

表7 生ハム中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			伊	ES	仏	米	独	AT	HU	NZ	CA	豪
Hazard												
日本の食中毒件数			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EU の食中毒件数	High >10/100,000	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity (%death)	High は 0.1% 以上が 1 年以 上	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (DALYs)	High>100 DALYs per 1000 cases	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Source attribution		High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中での汚染率	2-3%	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
USDA Recall		>10 High, 1:Low	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0
RASFF Alert			1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
小計			12	12	12	15	13	12	12	12	13	12
国の national food control system												
基本的食品衛生法規		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HACCP 義務化		あれば 1、部分 2、なければ 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品安全担当部局の有無		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Canada の Risk ranking	1~3	3	3	1	1	3	2	3	3	1	3
小計		6	6	4	4	6	5	6	6	4	6
食品											
日本での喫食量		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
喫食頻度		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
意図される用途・喫食前にハザード が死滅する可能性		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中でのハザードの増減（加工の 効果）		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
日本への輸出量	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
交差汚染の可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計		10	10	10	10	9	9	9	9	9	9
	合計	720	720	480	600	702	540	648	648	468	648

表8 ソフトチーズ中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			仏	伊	米	豪	NZ	DK	独	NL	英	ES
Hazard												
日本の食中毒件数			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EUの食中毒件数	High >10/100,000	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity (%death)	High は0.1% 以上が1年以上	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (DALYs)	High>100 DALYs per 1000 cases	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Source attribution		High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中での汚染率	0.43%	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FDA Reject		>10 High, 1:Low	3	2	0	0	0	0	0	0	1	2
RASFF Alert			3						2	1	0	0
小計			17	13	11	11	11	11	13	12	12	13
国の national food control system												
基本的食品衛生法規		あれば1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HACCP義務化		あれば1、部分2、なければ3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

食品安全担当部局の有無		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Canada の Risk ranking		1~3	1	3	1	3	3	2	3	2	1	3
小計			4	6	4	6	6	5	6	5	4	6
食品												
日本での喫食量			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
喫食頻度			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性		No	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中でのハザードの増減(加工の効果)		Decrease	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
日本への輸出量			3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
交差汚染の可能性		Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計			10	10	10	10	9	9	9	9	9	9
		合計	680	780	440	660	594	495	702	540	432	702

表9 果実中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			米	Phi	MX	チリ	タイ	ECA	豪	Kr	台湾	SA	NZ	中国	Peru	仏	Br	VN
Hazard																		
日本の食中毒 件数			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EUの食中毒 件数	High >10/100,000	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity (%death)	Highは0.1% 以上が1年以 上	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (DALYs)	High>100 DALYs per 1000 cases	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Source attribution		Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品中での汚 染率	2-3%	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FDA Recall	>10 High, 1:Low		1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
RASFF Alert			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1
小計			11	11	13	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	13	11	11
国の national food control system																		
基本的食品衛生法規		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

HACCP 義務化		2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2
食品安全担当部局の有無	あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Canada の Risk ranking	1~3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3
小計		5	7	7	7	7	7	6	6	7	7	6	7	7	4	7	7
食品																	
日本での喫食量		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
喫食頻度		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品中でのハザードの増減（加工の効果）		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
日本への輸出量		3	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
交差汚染の可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計		10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
合計		550	693	819	693	693	693	528	528	616	528	528	616	672	416	616	616

表 10 燻煙魚中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			CH	英	NZ	チリ	仏	Ca	タイ	Phi	Nor	米	中	ES	豪	DK
Hazard																
日本の食中毒件数			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EU の食中毒件数	High >10/100,000	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity (%death)	High は 0.1%以上 上が 1 年以上	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (DALYs)	High>100 DALYs per 1000 cases	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Source attribution		Low	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中での汚染率	2-3%	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FDA Recall	>10 High, 1:Low		1	3	1	3	1	3	2	1	2	1	3	2	1	1
RASFF Alert			1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2
小計			13	15	13	15	15	15	14	13	14	13	15	14	13	14
国の national food control system																
基本的食品衛生法規		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HACCP 義務化			1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1
食品安全担当部局の有無		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Canada の Risk ranking		1~3	3	1	3	3	1	1	3	3	1	1	3	3	3	2
小計			6	4	6	7	4	4	7	7	4	4	7	6	6	5

食品														
日本での喫食量	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
喫食頻度	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中でのハザードの増減（加工の効果）	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
日本への輸出量	3	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
交差汚染の可能性	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計	10	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8
合計	780	540	702	945	540	540	882	819	448	416	840	672	624	560

表 11 *Listeria monocytogenes* の生ハム、ソフトチーズ及び燻煙魚の比較

非加熱食肉製品	伊, ES	独	NZ, HU, 豪州	米	AT	仏	CA
Hazard	12	13	12	15	12	12	13
NFCS	6	6	6	4	5	4	4
Food	10	9	9	10	9	10	9
Total	720	702	648	600	540	480	468

