

毒キノコによる食中毒の検査体制の構築

野田拓史

Development of Method for Food Poisoning Causing Toxic Mushrooms

Takumi NODA

1. はじめに

毒キノコによる食中毒は、自然毒の中では国内で最も多い食中毒であり、多くは食用キノコに酷似していることによる誤食が原因である。そのため、厚生労働省では、「リスクプロファイル」を作成し注意喚起している。ツキヨタケ、クサウラボニタケおよびカキシメジは誤食されることの多い毒キノコであり、わが国におけるキノコによる食中毒の半数以上を引き起こしている¹⁾。キノコによる食中毒は、症状別に消化器障害型、神経障害型および原形質毒性型の3タイプに大別され、時に重篤な症状を起し死に至る場合もある²⁾。したがって、患者が喫食したキノコ種の迅速な同定が求められる。従来、キノコの鑑別は、形態学的特徴に基づいて同定されており、高度な専門知識を持ったキノコの専門家でなければ鑑別は困難である。また、残された喫食物が調理加工されたものや細断されたもの場合は観察による鑑別が困難となる。

そこで、食中毒発生時に迅速かつ高精度に鑑別可能な方法として、遺伝子検査法について検討した。今回の検討では、ツキヨタケ (*Omphalotus japonicus*) およびカキシメジ (*Tricholoma ustale*) の2種を対象とした。

2. 実験方法

2.1 試料

福井県内で自然採取したキノコ9検体を使用した。詳細は表1のとおり。ツキヨタケ③および④は凍結乾燥したもの、その他は生の状態で細断したものを使用するまで-20℃以下で冷凍保存した。なお、各キノコは、専門家の形態学的観察により同定されたものである。

表1 使用したキノコ

	採取年月日	採取場所
ツキヨタケ①	2017. 10. 10	福井県内
ツキヨタケ②	2018. 10. 14	越前町
ツキヨタケ③	2003. 10. 30	大野市
ツキヨタケ④	2003. 11. 5	池田町
カキシメジ①	2018. 10. 14	越前町
カキシメジ②	2018. 10. 21	おおい町
ヘビキノコモドキ	2018. 9. 27	福井市
チャツムタケ	2018. 10. 21	おおい町
ドクベニタケ	2018. 10. 25	福井市

2.2 DNA抽出

湿試料2g、凍結乾燥試料0.4gを以下の2つの方法を用いてDNAを抽出した。

抽出法①：Genomic-Tip20/G (QIAGEN) を用いて、試料を「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(平成22年9月10日付け消食表第286号消費者庁通知、最終改正平成26年3月26日)に従い操作しDNA抽出液

を得た。

抽出法②：DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて、試料を「安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(平成24年11月16日付け食発第1116第3号厚生労働省通知、最終改正平成30年7月9日)に従い操作しDNA抽出液を得た。

得られたDNA抽出液中のDNA濃度を超微量分光光度計NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。260nmの吸光度が1のときの濃度を50ng/μLとし、測定して得られた吸光度からDNA濃度を算出した。DNA濃度を滅菌蒸留水で20ng/μLに調製し、PCR反応に用いた。

2.3 PCR反応

得られたDNA抽出液を鋳型とし、ユニバーサルプライマーまたは種特異的なプライマー(表2)を用いてPCRを行った。PCR反応液は、全量を25μL (AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) 0.625unit、MgCl₂ 1.5mM、dNTPs 0.2mM、各プライマー0.2μM、DNA抽出液2.5μL)とした。反応条件は、95℃で10分間保った後、95℃30秒間、60℃30秒間、72℃1分間を1サイクルとして35サイクルを行った後、72℃で5分間保ち4℃で保存した。サーマルサイクラーは、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いた。

得られたPCR産物をAgilent 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies) により電気泳動した。電気泳動に用いる試薬等はDNA1000キット (Agilent Technologies) を使用した。

表2 使用したプライマー

Targeted species	Name	Length(bp)	Sequence(5'-3')
Universal	ITS1	19	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS2	20	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
<i>O. japonicus</i>	OJSP-F	19	GTGCACGTTTCCTTCAAT
	OJSP-R	20	AGAATCATCAACAGAGCTGC
<i>T. ustale</i>	TUSP-F	22	TAGTAGGGACCTCTGTTGCCTT
	TUSP-R	25	AACCTCCAATTAAAGCTGCTTCAC

3. 結果および考察

3.1 DNA抽出法の検討

市販されているDNA抽出キットであるGenomic-Tip20/GとDNeasy Plant Mini Kitを用いた2つの方法を検討した。それぞれの方法で表1に示すキノコ9検体からDNA抽出を行ったところ、抽出法①ではツキヨタケ②およびチャツムタケから十分量のDNAを抽出できなかった。一方、抽出法②では、全ての検体から十分量のDNAを抽出することができた。

