

毒キノコによる食中毒の検査体制の構築（第2報）

野田拓史

Development of Method for Food Poisoning Causing Toxic Mushrooms (2)

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。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。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ことが想定される。

そこで、食中毒発生時に観察による鑑別が困難な検体でも迅速かつ高精度に鑑別可能な方法として、遺伝子検査法および毒キノコに含まれる有毒成分の検査法について検討した。遺伝子検査法はツキヨタケ (*O. japonicus*) およびカキシメジ (*T. ustale*) を、有毒成分検査法はツキヨタケに含まれる有毒成分(イルジンS)を対象とした。さらに、両検査法を用いて令和元年度に福井県内で発生した毒キノコを原因とする食中毒の検体について分析を行ったので報告する。

2. 実験方法

2. 1 試料

市販のシイタケ、エリンギ、エノキ、シメジ、福井県内で自然採取したツキヨタケ、カキシメジ、ドクベニタケ、ヘビキノコモドキを用いた。これらを細断し、使用するまで-20℃以下で冷凍保存した。なお、自然採取したキノコは、専門家の形態学的観察により同定されたものである。

2. 2 遺伝子検査法

2. 2. 1 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。また、プライマーは既報²⁾を参考にThermo Fisher ScientificにてオリゴDNA受託合成したものを使用した(表1)。

2. 2. 2 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)ニッピ、遠心分離機：Microfuse 22R (BECKMAN COULTER)、超微量分光光度計：NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific)、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)

表1 使用したプライマー

Targeted species	Name	Length(bp)	Sequence(5'-3')
Universal	ITS1	19	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS2	20	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
	ITS3	20	GCATCGATGAAGAACCAGC
	ITS4	20	TCCTCCGCTTATTGATATGC
<i>O. japonicus</i>	OJSP-F	19	GTGCACGTTTCCTTCAAT
	OJSP-R	20	AGAATCATCAACAGAGCTGC
<i>T. ustale</i>	TUSP-F	22	TAGTAGGGACCTCTGTTGCCTT
	TUSP-R	25	AACCTCCAATTAAAGCTGCTTAC

2. 2. 3 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砕した後、55℃で1時間加温した。その後、遠心分離(3000×g、5分間)し、上清をDNA抽出液とした。得られたDNA抽出液中のDNA濃度を超微量分光光度計を用いて測定した。DNA濃度を滅菌蒸留水で40ng/µLに調整し、PCR反応に用いた。

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 0.5unit、各プライマー0.5µM、DNA抽出液0.5µL、滅菌蒸留水7.4µL)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。

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 イルジンS検査法

2. 3. 1 試薬等

イルジンS標準液：林純薬工業(株)製のものを使用した。検量線用標準液：1000µg/mL標準液をメタノールで適宜希釈し、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2µg/mLとしたものを検量線用標準液とした。

使用溶媒等：メタノール、超純水およびギ酸は富士フィルム和光純薬(株)製、または関東化学(株)製の液体クロマトグラフ用、LC/MS用または残留農薬分析用を使用した。

2. 3. 2 機材等

ホモジナイザー：LK-22(ヤマト科学(株))、ろ紙：5A、90mm(アドバンテック東洋(株))、遠心分離機：5400(株)久保田製作所、エバポレーター：R-124(柴田科学(株))、固相カラム：Oasis HLB 6cc、500mg(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. 3 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 (株式会社島津製作所/AB Sciex)、カラム：TSKgel ODS-100V 粒子径 5 μ m、2.0mm i.d.×150mm (東ソー(株))、移動相：0.1%ギ酸水溶液：0.1%ギ酸含有メタノール=7：3、流速：0.2mL/min、カラム温度：40℃、注入量：5 μ L、イオン化：ESI Positive (+)、定量イオン：265>128、確認イオン：265>115。

上記条件で、検量線用標準液および検液を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積からイルジン S を定量した (絶対検量線法)。

