

令和元年度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

植物性自然毒による食中毒対策の
基盤整備のための研究

総括・分担研究報告書

研究代表者

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

登田美桜

研究分担者

国立医薬品食品衛生研究所生化学部

近藤一成

岐阜県保健環境研究所 食品安全検査センター

南谷臣昭

令和2年(2020年)5月

目 次

I. 総括研究報告

植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究	-----	1
研究代表者 登田美桜 (国立医薬品食品衛生研究所安全情報部)		

II. 分担研究報告

1. 植物性自然毒の多成分同時分析法の開発	-----	10
研究分担者 南谷臣昭 (岐阜県保健環境研究所 食品安全検査センター)		
2. 食中毒の病因植物種の遺伝子解析による同定法の開発およびデータベースの作製	-----	79
研究分担者 近藤一成 (国立医薬品食品衛生研究所生化学部)		
3. 植物性自然毒による食中毒事件に関する情報研究	-----	99
研究分担者 登田美桜 (国立医薬品食品衛生研究所安全情報部)		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	110
---------------------	-------	-----

I. 総括研究報告

植物性自然毒による食中毒対策の
基盤整備のための研究

登田美桜

令和元年度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

植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究

総括研究報告書

研究代表者	登田美桜	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部 第三室長
研究分担者	近藤一成	国立医薬品食品衛生研究所生化学部 部長
研究分担者	南谷臣昭	岐阜県保健環境研究所 食品安全検査センター 専門研究員

研究概要

厚生労働省に届出された食中毒事件において、全体の発生件数及び患者数に占める割合は数%と少ないが、重篤化しやすく死亡事例の主な原因とされるのが「自然毒」である。本厚生労働科学研究では、自然毒のうち「植物性自然毒」による食中毒に焦点をあて、その発生予防と、発生時の原因究明に役立つ研究成果を出すことを目的に、下記3つの研究課題について研究を行っている。

- ・ 研究課題 1. 植物性自然毒の多成分同時分析法の開発
- ・ 研究課題 2. 食中毒の病因植物種の遺伝子解析による同定法の開発及びデータベースの作製
- ・ 研究課題 3. 植物性自然毒による食中毒事件に関する情報研究

研究課題 1 及び 2 は、食中毒の発生時に植物性自然毒が原因として疑われた場合に、中毒残品に含まれる植物種/毒成分を迅速に同定するための分析法の開発に関する研究である。研究課題 1 では、全国の地方衛生研究所に設置されている LC-MS/MS を用いた多成分同時同定法の開発に取り組んでおり、今年度は、これまでに選定した有毒植物 44 成分、有毒キノコ 12 成分について調理済み食品への適用条件を検討した。研究課題 2 では遺伝子解析リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法や Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を応用した植物種の同定法の開発に取り組んでおり、今年度は有毒植物 5 種とそれと誤認しやすい植物の同定への LAMP 法の利用を検討した。さらに、これまでに開発した遺伝子検査法の情報を提供する新たな植物性自然毒データベース MushPlant を構築した。研究課題 3 では今後の食中毒の重点的な予防策の検討に資する情報研究に取り組んでおり、今年度は国と全国自治体が植物性自然毒についてどのような情報提供を行っているのか現状を調査した。

研究協力者

畝山智香子	国立医薬品食品衛生研究所
與那覇ひとみ	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
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
谷口 賢	名古屋市衛生研究所
友澤潤子	滋賀県衛生科学センター

A. 研究目的

厚生労働省に届出された食中毒事件において、全体の発生件数及び患者数に占める割合が数%と少ないものの、症状が重篤化しやすく死亡者が報告されているのが「自然毒」を原因とする食中毒である。本研究では、自然毒のうち「植物性自然毒」に焦点をあて、それを原因とする食中毒事件の発生予防と原因究明に役立てることを目的として、次のような2つのアプローチで研究を計画した。

食中毒事件の発生時に植物性自然毒が疑われた場合には、当該地域の地方衛生研究所（以下、地研）が中毒残品の化学的分析と遺伝子解析により原因となった植物種/毒成分の同定を行う。しかし現状では分析・解析法が十分に整備されているとは言えない。そのようなことから、本研究では植物性自然毒による食中毒の迅速な原因

究明につなげるため、全国の地研に設置されている分析機器を考慮し、どこの地研でも利用可能な分析・解析法について化学的分析と遺伝子解析の両面から検討することにした。

研究課題1「植物性自然毒の多成分同時分析法の開発」では、化学的分析として、農薬のポジティブリスト制度の導入等を受けて全国地研で設置された液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いた、有毒植物とキノコの多成分同時分析法の確立を目的としている。

昨年度の研究では、過去の文献等と市販品の有無を参考に対象成分の候補として有毒植物44成分、有毒キノコ12成分を選定し、LC-MS/MSの分析条件の最適化と調理済み残品の分析可能な前処理法を検討した。今年度は、さまざまな食品による食中毒に利用できるようにするため、カレーや餃

子といった分析を妨害するマトリックスが多い調理済み残品への適用性を検証することにした。

研究課題 2「食中毒の病因植物種の遺伝子解析による同定法及びデータベースの作成」では、遺伝子解析リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法や Loop-Mediated Isothermal Amplification（LAMP）法を応用した植物種の同定法の開発を目的としている。

本課題ではこれまで、有毒植物の同定にリアルタイム PCR の応用が可能であることを確認するとともに、LAMP 法の利用により食中毒の原因となるキノコを野外で短時間に鑑別可能な方法を構築した。今年度は、有毒植物 5 種（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）とそれと誤認しやすい食用可能な植物種を検出できる LAMP 法を用いた同定法の開発を目的とした。さらに、これまでに確立した同定法の利用拡大を目指し、それらのプロトコルやプライマー情報等の関連情報を紹介するデータベースを作製することも目的とした。

一方、**研究課題 3「植物性自然毒による食中毒事件に関する情報研究」**では、植物性自然毒を原因とする食中毒事件に関する既存情報を調査・集約して解析し、重点的に予防すべきことを

助言するとともに、今後の食中毒事件の調査方法や情報の共有、消費者への注意喚起のやり方について検討することを目的としている。

昨年度は、昭和 30 年～平成 30 年に国内で発生し厚生労働省に届出された有毒植物による食中毒事件について調査・収集し、原因植物の経時的な傾向、発生に至った経緯、原因施設ごとの傾向を解析した。その結果から、有毒植物による食中毒の発生予防には消費者への知識普及や注意喚起が必須であることが示唆された。しかし、実際に消費者へ広く周知するのは難しく十分にはできていないのが現状である。そのため今年度は、信頼性の高い情報源として国・地方自治体が有毒植物による食中毒について消費者に向けてどのような情報提供を行っているのかを調査し、課題を検討することを目的とした。さらに、全国自治体関係者の意見を聴取しつつ、将来的な活用に向けて、食中毒に関する情報の収集、蓄積及び提供の方法を探ることも目的とした。

B. 研究方法／結果及び考察

各研究課題の分担報告書から研究要旨を以下に抜粋する。詳しい研究方法及び結果、並びに考察については、それぞれの分担報告書を必ず確認し

ていただきたい。

研究課題1「植物性自然毒の多成分同時分析法の開発」要旨より

食中毒事件発生時の検査を担当する地研が広く利用でき、調理済み中毒残品にも適用可能な方法として、LC-MS/MSを用いた簡易・迅速な手法の開発を行った。昨年度（平成30年度）の研究は、わが国において過去に発生した中毒事例から、発生頻度や症状の重篤度を考慮して分析対象化合物の毒成分として高等植物の44成分と毒キノコの12成分を選定し、LC-MS/MSの分析条件を最適化した。

令和元年度は、調理済み食品中の毒成分を定量するための前処理法として、抽出時にトリクロロ酢酸溶液を加えて除タンパク処理を行い、脂質除去機能を有する精製カートリッジを通液した後、希釈するという簡易な操作フローを構築した。高等植物の42成分を対象とし、内部標準物質としてカフェイン-d9、レセルピン-d9を測定時のシリジスパイク、ジゴキシン-d3をサロゲートとして用い、ハウレンソウ、ギョウザ、カレーの3種類の食品における1 μ g/gの添加回収試験を実施したところ、ジギトキシン、ジオスシン、ジオスゲニンを除く、39成分で真度が75～116%、併行精度（RSD%）が21%以内と概ね良好な結果となった。本法は高

等植物を原因とする調理済み中毒残品中の毒成分を同定、定量する試験法として有用であると考えられた。

研究課題2「食中毒の病因植物種の遺伝子解析による同定法、およびデータベースの作製」要旨より

遺伝子配列に基づく特異的な検出同定法を、中毒事例が多いきのこ2種、植物5種について簡易法と確定法のそれぞれの検出法を確立してきた。これらの検出法を広く使用してもらうため、さらに、これを基本にして、新たな標的に対する試験法を自ら作成できるようにする目的で、試験法プロトコル、プライマー情報、関連する遺伝子配列情報、中毒統計情報をまとめて整理した自然毒データベース **MushPlant** を作製して公開した。

野外で実施可能な LAMP 法を用いた有毒植物 5 種に対する検査法の開発を行った。

各有毒植物特異的な LAMP 法用のプライマーを設計し、その性能確認をした。標的とする有毒植物で増幅を示したプライマーについて、さらに増幅反応時間の短縮と検出感度の向上のために追加ループプライマーを設計して検討した。また、多数の植物間での交差性を確認し、標的となる有毒植物と特異性の高いプライマーセットを選出した。スイセンを除く有毒植物 4 種について、食用植物

20 種とも交差反応しない検出系を確立できた。

研究課題 3 「植物性自然毒による食中毒事件に関する情報研究」要旨より

有毒植物による食中毒の発生予防と原因究明に役立つことを研究目的にしている。昨年度の研究で、過去の食中毒事件について原因施設ごとの発生原因をまとめた。その結果、飲食店や旅館が原因施設として報告された事件ではプロの料理人であるにもかかわらず有毒植物と気付かずに誤って調理・提供していた。これらの事例は、見た目が酷似している場合には、普段から食材を扱っている人でも疑うことがないという状況をよく示しており、農産物直売所に納入された農産品に有毒植物が混入した事件でも同様のことが考えられた。また家庭で起きた事件では、食用にできる植物と間違い易い有毒植物があることを知らなかったという報告もあった。そのようなことから、有毒植物による食中毒の発生予防には消費者への徹底した知識普及や注意喚起が必要であることが示唆されたことから、今後の情報提供の参考資料とするために、今年度は、国や都道府県、政令指定都市が有毒植物を原因とする食中毒についてどのような情報を提供しているのかを調査し

た。その結果、自治体によって提供する情報の質、量ともに大きく異なり、東日本に位置する自治体の方が充実していた。中には独自に注意喚起のためのリーフレット/パンフレットを制作している自治体もあった。それらは今後、自治体に関係なく広く利用できるリーフレット/パンフレットを作成する際に参考となる。さらに、有毒植物が原因と疑われる食中毒発生時の迅速な原因究明につなげるため、食中毒の原因特定の最前線に位置づけられる全国地研の研究者等の意見をもとに原因究明を行う上での現状と問題点について調査し、改善のための方策を検討している。

D. 結論

植物性自然毒による食中毒について、発生時の迅速な原因究明に役立つ病因植物種/毒成分の同定法の開発研究（研究課題 1、2）及び発生の予防策の検討に資する情報研究（研究課題 3）を昨年度に継続して実施した。

今年度は、化学的分析の課題では LC-MS/MS を用いた多成分同時同定法について調理済み食品への適用条件を検討した。有毒キノコの成分分析ではいくつ解決すべき課題が残されたが、有毒植物の成分分析については概ね良好な結果が得られた。今後、試験室間共同試験を実施して全国地研が広く導入できるような標準法にすることを目指

す。

遺伝子解析の課題では、LAMP 法を有毒植物 5 種とそれと誤認しやすい植物にも利用できるよう同定法の開発に取り組み、特異的なプライマーの設計とその性能確認を行った。今年度に得られた解決すべき問題点についてはさらに検討し、改良する計画である。さらに、これまでに開発した遺伝子検査法の情報を提供する新たな植物性自然毒データベース MushPlant を構築した。今後、広く意見を聞きつつ掲載内容をより充実させていく。

化学的分析と遺伝子解析ともに、最終的に、地研で広く利用可能な病因植物種/毒成分をマルチに同定できる標準法が確立されれば、散発的に発生するため対応に混乱が生じやすい植物性自然毒による食中毒に対して、地研の検査技術を一定の水準に保つことができ、発生時の迅速な原因究明につながる事が期待される。

情報研究の課題では、国と全国自治体が植物性自然毒について消費者にどのような情報提供を行っているのか現状を調査した。その結果は、将来的に国や自治体関係者も広く利用可能な植物性自然毒に関する注意喚起や情報提供のリーフレット又はパンフレットを作成する際に良い参考となる。さらに、食中毒発生時の迅速な原因特定につなげるため、関係者の意

見を伺いつつ全国地研をつなぐネットワークのシステム構築の検討を開始した。

今年度は 3 年計画の 2 年目であるため本研究報告は途中段階での報告であるが、各課題で設定した目的に向かって着実に結果を出しつつある。次年度は最終年度となるため、各研究課題の完了を目指す。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 近藤一成、坂田こずえ、加藤怜子、菅野陽平、武内伸治、佐藤正幸：有毒クサウラベニタケ近縁種のリアルタイム PCR 法による同定. *食品衛生学衛誌*, **60**(5), 144-150, 2019
- 2) Narushima, J., Kimata, S., Soga, K., Sugano, Y., Kishine, M., Takabatake, R., Mano, J., Kitta, K., Kanamaru, S., Shirakawa, N., Kondo, K., Nakamura, K.: Rapid DNA template preparation directly from a rice sample without purification for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of rice genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **84**, 670-677, 2020

2. 学会発表

- 1) 成島純平、中村公亮、木俣真弥、曾我慶介、菅野陽平、岸根雅宏、高畠令王奈、真野潤一、橘田和美、金丸俊介、白川七海、近藤一成：コメ由来遺伝子の高精度検査を可能にする簡易法の開発. 日本食品衛生学会第 115 回学術講演会、

東京、2019年10月

- 2) 菅野陽平：LAMP法（ループ介在等温増幅法）による自然毒の遺伝子検査へのアプローチ．第56回全国衛生化学技術協議会年会 部門別研究会 食品部門、広島、2019年12月
- 3) 坂田こずえ、加藤怜子、近藤一成：自然毒データベースの改定について．第56回全国衛生化学技術協議会年会、広島、2019年12月
- 4) Kondo, K., Sakata, K., Kato, R, Noguch, A.: Identification of toxic plants that cause severe food poisoning using real-time PCR. Recent Advances in Food Analysis Prague, Czech Republic, Nov.5-8 (2019)
- 5) 谷口賢、南谷臣昭、友澤潤子、登田美桜：植物性自然毒の多成分同時分析法の開発：高等植物、令和元年度地方衛生研究所全国協議会、広島市、2019年12月
- 6) 友澤潤子、谷口賢、南谷臣昭、登田美桜：植物性自然毒の多成分同時分析法の開発：キノコ、令和元年度地方衛生研究所全国協議会、広島市、2019年12月

- 3) 登田美桜、「国内における有毒植物による食中毒について」令和元年度岐阜県食品衛生監視員研修会（2020.1）
- 4) 登田美桜、「食中毒の原因となる自然毒について」令和元年度地方衛生研究所全国協議会衛生理化学分野研修会（2020.2）

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

3. 行政関係者向け説明会

- 1) 登田美桜：「自然毒に関する最近の話題」令和元年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会、2019年11月、地方衛生研究所全国協議会近畿支部
- 2) 登田美桜：「国内における最近の自然毒による食中毒関連情報について」令和元年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸ブロック会議（2019.12）

令和元年度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
植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究
研究分担報告書

「植物性自然毒の多成分同時分析法の開発」

研究分担者 南谷臣昭 岐阜県保健環境研究所 食品安全検査センター

研究要旨

本研究は、わが国において発生する植物性自然毒の中毒の原因食品と病因物質を網羅的に同定するための標準的な化学分析法の確立を目的とする。食中毒事件発生時の検査を担当する地方衛生研究所（地研）が広く利用でき、調理済み中毒残品にも適用可能な方法として、液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いた簡易・迅速な手法の開発を行った。平成 30 年度は、わが国において過去に発生した中毒事例から、発生頻度や症状の重篤度を考慮し、分析対象の毒成分として、高等植物で 44 成分、毒キノコで 12 成分を選定し、LC-MS/MS の分析条件を最適化した。

令和元年度は、調理済み食品中の毒成分を定量するための前処理法として、抽出時にトリクロロ酢酸（TCA）溶液を加えて除タンパク処理を行い、脂質除去機能を有する精製カートリッジを通液した後、希釈するという簡易な操作フローを検討した。

高等植物の 42 成分を対象とし、内部標準物質としてカフェイン- d_9 、レセルピン- d_9 を測定時のシリジスパイク、ジゴキシン- d_3 をサロゲートとして用い、ハウレンソウ、ギョウザ、カレーの 3 種類の食品を用いて 1 $\mu\text{g/g}$ の濃度で添加回収試験を実施したところ、ジギトキシン、ジオスシン、ジオスゲニンを除く 39 成分で、真度が 75~119%、併行精度（RSD%）が 21%以内と概ね良好な結果となった。本法は高等植物を原因とする調理済み中毒残品中の毒成分を同定、定量する試験法として有用であると考えられた。一方、キノコの 11 成分を対象として、シイタケ、グラタン、スキヤキを用いて 1 $\mu\text{g/g}$ の濃度で添加回収試験を実施したところ、0.5%ギ酸-アセトニトリルを移動相とする親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）で分析する成分の真度が低く、一部の成分で溶媒標準溶液に対して保持時間が変動したため、分析が困難であった。毒キノコの分析法は、分離条件から再検討する必要があると考えられる。

研究協力者

谷口 賢 名古屋市衛生研究所 食品部

友澤潤子 滋賀県衛生科学センター 理化学係

A. 研究目的

自然毒食中毒は、発生頻度や患者数の割合は低いものの症状が重篤化しやすく死

に至る事例もあるため、食品衛生上の重要な課題とされてきた。特に近年、高等植物やキノコに含まれる植物性自然毒について

ては、誤食による死亡事例が毎年発生している。厚生労働省の食中毒統計によると、平成 26～30 年の 5 年間の植物性自然毒による死者数は、イヌサフランで 8 名、スイセン、トリカブト、ニセクロハツで各 1 名であった。また、平成 31/令和元年は、イヌサフランで 2 名が亡くなっており、近年植物性自然毒による死者数は大きく増加している。このことから、中毒発生時の迅速な原因究明とその予防対策が地方衛生研究所（地研）や保健所等の地方自治体衛生部局にとって重要な課題となっている。

食中毒事件の発生時に、植物性自然毒が原因と疑われる場合は、地研が中毒残品（患者が喫食したものの残品）の化学的分析や遺伝子解析を行い、病因植物種や毒成分の同定を行っている。このため、地研の分析結果は、正確な食中毒統計に欠かすことができない上に、患者の治療や中毒の予防対策にとっても重要な科学的知見を提供するものであり、極めて重要である。

中毒事例の対応を通して開発された種々の試験法は、これまで地研のネットワークにより情報共有されてきた。その中で改良や分析精度の向上が図られてきたが、未だ課題が残されている。化学的分析においては、毒成分の標準品を確保することが困難であるなどの理由により、同定可能な植物種が限られていることや、調理済み中毒残品の定量試験法が未整備であることなどが課題として挙げられる。

本研究では、植物性自然毒の中毒事例において病因植物種を網羅的に同定するために、地研が広く利用でき、調理済み中毒

残品にも適用可能な標準的化学分析手法の確立を目指した。分析機器は、農薬のポジティブ制度導入により地研において汎用されている液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いることとした。また、毒成分の標準品の供給体制について検討することとした。

平成 30 年度は、わが国において過去に発生した中毒事例から、発生頻度や症状の重篤度を考慮して、分析対象化合物とすべき毒成分の中から、市販の標準物質が入手可能であった高等植物の 44 成分とキノコの 12 成分を選定し、LC-MS/MS の分析条件を最適化した。

令和元年度は、調理済み食品中の毒成分を定量するための前処理法を検討した。有毒植物が誤食される際には、簡単な汁物、おひたし、揚げ物といった料理から、各種調味料を加えて、他の食品と長時間煮たり焼いたりする料理に至るまで、多種多様な料理として喫食されることが想定される。調理済み食品に含まれる脂質やタンパク質といった分析対象化合物以外の試料マトリックスは、分析対象化合物の正確な定性と定量に大きく影響し、同定された毒成分が中毒量に達しているかどうかを判断することが求められる中毒事例の原因究明を困難にする。そのため、機器分析に先立ち、液-液分配や固相抽出などの前処理により分析を妨害する試料マトリックスを除去する必要があり、さらに中毒時には簡易、迅速な前処理も求められる。

今回、抽出時にトリクロロ酢酸 (TCA) 溶液を加えて除タンパク処理を行い、脂

質除去機能を有する精製カートリッジを通液した後、希釈するという簡易な操作フローを検討した。分析対象化合物は、添加回収試験に用いるのに十分な量の市販品が入手可能であった高等植物の 42 成分、コリンを除くキノコの 11 成分を対象とした。各分析対象化合物の精製カートリッジの溶出条件を検討の上、前処理フローを構築した。調理済み食品として、高等植物の毒成分については、ハウレンソウ、ギョウザ、カレーの 3 品、キノコの毒成分については、シイタケ、グルタン、スキヤキの 3 品を試料とした。各食品で添加回収試験を実施して、試験法の適用性を評価した。