今回使用した2種類のDNA抽出キットの大きな違いは、精製の際に使用する固相カラムである。Genomic-Tip20/Gはイオン交換樹脂タイプ、DNeasy Plant Mini Kitはシリカゲル膜タイプとされている。詳しい原因は不明だが、キ

ノコに含まれる様々な成分が固相カラムに影響した可能性があると考えられる。抽出法②では今回用いた9検体全てからDNAを抽出できたが、キノコによってはDNAを抽出できないことも示唆される。そのため、さらに検体数を増やして検討するとともに、別のDNA抽出法についても検討していきたい。

なお、後のPCR反応には抽出法②で得られたDNA抽出液を用いた。

3. 2 ITS領域の検出

ITS (Internal transcribed spacer) 領域は、真核生物のリボソームDNAにおいて18S、5.8S、28Sの各リボソームRNAをコードする遺伝子の間に存在する領域である。この領域は変異が大きく、コピー数が多くて解析が容易であるなどの理由から、キノコの分類・同定にも広く活用されている³⁾。

この領域をユニバーサルプライマー (ITS1/ITS2) を用い、表1に示す9検体のキノコから得たDNA抽出液を鋳型としてPCR反応を行い、電気泳動によりバンドの有無を確認した。その結果、9検体すべてからバンドが検出された (図1)。このことから、用いたDNA抽出液にITS領域を含むキノコのDNAが存在することを確認でき、これを内部コントロールとして利用可能であると考えられた。

電気泳動の結果の中でバンドが複数検出されたものがあった。これは、キノコを自然採取した後洗わずに実験に使用したため、他の生物のDNAが混入したことが原因と考えられる。

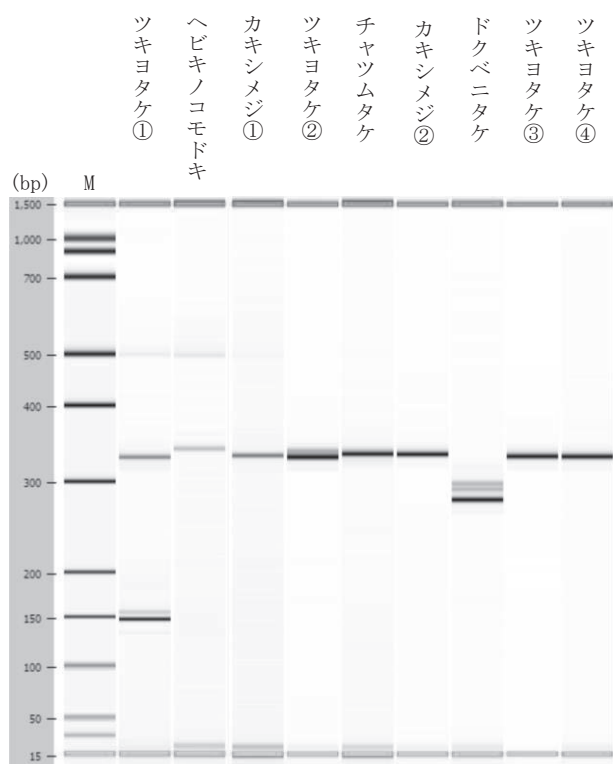


図1 ITS領域のPCR産物

3. 3 ツキヨタケの検出

ITS領域に認められるツキヨタケ特異的遺伝子を標的

としたプライマーとして OJSP-F/OJSP-R が報告されている⁴⁾。このプライマーを用いてPCR反応を行い、電気泳動によりバンドの有無を確認した。その結果、ツキヨタケ4検体すべてから単一のバンドが検出され、他のキノコ5検体からはバンドが検出されなかった (図2)。このことから、プライマー (OJSP-F/OJSP-R) のツキヨタケに対する特異性が確認された。また、バンドのサイズは理論値が107bpであり、今回確認できたバンドのサイズと一致した。

