

毒キノコによる食中毒の検査体制の構築（第3報）

野田拓史

Development of Method for Food Poisoning Causing Toxic Mushrooms. (3)

Takumi NODA

毒キノコによる食中毒が発生した際に原因を推定する手段として、各毒キノコに特異的な遺伝子領域を用いて種を同定する方法および毒キノコに含まれる有毒成分を分析する方法を検討した。その結果、前者では11種の主要な毒キノコを同定でき、後者では9つの有毒成分をLC/MS/MSにより分析できる検査法を確立した。また、両検査法が調理加工品や吐物にも有効であることが示唆された。

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。厚生労働省の統計¹⁾によると、毒キノコによる食中毒発生件数は全国において、令和2年は27件（患者数71人、死者数1人）であり、毎年数十件の中毒事例が報告されている。福井県においても令和元年に2件の毒キノコによる食中毒が発生した。毒キノコの中には致死性の有毒成分を含むものもあり、迅速に原因を特定し、早期治療を行うことが重要である。毒キノコによる食中毒では従来、患者からの聞き取り調査や専門家によるキノコの形態学的観察により原因の特定が行われる。しかし、調理加工品や嘔吐物などは調理や消化によりキノコ本来の形態を維持していないことが多く、原因の特定が困難となることが想定される。

そこで、そのような場合でも原因を特定できる検査体制の構築を目指し、遺伝子を標的として種を同定する方法（以下、遺伝子検査法という。）および毒キノコに含まれる有毒成分を分析する方法（以下、有毒成分検査法という。）について検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

市販の食用キノコ（シイタケ、エリンギ）および福井県内で自然採取し専門家により鑑別された野生キノコ43検体（表1）を使用した。これらを細断し、使用するまで-20℃以下で冷凍保存した。

2.2 遺伝子検査法

2.2.1 対象キノコ種

ツキヨタケ (*Omphalotus japonicus*)
 カキシメジ (*Tricholoma ustale*)
 ニガクリタケ (*Hypholoma fasciculare*)
 オオワライタケ (*Gymnopilus junonius*)
 テングタケ (*Amanita pantherina*)
 イボテングタケ (*Amanita ibotengutake*)
 ドクツルタケ (*Amanita vitosa*)
 スギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*)

2.2.2 試薬等

1M Tris-HCl および 0.5M EDTA は(株)ニッポンジーン製、塩化ナトリウムおよびドデシル硫酸ナトリウムは富士

フィルム和光純薬(株)製、Proteinase KはQIAGEN製、2×Ampdirect Plus およびBIOTAQ HS DNA Polymeraseは(株)島津製作所製、DNA1000キットはAgilent Technologies製のものを使用した。

表1 野生キノコ一覧

キノコ種	採取年月日	採取場所
スギヒラタケ	2017.10.10	福井市
	2018.9.27	福井市
	2019.10.14	越前市
	2020.10.21	福井市
ツキヨタケ	2020.11.7	越前市
	2017.10.10	福井市
	2018.10.14	越前町
ニガクリタケ	2020.11.7	越前市
	2017.10.10	福井市
	2017.10.26	南越前町
	2017.11.4	福井市
	2018.9.27	福井市
ドクツルタケ	2019.10.27	福井市
	2017.10.26	南越前町
	2018.10.14	越前町
カキシメジ	2018.10.21	おおい町
	2017.10.26	南越前町
	2018.10.14	越前町
オオワライタケ	2017.11.4	福井市
	2017.11.6	福井市
	2018.9.27	福井市
	2019.10.14	越前町
	2020.11.7	越前町
テングタケ	2018.9.27	福井市
	2019.10.26	越前市
イボテングタケ	2018.9.27	福井市
	2019.10.27	福井市
シロテングタケ	2018.9.27	福井市
タマゴテングタケモドキ	2018.9.27	福井市
コテングタケモドキ	2018.9.27	福井市
ヘビキノコモドキ	2018.9.27	福井市
クロハツ	2018.9.27	福井市
シロウロコツルタケ	2018.9.27	福井市
ドクベニタケ	2018.10.25	越前市
ツブカラカサタケ	2019.9.30	おおい町
コタマゴテングタケ	2019.10.14	越前市
クロタマゴテングタケ	2019.10.23	越前市
シロイボカサタケ	2019.10.23	越前市
アカイボカサタケ	2019.10.23	越前市
サクラタケ	2019.10.26	越前市
キイボカサタケ	2019.10.26	越前市
テングツルタケ	2019.10.27	福井市
クロハツモドキ	2019.10.27	福井市
オオキヌハダトマヤタケ	2020.10.21	福井市

2. 2. 3 プライマー

食中毒の原因となりやすい有毒キノコであるテンゲタケ、イボテンゲタケ、ドクツルタケおよびスギヒラタケの種特異的プライマーを設計した。さらに、既報^{2,3)}で報告されているツキヨタケ、カキシメジ、ニガクリタケ、オオワライタケの種特異的プライマーを加えた合計8種を使用した。なお、イボテンゲタケのリバースプライマーにはAPSP-Rを使用した。また、ユニバーサルプライマー⁴⁾はITS1、ITS2、ITS3およびITS4を用いた(表2)。

