

LAMP 法開発 (LAMP 法を用いた有毒きのこ検出法の開発)

研究分担者 菅野陽平 北海道立衛生研究所

研究要旨

日本国内で発生するきのこの食中毒は、大部分がツキヨタケ、クサウラベニタケによるものである。中毒事例数が常に多いツキヨタケおよび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について、喫食前に食毒が判別できれば食中毒の発生件数を大きく低減することが可能となる。LAMP 法は目視でも判定可能な遺伝子増幅法であり、野外でも実施可能であることから、喫食前検査法として LAMP 法を利用したツキヨタケおよびクサウラベニタケの迅速かつ簡便な検査法の構築について検討した。ツキヨタケの検出を目的とした LAMP 法については、ツキヨタケと誤認されやすいシイタケやヒラタケ、ムキタケを含む多数の食用きのここと交差せず、ツキヨタケのみを高精度に検出する LAMP 法を開発した。さらに、本法は加熱や消化の影響を受けにくいことから、きのこ食中毒発生時の原因特定にも役立てられると考えられる。また、クサウラベニタケにおいては、LAMP 法の開発に向けて選択的に検出する新たな知見が得られた。

本法は、きのこ採取現場でも実施可能な喫食前検査として中毒発生予防につながると期待される。そして、中毒発生時における検査でも原因きのこの特定に役立てられ、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、多数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、喫食し中毒に至る場合が多いと考えられる。国内できのこによる中毒事例について過去 10 年以上のデータを解析すると、ツキヨタケとクサウラベニタケの 2 つのきのこが多くを占める。

また一方で、きのこによる食中毒被害で、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、喫食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ツキヨタケについて、野外においても実施可能な迅速検査法として、LAMP法を用いたツキヨタケ検出法について検討した。LAMP法は、PCR法の代わりに4種類のプライマーを用いて、等温で反応が進む遺伝子増幅法で、遺伝子増幅が進行すると紫外光下で強い緑色の蛍光を示し、自然光下においても明確な緑色を示す。これまでツキヨタケのITS領域を標的として増幅を示す反応系を構築しており、ツキヨタケ以外の食用キノコに対して交差性を確認した。また、実際に食中毒を引き起こしたツキヨタケの残存試料(食中毒検体)を対象として検討も行った。さらに、我が国においてツキヨタケと共に食中毒の報告の多いクサウラベニタケの検出を目的としたLAMP法の構築についても検討を行った。

B. 研究方法

(1) 試料

ツキヨタケは、山形県、島根県で採取した。また、ツキヨタケの食中毒検体試料は、秋田県、山形県より分与されたものを試料として用いた。

シイタケ、ヒラタケ、ムキタケなどの食用キノコは国内産(北海道、秋田県、新潟県、茨城県、佐賀県)で市販されていたものを試料として用いた。

クサウラベニタケは、東京都、北海道、山形、島根、鳥取、富山、新潟で採取した。

ウラベニホテイシメジは、福島、茨城、鳥取で採取したもの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 (QIAGEN)もしくは簡易DNA抽出キット PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific)でDNA抽出を行った。

また、試料を30分加熱および人工消化液60分間浸漬処理した擬似加熱消化試料から簡易DNA抽出キットを用いてDNA抽出を行った。

(3) LAMP法

Loopamp DNA増幅試薬キット(栄研化学)を用い、必要に応じて、Loopamp 蛍光・目視検出試薬(栄研化学)を反応液に添加してLAMP法を実施した。

ツキヨタケのLAMP法は、以下のプライマーを使用した。

LAMP_Tukiyo-F3(ID74) :

5' - TGCTTCTGAAGCTTGGACTG -3'

LAMP_Tukiyo-B3(ID74) :

5' - ACACCTCCACAGCTCTTTGA -3'

LAMP_Tukiyo-FIP(ID74) :

5' - CCGACTAATCCGGTTTCCGC

TGGCTTGCTGGCATCACTAG -3'

LAMP_Tukiyo-BIP(ID74) :

