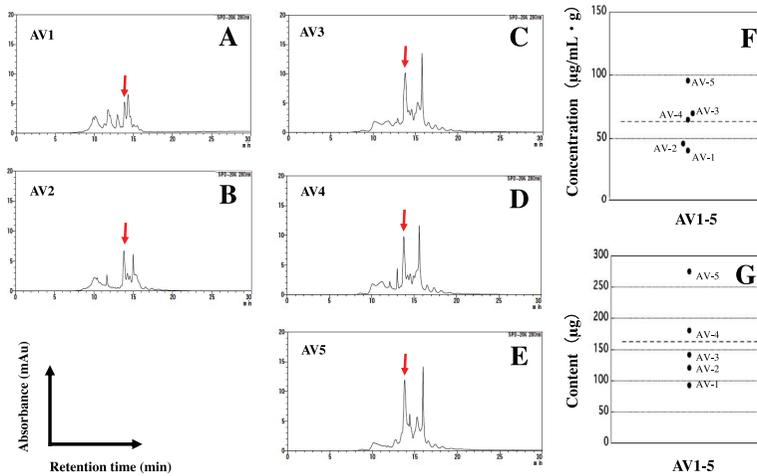


Fig. 5 HPLC analysis of *A. virosa* (AV) extracts. Panels (A–E) show the chromatograms of samples AV1–5. The x-axis shows retention time, and the y-axis shows absorbance at 280 nm. Red arrows indicate that the peak of AMA is detectable. Each experiment was performed in quintuplicate. (F) The calculated concentration of AMA in each extract. (G) The calculated content of AMA in each of the extracts. Dotted lines indicate the average value.

5. 尿試料中AMAの分析

続いて、尿試料を用いてAMAを5段階希釈 (200 - 100 µg/mL) し、HPLC分析を実施した。AMAを含有しない尿試料の分析結果 (Fig. 6F) と比較しても、AMAを含む尿試料ではRTが14

分付近に、明瞭なAMAの波形を検出することは出来なかった (Fig. 6A-E)。

6. 除タンパク血清試料中AMAの分析

さらに、血清試料を用いてAMAを7段階希釈

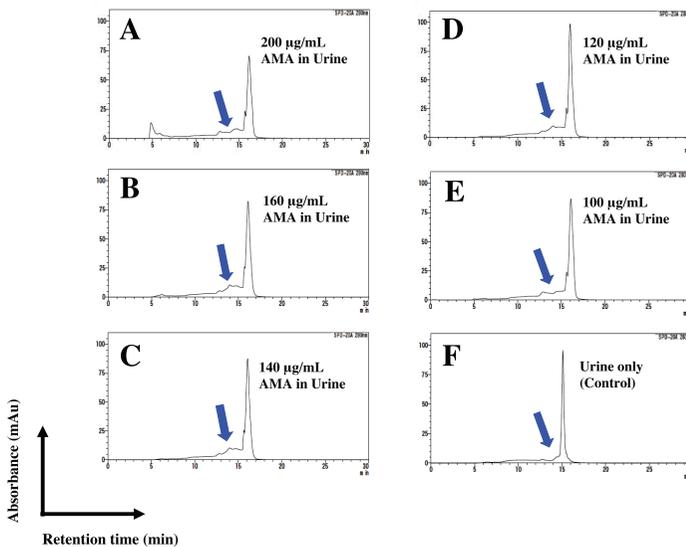


Fig. 6 HPLC analysis of urine samples. In panels (A–F), concentration of AMA in urine is as follows : A - 200 µg/mL, B - 160 µg/mL, C - 140 µg/mL, D - 120 µg/mL, E - 100 µg/mL, and F - 0 µg/mL. The x-axis shows retention time, and the y-axis shows absorbance at 280 nm. Blue arrows indicate that the peak of AMA is undetectable. Each experiment was performed in quintuplicate.