B. 研究方法

1. 高等植物

1.1 試料

高等植物の毒成分の添加回収試験は以下の食品を検討した。

- 1) ハウレンソウ（生、市販品）
- 2) ギョウザ（冷凍、市販品（A 社製））
- 3) カレー（自家調理品。原材料：H 社のカレールー（中辛）20 g、牛肉 40 g、タマネギ 60 g、ニンジン 15 g、水 140 mL、牛乳 5 mL、油 2 g（ジャガイモ抜き））

1.2 試薬・試液

高等植物の毒成分は、昨年度（H30 年度）に機器分析条件を設定した 44 成分のうち、市販品がないトリカブト類のジェサコニチンと十分な量の市販品が入手できなかったドクウツギのツチンを除く 42 成分を用いた。表 1 の混合標準溶液 A

群に属する毒成分はメタノールにより溶解した後、混合してメタノールにより希釈し、5 µg/mL の混合標準溶液を調製した。同様に B 群に属する毒成分はアセトニトリルにより溶解した後、混合してアセトニトリルにより希釈して 10 µg/mL の混合標準溶液を調製した。

内部標準として、安定同位体標識化合物のカフェイン- d_9 （CDN Isotopes 社製）、レセルピン- d_9 （Sigma-Aldrich 社製）及びジゴキシン- d_3 （Tront Research Chemicals 社製）を用いた。それぞれメタノールに溶解し、カフェイン- d_9 とレセルピン- d_9 は混合し、ジゴキシン- d_3 は単一でメタノールにより希釈して 10 µg/mL の溶液を調製した。

精製に用いたカートリッジは Agilent 社製の Captiva EMR-Lipid（3 mL、300 mg）を使用した。

10%(w/v)TCA 溶液はナカライテスク（株）製の特級試薬を用いて調製した。その他試験溶液の調製及び LC-MS/MS 測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用又は LC-MS 用を用いた。

1.3 装置

フードカッターは Retsch 社製グラインドミックス GM200、ホモジナイザーは（株）マイクロテック・ニチオン製のヒスコトロン NS-50 を用いた。遠心分離機は久保田商事（株）製の 6200 を用いた。LC-MS/MS 装置は Agilent 社製の 1200 シリーズ液体クロマトグラフに Sciex 社製の 4000QTRAP トリプル四重極タンデム質量分析計を接続して使用した。

1.4 LC-MS/MS 測定条件

高等植物の毒成分の測定条件を表 1、表 2 及び図 1 に示した。測定には各成分の予想される溶出時間帯のみをモニターする Scheduled MRM を用いた。

1.5 試験溶液の調製

高等植物の試験溶液調製法の概略を、Scheme1 に示した。

1.5.1 抽出

試料 5.0 g を 50 mL のポリプロピレン製遠心沈殿管に量り採り、ジゴキシン- d_3 溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 0.5 mL 添加して混合し、30 分間放置した。添加回収試験においても同様に、試料中の濃度が 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ となるように試料にあらかじめ標準溶液を添加し、30 分間放置したものを試料とした。

試料に 10%(w/v)TCA 溶液 10 mL 及びメタノール 10 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした後、常温、 $2,000\times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を採り、さらにメタノールを加えて正確に 50 mL とした。

1.5.2 精製

抽出液を 2 mL 採り、ガラス製の遠心沈殿管 (10 mL 容) にセットした Captiva EMR-Lipid カートリッジに負荷し、常温、 $1,000\times g$ で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てた。さらに抽出液 1 mL を負荷し、同様に遠心分離して得られた溶出液を採り、水を加えて 10 mL に定容したものを試験溶液とした (10 mg sample/g)。バイアルは不活性処理済みの透明ガラスバイアルを用いた。

1.6 定量

ジゴキシン- d_3 が 10 ng/mL となるように加えた上で、0.2%(w/v)TCA 含有 8%(v/v)メタノール溶液で 1.0、2.0、5.0、10、20、50 ng/mL の標準溶液を調製し、それぞれ 5 μL を LC-MS/MS に注入した。また、別途 0.2%(w/v)TCA 含有 8%(v/v)メタノール溶液で調製したカフェイン- d_9 及びレセルピン- d_9 の 10 ng/mL 混合標準溶液を 5 μL 共注入した。42 成分はそれぞれ表 1 に示す内部標準との面積比を求めて検量線を作成した。

1.7 精製カートリッジの負荷溶媒の検討

精製に使用する脂質除去機能付きカートリッジとして、Agilent 社製の Captiva ND Lipids 3 mL カートリッジ (以下、ND) と Captiva EMR Lipids 3 mL カートリッジ (以下、EMR) の 2 種類のカートリッジを検討した。負荷溶媒のメタノール濃度と TCA 濃度を最適化するため、高等植物、キノコの毒成分 200 ng を以下の組成の溶媒に溶解させ、カートリッジに負荷し、常温、 $1,000\times g$ 、1 分間遠心分離して得られた溶出液に含まれる毒成分の回収率を求めた。

- 1) メタノール濃度 80%(v/v)で TCA 含有濃度を 0、0.1、2%(w/v)とした 3 組成。
- 2) TCA 濃度 2%(w/v)でメタノール濃度を 50、60、70、80%(v/v)とした 4 組成。

1.8 試料マトリックスの測定への影響

ブランク試料を B.1.5 試験溶液の調製に従い調製し、添加回収試験における回収率 100%相当濃度となるように、試験溶液を 10 mL に定容する前に 100 ng/mL の標準溶液を 1 mL 加えて、マト

リックス標準溶液とした。10 ng/mL の溶媒標準溶液のピーク面積に対するマトリックスタンダード標準溶液のピーク面積の比（各2回測定の平均値）を求めて試料マトリックスの測定への影響を評価した。

2. キノコ

2.1 試料

キノコの毒成分の添加回収試験には、以下の食品を検討した。

- 1) シイタケ（生、市販品（菌床栽培品））
- 2) グラタン（自家調理品。原材料：マカロニ 25 g、チーズ 15 g、エビ 35 g、タマネギ 35 g、牛乳 200 mL、油 2 g、バター 3 g、小麦粉 8 g、塩コショウ少々）
- 3) スキヤキ（自家調理品。原材料：牛肉 100 g、ネギ 20 g、糸こんにゃく 50 g、シュンギク 15 g、豆腐 75 g、水 25 mL、しょうゆ 30 mL、みりん 30 mL、砂糖 10 g）

2.2 試薬・試液

H30年度に機器分析条件を設定した12成分（ムシモール、ファロイジン、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、 α -アマニチン、アガリチン、 β -アマニチン、イボテン酸（以上8成分：HILIC-A群）、ジロミトリン、ムスカリン、コリン（以上3成分：HILIC-B群）及びイルジンS）のうち、食品中に多量に含まれるコリンを除く11成分の市販品をメタノール・水(1:1)混液に溶解して混合し、10 $\mu\text{g/mL}$ の混合標準溶液を調製した。

精製に用いたカートリッジとその他の試薬及び試液は、**B.1.2** に示した高等植物と同じものを使用した。

2.3 装置

B.1.3 に示した高等植物と同じ装置を使用した。

2.4. LC-MS/MS 測定条件

キノコの毒成分の測定条件を表3、図2~4に示した。

イルジンSは5 mM ギ酸アンモニウム (pH 3) -メタノールを用いた逆相クロマトグラフィー (RPLC) により測定した (図2)。その他の10成分はAgilent社製のInfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, P (2.1 mm ϕ ×100 mm, 2.7 μm) を用いた親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) により測定した。**B.2.2 試薬・試液**でHILIC-A群とした8成分は移動相として0.5%ギ酸-アセトニトリル (図3) を、HILIC-B群とした3成分は20 mM ギ酸アンモニウム (pH 3) -アセトニトリル (図4) をそれぞれ使い、グラジエント分析を行った。

2.5. 試験溶液の調製

キノコの試験溶液調製法の概略を、Scheme 2に示した。イルジンSの試験溶液は高等植物と同様にScheme 1に従って調製した。

2.5.1 抽出

試料5.0 gを50 mLのポリプロピレン製遠心沈殿管に量り採り、添加回収試験においては、試料中の濃度が1 $\mu\text{g/g}$ となるように試料にあらかじめ標準溶液を添加し、30分間放置したものを試料とし

た。以下、**B.1.5.1**の高等植物と同じ操作フローにより抽出した。

2.5.2 精製

イルジン S は高等植物の場合と同じ操作フローで精製した。バイアルも不活性処理済みの透明ガラスバイアルを用いた (Scheme 1)。

イルジン S 以外のキノコの毒成分は、ポリプロピレン製の遠心沈殿管 (15 mL 容) を用いて高等植物と同様に操作し、得られた溶出液にアセトニトリルを加えて 10 mL に定容したものを試験溶液とした (10 mg sample /g)。バイアルはポリプロピレン製のものを用いた (Scheme 2)。

2.6. 定量

イルジン S は 0.2%(w/v)TCA 含有 8%(v/v)メタノール溶液で、その他の成分は 0.2%(w/v)TCA 含有 90%(v/v)アセトニトリル-2%(v/v)メタノール溶液で、1.0、2.0、5.0、10、20、50 ng/mL の標準溶液を調製し、絶対検量線で定量した。

2.7 精製カートリッジの負荷溶媒の検討

B.1.7の高等植物の検討と同様に行った。

2.8 真度低下の原因の検証

イボテン酸、ムシモール、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、 α -アマニチン、 β -アマニチン、ファロイジンの 7 成分について、シイタケ、グラタン及びスキヤキの各食品の前処理操作フロー

(Scheme 2) において、抽出前、精製前及び測定前の各段階で、試料中 1 μ g/g の濃度に相当する量の標準溶液を加えて添加回収試験を実施し、操作フローのどの

段階で回収率が低下しているかを検証した。

C. D. 研究結果及び考察

1. 前処理操作フローの検討

脂質やタンパク質といった試料マトリックスを除去する操作として、抽出時に TCA による除タンパク、精製時に脂質除去機能を持つカートリッジによる処理の工程を入れることにした。抽出時の除タンパクに用いる有機溶媒の濃度と TCA 濃度によって、50 mL に定容後の抽出溶液の組成、すなわち精製カートリッジの負荷溶媒の組成が決まるため、抽出時の溶媒組成が精製カートリッジにおける毒成分の溶出挙動に影響を与えることになる。そこで、まずは ND と EMR の 2 種の脂質除去機能付き精製カートリッジの溶出条件について、メタノールと TCA 濃度を最適化した上で、抽出時のメタノールと TCA 濃度を決定した。

1.1 精製カートリッジの負荷溶媒の条件 検討—高等植物

80%(v/v)メタノール濃度で TCA 濃度を変えたところ、ND と EMR のいずれのカートリッジも TCA 濃度を上げるほど毒成分の回収率が向上する結果となったため、TCA 濃度は 2%(w/v)とした。

2%(w/v)TCA 濃度でメタノール濃度を 50-80%(v/v)まで変化させたところ、ND と EMR のいずれのカートリッジにおいても、高極性のニコチンはメタノール濃度を上げると回収率が低下する傾向が見られたが、低極性の多くの成分の回収率が向

上したため、メタノール濃度は 80%(v/v)とした。

以上により、精製カートリッジの最適な溶媒組成として「2%(w/v)TCA 含有 80%(v/v)メタノール」を採用することとした。この溶媒組成で ND と EMR の比較したところ、ニコチンとアナバシンの回収率に差が見られ、ND はニコチン 17%、アナバシン 55%であったのに対し、EMR はニコチン 59%、アナバシン 91%と良好であったことから、精製カートリッジとして EMR を採用することとした。

この結果、抽出時に 10%(w/v)TCA 溶液 10 mL とメタノール 10 mL を加えてホモジナイズし、さらにメタノールを加えて 50 mL に定容することで、抽出溶液の溶媒組成が 2%(w/v)TCA 含有 80%(v/v)メタノール溶液となるようにして、EMR による精製を行うこととした (Scheme 1)。

1.2 精製カートリッジの負荷溶媒の条件検討ーキノコ

80%(v/v)メタノール濃度で TCA 濃度を変えたところ、ND と EMR のいずれのカートリッジも TCA 濃度を上げるほど、アガリチンの回収率が低下したが、ムスカリンやイボテン酸の回収率が向上したため中毒事例の発生頻度が高い後者の成分を重視して TCA 濃度は 2%(w/v)とした。

2%(w/v)TCA 濃度でメタノール濃度を 50-80%(v/v)まで変化させたところ、ND と EMR のいずれも回収率の大きな差はなかった。したがって、ND では脂質除去能が最も高いと考えられた 50%(v/v)メタノール、EMR では抽出時の試料の分散性

が良かった 80%(v/v)メタノールを採用した。

以上の条件で、実際の食品を分析したところ、ND ではグラタンやスキヤキといった油の多い食品で、カートリッジが目詰まりして、遠心力を 2,000×g まで上げて、5 分以上遠心しなければ負荷液を全量回収できなかった。一方、EMR は常温、1,000×g、1 分間の遠心分離で負荷液を全量回収できたため、操作性の点から EMR を採用することとした (Scheme 2)。

1.3 毒成分の吸着

今回、測定対象とする成分は化学構造が多岐にわたるため、前処理に用いる器具や精製カートリッジ、試験溶液を入れるバイアルで毒成分の吸着を考慮する必要があった。四級アンモニウムのムスカリンや酸性条件下のアルカロイドなど、正電荷を持つ成分がガラス表面に吸着する問題を回避するために、使用する器具は基本的にポリプロピレン製のものを使用することとした。

しかし、0.2%(w/v)TCA 含有 8%(v/v)メタノール溶液で調製した高等植物の毒成分の標準溶液のクロマトグラムのピーク強度は、RPLC で保持時間が大きい低極性成分ほど低下した。食品のマトリックスの存在化ではピーク強度の低下はみられなかったことから、低極性成分がポリプロピレン製容器に吸着したことが原因と考えられた。そのため、Scheme 1 で試験溶液を 10 mL に定容する際にガラス製のメスフラスコを使用し、試験溶液を入れるバイアルもガラス製のものに変更したところ、溶媒標準のピーク強度の低下は解消し、高

極性成分の回収率にも問題は生じなかった。一方、イルジン S 以外のキノコの毒成分は高極性成分が多いことや、試験溶液に有機溶媒が多く含まれるため吸着の影響はないと考え、ガラス製器具への吸着を回避するためポリプロピレン製の器具やバイアルを使用することとした (Scheme 2)。

また、今回採用した精製カートリッジの EMR は、使用する溶媒でのコンディショニングを必要としない。そのため、精製カートリッジでありながらメンブレンフィルターによるろ過のような簡易な操作で使用できるというメリットがある。しかし、メンブレンフィルターと同様に、負荷した溶媒に含まれる成分が精製カートリッジに吸着することがある。

高等植物の毒成分で精製カートリッジへの吸着の影響を確認するために、2%(w/v)TCA 含有 80%(v/v)メタノール溶液で調製した溶媒標準溶液を、EMR に 1 mL ずつ負荷して合計 4 mL まで分画したところ、最初の 1 mL で多くの成分で吸着による回収率の低下が起り、高極性のニコチンやアナバシンは 2 mL まで回収率が低かったため、精製の操作フローは、「抽出液を 2 mL 負荷して溶出液を捨てた後、抽出液を 1 mL を負荷して溶出液を採る」こととした (Scheme 1)。

2. 高等植物の添加回収試験

2.1 真度及び精度

中毒量に達しているかを判断するのに必要となる食品中の毒成分の最低濃度として、1 µg/g を想定し、ハウレンソウ、ギョウザ及びカレーの 3 種の食品を対象に、42 成分の毒成分について 5 併行の添加回

収試験を実施した。その結果を表 4 に示した。ジゴキシン及びジギトキシンはジゴキシン-d₃ をサロゲートとして試料の前処理を行う前に加えて内部標準補正を行った。その他の成分については、エレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード (ESI (+)) で測定した成分はカフェイン-d₉ 及びレセルピン-d₉ を、ESI ネガティブモード (ESI (-)) の測定成分はレセルピン-d₉ を測定時に共注入し、シリンジスパイクとして用いることにより内部標準補正を行った。各成分に対応する内部標準は表 1 に示した。

真度は、検討したハウレンソウ、ギョウザ、カレーの 3 種の食品で、ジギトキシン、ジオスシン、ジオスゲニンを除く 39 成分が 75~119%、併行精度 (RSD%) は 2~21% となり概ね良好な結果となった (表 4)。

2.2 内部標準物質

表 1 で内部標準として ESI (+) でカフェイン-d₉ を使用した 34 成分と、ESI(-) の 2 成分の合計 36 成分は、内部標準を使用することなく絶対検量線による定量でも良好な真度となった。ESI (+) のカフェイン-d₉ と ESI (-) のレセルピン-d₉ は液体クロマトグラフの注入誤差と質量分析計の感度変動を補正するシリンジスパイクとして使用した。

ESI (+) でレセルピン-d₉ を内部標準として使用したニコチン、アナバシン、ジオスゲニン、ジオスシンの 4 成分は、後述する試料マトリックスの測定への影響の評価において、正のマトリックス効果が見られた (カレーのアナバシンを除く)。この

ため、これらの4成分に対しては、同じくESI(+)で正のマトリックス効果が見られたレセルピン-d₉を内部標準として、マトリックス効果を補正するシリンジスパイクとして使用した。この結果、いずれの成分も真度が向上した。しかし、ジオスゲニンとジオスシンは120%以内に収まることはなかった(表4)。

ジゴキシンとジギトキシンは、精製カートリッジの溶出条件の検討や試料マトリックスの測定への影響の評価において、良好な結果が得られたが、実際の食品試料への添加回収試験は70%を下回る結果となる場合があり、精度も不良であった。このため、ジゴキシン-d₃をサロゲートとして試料の前処理を行う前に加え、内部標準補正を行った。その結果、ジゴキシンは良好な結果が得られたが、ジギトキシンは逆に120%を超える結果となった(表4)。

2.3 試料マトリックスの測定への影響

各食品のマトリックス標準溶液とその濃度に相当する溶媒標準溶液の比(百分率)を表5に示した。ニコチン、ジオスゲニン、ジオスシン、ハウレンソウとギョウザのアナバシン、エキミジン、ハウレンソウのフェブリフジン、アコニチン、カレーのプルナシン以外は、100±10%以内となり、試料マトリックスの測定への影響は小さかった。前処理による試料マトリックスの効果的な除去と試験溶液の希釈率が100倍(0.01 mg sample/g)と高いことにより、色素が多いハウレンソウ、脂質やタンパク質が多いギョウザ、脂質やスパイスなどを多量に含むカレーといった食品に

おいても、マトリックス効果が低減されたと考えられる。

2.4 選択性

内部標準を添加したブランク試料の試験溶液のクロマトグラムにより、選択性を評価した。図5~46に、測定対象成分の42成分の定量イオンについて、成分ごとにハウレンソウ、ギョウザ、カレーのクロマトグラムを示した(上段:ブランク試料、中段:添加回収、下段:溶媒標準溶液)。

ニコチンのブランク試料のクロマトグラムにおいて、保持時間付近に夾雑ピークが見られたが(図5)、他の成分のクロマトグラムにおいては、保持時間付近の夾雑ピークの強度が溶媒標準溶液に比べて1/100以下となっており、選択性は高かった。

また、溶媒標準溶液と添加回収のクロマトグラムにおいて、複数回の測定において保持時間の変動はなく、かつ両者の保持時間の違いは1%以内と良好な結果となった。

以上により、本分析法は食中毒の病因物質を誤りなく同定する定性能力に優れた方法であると考えられる。

3. キノコの添加回収試験

3.1 真度

コリンを除くキノコの毒成分11成分について、1 µg/gの添加濃度で、シイタケ、グラタン及びスキヤキの3種の食品を対象に添加回収試験を実施した。その結果を図47に示した。

真度は、ムスカリンとイルジンSで69~107%と良好な結果となったが、0.5%ギ酸とアセトニトリルを移動相として使用するHILIC-A群の8成分と、ジロミトリ

ンは真度が 0~83%となり、多くの成分と食品の組み合わせで真度が 70%に達しなかった。

この原因を検証するため、精製カートリッジの回収率が不良であったアガリチンと夾雑ピークの影響で定量が困難であったジロミトリンを除く 7 成分について、シイタケ、グラタン及びスキヤキの各食品の前処理フローにおいて、抽出前、精製前及び測定前の各段階で添加回収試験を実施した。その結果、測定前添加、すなわちマトリックス標準溶液において、全ての成分でピーク強度の低下が見られた（図 48）。このことから、試料マトリックスの測定への影響が回収率低下の原因であることが示唆された。また、グラタンのアシルグリシンとプロパルギルグリシンにおいては、測定前添加、精製前添加、抽出前添加と前処理操作フローを遡るに従い、回収率の低下が見られたことから、抽出、精製の各段階でも成分の損失もあることが分かった。

3.2 選択性

HILIC-A 群の成分のうち、イボテン酸は添加回収試験におけるクロマトグラムで夾雑ピークが近接しており、特にグラタンやスキヤキでは正確な定量値を得ることが困難であった（図 49）。

また、同じく HILIC-A 群のムシモールは、添加回収試験のクロマトグラムで試料マトリックスの影響により保持時間が大きくなる現象が見られた（図 50）。他、アシルグリシンやプロパルギルグリシンでは直前に移動相にギ酸アンモニウムを使用した後に、0.5%ギ酸による平衡化を十

