

研究者 (所属・氏名) : 保健衛生部 野田 拓史

研究課題名 (終了)	毒キノコによる食中毒の検査体制の構築	コードNO. III B-2
共同研究者 (担当分野)	なし	
研究期間	平成 30 年度から 令和 2 年度まで (3年間)	
研究成果 の概要	<p>1. 目的</p> <p>毒キノコによる食中毒は、自然毒由来の中では最も多く、時には重篤な症状となり死に至る場合もある。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。</p> <p>毒キノコによる食中毒は、平成 19 年以降福井県内で 10 件 (ツキヨタケ 9 件、ニガクリタケ 1 件) 発生し、少なくとも 28 名の患者を出しており、検査体制の整備が求められる。</p> <p>従来、キノコが原因と疑われる食中毒発生時には喫食者からの聞き取り調査や専門家による残品の形態学的観察により原因を推定してきたが、残品が調理加工された場合などは鑑定不能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推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。) および毒キノコ由来の有毒成分を定量分析する方法 (以下、有毒成分検査法という。) を検討した。</p> <p>2. 方法</p> <p>(1) 遺伝子検査法の検討</p> <p>Internal transcribed spacer(ITS)領域に認められる種特異的配列を標的にして PCR を行い、その PCR 産物を電気泳動により検出する方法とし、DNA 抽出法、PCR 条件等の検討を行った。</p> <p>(2) 種特異的プライマーの特異性の確認</p> <p>食中毒の原因となりやすい有毒キノコ 4 種 (ドクツルタケ、テングタケ、イボテングタケ、スギヒラタケ) の種特異的プライマーを新規設計した。さらに文献で報告されている 4 種 (ツキヨタケ、ニガクリタケ、カキシメジ、オオワライタケ) の種特異的プライマーを加え、合計 8 種の種特異的プライマーの特異性を確認した。</p> <p>(3) 有毒成分検査法の検討</p> <p>標準品が供給されている毒キノコ由来の有毒成分 9 種 (イルジン S、α-アマニチン、β-アマニチン、ファロイジン、ムスカリン、イボテン酸、ムシモール、アリルグリシン、プロパルギルグリシン) を対象として、前処理法、測定条件等を最適化し、LC-MS/MS を用いた一斉分析法を検討した。</p>	

(4)有毒成分検査法の妥当性評価

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、市販のシイタケに試料中濃度 5 μ g/g となるように標準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。

(5)野生キノコの有毒成分調査

福井県内で自然採取した 25 種 43 検体の野生キノコについて有毒成分検査を行った。

(6)調理加工品への適用

有毒成分の含有が確認された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た。これらについて遺伝子検査および有毒成分検査を行い、両検査法が調理加工品へ適用できるか検証した。

(7)吐物への適用

前項で作製した炒め物を 37 $^{\circ}$ C の人工胃液中で反応(30 分間、1、2、3 時間)させ、炭酸ナトリウム水溶液で中和し反応を停止させたものを模擬吐物とした。これらについて遺伝子検査および有毒成分検査を行い、両検査法が吐物へ適用できるか検証した。

3. 結果・成績(図面含む)

(1)遺伝子検査法の検討

遺伝子検査法を下記のとおり確立した。より迅速かつ簡便な検査法とするため、DNA 抽出はキットによる精製を行わない方法とした。これに伴い、DNA 抽出液に含まれる夾雑物により PCR 反応が阻害されるおそれがあるため、この阻害作用を抑制することのできる PCR buffer を用いることとした。

【検査法の概要】

試料約 0.2g に溶解液(Tris-HCl(pH 8.0) 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 200 μ g/mL) 2mL を加え、ホモジナイザーにより軽く粉碎した後、55 $^{\circ}$ C で 10 分間加温する。その後、遠心分離(3000 \times g、5 分間)し、上清を DNA 溶液とする。

