

蓄積量は変化せず、4~8 時間後の値は 0.1 nmol TTX /mg protein 以下であった。

D. 考察

1) 文献等調査

日本や韓国など極東アジア以外のフグ食文化をもたない国においても、フグ食中毒が起きていることが調査により確認された。フグは毒魚として有名だが、その認識が乏しかったり、フグ自体を鑑別できないことがフグ食中毒の原因のようである。事件後は行政機関が市民に注意喚起を行っている。

わが国へのフグの輸入は厳しく制限されているので、商業的な海外からのフグのハザード侵入は現状の体制で確保されていると考えられる。これに対し、海流など自然によるフグの国内侵入については、ドクサバフグの例があるように、今後も起こりうる可能性が危惧される。とくに、温暖化あるいは環境の変化の影響のためか、日本沿岸のフグが高毒化していることも指摘されており、大型で筋肉も有毒なセンニンフグは、南太平洋、インド洋から地中海にも生息域を広げているので、日本沿岸での出現が懸念される。南方産フグの分布と毒性の実態調査が必要である。

巻貝キンシバイの海外における食中毒については、文献がなく最近の動向はわからなかった。これら小型巻貝に関しては商業的輸入や他の食用貝類に混入した意図しない移動の可能性が考えられるので、輸入時の鑑別が重要となる。また、近縁種の *Nassarius* 属の毒性が夏期に高いことが報告されていたので、わが国でも、これら肉食性小型巻貝類の毒性調査を行う必要がある。

2) 肝組織培養法によるハコフグ肝臓の TTX 蓄積

TTX で毒化するトラフグは、*in vitro* 培養実験において肝組織切片の TTX 蓄積量が培養時間に伴って増加したのに対し、ハコフグ肝組織

切片では顕著な TTX 蓄積量の増加はみられなかった。

分担者らが、一般魚のアイナメ、イシダイ、ウマヅラハギ、カワハギの肝組織切片を用いて同様の実験を行ったところ、これらの肝組織切片では、TTX の蓄積はみられなかったの、ハコフグ肝臓は一般魚と同様に TTX を蓄積する能力が低いか欠いているものと推測された。

E. 結論

国内侵入のおそれのある生物学的ハザードのリスク管理に資することを目的に、海外におけるフグおよび巻貝類の食中毒事例を調査した。その結果、世界中でフグ食中毒が発生していることがわかった。わが国では、フグの輸入に関して国内基準と同等の基準で規制しているので、輸入フグの安全性確保については現行の方法で対応可能と考えられる。問題は海流等によるフグの移動、国内侵入である。とくに、地中海やオーストラリアにおける中毒原因種となったセンニンフグはわが国沿岸でも出現しているので、センニンフグを含めた南方産フグ類については注意が必要である。

次年度に計画していたフグ毒蓄積能評価を一部先行して行い、*in vitro* 培養実験において、ハコフグ肝臓は TTX を蓄積する能力が低いと示唆された。このことから、本法はフグの TTX 蓄積能評価に有効で、今後、サバフグ類およびハリセンボン科フグでの検討が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Nagashima, T. Matsumoto, K. Kadoyama, S. Ishizaki, S. Taniyama, T. Takatani, O. Arakawa, M. Terayama: Tetrodotoxin poisoning due to smooth-backed blowfish *Lagocephalus inermis* and toxicity of *L. inermis* caught off the Kyushu coast, Japan. Food Hyg. Saf. Sci., 53 巻, 85-90 (2012).

- 2) H. Lin, Y. Nagashima, P. Jiang, X. Qin, Y. Lu, C. Zhang: Screening for toxicity and resistance to paralytic shellfish toxin of shore crabs inhabiting at Leizhou peninsula, China. *Mar. Environm. Res.*, 78 卷, 48-52 (2012).
 - 3) A. Murata, Y. Nagashima, S. Taguchi: N:P ratios controlling the growth of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*: Content and composition of paralytic shellfish poison. *Harm. Algae*, 20 卷, 11-18 (2012).
 - 4) 長島裕二：フグ類の体内におけるテトロドトキシンの動態に関する研究. 日本水産学会誌, 78 卷, 380-383 (2012).
 - 5) 長島裕二：自然毒（動物性自然毒）フグ毒. 小児科臨床, 65 卷, 1419-1426 (2012).
 - 6) 長島裕二：食品中の魚毒（フグ毒）による食中毒とその予防. 食品衛生研究. 63 卷 2 号, 21-30 (2013).
 - 4) 長島裕二：食品中の魚毒による食品中毒とその予防. 平成 24 年度厚生労働科学研究シンポジウム, 2012 年 11 月, 東京都中央区.
 - 5) 永井 慎, 長島裕二：高磁場測定によるトラフグ肝臓におけるテトロドトキシンの三次元分布可視化に関する研究. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月, 東京都港区.
 - 6) 太田 晶, 須賀恵美, 石崎松一郎, 土井啓行, 石橋敏章, 松本拓也, 長島裕二：肝組織切片培養法によるテトロドトキシン蓄積能の比較. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月, 東京都港区.
 - 7) 源川博久, 石崎松一郎, 長島裕二：オキナワフグ筋肉におけるフグ毒テトロドトキシンの分布と蓄積能. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月, 東京都港区.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 書籍

- 1) 長島裕二：フグ毒の体内動態. 「フグ研究とトラフグ生産技術の最前線」(長島裕二, 村田 修, 渡部終五 編) 水産学シリーズ 174, 恒星社厚生閣, 東京, 2012. p. 98-110.

3. 学会発表

- 1) Y. Nagashima: Seafood poisoning due to marine toxins. 日中食品安全国際シンポジウム 2012. 2012 年 4 月, 東京都港区.
- 2) 長島裕二, 須賀恵美, 藤本健太, 源川博久, 石崎松一郎: 蛍光検出による簡易フグ毒検査法の開発. 第 103 回日本食品衛生学会学術講演会, 2012 年 5 月, 東京都江戸川区.
- 3) 長島裕二：トラフグ体内におけるフグ毒の動態. 第 22 回西日本フク研究会 2012 年 6 月, 山口県下関市.

