

【H30-R2調査研究】 R2終了報告

毒キノコによる食中毒の検査体制の構築

福井県衛生環境研究センター 保健衛生部
野田拓史

毒キノコによる食中毒発生状況(福井県)

発生年月日	発生場所	推定原因食品	原因施設	摂食者数	患者数	死者数
R1.11.13	勝山市	ツキヨタケ	家庭	4	3	0
R1.10.27	越前市	ツキヨタケ	家庭	3	3	0
H26.10.26	坂井市	ツキヨタケ	家庭	2	2	0
H24.10.20	鯖江市	ツキヨタケ	家庭	1	1	0
H23.10.15	鯖江市	ツキヨタケ	家庭	1	1	0
H23.10.14	大野市	ツキヨタケ	家庭	3	2	0
H23.10.14	越前町	ツキヨタケ	家庭	6	6	0
H22.10.7	越前町	ニガクリタケ	家庭	1	1	0
H21.10.15	福井市	ツキヨタケ	家庭	7	7	0
H19.10.28	福井市	ツキヨタケ	家庭	3	2	0

(参照:福井県HP 福井県の食中毒発生状況)

研究目的

【食中毒発生時の対応】

患者からの聞き取り調査および専門家による残品の形態学的観察により、原因を推定。

【問題点】

残品が調理加工されて鑑定不能な状態となり、原因を推定できないケースが想定される。



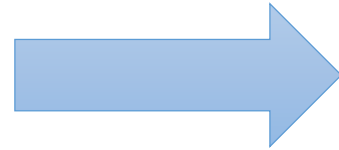
遺伝子

有毒成分

研究成果①

遺伝子検査法の確立

遺伝子検査法の概要



DNA



種に特異的な
領域を増幅

PCR



電気泳動

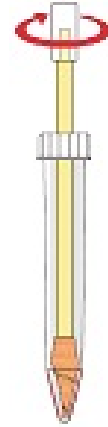
増幅の有無で
種を同定

遺伝子検査法

試料約0.2gに溶解液2ml加え、
軽く粉碎した後55°Cで10分間加温。

遠心分離し、上清をDNA溶液とする。

PCR、電気泳動。



【溶解液の調製】

Tris-HCl (pH8.0)	20mM
EDTA	5mM
NaCl	400mM
SDS	0.3%
Proteinase K	200 μ g/mL

【PCR反応液の調製】

2 × Ampdirect Plus	10 μ L
BIOTAQ HS DNA Polymerase (5U/ μ L)	0.1 μ L
F-Primer (10 μ M)	1 μ L
R-Primer (10 μ M)	1 μ L
DNA sample	0.5 μ L
Distilled water	7.4 μ L

