

表 2.

	国名	発生時期	原因食品	患者数	死者数	流産
1	USA	2009	米国産チーズ	18		
2	USA	2009	米国産チーズ	8		
3	オーストリア・ドイツ・チェコ	2009.6-2010.2	サワーミルクチーズ (quargel)	34	8	0
4	デンマーク	2009.5	宅配の牛肉料理	8	2	
5	USA(ルイジアナ)	2010.1-6	豚のヘッドチーズ	8	2	0
6	USA(テキサス)	2010.11	セロリ	10	5	0
7	USA	2010	未定(病院食)	4	不明	
8	USA	2010	米国産チーズ	6	不明	
9	スイス	2011.4-7	イタリア産加熱ハム	6(+3 疑い例)		
10	イギリス	2011.2	病院食のサンドイッチとサラダ	3		
11	USA(28 州)	2011.7-10	カンタローブメロン	147	33	1
12	USA	2011	ブルーチーズ	15	不明	
13	フィンランド	2012.7	調査中	12	0	0
14	USA	2012.3-10	イタリア産チーズ	22	2	1
15	オーストラリア	2013.1	チーズ	18	2	1
16	USA(5 州)	2013.5-7	米国産チーズ	6	1	1
17	USA(2 州)	2014.2	米国産チーズ	8	1	0

(別添1)

24-48 時間で実施可能な、標準化された PFGE による *Listeria monocytogenes* の分子型別法

[1] 寒天培養からの PFGE プラグの調製

*微生物危害への注意：リステリア症の感染菌量は確定しておらず、部分的には宿主の感受性によって異なる。ハイリスクグループは妊婦、新生児、免疫抑制疾患の患者と年長者である。そこで、本菌を扱う実験者、特にリスクのあるものは、感染の可能性に注意し、この微生物を用いる際には注意を喚起されなければならない。

試験開始前に、この試験法を全文読むこと。菌液やプラグに接触したすべてのプラスチック製品、ガラス製品、ピペット、ヘラなどは汚染物質として扱い、廃棄またはその研究所のガイドラインに従って除染すること。再利用可能なプラグモールドは、洗う前に除染すること。使い捨てモールドは、テープやプラグをウェルから押し出すタブも含めて汚染されており、洗って再利用するならば 10%の漂白剤で少なくとも 30 分除染しなくてはならない。

0 日目：試験培養から分離した集落を BHI 寒天平板に画線し、十分な培養を得る。培養ごとに保存バイアルを作ることを推奨する。TSA か HIA または同様の培地を入れたスクリーキャップの小チューブのスタブを作成し、平板に菌を植えたものと同じ白金耳で摂取する。この操作により、必要に応じて同じ集落の再試験を行うことができる。37°C で 13-18 時間培養する。

1 日目：

1. 振盪培養器つき温浴槽またはふらん器(54-55°C)、静置式温浴槽 (55-60°C) と分光光度計のスイッチを入れる。
2. TE バッファーを用意する。
(TE バッファーは、プラグ用あがろーすの作成、菌液の懸濁、溶解プラグの洗浄に用いられる。)
3. Lysozume(Sigma L7651 か同等品)ストック液 (20mg/ml in TE) を用意する。
4. プラグ作成のため、1% SeaKem Gold agarose + 1% SDS を T10E1 に入れたものを用意する。

*安全上の注意：電子レンジ後の熱いフラスコを取り扱うときには、耐熱手袋を使用する。

注：SeaKem Gold agarose は、プラグの溶解や洗浄ステップでの崩壊を最小限にしうる強度を付与するため、PFGE プラグの作成に好都合である。アガロース溶解は完全でなくてはならず、その温度と時間は使用する電子レンジによって異なり、各試験所で決めなければならない。

5. 小試験管に培養番号をラベルする。
6. 5 の試験管に、2ml 以内の TE バッファーを移す。滅菌ポリエステル線維か滅菌 TE で湿らせた綿スワブを用いて、寒天平板から菌を取り、菌が十分に溶け、気泡発生が最小限になるように静かに回転させて TE に溶かす。

注：必要な菌液量は、菌濃度を測るキュベットや試験管の容量、使用する分光光度計や濁度計に依存する。

7. 菌液濃度を下記に示す値に調整する。
 - a. 分光光度計：610nm 波長で、吸光度 1.00 (0.8-1.0 の範囲)
 - b. Dade Microscan Turbidity Meter：0.4-0.45(Falcon2054), 0.58-0.63(Falcon 2057)
 - c. ビオメリュー Vitek 可視光計：17~18%以内(Falcon2054)

注：上記の値は、CDC でよい結果が得られたものであり、機器や試験管が異なれば、それぞれの研究所でよい結果を得られる別の適した濃度を設定する必要がある。

プラグ作成

培養番号で PFGE プラグモールドの各ウェルをラベルする。プラグモールドを再利用する場合には、以前のラベルの上にテープを貼る。

注1：未使用のプラグ用アガロースは室温に保存し、1-2回再利用する。弱-中出力で10-15分間電子レンジにかけ、混和する。5-10秒間隔で繰り返し、アガロースを完全に溶解する。このステップは迅速に行う。

注2：ProteinaseK 溶液(20mg/ml)は市販されている。変法として、粉末と滅菌超純水から作成することもできる。小試験管に300-500 μ l ずつ分注し使用まで-20 $^{\circ}$ Cに保存するのが最も良い結果が得られる。使用直前に、必要数のチューブを溶かし、溶液は水中に保存する。粉末から調整した場合、作業日の終わりに溶解した液をすべて廃棄する。市販の溶液は、販売者の指示に従って保存する。