【資料】

表 1. 海外におけるフグ食中毒

国名、地名	年	件数	患者数 (死者数)	原因フグ種	備考
アメリカ合衆国	2002	10		ヨリトフグ <i>Sphoeroides</i> 属	毒成分は麻痺性貝毒。 文献 1)
イスラエル	2005 ～2007	3	13 (0)	センニンフグ <i>Lagocephalus scleratus</i>	文献 2)
オーストラリア	1996	1	3 (0)	Northwest blow fish (種不明) またはセンニンフグ <i>Lagocephalus scleratus</i>	文献 3)
オーストラリア	2001 ～2002	11			文献 4)
大韓民国	1991 ～2012	32	111 (30)		文献 5)
バングラデシュ	2001 ～2006		53 (8)		文献 6)
バングラデシュ	2008	3	63 (4)		文献 7)
フィリピン	1995 ～2004	2			文献 8)
ブラジル	1984 ～2009		27 (2)	<i>Colomesus asellus</i> 、バンドテールパuffers <i>Sphoeroides spenngleri</i>	文献 9)

文献

- 1) CIDRAP: FDA says pufferfish caught off Florida may contain neurotoxin.
<http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/fs/food-disease/news/pufferfish.html>. 2013年3月9日アクセス.
- 2) Bentur Y, Ashkar J, Lurie Y, Levy Y, Azzam ZS, Litmanovich M, Golik M, Gurevych B, Golani D, Eisenman A: Lessepsian migration and tetrodotoxin poisoning due to *Lagocephalus scleratus* in the eastern Mediterranean. *Toxicon*, 52, 964-968 (2008).
- 3) Ellis RM, Jelinek GA: Never eat an ugly fish: three cases of tetrodotoxin poisoning from Western Australia. *Emerg. Med.*, 9, 136-142 (1997).
- 4) Isbister GK, Son J, Ujima J, Smith B, Milder DG, Wang F, Maclean CJ, Lin CSY, Kieman MC, Balit CR: Puffer fish poisoning: a potentially life-threatening condition. *Med. J. Austral.*, 177, 650-653 (2002).
- 5) Kim JH, Gong QL, Mok JS, Min JK, Lee TS, Park JH: Characteristics of puffer fish outbreaks in Korea (1991-2002). *J. Food Hyg. Saf.*, 8, 133-138 (2003).

- 6) Chowdhury FR, Nazmal Ahasan HAM, Mamunur Rashid AKM, Al Mamun A, Khaliduzzaman SM: Tetrodotoxin poisoning: a clinical analysis, role of neostigmine and short-term outcome of 53 cases. Singapore Med. 48, 830-833 (2007).
- 7) Homaria N, Rahman M, Luby SP, Rahman M, Haider MS, Faruque LI, Khan D, Parveen S, Gurley ES: Multiple outbreaks of puffer fish intoxication in Bangladesh, 2008. Am. J. Trop. Med. Hyg., 83, 440-444 (2010).
- 8) Azanza MPV: Philippine foodborne-disease outbreaks (1995-2004). J. Food Saf., 26, 92-102 (2006).
- 9) Silva CCP, Zannin M, Rodrigues DS, dos Santos CR, Correa IA, Haddad Jr. V: Clinical and epidemiological study of 27 poisonings caused by ingesting puffer fish (Tetrodontidae) in the State of San Catarina and Bahia, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 52, 51-55 (2010).

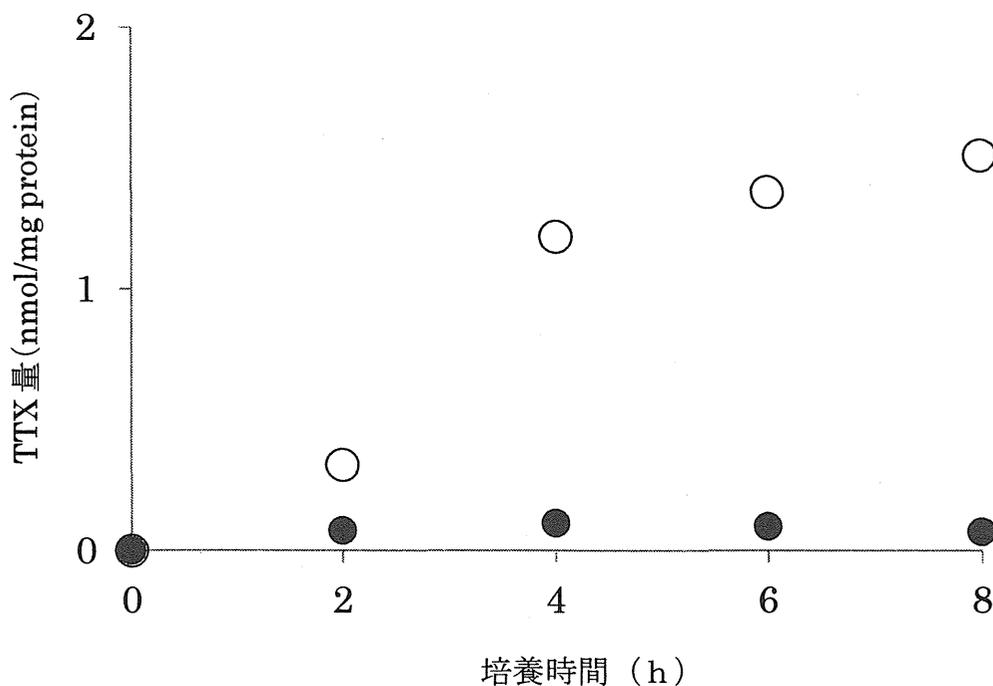


図 1. トラフグとハコフグの肝組織切片における TTX 蓄積
(○トラフグ、●ハコフグ)

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
「国内侵入のおそれがある生物学的ハザードのリスクに関する研究」
分担研究報告書

パリトキシン（PTX）様毒に関するリスク情報の集積

研究分担者 荒川 修 長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科
研究協力者 高谷智裕 長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科
谷山茂人 長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科
相良剛史 尚絅大学短期大学部食物栄養学科

研究要旨

本研究では、ハコフグ中毒原因物質として近年新たな問題となっているパリトキシン（PTX）様毒を対象に、共通の横紋筋融解症を発症するハフ病との関連解明を目指し、中国におけるハフ病の現地調査を実施するとともに、培養筋細胞の樹立を試み、それに対するPTXの作用を予備的に検討した。2010年の8～9月に中国江蘇省南京市を中心に発生したザリガニの喫食によるハフ病について、同省の人民医院、淡水水産研究所、水産卸売市場などを訪問して聞き取り調査を行った結果、中国、特に江蘇省周辺では、ザリガニは一般に広く消費されているが、今回のような中毒例はごく希で、原因食品ザリガニの毒化は、おそらく養殖用飼料に混入した毒物質に起因するものと推察された。一方、ラット大腿部骨格筋から結合組織を除去後、酵素処理・破碎したものにつき、上皮細胞増殖因子、インスリン様増殖因子などを添加したDF5（5%のウシ胎児血清を含むDMEM/F-12培養液）中で培養することにより、筋芽細胞、線維芽細胞、および筋管が混在する初代培養細胞を樹立することができた。このものをPTX（10 ng/ml）に曝露したところ、経時的な変形、萎縮、融解、細胞死が観察された。今後、この手法を発展させることで、横紋筋融解症を直接的に評価しうるアッセイ系の確立やPTX様毒の作用機序解明が期待できる。