(200 - 10 $\mu\text{g/mL}$) し、それを除タンパク処理したものを検体としてHPLC分析を行なった。AMAの波形はやや横方向に広い形状を示したが、AMAを含有しない血清試料の分析結果 (Fig. 7H) と比較して、AMAを含む血清試料では、RTが14分付近に200 - 20 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲でAMAの検出を認めた (Fig. 7A-F)。また、血清試料では、10 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度のAMAは検出が不可能であった (Fig. 7G)。さらに、各波形の解析結果から血清中AMA濃度を算出し、実際の濃度との比較を試みた。なお、除タンパク処理にて血清と等量のsolution Aを加えているため、検体は概ね1/2に希釈されている。そこで、RTが14分付近の波形の下側面積を検量線に当てはめ、得られた濃度を最終的に2倍すること

で、AMA濃度を算出した。算出されたAMA濃度 (Calculated concentration) は、血清試料で調製したAMA濃度 (Actual concentration) の1/2~1/3程度の値となった (Fig. 7I)。この結果から、除タンパク後の血清試料中AMAはHPLC分析において、実際の濃度よりもやや低めに見積もられることが分かった。さらに、HPLC分析による血清中AMA濃度 (200, 100, 20 $\mu\text{g/mL}$) 測定のパフォーマンスを評価した。AMA濃度20 $\mu\text{g/mL}$ 測定のCVは10.1%であったが、200 $\mu\text{g/mL}$ および100 $\mu\text{g/mL}$ 測定では10%以内であった (Table. 2)。また、これら血清中AMA濃度測定のRecoveryは34.2~43.2%と低値であり、LoQは22.6 $\mu\text{g/mL}$ であった (Table. 2)。

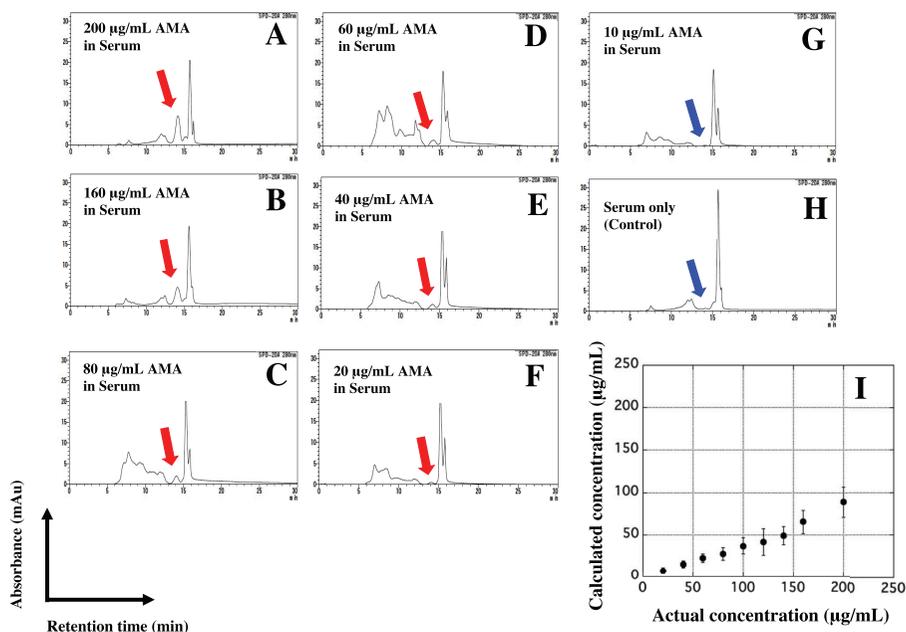


Fig. 7 HPLC analysis of deproteinized serum samples. In panels (A–H), concentration of AMA in deproteinization serum is as follows: A - 200 $\mu\text{g/mL}$, B - 160 $\mu\text{g/mL}$, C - 80 $\mu\text{g/mL}$, D - 60 $\mu\text{g/mL}$, E - 40 $\mu\text{g/mL}$, F - 20 $\mu\text{g/mL}$, G - 10 $\mu\text{g/mL}$, H - 0 $\mu\text{g/mL}$. The x-axis shows retention time, and the y-axis indicates absorbance at 280 nm. Red arrows indicate that the peak of AMA is detectable, while the blue arrows indicate that the peak is undetectable. Each experiment was performed in quintuplicate. (I) Correlation between the actual (x-axis) and calculated (y-axis) AMA concentrations. Values for calculated area were plotted as mean \pm one standard deviation of the values obtained from quintuplicate experiments.

