はちみつによる食中毒の病因物質について

(平成5年6月25日受理)

最所和宏^{*1} 豊田正武^{*1} 高木加代子^{*1}
 佐竹元吉^{*1} 高橋 悟^{*2} 山本裕昭^{*2}
 葛西 健^{*3} 橋本勢津^{*3} 斎藤行生^{*1}

Identification of Aconitine in Raw Honey that Caused Food Poisoning

Kazuhiro SAISHO^{*1}, Masatake TOYODA^{*1}, Kayoko TAKAGI^{*1}, Motoyosi SATAKE^{*1},
 Satoru TAKAHASHI^{*2}, Yasuaki YAMAMOTO^{*2}, Ken KASAI^{*3},
 Setu HASHIMOTO^{*3} and Yukio SAITO^{*1}

(^{*1}National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan;

^{*2}Iwate Prefectural Institute of Public Health: 15-25, Uchimaru, Morioka, Iwate 020,
 Japan; ^{*3}Iwate Prefectural Iwaizumi Health Center: 24-3, Matuhashi,

Iwaizumi, Iwaizumi-cho, Shimohei-gun, Iwate 027, Japan)

Food poisoning was caused by raw honey in Iwate prefecture on April 15, 1992. To investigate the poisonous substances, the pollens contained in the honey were inspected through a microscope. Most of the pollens (68.3%) belonged to *Aconitum*. The honey induced neurotoxic symptoms in rats.

On a thin layer chromatogram of an extract of the honey, a substance having the same *R_f* value as that of aconitine standard was detected. The presence of aconitine in the extract of the honey was confirmed by GC/MS.

Quantification was carried out by high performance liquid chromatography using a modified method for quick extraction and purification of aconitum alkaloids in herb medicines, and the aconitine level in the honey was determined. The concentration was 9.8 ppm, which was similar to the estimated level obtained from a toxicity test using killifish.

These results showed that the food poisoning was caused by aconitine in the honey.

(Received June 25, 1993)

Key words: はちみつ honey; 食中毒 food poisoning; アコニチン aconitine; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography (HPLC); 薄層クロマトグラフィー thin layer chromatography; 神経毒症状 neurotoxic symptom

緒 言

平成4年4月15日、岩手県岩泉町山林において、林業従事者が作業中、倒木の中にハチの巣を発見し、そのはちみつを喫食した6人中5人が、喫食後10分～1時間位で、吐き気、おう吐、悪寒、関節のしびれ、歩行困難などの食中毒症状を呈し、3名が入院した。その内の1名は意識昏睡状態に陥ったが、全員治療を受けて回復

した。

東北地方では8月以降冬までのはちみつは、しばしば植物由来の有毒成分を含有する危険性があり、喫食を避ける習慣がある¹⁾。しかし、近年はこの習慣を知らない人も多くなり、また今回の事例のように春先のはちみつで中毒を起こす事故も起こり、今後も起こり得る問題なので、この食中毒の病因物質を探るために、中毒はちみつ中の花粉の鏡検²⁾、アルカロイドの理化学試験、ラット・ヒメダカによる毒性試験を行い、二、三の知見を得たので報告する。

^{*1} 国立衛生試験所: 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*2} 岩手県衛生研究所: 〒020 岩手県盛岡市内丸 15-25

^{*3} 岩手県岩泉保健所: 〒027-05 岩手県下閉伊郡岩泉町岩泉字松橋 24-3

実験方法

1. 試料

分析試料：食中毒を起こしたはちみつと同一の場所より採取したはちみつを遠沈 (3,200 rpm, 20 分間) 後、上清をとりガーゼによりろ過したもの。

2. 試薬及び装置器具

2.1 試薬

アコニチン標準品 (純度約 95%) 及びビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (BSTFA) は Sigma 社製, Sep-pak カートリッジ C₁₈ は Waters 社製, アセトニトリル, メタノール, テトラヒドロフランは和光純薬工業 (株) 製液体クロマトグラフ用, その他の試薬は試薬特級を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) プレート: HPTLC Kiesel gel 60 Art13748 10×10 cm (Merck 社製)

展開溶媒: 25% アンモニア水飽和エーテル

発色試薬: ドラージェンドルフ試薬 (Munier 変法により調製した)

市販はちみつ: 東京都内で購入したもの

2.2 装置, 器具

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置: UV 多波長検出器付 HP1090 型 (Hewlett Packard 社製) (HPLC 条件)