表2 プライマー一覧

Target species	Name	Sequence(5'-3')	Target region	Amplicon size(bp)
Universal	ITS1	TCCTAGGTTGAACCTGCGG	ITS1	Variable
	ITS2	GCTGCGTTCCTCATCGATGC		
	ITS3	GCATCGATGAAGAAGCAGC	ITS2	
	ITS4	TCCTCGCTTAATGATATGC		
<i>A. pantherina</i>	APSP-F	CACCTGCTCTTTCTCTTGCTTG	ITS1	87
	APSP-R	CATAGACAACCTGAACAATGCC		
<i>A. ibotengutake</i>	AISP-F	GCTTGTTCCTCATCTCTCC	ITS1	71
<i>A. vitosa</i>	AVSP-F	GCTCTCCTGAATGTAATGATGG	ITS2	103
	AVSP-R	GGTTAGACAGCAGAGAACTAAC		
<i>P. porrigens</i>	PPSP-F	GGCTTGGATGTGAGGATG	ITS2	90
	PPSP-R	CACACCAAGACGGCTCT		
<i>O. japonicus</i>	OJSP-F	GTCACGCTTTCCTTCAAT	ITS1	107
	OJSP-R	AGAATCATCAACAGAGCTGC		
<i>T. ustale</i>	TUSP-F	TAGTAGGGACCTCTGTGCTT	ITS2	80
	TUSP-R	AACCTCGAATTTAAAGTGTCTCAC		
<i>H. fasciculare</i>	28F	AAACTGGCTTGGTTGATG	ITS1	123
	27R	CCTCACACCGAGTTCTCTC		
<i>G. junonius</i>	15F	TGCTTCTAATGGCTGGATGTG	ITS2	129
	14R	CAGACATCTAACGGCGTAGATA		

2. 2. 4 機材等

ディスポーザブルホモジナイザー：バイオマッシャーSP(株式会社)、ドライサーモユニット：DTU-2B(タイテック)、遠心分離機：Allegra X-22R(BECKMAN COULTER)、サーマルサイクラー：GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems)、電気泳動装置：Agilent 2100バイオアナライザ(Agilent Technologies)

2. 2. 5 試験法

試料約0.2gに溶解液(Tris-HCl 20mM、EDTA 5mM、塩化ナトリウム400mM、ドデシル硫酸ナトリウム0.3%、Proteinase K 200µg/mL) 2mLを加え、ホモジナイザーにより軽く粉碎した後、55°Cで10分加温した。その後、遠心分離(3000×g、5分間)し、上清1mLをDNA溶液とした。

得られたDNA溶液を鋳型とし、ユニバーサルプライマーおよび種特異的プライマーを用いてPCRを行った。PCR反応液は、全量を20µL(2×Ampdirect Plus 10µL、BIOTAQ HS DNA Polymerase(5U/µL) 0.1µL、F-プライマー(10µM) 1µL、R-プライマー(10µM) 1µL、DNA溶液0.5µL、滅菌蒸留水7.4µL)とした。反応条件は、95°Cで10分間保った後、94°C30秒間、60°C1分間、72°C1分間を1サイクルとして35サイクルを行った後、72°Cで7分間保ち4°Cで保存した。得られたPCR産物を電気泳動し、増幅の有無を確認した。

2. 3 有毒成分検査法

2. 3. 1 対象成分

イルジンS、α-アマニチン、β-アマニチン、ファロイジン、イボテン酸、ムシモール、ムスカリン、アリルグリシン、プロパルギルグリシン

2. 3. 2 試薬等

標準品：イルジンSは林純薬工業(株)製のものを、α-アマニチン、ファロイジンおよびイボテン酸は富士フィルムと光純薬(株)製のものを、β-アマニチン、ムシモール、ムス

カリンおよびプロパルギルグリシンはシグマアルドリッチ社製のものを、アリルグリシンは東京化成工業(株)製のものをを使用した。

標準溶液：各標準品を1.0mgずつ量り取り、70%メタノールで正確に10mLとして100µg/mL単体標準溶液を調製した。次に、この単体標準溶液を1mLずつ正確に量り取り、70%メタノールで正確に10mLとして10µg/mL混合標準溶液を調製した。

検量線用標準溶液：10µg/mL混合標準溶液を70%メタノールで適宜希釈し、0.0005、0.001、0.0025、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2µg/mLとしたものを検量線用標準溶液とした。

使用溶媒等：メタノール、超純水、酢酸および酢酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬(株)製のLC/MS用または残留農薬分析用を使用した