5' - ACGCCTTGGTGGTTTGACAAGG

AGACAGAGCAACCTGAGTTG -3'

の4本、および

LAMP_Tukiyo-F3(ID21) :

5'- GAAGCTTGGACTGTGGAG -3'

LAMP_Tukiyo-B3(ID21) :

5'- GTGaaAACAGACGATTAGAGAG -3'

LAMP_Tukiyo-FIP(ID21) :

5'- ACACCAAGGCTTagGTCCGA

ACtaGATGTTCTCAGCTCCT -3'

LAMP_Tukiyo-BIP(ID21) :

5'- ATCTACGCCTTgtGGTTTGAT

TTGAAATGAAAGCAGACAGA -3'

の4本の、2つの組合せで行った。

またクサウラベニタケのLAMP法は、以下のプライマーを使用した。

Kusa3-2_F3 :

5'- TGGAGGAAAATGCCATTCC -3'

Kusa3-2_B3 :

5'- TAGAGGTCGACAGACGCG -3'

Kusa3-2_FIP :

5'- AGATTTGCGGGATCACGGTG

AACCTTGCACCAAGGTGTTTCG -3'

Kusa3-2_BIP :

5'- AAGGACGACATCAGCCCAG

AGGGGCATCCGTATACAGGCG -3'

の4本、

Kusa1-2_F3 :

5'- CCCATTCCCAAACACCTTGT -3'

Kusa1-2_B3 :

5'- GGACCAGCTGCTGATTTTCC -3'

Kusa1-2_FIP :

5'- CGTCCTTGCGCCGTAGCTTTTT

GTGTCTGGATGGGTGTTTCAT -3'

Kusa1-2_BIP :

5'- CCAGAGGTCTCTGTTGTCCGTG

TAGAGGTCGACAGACGCG -3'

の4本、および

Kusa1-3_F3 :

5'- TGggGGTTAGAGTCGTTGG -3'

Kusa1-3_B3 :

5'- TAGAGGTCGACAGACGCG -3'

Kusa1-3_FIP :

5'- CGGGATCACGATGAACACCCAT

AGGAAAATGCCATTCCCAA -3'

Kusa1-3_BIP :

5'- TACGGCGCAAGGACGACATC

GTAGCTCCTTCTCCCGGATA -3'

の4本の、3つの組合せで行った。

増幅反応は、63 で1時間保持後に、酵素を失活させるため80 で5分間処理した。増幅の確認は、目視もしくはリアルタイム濁度測定装置 LA-320C (栄研化学)を用いて行った。

C. 研究結果と考察

ツキヨタケ迅速検査法 LAMP 法の実用化に向けた検討

野外で実施可能な有毒きのこの検査法を構築するため、一定温度の反応で標的遺伝子を増幅・確認可能なLAMP法によるツキヨタケ検出法を検討してきた。新たに設計したプライマーセットを含む2組のプライマーを用いて、ツキヨタケおよび13種の食用きのこを対象にLAMP法を行った。その結果、図1に示すとおり、ツキヨタケ由来DNAおよびツキヨタケのITS領域を組み込んだツキヨタケプラスミドでのみ標的遺伝子が増幅された。作製したプライ

マーセットのうち、ID21の方が反応時間の早い段階で増幅し始め、かつ同一反応時間における増幅量(濁度量)も多かったことから、以後の検討にはID21のプライマーを用いた。また、いずれのプライマーセットにおいても一般的な食用きのこには反応せずツキヨタケのみで増幅を示し、その選択性の高さが確認された。この結果より、ID21のプライマーを用いたLAMP法を利用することで、野外でも実施可能なツキヨタケの簡易検査法の構築につながると考えられる。