検出波長: 210~600 nm (モニター 240 nm)

カラム: Inertsil ODS-2 4 mm i.d. × 250 mm (ジーエルサイエンス (株) 製)

注入量: 20 µl

移動相: 水-テトラヒドロフラン-アセトニトリル-クエン酸 (85:15:5:1)

流速: 0.7 ml/min

GC/MS 装置: GC 部, HP5890 (Hewlett Packard 社製); MS 部, VG70SE (VG Elementary 社製) (GC/MS 条件)

注入口温度: 290°

カラム槽温度: 初期温度 200° (保持時間 2 分) 最終温度 320° (保持時間 15 分) 昇温速度 15°/min

キャリアーガス: ヘリウム

キャリアーガス流速: 1 ml/min

注入量: 1 µl スプリットレス

カラム: HP-1 25 m × 0.25 mm i.d. (Hewlett Packard 社製)

バー ジ時間: 60 sec.

イオン源温度: 240°

イオン化電圧: 80 eV

加速電圧: 6,000 V

質量数: 200~1,000

掃引速度: 1.0 sec.

3. 花粉の形態試験

分析試料を直接スライドグラスに取り, グリセリン水

及び抱水クロラル試液を用いてマウントした。染色はカルベラ液にて行った。このプレパラートを光学顕微鏡を用いて, 花粉粒の大きさ, 形, 表面の模様, 花粉管口の形と数を観察した。レンズは対物レンズ (×20, ×40, ×100), 接眼レンズ (×20) を用いた。

4. 毒性試験

マウス DDY 系雄 (体重 20 g) 2 匹に分析試料 0.5 ml を経口投与又は腹腔内投与後症状を観察した。

容量 100 ml のビーカーに水 100 ml を入れ, 分析試料の濃度が 1 及び 5%, 市販はちみつの濃度が 1 及び 5%, アコニチンの濃度が 0.1, 1 及び 10 ppm の水溶液となるように個別に加えて, 各々市販のヒメダカ 3 匹ずつを入れ, 生死を観察した。対照は水 100 ml にヒメダカ 3 匹を入れたものとした。

5. TLC, GC/MS, HPLC 用試験溶液の抽出精製法

生葉中のアコニチン系アルカロイド迅速抽出精製法に準じ³⁾, 分析試料 5 g をビーカーにとり, 1 mM 塩酸溶液 15 ml を加え 50° に加温して溶解し, 室温にて 5 分間超音波処理を行った。これを 10 分間 3,500 rpm で遠沈し, その上清液をとった。沈殿物に対しこの操作を更に繰り返し, 上清液を合わせ, Sep-pak C₁₈ に直接通し, 1 mM 塩酸溶液 5 ml, 水 20 ml, 15% メタノール水溶液 5 ml の順に流してカラムを洗い, ついでメタノール 8 ml でアルカロイド類を溶出させた。溶出液 8 ml を減圧乾固後, アセトニトリル 200 µl に溶解し TLC 及び HPLC 用試験溶液とした。また, 同じ溶出液 8 ml を減圧乾固後, ピリジン 20 µl に溶解し BSTFA 20 µl を加え 1 時間 60° に加温し TMS エーテル誘導体とし, これを GC/MS 用試験溶液とした。

結果及び考察

1. 花粉の形態試験

はちみつ食中毒患者の症状及び過去の中毒事例¹⁾よりアコニチン系アルカロイドによる食中毒であることが考えられたため, まず花粉の形態試験を行うことにした。

結果を Table 1 に示した。個々の花粉の形態的な特徴は以下に記述するとおり, I は紡錘形・表面平滑, II は球形・表面平滑, III はやや球形 (上面から見ると三角状円形)・小刺状紋・3 個の花粉管口がある溝孔粒, IV は

Table 1. Appearance and Incidence of the Pollens Found in the Poisonous Honey

	Size (µm)	Detection (%)
I	5~10×20~25	7.9
II	15~20×15~20	11.6
III	15~20×40~50	11.6
IV	20~22×25~30	68.3
V	100~150×100~150	0.6

紡錘形・表面やや滑らか・6個の花粉管口がある溝孔粒, Vは球形. これらの内, IVの花粉は, *Aconitum* 属植物の花粉の形態とよく一致し, 出現率が68.3%であることから, アコニチン系アルカロイドが中毒病因物質の可能性が高まった.