ソフトチーズ	伊	独, ES	仏	豪	NZ	NL	DK	米,	英
Hazard	13	13	17	11	11	12	11	11	12
NFCS	6	6	4	6	6	5	5	4	4
Food	10	9	10	10	9	9	9	10	9
Total	780	702	680	660	594	540	495	440	432

Smoke fish	チリ	タイ	中国	Philippines	CH	NZ	ES	豪	DK	仏, Ca,	Nor	米
Hazard	15	14	15	13	13	13	14	13	14	15	14	13
NFCS	7	7	7	7	6	6	6	6	5	4	4	4
Food	9	9	8	9	10	9	8	8	8	9	8	8
Total	945	882	840	819	780	702	672	624	560	540	448	416

表 12 Smoke fish 中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング (重量ベース)

			チリ	タイ	Phi	豪	NZ	英	Ca	仏	米	CH	中国	NO	ES	DK
Hazard																
日本の食中毒件数			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EU の食中毒件数	High >10/100,000	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity (%death)	High は 0.1% 以上が 1 年以上	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (DALYs)	High>100 DALYs per 1000 cases	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Source attribution		Low	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中での汚染率	2-3%	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FDA Recall			3	2	1	1	1	3	3	1	1	1	3	2	2	1
RASFF Alert			1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2
小計			15	14	13	13	13	15	15	15	13	13	15	14	14	14
国の national food control system																
基本的食品衛生法規		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HACCP 義務化			2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1

食品安全担当部局の有無	あれば1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Canada の Risk ranking	1~3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	3	3	1	3	2
小計		7	7	7	6	6	4	4	4	4	6	7	4	6	5
食品															
日本での喫食量		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
喫食頻度		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中でのハザードの増減（加工の効果）		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
日本への輸出量		3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
交差汚染の可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計		10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8
合計		1050	980	819	702	702	540	540	540	468	702	840	448	672	560

表 13 燻煙魚中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキングの輸入届出件数ベースと重量ベースでの比較

	届出ベース	score	重量ベース	Score	変化
1	チリ	945	チリ	1050	Up
2	タイ	882	タイ	980	Up
3	中国	840	中国	840	不変
4	フィリピン	819	フィリピン	819	不変
5	スイス	780	オーストラリア	702	Up
6	NZ	702	NZ	702	Down
7	スペイン	672	スイス	702	Down
8	オーストラリア	624	スペイン	672	不変
9	デンマーク	560	デンマーク	560	不変
10	フランス	540	英	540	不変
11	カナダ	540	カナダ	540	不変
12	イギリス	540	フランス	540	不変
13	ノルウェー	448	米	468	Up
14	米	416	ノルウェー	448	不変

表 14 果実中の *Salmonella* のリスクランキング

			米	Phi	MX	チリ	タイ	ECA	豪	Kr	台	SA	NZ	中国	Peru	仏	Br	VN
Hazard																		
日本の食中毒 件数			2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
EU の食中毒 件数	High >10/100,000	Low	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (%death)	High は 0.1%以 上が 1 年以上	High	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity (DALYs)	High>100 DALYs per 1000 cases	High	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Source attribution		Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品中での汚 染率	2-3%	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FDA Recall	>10 High, 1:Low		1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2
RASFF Alert			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計			11	11	13	11	11	11	11	11	11	11	11	12	11	11	11	12
国の national food control system																		
基本的食品衛生法規		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HACCP 義務化			2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2

食品安全担当部局の有無	あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Canada の Risk ranking	1~3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3
小計		5	7	7	7	7	7	6	7	7	7	6	7	7	4	7	7
食品																	
日本での喫食量		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
喫食頻度		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品中でのハザードの増減（加工の効果）		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
日本への輸出量		3	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
交差汚染の可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計		10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
合計		550	693	819	693	693	693	528	528	616	616	528	672	616	352	616	672

表 15 果実について *Listeria* と *Salmonella* の比較

<i>Listeria</i>	米	Phi	MX	チリ	タイ	ECA	豪	Kr	台	SA	NZ	中国	Peru	仏	Br	VN
Hazard	11	11	13	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	13	11	11
NFCS	5	7	7	7	7	7	6	6	7	7	6	7	7	4	7	7
Food	10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Total	550	693	819	693	693	693	528	528	616	616	528	616	672	416	616	616

<i>Salmonella</i>	米	Phi	MX	チリ	タイ	ECA	豪	Kr	台	SA	NZ	中国	Peru	仏	Br	VN
Hazard	11	11	13	11	11	11	11	11	11	11	11	12	11	11	11	12
NFCS	5	7	7	7	7	7	6	6	7	7	6	7	7	4	7	7
Food	10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Total	550	693	819	693	693	693	528	528	616	619	528	672	619	352	616	672