【PCR条件】

95°C、10min	} 35cycles
94°C、30sec	
60°C、1min	
72°C、1min	
72°C、7min	

種特異的プライマー①

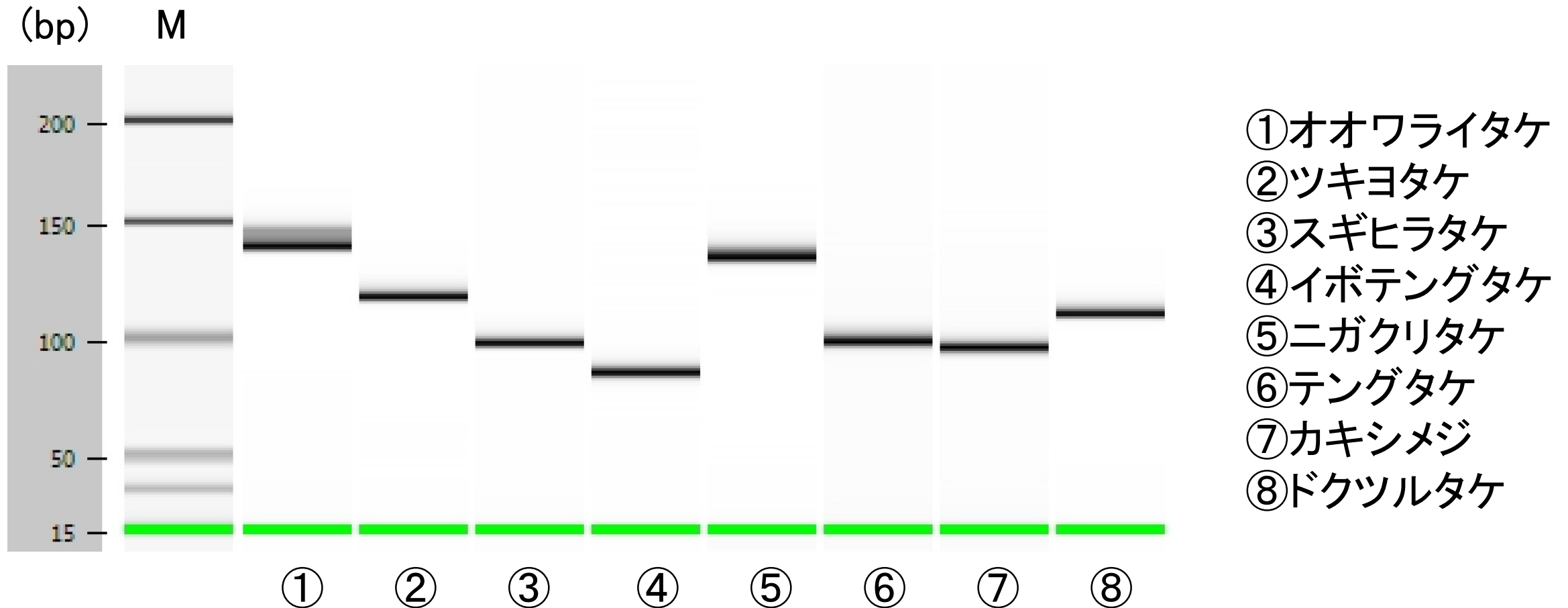
Targeted species	Name	Sequence(5' -3')	Amplicon size
ツキヨタケ	OJSP-F	GTGCACGTTTCCTTTCAAT	107bp
	OJSP-R	AGAATCATCAACAGAGCTGC	
カキシメジ	TUSP-F	TAGTAGGGACCTCTGTTGCCTT	80bp
	TUSP-R	AACCTCCAATTTAAAGCTGCTTCAC	
ニガクリタケ	28F	AAACCTGGCTTGGTTGATG	123bp
	27R	CCTCACAACCGAGTTTCCTC	
オオワライタケ	15F	TGCTTCTAATGGTCTGGATGTG	129bp
	14R	CAGACATCTAACGGCGTAGATA	

種特異的プライマー②

Targeted species	Name	Sequence(5' -3')	Amplicon size
ドクツルタケ	AVSP-F	GCTCTCCTTGAATGTATTAGTGG	103bp
	AVSP-R	GGTTAGACAGCAGAGAGAACTAAC	
スギヒラタケ	PPSP-F	GGCTTGGATGTGAGGATTG	90bp
	PPSP-R	CACACCAAAGACGGTCCT	
テングタケ	APSP-F	CACTGTCTCTTTCTCTTGCTTG	87bp
	APSP-R	CATAGACAACCTGAACAATGCC	
イボテングタケ	AISP-F	GCTTGTTTCTTCATTCTCTCC	71bp