分に行わずに分析した場合に、保持時間が変動する現象が見られた。コアシェル型の HILIC カラムにより、ギ酸アンモニウムの代わりにギ酸を用いて、イボテン酸やムシモールなどギ酸アンモニウムによりイオン化抑制を強く受ける高極性成分を、迅速に高感度分析するというアプローチは、理にかなった魅力的なものであると考えられたが、食品由来の試料マトリックスの影響を回避することは困難であった。従って、毒キノコの分析法は分離条件から再検討が必要であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 南谷臣昭、登田美桜、大城直雅：質量分析による自然毒食中毒の理解 課題と展望, *質量分析*, 67(2), 71-77, 2019

2. 学会発表

- 1) 谷口賢、南谷臣昭、友澤潤子、登田美桜：植物性自然毒の多成分同時分析法の開発：高等植物、令和元年度地方衛生研究所全国協議会、広島市、2019年12月
- 2) 友澤潤子、谷口賢、南谷臣昭、登田美桜：植物性自然毒の多成分同時分析法の開発：キノコ、令和元年度地方衛生研究所全国協議会、広島市、2019年12月

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表 1. 高等植物の毒成分の SRM トランジション及び内部標準の割り当て
(保持時間順)

No.	和名	英名	CAS No.	標準溶液	(min)	(+/-)	イオン	Q1	Q3	内部標準
1	ニコチン	Nicotine	54-11-5	A	2.2	+	[M+H] ⁺	163.2 163.2	132.0 106.0	レセルピン-d9
2	サンギニン	Sanguinine	60755-80-8	A	2.6	+	[M+H] ⁺	274.2 274.2	199.2 184.1	カフェイン-d9
3	アナバシン	Anabasine	494-52-0	A	2.8	+	[M+H] ⁺	163.2 163.2	134.2 146.0	レセルピン-d9
4	リナマリ	Linamarin	554-35-8	A	2.9	+	[M+NH ₄] ⁺	265.1 265.1	180.0 163.1	カフェイン-d9
5	ギンコトキシ	Ginkgotoxin	1464-33-1	A	3.0	+	[M+H] ⁺	184.0 184.0	152.0 134.1	カフェイン-d9
6	リコリン	Lycorine	476-28-8	A	3.2	+	[M+H] ⁺	288.1 288.1	147.0 119.2	カフェイン-d9
7	ガラタミン	Galantamine	357-70-0	A	4.9	+	[M+H] ⁺	288.3 288.3	213.2 198.1	カフェイン-d9
8	リコラミン	Lycoramine	21133-52-8	A	5.0	+	[M+H] ⁺	290.2 290.2	233.1 215.1	カフェイン-d9
9	コニイ	Coniine	458-88-8	A	5.2	+	[M+H] ⁺	128.2 128.2	69.1 55.0	カフェイン-d9
10	フェブリフジン	Febrifugine	24159-07-7	A	5.5	+	[M+H] ⁺	302.1 302.1	100.1 120.1	カフェイン-d9
11	スコポラミン	Scopolamine	114-49-8	A	5.7	+	[M+H] ⁺	304.0 304.0	138.0 156.0	カフェイン-d9
12	アミグダリン	Amygdalin	29883-15-6	A	5.9	+	[M+NH ₄] ⁺	475.1 475.1	325.0 163.3	カフェイン-d9
13	ゲルセミン	Gelsemine	509-15-9	A	5.8	+	[M+H] ⁺	323.2 323.2	70.1 236.2	カフェイン-d9
14	アニサチン	Anisatin	5230-87-5	B	6.2	-	[M-H] ⁻	327.1 327.1	126.9 83.0	レセルピン-d9
15	ツチン*	Tutin	2571-22-4	B	6.2	-	[M+HCOO] ⁻	339.0 339.0	152.8 138.8	-
16	プルナシン	Prunacin	99-18-3	A	6.3	+	[M+NH ₄] ⁺	313.1 313.1	163.2 145.2	カフェイン-d9
17	アトロピン	Atropine	13269-35-7	A	6.3	+	[M+H] ⁺	290.2 290.2	124.2 93.0	カフェイン-d9
18	グラヤノトキシ I	Grayanotoxin I	4720-09-6	B	6.5	+	[M+NH ₄] ⁺	430.2 430.2	299.0 376.9	カフェイン-d9
19	センキルキン	Senkirkine	2318-18-5	B	6.7	+	[M+H] ⁺	366.2 366.2	168.3 94.0	カフェイン-d9
20	エキミジン	Echimidine	520-68-3	B	6.7	+	[M+H] ⁺	398.3 398.3	120.2 220.2	カフェイン-d9
21	デメコルシン	Demecolcine	477-30-5	A	6.8	+	[M+H] ⁺	372.2 372.2	340.1 310.1	カフェイン-d9
22	ヘレブリン	Hellebrine	13289-18-4	A	7.5	+	[M+NH ₄] ⁺	742.4 742.4	417.3 563.4	カフェイン-d9
23	コンバラトキシ	Convallatoxin	508-75-8	A	7.5	-	[M+HCOO] ⁻	595.3 595.3	549.1 385.3	レセルピン-d9
24	ストロファンチジン	Strophanthidine	66-28-4	A	7.8	+	[M+NH ₄] ⁺	422.3 422.3	341.2 323.2	カフェイン-d9
25	α-ソラニン	α-Solanine	20562-02-1	A	7.8	+	[M+H] ⁺	868.5 868.5	398.4 722.5	カフェイン-d9
26	α-チャコニン	α-Chaconine	20562-03-2	A	7.8	+	[M+H] ⁺	852.5 852.5	706.4 398.4	カフェイン-d9
27	コルヒチン	Colchicine	64-86-8	A	7.9	+	[M+H] ⁺	400.2 400.2	358.2 310.0	カフェイン-d9
28	ジェルピン	Jervine	469-59-0	B	7.8	+	[M+H] ⁺	426.2 426.2	67.1 313.2	カフェイン-d9
29	ベラトラミン	Veratramine	60-70-8	B	8.0	+	[M+H] ⁺	410.3 410.3	295.1 84.1	カフェイン-d9
30	プロトベラトリンB	Protoveratrine B	124-97-0	B	8.1	+	[M+H] ⁺	810.4 810.4	792.2 658.4	カフェイン-d9

*標準品が入手できなかったため、添加回収試験を実施することができなかった。

上段：定量トランジション
下段：確認トランジション

表 1. つづき

No.	和名	英名	CAS No.	混合標準溶液	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサーイオン	Q1	Q3	内部標準
31	ジゴキシン	Digoxin	20830-75-5	A	8.5	+	[M+NH ₄] ⁺	798.6 798.6	97.1 651.2	ジゴキシン-d3
32	メサコニチン	Mesaconitine	2752-64-9	B	8.5	+	[M+H] ⁺	632.2 632.2	572.4 354.2	カフェイン-d9
33	シマリン	Cymarine	508-77-0	A	8.7	+	[M+NH ₄] ⁺	566.3 566.3	405.2 517.3	カフェイン-d9
34	プロトベラトリンA	Protoveratrine A	143-57-7	B	8.7	+	[M+H] ⁺	794.5 794.5	776.5 658.4	カフェイン-d9
35	アコニチン	Aconitine	302-27-2	B	8.9	+	[M+H] ⁺	646.2 646.2	586.4 526.3	カフェイン-d9
36	ヒバコニチン	Hypaconitine	6900-87-4	B	8.9	+	[M+H] ⁺	616.3 616.3	556.1 524.2	カフェイン-d9
37	ジェサコニチン*	Jesaconitine	16298-90-1	B	9.0	+	[M+H] ⁺	676.3 676.3	616.2 134.9	-
38	アリストロキア酸 II	Aristrochic acid II	475-80-9	A	10.2	+	[M+NH ₄] ⁺	329.2 329.2	268.0 294.0	カフェイン-d9
39	オレアンドリン	Oleandrine	465-16-7	A	10.3	+	[M+NH ₄] ⁺	594.4 594.4	577.6 433.3	カフェイン-d9
40	ジギトキシン	Digitoxin	71-63-6	A	10.3	+	[M+NH ₄] ⁺	782.3 782.3	96.9 635.3	ジゴキシン-d3
41	ククルピタシン B	Cucurbitacin B	6199-67-3	B	10.4	+	[M+NH ₄] ⁺	576.3 576.3	499.2 481.3	カフェイン-d9
42	アリストロキア酸 I	Aristrochic acid I	313-67-7	A	10.5	+	[M+NH ₄] ⁺	359.0 359.0	296.0 323.9	カフェイン-d9
43	ジオスゲニン	Diosgenin	512-04-9	A	11.5	+	[M+H] ⁺	415.3 415.3	271.3 253.1	レセルピン-d9
44	ジオスシン	Dioscin	19057-60-4	A	11.5	+	[M+NH ₄] ⁺	886.5 886.5	415.4 397.3	レセルピン-d9

*標準品が入手できなかったため、添加回収試験を実施することができなかった。

上段：定量トランジション
下段：確認トランジション

表 2. 高等植物の内部標準の SRM トランジション条件

No.	和名	英名	CAS No.	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサーイオン	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
IS1	カフェイン-d ₉	Caffeine-d ₉	シリンジスパイク	5.8	+	[M+H] ⁺	204.2	144.2	76	31	24
IS2	レセルピン-d ₉	Reserpine-d ₉	シリンジスパイク	9.2	-	[M-H] ⁻	618.4	174.1	176	59	30
IS3	ジゴキシン-d ₃	Digoxin-d ₃	サロゲート	11.5	+	[M+NH ₄] ⁺	616.4	598.3	-135	-38	-13
							801.5	97.0	71	57	14

表 3. キノコの毒成分の SRM トランジション

No.	和名	英名	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3
1	イルジンS	Illudin S	8.1	+	[M+H] ⁺	265.0 265.0	247.0 217.0
HILIC-A							
1	ムシモール	Muscimol	5.9	+	[M+H] ⁺	115.0 115.0	98.0 68.0
2	ファロイジン	Phalloidin	7.5	+	[M+H] ⁺	789.3 789.3	753.3 86.0
3	アリルグリシン	L-Allylglycine	7.3	+	[M+H] ⁺	116.0 116.0	70.0 74.0
4	プロパルギルグリシン	L-Propargylglycine	8.0	+	[M+H] ⁺	114.0 114.0	68.0 74.0
5	α-アマニチン	α-Amanitin	8.8	+	[M+H] ⁺	919.4 919.4	86.0 259.0
6	アガリチン	Agaritin	9.0	+	[M+H] ⁺	268.0 268.0	250.0 121.0
7	β-アマニチン	β-Amanitin	9.6	+	[M+H] ⁺	920.3 920.3	86.0 259.0
8	イボテン酸	L-Ibotenic acid	9.8	+	[M+H] ⁺	159.0 159.0	113.0 115.0
HILIC-B							
1	ジロミトリン	Gyromitrin	0.9	+	[M+H] ⁺	101.0 101.0	73.0 42.0
2	ムスカリン	Muscarin	3.5	+	M ⁺	174.0 174.0	57.0 43.0
3	コリン	Cholin	4.8	+	M ⁺	104.0 104.0	60.0 58.0

上段：定量トランジション

下段：確認トランジション

カラム	Raptor C18, 2.1 × 150 mm, 2.7 mm		
移動相	(A) 5 mMギ酸アンモニウム (pH 3) (B) アセトニトリル		
グラジエント	Time/min	A (%)	B (%)
	0	98	2
	11	10	90
	12	10	90
	12.1	98	2
	20	98	2
流速	0.3 mL/min		
カラム温度	40°C		
注入量	5 μL		
イオンソース	Parameter \ Porarity	ESI(+)	ESI(-)
	Curtain gas (psi)	20	20
	Collision gas (psi)	7	7
	Ion Spray Voltage (V)	5000	-4500
	Temperature (°C)	300	300
	Ion Source Gas1 (psi)	60	60
	Ion Source Gas2 (psi)	60	60

* SCIEX社製 Turbo-Vソースの設定例

図 1. 高等植物の毒成分一斉試験の機器分析条件

カラム	Raptor C18, 2.1 × 150 mm, 2.7 mm																		
移動相	(A) 5 mMギ酸アンモニウム (pH 3) (B) メタノール																		
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time/min</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>12.1</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>	Time/min	A (%)	B (%)	0	98	2	11	10	90	12	10	90	12.1	98	2	20	98	2
Time/min	A (%)	B (%)																	
0	98	2																	
11	10	90																	
12	10	90																	
12.1	98	2																	
20	98	2																	
流速	0.3 mL/min																		
カラム温度	40°C																		
注入量	5 μL																		
イオンソース	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parameter \ Porarity</th> <th>ESI(+)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Curtain gas (psi)</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>Collision gas (psi)</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>Ion Spray Voltage (V)</td> <td>5000</td> </tr> <tr> <td>Temperature (°C)</td> <td>300</td> </tr> <tr> <td>Ion Source Gas1 (psi)</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>Ion Source Gas2 (psi)</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table>	Parameter \ Porarity	ESI(+)	Curtain gas (psi)	20	Collision gas (psi)	7	Ion Spray Voltage (V)	5000	Temperature (°C)	300	Ion Source Gas1 (psi)	60	Ion Source Gas2 (psi)	60				
Parameter \ Porarity	ESI(+)																		
Curtain gas (psi)	20																		
Collision gas (psi)	7																		
Ion Spray Voltage (V)	5000																		
Temperature (°C)	300																		
Ion Source Gas1 (psi)	60																		
Ion Source Gas2 (psi)	60																		

* SCIEX社製 Turbo-Vソースの設定例

図 2. イルジン S の機器分析条件

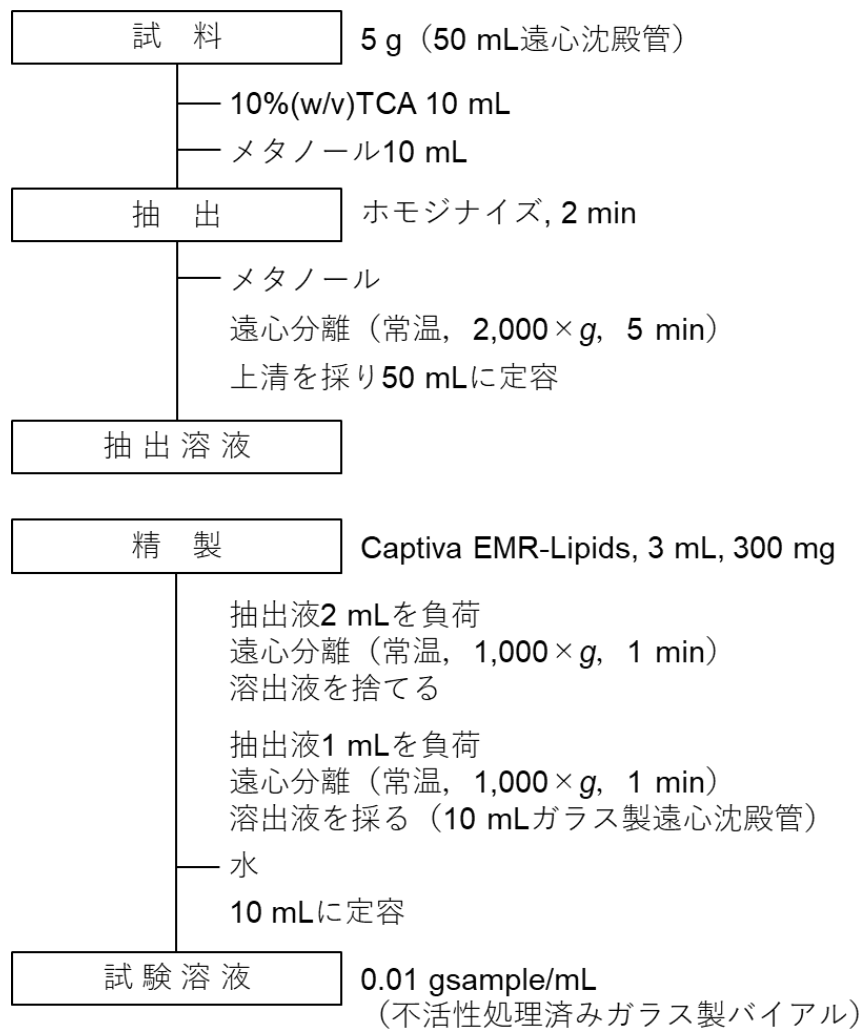
カラム	InfinityLab Poroshell 120, HILIC-Z, P 2.1 × 100 mm, 2.7 mm		
移動相	(A) 0.5%ギ酸 (B) アセトニトリル		
グラジエント	Time/min	A (%)	B (%)
	0	0	100
	10	40	60
	12	40	60
	12.1	0	100
	20	0	100
流速	0.3 mL/min		
カラム温度	40°C		
注入量	5 μL		
イオンソース	Parameter \ Porarity	ESI(+)	
	Curtain gas (psi)	20	
	Collision gas (psi)	7	
	Ion Spray Voltage (V)	5000	
	Temperature (°C)	300	
	Ion Source Gas1 (psi)	60	
	Ion Source Gas2 (psi)	60	

* SCIEX社製 Turbo-Vソースの設定例

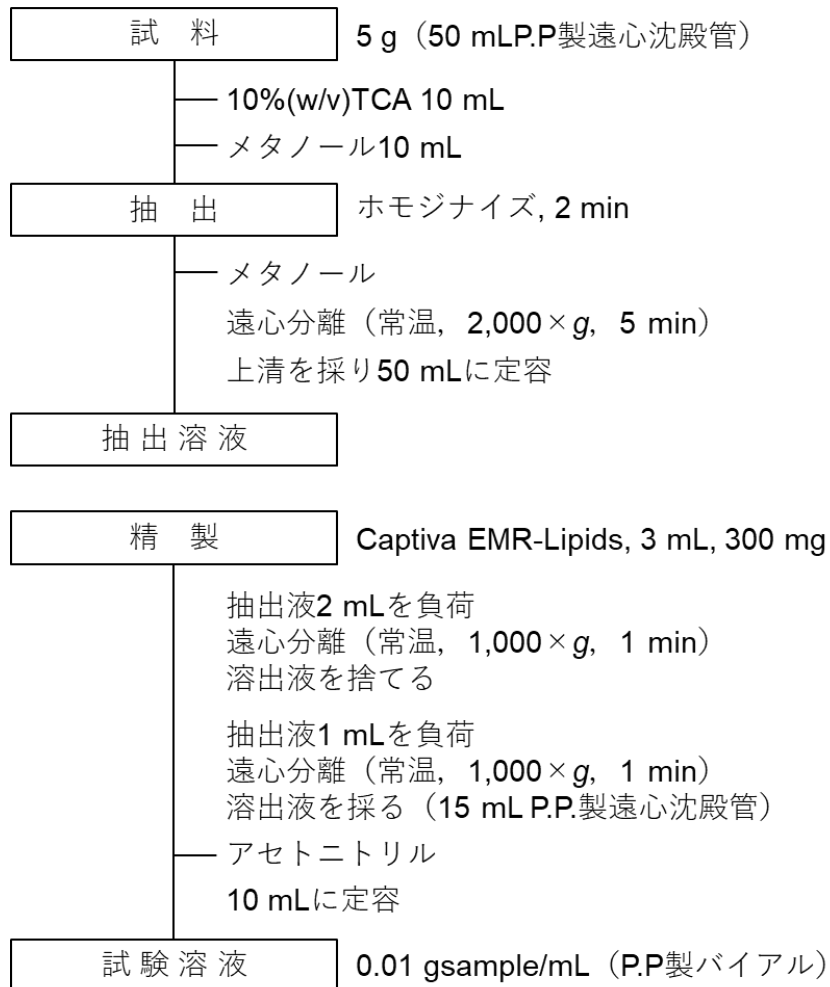
図 3. 毒キノコ 8 成分 (HILIC-A 群) の機器分析条件

カラム	InfinityLab Poroshell 120, HILIC-Z, P 2.1 × 100 mm, 2.7 mm		
移動相	(A) 20 mMギ酸アンモニウム (pH 3) (B) アセトニトリル		
グラジエント	Time/min	A (%)	B (%)
	0	5	95
	10	40	60
	12	40	60
	12.1	5	95
	20	5	95
流速	0.3 mL/min		
カラム温度	40°C		
注入量	5 μL		
イオンソース	Parameter \ Porarity	ESI(+)	
	Curtain gas (psi)	20	
	Collision gas (psi)	7	
	Ion Spray Voltage (V)	5000	
	Temperature (°C)	300	
	Ion Source Gas1 (psi)	60	
	Ion Source Gas2 (psi)	60	
	* SCIEX社製 Turbo-Vソースの設定例		

図 4. 毒キノコ 3 成分 (HILIC-B 群) の機器分析条件



Scheme 1. 高等植物及びビルジン S の毒成分一斉試験の前処理操作フロー



Scheme 2. キノコ (イルジン S を除く) の毒成分一斉試験の前処理操作フロー

表 4. 高等植物の毒成分の添加回収試験の結果

No.	和名	英名	真度 (n=5, 併行)					
			ホウレンソウ		ギョウザ		カレー	
			平均(%)	RSD(%)	平均(%)	RSD(%)	平均(%)	RSD(%)
1	ニコチン	Nicotine	108	5	98	5	107	13
2	サンギニン	Sanguinine	96	8	85	3	95	10
3	アナバシン	Anabasine	101	4	85	8	93	14
4	リナマリン	Linamarin	102	16	85	13	88	11
5	ギンコトキシソ	Ginkgotoxin	107	10	92	5	98	10
6	リコリン	Lycorine	99	10	91	4	93	10
7	ガラタミン	Galantamine	99	12	85	5	90	11
8	リコラミン	Lycoramine	103	10	89	6	93	10
9	コニイソ	Coniine	100	8	92	5	96	9
10	フェブリフジソ	Febrifugine	112	10	92	4	105	11
11	スコポラミン	Scopolamine	101	9	89	4	98	10
12	アミグダリン	Amygdalin	103	13	103	4	87	17
13	ゲルセミン	Gelsemine	96	12	85	5	98	10
14	アニサチソ	Anisatin	101	4	86	9	94	7
15	ツチソ*	Tutin	-	-	-	-	-	-
16	プルナチソ	Prunacin	107	13	90	11	86	14
17	アトロピン	Atropine	113	8	87	2	99	10
18	グラヤノトキシソ I	Grayanotoxin I	83	21	78	10	80	15
19	センキルクイソ	Senkirkine	97	14	93	4	97	7
20	エキミジソ	Echimidine	119	12	92	3	97	9
21	デメコルチソ	Demecolcine	112	14	85	8	86	14
22	ヘレブリソ	Hellebrine	90	11	84	8	90	15