Table 2 Measurement performance of AMA by HPLC analysis, based on measuring serum dilution series

Solvent	Serum		
AMA concentration ($\mu\text{g/mL}$)	200	100	20
Ave ($\mu\text{g/mL}$)	87.1	37.6	6.99
SD	6.67	3.13	0.71
CV (%)	7.66	8.34	10.1
Recovery (%)	43.2	36.8	34.2
LoD ($\mu\text{g/mL}$)	17.4		
LoQ ($\mu\text{g/mL}$)	22.6		

(n=10 each)

Ave; Average, SD; Standard deviation, CV; Coefficient of variation
LoD: Limit of detection, LoQ: Limit of quantitation

IV. 考察

本研究のHPLC分析に用いたカラムはGFCを原理としており、これは検体の分子量 (MW) の違いによりその成分を分離するものである。AMAのMWは919程度であり、MWがこの値を示す化合物は本法において、RTが14分付近に波形が検出されることが分かった。そのため、検体中にAMAと同程度のMWの化合物が多く含まれるほど、AMA単体の検出は困難となる。また、本法で14分付近に波形が見られたからといって、その成分がAMAであるとは限らないことには注意すべきである。臨床検査法や、野生キノコの鑑別および同定法として応用する際には、Meixner試験やELISAにより、検体中のAMAの存在を確定させた後で、HPLCによりAMA濃度を推定する、というような既存法との併用が望ましいと考える。なお、AMAの検出に関しては、古くから逆相クロマトグラフィー (RPC) を原理としたカラムを用いたHPLC分析の報告が目立つ^{10,11)}。RPCは試料中の成分をその極性 (親水性) に応じて分離する手法であり、試料中にAMAと同等の極性を有する物質が存在しない場合に有用な測定系といえる。なお、RPCを用いてAMAを特異的に分離するためには、グラジエント溶離を実施することが望ましいと考えられている^{11,12)}。グラジエント溶離では移動相溶液の組成を連続的に変化させながら分析を行う必要があるため、溶液の調製と測定条件の設定が複雑である。一方、我々が構築したGFCを原理とするHPLC分析は目新しい手法であり、solution Aのみを展開する単純な操作にも関わらず比較的良好な分離能を発揮

する点が有用と思われた。検体の前処理も単純かつ迅速であり、複雑な測定条件の設定は存在しないため、本研究において前処理法を含む新たなAMAのHPLC測定法を提示したといえる。

本研究の結果から、HPLC分析によるAMAのLoDは $0.47 \mu\text{g/mL}$ 、LoQは $2.03 \mu\text{g/mL}$ と推定できる (Table. 1)。このLoQは、Meixner試験の検出可能濃度 $\geq 200 \mu\text{g/mL}$ ^{3,4)}の100倍であり、感度はこの度のHPLC分析が勝る結果となった。また、我々が以前の研究で構築したAMA測定用ELISAのLoQが約 $2 \mu\text{g/mL}$ であるため⁵⁾、HPLC分析はこれと同等の結果となった。また、HPLC分析によるAMA検出は世界的にもいくつか報告がある。中にはAMAのLoQが 10 ng/mL という結果もあることから¹³⁾、我々の手法においても分析条件を精査し、改善を図ればさらに感度が向上する可能性も考えられた。なお、本研究のHPLC分析におけるCVは10%をやや超える場合があるが、Recoveryは $100 \pm 10\%$ の範囲に収まり (Table. 1)、いずれも許容範囲内と考えられた。

キノコの抽出液を検体とした時、本法を用いることでドクツルタケ内の成分からAMAを分離検出できることが分かった (Fig. 5)。これはドクツルタケ内にAMAと同等のMWの化合物が少ないためであると考えられる。また、ドクツルタケ以外の毒キノコにおいても、RTが14分付近にピークをもつ成分は乏しい結果となり (Fig. 4)、本法はキノコにおけるAMAの有無を調べる簡易検査として有用と思われた。なお、ドクツルタケ1本は通常 $5 \sim 15 \text{ mg}$ のAMAを含むことが報告されている¹⁴⁾。本法では、傘の部分のみAMAの含有量を算出したが、平均160

μg と想定より低く算出された。これは、キノコ成分の抽出が不十分であることや、抽出過程におけるAMAの損失が考えられたため、抽出方法を工夫することで改善されると予想する。具体的には、キノコを超音波破碎する方法や、市販のタンパク抽出液などを用いることで、抽出液中のAMA含有量は実際の値に近づくと考える。