PCR 反応液は、全量を 20 μ L (2 \times Ampdirect Plus 10 μ L、BIOTAQ HS DNA Polymerase(5U/ μ L) 0.1 μ L、F-プライマー(10 μ M) 1 μ L、R-プライマー(10 μ M) 1 μ L、DNA 溶液 0.5 μ L、滅菌蒸留水 7.4 μ L) で調製する。反応条件は、95 $^{\circ}$ C で 10 分間保った後、94 $^{\circ}$ C 30 秒間、60 $^{\circ}$ C 1 分間、72 $^{\circ}$ C 1 分間を 1 サイクルとして 35 サイクルを行った後、72 $^{\circ}$ C で 7 分間保ち 4 $^{\circ}$ C で保存する。

得られた PCR 産物を電気泳動し、増幅の有無を確認する。

(2)種特異的プライマーの特異性の確認

使用したユニバーサルプライマーおよび種特異的プライマーは表 1 のとおり。なお、イボテングタケのリバースプライマーは APSP-R を用いた。ユニバーサルプライマーによる PCR により、ITS 領域の増幅を確認した。すべての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(計 27 種)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。その結果、8 種の種特異的プライマーについて、それぞれ標的とするキノコから目的とする PCR 産物が確認され、標的以外のキノコからは PCR 産物が確認されなかった。したがって、これらの種特異的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された。

表1 ユニバーサルプライマーおよび種特異的プライマー

Targeted species	Name	Sequence(5'-3')
Universal	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ドクツルタケ	AVSP-F	GCTCTCCTTGAATGTATTAGTGG
	AVSP-R	GGTTAGACAGCAGAGAGAACTAAC
テングタケ	APSP-F	CACTGTCTCTTTCTCTTGCTTG
	APSP-R	CATAGACAACCTGAACAATGCC
イボテングタケ	AISP-F	GCTTGTTTCTTCATTCTCTCC
スギヒラタケ	PPSP-F	GGCTTGGATGTGAGGATTG
	PPSP-R	CACACCAAAGACGGTCTT
ツキヨタケ	OJSP-F	GTGCACGTTTCCTTTCAAT
	OJSP-R	AGAATCATCAACAGAGCTGC
ニガクリタケ	28F	AAACCTGGCTTGGTTGATG
	27R	CCTCACAACCGAGTTTCCTC
カキシメジ	TUSP-F	TAGTAGGGACCTCTGTTGCCTT
	TUSP-R	AACCTCCAATTTAAAGCTGCTTCAC
オオワライタケ	15F	TGCTTCTAATGGTCTGGATGTG
	14R	CAGACATCTAACGGCGTAGATA

(3)有毒成分検査法の検討

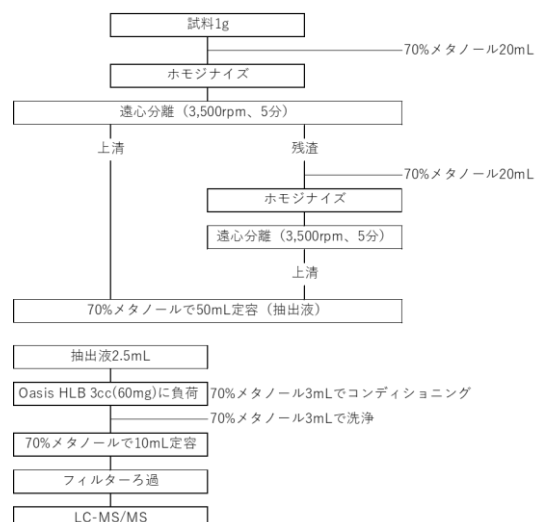
LC-MS/MS を用いた 9 種の有毒成分の一斉分析法を下記のとおり確立した。対象とした有毒成分は、イオン性で極性が非常に高いものや分子量の大きい環状ペプチドなど、それぞれ極性や分子量の物性が非常に異なるため、一般的に使用される ODS カラム等では一斉分析が困難であった。そこで、ODS にイオン交換基が導入されたマルチモードカラムである Imtakt 製の Scherzo SS-C18 を用いて検討した。各種測定条件を最適化し混合標準液を測定したところ、すべての成分が良好に分析できた (図 1)。