A. 研究目的

近年、日本では、アオブダイ、ハタ科魚類、ハコフグなどの海産魚の喫食により、横紋筋融解症を主徴とする食中毒が頻発している。本中毒は、以前はアオブダイのみが引き起こす特殊な事例とされていたため、1997年、当時の厚生省は、生活衛生局乳肉衛生課長通知「アオブダイの取扱いについて」（衛乳第281号）によりアオブダイの販売や輸入の自粛措置をとった。しかしながら、2000年10月に高知県で高級魚“クエ”（後にクエ近縁のハタ科魚類とされた）により同様の集団食中毒が発生し、本件はアオブダイのみの問題ではなくなった。さ

らに、2001年11月から2008年10月にかけて、宮崎、長崎、三重の各県で、ハコフグ類の喫食により、横紋筋融解症を主徴とする食中毒がたてつづけに6件発生し、計10名が罹患、1名が死亡した。これらの中毒の原因物質は未だに化学構造が不明であるが、生化学的ないし薬理的性状がパリトキシン（PTX）に類似していることからPTX様毒と称されている。

一方、2010年8～9月、中国江蘇省において、横紋筋融解症を主徴とする食中毒が発生した。その原因食材として淡水産のザリガニが疑われており、中国当局は本中毒を「ザリガニの喫食を原因とするハフ病」とした（Zhang *et al.*,

Intern. Med. 51, 487-489, 2012)。ハフ病は、1924年にバルト海沿岸のハフ・ビーチで初めて確認された特異な食中毒で、その後、スウェーデン、旧ソ連、北米、ブラジルでも報告されている。特定の魚類喫食後、24時間以内に横紋筋融解症を発症するが、原因物質は不明である。

本研究では、このハフ病と本邦で発生しているアオブダイ／ハコフグ中毒との関連解明を目指し、食中毒発生から日の浅い中国江蘇省南京市にて、現地の専門家らの協力を仰ぎながら、発生状況や原因食品ザリガニの養殖、消費の状況などに関する現地調査を実施した。他方、ハフ病の原因物質ないし PTX 様毒など、横紋筋融解症誘起物質の特定、作用機序解明や高感度検出・定量法の開発を目指し、培養筋細胞の樹立を試みるとともに、これに対する PTX の作用について予備的に検討した。

B. 研究方法

1) 中国におけるハフ病の現地調査

2012年6月に、中国江蘇省人民医院 (Jiangsu Province Hospita) (図1)、同淡水水産研究所 (Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province) (図2)、南京惠民橋水産卸売市場 (図3)、ならびに迎賓菜市場を訪問し、2010年の8~9月にかけて中国江蘇省南京市を中心に発生した横紋筋融解症を主徴とする食中毒、あるいはその原因食材であるザリガニ (図4) について聞き取り調査を行った。

2) 培養筋細胞の樹立とそれに対する PTX の作用

8週齢の SPF ラットを CO₂ で安楽死させ、大腿部から骨格筋を採取して Hanks' balanced salt solution (HBSS (-)) 中で結合組織を除去したものを 5% のウシ胎児血清を含む DMEM/F-12 (Invitrogen) (以下 DF5) 中で一晩冷蔵保存した。次いで、当該保存筋 1~2 g 程度を 360 unit/ml の Collagenase II

(Lifetechnologies) および 25 unit/ml の DNase (Roche) を含む 5 ml の HBSS (-) に分取後、自動組織分散・破砕装置 gentleMACSTM Dissociator (Miltenyi Biotec) により 37°C で 30 分間振盪し、組織を破砕した。得られた懸濁液に 35 ml の HBSS (-) および 5 ml の DF5 を添加し、2 種類のナイロンメッシュ (ポアサイズ 100 μm および 40 μm) でろ過後、1,500 g で 10 分間遠心分離し、得られた沈澱部に 14 ml の DF5 を加えて再懸濁した。よく攪拌した懸濁液を 100 mm のシャーレに播き、CO₂ 濃度を 5% に保った CO₂ インキュベーター中、37°C で 3 時間培養し、上澄みを除いたものを 3 ml のバンバンカー (NIPPON Genetics) に懸濁させ、-80°C で冷凍保存したものを初代培養細胞とした。

このものに 10 ng/ml 上皮細胞増殖因子、10 ng/ml インスリン様増殖因子-I および 1% ITS-X を含む DF5 (DIEF) を加えてよく攪拌し、35 mm のシャーレで 3 日間の前培養を行った。培養後の懸濁液を回収し、別のシャーレで 7 日間培養したものに PTX 標準品 (WAKO) を 10 ng/ml の濃度になるよう添加し、筋肉細胞の形態の変化を顕微鏡下で観察した。

C. 研究結果

1) 中国におけるハフ病の現地調査

江蘇省人民医院にて聞き取り調査を行った結果、同省南京市を中心に 2010年8~9月に発生したザリガニ中毒は、南京市の中国疾病予防控制中心 (Centers for Disease Control and Prevention (CDC)) が事後調査を行い、江蘇省の CDC、さらに国 (北京) の CDC へと報告がなされているが、中毒原因個体の種や履歴、原因物質等はいずれも不明であるとの情報が得られた。今後は中毒の発生状況や原因物質等に関する調査体制が必要との認識に基づき、その整備を急いだが、その後、同様の中毒はまったく発生していないとのことであった。

一方、同省淡水水産研究所での調査では、中国に生息するザリガニは 4 種ほどが知られているが、同省で養殖されているザリガニは主に 1 種であることがわかった。その養殖場は小型 (1,320~1,980 m²) または大型 (19,800~33,000 m²) の池を使用したもので、餌はトウモロコシや大豆の残渣であるが、天然の個体も僅かながら市場に出回っているとの情報が得られた。今回のザリガニ中毒の原因が養殖の個体であるか否かは明確ではないとのことであった。

他方、南京惠民橋水産卸売市場 (築地市場の仲卸のような関連業者を対象とした市場) での調査では、ザリガニの販売は 30 軒近いザリガニ専門の仲卸業者により、生きたままの状態で行われていることがわかった。販売されているザリガニはザリガニの養殖が最も盛んな湖南省洞庭湖で養殖されたものであった。販売価格は、大きいもので 40 元/kg [約 610 円/kg; 2013 年 3 月 15 日の為替レート (15.3 円/元) で換算]、中程度で 28 元/kg (約 430 円/kg)、小さいもので 20 元/kg (約 310 円/kg) であった。同市場で多い時は 20 トン/日の取引量があったが、現在では 10 トン/日以下であるとの情報が得られた。次に、一般の消費者を対象とした迎賓菜市场では、ザリガニを扱っている小売店は 5 件ほどで、販売価格は 56 元/kg (約 860 円/kg) 程度であり、一般的に消費者がザリガニを喫食する際には必ず加熱調理を行っているとの情報が得られた。