2. 3. 4 試験法

図 1 に従い操作した。

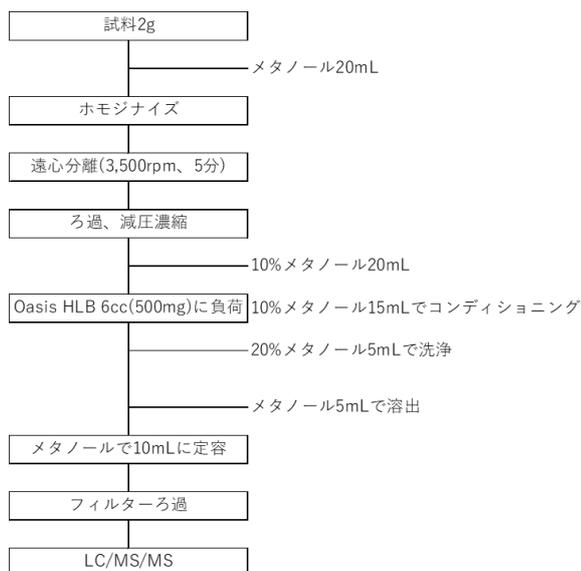


図 1 イルジン S 検査法

2. 3. 5 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、予めイルジン S 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 0.25 μ g/g および 10 μ g/g となるよう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。

3. 結果および考察

3. 1 遺伝子検査法の検討

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、キノコの種類・同定にも広く活用されている³⁾。この ITS 領域内に存在する種特異的領域の増幅の有無により種を同定する方法を検討した。

キノコには糖脂質や多糖類などが含まれており、これらの物質は PCR 反応を強く阻害することが知られている⁴⁾。そのような夾雑物を除去するため、市販の DNA 抽出キットである Genomic-Tip20/G や DNeasy Plant Mini Kit を用いた方法を前年度検討した⁵⁾。この方法では精製度の高い DNA 抽出液が得られる一方、操作が煩雑であり前処理に多くの時間がかかる。食中毒発生時にはより迅速に結果が得られることが望ましいと考え、DNA 抽出キットを用いない簡単な DNA 抽出でも PCR できる方法を検討した。そこで、PCR 反応液中に残存した夾雑物による PCR 阻害作用を抑制することのできる PCR 試薬である Ampdirect Plus を用いることとした。Ampdirect Plus は血液からのダイレクト PCR や粗精製 DNA 試料からの安定した PCR を可能にすることが知られている⁶⁾。

構築した方法でツキヨタケを特異的に同定できるか検証した。試料は自然採取したツキヨタケならびに市販のエリンギ、エノキおよびシメジを用いた。内部コントロールとしてユニバーサルプライマーの ITS1/ITS2 および ITS3/ITS4 ならびにツキヨタケ検出用プライマーの OJSP-F/OJSP-R それぞれで PCR、電気泳動し、増幅の有無を確認した。その結果、ITS1/ITS2 および ITS3/ITS4 では全ての試料から増幅が確認され、OJSP-F/OJSP-R ではツキヨタケのみ増幅が確認された (図 2)。

同様にカキシメジを特異的に同定できるか検証した。試料は自然採取したツキヨタケ、カキシメジ、ドクベニタケおよびヘビキノコモドキを用いた。内部コントロールとしてユニバーサルプライマーの ITS1/ITS2 および ITS3/ITS4 ならびにカキシメジ検出用プライマーの TUSP-F/TUSP-R それぞれで PCR、電気泳動し、増幅の有無を確認した。その結果、ITS1/ITS2 および ITS3/ITS4 では全ての試料から増幅が確認され、TUSP-F/TUSP-R ではカキシメジのみ増幅が確認された (図 3)。

これらの結果から、本法によりツキヨタケおよびカキシメジを特異的に同定できることが確認できた。また、市販の DNA 抽出キットを用いない簡単な DNA 抽出とすることで時間を短縮でき、迅速な検査が可能となった。