*標準品が入手できなかったため、添加回収試験を実施することができなかった。

表 4. つづき

No.	和名	英名	真度 (n=5, 併行)					
			ホウレンソウ		ギョウザ		カレー	
			平均(%)	RSD(%)	平均(%)	RSD(%)	平均(%)	RSD(%)
23	コンバトキシシ	Convallatoxin	92	7	81	5	90	8
24	ストロファンチジン	Strophanthidine	114	6	94	5	108	15
25	α-ソラニン	α-Solanine	97	9	83	8	92	10
26	α-チャコニン	α-Chaconine	95	8	87	6	91	13
27	コルヒチン	Colchicine	111	10	96	6	92	18
28	ジェルピン	Jervine	101	14	81	7	89	11
29	ベラトラミン	Veratramine	91	8	82	4	91	11
30	プロトベラトリンB	Protoveratrine B	103	13	80	3	91	10
31	ジゴキシシ	Digoxin	112	10	101	10	116	11
32	メサコニチン	Mesaconitine	109	8	87	8	94	9
33	シマリン	Cymarine	75	11	81	14	79	16
34	プロトベラトリンA	Protoveratrine A	100	12	78	5	88	10
35	アコニチン	Aconitine	104	13	85	4	90	14
36	ヒパコニチン	Hypaconitine	104	10	85	5	88	18
37	ジェサコニチン*	Jesaconitine	—	—	—	—	—	—
38	アリストロキア酸II	Aristrochic acid II	89	7	82	9	92	7
39	オレアンドリン	Oleandrine	92	12	83	5	86	11
40	ジギトキシシ	Digitoxin	157	14	120	13	137	7
41	ククルビタシンB	Cucurbitacin B	85	10	83	3	89	9
42	アリストロキア酸I	Aristrochic acid I	89	12	81	2	80	6
43	ジオスゲニン	Diosgenin	120	28	135	20	162	27
44	ジオスシン	Dioscin	128	25	148	15	157	22

*標準品が入手できなかったため、添加回収試験nを実施することができなかった。

表 5. 高等植物の試料マトリックスの影響の測定結果

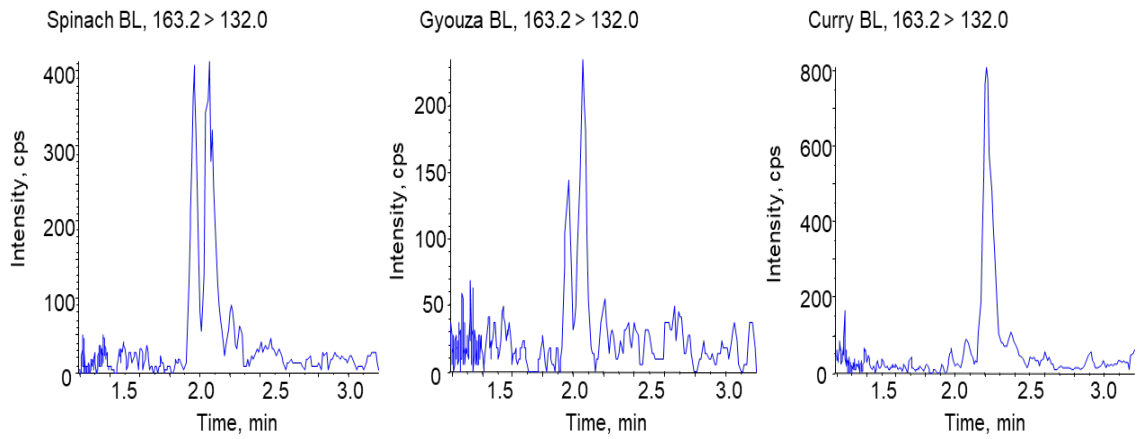
No.	和名	英名	マトリックスの影響 (n=2, 併行)		
			ホウレンソウ マトリックス標準	ギョウザ 溶媒標準	カレー 面積比 (%)
1	ニコチン	Nicotine	128	138	117
2	サンギニン	Sanguinine	99	103	103
3	アナバシン	Anabasine	111	111	90
4	リナマリン	Linamarin	110	108	105
5	ギンコトキシシ	Ginkgotoxin	106	107	99
6	リコリン	Lycorine	106	102	100
7	ガラントアミン	Galantamine	103	98	98
8	リコラミン	Lycoramine	103	101	99
9	コニイン	Coniine	96	101	101
10	フェブリフジン	Febrifugine	111	106	107
11	スコポラミン	Scopolamine	107	94	99
12	アミグダリン	Amygdalin	119	107	91
13	ゲルセミン	Gelsemine	103	99	99
14	アニサチン	Anisatin	108	105	101
15	ツチン*	Tutin	-	-	-
16	プルナシン	Prunacin	110	104	127
17	アトロピン	Atropine	104	103	98
18	グラヤノトキシシ I	Grayanotoxin I	94	98	90
19	センキルキン	Senkirkine	105	101	97
20	エキミジン	Echimidine	114	111	96
21	デメコルシン	Demecolcine	104	108	81
22	ヘレブリン	Hellebrine	103	94	107

*標準品が入手できなかったため、添加回収試験を実施することができなかった。

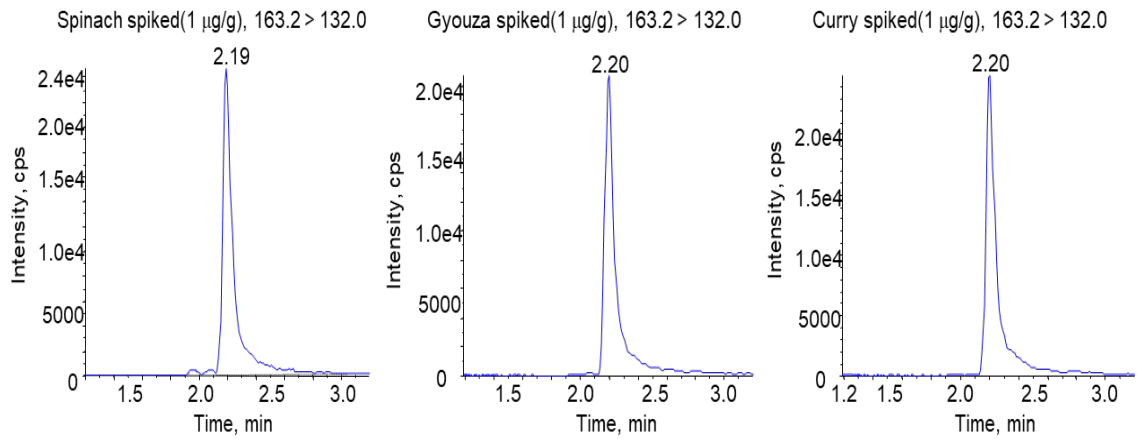
表 5. つづき

No.	和名	英名	マトリックスの影響 (n=2, 併行)		
			ホウレンソウ マトリックス標準	ギョウザ 溶媒標準	カレー 面積比 (%)
23	コンバラトキシシ	Convallatoxin	94	99	100
24	ストロファンチジン	Strophanthidine	92	100	97
25	α -ソラニン	α -Solanine	109	97	100
26	α -チャコニン	α -Chaconine	90	100	99
27	コルヒチン	Colchicine	101	97	103
28	ジェルビン	Jervine	93	99	95
29	ベラトラミン	Veratramine	85	86	96
30	プロトベラトリンB	Protoveratrine B	109	94	95
31	ジゴキシシ	Digoxin	81	95	82
32	メサコニチン	Mesaconitine	98	87	94
33	シマリン	Cymarine	91	91	92
34	プロトベラトリンA	Protoveratrine A	101	92	101
35	アコニチン	Aconitine	115	86	97
36	ヒパコニチン	Hypaconitine	105	93	94
37	ジェサコニチン*	Jesaconitine	-	-	-
38	アリストロキア酸II	Aristrochic acid II	98	93	96
39	オレアンドリン	Oleandrine	84	92	102
40	ジギトキシシ	Digitoxin	105	88	95
41	ククルビタシンB	Cucurbitacin B	98	94	95
42	アリストロキア酸I	Aristrochic acid I	93	92	87
43	ジオスゲニン	Diosgenin	148	138	147
44	ジオスシシ	Dioscin	148	137	137

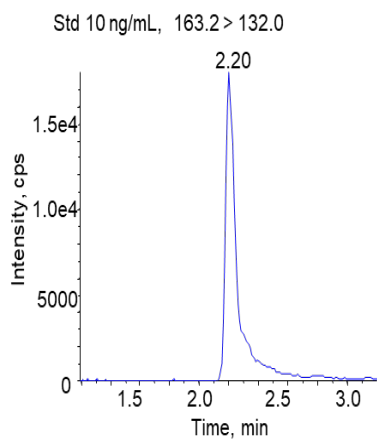
*標準品が入手できなかったため、添加回収試験nを実施することができなかった。



ブランク試料

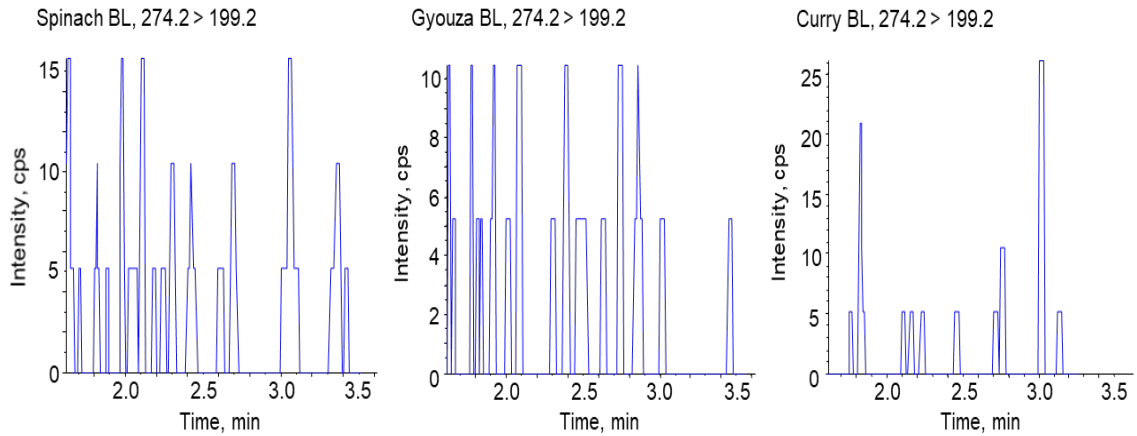


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

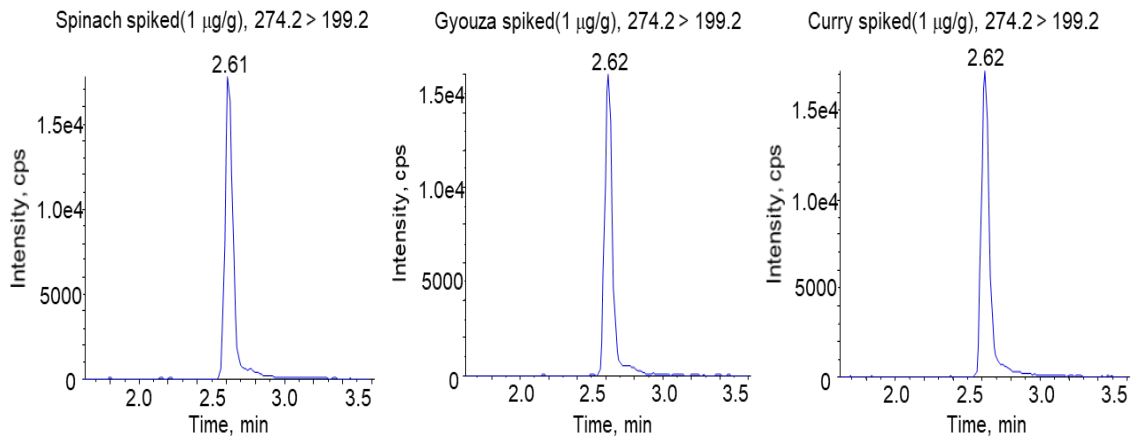


標準溶液 10 ng/mL

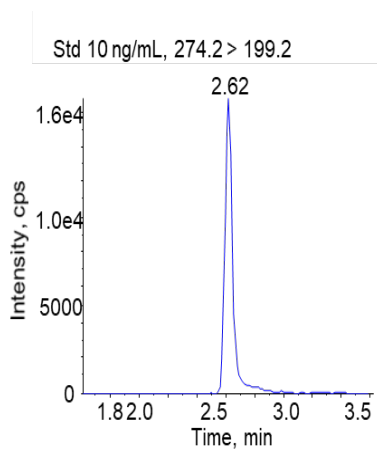
図 5. ニコチンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 163.2 > 132.0



ブランク試料

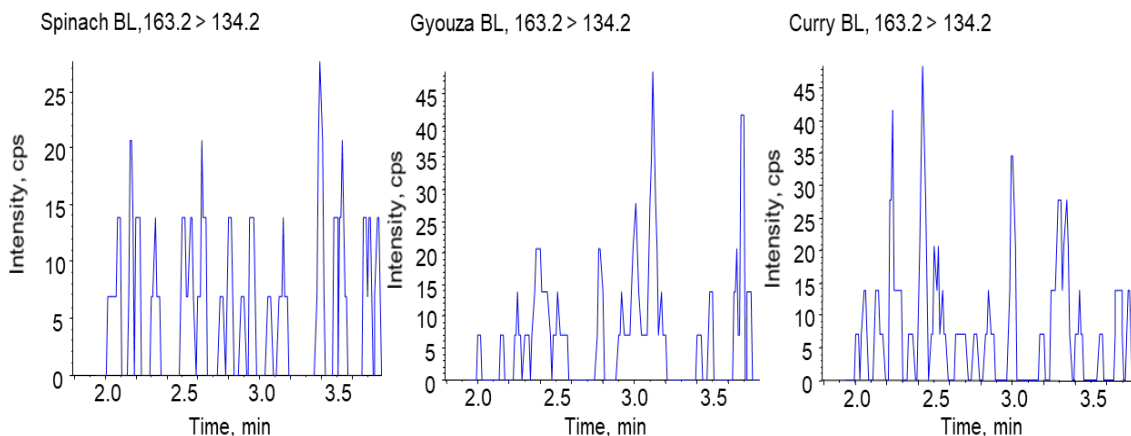


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

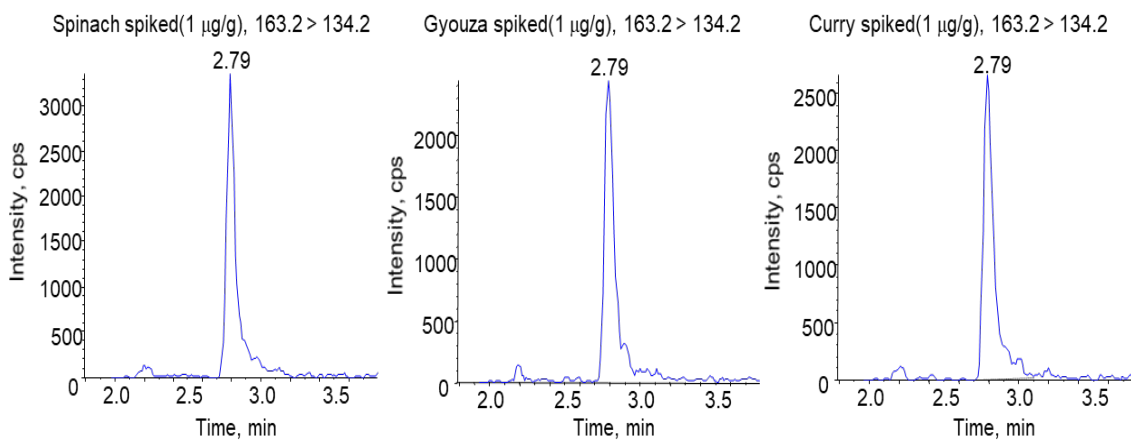


標準溶液 10 ng/mL

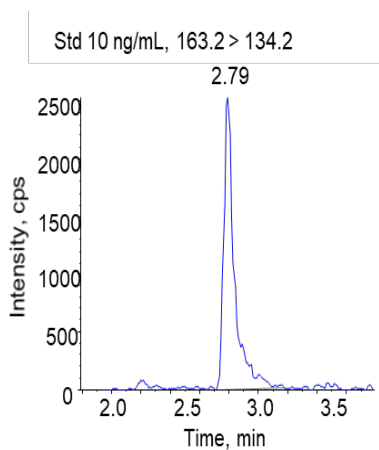
図 6. サングニンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 274.2 > 199.2



ブランク試料

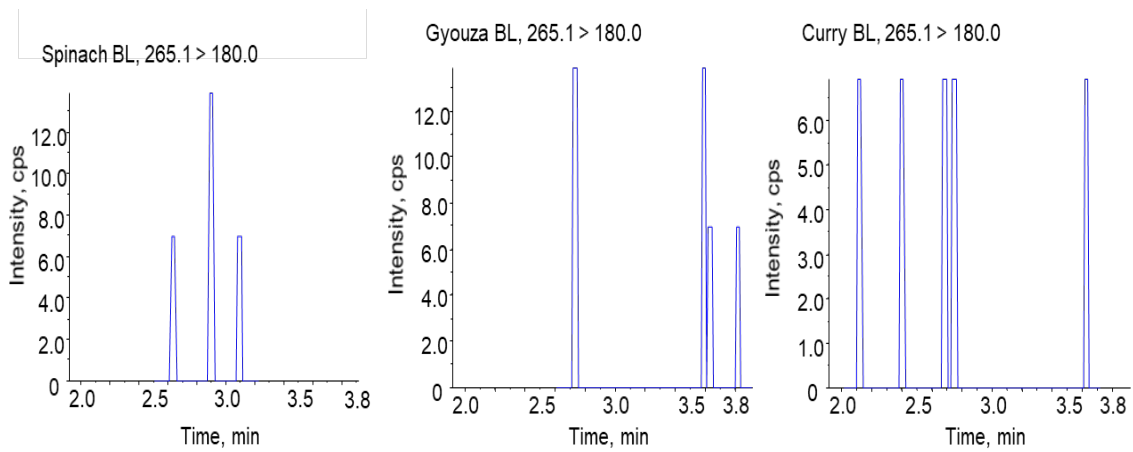


添加回収 (添加濃度 1 μg/g)

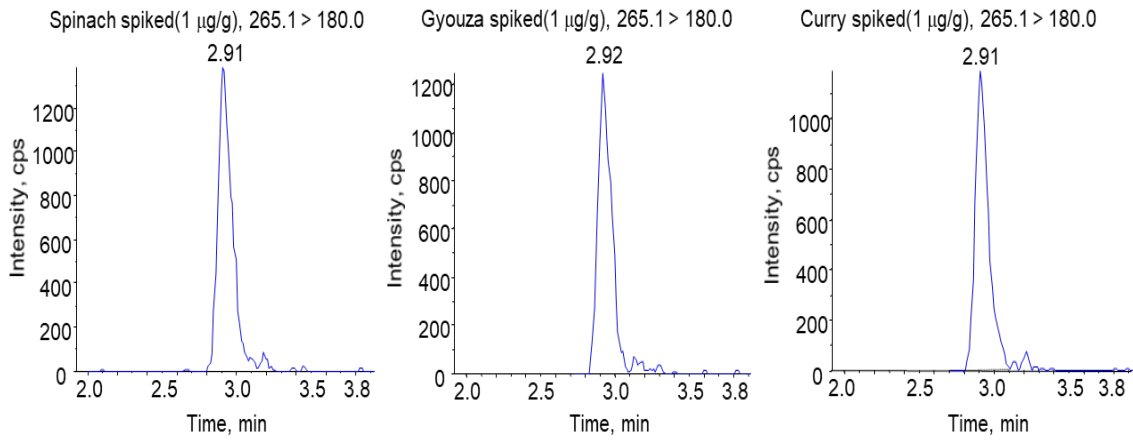


標準溶液 10 ng/mL

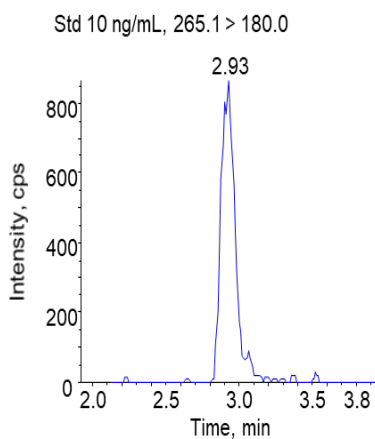
図 7. アナバシンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 163.2 > 134.2