2. 3. 3 機材等

ホモジナイザー：LK-22(ヤマト科学(株))、遠心分離機：5400(株式会社)、固相カラム：Oasis HLB 3cc、60mg(Waters)、フィルター：DISMIC、0.20µm、親水性PTFE(アドバンテック東洋(株))

2. 3. 4 装置および測定条件

装置：液体クロマトグラフ質量分析計 Prominence 20A/3200Q TRAP(株式会社)、分析カラム：Scherzo SS-C18 粒子径3µm、2.0mm i.d.×150mm(Imtakt)、移動相：A液0.07%酢酸水溶液、B液15mM酢酸アンモニウム含有メタノール、グラジエント条件：B液0% (0min→6min)→100% (20min)→0% (20min→30min)、流速：0.3mL/min、カラム温度：40°C、注入量：10µL、イオン化：ESI Positive (+)、MRM条件：表3のとおり。

表3 MRM条件

有毒成分	イルジンS	α-アマニチン	β-アマニチン
定量イオン	265 > 128	919 > 86	920 > 86
確認イオン	265 > 115	919 > 339	920 > 902

有毒成分	ファロイジン	イボテン酸	ムシモール
定量イオン	789 > 86	159 > 113	115 > 98
確認イオン	789 > 157	159 > 159	115 > 68

有毒成分	ムスカリン	アリルグリシン	プロパルギルグリシン
定量イオン	174 > 57	116 > 70	114 > 68
確認イオン	174 > 115	116 > 116	114 > 74

2. 3. 5 試験法

図1に従い操作した。

2. 3. 6 試験法の妥当性評価

平成19年11月15日付け食安発第115001号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」に準じて、検査者1名が添加試料を1日2併行、5日間繰り返し測定した。添加試料は、予め有毒成分が含まれていないことを確認した試料(シイタケ)に試料中濃度5µg/gとなるよう混合標準溶液を添加した試料を用いた。

得られた測定値から各パラメータを算出し、同ガイドラインにおける目標値：真度70-120%、併行精度10%未満、室内精度15%未満と比較した。

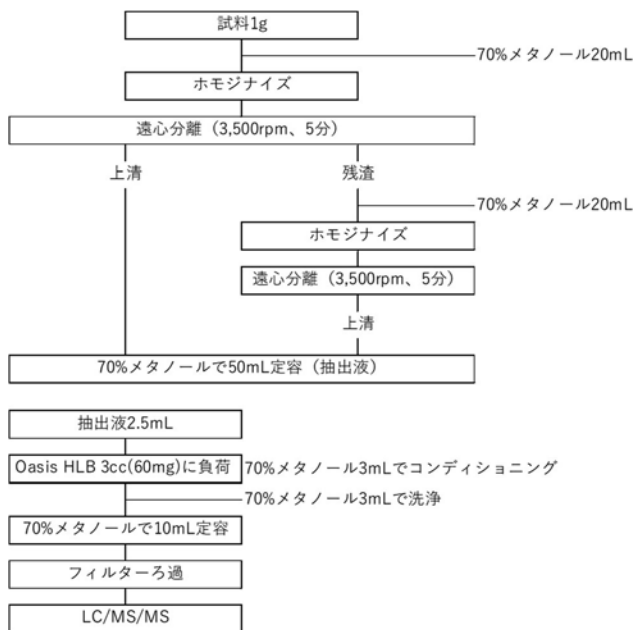


図1 前処理法

2. 4 調理加工品への適用

ツキヨタケおよびイボテングタケを用いて、炒め物および汁物を作製し、これらについて遺伝子検査および有毒成分検査を行った。炒め物はキノコ、豚肉、ピーマンを合わせて炒め、調味料(砂糖、しょうゆ、生姜)を加えた。汁物は水と調味料(しょうゆ、みりん)を合わせて沸騰させ、キノコを加えて煮込んだ。

2. 5 吐物への適用

前項で作製した炒め物を 37°Cの人工胃液中で反応させ(30分間、1、2、3時間)、200mM 炭酸ナトリウム水溶液中で中和し、これらについて遺伝子検査および有毒成分検査を行った。人工胃液は塩化ナトリウム 2g および塩酸 7mLに精製水を加えて 1000mLとし、これにペプシン 1gを溶かしたものとした。

3. 結果および考察

3. 1 遺伝子検査法の検討

遺伝子検査法は、internal transcribed spacer(ITS)領域に認められる種特異的配列を用いて PCR を行い、その PCR 産物を検出する方法であり、種特異的 PCR、PCR-RELF 法、リアルタイム PCR 法等が挙げられる。操作の簡便性や迅速性を考慮し、種特異的 PCR 産物を電気泳動により確認する方法とした。第2報²⁾において、PCR 反応液中に残存する夾雑物による PCR 阻害作用を抑制できる PCR 試薬を用いることで、DNA 抽出操作を簡略化し検査時間の短縮を図った。また、第2報では DNA 溶液の DNA 濃度を測定し滅菌蒸留水で希釈したものを PCR に用いていたが、原液のままでも PCR に支障が無かったため、これらの操作は省略し、さらに時間の短縮を図った。