1. 400 μ l の調整菌液を、ラベルした 1.5ml の遠心チューブに移す。

2. 20 μ l の溶解した Lysozyme ストック液を各チューブに入れ、静かに混ぜる。10–20 分間 55–60°C に温浴する。使わなかった溶解 Lysozyme 液は廃棄する。
3. 20 μ l の溶解した Proteinase K 溶液を各チューブに入れ、ピペットで静かに混ぜる。
(10 の菌液に 200 μ l 必要となる。)
4. 400 μ l の溶解した 1% SeaKem Gold agarose 液を 0.4 ml の菌液に入れ、ピペットで 2–3 回静かに混ぜる。温水 (55–60°C) の入ったビーカー中にフラスコを保持し、アガロースが溶解したままの温度を保つ。
5. ただちに、プラグモールドのウェルに混合液を分注する。気泡が発生してはならない。各サンプルに 2 つのプラグが作成でき、再試験が必要な時に有益である。室温で 10–15 分間プラグを固まらせる。冷蔵庫 (4°C) で 5 分静置してもよい。

注：もしディスポモールドを使用するならば、200 μ l の菌液、10 μ l の lysozyme、10 μ l の ProteinaseK、200 μ l のアガロースを用い、4 つのプラグを作成することができる。

注：菌液調整とプラグの作成は、菌の不要な溶解を最小限にするために、素早く行わなくてはならない。もし数多くのサンプルを調整する場合は、一度に 10 以内のバッチを処理することを推奨する。最初のバッチが溶菌段階に入ったら、次のグループを開始する。最初のバッチの溶解時間が長くなっても結果には影響を与えないので、すべてのバッチを溶解しおえてから、洗浄は一緒に行ってよい。

アガロースプラグ内での溶菌

注：同じ菌株由来の 2 プラグ (再利用可能なプラグモールド) または 3–4 プラグ (ディスポモールド) は、同じ 50 ml チューブ内で溶菌してよい。

1. 50 ml チューブに菌番号をラベルする。
2. 溶菌バッファーを調整する。
3. 溶菌/ProteinaseK 溶液の必要量を計算する。
 - a. チューブあたり 5 ml の溶菌バッファーが必要となる。
 - b. チューブあたり 25 μ l の ProteinaseK 溶液が必要となる。
 - c. 溶菌バッファーと ProteinaseK 溶液の正確な量を測り、マスターミックスを調整してよく混和する。

注：溶菌液中の ProteinaseK の終濃度は 0.1 mg/ml であり、菌懸濁液に加える濃度 (0.5 mg/ml) とは異なる。

4. ラベルした 50 ml チューブそれぞれに 5 ml の溶菌/ProteinaseK 溶液を入れる。
5. プラグの上にはみ出たアガロースをメス、剃刀の刃などで切り取る。再利用可能なプ

ラグモールドを開き、プラグを 6 mm幅のへらでラベルしたチューブに移す。ディスポモールドの場合は、底からテープを取り外し、ラベルされたチューブ内にプラグを落とし込む。プラグが確実にバッファーの中に入り、チューブの壁面につかないようにすること。

注：切り取ったプラグ、モールド、へらなどは汚染されているので、廃棄するか適切な方法で除染すること。

6. 再利用可能なモールドからテープを除去する。モールドの両面、へら、メスを 70%イソプロパノールかエタノールまたはその他の適した除染剤に浸す。洗浄前に 15分は浸漬する。ディスポモールドは廃棄するか、10%漂白剤で 30–60分浸してから洗浄、再利用する。

7. チューブをラックに入れ、54–55°Cの振盪恒温槽またはふらん器で 2時間振盪する (150–175rpm)。溶解を恒温水槽で行う場合、水面が溶菌バッファーの水面よりも上になるようにする。

8. あらかじめ 54–55°Cに温めた超純水を用い、プラグを 10–15mlの超純水で 2回洗浄する。

溶菌後のアガロースプラグの洗浄

注：多くの実験室では、54 から 55°Cでの以下の洗浄ステップに耐えうる強度のプラグを作っている。しかし、もし角が欠けていたり壊れていた場合には、洗浄ステップの温度を 50°C以下にする必要がある。

1. チューブを恒温槽から取り出し、溶菌バッファーを注意深く適した廃棄容器に捨てる。スクリーンキャップかへらを使い、プラグがチューブ内に残るようにする。

注：この操作及び続く操作で、チューブやスクリーンキャップの端をペーパータオルで押さえ、液体をすべて取り除くことが重要である。

2. 54–55°Cに予熱した 10–15mlの滅菌超純水を加え、54–55°Cで 10–15分振盪する。

3. 水を取り除き、洗浄ステップを再度繰り返す。

a. TE バッファーを 54–55°Cに予熱しておくこと。水での洗浄終了後すぐに 10–15mlの TE バッファーで 4回洗浄する。

4. 水を廃棄し、10–15mlの予熱した滅菌 TE バッファーを加える。54–55°Cで 10–15

分振盪する。

5. TE を廃棄し、さらに 3 回洗浄を繰り返す。

6. 最後の洗浄液を捨て、5–10ml の滅菌 TE を加える。「制限酵素による切断」の章のステップ 1 を行うか、TE バッファー中でプラグを使用するまで 4°C に保存する。保存するプラグは小チューブに移してもよい。

注：もし制限酵素による切断を同日に行うなら、次章のステップ 1 から 3 は最後まで実施する。最後の TE での洗浄の後は、使用時まで保存できる。

アガロースプラグ中での DNA の制限酵素による切断

注：プラグの小片または全体（ディスポモールドでつくられたもの）は制限酵素で切断可能である。制限酵素の必要量が少なくて済み、また、残りをほかの酵素（AscI など）での切断に使用できるため、プラグ小片の制限酵素切断を推奨する。第 2 の酵素による切断解析は、第 1 の酵素による PFGE パターンで 2 つまたはそれ以上の株の区別ができない場合に有効である。第 2 の酵素の使用は、区別できない PFGE パターンを示す株の確認に有効である。