続いて、実際にツキヨタケによる食中毒が発生したときの食中毒検体試料を対象にLAMP法を行った。同時にツキヨタケやツキヨタケが誤認されやすい食用きのこ(シイタケ、ヒラタケ、ムキタケ)も対象とした。また、DNA抽出は、30分程度で抽出可能な簡易DNA抽出キットを用いた。その結果、図2に示したとおり、ツキヨタケおよび食中毒検体でのみ増幅が確認された。しかし、食中毒検体では、増幅開始が他のツキヨタケに比べ遙かに遅かった。食中毒検体に関して、これまで構築してきたツキヨタケ迅速検査法PCR-RFLP法で確認した結果、ムキタケと思われるバンドパターンが示された(図3)。また、ツキヨタケを検知するリアルタイムPCR法では、微量のツキヨタケ由来DNAの存在を確認した(図4)。さらにITS領域のシークエンスを実施した結果、ムキタケ(*Sarcomyxa edulis* Genbank Accession no. LC098752)などと97%の高い相同性を示した。これらの結果より、食中毒検体は、ムキタケであり、食中毒を引き起こしたツキヨタケと一緒に調理された為に、

わずかなツキヨタケのDNAが付着していたと推定された。

さらに、ツキヨタケや食中毒検体試料、誤認されやすい食用きのこを加熱、人工胃液に浸漬処理した擬似加熱消化試料を対象にLAMP法を実施した。その結果、図5に示すとおり、加熱・消化処理の影響で増幅開始は少し遅延したが、図2と同様にツキヨタケに関する試料で増幅を示した。ただし、ムキタケと考えられる食中毒検体については、増幅が確認できなかった。これらのことから、ツキヨタケ検出用のLAMP法は、生のきのこの喫食前診断と共に、食中毒発生時の確認試験法としても高い信頼性を有することが確認された。

クサウラベニタケ迅速検査法 LAMP 法の検討

これまでのクサウラベニタケの分子系統解析により、日本のクサウラベニタケとされてきたきのこは、欧州の *Entoloma rhodopolium* とは異なる3つのグループ(clade-I, clade-II, clade-III)に分類されることが明らかとなった。

そこで、我が国においてツキヨタケと並び食中毒報告事例の多いクサウラベニタケを、野外でも実施可能なLAMP法で判別するためには、標的を絞る必要がある。これまでクサウラベニタケとされた食中毒事例ではclade-IIおよびclade-IIIが多数を占めていたことから、clade-IIとclade-IIIを検出するLAMP法の構築を試みた。その結果、3種類のLAMP法用プライマーによってクサウラベニタケの遺伝子の増幅が確認できた(図6)。Kusa3-2の

プライマーセットは、clade-III を検出し増幅を示した。Kusa1-2 のプライマーセットは、clade-II と clade-III のみならず、clade-I でも増幅を示したが、誤認されやすい可食きのこのウラボニホテイシメジでも増幅を示した。また Kusa1-3 では、clade-III の他にわずかに clade-II も増幅が見られた。Kusa1-2 は、プライマーの認識配列の調整が必要である。一方、Kusa1-3 はループプライマーなどの利用で clade-II の増幅を補助するなどの改善が必要であるが、クサウラベニタケの LAMP 法の構築へ向けて大きな知見が得られた。

D. 結論

ツキヨタケ迅速検査法 LAMP 法の実用化に向けた検討

ツキヨタケ検出用に開発した LAMP 法は、シイタケ、ヒラタケ、ムキタケを含む多数の食用きのこを交差せずにツキヨタケだけを検出することが確認された。また、過去に食中毒を引き起こしたツキヨタケの検体についても同様に検出することが可能であった。そして、簡易 DNA 抽出法(操作時間 30 分)と LAMP 法(反応時間 60 分)を組み合わせることによって、2 時間以内での迅速な判定が達成できた。LAMP 法は、きのこを採取する現場で検査できる方法であり、喫食前診断に大きく寄与できると考えられ、ツキヨタケによる食中毒を未然に防ぐことに大いに役立てられると期待される。また、本法は擬似加熱消化処理の影響を受けにくいことから、食中毒発生時に調理品や吐瀉物など原形を留めてい

ない試料でもツキヨタケの特定に寄与できると考えられる。

クサウラベニタケ迅速検査法 LAMP 法の検討

ツキヨタケと共に日本国内で食中毒事例が多いクサウラベニタケの検出を目的とした LAMP 法は、プライマー配列の調整やループプライマーの利用で構築できる可能性が見出された。クサウラベニタケを検出する LAMP 法が構築できれば、ツキヨタケと共に喫食前診断に利用することで日本国内における有毒きのこの食中毒発生予防につながり、ひいては食中毒の大幅な低減が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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、投稿中

