

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
研究協力者 鈴木智宏 北海道立衛生研究所
研究協力者 青塚圭二 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。食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、新たに設計した専用のループプライマーを併用することで、検出感度が 10 倍程度向上し、増幅時間を 60 分から 40 分に短縮することが可能となった。また、複数のきのこ試料に微量に混合したツキヨタケも検出できたことから、多種類のきのこの中から微量ツキヨタケの有無の確認法としても活用できる。クサウラベニタケにおいては、新たに設計したプライマーにより、可食きのこのウラベニホテイシメジを含む食用きのこでは増幅を示さず、国内でクサウラベニタケとされていた 3 品種のきのこに対して特異的に増幅を示す LAMP 法を開発した。

本法は、形態判別に頼らない有毒きのこ判別法であり、きのこ採取現場でも実施可能な喫食前検査として食中毒発生予防につながると期待される。

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している。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 月に集中しており、採取されたきのこの多くは、専門家の鑑定を受けずにそのまま自宅に持ち帰り、喫食されて食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食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、形態をどうし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。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、遺伝子の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きのこ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。シイタケ、ヒラタケ、ムキタケなどの食用きのこは国内産(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、山形県、島根県、鳥取県、富山県、新潟県で採取した。ウラベニホテイシメジは、福島県、茨城県、鳥取県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。

(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。

増幅反応は、63°Cで1時間保持後に、酵素を失活させるため80°Cで5分間処理した。増幅反応には、リアルタイム濁度測定装置LA-320C(栄研化学)、もしくは温調機能付き吸光度計MyAbscope(カネカ)を用いた。

C. 研究結果

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、一定温度での反応によって標的遺伝子を増幅・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。これまで検討してきたプライマーセットに、2本のループプライマーを新たに設計して追加利用することで、その効果を検討した。

その結果、ループプライマーを追加して利用することにより、検出限界が105 copy から104 copyへと10倍程度向上し、また各

濃度で 10 分から 20 分程度増幅の開始時間が早まった (図 1)。この結果より、反応時間に 60 分を要していたが、40 分でこれまでと同様の増幅結果が得られることが確認でき、さらなる判定の迅速化が可能となった。

今回、ループプライマーを追加利用することによって、検出感度が向上したことから、これまで増幅を示さなかった食用きのこに対して非特異的な反応の有無を確認した (図 2)。その結果、ループプライマーを利用しても非特異的な増幅を示さず、高いツキヨタケ選択性を維持していることを確認した。

続いて、食用きのこ混合試料に 2.5%～50%の割合でツキヨタケを含む混入試料を調製し LAMP 法を実施した結果、2.5%までの全てのツキヨタケを含む試料で増幅を確認できた (図 3)。これは、マトリックスとして含まれる多種類のきのこの中から微量のツキヨタケを判別できるということを示しているため、本法は、実際に現場で大量に採取したきのこの中からも微量のツキヨタケの有無を判定できるということである。

ツキヨタケの LAMP 法を屋外で利用することを想定して、バッテリー駆動が可能なポータブル LAMP 装置として温調機能付き吸光度計 MyAbscope を用いた (図 4)。その結果、これまでと同様の増幅を示し、本法は屋外でも実施可能であると考えられた。

MyAbscope は、簡易 DNA 抽出に必要な加熱ユニットもあるため、屋外での DNA 抽出から LAMP 法による判別まで 1 台で実施可能であることが確認でき、きのこ採取現場でのツキヨタケ判別にむけて大きく前進した。

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。

昨年度にクサウラベニタケ検出用に作製したプライマー (Kusa1-3) をもとに、新たにループプライマーを設計し、追加利用することで、可食きのこのウラベニホテイシメジでは増幅を示さず、各種クサウラベニタケで増幅を示すプライマーセットとなった (図 5)。

さらに、作製したクサウラベニタケ検出用 LAMP 法プライマーセットにより、食用きのこの非特異的な反応の有無を確認した結果、非特異的な増幅を示さず、高いクサウラベニタケ選択性を有していることを確認した (図 6)。

本法は、ウラベニホテイシメジと誤認して、食中毒を引き起こす国産クサウラベニタケ各種を迅速簡便に見分ける方法である。今後は検出限界を明らかにし、適正な測定条件を確立することで、クサウラベニタケの喫食前診断の実現に向けて検討を重ねていく。