*イボテングタケのリバープライマーにはAPSP-Rを使用

種特異的プライマーによるPCR産物



種特異的プライマー③

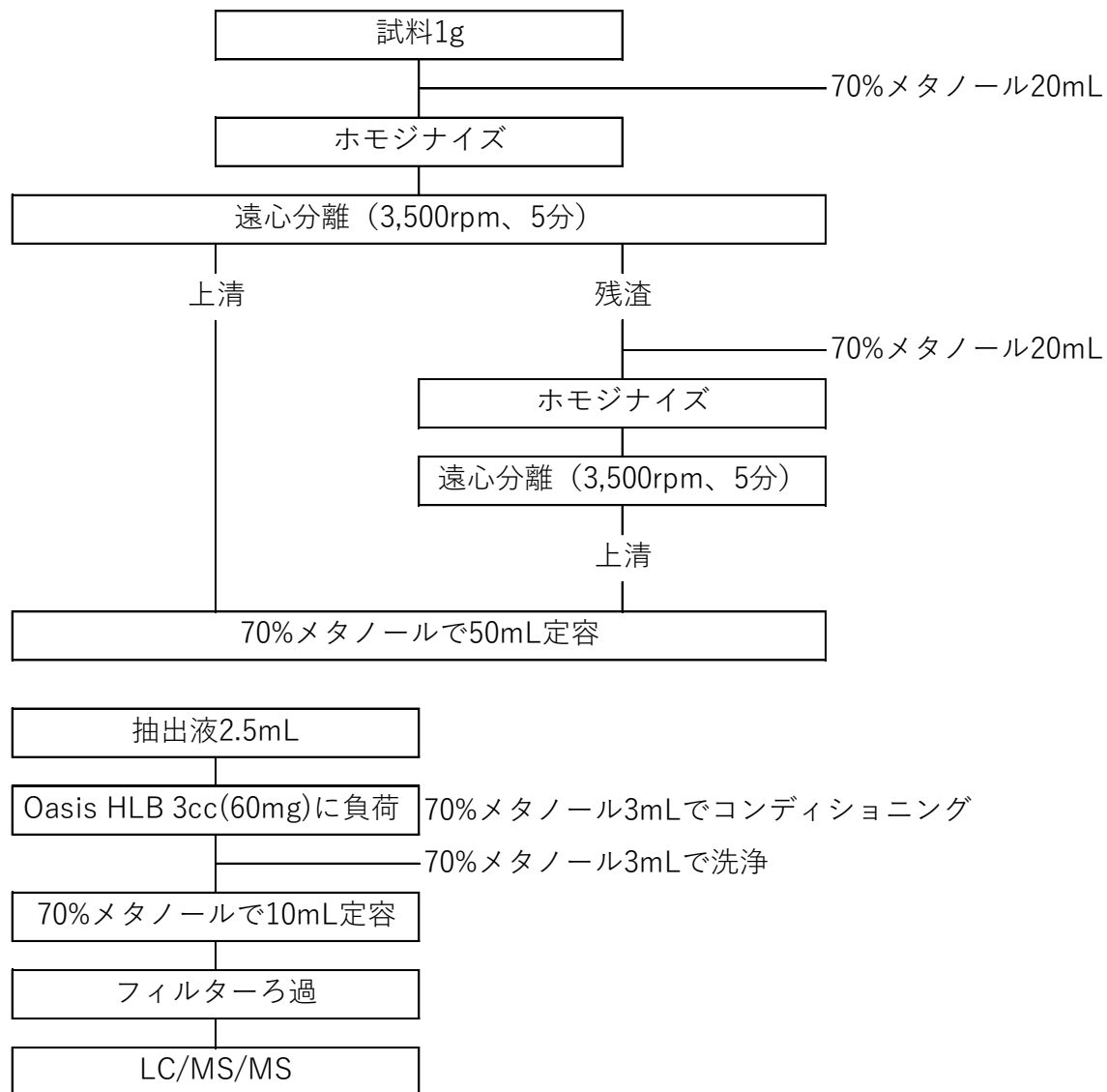
Targeted species	Name	Sequence(5' -3')	Amplicon size
クサウラベニタケ	ERSP-F	TTTGAGAACTGCTGTGAAAATC	110bp
	ERSP-R	GGCACAAAGTCCCTATATGTTTA	
ドクササコ	CASP-F	GGTGCACACCTGATAACCA	108bp
	CASP-R	AGCTTAAGCTTTCGCACCAG	
オオシロカラカサタケ	24F	TTGAGGGGTCTGAGAGAGTG	116bp
	18R	ATGGCCAGGTAGAAGAGAGC	

全11種の毒キノコを同定できる検査体制を構築！

研究成果②

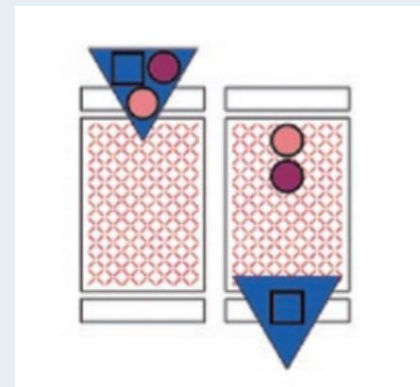
有毒成分検査法の確立

有毒成分検査法



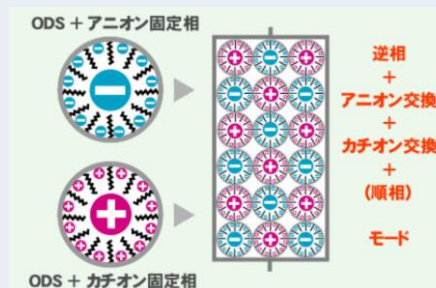
固相抽出

- 対象成分の物性が非常に異なるため通過型により精製
- 対象成分がすべて回収できる最適な固相カラムおよび溶媒を検討した結果、Oasis HLBに70%メタノールを通過させる方法に決定



分析カラム

- 対象成分の極性の幅が非常に広いため、一般的に使用されるODSカラム等では一斉分析が困難
- ODSにイオン交換基を導入したマルチモードカラムを採用し、すべての成分を一斉分析することに成功