1. 1.5ml のエッペンチューブに菌番号をラベルする。3 本（10 ウェルのゲルの場合）または 4 本（14 ウェルのゲルの場合）のチューブを、*Salmonella* Braenderup H9812（スタンダード）用にラベルする。

a. 制限酵素切断前の任意のステップ：10 倍の制限酵素バッファーを 1 : 10 の滅菌蒸留水で、以下のように希釈しマスターミックスを作る。

b. 200 μ l の 1 倍制限酵素バッファーをラベルしたチューブに入れる。

c. 注意深くプラグを TE バッファーからヘラでディスポシャーレに入れる。

d. 各サンプルと必要数のスタンダードについて、2–2.5 mm 幅の小片を切り出し、制限酵素バッファーの入ったチューブに加える。プラグ小片がバッファーの中に浸っていることを確認する。プラグの残りは元のチューブに戻し、4°C に保管する。

注：プラグのサイズと形は、コームの歯のサイズによって異なる。パルスネットでは、コンピューター解析がより正確になり、より小さい歯（5.5 mm）のコームを用いた場合よりシャープな結果が得られやすいため、大きい歯の（10 mm 幅）コームを推奨する。プラグから

切り出せる小片の数は、実施者の技術と経験、プラグの出来、小片を水平にカットするか垂直にカットするか（ディスポモールドの場合）による。

- e. S. Braenderup H9812 のプラグから 2mm 幅の小片 3-4 個を切り出し、希釈されたバッファーを含むチューブに移す。プラグ小片がバッファーに完全に浸っているよう注意する。プラグの残りは、5ml の TE バッファーが入った元のチューブに戻し、4°C に保管する。
- f. 検体とコントロールのプラグ小片を 25°C (ApaI の場合) または 37°C (AscI と XbaI の場合) の恒温水槽に入れて 5-10 分、又は室温で 10-15 分培養する。
- g. その後、バッファーをプラグ小片からピペットを用いて取り除く。ピペットでプラグを傷つけたり、チップに吸い込んだりしないよう気を付ける。

2. 制限酵素マスターミックスを、10 倍制限酵素バッファーを滅菌蒸留水で希釈したものを用い、ApaI(50U/sample)または AscI(40U/sample)を下記の表に従って加えて、作成する。バッファー希釈に用いたのと同じチューブ内で混和する。

注：制限酵素のチューブは、常時氷中か低温コンテナー（-20°C）に保持すること。

3. 各チューブに 200 μ l の制限酵素ミックスを加える。チューブのふたを閉じ、静かにたたいて混和する。プラグ小片が必ず液中にあるように注意する。

4. サンプルとスタンダードの小片を酵素の種類に適した温度で 2-3 時間培養する。

- a. ApaI の場合は 25°C。
- b. AscI または XbaI の場合は 37°C。

5. プラグ小片をウェルに入れる場合は、制限酵素切断反応が終わる 1 時間前に、次章（アガロースゲルのキャスティング）のステップ 1-4 を続け、PFGE プラグを乗せるより少なくとも 30 分前にゲルが固まっているようにする。

アガロースゲルのキャスティング

A. 制限酵素切断されたプラグ小片をコームに乗せる方法

1. 恒温水槽が 55-60°C になっていることを確認する。
2. ゲルと泳道バッファーに必要な量の 0.5 倍の TBE バッファー を作成する。
3. 1%SeaKem Gold アガロースを、0.5 倍の TBE バッファー を用いて下記のように作成する。
 - a. 500ml のフラスコに必要な量のアガロースを秤量する。
 - b. 必要量の 0.5 倍の TBE バッファー を加え、静かに混和する。

- c. キャップを緩めるか、取り除いてラップをふわりと掛け、電子レンジで 60 秒加熱し、静かに混ぜる。アガロースが完全に溶けるまで、15 秒間隔で繰り返す。
- d. キャップを締め直し、55–60°Cの恒温水槽に入れ、15 分あるいは使うまで置いておく。

14 cm幅のゲル台（10 または 15 ウェル）には、1g のアガロースを 100ml のバッファーで溶かす。

21 cm幅のゲル台（15 以上のウェル）には、1.5g のアガロースを 150ml のバッファーで溶かす。

安全上の注意：電子レンジ後の熱いフラスコの取り扱いには、耐熱手袋を使用する。

4. 少量（2–5ml）の溶かして冷ました（55–60°C）1%アガロースを、プラグを乗せた後にウェルをふさぐのに用いる。上述のように、250ml のフラスコで 0.5g のアガロースを 50ml のバッファーで溶かしたものを用意する。残ったアガロースは室温に保存し、溶かして数回再利用できる。電子レンジに 15–20 秒かけ、混ぜるのを 10 秒間隔で完全に溶けるまで繰り返す。使用まで 55–60°Cの恒温水槽に置く。もしくは、ゲルの作成に用いたアガロースから 5ml 取り分けておき、使用まで 55–60°Cの恒温水槽においておく。

注：ゲル台を水平な作業台に置き、完全に水平になるように調節する。コームホルダーを正面（小さい金属スクリーのある側）に置き、歯をゲル枠の外に向け、コームの歯がゲル台に接触するようにする。

5. 制限酵素切断されたプラグ小片を恒温水槽からだし、酵素ミックスを除去する。200 μ l の 0.5 倍 TBE バッファーを加え、室温で 5 分培養する。
6. プラグ小片をチューブからだし、コームをキャビネット内に置き、コームの歯にプラグ小片を下記のように乗せる。
 - a. スタンダードをレーン 1, 5, 10（10 ウェルの場合）またはレーン 1, 5, 10, 15（15 ウェルの場合）に乗せる。
 - b. サンプルを残りの歯に乗せる。
7. 余分なバッファーをティッシュで除去する。プラグ小片をコーム上で 3–5 分風乾させるか、55–60°Cの 1%アガロースでシールする。
8. コームをゲル台に設置し、プラグ小片が正確にコームの歯の底辺に並んでいることを確認する。プラグ小片の底辺が黒いゲル台底面に接しており、気泡がないようにす