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

ループプライマーを新たに追加したツキヨタケ検出用 LAMP 法は、検出感度および増幅開始速度ともに向上が認められ、シイ

タケ、ヒラタケ、ムキタケを含む多数の食用きのこ交差せずにツキヨタケだけを検出可能であった。また、複数のきのこ混合試料中にわずかに混入したツキヨタケも検出できたことから、多種類のきのこの中から微量のツキヨタケの有無を確認する方法としても活用できる。さらに、ポータブル LAMP 装置の利用により、DNA 抽出から LAMP 法によるツキヨタケの判定まで屋外で実施可能であった。本研究の成果をツキヨタケの喫食前診断に活用することで、ツキヨタケによる食中毒の発生の低減に向けて大いに役立つと期待される。

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を対象とした LAMP 法も、新たに設計したループプライマーの利用で各種クサウラベニタケを選択的に検出可能になった。本法は、同じ *Entoloma* 属で形態的にも非常に似ている国産クサウラベニタケとウラベニホテイシメジを、迅速簡便に見分けることができる方法であることから、クサウラベニタケの喫食前診断の実用化へ向けて大きく前進したと考えられる。

E. 健康危害情報

なし

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、

食品衛生学雑誌、Vol.58, No.3, p113-123, 2017

2. 学会発表

- 1) 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、青塚圭二、佐藤正幸、鈴木智宏、近藤一成：LAMP 法を用いた有毒キノコ迅速判別法の構築、第 54 回 全国衛生化学技術協議会年会、奈良、2017 年 11 月
- 2) 菅野陽平、青塚圭二、坂田こずえ、中村公亮、鈴木智宏、近藤一成：LAMP 法を用いた有毒キノコの迅速判別法の構築 —国内産クサウラベニタケ判別法の開発について—、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会、兵庫、2017 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

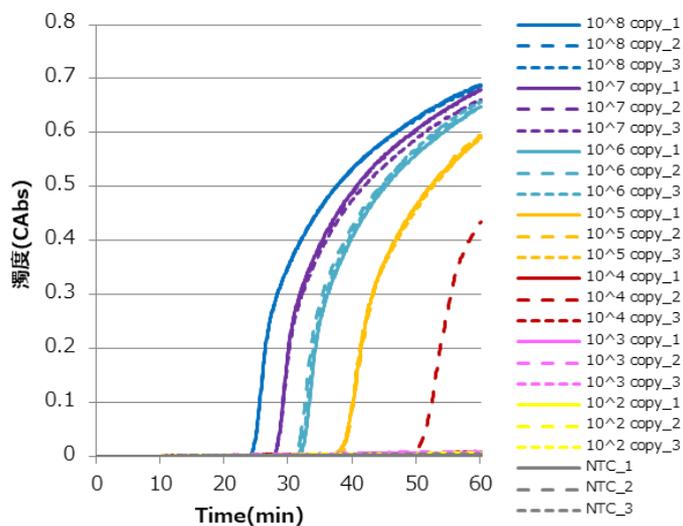
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

A ループプライマーなし



B ループプライマー利用

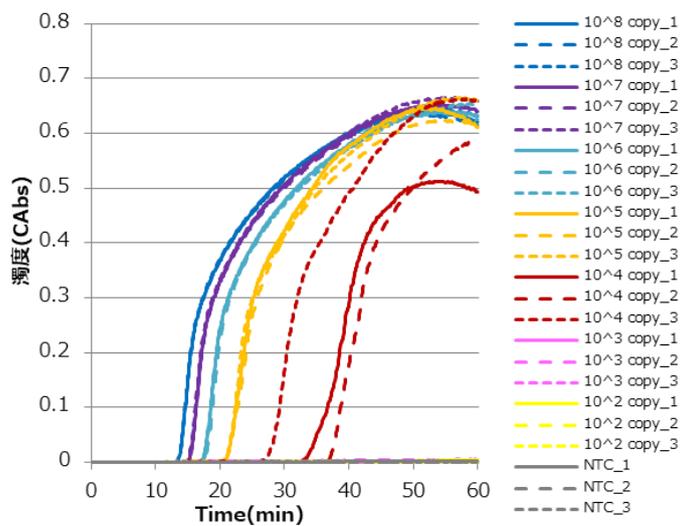


図1 ループプライマー利用によるツキヨタケ遺伝子の検出の変化

ループプライマーの有無によりツキヨタケ検出用LAMP法の増幅の変化を確認した。ツキヨタケ陽性コントロールプラスミドの濃度を段階的に変化させ、検出限界濃度とそれぞれの増幅の開始時間を比較した。ループプライマーなし(A)に比べ、ループプライマーを利用(B)した結果、 10^4 copyのプラスミドまで検出可能になり、また増幅の開始時間も10分以上早くなった。