2) 培養筋細胞の樹立とそれに対する PTX の作用

ラット大腿部筋肉より初代培養細胞 (筋芽細胞、線維芽細胞、および筋管が混在) を樹立することができた (図 5A)。筋芽細胞と線維芽細胞は培養皿に接着して高密度で広がっており、相互の区別は困難であった。一方、筋芽細胞由来と思われる筋管は、典型的なチューブ形状をしており、容易に識別できる。

これらに PTX 標準品を 10 ng/ml の濃度になるよう添加したところ、筋芽細胞/線維芽細胞は次第に細胞構造が変形して丸くなり、最終的には細胞死に至った (図 5B~D)。他方、筋管には経時的な萎縮/融解が見られたが、形態変化の程度が比較的小さいものもあった。筋管には筋原線維様の構造が形成されている可能性が高く、このため形態への影響が出にくい場合があるものと推察された。

D. 考察

1) 中国におけるハフ病の現地調査

Zhang *et al.*, *Intern. Med.* 51, 487-489, 2012 に記載された情報に基づけば、2010 年 8 ~9 月に発生したザリガニ中毒の症状は、本邦で発生しているアオブダイ/ハコフグ中毒と酷似しており、両中毒の原因物質は共通の生理活性をもつものと判断される。ハフ病に共通する原因食材は、中国産のザリガニを含め、これまで淡水ないし汽水産の魚介類のみであり、海産魚介類で同様の症状を示す例は本邦のアオブダイ/ハコフグ中毒のみである。フグ毒テトロドトキシンや麻痺性貝毒同様、PTX 様毒も淡水、海水の両水域に分布するのか調査を進める必要がある。

一方、今回の現地調査により、中国、特に江蘇省周辺では、ザリガニは一般に広く消費されているにもかかわらず、今回のような中毒例はごく希で、2010 年の事件以後まったく発生していないことがわかった。本邦における PTX 様毒中毒に関しては、原因魚への毒の蓄積は食物連鎖による外因性との見解があるが、これと同様に、偶然、養殖用飼料に有毒物質が混入し、それを摂取・蓄積した個体をヒトが食べて中毒した可能性がある。すなわち、ザリガニの毒化は餌由来であり、養殖飼料への横紋筋融解症誘起物質 [ドクニンジンやニセクロハツの毒成分 (コニイン、2-シクロプロペンカルボン酸) など] の混入の可能性についても調べる必要があるものと思われた。

2) 培養筋細胞の樹立とそれに対する PTX の作用

培養筋細胞の PTX 暴露試験では、筋芽細胞／線維芽細胞と筋管の経時的な変形、萎縮、融解、細胞死が観察され、PTX は 10 ng/ml の濃度で、筋細胞に顕著な影響を与えることが明らかとなった。現段階で PTX の作用機序（細胞死や筋管萎縮／融解の機構）は不明であるが、CPK の放出等を指標として当該作用の定量的評価や PTX 濃度依存性などを明確にすることができれば、横紋筋融解症を直接的に評価しうるアッセイ系の確立が可能となろう。さらに、PTX や PTX 様毒を含めて種々の横紋筋融解症誘起物質を対象に培養筋細胞への作用機序を究明することで、ハフ病やアオブダイ／ハコフグ中毒の原因物質や発症機構を解明することができるかもしれない。

E. 結論

中国におけるハフ病の現地調査により、原因食品ザリガニの毒化はアオブダイやハコフグ以上に希なものであることがわかった。従って、当該毒化は外因性であり、おそらく養殖用飼料に混入した毒物質に起因するものと推察された。一方、ラット骨格筋の培養細胞を樹立し、予備的に筋芽細胞／線維芽細胞と筋管に対する PTX の作用を示すことができた。今後、この手法を発展させることで、横紋筋融解症を直接的に評価しうるアッセイ系の確立や PTX 様毒の作用機序解明が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) R. Tatsuno, M. Shikina, K. Soyano, K. Ikeda, T. Takatani and O. Arakawa: Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin in the female goby *Yongeichthys criniger*. *Toxicon*, 63, 64-69 (2013).
- 2) 谷山茂人, 高谷智裕, 反町太樹, 相良剛史, 久保弘文, 大城直雅, 小野 要, 肖 寧,

橘 勝康, 荒川 修: 沖縄県沿岸に分布する腐肉食性および肉食性巻貝の毒性と毒成分. *食衛誌*, 54, 49-55 (2013).

- 3) R. Tatsuno, M. Shikina, Y. Shirai, J. Wang, K. Soyano, G.N. Nishihara, T. Takatani and O. Arakawa: Change in the transfer profile of orally administered tetrodotoxin to non-toxic cultured pufferfish *Takifugu rubripes* depending of its development stage. *Toxicon*, 65, 76-80 (2013).

2. 学会発表

- 1) S. Itoi, S. Yoshikawa, R. Tatsuno, A. Detake, C. Takayanagi, M. Eguchi, M. Suzuki, K. Asahina, S. Kokubo, S. Takanashi, A. Miura, M. Kawane, K. Suitoh, T. Takatani, O. Arakawa, Y. Sakakura and H. Sugita: Distribution of tetrodotoxin in the larvae of the genus *Takifugu* pufferfish, 6th World Fisheries Congress, Edinburgh, May. 2012.
- 2) K. Onuki, S. Shiba, S. Hihara, O. Arakawa and T. Noguchi: Effect of pufferfish liver on the ability of mice in learning and memorizing, 6th World Fisheries Congress, Edinburgh, May. 2012.
- 3) S. Jiang, S. Miyata, T. Takatani and O. Arakawa: Effects of successive subculture and various culture conditions on growth and PSP productivity of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*, 17th World Congress of the International Society on Toxinology, Honolulu, Jul. 2012.
- 4) R. Tatsuno, K. Yamaguchi, T. Takatani and O. Arakawa: Two proteins homologous to pufferfish saxitoxin-binding protein (PSTBP) found in the plasma of non-toxic