る。

9. 注意深くゲル台にアガロース (55–60°C) を注ぐ。
10. 黒いゲルフレームを泳動槽に置く。調整したての 2 から 2.2L の 0.5 倍 TBE を注ぐ。カバーを閉じる。(バッファの必要量は、前回の泳動時のバッファがチューブ内に残っているかどうかで異なる。)
11. 電源装置、ポンプ、冷却装置 (14°C) をオンにする。(1 L/分の流量を 70 までにする。)
12. 30–45 分後に固まったゲルからコームを抜き取る。
13. ゲルのウェルに、55–60°C の 1% アガロースを満たす (任意)。ねじを外し、ゲル枠を台から外す。側面や底面に残った余分なアガロースをティッシュで取り除く。ゲルを台に乗せたまま、黒いゲルフレームに設置する。泳動槽のカバーを閉じる。

B. ウェルの中に制限酵素切断されたプラグを入れる方法

1. A のステップ 1–4 を実施する。

注：ゲル台は水平な作業台に置き、ゲルを入れる前に完全に水平に調整する。コームホルダーを正面 (小さい金属スクリーのある側) に置き、歯をゲルのボトムに向け、コームの歯の端がゲル台表面の 2 mm 上になるようにする。

2. 溶かした 1% アガロースを 55–60°C の恒温水槽中で 15–20 分冷ます。アガロースを注意深く、コームをセットしたゲル台に注ぐ。気泡ができないよう気を付ける。
3. 黒いゲルフレームを泳動槽に置く。調整したての 2 から 2.2L の 0.5 倍 TBE を注ぐ。カバーを閉じる。(バッファの必要量は、前回の泳動時のバッファがチューブ内に残っているかどうかで異なる。)
4. 冷却装置 (14°C)、電源装置、ポンプ (1 L/分の流量を 70 までにする) のスイッチを、泳動開始の約 30 分前にオンにする。
5. 制限酵素切断されたプラグ小片を恒温水槽からだし、酵素ミックスを除去する。200 μ l の 0.5 倍 TBE バッファを加え、室温で 5 分培養する。
6. コームを、少なくとも 30 分間固めたゲルから除去する。
7. 制限酵素切断されたプラグを、ヘラの細い先を用いてチューブからだし、ウェルに入れる。ヘラの広い先でプラグをそっと底に押し込み、ウェルの前面に寄せる。ヘラを操作し、気泡がないようにする。

- a. スタンダードをレーン 1, 5, 10 (10 ウェルの場合) またはレーン 1, 5, 10, 15 (15 ウェルの場合) に乗せる。
- b. サンプルを残りの歯に乗せる。

注：ゲル小片に乗せるのは、ゆっくりと操作してよい。各人は、ゲル小片をウェルに乗せるための技術を向上させれば、レーンがまっすぐになり、バンドがシャープな結果が得られる。

- 1 4. 8. ウェルに 55–60°Cの溶かした 1%アガロースを満たす。3–5 分固める。ねじを外し、ゲル枠を台から外す。側面や底面に残った余分なアガロースをティッシュで取り除く。ゲルを台に乗せたまま、黒いゲルフレームに設置する。泳動槽のカバーを閉じる。

電気泳動条件

1a. ApaI または AscI で切断された *L. monocytogenes* の CHEF Mapper での泳動には、下記の条件で実施する。

Auto Algorithm

49kb-low MW

450kb-high MW

Select default values except where noted by pressing “enter”.

Initial Switch time=4.0s

Final switch time=40.0s

泳動時間は 18–19 時間に変更する

1b. CHEF-DRIII での泳動には、下記の条件で実施する。

Initial Switch time=4.0s

Final switch time=40.0s

Voltage: 6V

Included angle:120°

Run time: 18-19h

1c. CHEF-DRII での泳動には、下記の条件で実施する。

Initial Switch time=4.0s

Final switch time=40.0s

Short ratio: 1.0

Voltage: 6V

Run time: 19-20h

注：上に推奨した泳動時間は CDC の機器及び試薬での結果に基づいている。泳動時間は試験所により異なり、それぞれのゲルで適正化されなければならない。スタンダードの最小バンドがゲルボトムから 1–1.5 cm の位置にくるようにすべきである。

注：機器の初めの mA を記録しておく。初期 mA は、110 から 170 mA の間でなくてはならない。この範囲を超えた場合には、0.5 倍 TBE バッファーの作成が間違っており、バッファーを作り直さなくてはならない。

2 日目

PFGE アガロースゲルの染色と画像化

1. 電気泳動が終了したら、機器の電源を切り、ゲルを除去してエチジウムブロマイドで染色する。40 μ l のエチジウムブロマイドストック液 (10 mg/ml) を 400ml の純水で希釈する (この容量は、14×24 cm の染色槽向けである。より大きい容器には、より大量の染色液が必要となる。) ゲルを蓋をした容器内で 20–30 分染色する。

注：エチジウムブロマイドは有害で発がん性がある。10 mg/ml のストック液はいくつかの会社から市販されている。希釈された液は褐色ビン中で保存し、有害廃液に関するそれぞれの試験所のガイドラインに従って廃棄する前に 6–8 回使用できる。CDC はエチジウムブロマイドを排水に流すことは推奨しない。エチジウムブロマイドを含む水溶液は炭でろ過するか、活性炭を用いて分解するか、市販のエチジウムブロマイド除去製品を用いて処理する。除去されたのちは、水溶液を排水に流してもよい。エチジウムブロマイドについてさらに質問があれば、販売業者やメーカーの Material Safety Data Sheets を参照のこと。