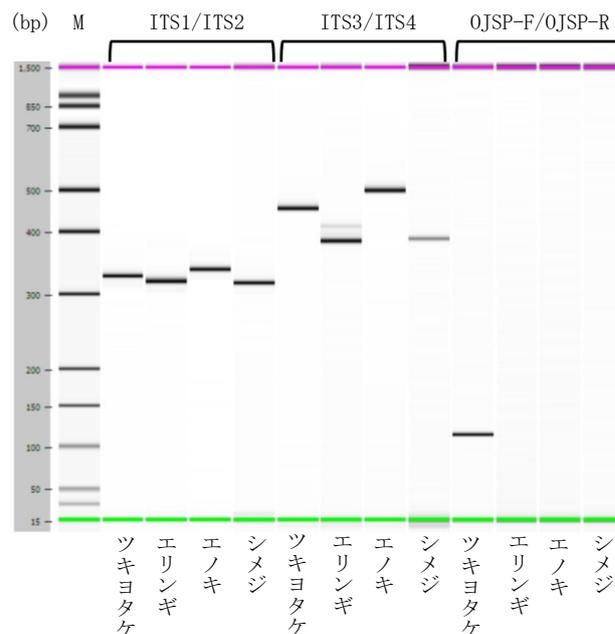


図 2 ツキヨタケの同定

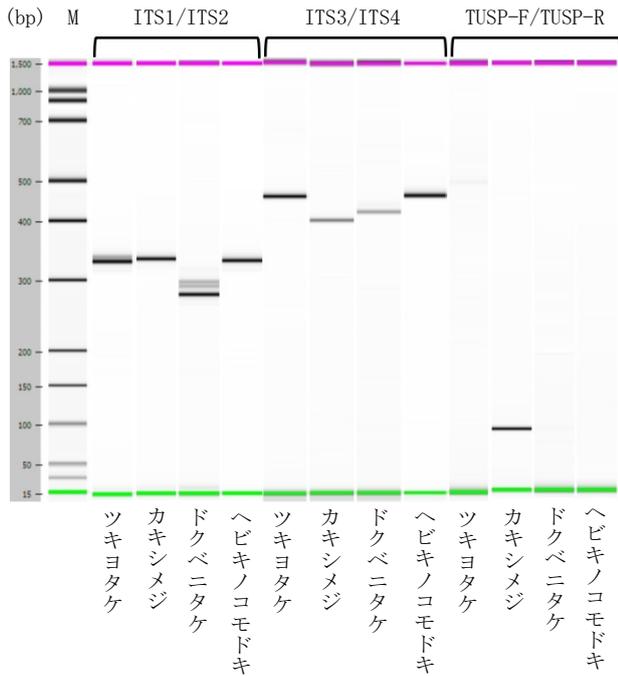


図3 カキシメジの同定

3. 2 イルジン S 試験法の検討

3. 2. 1 MS/MS 条件の検討

インターフェイスには極性化合物のイオン化に適した ESI を選択した。また、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。その結果、良好な感度が得られたポジティブモードを選択した。プロトンが付加した分子をプレカーサーイオンとし、これにエネルギーを与えて衝突解離し生成したプロダクトイオンをモニターした。その際 m/z 265→115、128 の特徴的なフラグメントイオンが認められたので、感度が強く得られたプロダクトイオン (m/z 128) を定量用に、もう一方のプロダクトイオン (m/z 115) を確認用とした。

3. 2. 2 LC 条件の検討

笠原らの方法⁷⁾を参考にカラムについては ODS 系カラムとして TSKgel ODS-100V 粒子径 5 μ m、2.0mm i.d.×150mm (東ソー(株))を使用することとし、移動相については 0.1%ギ酸水溶液 - 0.1%ギ酸含有メタノール (7 : 3) のアイソクラティックとした。

3. 2. 3 検量線

0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 μ g/mL の検量線用標準液を用いて検量線を作成し、直線性を調べたところ相関係数が 1.000 であり良好であった。

3. 2. 4 前処理の検討

笠原らの方法に準拠し、シイタケを用いて添加回収試験を行ったところ回収率が 70%を下回ったため、原因を調べたところ、マトリックスによるイオン化阻害の影響が大きかった。笠原らの方法では試料 5g を前処理し最終検液を 1mL とするが、最終検液中のマトリックス濃度を下げるため試料 2g を前処理し最終検液を 10mL とする方法に変更し、再度添加回収試験を行ったところ、回収

率は良好となった。

3. 2. 5 試験法の妥当性評価

0.25 μ g/g 添加の結果は真度 88.9%、併行精度 8.6%、室内精度 10.5%、10 μ g/g 添加の結果は真度 87.1%、併行精度 2.5%、室内精度 2.6%となり、いずれもガイドラインの目標値を満たした。

3. 3 食中毒検体の検査

3. 3. 1 食中毒事例 1

令和元年 10 月 27 日に越前市内の山中で採取したキノコを自宅に持ち帰り、同日の昼食に炒め物に調理して家族 3 名で喫食した。喫食した 3 名が嘔吐等の症状を呈した。検体として、水洗しスライスしたキノコ (検体 1) および調理残品である炒め物 (検体 2) が搬入された。