各種特異的プライマーの特異性について確認するため、ユニバーサルプライマーおよび種特異的プライマーを用いて食用キノコおよび野生キノコ合計 45 検体の DNA 溶液を鋳型として PCR を行い、電気泳動により増幅の有無を確認した。8種の種特異的プライマーについて、標的と

するキノコから目的とする増幅(71~129bp)が確認され(図2)、標的以外のキノコからは増幅は確認されなかった。したがって、これらのプライマーは標的とするキノコに対して特異的であることが確認できた。

本検査法では、ユニバーサルプライマー(ITS1/ITS2およびITS3/ITS4)によるPCRで増幅が確認でき、かつ、いずれかの種特異的プライマーによるPCRで目的とする増幅が確認された場合に種を同定する。ユニバーサルプライマーによるPCRで増幅が確認できない場合は、DNA抽出やPCRに不備があった可能性があるため、再検査を行う。

また、今回の検討では実物が入手できなかったため検証できなかったが、ドクササコ、クサウラベニタケおよびオシロカラカサタケの種特異的プライマーが報告されている^{2),3)}。したがって、これらのプライマーも合わせると合計11種の毒キノコについて、本検査法で同定が可能であると考えられる。

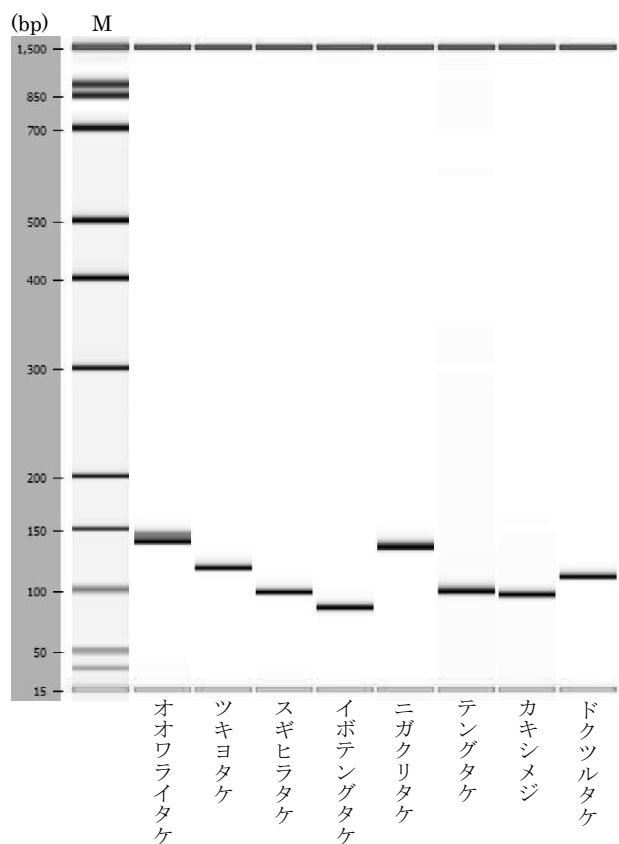


図2 種特異的プライマーによるPCR

3. 2 有毒成分検査法の検討

3. 2. 1 MS条件の検討

測定は選択的にイオンをモニタリングする MRM モードで行った。標準溶液をインフュージョン法で MS 部へ直接導入し、エレクトロスプレーイオン化法(ESI法)のポジティブモードでスキャン測定することにより、プリカーサーイオンを選定した。次に、解析ソフト(Analyst)の最適化ツールを用いてプロダクトイオンおよび MS パラメータ(コリジョンエネルギーおよび電圧等)の最適化を行い、MS 条件を決定した。

3. 2. 2 分析カラムの検討

対象とした9成分は、ムスカリンのようなイオン性で極性の非常に高いもの、ファロイジンのような分子量の大きい環状ペプチドなど、それぞれ極性や分子量が非常に異なる。そのため、これらの成分を通常使用される ODS カラムや HILIC カラムを用いて一斉分析することは困難である。そこで、低極性物質から高極性物質まで幅広く分析できるマルチモードカラムである Scherzo SS-C18 を用いることとした。この分析カラムは低極性物質を逆相モード、高極性物質をイオン交換モードで保持・分離する。

3. 2. 3 移動相およびグラジエント条件の検討

初めに移動相に用いる有機溶媒を検討した。メタノールおよびアセトニトリルで混合標準溶液を測定したところ、アセトニトリルではイルジン S の感度が著しく低下したため、メタノールを使用することとした。また、メタノール濃度を 0% から 100% まで上昇させるグラジエント条件で低極性物質であるイルジン S、 α -アマニチン、 β -アマニチンおよびファロイジンが良好に分析できた。