臨床検査としての応用を想定した場合、AMAが原因の食中毒患者の尿や血清から、AMAを検出できることが重要である。しかし、AMAを尿試料で調製したものを検体とした場合は、本法によりAMAを検出することができなかった (Fig. 6)。そこで我々は、尿試料でAMA測定に影響を及ぼす因子を推定するため、代表的な尿中成分である尿素、尿酸、クレアチニンの本HPLC分析系での検出を試みた。結果、尿素の測定においてRTが14分の箇所に波形を認め、尿酸の測定においてRTが13-17分の箇所に波形を認めた (data not shown)。この結果から、本HPLC分析系では同等の波長に吸収をもつ尿酸成分が妨害物質となり、そこに尿素の影響も加わることが、尿中AMAの検出を困難にしている一因と考えられた。ただし、次に検証した試料である血清にも尿酸や尿素が含まれるにも関わらずAMAの検出が可能であったことから、これら要素だけが尿試料におけるAMAの検出困難の原因ではないと予想する。尿自体の色調や他の尿中成分、本HPLC測定条件などが複雑に関係していると思われ、より詳細な検証が必要であるため、今後の課題としたい。AMAを血清試料で調製したものは、除タンパク処理を施した場合にAMAの検出が可能であった (Fig. 7)。この時、AMAと思われる波形がやや横方向に広い形状になる理由は不明である。可能性としては、AMA以外の血清中成分でMWが近似するものが影響し、このような波形になるのではないかと推測する。なお、除タンパク処理を施しているにも関わらず、いくつかの血清試料のHPLC分析結果では、比較的高いMWの化合物の存在を示す波形が検出される傾向にあった。血清を対象とした時、この除タンパク法では、高濃度のタンパク質が完全に除去されないと推測される。即ち、この度実施した除タンパク法にも改善の余地があると思われ

た。しかし、我々はトリクロロ酢酸やアルコールを用いた除タンパク法も試みたが、その処理後の血清試料中からはAMAを検出できなかった (data not shown)。この結果から判断し、除タンパク法の選択を誤るとAMA自体が完全に試料中から取り除かれ、HPLCによる検出が不可となることが推察された。したがって、本研究における除タンパク処理の検証では、solution Aを血清に等量加える手法が簡易かつ迅速であり、それにより得られた結果が最も安定していた。なお、AMAを含む生体試料の前処理法は過去に報告があり、ジクロロメタンなどの溶液を用いた溶媒抽出法¹²⁾や、専用のカラム製品を用いた固相抽出法¹⁵⁾が有用と考えられている。特にPRiME HLB μ Elutionと呼ばれるカラムを用いて血清や血漿の前処理を行ない、その後分析した場合では、AMAのRecoveryが90%程度¹⁵⁾と非常に正確な測定が可能と報告されていた。一方で、いずれの前処理法においても、試料中AMAのロスはある程度は避けられないようであった。本研究における除タンパク処理でも、波形下面積から算出されるAMAの濃度は実際の濃度よりも低く見積もられており (Fig. 7I)、除タンパク処理の血清中AMAへの影響があると思われた。一方で、SDやCVは比較的良好であり (Table. 2)、高い精度での測定が可能と考える。以上より、本法による分析結果のみでは血清中AMA濃度を確定させるのは困難であると思われた。一方で、算出結果の2~3倍の値を実際のAMA濃度として換算することや、他の手法と併用する等により、臨床検査法として一定の有用性はあると考える。過去の文献では、ドクツルタケの摂食が原因の食中毒により死亡した患者の血清中AMA濃度は $0.20 \mu\text{g/mL}$ 程度と報告されていた¹⁶⁾。本研究における血清中AMA測定のLoQは $22.6 \mu\text{g/mL}$ であるため (Table. 2)、実際の患者血清中AMA濃度はこれよりも遥かに低いことが分かる。そのため、AMA中毒患者の血清試料に本HPLCを適応する際には現状、検体の濃縮が必要と思われた。しかし、この作業を含めると、更に測定結果を得るまでの時間が延びることになるため、今後は本HPLC分析のための最適な前処理法の確立が課題として挙げられる。

現状、HPLC装置を有する医療施設は少なく、

本研究で構築した手法を普及させることは困難に思われる。即ち、本法に関しては、測定可能な施設に限られることが弱点である。一方、測定条件を決定した後は検体をHPLC装置に注入するのみで精度に優れた分析が可能であることや、結果の解釈が容易であること、目的物質の濃度の推定が可能であることが本法の利点である。また、今回は30分間のRTにおける波形を計測したが、AMAの波形はRTが14分の箇所で見出できることを考慮すると、15~20分程度のRTにおける波形計測でも問題ないと考えられ、測定の速さも長所と思われる。以上より、AMAのHPLC分析は、血中濃度の測定によるAMA中毒の重症度判定や、治療効果の判定等の活用が考えられる。また、野生キノコの鑑別や同定には極めて有用と思われた。