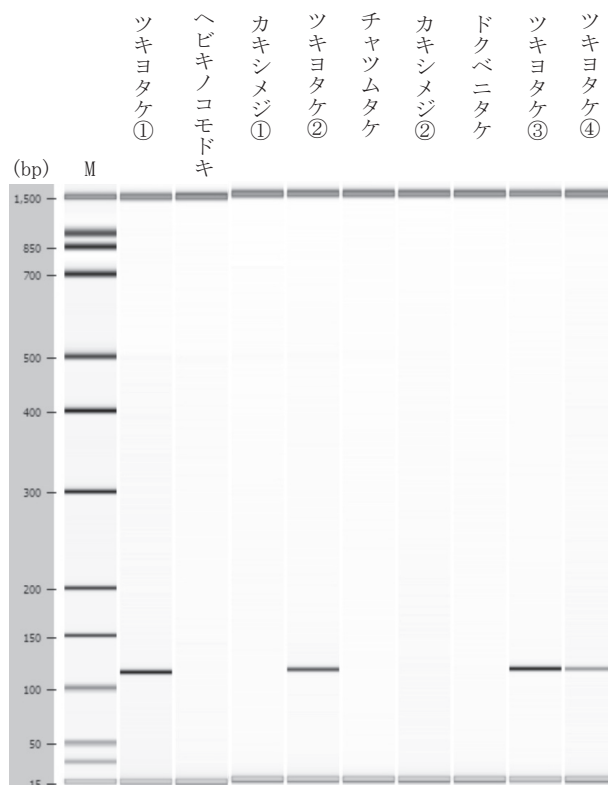


図2 ツキヨタケ特異的遺伝子のPCR産物

3. 4 カキシメジの検出

ツキヨタケと同様に、ITS領域に認められるカキシメジ特異的遺伝子を標的としたプライマーとして TUSP-F/TUSP-Rが報告されている⁴⁾。このプライマーを用いてPCR反応を行い、電気泳動によりバンドの有無を確認した。その結果、カキシメジ2検体すべてから単一のバンドが検出され、他のキノコ7検体からはバンドが検出されなかった (図3)。このことからプライマー (TUSP-F/TUSP-R) のカキシメジに対する特異性が確認された。また、バンドのサイズは理論値が80bpであり、今回確認できたバンドのサイズと一致した。

4. まとめ

DNA抽出キットである Genomic-Tip20/G および DNeasy Plant Mini Kit を用いた方法によりキノコからDNAを抽出することができたが、Genomic-Tip20/G を用いた方法では一部DNAを抽出できないキノコがあった。このことから、検査体制を構築するにあたりDNA抽出法を複数持つことは重要と考え、さらに別の方法について検討し

ていきたい。また、国内で食中毒事例の多いツキヨタケとカキシメジについて、種特異的プライマーを用いたPCR、電気泳動により高精度に鑑別できることが分かった。

今後は、ニガクリタケやスギヒラタケなどの別種の毒キノコや、焼く・煮るなどの調理加工された検体について、同様の方法で鑑別可能か検討する予定である。

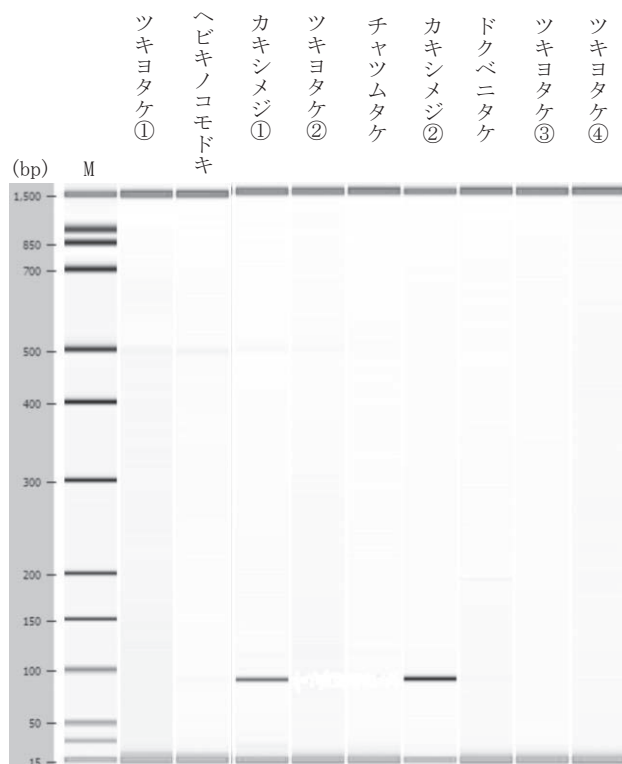


図3 カキシメジ特異的遺伝子のPCR産物

参考文献

- 1) 登田美桜 他：わが国における自然毒による食中毒事例の傾向（平成元年～22年），食品衛生学雑誌，**53**(2),105-120(2012)
- 2) 山浦由郎：キノコ中毒における最近の動向と今後の課題，食品衛生学雑誌，**51**(6),319-324(2010)
- 3) 須原弘登：分子生物学的手法を利用した木材腐朽担子菌の検出及び分類，木材保存，**30**(5),192-203(2004)
- 4) Maeta et al：DNA authentication of cooked mushrooms, Mushroom Science and Biotechnology, **16**(3), 123-128(2008)