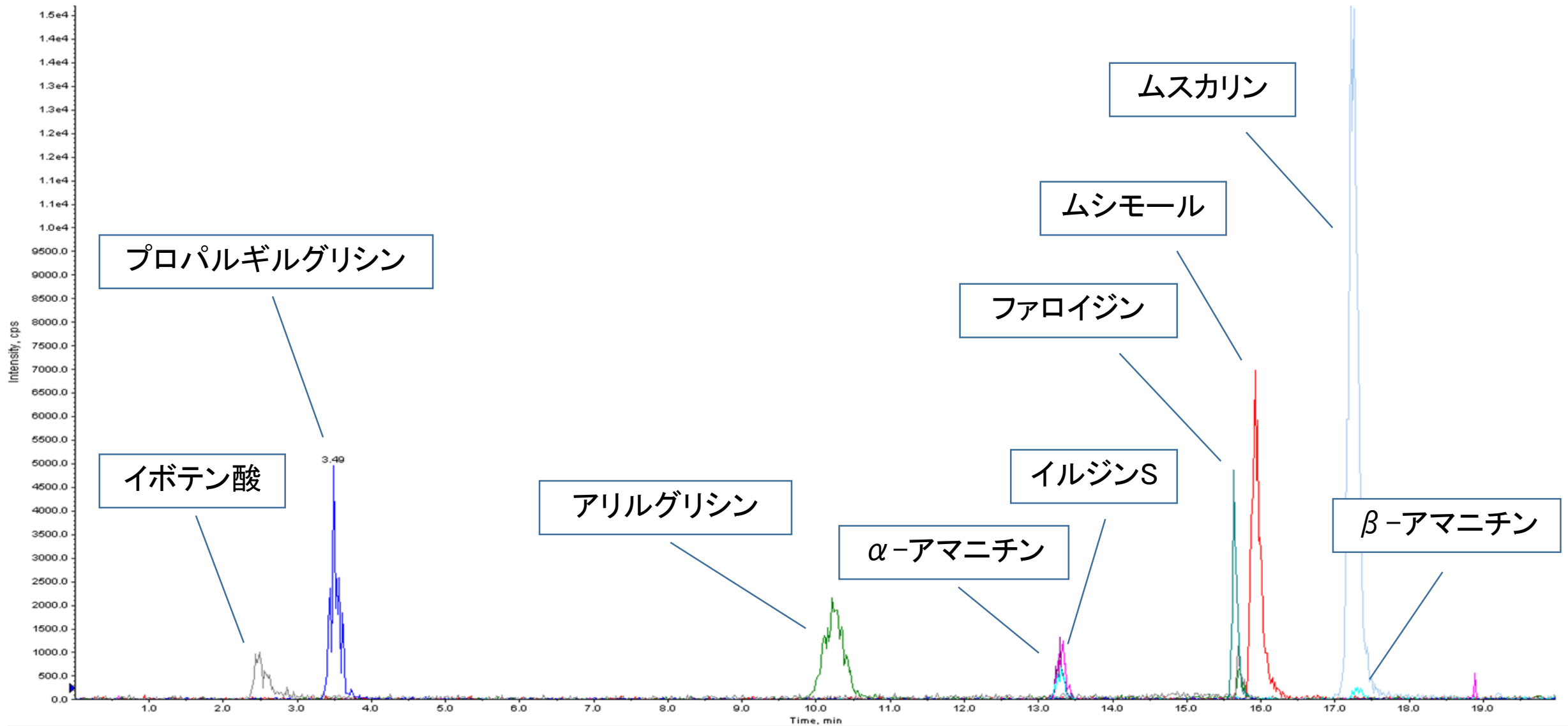
LC-MS/MSの測定条件

- 装置: Prominence 20A/3200Q TRAP (島津製作所/Sciex)
- 分析カラム: Scherzo SS-C18 (Imtakt) 粒子径3 μ m、2.0mmi.d. \times 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
- グラジエント条件: B液 0% (0 \rightarrow 6min) \rightarrow 100% (20min) \rightarrow 0% (20 \rightarrow 30min)
- 流速: 0.2 mL/min
- カラム温度: 40 $^{\circ}$ C
- 注入量: 10 μ L
- 測定モード: MRM測定
- イオン化: 別表のとおり

ESI(+)	イルジンS	α -アマニチン	β -アマニチン	ファロイジン
分子量	264	919	920	789
定量イオン(m/Z)	265 > 128	919 > 86	920 > 86	789 > 86
確認イオン(m/Z)	265 > 115	919 > 339	920 > 902	789 > 157

