

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 28 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）

研究協力者：野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ（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。特に近縁種が多く複数種からなると考えられ、形態学的な判別が困難なクサウラベニタケについて、種の再分類と毒性との関連付けを行った。日本のクサウラベニタケは学名 *Entoloma rhodopolium* と考えられてきたが、今年度は ITS1-5.8S-ITS および RPB2 領域のデータを欧州の *E. rhodopolium* とその近縁種に解析データと比較するために、同一分子系統解析ソフトウェアを用いて比較解析した結果、日本のクサウラベニタケは 3 グループに分類され、すべて欧州起源である *E. rhodopolium* とは異なること、その近縁種 *E. sinuatum* や *E. subsinuatum* と異なること、*E. majaloides* と *E. eminens* 等既知の *Entoloma* 属きのこのいずれとも異なることが判明した。日本のクサウラベニタケは新種であることから、以下のように命名した、*E. lacus*, *E. subrhodopolium*, *E. pseudorhodopolium*。このうち、食中毒事例から回収した試料の解析から、日本で食中毒が報告されるのは、*E. subrhodopolium* と *E. pseudorhodopolium* である。今年度、高等植物による食中毒事例が多く発生した。有毒植物の簡易分析法 PCR-RFLP 法は分担研究者紺野らが行っているが、確定検査法の開発も並行して行うために、リアルタイム PCR を用いた手法を検討した結果、有毒植物に特異的な方法が確立可能であることが示唆された。引き続き検討を行い、分析法確立を行うとともに国内で実施してもらうように整備していく。

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。一つは、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、昨年度 RPB2 領域 (RNA polymerase II second largest subunit) の配列を解析した。

欧州のグループから報告された論文において、欧州起源 *Entoloma rhodopolium* のほかに多くの *Entoloma* 属きのこの分類がされている。そこで、我々のデータと比較解析するために、論文で用いられている系統解析ソフト MEGA を用いて再度解析を行うことで、日本のクサウラベニタケの分類を再検討する。

高等植物では、今年度食中毒事例が多く、死亡者も報告された。そこで、有毒植物の確定検査のために、リアルタイム PCR 法を検討する。

## B. 研究方法

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 MEGA7 ソフトウェアによる分子系統比較解析

### (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。

### (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) 分子系統樹解析による分類

得られた塩基配列は 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。欧州データと比較するために、分子系統樹解析に MEGA7 ソフトウェアを用いた。

#### 有毒植物のリアルタイム PCR 法の検討

スイセン、バイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオ、トリカブトをターゲットとしたリアルタイム PCR 法の検討を行った。

### C. 研究結果と考察

#### 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 MEGA7 ソフトウェアによる分子系統比較解析

日本国内で毒きのことされているクサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium* と考えられているが詳細不明のまま) の分類と毒性を明らかにするために、これまでに ITS 領域のシーケンス解析の結果を用いてクサウラベニタケの系統分類を行ってきた。昨年度、系統分類解析の精度をさらに高めて 2015 年に新たに公開されたデータベース上の配列から欧州のものと比較検討するために RPB2 領域をシーケンス解析した。

そこで、本年度は ITS1-5.8S-ITS2 領域および RPB2 領域の解析データを用いて、欧州起源 *Entoloma rhodopolium* とその近縁種のシーケンスと系統樹解析結果を日本のクサウラベニタケのそれと比較するために、欧州グループが論文で用いている系統解析ソフトウェア MEGA7 を

使用して比較解析し、分類を再検討した

(昨年度は、CLC Genomicworkbench を使用)。その MEGA 解析の結果から、まず、クサウラベニタケは欧州起源 *Entoloma rhodopolium* とは異なり、また近縁の *Entoloma nidorosum* や *Entoloma majaloides* と異なる種である。さらに、既存のどの *Entoloma* の種とも異なっており、新種であると考えられたことから、次のように新たに

*Entoloma latcus*,

*Entoloma subrhodopolium*,

*Entoloma pseudorhodopolium*

と命名した。

また、毒性との関係について中毒事例から回収した検体を検査したところ、*Entoloma subrhodopolium*, *Entoloma pseudorhodopolium* であることが確認されたが、一方で、*Entoloma latcus* は中毒事例品には存在しなかった。以上の結果から、国内で中毒の原因となるのは、*Entoloma subrhodopolium*, *Entoloma pseudorhodopolium* の2つのきのこであると判明した。本研究の結果から、長年分類が曖昧であったクサウラベニタケの分類と毒性との関係を明らかにすることができた。