2. 毒性試験

分析試料をマウスに0.5 ml 経口投与すると, 65分後に死亡し, けいれん・腰が抜ける・飛び上がるなどの症状を示した. 0.5 ml 腹腔内投与すると, 5分後に死亡し, 経口投与の場合と同様な症状を示したほか, 死亡の直前に眼球が突出した. マウスの毒性試験から, はちみつ試料中には神経毒が含まれると考えられた.

また, 前回のはちみつ中毒事件¹⁾において, ヒメダカを毒性試験に用いているので, 前回と比較する目的で, 同様な毒性試験を行った. 同時に, 中毒病因物質としてアコニチン系アルカロイドの存在が推測されたので, アコニチン標準品についても並行して行った. 結果は,

Table 2. Acute Toxicity with Killifish (*Oryzias latipes*)

Sample	Number of alive killifish after exposing to each test solution*		
	2** (hr)	4** (hr)	6** (hr)
Control	3	3	3
Aconitine 10 ppm	0	0	0
Aconitine 1 ppm	2	2	2
Aconitine 0.1 ppm	2	2	2
Sample 5%	1	0	0
Sample 1%	3	3	3
Commercial honey 5%	3	3	3
Commercial honey 1%	3	3	3

* Toxicity test was carried out using killifish ($n=3$) in 100 ml of water containing each test sample above.

** Survival time

Table 2 に示すように市販のはちみつでは5% 濃度でもヒメダカは正常であるが, 分析試料では5% 濃度で4時間後に3匹とも死亡した. 一方, アコニチン標準品では, 1 ppm 以下の低濃度ではいずれも1匹のみ死亡し, 10 ppm では2時間後で3匹とも死亡した.

ヒメダカによる毒性試験の結果からはちみつ試料中に, アコニチンが存在すると仮定すると, その濃度は10~100 ppm と推定された.

3. TLC による定性試験

分析試料のTLC用試験溶液について, 40 μ l をスポットし, 展開溶媒として25% アンモニア水飽和エーテル, 発色試薬としてドラーゲンドルフ試薬を用い TLCを行ったところ, 分析試料中アコニチン標準品のアセトニトリル溶液と同じ R_f 値 0.56 を示すスポットが認められた. アコニチン標準品 1, 10, 100 μ g との肉眼比較により, スポットしたTLC用試験溶液中に10~100 μ g (分析試料中に10~100 ppm のアコニチン濃度に相当) の存在が認められた.

4. GC/MS による確認試験

試験溶液中のアコニチンを確認するため, 文献⁴⁾に従いTMS誘導体とした後, GC/MSによる解析を行った.

Fig. 1 に示したように分析試料よりアコニチンの bisTMS 体のフラグメントイオンの m/z 714 [$M-CH_3COO-CH_3$]⁺, 698 [$M-CH_3COOH$]⁺, 608 [$M-CH_3COOH-OCH_3-TMSOH$]⁺ が観測され, 各ピークの強度比も標準品と一致し, 分析試料中のアコニチンの存在が確認された.

5. HPLC による定性・定量試験

本試験で用いた方法, 即ち塩酸酸性抽出後, Sep-pak C₁₈ カートリッジにより精製し HPLC を用いて定量する方法は, 生薬中からアルカロイドを抽出する方法³⁾に準拠したものである.

そこで市販のはちみつを用いて本法によるアコニチンの添加回収実験を行ったところ, 100 ppm 及び 10 ppm 添加で回収率はそれぞれ 86.4% 及び 104.1% とほぼ良好な結果が得られ, 本法ははちみつからのアコニチン系アルカロイドの抽出精製法として適していることが分か

Fig. 1. Mass spectra of aconitine: (A) authentic aconitine; (B) aconitine from honey

Fig. 2. High performance liquid chromatograms of aconitine
(A) authentic aconitine; (B) aconitine from honey

Fig. 3. Absorption spectra of aconitine
(A) authentic aconitine; (B) aconitine from honey

った。

Fig. 2 にアコニチン標準品と分析試料からの抽出液の HPLC によるクロマトグラムを示した。分析試料にアコニチンと保持時間が良く一致するピークが存在が認められ、Fig. 3 にそのピークの吸収スペクトルを示した。UV スペクトルは 235 と 275 nm に極大吸収が見られ、アコニチンと類似のスペクトルであることが確認された。HPLC 分析による中毒はちみつ中アコニチン濃度は 10.7 ppm であった。