2. 500ml の純水で 60–90 分ゲルを脱色する。20 分おきに水を取り換える。ゲルイメージを取り込む。バックグラウンドが高すぎる場合には、脱色をさらに 30–60 分行う。

注：もしデジタルイメージと通常の写真の両方がほしいければ、デジタルイメージの前に写真を撮る。

3. イメージャーの指示に従い、イメージをセーブする。BioNumerics で解析するには、このファイルを tif に変換する。ゲルイメージは、全体像を保存し、ウェルや下部のバンドをカットしてはならない。イメージのピントが合っているように注意し、バンドの露光過剰によるサチュレーションがないようにする。詳細は PulseNet QA/QC マニュアルの PNL07 を参照のこと。

4. 泳動槽からバッファーを除去し、廃棄する。泳動槽を 2 L の純水ですすぐ。もし数日間使わないなら、5-10 分間ポンプで水を循環させ、それから廃棄する。

5. もしスタンダードの最小バンドがゲルボトムの端から 1-1.5 cmのところになれば、それぞれの試験所で泳動時間を設定しなければならない。

もし PFGE の結果が 24-48 時間以内に得られなければならないのでなければ、以下の検討をする。

1. プラグの溶菌をより長い時間にする (3-16 時間)。

2. 溶菌バッファーを取り除くための TE での洗浄ステップを長時間 (30-45 分)、低温で (37°C 又は室温) 行う。1 日目に開始し、プラグを TE 煮付けて冷蔵庫で保存して 2 日目に終了する。

3. 制限酵素切断をより長時間 (3-16 時間) 行う。

4. スタンダードの最小バンドがゲルボトムの 1-1.5 cmのところに見えなければ、泳動時間を各試験所の条件に合わせて決めなければならない。

厚生労働科学研究費補助金（食品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

食中毒事例が多いキノコの分子系統樹解析と検査法確立

研究分担者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部

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、およびツキヨタケについて、間違えやすい食用きのこ合わせて国内より広くサンプリングして分子系統樹解析を行った。その結果、1種と考えられていたクサウラベニタケは3種存在することが判明した。この結果を用いて、クサウラベニタケについて、調理加工後サンプルでも適用可能な *MsiI* を用いる新たな食毒判別用迅速 PCR-RFLP 法を確立した。ツキヨタケについては、生のきのこを対象とした PCR-RFLP 法を構築し、各種市販きのこ中でも判別できることを示した。クサウラベニタケおよびツキヨタケについて、確定法となるリアルタイム PCR 法を開発し、これまで調理後の原型をとどめていないために形態判別が不可能であったサンプルに対しても、確定検査が可能となった。本法により、きのこ中毒被害事例数の半分以上を占める、原因きのこ不明の事例の特定につながると考えられる。

研究協力者

中村公亮、野口秋雄、坂田こずえ、小林友子、福田のぞみ（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

日本国内では植物性自然毒（高等植物ときのこ）による食中毒被害が毎年発生する。その中で、きのこによる食中毒被害は、多くの野生きのこが発生する9月から11月に集中している。夏の終わりから秋にかけて、野生きのこの発生時期に重なり、多くの人々がきのこ採取を行い、多くの場合には採取したきのこの鑑定を行わずにそのまま自宅に持ち帰るために、摂取後中毒に至る場合が多い。国内で中毒事例が多いきのこについて過去10年以上のデータを解析すると、クサウラベニタケとツキヨタケの2つのきのこであることが判明している。一方で、きのこによる中毒被害事例の中で、原因きのこ

が特定できない場合も多く存在する。これは、きのこの判別や同定が経験者の形態学的判別により行われているためである。鑑定能力には大きな個人差があること、形態をとどめていない細分化されたものや調理された場合、さらには、摂取後吐瀉物の場合には同定不可能になる。これらの事実を踏まえて、植物性自然毒の中で、きのこによる食中毒被害を低減するための施策として重要なことは次のように考えられる。1つは、きのこ採取者に対する一層の情報提供と注意喚起であり、もう一つは迅速にかつ科学的なエビデンスに基づく検査方法の確立と整備であると考えられる。日本国内で食中毒被害が多く発生する、クサウラベニタケとツキヨタ

ケのうち、クサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium* と現在考えられている) は、一般には複合種と言われ複数の種を含むと考えられており、分類学的にも整理されていない。文献および遺伝子データベース情報から、ヨーロッパにおける *Entoloma rhodopolium* として公開されているものと同かどうかを含めて、現在まで詳しく検討されたことはなかった。そこで、本研究班においてこれまでに、クサウラベニタケとその近縁種について全国からサンプルを収集して遺伝子配列解析を行い、系統樹解析を行ってきた。また、その結果を用いて生のきのこの判別に有効な PCR-RFLP 法を昨年作成したが、本年度は、加熱調理や吐瀉物を想定し、加熱および人口胃液処理したサンプルでも適用可能な PCR-RFLP 法を考案した。さらに、ツキヨタケについても同様の検討を行い、PCR-RFLP 法を確立するとともにリアルタイム PCR 法についても検討を行った。

B. 研究方法

クサウラベニタケ

クサウラベニタケの ITS 領域解析の実験

(1) 試料

昨年度に引き続き、今年度はさらに栃木、福島産のウラベニホテイシメジを収集し、さらに標本試料を用いた。

(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 RNaseA 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 culum 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 culum 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 culum 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 回繰り返す、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 culum 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 の DNA 抽出液を得た。

(3) PCR 条件

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'

を用いた。

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 µg/mL）で電気泳動後、目的のバンドである約1 kb 付近をUV下で検出した。