【検査法の概要】

○測定条件

装置 LC-MS/MS	Prominence 20A/3200Q TRAP (島津製作所/Sciex)
分析カラム	Scherzo SS-C18(Imtakt) 粒子径 3µm、2.0mm i.d.×150mm
移動相	A 液 : 0.07%酢酸 B 液 : 15mM 酢酸アンモニウム含有メタノール
グラデーション条件	B 液 : 0%(0min→6min)→100%(20min) →0%(20min→30min)
流速	0.3mL/min
カラム温度	40℃
注入量	10µL
イオン化	ESI Positive (+)
MRM 条件	別表のとおり

○前処理法



・MRM 条件

有毒成分	イルジンS	α-アマニチン	β-アマニチン	ファロイジン	ムスカリン
定量イオン	265>128	919>86	920>86	789>86	174>57
確認イオン	265>115	919>339	920>902	789>157	174>115

有毒成分	イボテン酸	ムシモール	アрилグリシン	プロパルギルグリシン
定量イオン	159>113	115>98	116>70	114>68
確認イオン	159>159	115>68	116>116	114>74

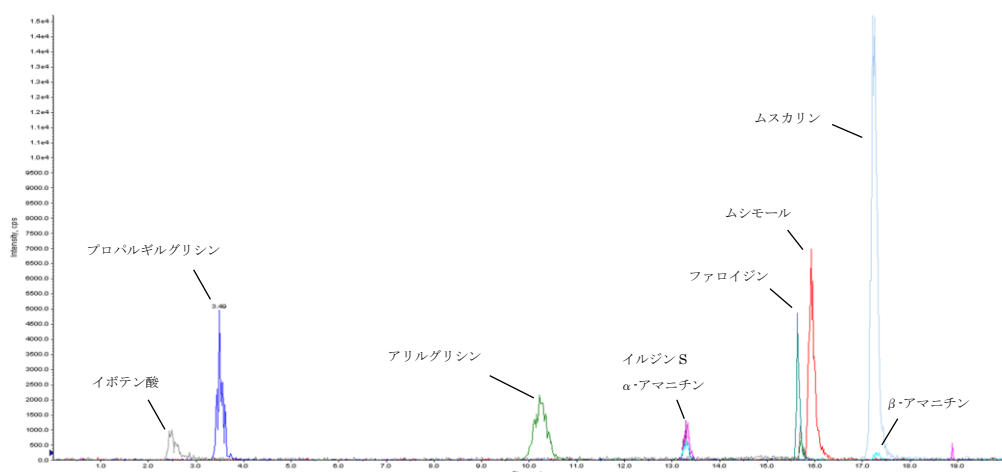


図1 各有毒成分のMRMクロマトグラム (各 100ng/mL)

(4)有毒成分検査法の妥当性評価

結果は表2のとおり。イボテン酸およびプロパルギルグリシンは真度について目標を達成できなかった。調査した結果、マトリックス効果によるイオン化抑制が原因であると考えられた。マトリックス効果の対策として希釈法が有効であったため、最終検液を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倍希釈することにより目標を達成できた。希釈することにより検出感度が下がるものの定量限界は2μg/gであり、イボテン酸およびプロパルギルグリシンは数百μg/g程度毒キノコに含まれていると報告されていることから十分検出可能であると考えられる。

表2 妥当性評価の結果

	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
ムスカリン	105.2	2.2	3.2
イボテン酸	65.5	6.2	7.6
ムシモール	89.6	3.9	4.1
アрил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
目標	70-120	10>	15>

(5)野生キノコの有毒成分調査

結果は表 3 のとおり。43 検体の野生キノコのうち、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を検出した。いずれの有毒成分も定量限界より数百倍程度高い濃度が検出され、本法の感度が十分であることが示された。