次に、移動相に加える添加剤を検討した。ギ酸-ギ酸アンモニウムおよび酢酸-酢酸アンモニウムをそれぞれ添加した水-メタノールで混合標準溶液を測定したところ、ギ酸-ギ酸アンモニウムではイボテン酸およびプロパルギルグリシンの感度が低下したため、酢酸-酢酸アンモニウムを添加剤として使用することとした。Scherzo SS-C18 では塩濃度を上げることで高極性物質を溶出させるが、塩濃度が高くなるほどイオン化が抑制され感度が低下する成分があった。そのため、最適な酢酸アンモニウムの濃度を検討したところ、15mM とすることですべての成分が良好に分析できた。また、酢酸の濃度が高くなるとイボテン酸の感度が上昇したが、アリルグリシンとムシモールのピークがブロード化した。そのため、最適な酢酸の濃度を検討したところ、0.07% とすることですべての成分が良好に分析できた。

9成分のうちイボテン酸およびプロパルギルグリシンは最も早く溶出するが、これらは酢酸アンモニウムによるイオン化抑制の影響を強く受けたため、これらが溶出する最初の6分間は移動相 B 液を 0% で保ち、その後 100% に上昇させるグラジエント条件とした。

3. 2. 4 定量限界および検量線の範囲・直線性

最適化した条件を用いて混合標準液を測定し、各成分の S/N 比 > 10 となる最低濃度を定量限界とした。その結果、ムスカリンおよびプロパルギルグリシンの定量限界を 0.5ng/mL、 α -アマニチン、ファロイジンおよびアリルグリシンの定量限界を 2.5ng/mL、イルジン S、イボテン酸およびムシモールの定量限界を 5ng/mL、 β -アマニチンの定量限界を 10ng/mL とした。

次に、検量線の範囲および直線性を確認した。表 4 に示す範囲で混合標準溶液を測定し検量線を作成した。その結果、全ての成分で相関係数 0.994 以上の良好な検量線となった。

表 4 各有毒成分の検量線の範囲

有毒成分	検量線の範囲
ムスカリン、プロパルギルグリシン	0.5-10ng/mL
α -アマニチン、ファロイジン、アリルグリシン	2.5-50ng/mL
イルジン S、イボテン酸、ムシモール	5-100ng/mL
β -アマニチン	10-200ng/mL

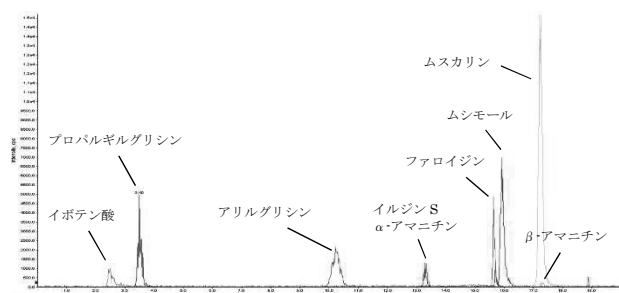


図 3 各有毒成分の MRM クロマトグラム (各 100ng/mL)

3. 2. 5 前処理法の検討

固相カラムによるクリーンアップには、目的物質を保持させ、夾雑物を洗い流してから目的物質を溶出させる保持型と、目的物質を保持させず夾雑物を保持させる通過型の 2つの方法がある。前者は精製効果が高い反面、多成分分析には向かず、後者は精製効果が低いが多成分分析に向いているため、通過型で検討した。固相カラムはイルジン S 検査法⁹⁾ で用いた Oasis HLB とした。

混合標準溶液を用いて 9成分全てが Oasis HLB を通過する有機溶媒条件を調べた結果、70%メタノールで通液することで概ね回収できることが分かった。よって、70%メタノールにより抽出し、抽出液を固相カラムに通液して精製する前処理法とした (図 1)。

3. 2. 6 試験法の妥当性評価

結果は表 5 のとおり。イボテン酸およびプロパルギルグリシンを除く 7 成分については全ての項目で目標値を満たした。一方、イボテン酸およびプロパルギルグリシンの真度が 70% を下回った原因を調べたところ、マトリックス効果によるイオン化抑制であると考えられた。マトリックス効果の対策として最終検液を希釈し再度評価したところ、イボテン酸については 2 倍希釈、プロパルギルグリシンについては 20 倍希釈することで良好な結果となった。希釈することにより検出感度が下がるものの、両者は数百 ug/g 程度毒キノコに含まれていると報告されており⁶⁾、希釈した時の定量限界は 2 μ g/g 試料であることから、検出感度は十分であると考えられる。

3. 2. 7 野生キノコの有毒成分実態調査

野生キノコ 43 検体について有毒成分検査を行った。その結果、ツキヨタケ 3 検体からイルジン S、ドクツルタケ 1 検体から α -アマニチン、 β -アマニチンおよびファロイジン、テングタケ 2 検体およびイボテングタケ 2 検体からイボテン酸およびムシモールが検出された (表 6)。