検体 1 および 2 について遺伝子検査を実施した結果、どちらからも OJSP-F/OJSP-R プライマーにより増幅が確認でき、ツキヨタケと同定した (図 4)。また、同検体についてイルジン S 検査を実施した結果、試料中濃度として検体 1 からは 120.1 μ g/g、検体 2 からは 44.2 μ g/g のイルジン S が検出された。

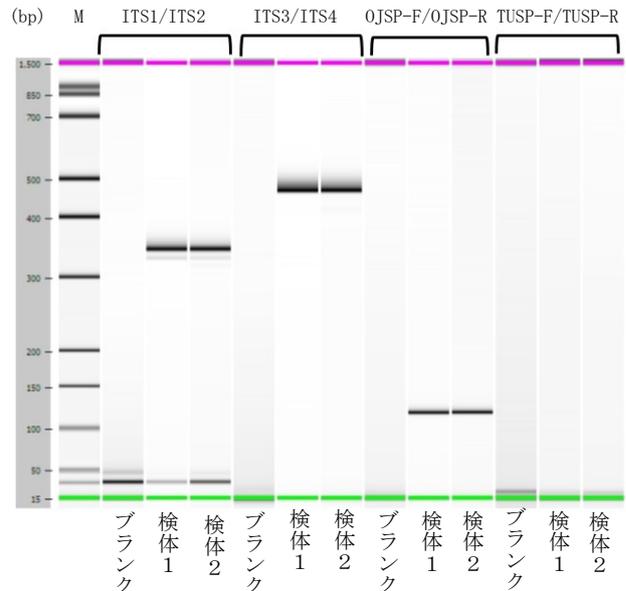


図4 検体 1 および 2 の遺伝子検査結果

3. 3. 2 食中毒事例 2

令和元年 11 月 13 日に大野市内の山中で親族が採取したキノコを譲り受け、同日の夕食にグラタンに調理して家族 4 名で喫食した。喫食した 4 名のうち、3 名が嘔吐等の症状を呈した。検体として、未処理のキノコ (検体 3)、調理残品であるグラタン (検体 4) および患者の吐物 (検体 5~10、表 2) が搬入された。

検体 3 および 4 について遺伝子検査を実施した結果、どちらからも OJSP-F/OJSP-R プライマーによる増幅が確認でき、ツキヨタケと同定した (図 5)。また同検体についてイルジン S 検査を実施した結果、試料中濃度として検体 3 からは 890.5 μ g/g、検体 4 からは 90.2 μ g/g のイルジン S が検出された。

吐物である検体 5~10 について遺伝子検査を実施した

結果、検体 5 および 6 からは OJSP-F/OJSP-R プライマーによる増幅が確認できたが、検体 7~10 からは増幅が確認できなかった(図 6)。また、同検体についてイルジン S 検査を実施した結果、検体 5 からは 0.7 $\mu\text{g/g}$ 、検体 6 からは 1.4 $\mu\text{g/g}$ のイルジン S が検出されたが、検体 7~10 は ND (0.25 $\mu\text{g/g}$ 未満) であった。

表 2 食中毒事例 2 の吐物検体

検体番号	患者	形態
検体 5	70 歳女性	主に固形物
検体 6	70 歳女性	主に固形物
検体 7	43 歳女性	緑色の液体
検体 8	43 歳女性	緑色の液体
検体 9	11 歳男性	黄色の液体。赤茶色の浮遊物。
検体 10	11 歳男性	黄色の液体