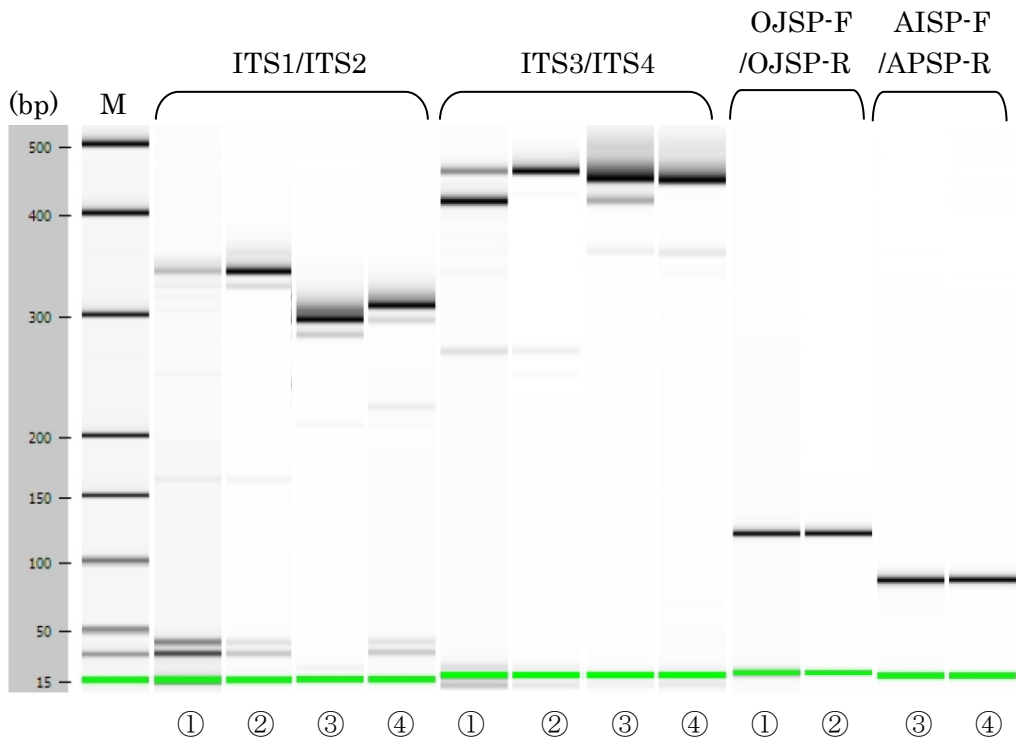
表 3 野生キノコの有毒成分検査結果

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

(6)調理加工品への適用

○遺伝子検査

いずれの調理加工品においてもユニバーサルプライマーによる PCR 産物が確認でき、かつ、種特異的プライマーによる PCR 産物が確認できた (図 2)。このことから、本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 2 調理加工品の遺伝子検査結果

○有毒成分検査

未調理品および調理加工品のキノコ部位を試料として検査を行った。結果は表4のとおり。すべての有毒成分の検出濃度が未調理品より調理加工品（キノコ部位）の方が低かったことから、有毒成分が調理により全体へ拡散したと推定された。そのため、炒め物についてはキノコ以外の具材、汁物については煮汁を試料として検査した結果、どちらからも有毒成分が検出された。このことから、有毒成分が調理により全体へ拡散するため、調理加工品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された。

表4 調理加工品の有毒成分検査結果 (μg/g)

		ツキヨタケ	イボテングタケ	
有毒成分		イルジン S	イボテン酸	ムシモール
未調理品		384	236	31.7
炒め物	キノコ部位	159	106	10.7
	その他の具材	72.6	46.7	5.90
汁物	キノコ部位	68.8	43.5	4.10
	煮汁	55.0	43.3	3.86

(7)吐物への適用

○遺伝子検査

ツキヨタケの炒め物を用いた模擬吐物について検査した結果、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 産物が確認でき、かつ、種特異的プライマーによる PCR 産物が確認できた (図3)。ITS1/ITS2 による PCR 産物においては反応時間が長くなるにつれバンドが薄くなる傾向が見られ、胃液による DNA の断片化が起こったと予想されるが、種特異的プライマーによる PCR 産物は 100bp 程度と短いため胃液の影響を受けなかったと考えられる。このことから、本法により吐物についても検査可能であることが示された。