表 5 妥当性評価結果

	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
イルジン S	82.6	8.0	11.9
α -アマニチン	98.1	8.2	8.2
β -アマニチン	83.2	8.7	14.4
ファロイジン	78.4	8.8	11.2
イボテン酸	65.5	6.2	7.6
ムシモール	89.6	3.9	4.1
ムスカリン	105.2	2.2	3.2
アリルグリシン	86.8	3.4	3.4
プロパルギルグリシン	9.5	6.9	11.0
イボテン酸 (2 倍希釈)	98.5	8.6	8.6
プロパルギルグリシン (20 倍希釈)	71.4	9.5	14.9

表 6 有毒成分実態調査結果

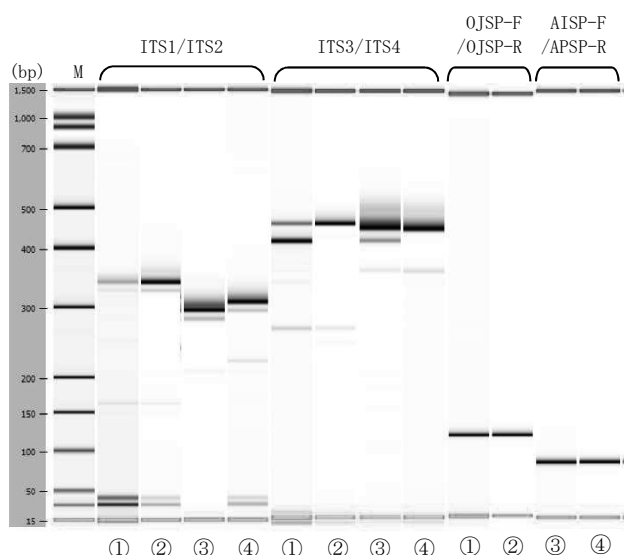
キノコ種	検出した有毒成分
ツキヨタケ	イルジン S (41~373μg/g)
ドクツルタケ	α-アミニチン (391μg/g) β-アミニチン (158μg/g) ファロイジン (273μg/g)
テングタケ	イボテン酸 (441~444μg/g) ムシモール (42~182μg/g)
イボテングタケ	イボテン酸 (176~435μg/g) ムシモール (19~26μg/g)

3.3 調理加工品への適用

3.3.1 遺伝子検査

作製した調理加工品から得た DNA 溶液を鋳型としてユニバーサルプライマーおよび種特異的プライマーを用いて PCR を行い、電気泳動により増幅の有無を確認した。

結果は図 4 のとおり。すべての検体でユニバーサルプライマーによる PCR で増幅が確認でき、かつ、それぞれの種特異的プライマーによる PCR でも増幅が確認できた。このことから、本検査法により調理加工品についても検査可能であることが示唆された。



①：ツキヨタケの炒め物 ②：ツキヨタケの汁物
③：イボテングタケの炒め物 ④：イボテングタケの汁物

図 4 調理加工品の遺伝子検査結果

3.3.2 有毒成分検査

ツキヨタケやドクツルタケに含まれる有毒成分が調理加工によりキノコから別の部位へ移行することが報告されている^{7),8)}ため、作製した炒め物についてはキノコ部位およびその他の具材、汁物についてはキノコ部位および煮汁をそれぞれ検査した。

結果は表 7 のとおり。各有毒成分の濃度がいずれも未調理品より調理加工品（キノコ部位）の方が低くなり、その他の具材および煮汁からも有毒成分が検出されたことから、キノコに含まれていた有毒成分が調理加工により全体へ拡散したと考えられた。このことから、食中毒発生時の検体にキノコ本体が残っていない場合でも煮汁などから有毒成分を検出できる可能性が示唆された。

表 7 調理加工品の有毒成分検査結果

	イルジン S	イボテン酸	ムシモール
未調理品	384.0μg/g	236.4μg/g	31.7μg/g
炒め物（キノコ部位）	159.2μg/g	105.6μg/g	10.7μg/g
汁物（キノコ部位）	68.8μg/g	43.5μg/g	4.1μg/g
炒め物（その他の具材）	72.6μg/g	46.7μg/g	5.9μg/g
汁物（煮汁）	55.0μg/g	43.3μg/g	3.9μg/g

3.4 吐物への適用

3.4.1 遺伝子検査

ツキヨタケの炒め物を用いて作製した模擬吐物から得た DNA 溶液を鋳型としてユニバーサルプライマーおよび種特異的プライマーを用いて PCR を行い、電気泳動により増幅の有無を確認した。

結果は図 5 のとおり。いずれの反応時間においても、ユニバーサルプライマーによる PCR で増幅が確認でき、かつ、種特異的プライマーによる PCR でも増幅を確認できた。ユニバーサルプライマーによる PCR 結果においては反応時間が長くなるほどバンドが薄くなる傾向が見られ、胃液による DNA の断片化が起きたと考えられるが、種特異的プライマーによる PCR 結果においてはバンドが薄くなる傾向は見られなかった。PCR 産物のサイズが大きいほど胃液による DNA の断片化を受けやすいことが報告されている⁹⁾が、種特異的プライマーによる PCR 産物は 100bp 程度と小さいため DNA の断片化を受けなかったと考えられる。これらのことから、本検査法により吐物についても検査可能であることが示唆された。