V. 結語

GFCカラムを利用したHPLC分析により、キノコの成分抽出液や除タンパク処理を施した血清試料に含まれるAMAの検出が可能であることから、本法は臨床検査や、野生キノコの鑑別および同定法としての将来的な応用が期待できる。本法によるAMAの検出および定量の性能には課題が残るが、検体の前処理法や分析条件の再検討により、それらの改善は可能と思われた。

VI. 謝辞

野生キノコの子実体を提供頂きました日本きのこセンター菌茸研究所に厚く御礼申し上げます。本研究は、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」21KA3007の援助を受け実施しました。

本論文内容に関連する著者らの利益相反:なし

文献

- 1) 福内史子, 飛田美穂, 佐藤威, 猪口貞樹, 澤田裕介: 毒キノコ (ドクツルタケ) 中毒により急性腎不全をきたした1症例. 透析会誌. 28: 1455-1460, 1995.
- 2) 吉田省造, 岡田英志, 土井智章, 中島靖浩, 鈴木浩大, 田中卓, 福田哲也, 北川雄一郎, 安田立, 水野洋佑, 宮崎渚, 森下健太郎, 牛越博昭, 竹村元三, 白井邦博, 豊田泉, 小倉真治: ドクツルタケ中毒による昏睡型急性肝不全に対し急性血液浄化療法を併用し救命しえた1症例. 透析会誌. 48: 129-135, 2015.
- 3) 上條吉人: ドクツルタケ類 (コレラ様症状型毒キノコ). 臨床中毒学 第1版. p453-458, 医学書院, 東京, 2009.
- 4) Beuhler M, Lee DC, Gerkin R: The Meixner test in the detection of alpha-amanitin and false-positive reactions caused by psilocin and 5-substituted tryptamines. *Ann Emerg Med.* 44: 114-120, 2004.
- 5) 岡田光貴, 牛島修爾, 福田篤久, 竹下仁: 毒キノコ成分 α -アマニチンに対する新規ELISA測定系の構築. 生物試料分析. 44: 34-44, 2021.
- 6) 中村洋: クロマトグラフィーの原理と実際. 化学と教育. 46:410-413, 1988.
- 7) 今関六也, 本郷次雄 (編): テングタケ科. 原色日本新菌類図鑑I. p115-135, 保育社, 大阪, 1987.
- 8) 市原清志, 芳賀利一, 本永秀夫, 中甫, 細萱茂実, 奥谷竜太, 吉本茂, 井藤一久, 亀子光明, 栢森裕三, 高木康, 中野幸弘: 定量分析法における検出限界および定量限界の評価法. 臨床化学. 35: 280-294, 2006.
- 9) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48: 452-458, 2013.
- 10) Muraoka S, Fukamachi N, Mizumoto K, Shinozawa T: Detection and identification of amanitins in the wood-rotting fungi *Galerina fasciculata* and *Galerina helvoliceps*. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4207-4210, 1999.
- 11) Sgambelluri RM, Epis S, Sasseria D, Luo H, Angelos ER, Walton JD: Profiling of amatoxins and phallotoxins in the genus *Lepiota* by liquid chromatography combined with UV absorbance and mass spectrometry. *Toxins (Basel).* 6: 2336-2347, 2014.
- 12) Bambauer TP, Wagmann L, Weber AA, Meyer MR: Analysis of α - and β -amanitin in Human Plasma at Subnanogram per Milliliter Levels by Reversed Phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Orbitrap Mass Spectrometry. *Toxins (Basel).* 12: 671, 2020.
- 13) Jehl F, Gallion C, Birckel P, Jaeger A, Flesch F, Minck R: Determination of alpha-amanitin and beta-amanitin in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 149: 35-42, 1985.

- 14) 戸崎洋子: 自然毒 キノコ. 救急医学. 12: 1551-1559, 1988.
- 15) Zhang S, Zhao Y, Li H, Zhou S, Chen D, Zhang Y, Yao Q, Sun C: A Simple and High-Throughput Analysis of Amatoxins and Phallotoxins in Human Plasma, Serum and Urine Using UPLC-MS/MS Combined with PRiME HLB μ Elution Platform. *Toxins (Basel)*. 8: 128, 2016.
- 16) 平松靖史, 品川晃二, 高畑統臣, 佐藤俊雄, 水田玲美, 権守邦夫, 宮崎哲次, 小嶋亨: 劇症肝炎の経過をたどったキノコ中毒の1例 法医学的考察を含めて. *日農医誌*. 47: 145-149, 1998.