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

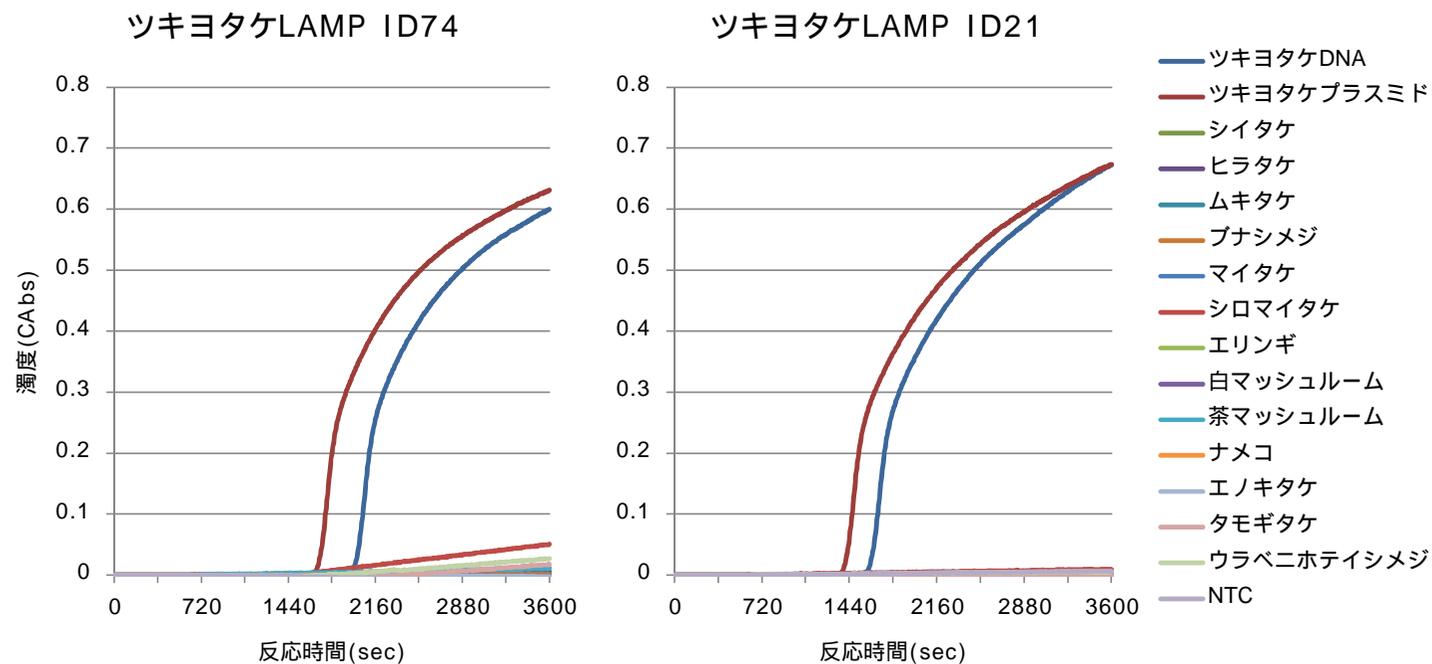


図1 ツキヨタケ検出用LAMP法の検討

ツキヨタケ検出用に設計したプライマーセットを用いて、ツキヨタケおよび食用きのこから抽出したDNAを対象に増幅を確認した。

その結果、ID74 とID21の両プライマーセットにおいてツキヨタケDNAおよびツキヨタケのITS領域を組み込んだプラスミドDNAでのみ明確な増幅を示した。

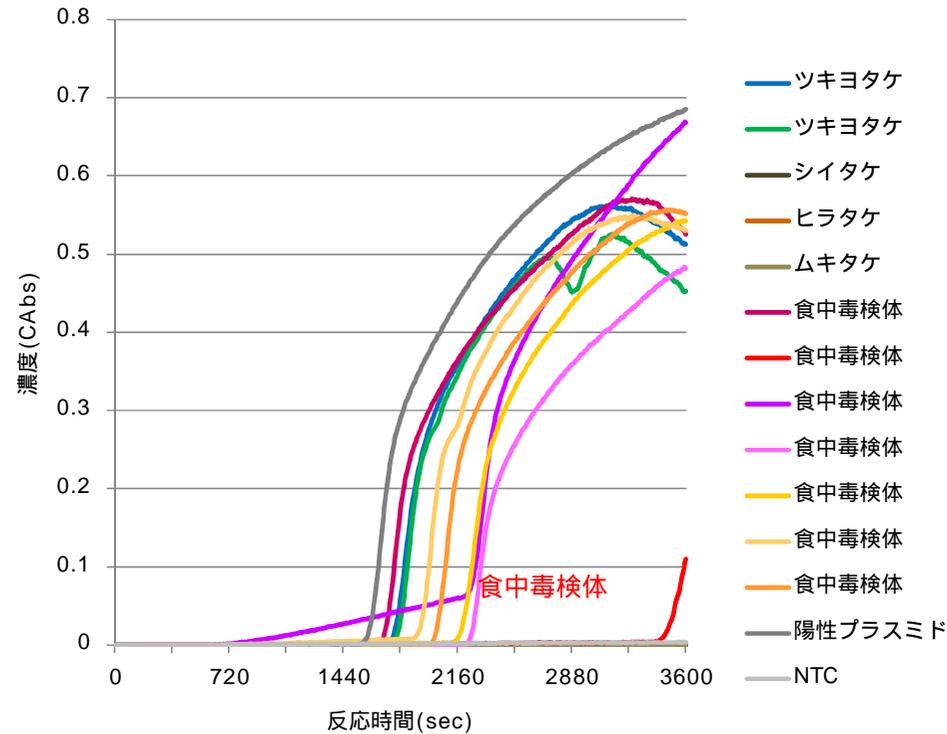


図2 LAMP法によるツキヨタケ食中毒検体の確認

ツキヨタケ検出用プライマーセット(ID21)を用いて、ツキヨタケおよびツキヨタケにより食中毒が引き起こされた食中毒検体等に対してLAMP法を実施した。各キノコからのDNA抽出は、簡易DNA抽出キットを用いた。