ESI(+)	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
分子量	174	158	114	115	113
定量イオン(m/Z)	174 > 57	159 > 113	115 > 98	116 > 70	114 > 68
確認イオン(m/Z)	174 > 115	159 > 159	115 > 68	116 > 116	114 > 74

MRMクロマトグラム



妥当性評価

「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」に準じた。
(平成19年11月15日付け食安発第115001号)

- 添加試料：シイタケ
- 添加濃度：5 μ g/g試料
- 検査者1名が1日2併行、5日間繰り返し測定



目標

- 真度 (70-120%)
- 併行精度 (10%未満)
- 室内精度 (15%未満)

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

野生キノコの有毒成分調査

福井県内で自然採取したキノコ43検体のうち8検体から有毒成分を検出した。

キノコ種	採取年月日	採取場所	検出した毒成分
ツキヨタケ	2017.10.10	福井市	イルジンS(41 μ g/g)
ツキヨタケ	2018.10.14	越前町	イルジンS(347 μ g/g)
ツキヨタケ	2020.11.7	越前市	イルジンS(373 μ g/g)
ドクツルタケ	2017.10.26	南越前町	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	2018.9.27	福井市	イボテン酸(441 μ g/g)、ムシモール(182 μ g/g)
テングタケ	2019.10.26	越前町	イボテン酸(444 μ g/g)、ムシモール(42 μ g/g)
イボテングタケ	2018.9.27	福井市	イボテン酸(435 μ g/g)、ムシモール(26 μ g/g)
イボテングタケ	2019.10.27	福井市	イボテン酸(176 μ g/g)、ムシモール(19 μ g/g)