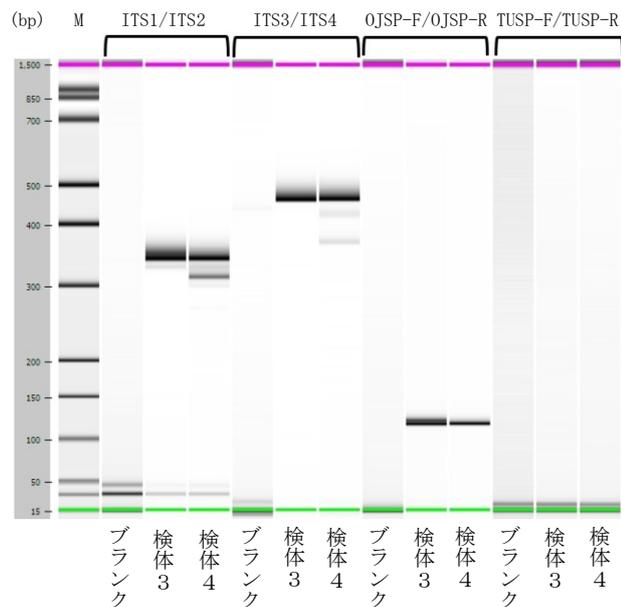


図 5 検体 3 および 4 の遺伝子検査結果

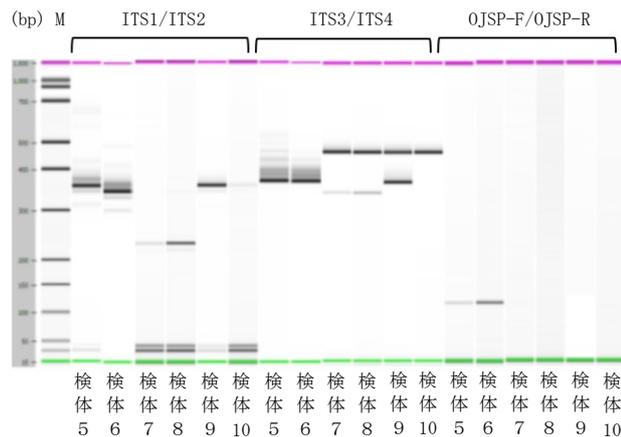


図 6 検体 5~10 の遺伝子検査結果

3. 3. 3 考察

これらの結果から遺伝子検査法およびイルジン S 検査法は調理加工品に応用できることが示唆された。また、ツキヨタケには数百 $\mu\text{g/g}$ 程度のイルジン S が含まれており、調理加工品では 10 倍程度濃度が下がるものの、本法の定

量限界は 0.25 $\mu\text{g/g}$ であり、調理加工品からもイルジン S を十分検出できることが分かった。

吐物の検査結果について、遺伝子検査およびイルジン S 検査ともに検体 7~10 では検出できなかった。これらの検体は主に液体であり、複数回嘔吐された後のものであったため検出できなかったと推測した。一方、検体 5 および 6 は主に固形物であり、嘔吐初期のものであったため検出できたと考えられた。このことから嘔吐初期の吐物であれば両検査ともに応用できる可能性が示唆された。

4. まとめ

遺伝子検査法について、Ampdirect Plus を用いた PCR とすることにより DNA 抽出を簡素化することができ、より操作が簡便で迅速な検査が可能となった。この方法でツキヨタケおよびカキシメジを特異的に同定できることを確認した。

有毒成分検査法として、LC/MS/MS によるイルジン S 検査法を構築した。妥当性評価の結果は良好であり、定量限界が 0.25 $\mu\text{g/g}$ であるのに対しツキヨタケに含まれるイルジン S は数百 $\mu\text{g/g}$ 程度であったことから十分な性能であると考えられた。

令和元年度に福井県で発生した食中毒検体を分析した結果、両検査法が調理加工品および嘔吐初期の吐物に応用できることが示唆された。

今後、遺伝子検査法についてはニガクリタケやスギヒラタケなどの別種の毒キノコを特異的に同定できるプライマーの検討、有毒成分検査法についてはテングタケに含まれる有毒成分であるイボテン酸やムシモールなどを同時に分析できる一斉分析法の検討を予定している。

謝辞

本調査を行うに当たり、野生キノコの採取および鑑別に協力いただきました福井きのこ会の方々には深謝いたします。

参考文献

- 1) 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)
- 2) Maeta, K. et al : DNA authentication of cooked mushrooms, Mushroom Science and Biotechnology, **16**(3),123-128(2008)
- 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) Hidaka, F. et al : Development of semi-direct polymerase chain reaction method for mushrooms, Mushroom Science and Biotechnology,**18**(1),13-16(2010)
- 5) 野田拓史：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年報,**17**,57-59(2019)
- 6) Alshahni, M. et al : Direct colony PCR of several medically important fungi using Ampdirect Plus, Jpn. J. Infect. Dis.,**62**,164-167(2009)
- 7) 笠原義正 他：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**,62-64(2004)