ツキヨタケおよびほとんどの食中毒検体で増幅が認められたが、食中毒検体は増殖開始が他のツキヨタケよりもかなり遅かった。

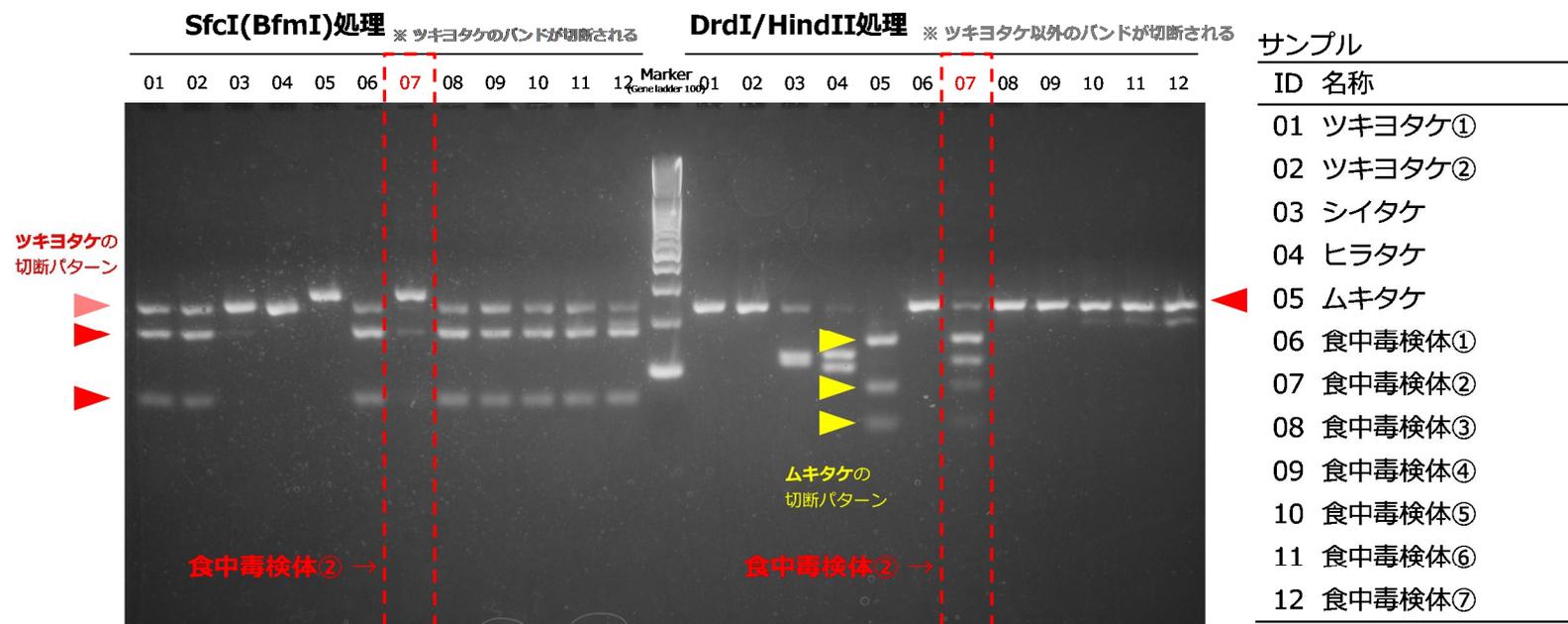


図3 ツキヨタケ確認用PCR-RFLPによるツキヨタケおよび食中毒検体の確認

我々がこれまでにツキヨタケ確認用に構築したShort PCR-RFLP法をツキヨタケおよびツキヨタケによる食中毒検体等に対して実施した。各レーン番号とサンプルの対応は右の表に示した。SfcI処理では、ツキヨタケのバンドが切断され、DrdIとHindIIの同時処理では、ツキヨタケ以外(シイタケ、ヒラタケ、ムキタケ)が切断される。ツキヨタケの切断パターンは赤い矢印で示した。また、DrdI/HindII処理でのムキタケの切断パターンは黄色い矢印で示した。食中毒検体②に関しては、赤の点線で示した。