研究成果③

調理加工品への適用

調理加工品の作製

ツキヨタケおよびイボテングタケをそれぞれ用いて調理した。

○炒め物

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。

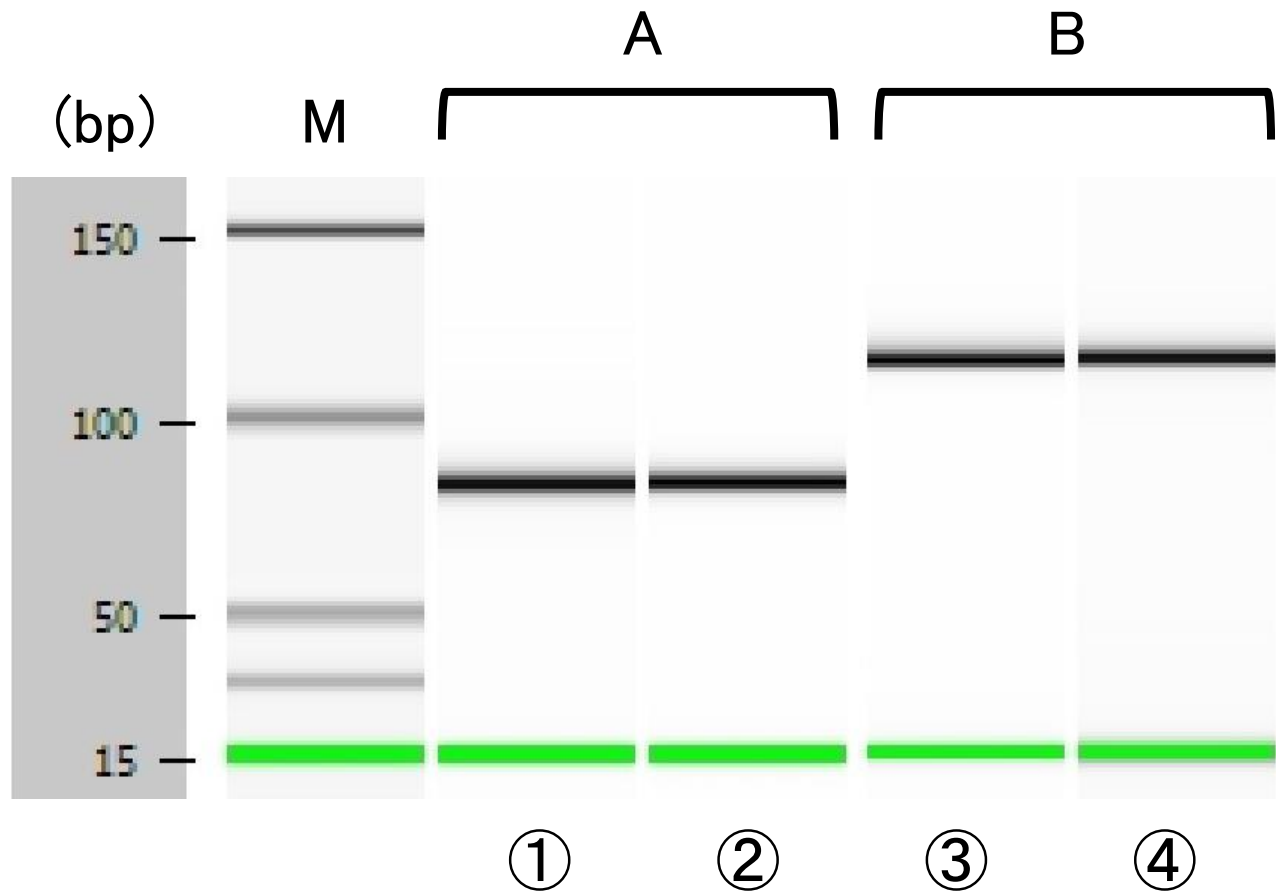


○汁物

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。



遺伝子検査結果



A: AISP-F/APSP-R

B: OJSP-F/OJSP-R

①: イボテングタケの炒め物

②: イボテングタケの汁物

③: ツキヨタケの炒め物

④: ツキヨタケの汁物

調理加工品でも検査が可能！

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	384.0 μ g/g	236.4 μ g/g	31.7 μ g/g
炒め物(キノコ部位)	159.2 μ g/g	105.6 μ g/g	10.7 μ g/g
汁物(キノコ部位)	68.8 μ g/g	43.5 μ g/g	4.1 μ g/g
炒め物(ピーマン)	72.6 μ g/g	46.7 μ g/g	5.9 μ g/g
汁物(煮汁)	55.0 μ g/g	43.3 μ g/g	3.9 μ g/g

