

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」  
平成 24～26 年度総合分担研究報告書

### 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・生化学部
研究協力者	坂田こずえ	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
研究協力者	菅野陽平	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
研究協力者	中村公亮	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
研究協力者	野口秋雄	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
研究協力者	福田のぞみ	国立医薬品食品衛生研究所・生化学部

#### 研究要旨

きのこによる食中毒は、毒きのこを食用きのこ間違えて摂取することが主な原因である。毒きのこの判別は、形態学的な判別で行われていたが、確実な判別は容易ではなかった。そのため、遺伝子の特定領域を標的とした判定法が望まれている。迅速に判別可能な遺伝子検査法を開発するために研究を行った。まず、標的配列の多様性を明らかにするために、日本国内で中毒被害が多いクサウラベニタケ、ツキヨタケ、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、国内より広くサンプリングし、誤食対象の食用きのこ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、クサウラベニタケについて、日本国内では3つの系統に分類されることを明らかにした。ツキヨタケは、地域による差異は見られなかった。

本分子系統樹解析結果をもとに、クサウラベニタケとその近縁種、および、ツキヨタケについて、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。本法は、特別な機器を必要としないことから広く検査を行うことが可能となる。また、より特異性が高い確定検査法として、リアルタイム PCR 法を同時に開発した。これらの方法は、広く用いられることで自然毒による食中毒被害を低減させることができると期待される。

#### 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、野生のきのこが発生時期に重なり、多くの人々がきのこ採取を行い、多くの場合、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り、摂取し中毒に至る事例が多い。国内で中毒事例が多いきのこについて

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。また、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、その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信頼性の高い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ーかどうかを含めて、現在まで詳しく検討されたことはなかった。そこで、本研究班においてクサウラベニタケとその近縁種、および、ツキヨタケについて全国からサンプルを収集して遺伝子配列を解析行い、系統樹解析を行った。その結果を用いて、生のきのこの判別に有効な PCR-RFLP 法を、また、本方法を改良して加熱調理食品残渣からでも検査可能にした。さらに、特異性、感度に優れた確定法としてリアルタイム PCR 法を確立した。

## B. 研究方法

### ITS 領域の解析

#### (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。

ツキヨタケは、島根県、長野県、新潟県で採取した。ムキタケ、ヒラタケは新潟県、北海道などで採取したものをを用いた

#### (2) DNA 抽出

試料をよく洗浄し、そのまま、または液体窒素で凍結粉碎後、DNeasy plant mini kit または CTAB 法で抽出を行った。

#### (3) 分子系統樹解析

ユニバーサルプライマー (ITS-1F, ITS-4B) を用いて ITS 全領域を PCR 増幅し、精製後アガロース電気泳動で得られたバンドを切り出して精製したものをシーケンス解析した。シーケンス解析で得た塩基配列は GENETYX ver12 および CLC Genomic workbench ver6.5 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。

#### (4) PCR-RFLP 法

### クサウラベニタケとその近縁種、ウラベニホテイシメジの検査法

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、Web ソフト (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。

DNA 抽出は、簡便にするために PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent を用いて行った。前述したユニバーサルプライマーで約 1 kb を PCR 増幅後、この PCR 産物をアガロース電気泳動で泳動して、そのパターンから、毒きのこであるクサウラベニタケの 3 系統と食用のウラベニホテイシメジの計 4 系統を判別同定した。DNA 分解がみられる食品残渣試料にも適用するために、約 200 bp の短い領域を標的とした PCR 反応を行い、同様に泳動パターンで食毒判別を行った。疑似食品残渣試料は、加熱後人工消化液処理したものをを用いた。

定性リアルタイム PCR 法は、クサウラベニタケ 3 系統とウラベニホテイシメジの合計 4 系統を同時に判別するために、マルチプレックス PCR とした。4 チャンネル検出のために、検出にはロツシュの LightCycler96 を用いた。毒のクサウラベニタケ 3 系統を区別しないのであれば、食用ウラベニホテイシメジと合わせて 2 チャンネル検出で、汎用されているアプライドバイオシステムの 7900 で測定可能である。

#### ツキヨタケの検査法

国内から集めた毒きのこであるツキヨタケおよび食用であるシイタケ（栽培、野生）、ヒラタケ、ムキタケのシークセンス解析の結果をもとに、系統判別および食毒判別が可能な制限酵素部位と種類を、遺伝子解析ソフト Genetyx を用いて行った。

DNA 抽出は、簡便にするために PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent を用いて同様にを行った。

PCR-RFLP 法は、クサウラベニタケと同様に手法により行った。食品残渣試料からも可能な方法として開発を行った。

定性リアルタイム PCR 法は、ツキヨタケを特異的に検出するプライマー・プローブを用いてアプライドバイオシステムの 7900 で行った。

また、クサウラベニタケとツキヨタケの検査法が、他の市販きのこに交差反応しないかどうか、市販の食用きのこ 6 種（シイタケ、マイタケ、ブナシメジ、エノキタケ、マッシュルーム、なめこ）も用いて検討した。また、陽性コントロールとして、陽性対照プラスミドを構築した。