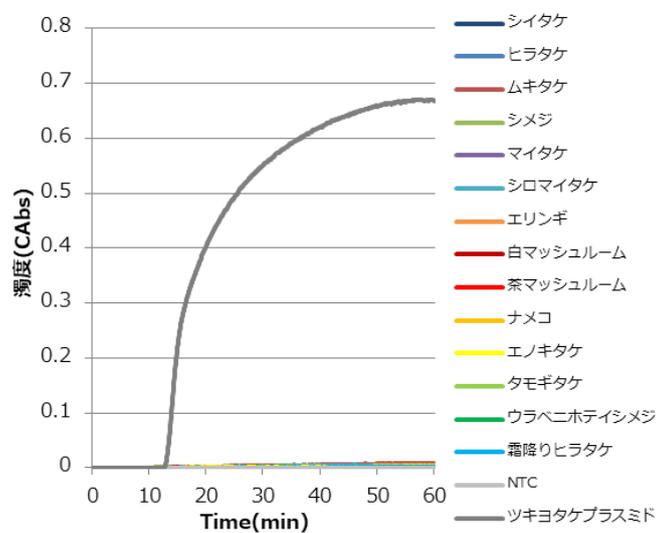


図2 ループプライマーを利用したツキヨタケLAMP法による食用きのこの交差性の確認

ツキヨタケが誤認されやすいシイタケ、ヒラタケ、ムキタケを含む食用きのこ(14種)を対象にループプライマーを追加利用したツキヨタケ検出用LAMP法による交差性を確認した。その結果、非特異的な増幅を示さず、ツキヨタケに対する高い特異性を有することを確認した。

A きのご混合試料中のツキヨタケ混入率

	Control-1	Control-2	Control-3	Mix-1	Mix-2	Mix-3	Mix-4	Mix-5	Mix-6
誤認キノコ (シイタケ, ヒロタケ, ムキタケ)	4000			2000		1000	1600	1900	2000
市販キノコ (シメジ, エリンギ, ナメコ, エノキ)		4000			2000	2000	2000	2000	2000
ツキヨタケ			4000	2000	2000	1000	400	100	
ツキヨタケの有無 (混入率)	-	-	+	+	+	+	+	+	-
			(100%)	(50%)	(50%)	(25%)	(10%)	(2.5%)	

B きのご混合試料中のツキヨタケの検出

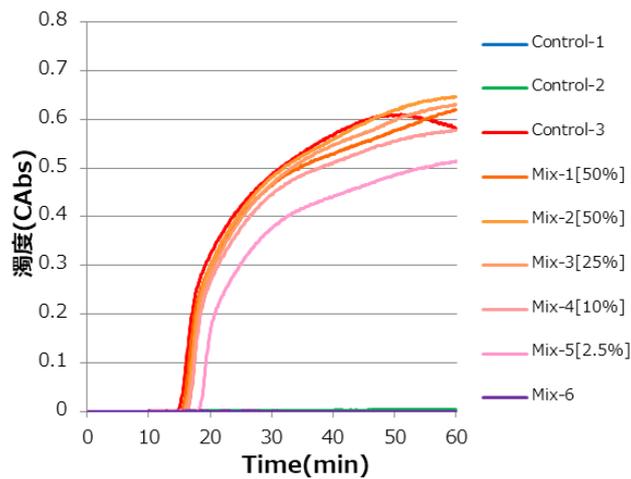


図3 きのご混合試料中のツキヨタケの検出

(A)食用きのご混合試料中に2.5%~50%の割合でツキヨタケを混入させたきのご混合試料を調製した。(B)きのご混合試料を対象にループプライマーを併用したツキヨタケ検出用LAMP法を実施した結果、ツキヨタケを含む試料全てで、明確な増幅を確認できた。