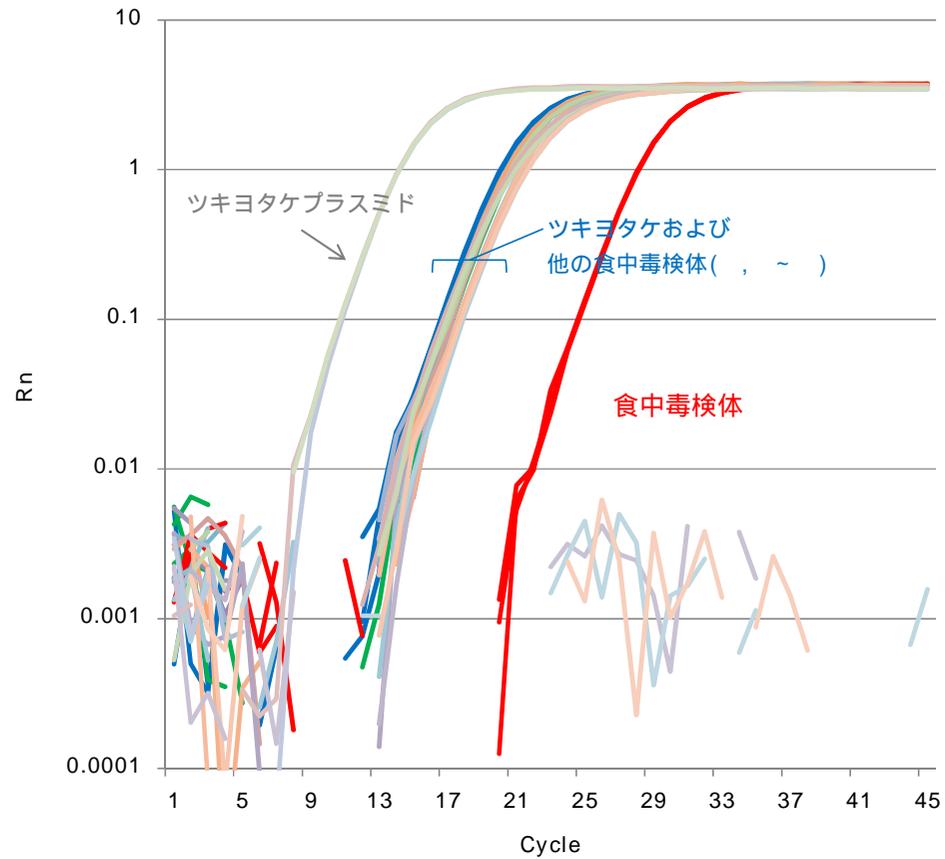


図4 リアルタイムPCRによるツキヨタケおよび食中毒検体の確認

我々がこれまでに構築したツキヨタケ確認用リアルタイムPCR法でツキヨタケおよびツキヨタケによる食中毒検体等を確認した。その結果、ツキヨタケおよび他のツキヨタケ食中毒検体(, ~)でほぼ一様の増幅を示したが、食中毒検体 