#### 有毒植物のリアルタイム PCR 法の検討

今年度は、各高等植物のバーコーディング領域である *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* をデータベースおよびシーケンス解析により収集した。

データベース (NCBI) から入手できなかったニラ *matK*, オオバギボウシ *rbcL*, オオバギボウシ *matK*, オオバギボウシ

trnH-psbA, ギョウジャニンニク  
trnH-psbA, チョウセンアサガオ rbcL, チョウセンアサガオ matK, ニリンソウ rbcL, ヤマトリカブト rbcL, ヤマトリカブト matK, ヤマトリカブト trnH-psbA について、PCR を行い、得られた増幅産物についてシーケンス解析を行った。データベースおよびシーケンス解析によって収集した各有毒植物と誤認しやすい食用植物の rbcL, matK および trnH-psbA の配列のアライメント解析を行った。

#### D. 結論

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 MEGA7 ソフトウェアによる分子系統比較解析

食中毒が多いクサウラベニタケの再分類を行った結果から、日本のクサウラベニタケ 3 種は新種であり、中毒はそのうち 2 種で起きることを明らかにした。本結果は、食中毒が起きるクサウラベニタケ種の同定が確実に可能になり、中毒防止と原因特定に威力を発揮すると考えられた。

有毒植物のリアルタイム PCR 法の検討

食中毒事例の多い、あるいは死亡事例のある有毒植物をターゲットとした特異的なリアルタイム PCR 法が開発可能であると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 菅野陽平、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、福田のぞみ、鈴木智宏、近藤一成 : PCR-RFLP によるツキヨタケの迅速判別法、日本食品衛生学会誌、印刷中

2) Kazunari Kondo, Kosuke Nakamura, Takumi Ishigaki, Kozue Sakata, Saemi Obitsu, Akio Noguchi, Nozomi Fukuda, Eiji Nagasawa, Reiko Teshima, Tomoko Nishimaki-Mogami.

Molecular phylogenetic analysis of new *Entoloma rhodopolium*-related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP. *Scientific Reports*, accepted.

##### 2. 学会発表

1) 菅野陽平、青塚圭二、佐藤正幸、鈴木智宏、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、近藤一成 : Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いたツキヨタケの迅速判別法の検討、第 112 回 日本食品衛生学会学術講演会 (北海道)、2016 年 10 月

2) 坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、石垣拓実、加藤怜子、近藤一成 : ITS-RPB2 領域を用いたクサウラベニタケ系統分類と中毒事例検体の分析 : 第 53 回全国衛生化学技術協議会年会 (青森)、2016 年 11 月

##### 3. 知的財産権の出願・登録状況

なし



日本で食中毒が多いキノコの一つ、  
「クサウラベニタケ」はクサウラベニタケではない



*Entoloma rhodopolium* 欧州起源（無毒）  
= クサウラベニタケ（日本）



clade-I



*E. lacus*  
(新種)