3.4.2 有毒成分検査

ツキヨタケおよびイボテングタケの炒め物を用いて作製した模擬吐物を検査した結果を図 6 に示す。反応時間が長くなるほどすべての有毒成分の濃度が減少傾向にあり、人工胃液により有毒成分が分解された可能性が示唆された。他の有毒成分も胃液により分解される可能性が考えられたため、混合標準溶液を人工胃液と反応させて影響を調べた。

結果は図 7 のとおり。人工胃液を炭酸ナトリウム水溶液で中和した後に混合標準溶液を添加したものを 0 時間とし、このピーク面積を 100% として各反応時間のピーク面積と比較した。多くの有毒成分が減少傾向にあり、特にイルジン S やファロイジンは影響が大きいことが判明した。このことから、胃液により有毒成分の多くは分解され、吐物中の有毒成分濃度は低くなることが示唆された。

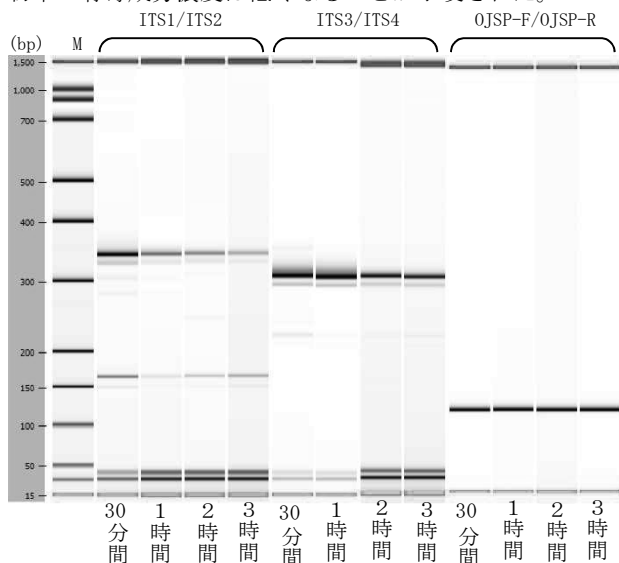


図 5 模擬吐物の遺伝子検査結果

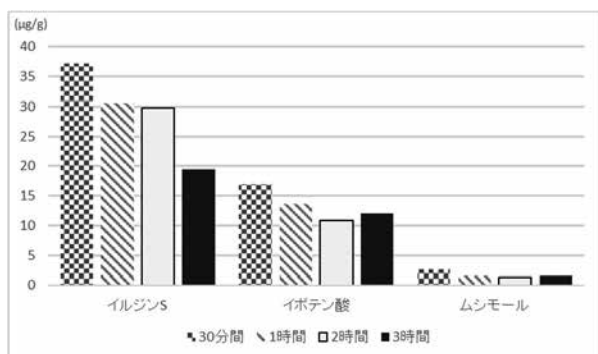


図6 模擬吐物の有毒成分検査結果

4. まとめ

遺伝子検査法は、種特異的プライマーを用いた PCR による増幅の有無を電気泳動により確認する簡便な方法を検討した。本研究で新規設計したプライマーに加え、報告されているプライマーを用いることで食中毒事例の多い 11 種の毒キノコについて同定できる検査法を確立した。

有毒成分検査法は、LC/MS/MS を用いた 9 つの有毒成分一斉分析法を検討した。分析カラムとしてマルチモードカラムを採用することにより、幅広い物性を持つ 9 つの有毒成分を一度に分析できる迅速な検査法を確立した。

食中毒発生時に持ち込まれる検体として調理加工品や吐物が想定されるため、これらについて両検査法が適用可能か検討した。その結果、両検査法が調理加工品および吐物にも有効であることが示唆された。また、キノコに含まれる有毒成分が調理加工により他の食材へ拡散すること、有毒成分の多くが胃液により分解されることが明らかとなった。