ではその $1/2^{7\sim 9}$ 程度の割合の僅かなツキヨタケ由来DNAが含まれていたことが明らかとなった。

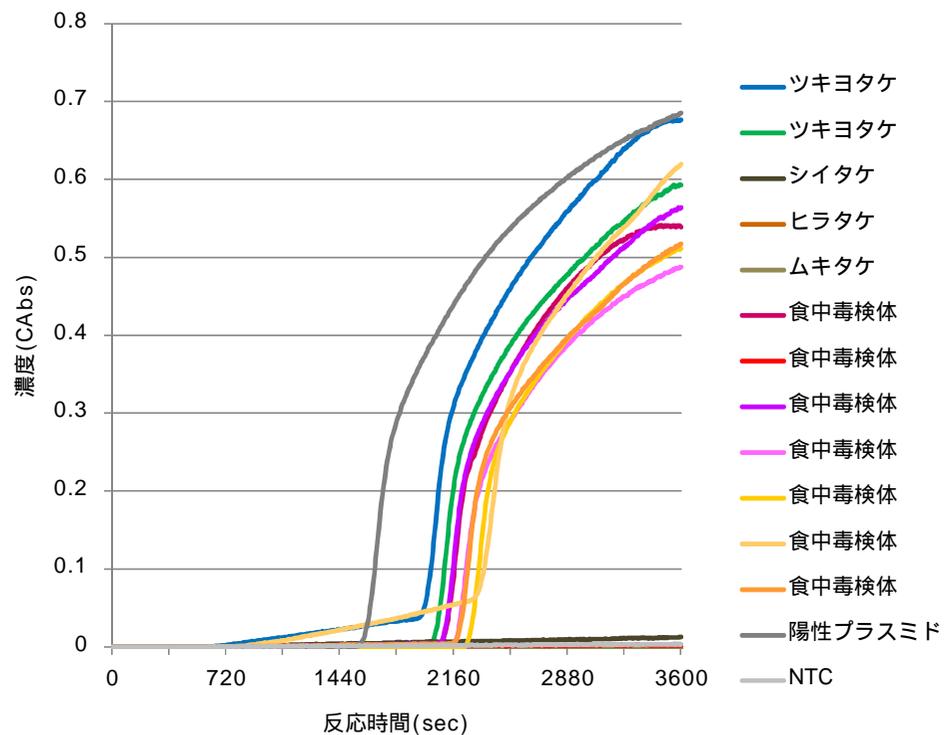
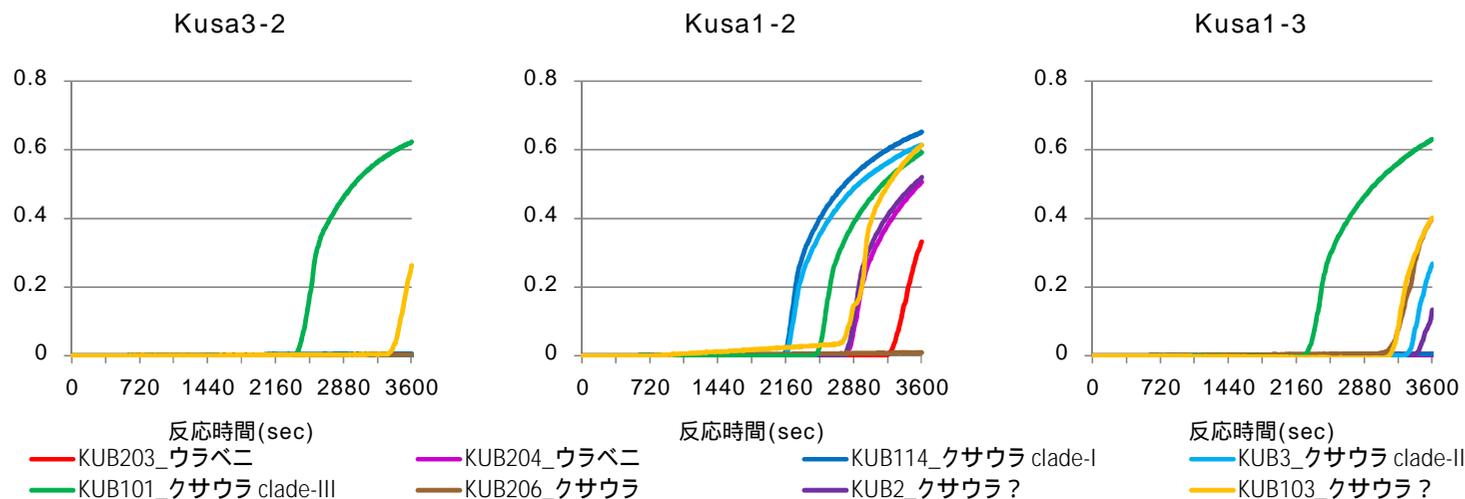