- cultured specimens of the pufferfish (*Takifugu rubripes*), 17th World Congress of the International Society on Toxinology, Honolulu, Jul. 2012.
- 5) S. Niina, T. Araki, Y. Yamanaka, J. Wang, R. Tatsuno, O. Arakawa and T. Takatani: Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to different ages of artificial hybrid pufferfish, Joint International Symposium on Marine Science and Technology, Jeju, Oct. 2012.
- 6) Y. Yamanaka, S. Niina, J. Wang, T. Araki, R. Tatsuno, K. Ikeda, M. Hamasaki, Y. Sakakura, T. Takatani and O. Arakawa: Transfer profiles of intramuscularly administered tetrodotoxin to artificial hybrid specimens of the pufferfish: *Takifugu rubripes* × *Takifugu niphobles* and *T. niphobles* × *T. rubripes*, Joint International Symposium on Marine Science and Technology, Jeju, Oct. 2012.
- 7) O. Arakawa: Risk control on causative marine toxins of food poisoning in Japan, A Joint Symposium of the Kenya Marine & Fisheries Research Institute and Nagasaki University, Kisumu, Dec. 2012
- 8) 山中祐二, 峰 智香, 辰野竜平, 池田光彦, 高谷智裕, 荒川 修: 天然フグ3種における体内毒分布の成長依存的変化, 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2012 年 3 月
- 9) 辰野竜平, 山口健一, 高谷智裕, 荒川 修: 無毒養殖トラフグにおける PSTBP 相同アイソフォーム遺伝子の発現, 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2012 年 3 月
- 10) 野原健司, 柴原康広, 河野裕美, 荒川 修, 斎藤俊郎: DNA 分析によるツムギハゼ北上個体群の由来推定の試み, 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2012 年 3 月
- 11) 沖田光玄, 後藤完奈, 近藤秀裕, 平野雪, 金子元, 木下滋晴, 山崎英樹, 崎山一孝, 山根晃, 新名真也, 辰野竜平, 高谷智裕, 荒川修, 阪倉良孝: トラフグのフグ毒感知に関わる遺伝子のマイクロアレイ解析による探索, 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2012 年 3 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

【資料】



图 1. 中国江苏省人民医院



图 2. 中国江苏省淡水水产研究所での聞き取り調査



図3. 南京惠民橋水産卸売市場



図4. 水産市場で販売されるザリガニ

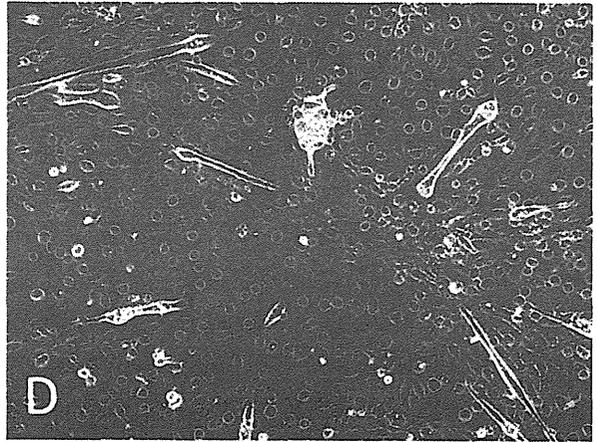
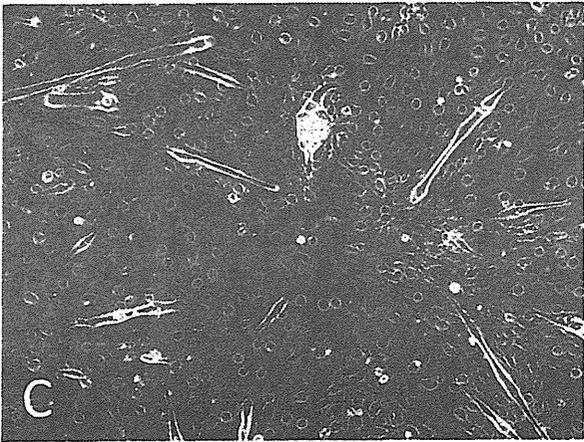
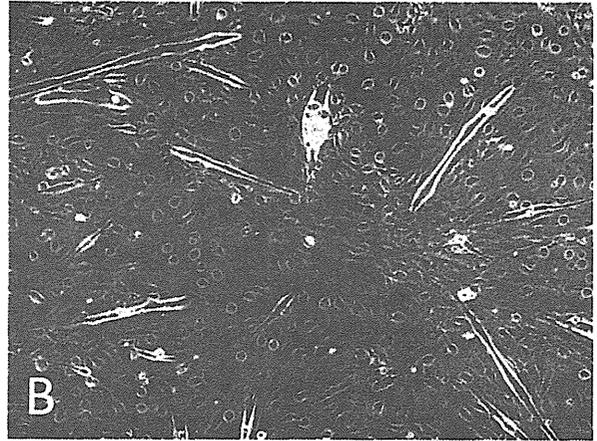
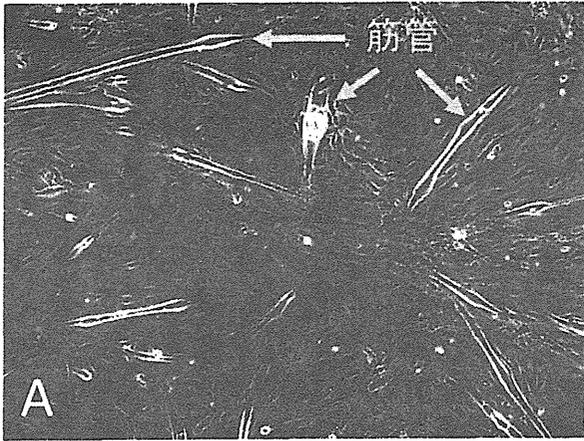


図5. PTX 添加後の筋肉細胞
A : 0 時間経過, B : 2 時間経過, C : 4 時間経過, D : 8 時間経過

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
「国内侵入のおそれがある生物学的ハザードのリスクに関する研究」
分担研究報告書

植物毒の毒性評価と毒成分分析

研究分担者 紺野勝弘 富山大学和漢医薬学総合研究所

研究要旨

我々は、従前より植物毒による食中毒を未然に防ぐ事を目的に、「自然毒のリスクプロファイル」作成や「日本の有毒植物」を出版する等して啓蒙活動を進めている。その一環として、2012年4月北海道函館市において発生したトリカブトによる食中毒について現地調査を行い、事故の詳細の調査、原因植物の入手、有毒成分の定量分析等を行った。

A. 研究目的

中毒事故の発生した現地に赴き、関係者と接触することで現地でしか得られない情報を得、事故の詳細を明らかにすることにより、今後の中毒防止対策の一助とする。

B. 研究方法・結果

1) 事故の経過

函館保健所の個別聞き取り調査資料及び新聞報道資料より事故の詳細な経過が明らかになった。2012年4月初旬、家族3名（A: 71歳、男性、B: 42歳、男性、C: 41歳、男性）が、Bがニンソウとして採取してきた野草をおひたしにして、夕食のおかずとして食べた。食後、1.5～2時間後から、全員食中毒症状（吐き気、倦怠感、胸のもやもやなど）を呈した。3時間後、救急車で病院へ搬送。Bは、到着時に心肺停止状態、食後約5時間後に死亡を確認。Aは、5時間後に心肺停止、翌日死亡が確認された。Cは、応急処置の後入院、数日後回復して退院した。