調理によりキノコに含まれていた
有毒成分が他の部分へ拡散した



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ある

研究成果④

吐物への適用

模擬吐物の作製

○人工胃液の作製

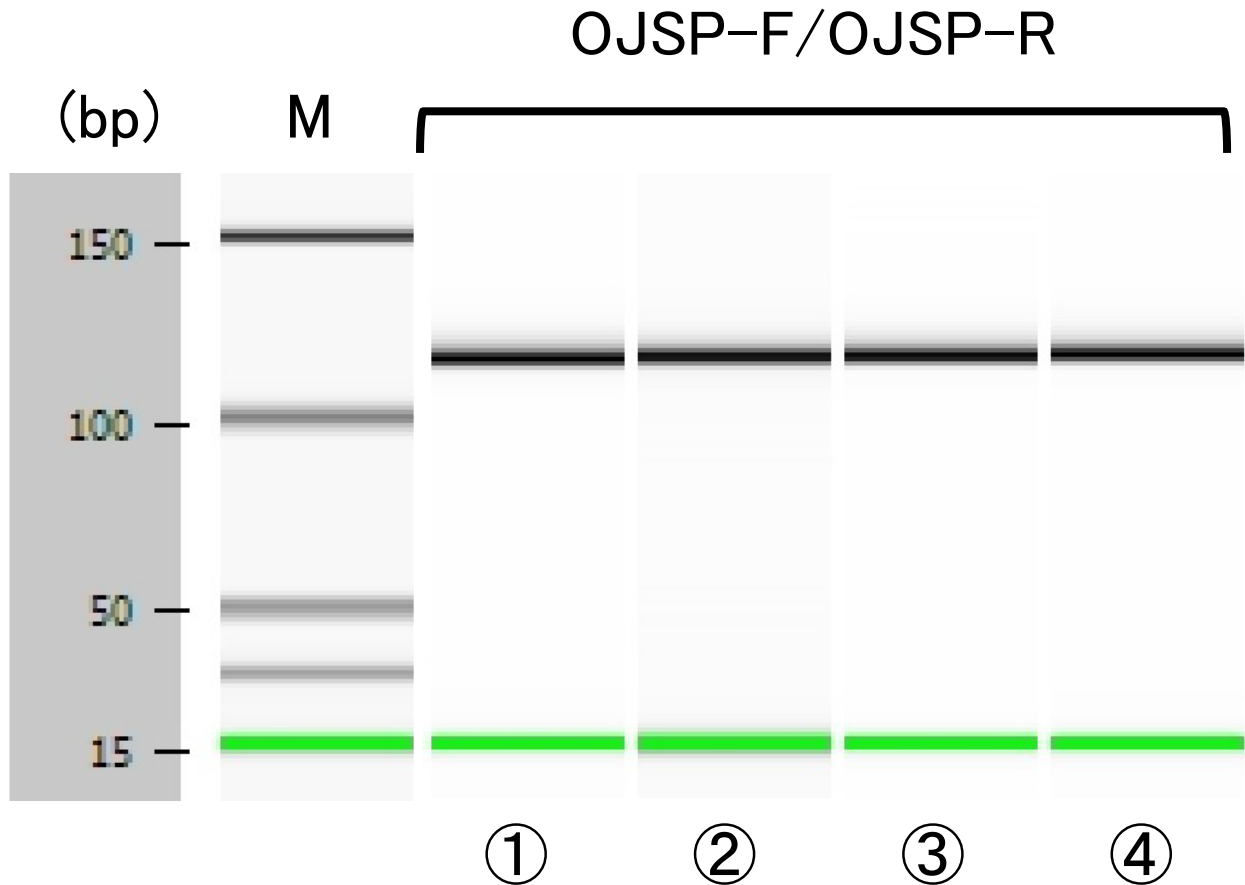
日本薬局方 溶出試験法に記載の第1液にペプシン(消化酵素)を加えて作製した。

○模擬吐物の作製

ツキヨタケおよびイボテングタケの炒め物を37°Cの人工胃液中で反応させ、炭酸ナトリウム水溶液で中和して反応を停止させた。

反応時間を30分間、1時間、2時間および3時間に振って比較した。

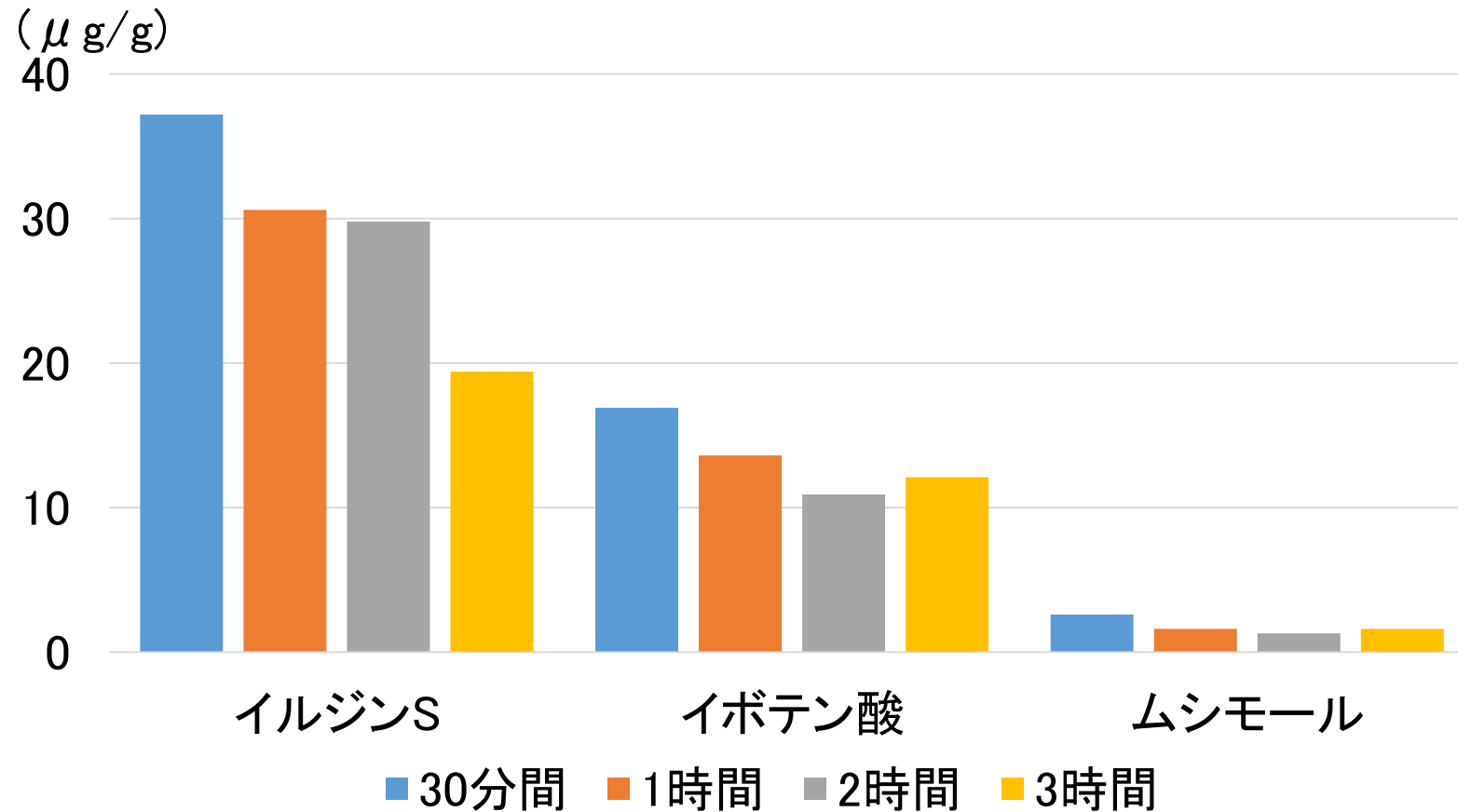
遺伝子検査結果



- ①: 30分間
- ②: 1時間
- ③: 2時間
- ④: 3時間

吐物でも検査が可能！

有毒成分検査結果

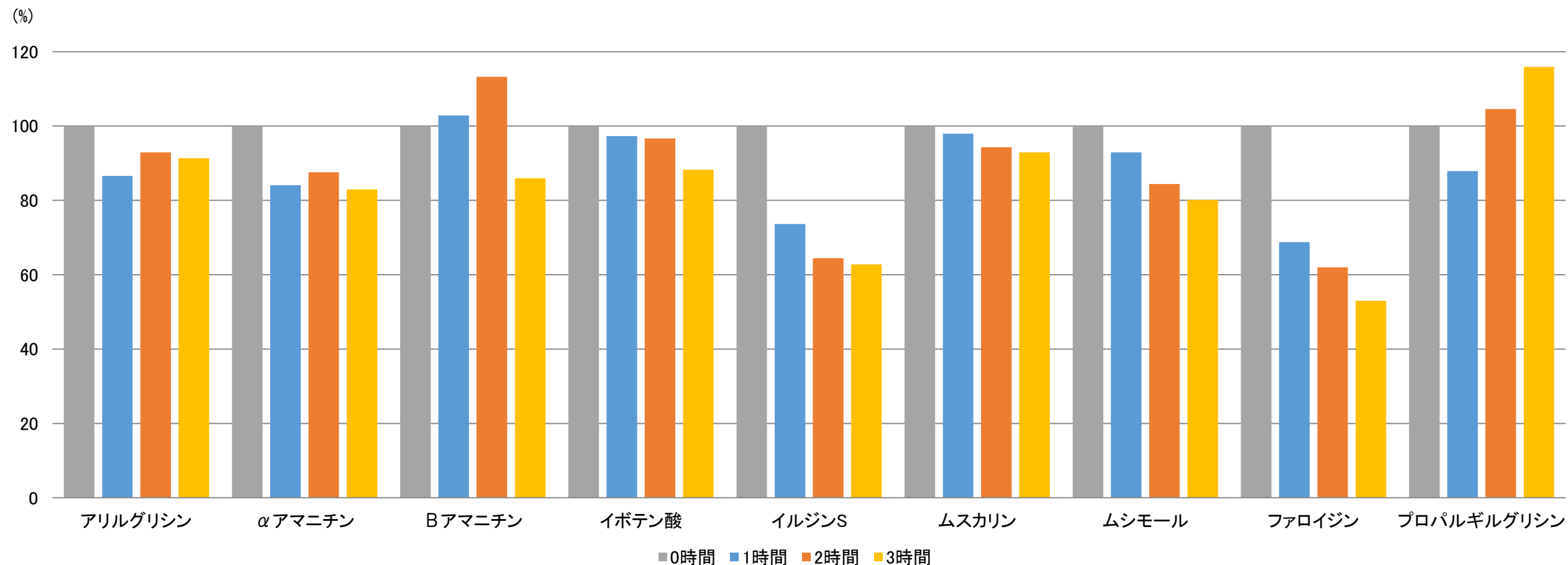


反応時間が長くなるほど
有毒成分が減少傾向



胃液により有毒成分が分解された？

胃液が有毒成分に与える影響



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が低くなることが示唆された

研究のまとめ

- 食中毒の原因となる主な毒キノコ11種を同定できる遺伝子検査法を確立した。
- 毒キノコに含まれる9つの有毒成分検査法を確立した。
- 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。



- 従来 of 専門家による形態学的観察では対応困難な検体でも原因を推定できる検査体制を構築した。

対応事例

- 令和元年に2件の食中毒が発生し検査対応を行った。
- 搬入された検体は未調理品および調理加工品（炒め物、グラタン）
- 遺伝子検査によりツキヨタケと同定した。
- 後日、有毒成分検査を行いすべての検体からイルジンSが検出された。