図5 擬似加熱消化処理によるツキヨタケLAMP法への影響

ツキヨタケが疑われる食中毒発生時の調理品や吐瀉物の確認試験を想定し、擬似加熱消化処理した試料を対象としてLAMP法を実施した。

その結果、ツキヨタケおよび食中毒検体を除く食中毒検体で図2と同様の増幅を示した。ただ、いずれの試料も加熱もしくは消化処理により、増幅開始時間が遅延していた。



試料(各 5 ng/ tube)	備考	増幅の有無		
		Kusa3-2	Kusa1-2	Kusa1-3
KUB203_ウラベニ	可食キノコ	-	++	-
KUB204_ウラベニ	可食キノコ	-	+++	-
KUB114_クサウラ clade-I	毒性少?	-	+++	-
KUB3_クサウラ clade-II	中毒例多数	-	+++	+
KUB101_クサウラ clade-III	中毒例多数	+++	+++	+++
KUB206_クサウラ	独立群	-	-	++
KUB2_クサウラ?	独立群 E. sinuatumに近い	-	+++	+
KUB103_クサウラ?	E. sericatum K541と一致	++	+++	++

増幅の有無は、反応後(63 60分)の濁度から以下の暫定基準で判定した。

- +++ : 0.4以上
- ++ : 0.2以上、0.4未満
- +: 0.1以上、0.2未満
- : 0.1未満

図6 クサウラベニタケ検出用LAMP法の検討

クサウラベニタケの検出を目的に設計した3種類のプライマーセットを使用して、各種クサウラベニタケおよび誤認されやすいウラベニホテイシメジから抽出したDNAを対象にLAMP法を実施した。その増幅および増幅結果の一覧を示した。