食中毒発生時には両検査を実施し、結果を総合的に判断して原因を推定することが望ましいと考える。今後は、標準作業書を整備し、常に検査対応ができる体制を整えたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、野生キノコの採取および鑑別にご協力いただきました福井きのこアドバイザー会の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 厚生労働省：食中毒統計資料
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/k/enkou_iryoushokuhin/syokuchu/04.html
- Maeta, K., Mochida, Y., Komatsu, M., Ochi, T., NaGase, M., Aimi, T.: DNA authentication of cooked mushrooms, *Mushroom Science and Biotechnology*, **16**(3),123-128(2008)
- 野村千枝,昌山敦,山口瑞香,佐久間大輔,梶村計志: 食中毒を引き起こす有毒キノコの種特異的プライマーによるスクリーニング法の開発, *食品衛生雑誌*, **58**(3), 132-142(2017)
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR protocols: a guide to methods and applications*,315-322(1990)
- 野田拓史: 毒キノコによる食中毒の検査体制の構築 (第2報), *福井県衛生環境研究センター年報*, **18**,54-57(2020)
- 佐藤正幸,姉帯正樹: テングタケ類に含有されるイボテン酸及びムシモールの分析, *北海道立衛生研究所*, **64**,27-33(2014)
- 笠原義正,伊藤健: LC/MS/MS によるツキヨタケおよび食中毒原因食品中の illudin S の分析, *食品衛生雑誌*, **50**,167-172(2009)
- 松下和裕,若林勇輝,駒場直行,徳田侑子,飯野聡子,渡辺真美子,泉聡美,堀亜裕美,黒崎かな子: キノコ中毒における有毒成分の分析法の検討, *栃木県保健環境センター年報*, **21**,42-45(2016)

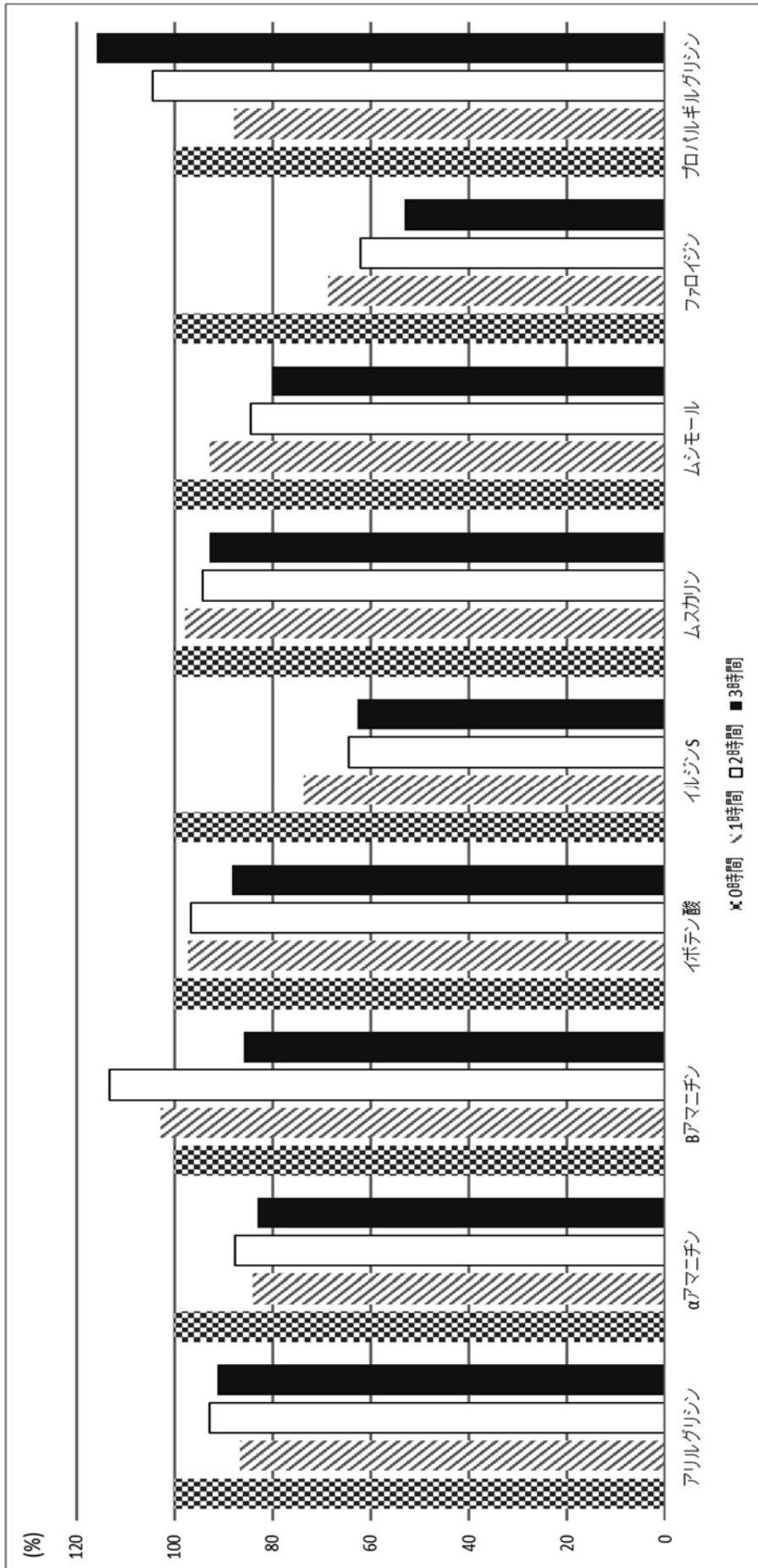


図7 胃液が有毒成分に与える影響調査結果