ブランク試料

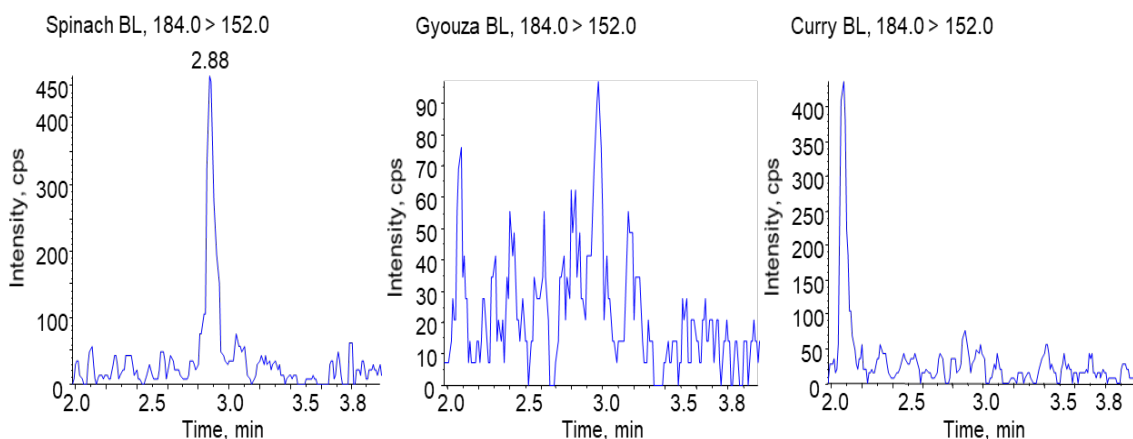


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

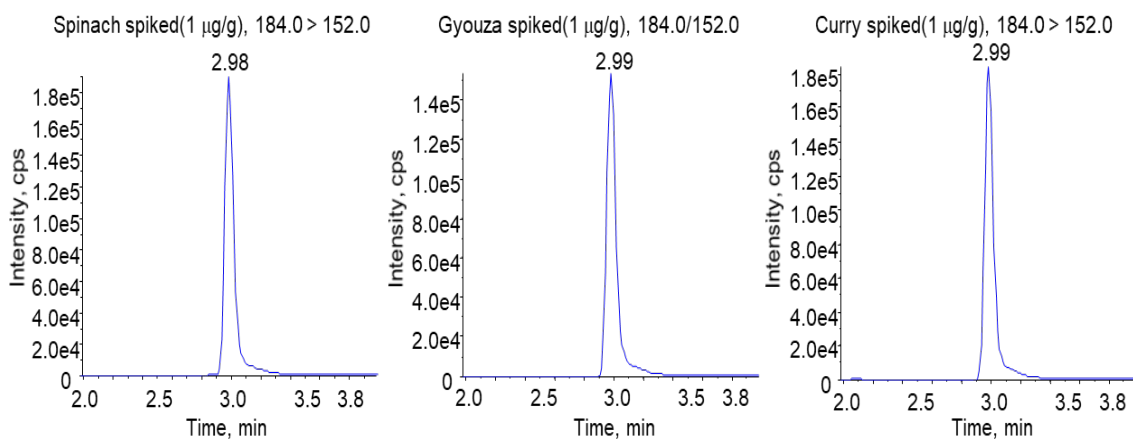


標準溶液 10 ng/mL

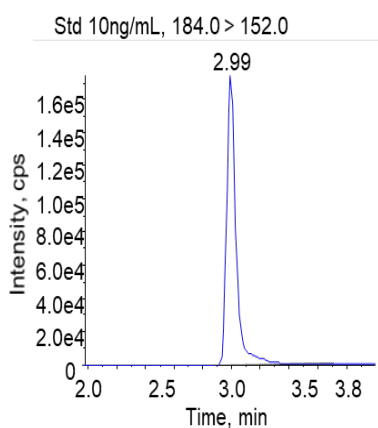
図 8. リナマリンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 265.1 > 180.0



ブランク試料

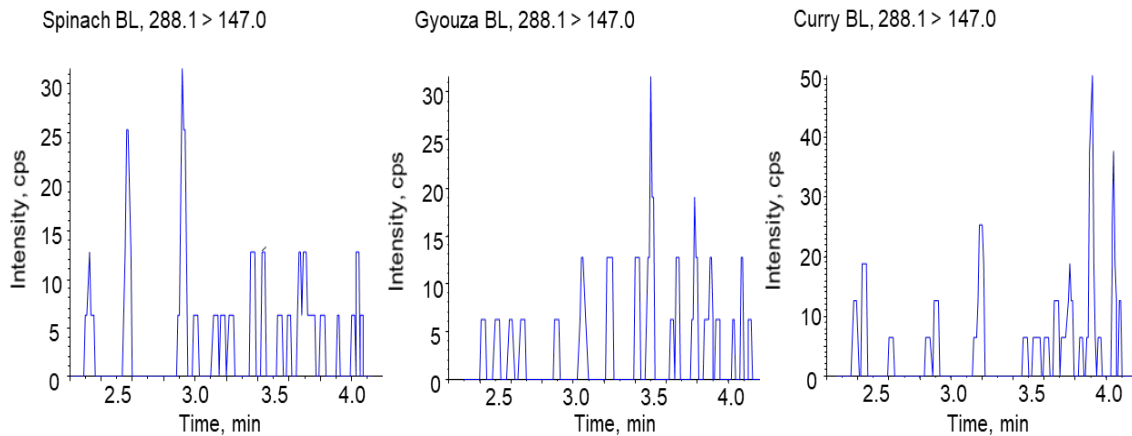


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

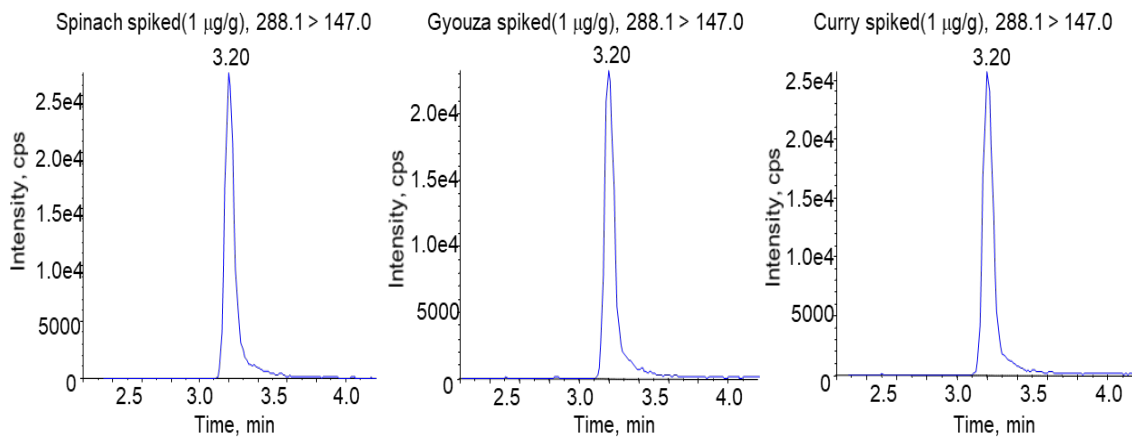


標準溶液 10 ng/mL

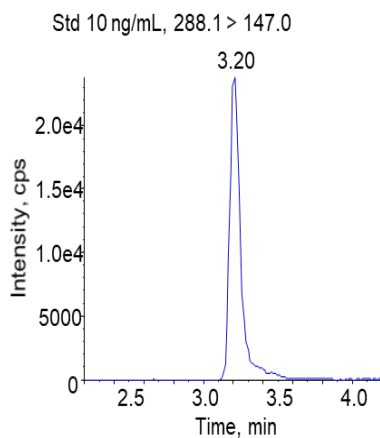
図 9. ギンコトキシンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 184.0 > 152.0



ブランク試料

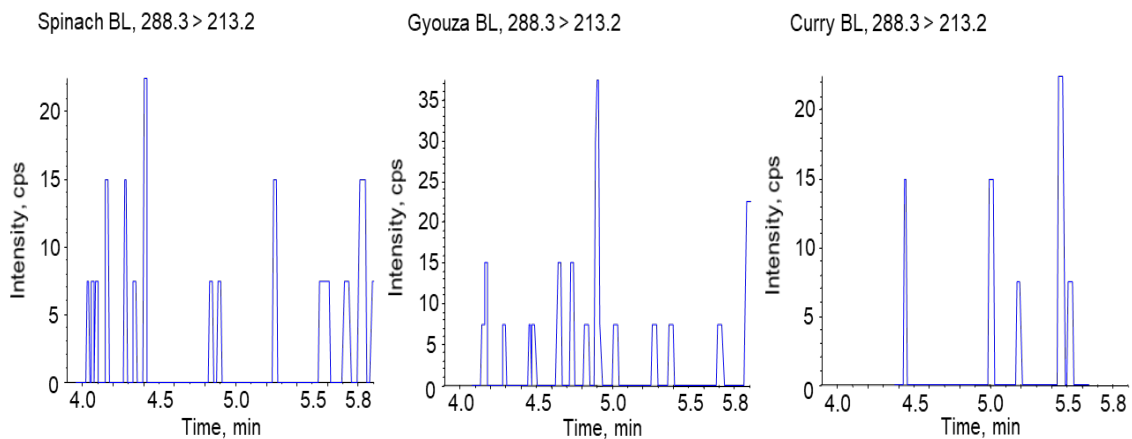


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

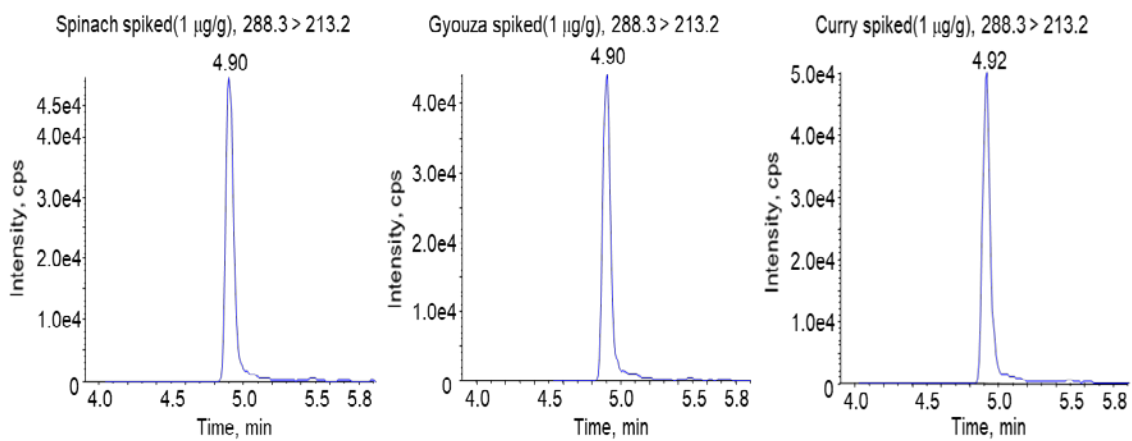


標準溶液 10 ng/mL

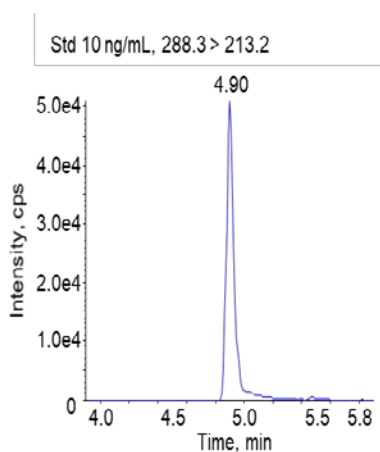
図 10. リコリンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 288.1 > 147.0



ブランク試料

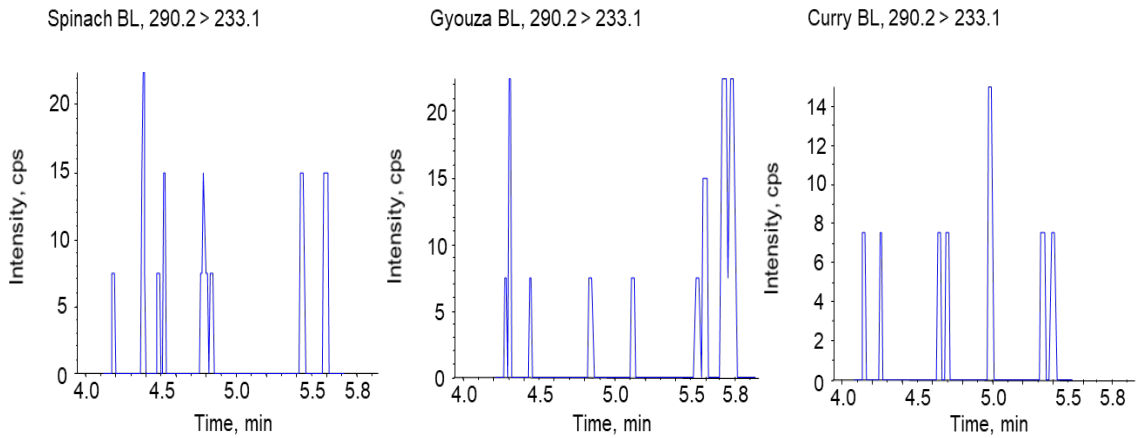


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

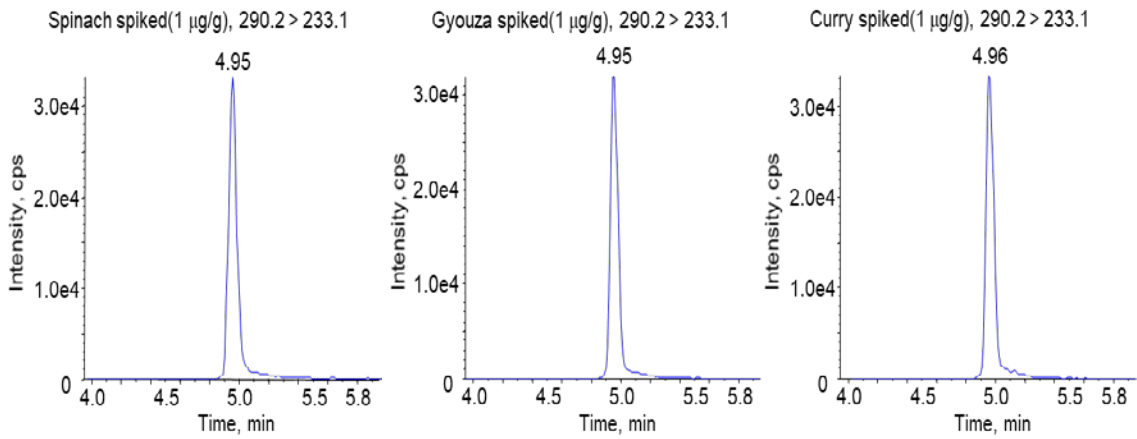


標準溶液 10 ng/mL

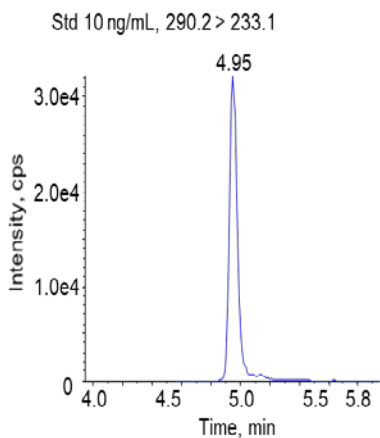
図 11. ガランタミンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 288.3 > 213.2



ブランク試料

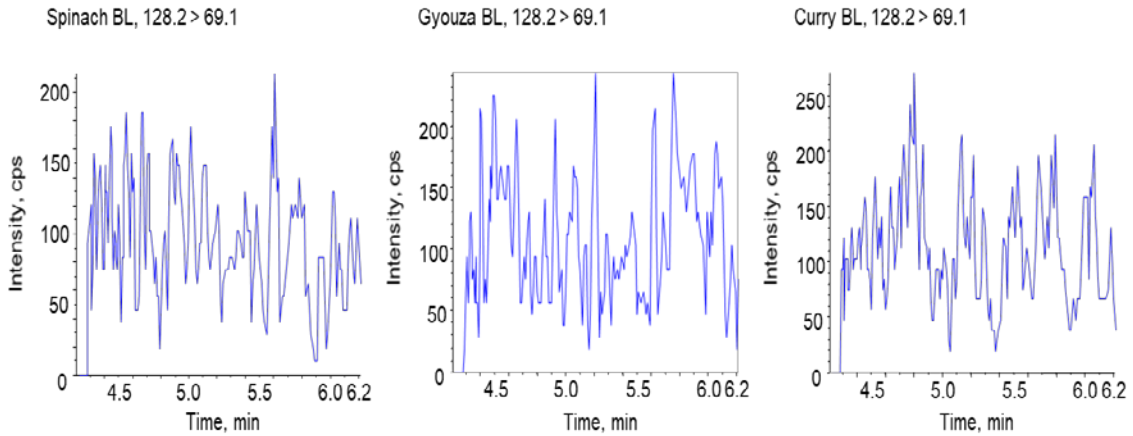


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

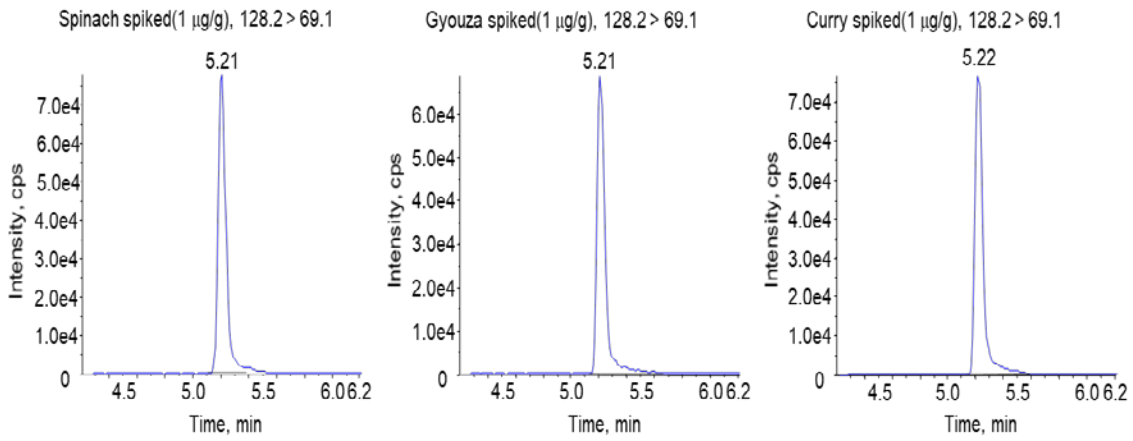


標準溶液 10 ng/mL

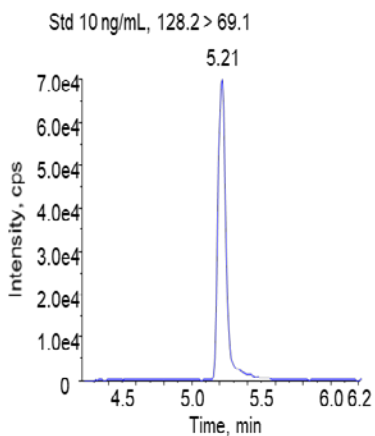
図 12. リコラミンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 290.2 > 233.1



ブランク試料

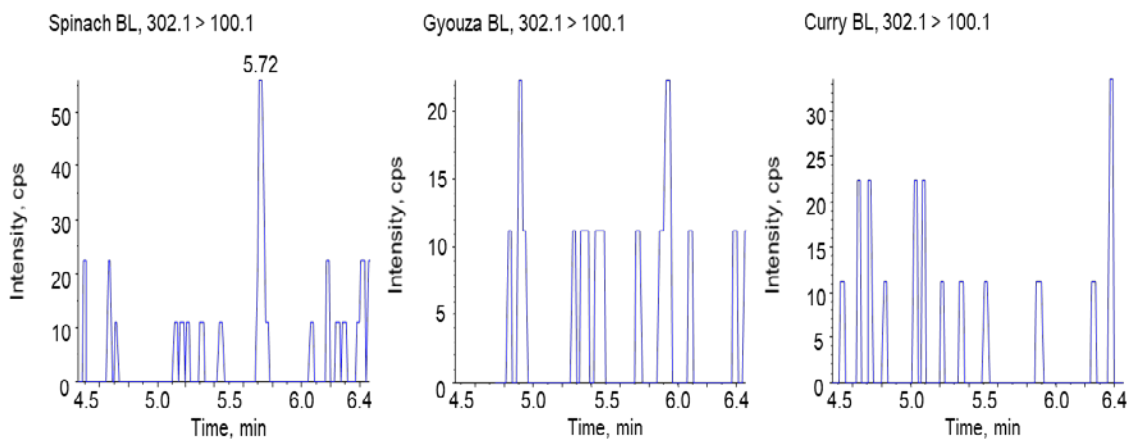


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

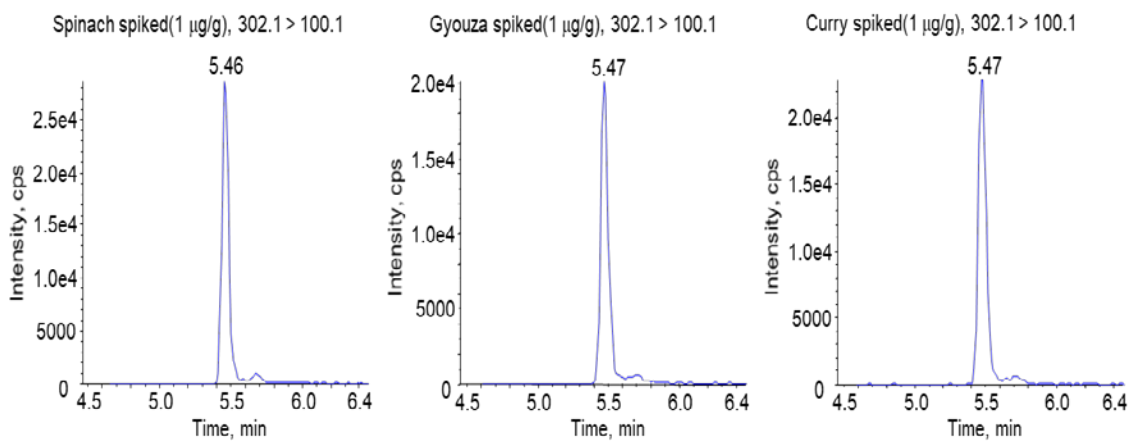


標準溶液 10 ng/mL

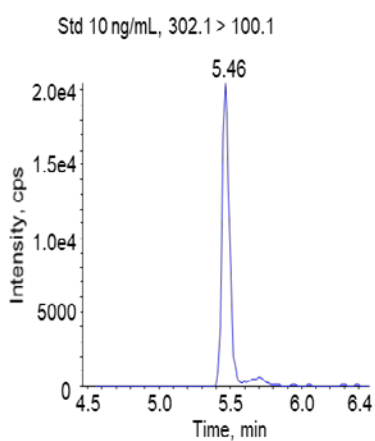
図 13. コニインの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 128.2 > 69.1