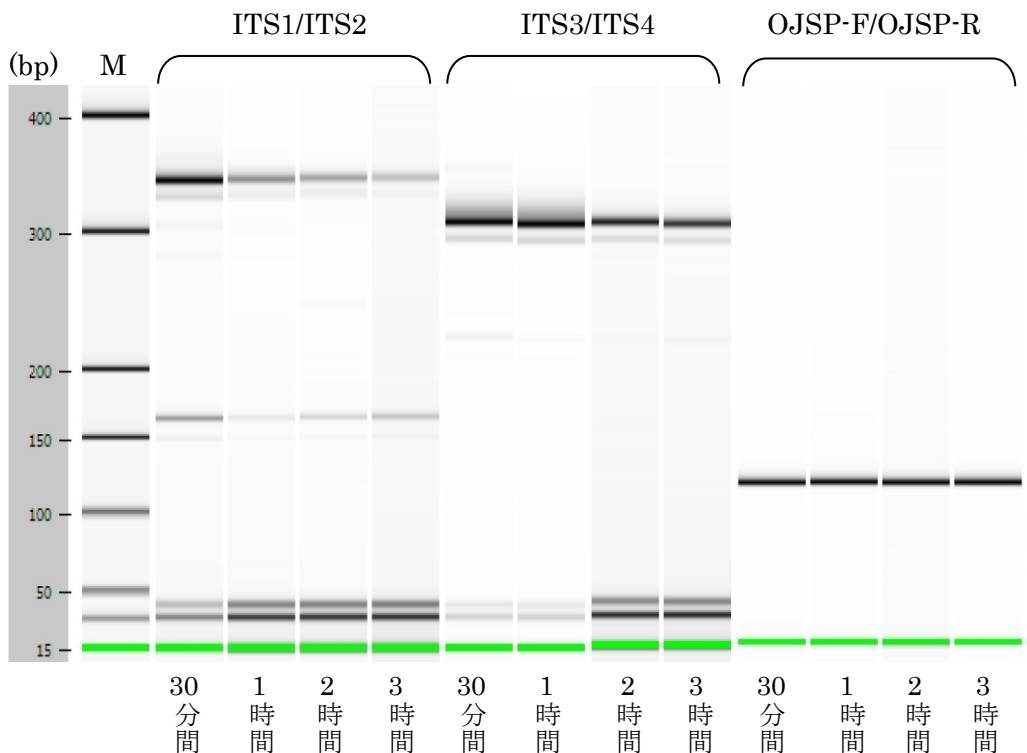


図3 模擬吐物の遺伝子検査結果

○有毒成分検査

結果は図4のとおり。全ての有毒成分が検出されたが、反応時間が長くなるにつれて検出濃度の低下傾向がみられた。この原因として、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ため、他の有毒成分についても標準液と人工胃液を混合反応させて反応時間と検出濃度の関係を調査した。結果は図5のとおり。多くの有毒成分が人工胃液により分解される傾向があり、特にイルジンSやファロイジンは影響が大きいことが分かった。胃液により有毒成分が分解されて検出濃度が低くなることが予想されるため、早期の検査が重要であると考えられる。