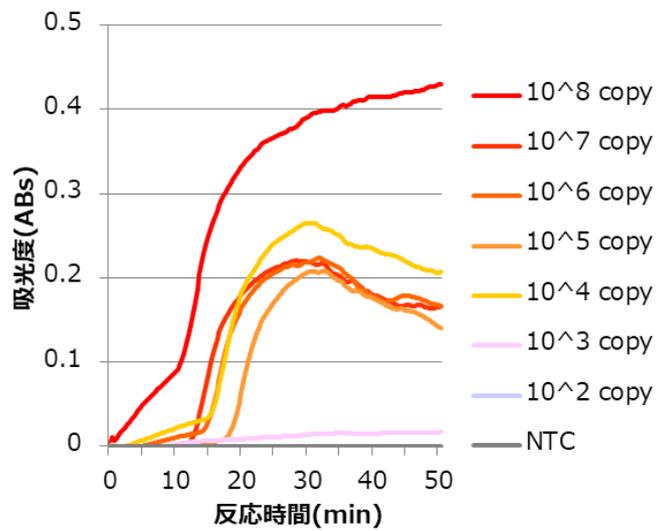


図4 ポータブルLAMP装置によるツキヨタケの検出

段階希釈したツキヨタケ陽性コントロールプラスミドを対象に、ポータブルLAMP装置MyAbscopeを用いてLAMP法を実施した。その結果、ループプライマーを利用することにより 10^4 copyのプラスミドまで検出可能であり、増幅の開始時間もLA-320Cと同程度であった。

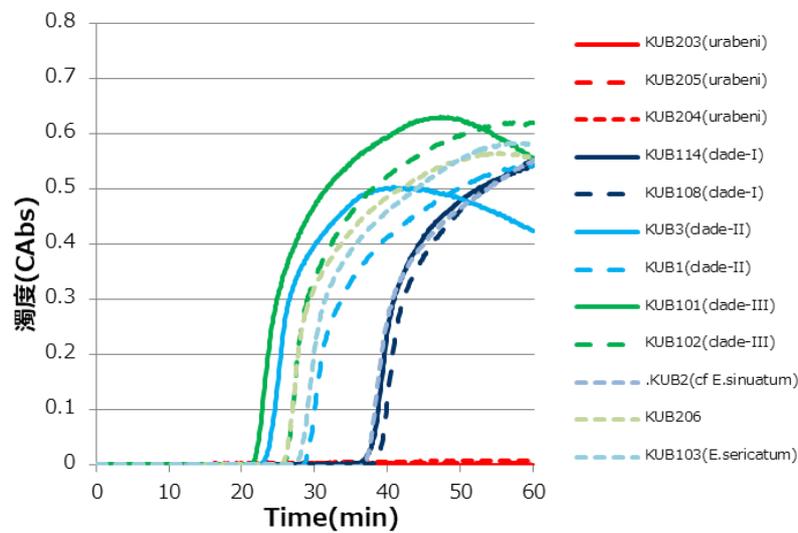


図5 クサウラベニタケ検出用LAMP法

クサウラベニタケ検出用に設計したループプライマーを含むプライマーでLAMP法を実施した。その結果、可食きのこのウラベニホテイシメジ(KUB203, KUB204およびKUB205)では、増幅を示さず、有毒きのこである各種クサウラベニタケで、増幅を示した。

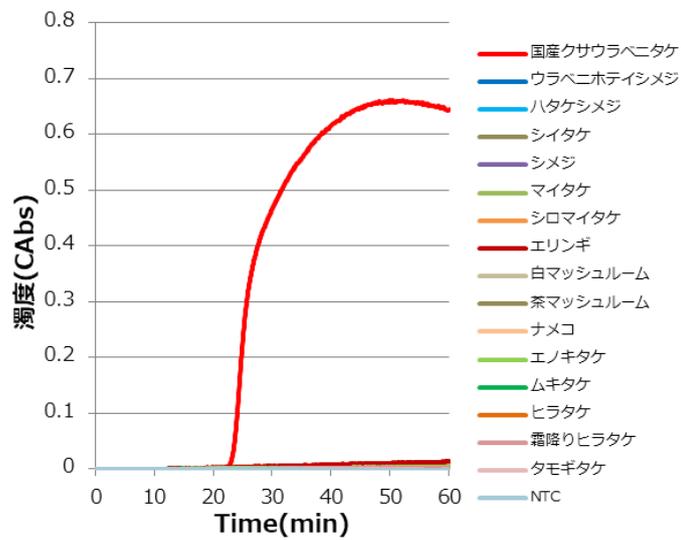


図6 クサウラベニタケLAMP法による食用きのこの交差性の確認

クサウラベニタケが誤認されやすいウラベニホテイシメジおよびハタケシメジを含む食用きのこ(15種)を対象にクサウラベニタケ検出用LAMP法による交差性を確認した。その結果、非特異的な増幅を示さず、国産クサウラベニタケに対する高い特異性を有することを確認した。