ブランク試料

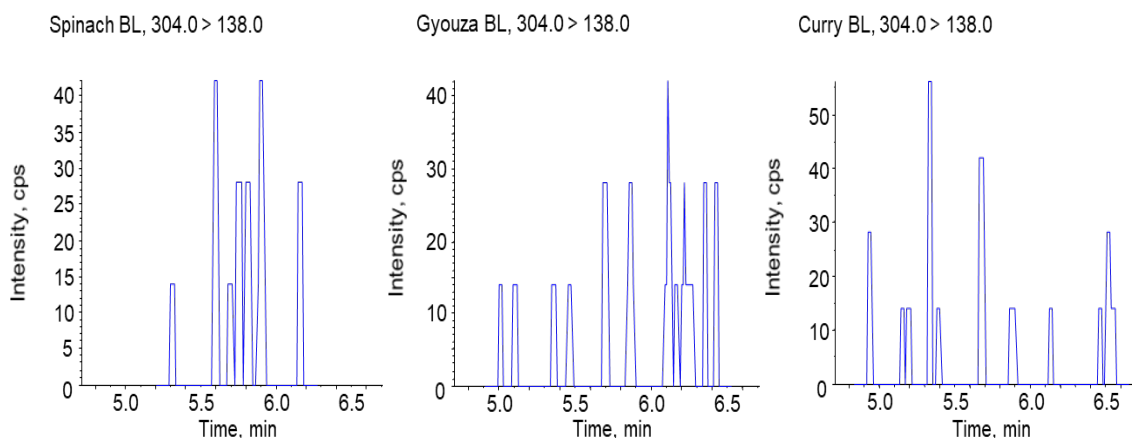


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

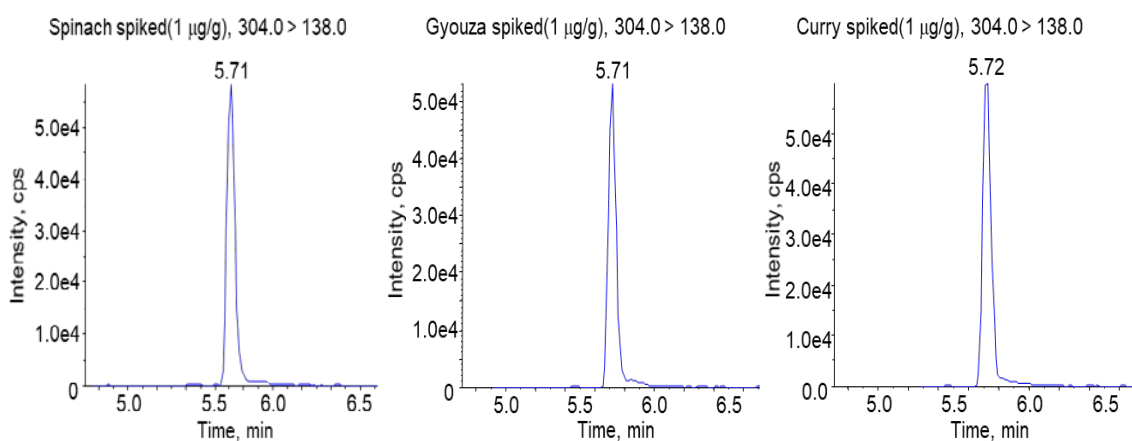


標準溶液 10 ng/mL

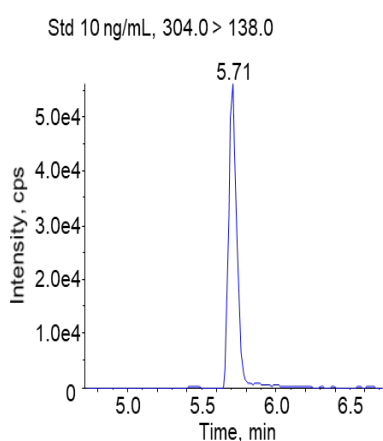
図 14. フェブリスジンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 302.1 > 100.1



ブランク試料

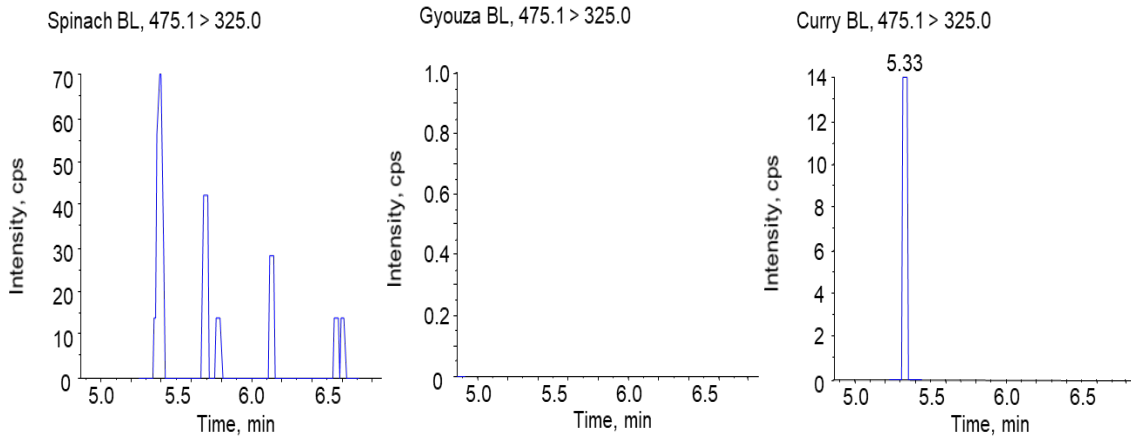


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

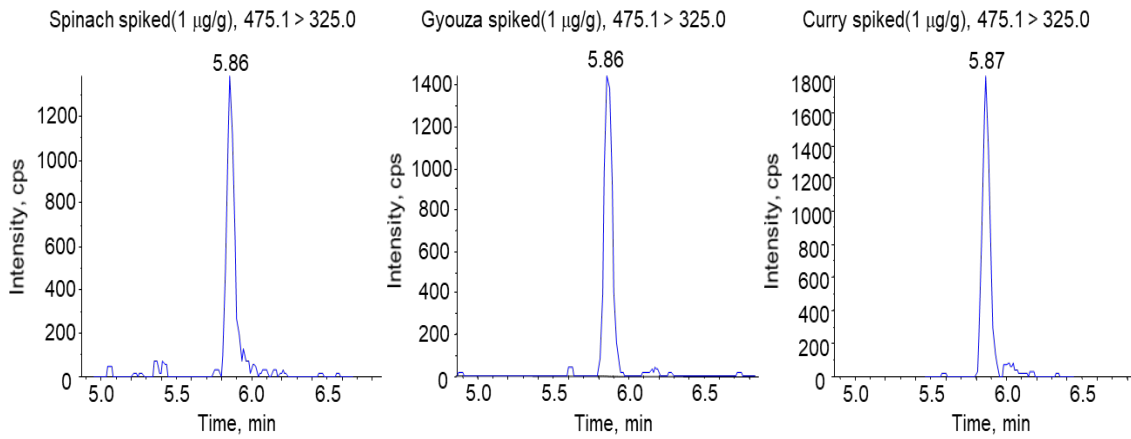


標準溶液 10 ng/mL

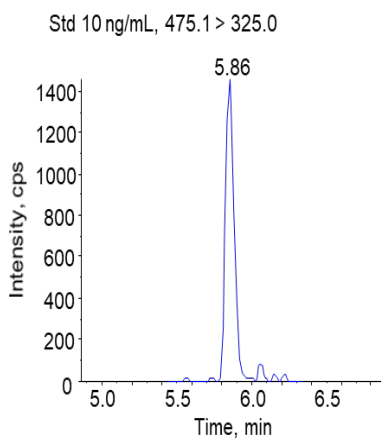
図 15. スコポラミンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 304.0 > 138.0



ブランク試料

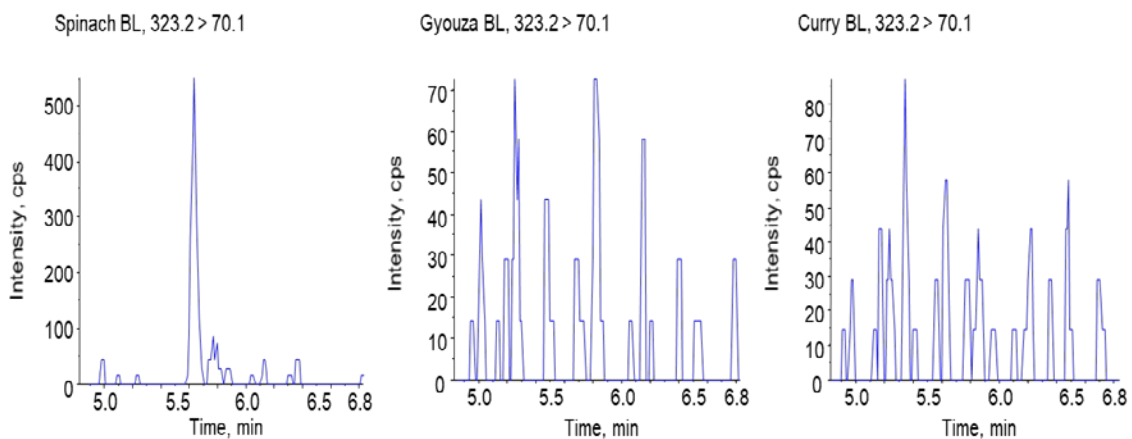


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

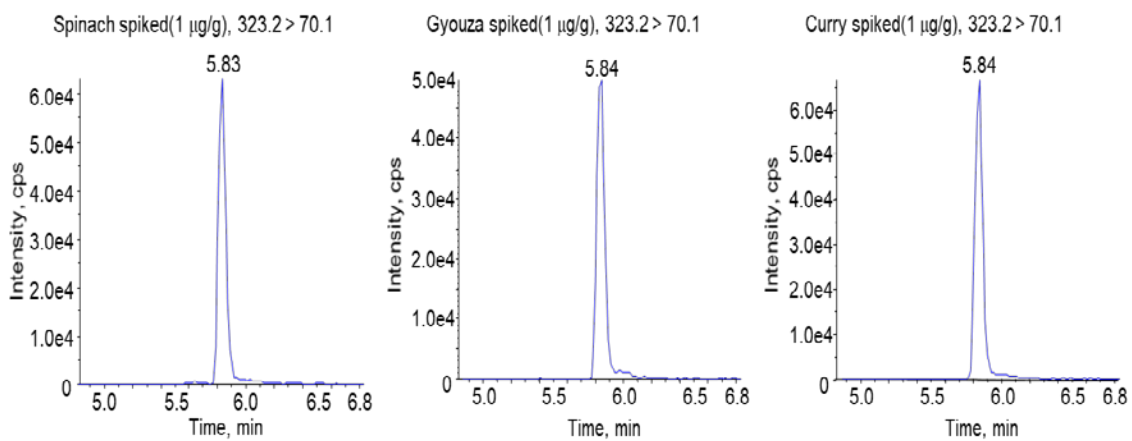


標準溶液 10 ng/mL

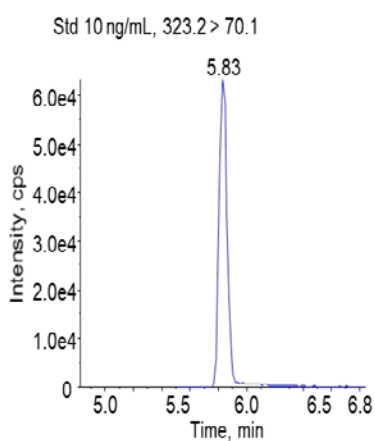
図 16. アミグダリンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 475.1 > 325.0



ブランク試料

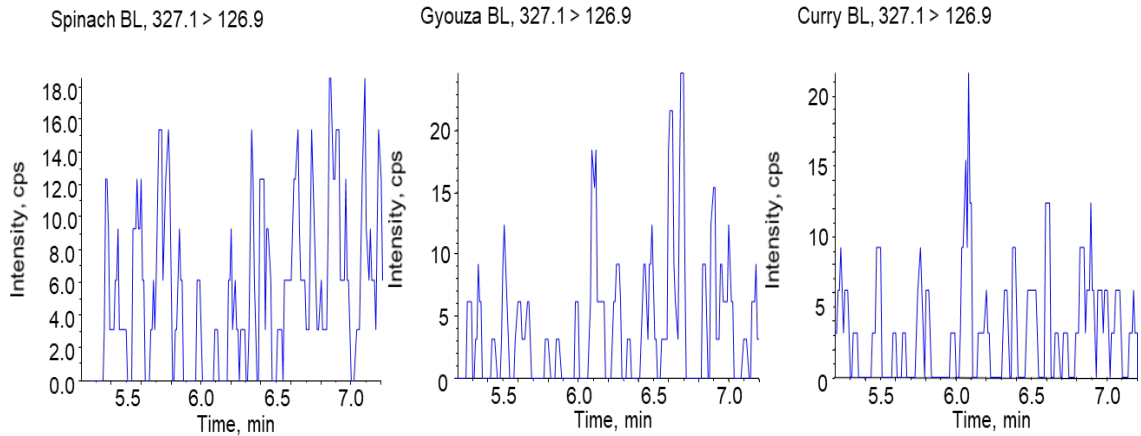


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

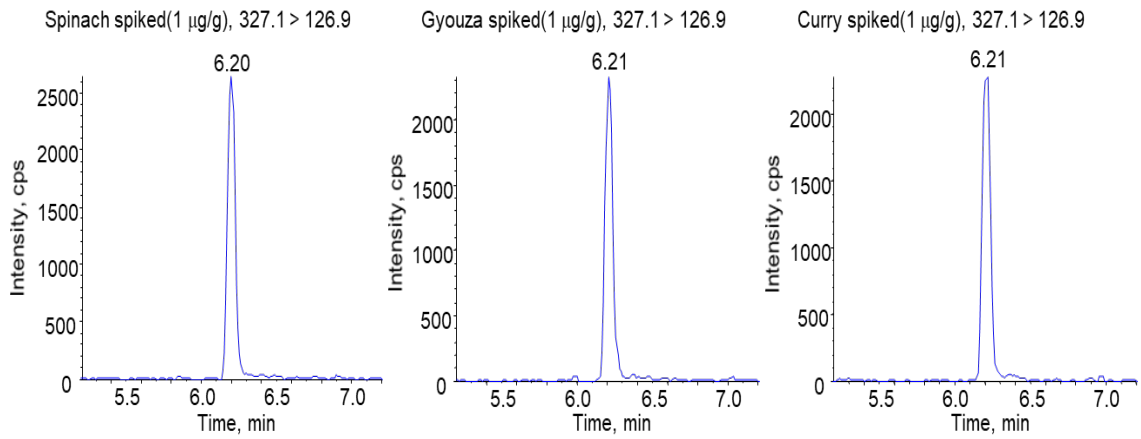


標準溶液 10 ng/mL

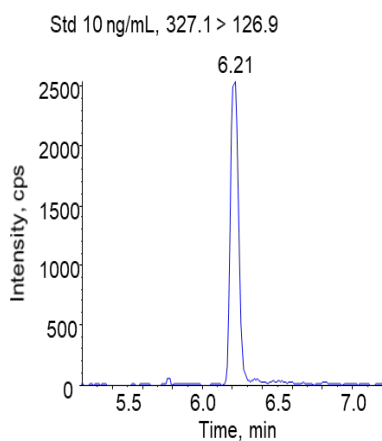
図 17. ゲルセミンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 323.2 > 70.1



ブランク試料

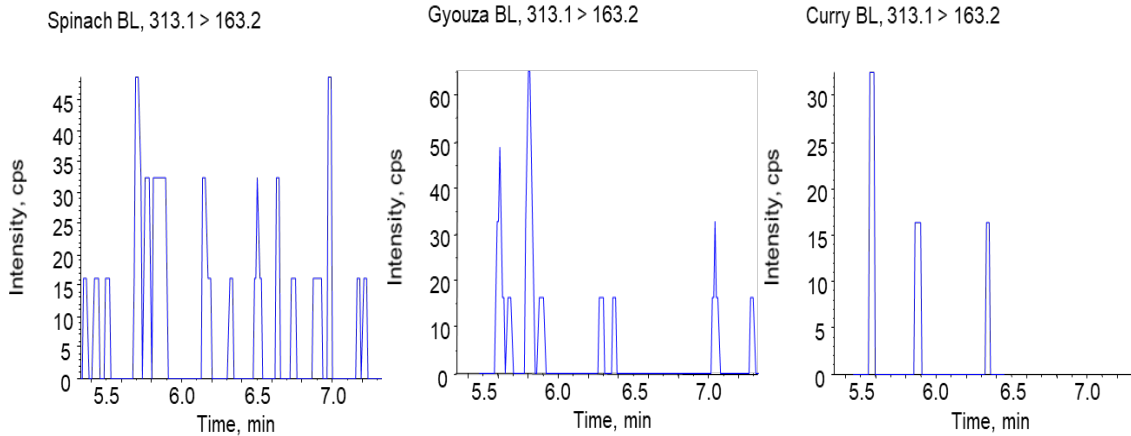


添加回収 (添加濃度 1 μg/g)

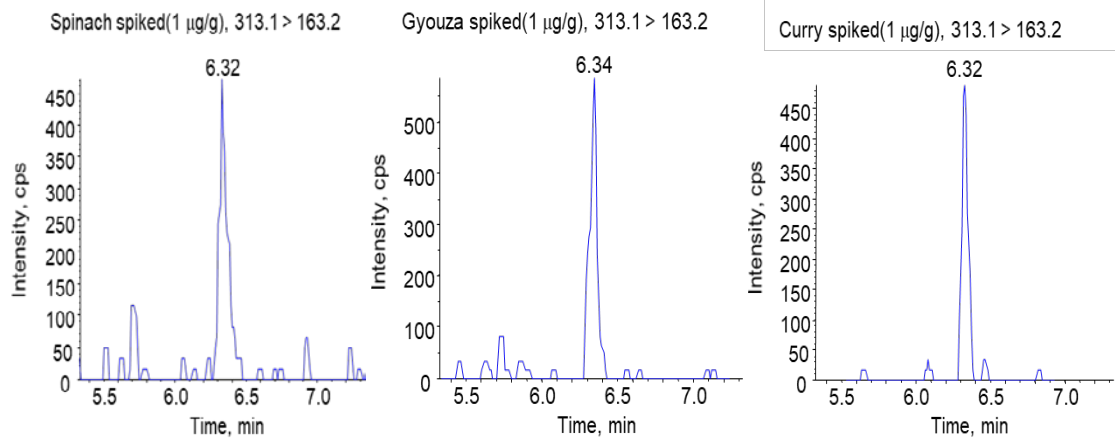


標準溶液 10 ng/mL

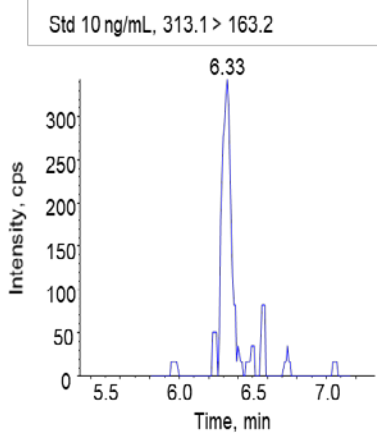
図 18. アニサチンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 327.1 > 126.9