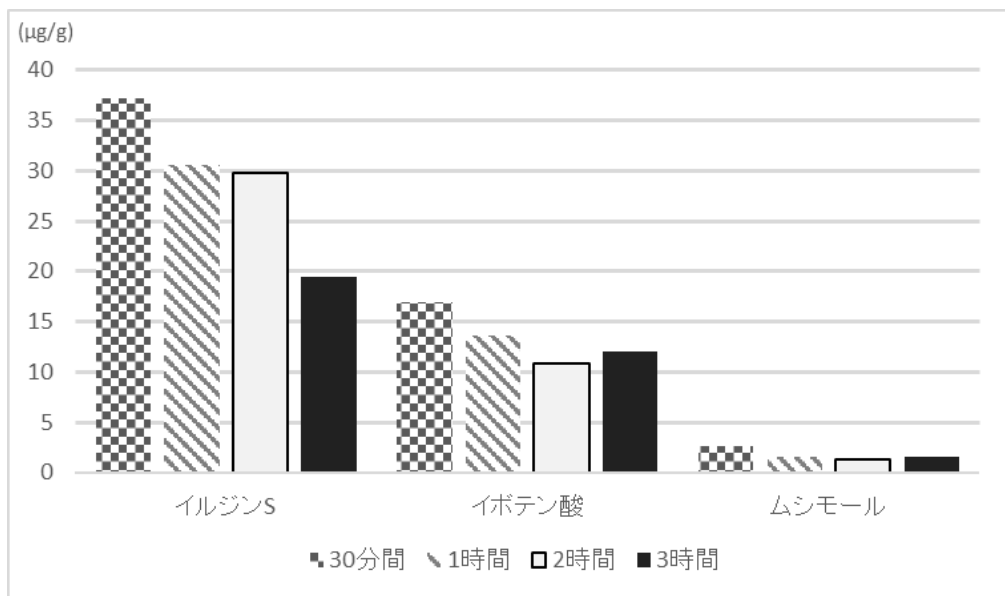


図4 模擬吐物の有毒成分検査結果

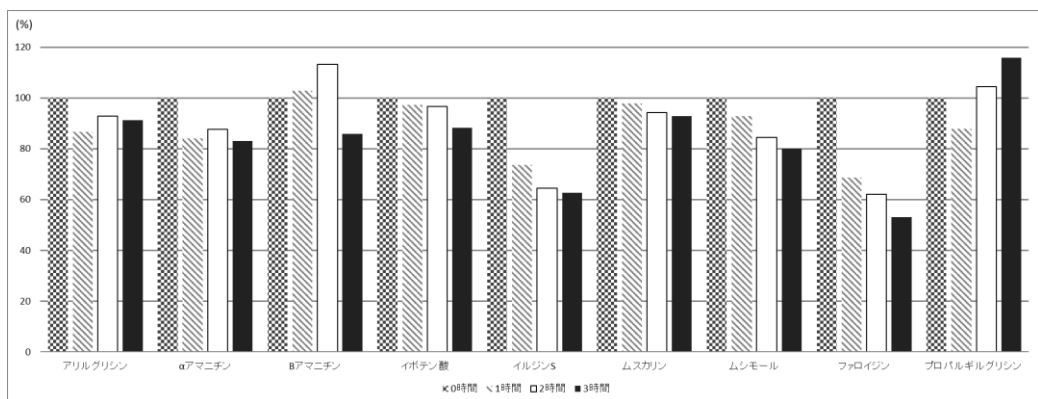


図5 胃液が有毒成分に与える影響調査結果

4. まとめ

8種の食中毒の原因となりやすい毒キノコを同定できる種特異的プライマーについて実物を用いて検証したが、文献では他にクサウラベニタケ、ドクササコおよびオ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おり、これらを併せて合計11種の毒キノコを同定できる遺伝子検査法を確立した。また、9種の毒キノコ由来の有毒成分の一斉分析法を確立した。両検査法は調理加工品および吐物に対しても有効であると考えられ、従来の専門家による形態学的観察のみでは対応困難な事例についても原因を推定できる検査体制を構築できた。

実現した、 または期待 される成果	1. 県民生活や産業社会への波及効果 ・調理加工品や吐物のような形態学的観察による鑑定が不可能な状態でも迅速に検査でき、原因を推定することで患者の治療に貢献できるようになった。		
	2. 業務遂行のレベルアップへの寄与等 ・これまで原則的に対応していなかった毒キノコによる食中毒の検査対応が可能となった。		
外部（県民等）への効果的な発信実績（予定可）	題名	発信媒体、方法等	発信年月
	(1)毒キノコによる食中毒の検査体制の構築	第 55 回全国衛生化学技術協議会 年会	H30.11.29-30
	(2)同上	福井県衛環研センター年報第 17 卷(2018)	R1.11
	(3)同上	福井県衛環研センター年報第 18 卷(2019)	R2.12
	(4)同上	福井県衛環研センター年報第 19 卷(2020)（予定）	R3.11（予定）
	(5)同上	第 54 回北陸信越薬剤師学術大会	R3.11.6-7（予定）
備 考			