2) 採取植物の同定

患者の死亡に際し、病院は道警（北海道警察）へ検視依頼している。道警は、検視のため遺体を引き取ると同時に、患者自宅への立ち入りと、

残されていた野草の全量、採取者Bが使っていた山菜図鑑、携帯電話などを収集した。採取された野草は、北海道衛生研究所によりトリカブトと鑑定された。救急隊員は、当初からトリカブト中毒を疑っていたという。道警が収集したトリカブトと鑑定された野草は、後に函館保健所に譲渡され同保健所内の冷蔵庫で保管されていた。我々はこの野草を譲り受け観察したところ、すべてトリカブトで、採集したとされるニンソウやその他の植物種は全く入っていなかった。

3) 有毒アルカロイドの定量および患者のアルカロイド摂取量

トリカブトには、全草に猛毒のアルカロイド（アコニチン、ヒパコニチン、メサコニチン、ジェサコニチン）が含まれ、アコニチンアルカロイドまたはジェステルアルカロイドと総称される。これら4種のアルカロイドを、LC-MSを用いて定量分析した。

分析はESI-FT-MSを検出に用いたLC/MSシステム（ThermoFisher LTQ-Orbitrap XL）を用いて行った。HPLCは、逆相C18カラムを用いたグラジエント条件、観測質量範囲 m/z 600-700、サンプルは各10 μ Lを注入した。アルカロイド標品は和光純薬市販品を用い、添

付文書に基づき標準溶液を調整し検量線を作成した。

譲り受けたトリカブトについて乾燥重量 1g 当りのジエステルアルカロイド類の含有量を定量したところ、アコニチン 0.43 mg、メサコニチンは 0.55 mg、ヒパコニチンは 0.04 mg、ジェサコニチン 0.89 mg で、これらの和（ブシジエステルアルカロイド量）は、1.9 mg であった。

この結果から推計すると、患者の摂取した総アルカロイド量は 14.4 mg と考えられる。すなわち、一人当たり 5 mg 程度摂取したことになる。アコニチンの致死量については、およそ 3-6 mg という値が知られているので、この摂取量は、致死量を十分含んでいたことになる。なお、後日道警は、死亡した 2 名の血中からトリカブトに特徴的なアコニチンなどの 3 成分が検出されたと発表した（俵 敏弘ら：重症トリカブト中毒の 3 名同時搬入例、中毒研究 25: 332, 2012）。

4) 採取地の植物相観察

誤認するに至った現場の植物相を検証するため、聞き取り調査で得られた情報をもとに、採取地と考えられる函館市郊外の山林の植物相を調査した。トリカブトは林道基点近くの沢筋に小群落を 1 つ見つけたのみで、その近辺及び上流部には全く見つける事はできなかった。トリカブトのすぐ近くにはニリンソウがまばらに生えていた。ニリンソウは、林道の基点から終点まで林道沿いの林床に群生していたが、尾根筋となる林道終点以北には観察されなかった。その他、川沿いの植林された針葉樹の林床には、アキタブキ、マイヅルソウ、バイケイソウ、モミジガサ、チゴユリ、ミツバ、エゾニユウ、オニシモツケ、ドクニンジン、ウマノミツバ、広葉樹林の林床には、バイケイソウ、エンレイソウ、オニシモツケ、モミジガサ、オオウバユリ、タンポポなどが観察された。

C. 考察

今回の事故では、採取者が「ニリンソウを取ってきた」と家族に話していることから、ニリンソウとトリカブトの誤認と考えられる。残存していた植物の観察、およびその成分の化学分析からも、トリカブトであることが裏付けられた。最近 20 年余の日本国内における高等植物による食中毒事例の統計調査によれば、トリカブトによる食中毒に関して、誤認した植物としてはニリンソウが最多で、ついでモミジガサが多いと報告されている（登田ら，食衛誌，2012:53, 105）。野草を採取したとされる現地の植物相調査でも、トリカブトの周辺にニリンソウ、モミジガサが生育していた。以上のことから、トリカブト中毒を未然に防止するには、まず原植物の正確な鑑定、あるいは似た植物との適切な見分け方が如何に重要かがわかる。これに関して、北海道のアイヌの伝承に学ぶべきことが多々ある。かつてニリンソウは、アイヌにとって重要な食料のひとつであり、毎年春には大量のニリンソウを採取し、冬の保存食料としていた。採集に関するいくつかの資料には、若葉のうちトリカブトの葉によく似ているので、花が咲いてから採るのが良いとされている。ニリンソウの花が咲くころには、トリカブトは大きくなっており確実に区別できることが示されている。現在出版されている多くの山菜図鑑も、ニリンソウは花やつぼみのついているものを採るのが安全だと指摘している。

D. 結論

植物毒による食中毒は、細菌やきのこほど多くはないものの、毎年少なからず発生する。春の山菜の時期に特に多く、山菜とよく似た有毒植物を採取し、誤って食べて中毒する例が後を絶たない。ニリンソウなどと誤認してのトリカブト中毒は、死に至ることも多いので、特に注意が必要である。今回のトリカブト中毒現地調査により、植物の誤認を防ぐことが如何に重要であるかが示された。個々の植物によって、特徴や見分け方が違うので、それぞれに応じたき

め細かい注意喚起、啓蒙活動が必要と考えられる。

E. 研究発表

特になし

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
「国内侵入のおそれがある生物学的ハザードのリスクに関する研究」
分担研究報告書

食中毒事例が多いきのこの分子系統樹解析と迅速同定法開発

分担研究者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者 中村公亮 国立医薬品食品衛生研究所
小櫃冨未 国立医薬品食品衛生研究所
小林友子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

きのこによる食中毒は、形態学的に判別が難しい食用きのこの誤食が主な原因である。日本国内で中毒被害が多いツキヨタケ、クサウラベニタケ、カキシメジ、ニガクリタケのうち、特に近縁種が多く、かつ形態学的な判別が困難なクサウラベニタケについて、国内より広くサンプリングし、食用のウラベニホテイシメジとともにリボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域の塩基配列を解析した。この結果をもとに、分子系統所解析を行ったところ、クサウラベニタケとして採取したきのこは、一部がクサウラベニタケである他に、イッポンシメジも含まれていた。また、両社に属さないきのこもあった。さらに、分子系統樹解析結果をもとに、数時間で判別・同定可能な PCR-RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）を開発し、食毒の判別やクサウラベニタケ近縁種の判別が容易に行うことができた。

A. 研究目的

日本では夏から秋を中心に各地で多様な食用や毒きのこが発生する。一方で、きのこは、その年の気候など生育条件により同一きのこであってもその形態は変化し、一定ではない。そのため、9-10 月は、食用きのこの誤食による食中毒事例が多く報告される。注意喚起にもかかわらず、毎年一定件数の食中毒事例が報告され、根本的な食中毒低減のための施策が求められている。日本で中毒事例が多いきのこは 4 つ程度であるが、ツキヨタケとクサウラベニタケの上位 2 つが大部分を占める（8 割以上）その中でも、毒きのこであるクサウラベニタケ（イッポンシメジ属）は、同じような大きさの食用ウラベニホテイシメジとの判別は特に専門家においても難しく、確実な判別ができない。さらに、毒きのこは、毒成分が明らかでないものや、特有の成分が知られていないこと、および

