

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。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、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は交差せず、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、ツキヨタケが疑われる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、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、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。

クサウラベニタケの検出を目的とした LAMP 法においては、誤認されやすい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。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。

研究協力者 鈴木智宏 北海道立衛生研究所
青塚圭二 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手法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。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およびクサウラベニタケについて、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。簡易 DNA 抽出法と LAMP 法を組み合わせることで、2 時間以内の迅速な判定が可能となり、またポータブル LAMP 装置を使用することで採取現場での有毒きのこの食毒判定を実施することが可能となる。本法により、ツキヨタケおよびクサウラベニタケの喫食前診断が可能となれば、有毒きのこによる食中毒の発生件数を低減することが期待できる。

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℃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. 研究結果および考察

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について検討を行った。

ツキヨタケと誤認されやすい食用きのこのシイタケ、ヒラタケおよびムキタケの ITS 領域の配列情報を比較し、ツキヨタケに特徴的な配列を認識する LAMP 法用プライマーセットを設計した。設計したプライマーセットを用いて LAMP 法を行った結果、一般的な食用きのこに対する非特異的な増幅は示さず、ツキヨタケ遺伝子でのみ増幅を示した。この結果から、作製したプライマーセットはツキヨタケに対して、高い選択性を有することが確認できた。

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 法を行った結果、ツキヨタケを含む食中毒検体でのみ増幅が確認された。さらに、これらツキヨタケ食中毒検体試料を加熱、人工胃液に浸漬処理した擬似加熱消化試料を対象に LAMP 法を実施した結果でも、加熱・消化処理の影響で増幅開始時間は少し遅延したものの同様に増幅を示した。これらの結果から、本法はツキヨタケの喫食前診断だけではなく、ツキヨタケが疑われる食中毒発生時の原因究明法としての利用も期待できる。

さらに、ツキヨタケ検出用 LAMP 法プライマーに 2 本のループプライマーを追加することで、検出感度が 10 倍程度向上し、増幅の開始時間も早くなったため、LAMP 法の反応時間を短縮可能であることが示された。また、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、ループプライマーを利用した 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。そのため、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考えられる。さらに、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。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。

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 つのグループに分類されることが明らかとなった。

RPB2 領域を対象として、可食きのこのウラベニホテイシメジでは増幅を示さず 3 種類の国産クサウラベニタケでのみ増幅を示すように 4 本の LAMP 法用プライマーと 2 本のループプライマーの合計 6 本のプライマーセットを設計した。本プライマーセットを用いた LAMP 法は、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に特異的に増幅を示すことが確認できた。

さらに、作製したプライマーセットの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。

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

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は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を含む検体についても同様に検出することが可能であった。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。さらにループプライマーを追加利用することで検出感度および増幅開始速度ともに向上した。ポータブル LAMP 装置の利用により、DNA 抽出（操作時間約 30 分）から LAMP 法によるツキヨタケの判定（反応時間約 60 分）まで屋外で実施でき、1 時間半程度での迅速な判定が可能となる。本研究成果は、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役立つと期待される。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を対象とした LAMP 法も、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、迅速かつ簡便に見分けることができることから、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. 研究発表

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、Vol.58, No.3, 2017

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 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

<p>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</p>	<p>F. 知的所有権取得状況</p>
<p>3 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</p>	<p>1 特許取得 なし 2 実用新案 なし 3 その他 なし</p>