ブランク試料

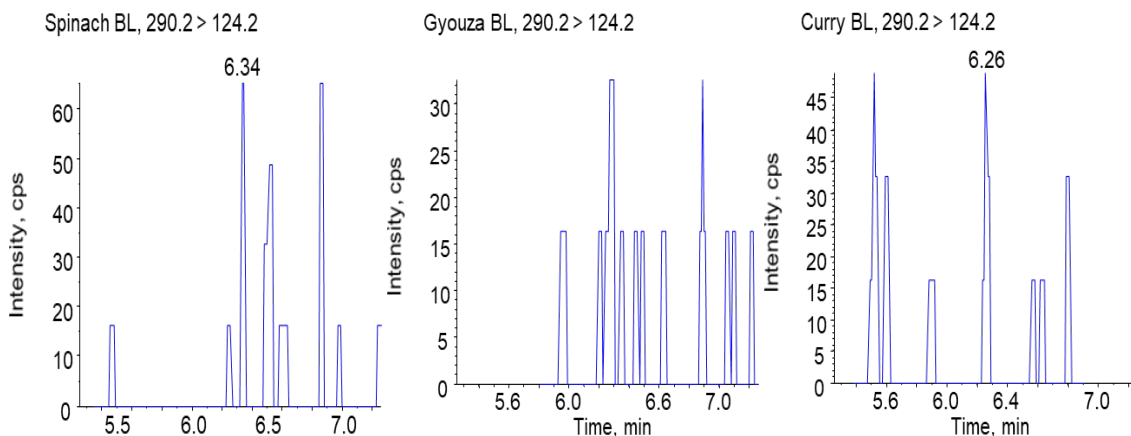


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

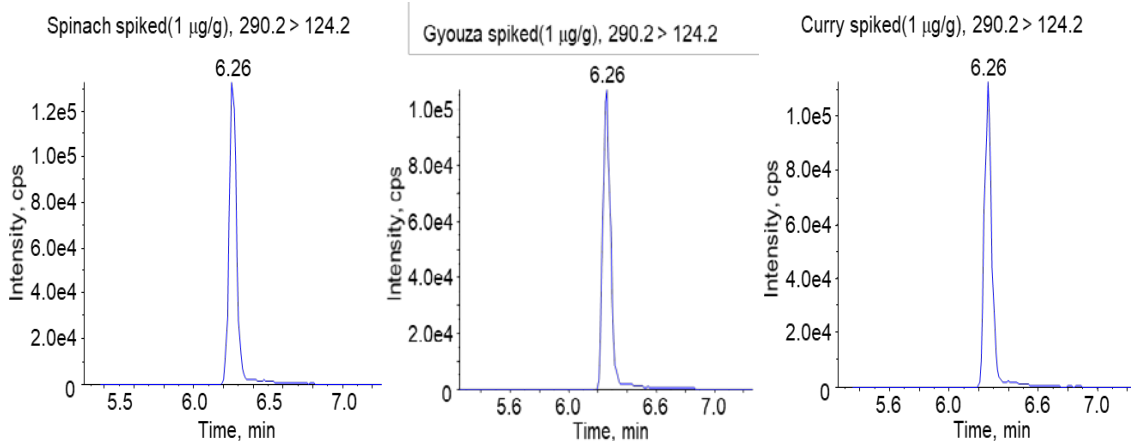


標準溶液 10 ng/mL

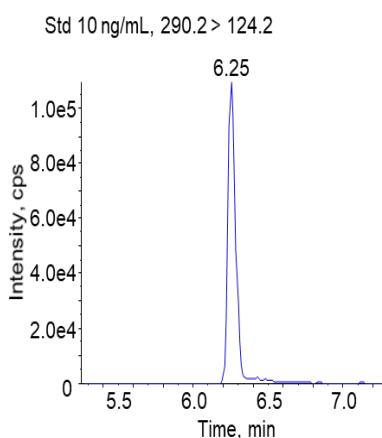
図 19. プルナシンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 313.1 > 163.2



ブランク試料

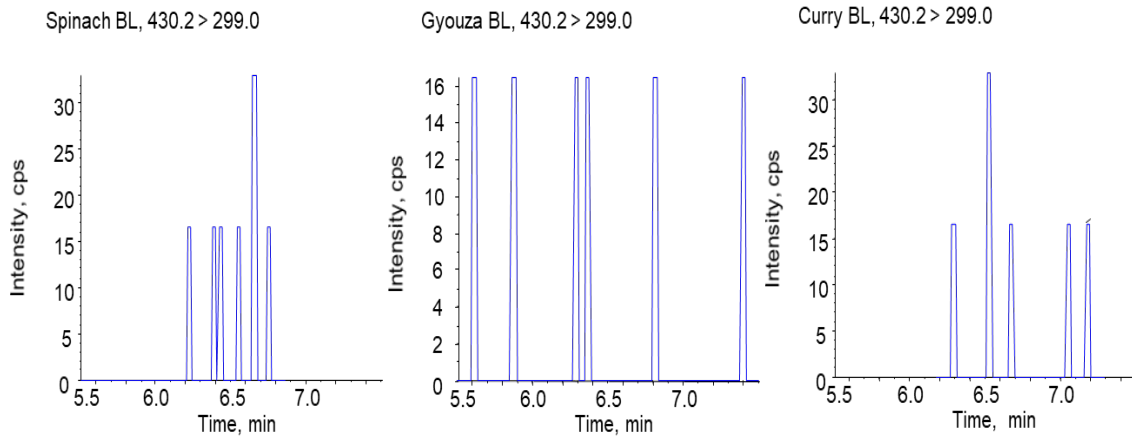


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

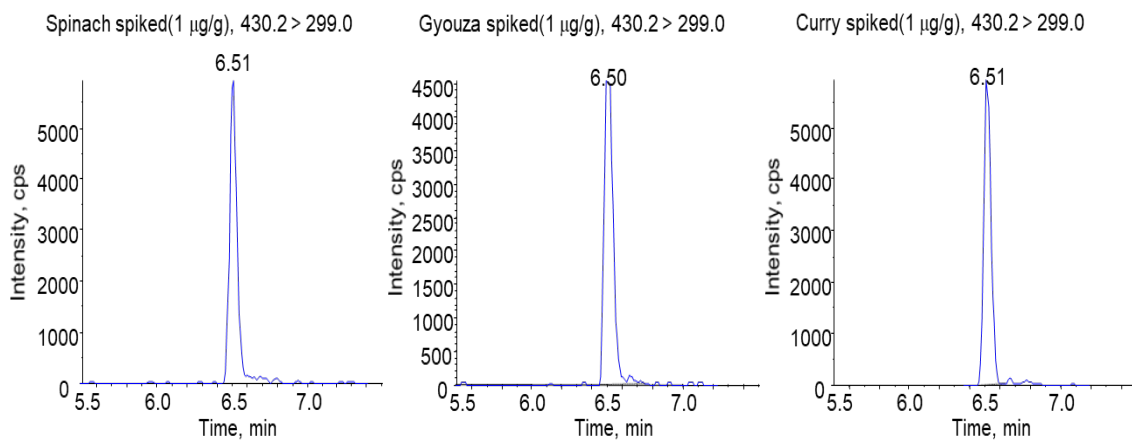


標準溶液 10 ng/mL

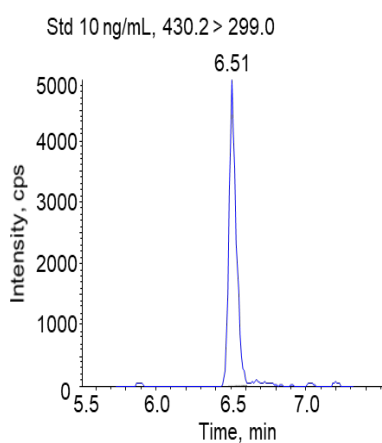
図 20. アトロピンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 290.2 > 124.2



ブランク試料

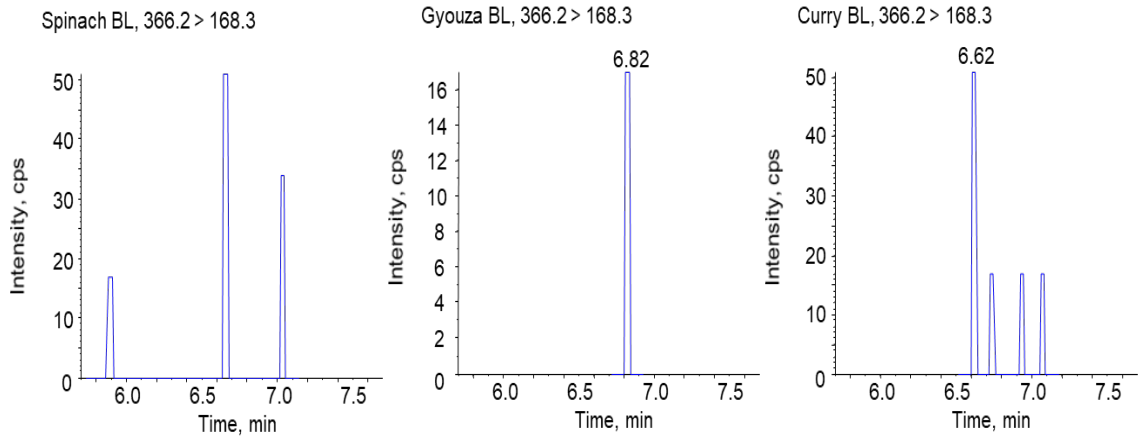


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

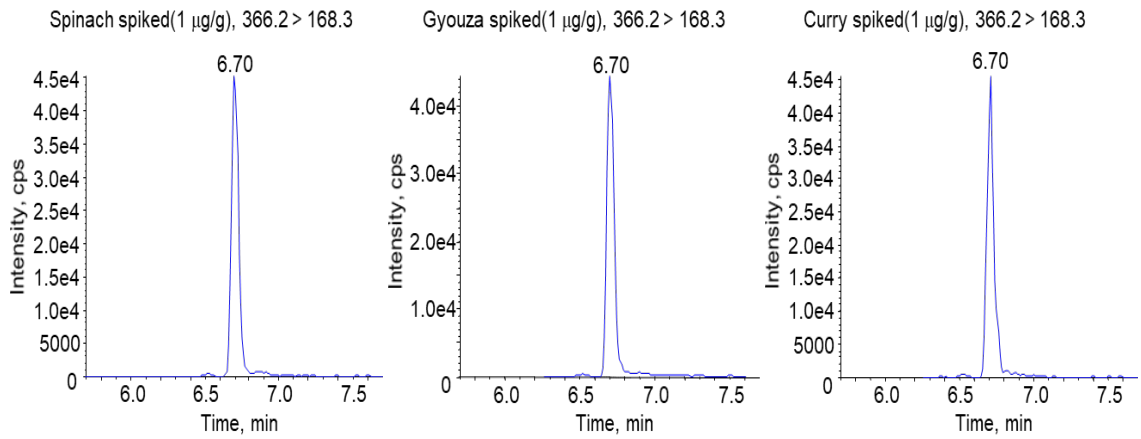


標準溶液 10 ng/mL

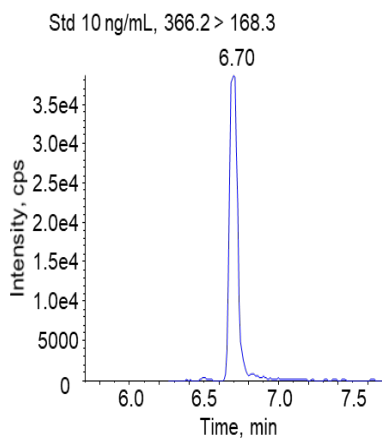
図 21. グラヤノトキシシン I の LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 430.2 > 299.0



ブランク試料

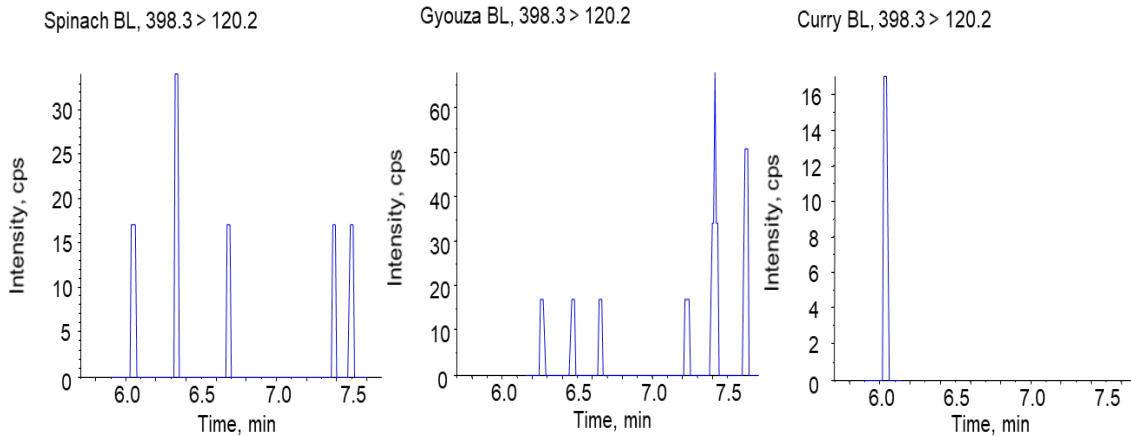


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

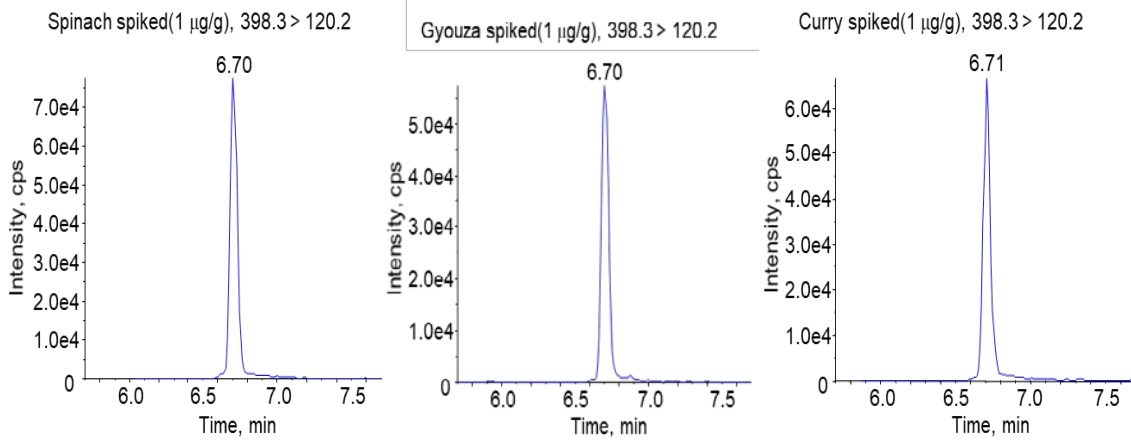


標準溶液 10 ng/mL

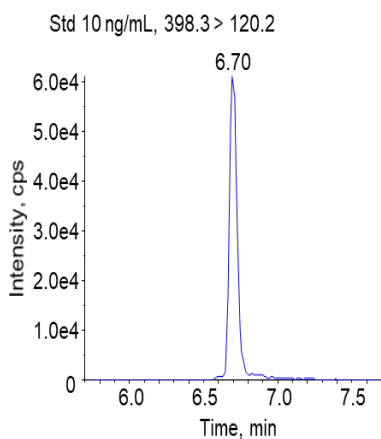
図 22. センキルキンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 366.2 > 168.3



ブランク試料

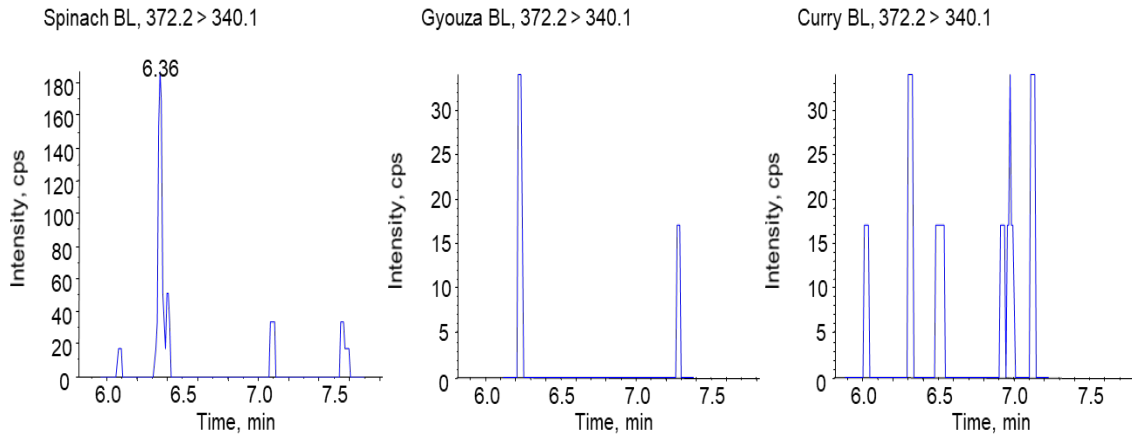


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

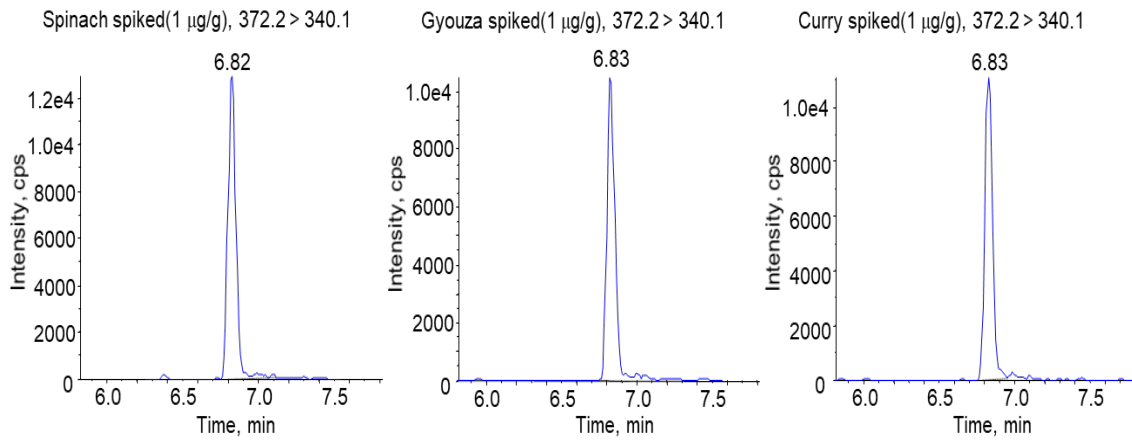


標準溶液 10 ng/mL

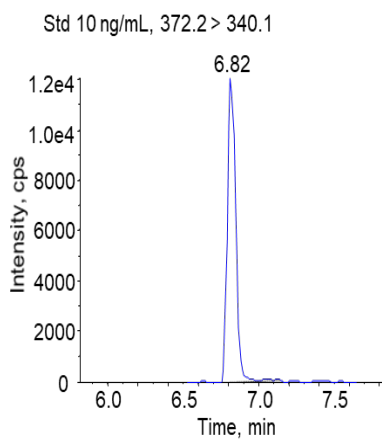
図 23. エキミジンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 398.3 > 120.2



ブランク試料

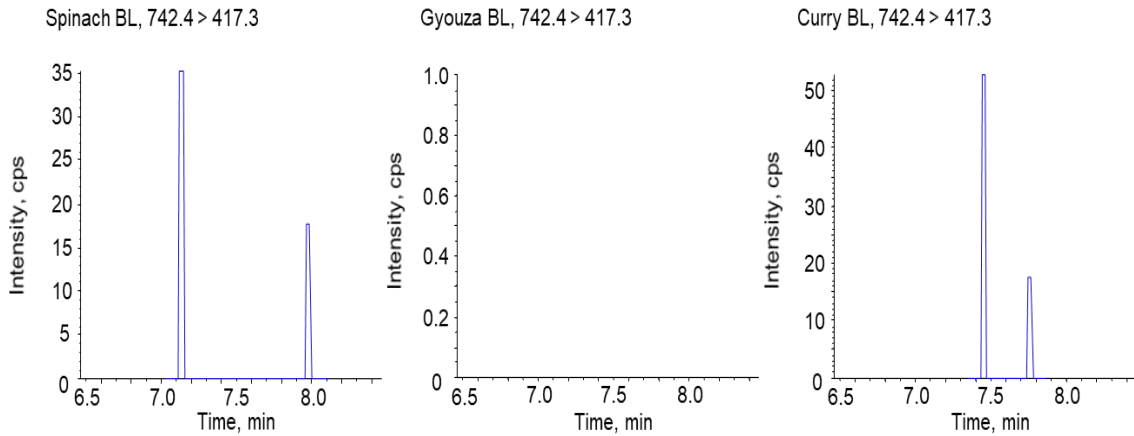


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

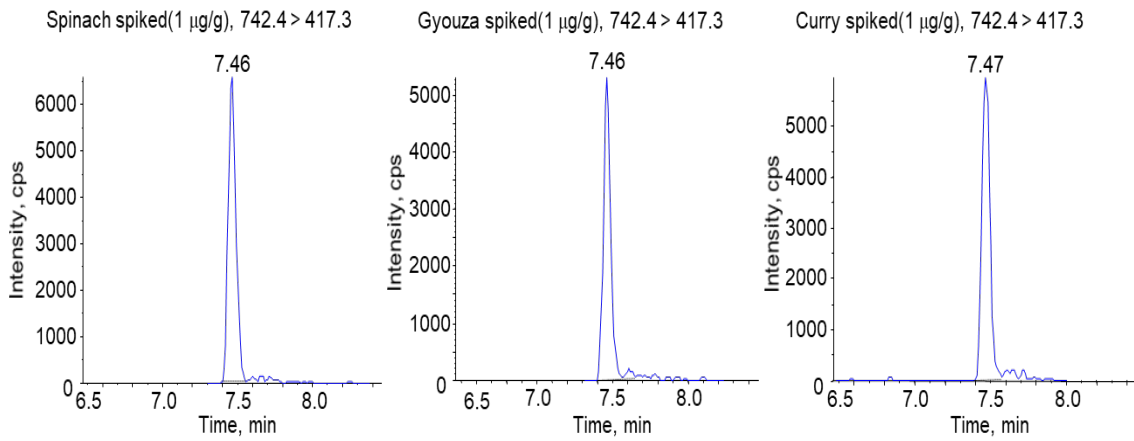


標準溶液 10 ng/mL

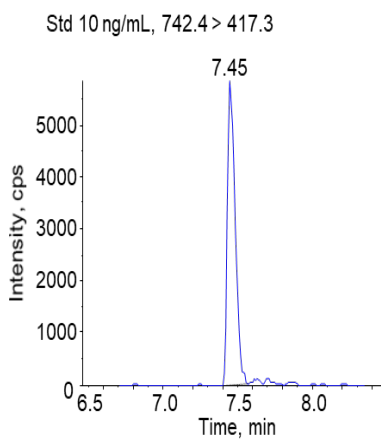
図 24. デメコルシンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 372.2 > 340.1