び標準品が存在しないことなど、分析上の問題を抱えている。

そこで、本研究では形態学的な判別が困難で、かつ近縁種が多く存在するクサウラベニタケについて、同属間での比較によく用いられる核リボソーム RNA をコードする遺伝子（rDNA）の ITS 領域を解析し、遺伝学的に分類するために系統樹解析した。この結果をもとに、迅速に食毒判別や近縁種の判別同定が可能な PCR-RFLP 法を検討したので報告する。

B. 研究方法

1. クサウラベニタケの ITS 領域解析の実験

1) 試料

日本各地（東京、北海道、山形、島根、鳥取、富山、新潟）で採取したクサウラベニタケおよび福島、茨城、鳥取で採取したウラベニホテイシメジを試料として用いた。

2) DNA 抽出

試料は蒸留水でよく洗浄し、1.5mL tube にて 0.3~0.7g のサンプルを採取し、マイクロ乳棒を用いてホモジナイズし、65°C の AP1 buffer 600 μ L と RNase A 4 μ L を加え、混合した。次に、AP1 buffer 195 μ L を加え、ボルテックスでよく混合した後、氷上で 10 分間静置した。次に、室温で 14,000 \times g、10 分間遠心し、その上清を QIAshredder Mini spin column に負荷し、室温で 14,000 \times g、1 分間遠心し得られた溶出液を 2mL tube に移した。溶出液は 1.5 倍量の AP3/E buffer を加え混合し、650 μ L ずつ数回に分けて DNeasy Mini spin column に負荷した。その際、10,000 \times g、1 分間遠心し、溶出液は廃棄した。次に、AW buffer 500 μ L を DNeasy Mini spin column に負荷後、10,000 \times g、1 分間遠心し溶出液は廃棄した。これを 3 回繰り返し、最後に、10,000 \times g、15 分間遠心し、余分なアルコールを除去した。DNeasy Mini spin column は新しい 1.5mL tube に移し、65°C に加温しておいた AE buffer 40 μ L をシリカメンブレンに負荷し、5 分静置後、10,000 \times g、1 分間遠心し溶出液を回収した。再度、同様の操作を行い、合計 80 μ L DNA 抽出液を得た。

3) PCR 条件

① 使用したプライマー対

rDNA ITS 領域 (ITS) 解析用として

ITS1F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'

ITS4B:

5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3'

Mitochondrial Small rDNA (MS) 解析用として

MS1:

5'-CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG-3'

MS2: 5'-GCGGATTATCGAATTAATAAC-3'

および

Mitochondrial Large rDNA (ML) 解析用として

ML3:

5'-GCTGGTTTTCTACGAAACATATTTAAG-3'

ML4: 5'-GAGGATAATTTGCCGAGTTCC-3'

を用いた。

② PCR 条件

nuclear rDNA ITS 領域

PCR 用反応液は 50 μ L/well として調製する。その組成は以下のとおりである。10 \times Ex Taq Buffer 5 μ L、2.5mM dNTP 4 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各 0.5 μ L、TaKaRa Ex Taq HS 0.25 μ L、蒸留水 34.75 μ L を混合調製し、DNA 試料液 5 μ L (10 ng/ μ L) を添加した。また、反応条件は、95°C で 5 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った。その後、72°C 5 分伸長反応、4°C 保存を行った。PCR 産物は 1%アガロースゲル (エチジウムブロマイド溶液 0.1 μ g/mL) で電気泳動後、目的のバンドである約 1.2kb を UV 下で検出した。

Mitochondrial rDNA small and large サブユニット

PCR 用反応液は 50 μ L/well として調製する。その組成は以下のとおりである。2 \times PCR Buffer for KOD FX 25 μ L、2mM dNTP 10 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各 1 μ L、KOD FX 1 μ L、蒸留水 7 μ L を混合調製し、DNA 試料液 5 μ L (10 ng/ μ L) を添加した。また、反応条件は、95°C で 5 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、56°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った。その後、72°C 3 分伸長反応、4°C 保存を行った。PCR 産物は 1%アガロースゲル (エチジウムブロマイド溶液 0.1 μ g/mL) で電気泳動後、目的のバンドである約 600bp

(MS)、約 1000bp (ML) を UV 下で検出した。

4) シークエンス解析および系統樹作成

PCR 産物は、アガロースゲルで電気泳動後、目的のバンドをゲルから切り出し、DNA を精製した。それをシークエンス解析 (ファスマック) に用いた。シークエンス解析で得た塩基配列は遺伝子解析ソフト「GENETYX」を使用し、解析および系統樹作成を行った。

2. PCR-RFLP 法のための制限酵素の選択

国内から広く集めた毒きのこであるクサウラベニタケと食用ウラベニホテイシメジのシークエンス解析の結果をもとに、食毒判別が可能な制限酵素部位と種類を、*In silico* で検討を行った。

検討には、*In silico simulation of molecular biology experiments* (<http://insilico.ehu.es>) および遺伝子解析ソフト「GENETYX」を用いて行った。

1) PCR-RFLP 法を用いた迅速定量法

A. PCR 条件

生または乾燥したきのこを、100 mg または 20 mg 測り取り、よく洗浄する。これに PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 400 μ L を加え、100°C 10 min 処理し、遠心 13,000 \times g、2 min して上清を取る。これを、PCR 反応の鋳型とする。

次の PCR 条件で行い、制限酵素処理を行った。

95°C, 3 min	} 45 サイクル
95°C, 30 sec	
55°C, 30 sec	
72°C, 1 min	

B. PCR-RFLP 条件

制限酵素処理は、次の 3 種を用いた。クサウラベニタケと食用のウラベニホテイシメジを

区別するために *Msl*I、*Dde*I、*Hinc*II-*Hae*III を用いた。

PCR 反応液 50 μ l あたり、制限酵素 10 unit を用いて、1h~3h、37°C で処理した。酵素反応後、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、その泳動パターンの違いにより判別した。

C. 研究結果

クサウラベニタケとその他のきのこ ITS 領域を用いた系統樹比較

各きのこについて公共データベース (NCBI) 記載の ITS 領域を分子系統樹解析比較したところ、図 1 に示すように、食用のウラベニホテイシメジ、クサウラベニタケ、イッポンシメジは近い関係にあることがわかる。クサウラベニタケをはじめこれらのきのこは、植物の根と共生する菌根菌であり、近縁種も多く形態学的にも多様であることから、遺伝子配列からこれらのきのこの確実な判定法が確立できれば大きな意義があると考えられる。