表 16 魚介類中の *Salmonella* のリスクランキング

			中国	タイ	韓国	ネ シ ア	Nor	米国	チリ	Mya n	台湾	Phi	Ca	印	豪	Ice	NZ	仏
Hazard																		
日本の食中毒 件数			2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
EU の食中毒 件数	High >10/100,000	Low	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (%death)	High は 0.1% 以上が 1 年以上	High	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity (DALYs)	High>100 DALYs per 1000 cases	High	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Source attribution		Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品中での 汚染率	2-3%	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FDA Recall			3	3	2	1	0	0	1	1	0	1	1	3	0	0	0	1
RASFF Alert			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小計			12	12	11	10	9	9	10	10	9	10	10	12	9	9	10	9
国の national food control system																		
基本的食品衛生法規		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HACCP 義務化			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

食品安全担当部局の有無	あれば1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Canada の Risk ranking	1~3	3	3	3	3	1	1	3	3	3	3	1	3	3	3	3	1
小計		6	6	6	6	4	4	6	6	6	6	4	6	6	6	6	4
食品																	
日本での喫食量		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
喫食頻度		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
食品中でのハザードの増減（加工の効果）		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
日本への輸出量		3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
交差汚染の可能性		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
小計		15	15	15	15	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
合計		1080	1080	990	990	504	504	840	840	756	840	560	1008	756	756	840	504

国名略号一覧

伊：イタリア

ES：スペイン

仏：フランス

米：アメリカ合衆国

独：ドイツ

AT：オーストリア

HU：ハンガリー

NZ：ニュージーランド

CA：カナダ：

豪：オーストラリア

DK：デンマーク

NL：オランダ

英：イギリス

Phi：フィリピン

MX：メキシコ

ECA：エクアドル

Kr：韓国

SA：南アフリカ共和国

Peru：ペルー

Br：ブラジル

VN：ベトナム

Nor：ノルウェー

ネシア：インドネシア

Myan：ミャンマー

印：インド

Ice：アイスランド

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）
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」
平成 27 年度分担研究報告書

きのこによる食中毒低減のための分子系統樹解析と検査法開発

研究分担者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

日本国内で発生するきのこ食中毒は、大部分がクサウラベニタケ、ツキヨタケによるものである。特に近縁種が多く、形態学的な判別が困難なクサウラベニタケ、中毒事例数が常に多いツキヨタケについて、国内より広くサンプリングし、ITS 領域のほか、RPB2 領域でもシーケンス解析を行うことにより、精度を高めた分子系統樹解析を行い、海外の種と比較した。その結果、日本のクサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium*) は、3 つのグループに分類され、また、既に形態と遺伝子解析がされている欧州 *Entoloma rhodopolium* とは異なることが明らかになった。迅速簡便な検査法開発の一環として、LAMP 法を用いて目視判別（蛍光）で判定可能な方法を、ツキヨタケをモデルに検討した結果、可視光下においても緑色蛍光が観察され高感度に検出可能であると示唆された。

本法により、喫食前検査での中毒発生防止と中毒発生時の検査での原因きのこ不明の事例の特定に繋がり、自然毒による食中毒のリスク管理に大きく貢献できるものと考えられた。

研究協力者	中村公亮	国立医薬品食品衛生研究所
	野口秋雄	国立医薬品食品衛生研究所
	坂田こずえ	国立医薬品食品衛生研究所
	菅野陽平	北海道立衛生研究所

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）による食中毒被害は毎年発生する。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

宅に持ち帰り、摂取し中毒に至る場合が多いと考えられる。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。また、一方で、きのこによる中毒被害事例中、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。これらの現状を踏まえて、植物性自然毒の中で、きのこによる食中毒被害低減と原因きのこ特定の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、もう一つは迅速な検査方法の確立と整備である。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*) 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、欧州における *Entoloma rhodopolium* として公開されているものと同一かどうかを含めて、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を解析を行い、ITS 領域を用いた系統樹解析を行い、その結果を用いて迅速分析法として PCR-RFLP 法をこれまで開発してきた。本年度は、日本国内における、クサウラベニタケ分類をさらに精度よく行い、欧州のそれと比較解析を行うために、新たに RPB2 領域 (RNA polymerase II second largest subunit) の配列を解析した。

また、迅速検査法を野外においても可能な方法を検討するために、LAMP 法を用いて、目視判別可能な手法を試みた。

B. 研究方法

I. クサウラベニタケとその近縁種の ITS 及び RPB2 領域を用いた分子系統解析

(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、DNA 抽出精製キット DNeasy Plant Mini Kit または CTAB 法で抽出を行った。

(3) 分子系統樹解析

RPB2 用プライマー対 (rpb2-6f, rpb2-7r) を用いて、1 回目の PCR 反応を行い、rpb2-6fi, rpb2-7ri プライマー対を用いて nested PCR を行った。電気泳動後バンドを切り出し精製してシークエンス解析を行った。得られた塩基配列は GENETYX および CLC Genomic workbench ver8.5 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。欧州で *Entoloma rhodopolium* として公共データベース公開されている ITS および RPB2 領域の配列を新たに修得して、日本国内 *Entoloma rhodopolium* と比較のために用いた。