（4）シーケ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。それをシーケンス解析（ファスマック）に用いた。シーケンス解析で得た塩基配列はGENETYX ver.12およびCLC Genomic workbench ver.6.5を使用してMUSCLEアライメント解析および最尤法（Maximum likelihood）を用いて分子系統樹作成を行った。

クサウラベニタケのPCR-RFLP法の実験

（1）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ケ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。

加熱調理あるいは吐瀉物からでも適用可能にするために、増幅断片長を200 bpとする領域を標的としたPCR反应用（short-PCR）プライマーを設計した。

（2）PCR条件

PCR条件は生のきのこ対象としたRFLP法と同一である。

Short PCRプライマーの配列を示す。

[5'-Primer] Short-MsII-PCR Fw:

5'- GCTCTTCTTAAATGCATTAGC -3'

[3'-Primer] Short-MsII-PCR Rev:

5'- TCGCTTCGTCAACCTG -3'

加熱調理（30-60分）、人口胃液処理（30分）したきのこを100 mg 測り取り、よく洗浄する。これにPrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 400 µLを加え、100°C、10分間処理し、13,000×g、2分間遠心して上清を取る。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

95°C, 30 sec

55°C, 30 sec

72°C, 1 min

} 45 サイクル

（3）PCR-RFLP条件

加熱調理、人口胃液処理したきのこ試料の場合は、食毒判別のために特化するために、短い増幅断片長（200 bp）のPCR産物に対して、*MsaI*（37°C、30 min）で処理した。酵素反応後、2%アガロースゲルを用いて泳動して、*MsaI*処理での切断の有無の違いにより判別した。

（4）市販流通きのこ中での混入試料への適用

作成した検査法の適用範囲を広げるために、市販のきのこ（ブナシメジ、マッシュルーム、ナメコ、エノキ、エリンギ、マイタケ、シイタケ）中に含まれた場合でも、毒のクサウラベニ

タケが検出可能かどうかを検討した。疑似試料として、市販きのこの一部クサウラベニタケを含むものを調製し、DNA抽出、PCR反応、*MsaI*を用いたPCR-RFLPを行った。

(5) リアルタイム PCR 法の検討

PCR-RFLP法で得られた結果を、最終的に確認するためのリアルタイムPCR法について検討した。

ツキヨタケ

ツキヨタケのITS領域解析の実験

(1) 試料

ツキヨタケおよびヒラタケ、ムキタケは、鳥取、島根、山形、北海道などから収集したものをを用いた。さらに標本試料を用いた。

(2) DNA抽出条件および(3) PCR条件
クサウラベニタケと同じ条件およびプライマーを用いて行った。

(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GENETYX ver.12を使用してClustalW2アライメント解析およびNJ法を用いて分子系統樹作成を行った。

ツキヨタケのPCR-RFLP法の実験

(1) PCR-RFLP法のための制限酵素の選択

アライメント解析結果をもとに、ツキヨタケに対するPCR-RFLP法に用いる制限酵素を、

Sau96I、*Bpu10I*、*SfiI* および *DraI/HincII* に設定した。

(2) 市販流通きのこ中での混入試料への適用
作成した検査法の適用範囲を広げるために、市販きのこ(ブナシメジ、マッシュルーム、ナメコ、エノキ、エリンギ、マイタケ、シイタケ)中に含まれた場合でも、毒のツキヨタケが検出可能かどうかを検討するために、ITS領域のPCR産物(800bp)および各制限酵素で切断した時の泳動パターンを比較した。

(3) リアルタイム PCR 法の検討

PCR-RFLP法で得られた結果を、最終的に確認するためのリアルタイムPCR法について検討した。

C. 研究結果

1. 分子系統解析

クサウラベニタケについて、昨年までの結果から、遺伝的バリエーションがあるクサウラベニタケおよび近縁種の解析に、さらなる食用のウラベニホテイシメジのサンプル数が必要と考えられたため、栃木県および福島県からサンプルを収集し、これまでのデータと合わせて再解析した。また、outgroupとして、*Clitocybe dealbata*、*Collybia tuberosa*、*Rugosomyces carneus*、*Lyophyllum leucopaetum*を用いた。その結果、食用であるウラベニホテイシメジは他からよく分離した系統樹が得られ、データベース上の *Entoloma sarcopum* Ec3 (GenBank: AB301603.1) に一致した。一方、形態学的にクサウラベニタケと考えられたきのこは、分子系統樹解析結果から *Entoloma rhodopolium* clade I~III の3つのグループに分類された (Fig.1)。このうち、*Entoloma*

rhodopolium clade II が日本でクサウラベニタケと考えられてきたもので、データベース上の *Entoloma rhodopolium*_Er3 (GenBank: AB301602.1) に一致した。しかしながら、この種のきのこがよく分類研究されているヨーロッパでは、*Entoloma rhodopolium* と呼ばれているものは、今回解析した *Entoloma rhodopolium* clade III と考えられており、したがって、clade I および II は分類上では新種である可能性も示唆された。

一方、ツキヨタケとこれに似た間違えやすい食用きのこであるシイタケ、ムキタケおよびヒラタケは、お互いに属が異なることから分子系統樹解析では明確に分離され、クサウラベニタケのように近縁関係にあるきのこは少ない。また、遺伝的なバリエーションもほとんど見られなかった (Fig.2)。

2. PCR-RFLP 法

クサウラベニタケについて、本研究班で昨年度の研究成果として、生きのこに対して適用可能な PCR-RFLP 法を報告した。しかしながら、喫食前の中毒防止とともに、摂取した後の原因きのこ特定にも使える検査法の整備が必要であることから、加熱調理などの操作後で DNA 断片化が一部進んでいる試料に適用可能な 200 bp を標的とする Short-PCR-RFLP 法を検討した (Fig.3)。その結果、標的とした 200 bp の断片は 60 分の加熱および人工胃液処理 (トリプシン含まず) においてもバンドが消失せず、その後の *MsaI* 制限酵素処理で、食用のウラベニホテイシメジと確実に区別できた (Fig.4)。