クサウラベニタケの ITS 領域を用いた分子系統樹解析

プライマー対 (ITS1、ITS4) を用いて 5.8S リボソームを含む ITS1 から ITS2 の領域 (図 2) 約 1,200 bp を PCR により増幅し、ゲルより切り出し精製した。増幅産物のシークエンス解析をし、1,016 bp について clustalW でアライメントを行い、分子系統樹解析をした。また、outgroup として、*Clitocybe dealbata*、*Collybia tuberosa*、*Tricholoma matsutake*、*Rhodocybe trachyspora* を用いた。系統樹解析の結果、一部のサンプルは、データベース上のクサウラベニタケ (*E. rhodopolium*、GenBank: AB301602.1) に一致したが、東京近郊で形態的にクサウラベニタケと判別された一部は、遺伝子配列から、同じイッポンシメジ属のイッポンシメジ (*E. sinuatum*、GeneBank: GU289652.1) に分類された。さらに、一部のサンプルは、データベース上一致するきのこがない新しいグループに分類され

た。また、食用のウラベニホテイシメジは、データベース上のウラベニホテイシメジ (*E. sarcopum*, GeneBank: AB301603.1) に一致した。以上の結果から、形態学的にクサウラベニタケと判定されたものを ITS 領域を解析したところ、クサウラベニタケ、イッポンシメジ、新たなグループの3つに分かれたことから、これまでクサウラベニタケと考えていたものの一部はイッポンシメジなど別のきのこであることが今回初めて分かった (図 3)。

PCR-RFLP 法に用いる制限酵素の選定

得られたシークエンス結果をもとに *In silico* 検索した結果、図 4 に示したように、*Msl* I は食用ウラベニホテイシメジのみ切断され、*Dde* I もウラベニホテイシメジが特異的な泳動パターンを示すとともに、3 グループに分類されたクサウラベニタケ間でも差のある泳動パターンが推定された (イッポンシメジグループのみ他と違う)。さらに、*Hinc* II・*Hae* III 2 重切断処理では、グループに分類されたクサウラベニタケ間の内で、データベース上に一致するものがないグループのみ特異的な泳動パターンを示した。したがって、これら3つの結果を合わせて判断すれば、食毒判別は、*Msl* I と *Dde* I 両方で確認でき、かつ3つのクサウラベニタケ近縁種全ても判別できると考えられた。

PCR-RFLP 法を用いた迅速定量法

PrepMan Ultra Reagent で抽出したきのこサンプルを、ユニバーサルプライマー対で増幅した結果、すべてのサンプルできれいに予測される大きさ約 1.2 kb の増幅断片を得た (図 5)。このことから、先のシークエンス解析に用いた DNeasy Plant mini kit のようなカラム精製をすることなく検査に使用できることが分かった。次に、この増幅断片を、各制限酵素で処理して電気泳動した結果、制限酵素に *Msl* I を用いた時には、食用のウラベニホテイシメジのみ切断され、その他のクサウラベニタケとその近

縁種は全く切断されなかったことから、*Msl* I 処理で食毒判別が可能であることが示唆された (図 6)。さらに、*Dde* I で処理した時には、食用のウラベニホテイシメジは特異的な切断パターンを示したほかに、イッポンシメジに分類されるきのこだけが他 2 つのクサウラベニタケとその近縁種と異なったパターンを示した (図 7)。また、*Hinc* II・*Hae* III の同時処理では、クサウラベニタケ近縁種の中でデータベースに一致するものがないグループだけが特徴的な泳動パターンを示した (図 8)。これらの結果から、上記の3つの制限酵素を用いて泳動パターンを比較すれば、食毒の判別だけではなく、形態学的に判別が困難なクサウラベニタケ近縁種の判別も行うことが可能であることと考えられ、煩雑なシークエンス解析をきのこサンプルごとにするのではなく迅速簡便に判別が可能であることが分かった。

D. 考察

例年食中毒事例が多い、ツキヨタケ、クサウラベニタケ、ニガクリタケ、カキシメジのうち、クサウラベニタケは、食用のウラベニホテイシメジとの判別 (特に大きさが同じような場合) は専門家においても難しいとされてきた。形態学的な判別の困難さの他に、クサウラベニタケはさらに分類すべき近縁種があるとこれまで考えられてきた。しかしながら、これらを詳しく検討した研究はこれまでなかった。今回の研究結果から、2 つの成果を得ることができた。一つは、形態学的にクサウラベニタケと判定されていたきのこの一部は、イッポンシメジや未同定の近縁種であること、そして、2 つ目は判別が困難なこれらきのこの迅速で確実な判別同定法である PCR-RFLP 法を開発できたことである。本法により、少なくとも採取したきのこのこについての判別に非常に有用であると考えられた。

E. 結論

クサウラベニタケとその近縁種について、国内より広くサンプルを採取して、ITS 領域の塩基配列を解析し、比較した。これを用いて分子系統樹解析したところ、形態学的にクサウラベニタケと判定された中には、クサウラベニタケの他に、イッポンシメジと未同定の近縁種の少なくとも 3 グループに分類することが分かった。これらクサウラベニタケ及びその近縁種と食用のウラベニホテイシメジの確実に迅速な判別同定法を開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Obitsu S., Sakata K., Teshima R., Kondo K.: Eleostearic acid induces RIP1-mediated atypical apoptosis in a kinase independent manner via ERK phosphorylation, ROS generation and mitochondrial dysfunction. *Cell Death and Disease* (in press)

2. 学会発表

- 1) 近藤一成、小林友子、中村公亮、小櫃冨未、野口秋雄、長澤栄史、手島玲子「クサウラベニタケおよび近縁種の rDNA ITS 領域の解析」第 104 回日本食品衛生学会学術講演会 (2012. 9, 岡山)
- 2) 小櫃冨未、近藤一成、中村公亮、小林友子、野口秋雄、坂田こずえ、手島玲子「クサウラベニタケおよび近縁種の PCR-RFLP 法を用いた迅速同定法の検討」第 104 回日本食品衛生学会学術講演会 (2012. 9, 岡山)
- 3) 近藤一成、小櫃冨未、小林友子、中村公亮、坂田こずえ、野口秋雄、手島玲子「PCR-RFLP 法を用いたクサウラベニタケの迅速同定法」日本薬学会第 133 回年会 (2013. 3, 横浜)

- 4) 近藤一成、小櫃冨未、手島玲子「エレオステアリン酸刺激による細胞死における RIP1 の役割」第 35 回日本分子生物学会年会 (2012. 12, 福岡)

G. 知的財産権の出願・登録状況

本研究で得られたクサウラベニタケとその近縁種の分子系統樹解析および PCR-RFLP 法の結果を、特許出願した。

出願番号：特願 2013-005113

「キノコの同定方法、及び、同定キット」

出願日：平成 25 年 1 月 16 日