なお Fig. 2 に見られる保持時間 9.1 min の大きなピークの UV スペクトルは、260 nm に肩があり、極大吸収が 335 nm と 355 nm で、これは酸性溶液中におけるフラボン類のスペクトルに類似していた。そこで数種フラボン類の標品を用い、同一条件下で HPLC を行い、各ピークの吸収スペクトルを測定し比較したところ、フラボンのモノ配糖体と保持時間が近く、またスペクトルも類似していた。そこで試料からの保持時間 9.1 min のピークを分取し、エーテル、酢酸エチルの順に振とう抽出

し、ピーク成分が回収されて来た酢酸エチル画分の UV スペクトルを測定したところ、330 nm (Band I) と 270 nm (Band II) に極大吸収が見られるが、Band I の極大吸収が 350 nm 以下であることから、含有成分はフラボノールではなくフラボンと推定⁵⁾された。一方保持時間 17.0 min の大きなピークは UV 吸収スペクトルのパターンより有機酸類ではないかと推定された。これら HPLC で推定されたアコニチン以外の成分は致死量のはるかに高く (アピゲニンのモノ配糖体の LD₅₀ 1 mg/kg⁶⁾, クエン酸の LD₅₀ 883 mg/kg⁷⁾ など), また中毒症状も異なることから、食中毒の病因物質とは考えられなかった。

トリカブトを原因とする食中毒が 2 例^{8), 9)}報告されている。しかし、これらの場合実際に喫食したトリカブトのアコニチン量は不明であるため、中毒量の予測は困難であるが、ヒトでの致死量は 2~5 mg¹⁰⁾といわれており、仮に中毒量を致死量の 1/100 とすると中毒量は 20~50 µg となる。今回ののはちみつを匙に 1 杯 (小匙 1 さじは水なら約 1.8 g) 食べたとなると、その摂取アコニチン量は約 20 µg に相当し、これは中毒が起こりうる量と考えられる。従って、今回ののはちみつ中のアコニチン濃度 10.7 ppm は妥当な値と考えられる。

総 括

はちみつ検体中の中毒病因物質を検索した。中毒症状からアコニチン系アルカロイドが推定されたため、まず花粉の形態試験を行い、*Aconitum* 属植物の花粉が 68.3% と高い出現率であった。更に、生薬のアルカロイドの抽出精製法に準じアルカロイドを抽出し、TLC により定性、HPLC により定量を行ったところ、アコニチ

ンの存在が認められ、その濃度は 10.7 ppm であり、これはヒメダカを用いた毒性試験の結果から推定される含有量範囲に近い値となっていた。また GC/MS 分析によりアコニチンの存在が確認できた。これらの結果から中毒病因物質はトリカブト由来のアコニチンであり、中毒はちみつ中のアコニチン含量は約 10 ppm と考えられた。

謝 辞

本研究に当たり、GC/MS 分析にご協力頂きました日本食品分析センター仲村忠雄氏に深謝致します。

文 献

- 1) 斎藤行生, 光楽昭雄, 佐々木久美子, 佐竹元吉, 内山 充: 衛生試験, **98**, 32~35 (1980).
- 2) 佐竹元吉: 同上 **87**, 81~82 (1969).
- 3) 中野道晴, 山岸 喬: 北海道衛生研究所報, **32**, 21~26 (1982).
- 4) 水柿道直, 大山良治, 木村勝彦, 石橋 正, 大野曜吉, 内間米行, 永 盛肇, 鈴木康男: 衛生化学 **34**, 359~365 (1988).
- 5) Markham, K. R.: "Techniques of Flavonoid Identification" p. 36~51 (1982), Academic Press, New York.
- 6) Prabhakar, M. C., Bano, H., Kumar, I., Shamsi, M. A., Khan, M. S. Y.: *Planta Medica* **43**, 396~403 (1981).
- 7) Gruber, C. M. Jr., Halbeisen, W. A.: *J. Pharm. Exp. Therapeu.* **94**, 65~67 (1948).
- 8) 吉井玄亮: 食衛誌, **25**, 465~466 (1984).
- 9) 管井博文: 同上 **32**, 450~451 (1991).
- 10) 藤原喜久夫, 栗飯原景昭編: "食品衛生ハンドブック" p. 189~191 (1992), 南江堂.