一方、ツキヨタケと他の食用きのこである、シイタケ、ムキタケ、ヒラタケに対する PCR-RFLP 法では、*Bpu10I* および *SfiI* 制限

酵素処理した時に、ツキヨタケのみ切断されることから、他と明確に区別可能であることが判った。一方、*Sau96I* では、シイタケ以外のすべてのきのこが切断されるが、その泳動パターンはツキヨタケとそれ以外では異なることから、3つの制限酵素の複数をを用いることで判別同定可能である (Fig.5)。

市販の多様な食用きのこ存在下でも、その中に一部毒のクサウラベニタケが混入したような試料でも検出可能 (>20 mg の試料) あり、原型をとどめていない多種のきのこ中に混入しても検出できることが示唆された (Fig.6)。ツキヨタケにおいても、市販の多様なきのこ制限酵素処理後の泳動パターンは特徴的で、特に *Bpu10I* 処理ではツキヨタケが切断され他と明確に区別できた (Fig.7)。

さらに、毒性を持つツキヨタケのみ制限酵素で切断しないパターンでも検討するために、*DrdI* および *HincII* で処理したところ、食用のシイタケ、ヒラタケ、ムキタケのみ切断されることが判った (Fig.8)。これにより、制限酵素が万が一機能しなかった時に、毒のツキヨタケを食用と誤判定する危険性を除くことができる。

3. リアルタイム PCR 法

PCR-RFLP 法は、PCR 反応後にそれぞれに特異的な制限酵素で処理して、電気泳動した時の泳動パターンの違いで判別するもので、特殊な装置を必要としないことから、各都道府県衛生研究所だけではなく、保健所あるいは役所等でも実施可能な方法であり、検査の裾野を拡大する意味でも重要である。一方で、これらの結果を確認するための高感度な確定法としてリアルタイム PCR を用いた方法があれば最終確

認が可能となり結果の信頼性がさらに向上する。

クサウラベニタケについては、他に2つの近縁種が毒でありこの3系統を検出する必要があることから、マルチプレックス定性リアルタイムPCR法の開発を行った。その結果、プローブをうまく設計することで、それぞれを特異的に検出できることが明らかになった

(Fig.8)。一方、ツキヨタケについては、毒性を持つ分類学上の近縁種が存在しないことから、ツキヨタケのみに特異性が高いプライマー・プローブを設計したところ、食用のシイタケ、ムキタケ、ヒラタケには交差反応しない、ツキヨタケ時的検出が可能であることが明らかになった (Fig.9)。

D. 考察

植物性自然毒の中でも、きのこ毒について、原因物質が特定されているものは非常に少ない。また、ツキヨタケやカキシメジのように原因物質が明らかになっているものも存在するが、LC/MSなどで分析しようと考えても標準品が存在しないという重要な問題に直面する。さらに、野生きのこの場合には、その成分含量は非常に大きく変動し(数十から数百倍)、ある毒きのこを検出する場合、ある地域からの試料は検出可能であっても、別の地域からの試料は検出下限以下になることも想定される。その成分が明らかな唯一の原因物質である場合には、測定した試料が検出下限以下であれば問題はない。しかしながら、きのこ毒の原因物質には類縁体が多く存在し、かつ毒性を示す成分も複数あることが多いため、ある特定の化学的成分の分析のみに依存すると、リスク管理上問題となることが考えられる。

そこで、本研究班では食中毒被害事例が多いきのこについて、採取時期や採取地域、測定までの保存時間と状態により、化学成分(低分子有機化合物やペプチド、タンパク質)のように変動しない検査対象として、きのこ自身が持つ遺伝子塩基配列を用いた信頼性の高い、かつ迅速で簡便な試験検査法を確立し、これまで中毒被害防止と中毒発生時の原因きのこ特定のための、健康危機管理に必要な必要な試験法を整備することが極めて重要である。

今年度開発したクサウラベニタケとその近縁種、およびツキヨタケに対する迅速簡便な同定法とより高感度で確定検査としても重要な特異性の高い定性リアルタイムPCR法を開発することができた。調理加熱後の試料でも適用できることから、これを今後は全国の検査可能なところに普及していくことが必要であると考えられた。

最後に Table I には、過去13年間のきのこによる食中毒事例をまとめたものを示した。

E. 結論

1. クサウラベニタケは、日本国内では近縁種が3種存在することが明らかになった。これら毒性を持つ3種の簡便迅速な検査法としてPCR-RFLP法を加熱調理サンプルまで適用可能な方法として確立した。さらに、確定法としてMultiplex定性リアルタイムPCR法を開発した。
2. ツキヨタケについて、誤食原因であるシイタケ、ムキタケ、ヒラタケに対する簡便迅速な検査法としてPCR-RFLP法を他の多様な市販きのこ存在下でも適用可能方法として確立した。さらに、確定法としてマル

チプレックス定性リアルタイム PCR 法を開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 坂田こずえ, 小櫃冨未, 中村公亮, 小林友子, 野口秋雄, 福田のぞみ, 最上(西巻)知子, 手島玲子, 近藤一成: クサウラベニタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法(第 2 報): 加熱、消化処理サンプルへの適用

第 106 回日本食品衛生学会学術講演会 (2013.11)

2. 菅野陽平, 坂田こずえ, 野口秋雄, 中村公亮, 小林友子, 福田のぞみ, 佐藤正幸, 最上(西巻)知子, 手島玲子, 長澤栄史, 近藤一成: ツキヨタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法の検討