### **C. 研究結果と考察**

#### **1 . 分子系統樹解析**

毒のクサウラベニタケ (*E. rhodopolium*) は、形態的には多様性が報告されているものの、これまで遺伝子配列に基づいた分類解析は行われていなかった。今回、全国から集めた試料の ITS 領域解析結果から、日本におけるクサウラベニタケは 3 系統に分けられ、いずれも食用のウラベニホテイシメジとも異なることが判明した。

#### **2 . PCR-RFLP 法**

系統樹解析の結果をもとに、迅速で簡便な判別法として、電気泳動の泳動パターンで判別する PCR-RFLP 法を開発するために、それぞれの系統に特異的な制限酵素を決定して解析した。クサウラベニタケ近縁種とウラベニホテイ

シメジの判別は、食用と毒を判別する目的のほか、3種の制限酵素を用いることで食毒判別に加えて、毒のクサウラベニタケ3系統をも区別することが可能であった。同様の手法をツキヨタケ判別にも応用した。制限酵素を3種類用いることで、食毒判別のほかに、間違えやすい食用のシイタケ、ムキタケ、ヒラタケも判別可能であった。本法は、主に生のきのこなどDNA分解があまりない試料に適用でき、食毒判別と系統分類が数時間(3-4時間程度)で可能である。

また、DNAがある程度分解されていると考えられる、調理加工された食品残渣や吐瀉物からも検査可能にする目的で、短い標的配列(200bp程度)を用いたshort-PCR-RFLP法も構築した。毒のクサウラベニタケ近縁種やツキヨタケを、他の食用きのこを判別することができた。本法は、系統分類まではできないが、市販のきのこ(エリンギ、マイタケなど)には交差反応することなく食毒判定を短時間(2-3時間程度)で可能であった。

### 3. 定性リアルタイムPCR法

(1)クサウラベニタケとその近縁種3系統およびウラベニホテイシメジ1系統を同時に同定するために、マルチプレックスリアルタイムPCR法を検討した結果、検出限界20コピー付近まで検出可能であり、条件によっては一部非常に弱い交差反応がみられることがあるものの、4系統を特異的に高感度で検出することができた。本方法は、迅速法であるPCR-RFLP法で判別不能で、確定検査が必要とされるときの確認検査に用いることができると考えられる。

(2)ツキヨタケは、国内では地域による遺伝的な多様性はほとんどないものの、諸外国では類似のきのこがいくつか報告されている。ツキヨタケを広く、かつ特異的に検出するために特異的な配列を選定し検討した結果、これまでに採取したツキヨタケを特異的に検出でき、他のきのこには交差反応せず、特異性の高い検出方法である。

### 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多くはない。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、あるいは分解のため分析時に試料中に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。また、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、化学的成分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

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。

本研究において、形態判別が難しい毒きのこクサウラベニタケと食用ウラベニホテイシメジ、および、毒きのこツキヨタケと食用シイタケ、ムキタケ、ヒラタケなど、を迅速に判別可能な検査法を開発した。本法で確実な結果が得られない場合には、今回同時に検討した定性リアルタイムPCR法を用いることで確定可能である。

今後は全国の検査可能なところに普及して現場で使っていくことが必要であると考えられた。

## 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4系統同時分析のための4色マルチプレックス定性リアルタイム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、確定法としてマルチプレックス定性リアルタイムPCR法を開発した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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*, doi: 10.1038/cddis. 2013.188.

### 2. 学会発表

1. 近藤一成, 小林友子, 中村公亮, 小櫃冴未, 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. 小櫃冴未, 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, 小櫃冴未, 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, 小櫃冴未, 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)
5. 坂田こずえ, 小櫃冴未, 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)
6. 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)

7. 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)

8. 坂田こずえ, 近藤一成, 中村公亮, 野口秋雄, 小林友子, 福田のぞみ, 最上(西巻)知子: 「Multiplex real-time PCR を用いたクサウラベニタケとその近縁種の同定」第 108 回日本食品衛生学会学術講演会 (2014.12)

9. 坂田こずえ, 近藤一成, 中村公亮, 野口秋雄, 小林友子, 福田のぞみ, 最上(西巻)知子「RFLP および Real-time PCR 法を用いたクサウラベニタケ複合種の分析法」第 51 回全国衛生化学技術協議会年会 (2014.11)

#### H.知的財産権の出願・登録状況

(1)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

発明者：近藤 一成 様、小櫃 冴未 様

(2)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 様

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 様、小櫃 冴未 様、坂田 こずえ 様

弊所整理番号：26H006

(3)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

出願日：平成 26 年 5 月 19 日

発明の名称：きのこの同定方法および同定キット

出願人：公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 様

発明者：近藤 一成 様(国立医薬品食品衛生研究所)

弊所整理番号：26H105