clade-II

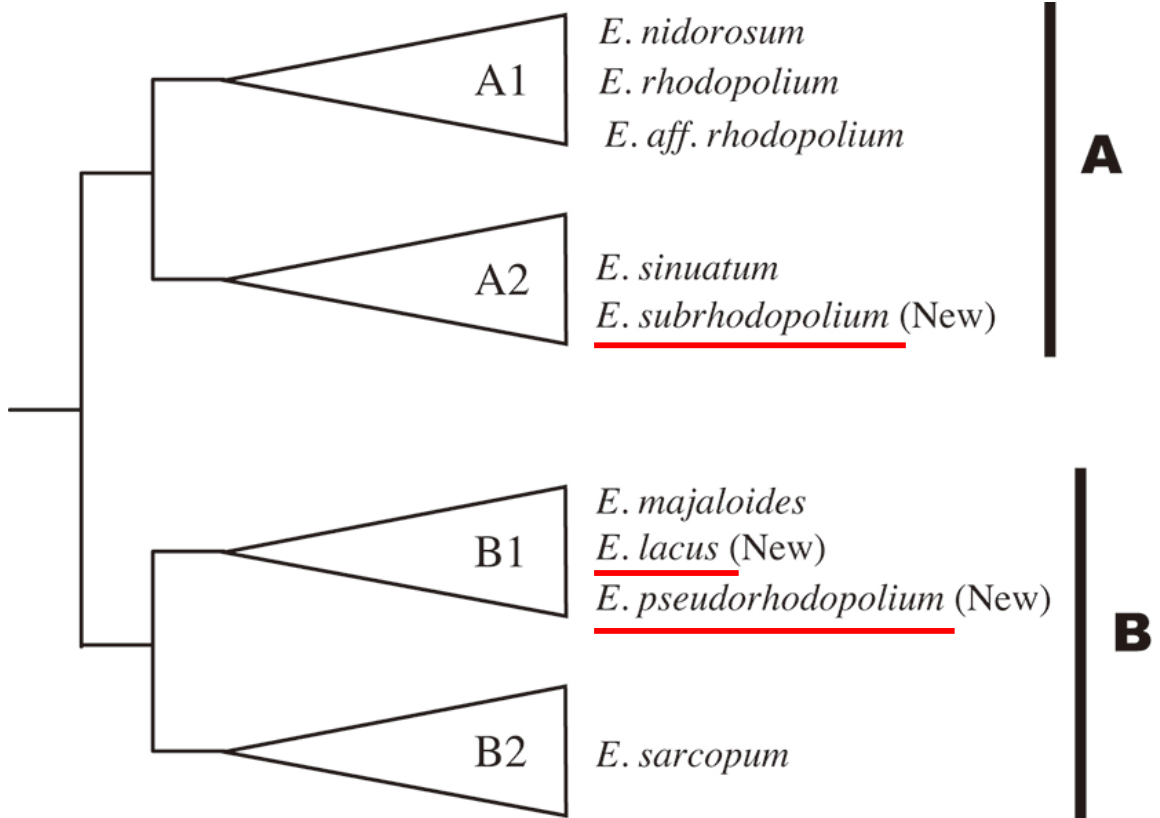


*E. subrhodopolium*  
(新種)

clade-III



*E. pseudorhodopolium*  
(新種)



クサウラベニタケの2遺伝子座により分類解析  
した結果、従来考えられてきた*E. rhodopolium*を含めて  
既存種とは異なる新しい種であることが示された

# 食用直物と誤食される主な有毒植物

食 ニラ 毒 スイセン



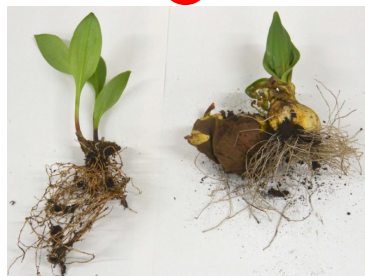
消費者庁HP

食 ギボウシ 毒 バイケイソウ



厚労省HP

食 ギョウジャニンニク 毒 イヌサフラン



消費者庁HP

食 ゴボウ 毒 チョウセンアサガオ



岡山県HP

食 ニリンソウ



毒 トリカブト



厚労省HP

有毒植物の判別検討に用いた高等植物

# 葉緑体上のDNAバーコーディング領域の配列①

	和名	学名	rbcL		matK		tmH-psbA	
			length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.
食	ニラ	<i>Allium tuberosum</i>	1,434	JN969266	854	KC704497	577	GQ434888
毒	ニホンズイセン	<i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i>	1,334	HM640487	1,563	HM640601	644	GQ923940
毒	スイセン	<i>Narcissus tazetta</i>	703	GQ436660	1,565	HM011047	558	GQ435346
毒	スイセン属	<i>Narcissus elegans</i>	1,341	AF116972	882	KU127381		