第 106 回日本食品衛生学会学術講演会 (2013.11)

3. 近藤一成, 中村公亮, 野口秋雄, 坂田こずえ, 小林友子, 福田のぞみ, 手島玲子, 最上(西巻)知子: 毒きのこドラフトゲノムシーケンス

第 106 回日本食品衛生学会学術講演会 (2013.11)

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 法に関して、昨年度出願したものの適用範囲拡大のために再出願した。

出願番号: 特願 2014-006142

出願人: 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称: キノコの同定方法、及び、同定

キット

出願日: 平成 26 年 1 月 16 日

発明者: 近藤一成、小櫃冨未、坂田こずえ

弊所整理番号: 26H006

さらにツキヨタケとシイタケ、ムキタケ、ヒラタケに対する PCR-RFLP 法およびリアルタイム PCR 法に関して出願した。

出願番号: 特願 2014-103555

出願人: 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称: きのこの同定方法および同定キット

出願日: 平成 26 年 5 月 19 日

発明者: 近藤一成

弊所整理番号: 26H105

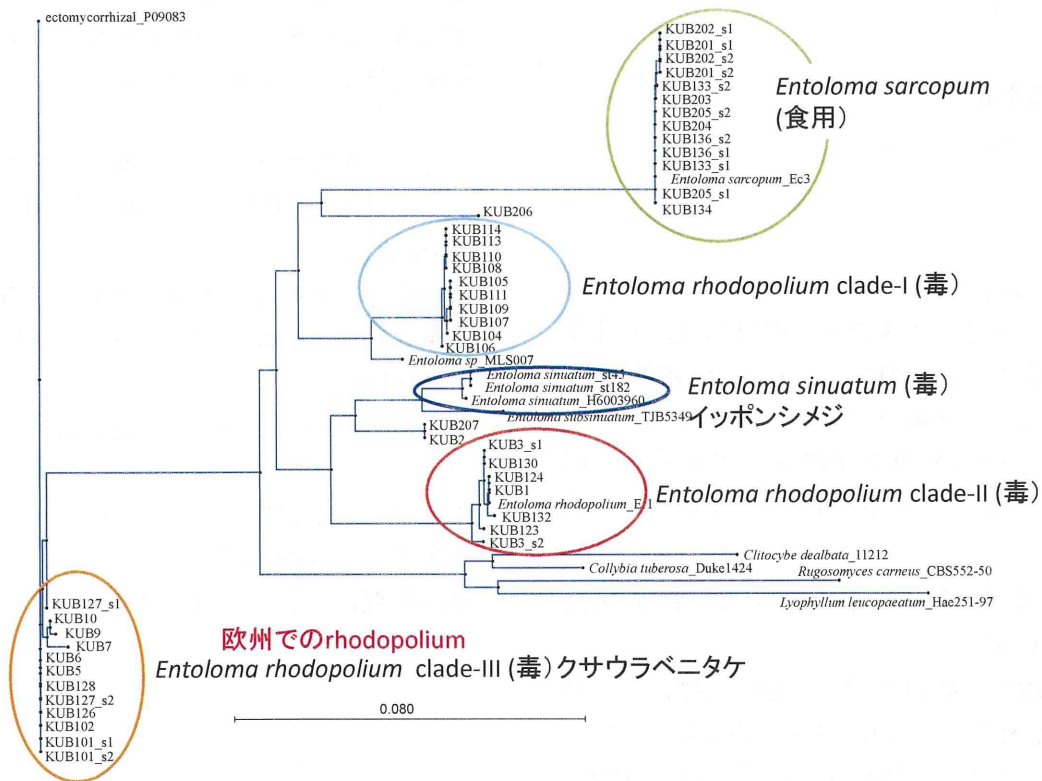


Fig.1. クサウラベニタケとその近縁種のカテゴリ

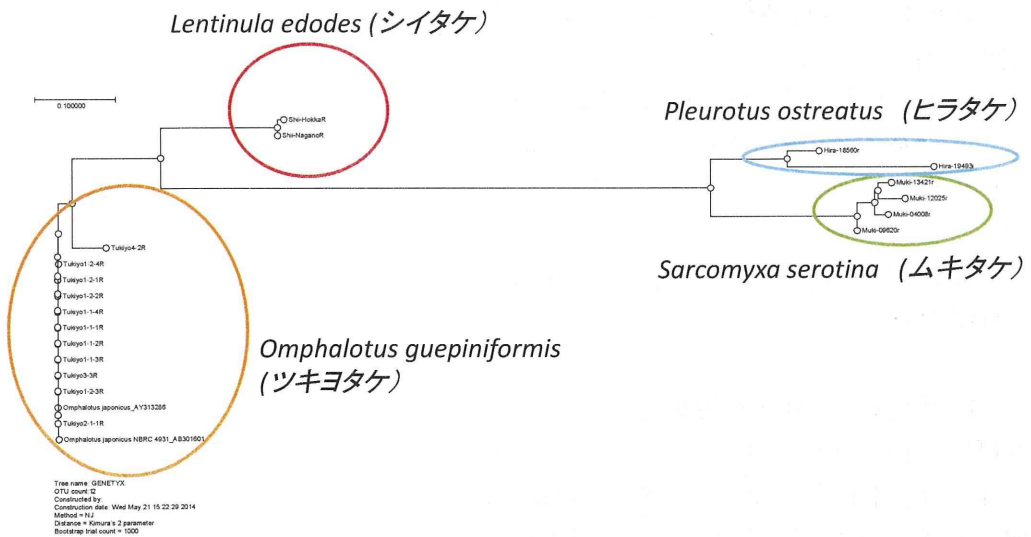


Fig.2. ツキヨタケとその形態学的に似ているきのこのこのカテゴリ