食	オオバギボウシ (ウルイ)	<i>Hosta sieboldiana</i>	1,469	this study	1,604	this study	686	this study
食	タマノカンザシ	<i>Hosta plantaginea</i>	1,334	HM640480	1,566	HM640594	656	KC704294
食	タチギボウシ	<i>Hosta rectifolia</i>	1,327	L10253				
毒	バイケイソウ	<i>Veratrum album</i> subsp. <i>oxysepalum</i>	1,225	JN417478	1,536	JF807719	314	JF807759
毒	コバイケイソウ変種	<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>stamineum</i>			1,536	JF807731	301	JF807783
毒	ミカワバイケイソウ	<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>micranthum</i>			1,536	JF807729	289	KT254787
毒	コバイケイソウ	<i>Veratrum stamineum</i>	1,384	KM242996	1,555	AB040184		
毒	シュロソウ属	<i>Veratrum album</i>	1,390	D28168	1,537	JF807687	294	KJ395078
毒	シュロソウ属	<i>Veratrum maaackii</i>	1,390	AB018849	1,556	AB040183	309	JF807786
毒	シュロソウ属	<i>Veratrum parviflorum</i>	1,365	AJ235813				
毒	シュロソウ属	<i>Veratrum virginicum</i>	1,371	AJ276348	1,509	KM242777		

# 葉緑体上のDNAバーコーディング領域の配列②

	和名	学名	rbcL		matK		tmH-psbA	
			length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.
食	ギョウジャニンニク	<i>Allium victorialis</i> var. <i>Platyphyllum</i>	1,334	HM640483	1,563	HM640597	697	this study
食	ギョウジャニンニク種	<i>Allium victorialis</i>	703	KC704768	854	KC704498	578	HQ690620
毒	イヌサフラン	<i>Colchicum autumnale</i>	649	KC899451	827	FR865065	477	JF934069
毒	イヌサフラン属	<i>Colchicum agrippinum</i>	642	KC899465	423	KC899635		
毒	イヌサフラン属	<i>Colchicum speciosum</i>	1,399	L12673	1,553	AB040181	439	JF934163
毒	イヌサフラン属	<i>Colchicum montanum</i>	1,334	KC796873	1,532	JN417407	439	JF934134
毒	イヌサフラン属	<i>Colchicum bommuelleri</i>	1,356	KC796865	1,532	JN417406	439	JF934161

食	ゴボウ	<i>Arctium lappa</i>	1,244	AB530978	985	AY013520	478	AB727572
毒	チョウセンアサガオ	<i>Datura metel</i>	663	JN244364	815	GQ434220	468	JX467620
毒	ケチョウセンアサガオ	<i>Datura innoxia</i>	932	EF438895	1,264	JX996059	517	KC146630
毒	シロバナヨウシュチョウセンアサガオ	<i>Datura stramonium</i>	1,408	DSU08611	1,527	KP756825	514	KC146637

食	ニリンソウ	<i>Anemone flaccida</i>	1,477	this study	1,533	AB110530	480	AB117604
食	イチリンソウ属	<i>Anemone nemorosa</i>	1,408	KM360632	869	JN895407		
?	イチリンソウ属	<i>Anemone americana</i>	1,428	EU053901	1,161	AF542590	375	KP643346
?	シュウメイギク	<i>Anemone hupehensis</i>	1,395	FJ626577	1,212	FJ626488		
毒	ヨウシュトリカブト	<i>Aconitum napellus</i>	1,424	EU053898	863	JN895413	222	ZPLPP033-13
毒	オクトリカブト	<i>Aconitum japonicum</i> ssp. <i>Subcuneatum</i>	666	LC036440	1,224	LC036452	211	LC152848
毒	ヤマトリカブト	<i>Aconitum japonicum</i>	1,480	this study	1,816	this study	324	this study
毒	ウゼントリカブト	<i>Aconitum okuyamae</i>	666	LC036442	1,224	LC036456	211	LC152849
毒	カワチブシ	<i>Aconitum grossedentatum</i>	665	LC152818	1,243	LC152826	204	LC152853
毒	センウズモドキ	<i>Aconitum jaluense</i> subsp. <i>iwatekense</i>	666	LC036441	1,224	LC036454	211	LC036489
毒	レイジンソウ	<i>Aconitum loczyanum</i>	665	LC152819	1,243	LC152828	212	LC152855
毒	エゾトリカブト	<i>Aconitum sachalinense</i>	666	LC036445	1,224	LC036459	211	LC036496

有毒植物の判別検討に用いた配列情報

NCBI等の公共データベース及びシーケンス解析から必要な配列を得た