ブランク試料

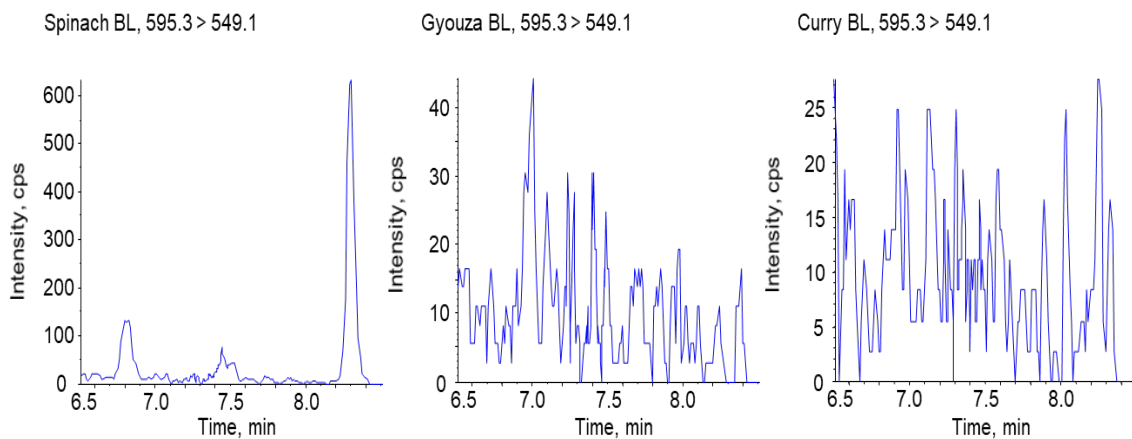


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

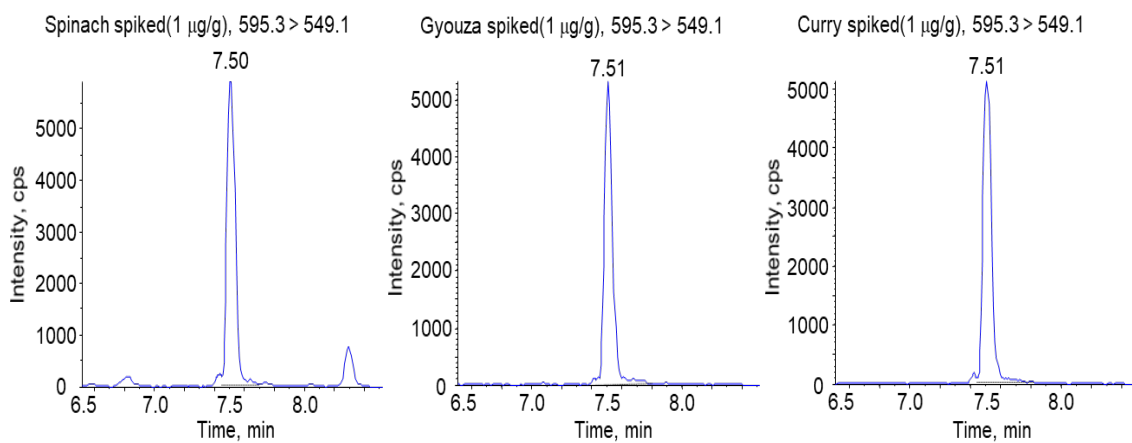


標準溶液 10 ng/mL

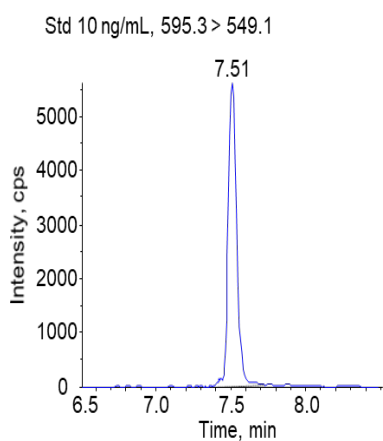
図 25. ヘレブリンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 742.4 > 417.3



ブランク試料

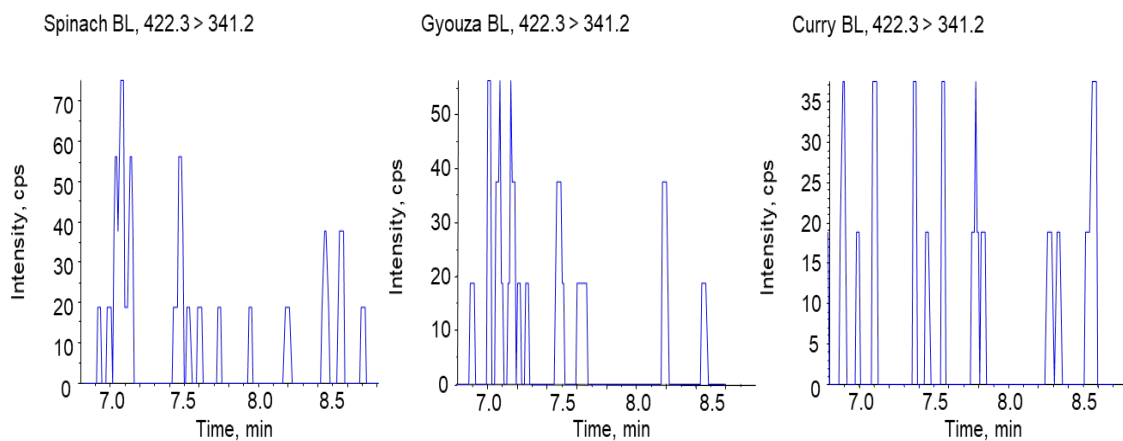


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

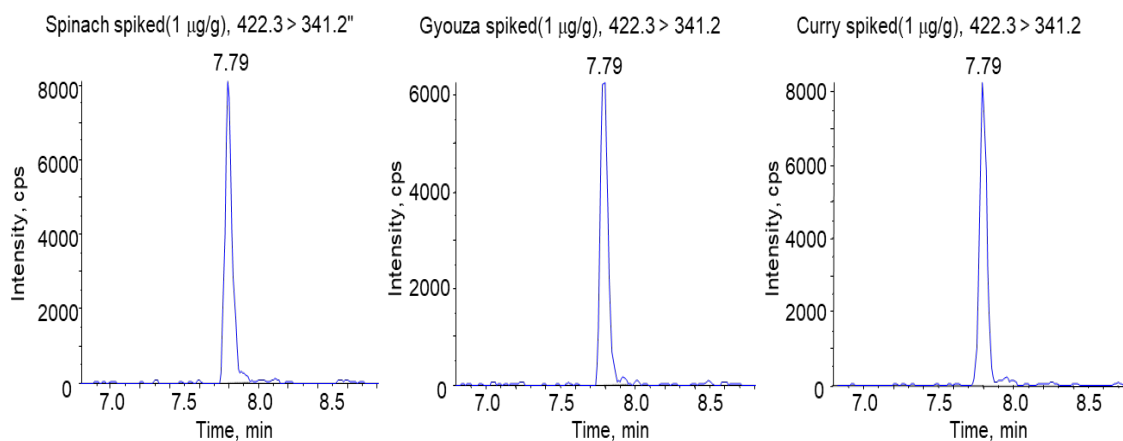


標準溶液 10 ng/mL

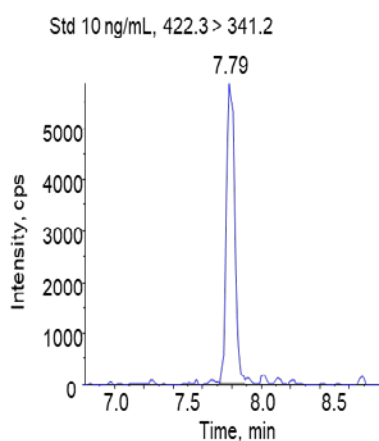
図 26. コンバラトキシシンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 595.3 > 549.1



ブランク試料

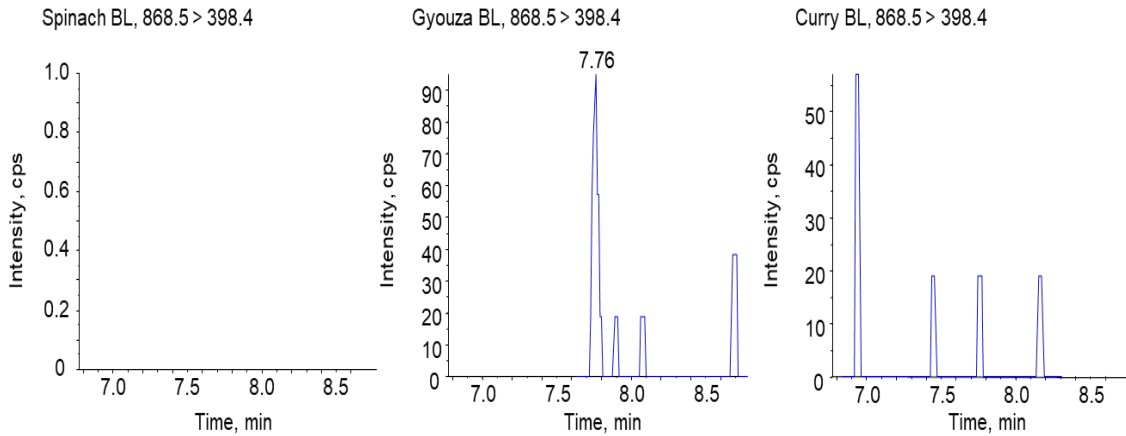


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

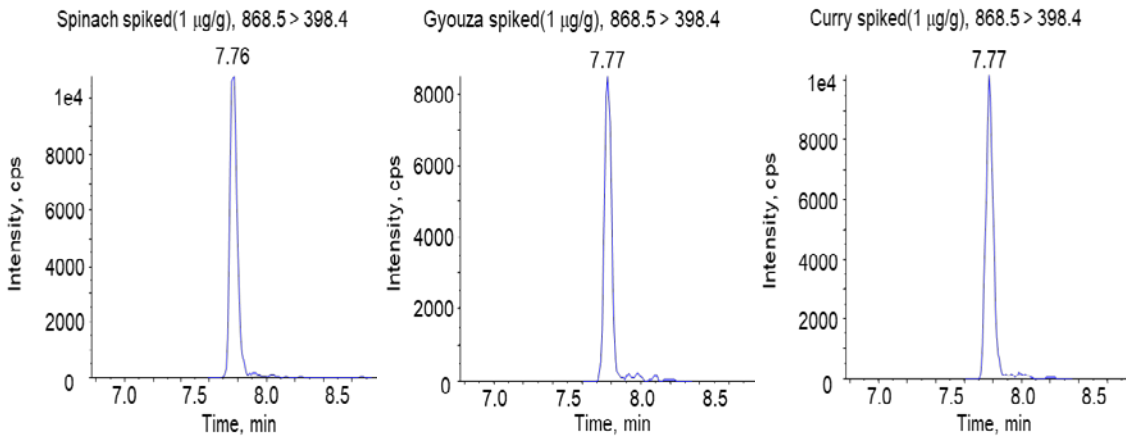


標準溶液 10 ng/mL

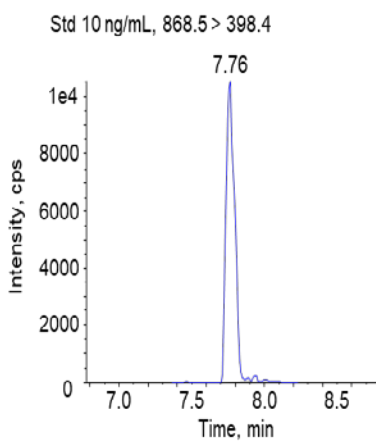
図 27. ストロファンチジンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 422.3 > 341.2



ブランク試料

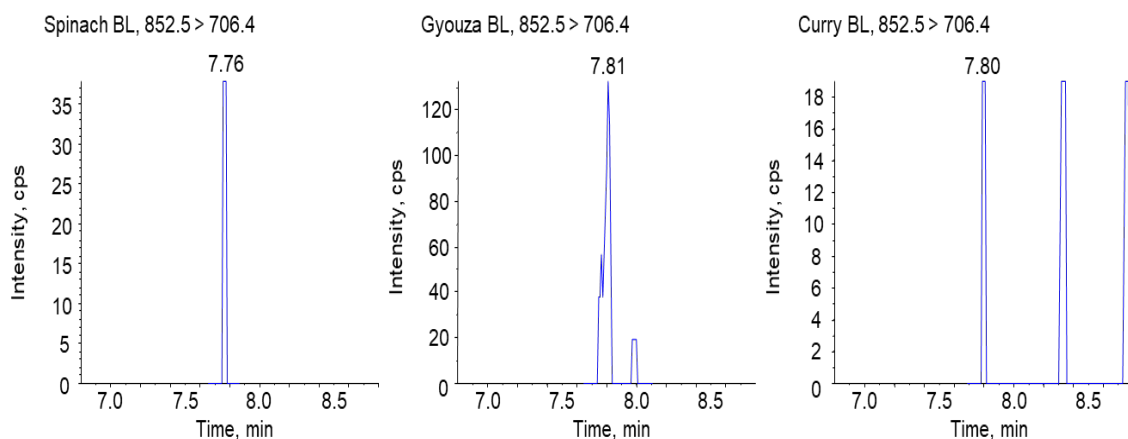


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

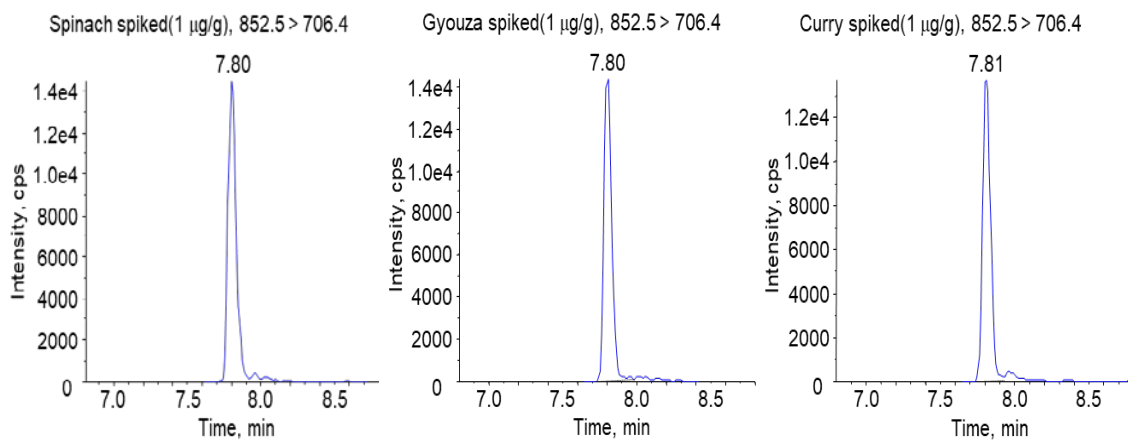


標準溶液 10 ng/mL

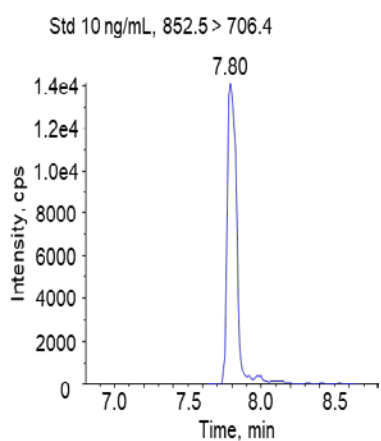
図 28. α-ソラニンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 868.5 > 398.4



ブランク試料

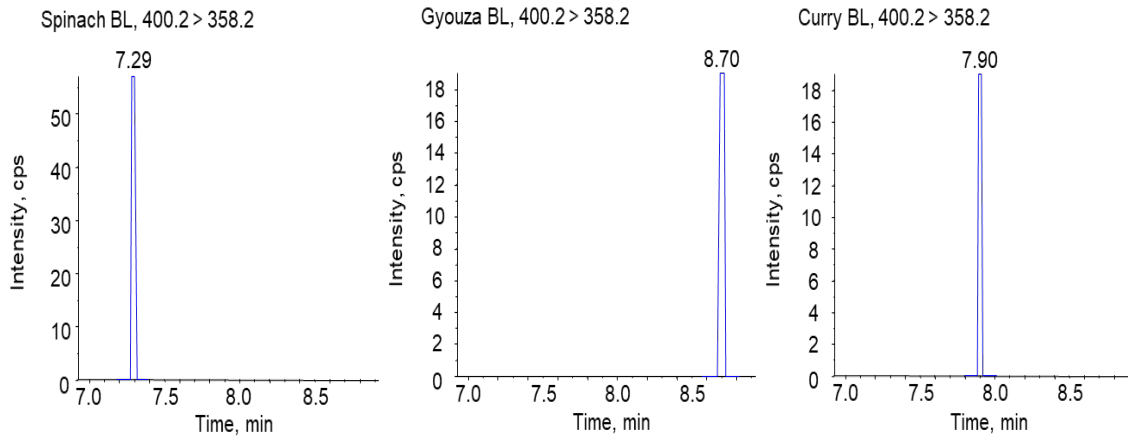


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

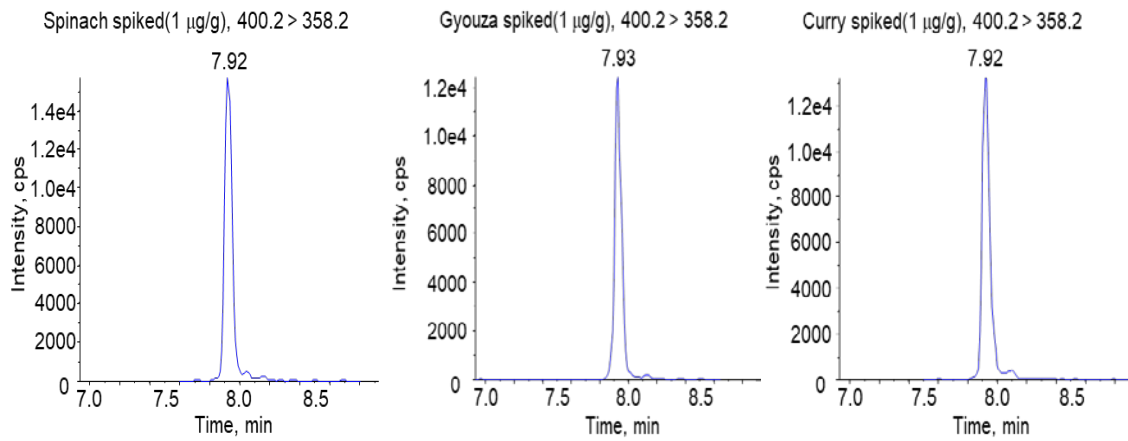


標準溶液 10 ng/mL

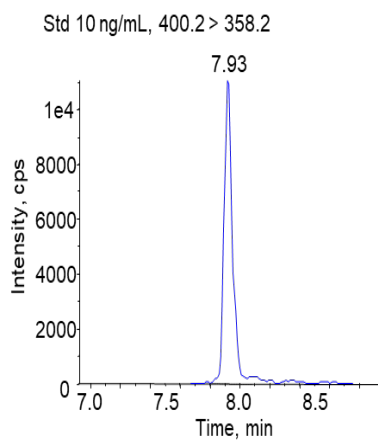
図 29. α -チャロニンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 852.5 > 706.4



ブランク試料

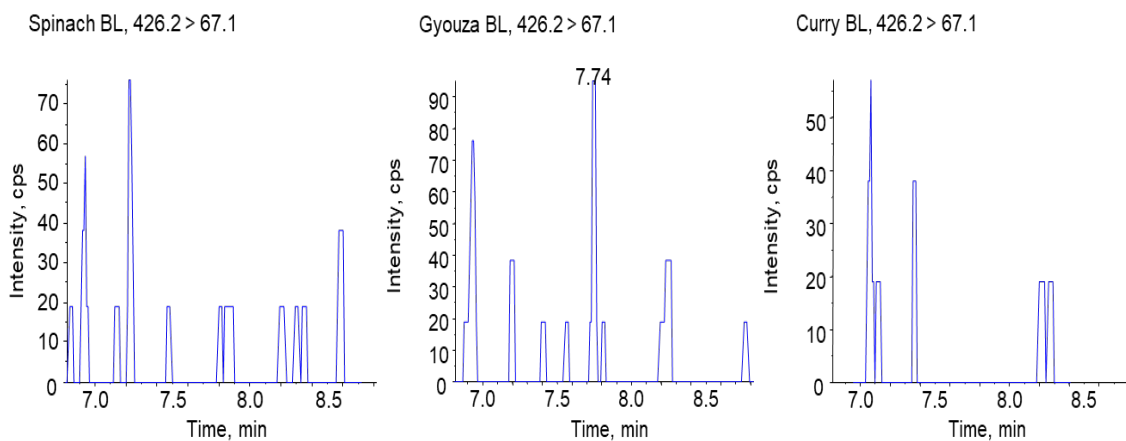


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

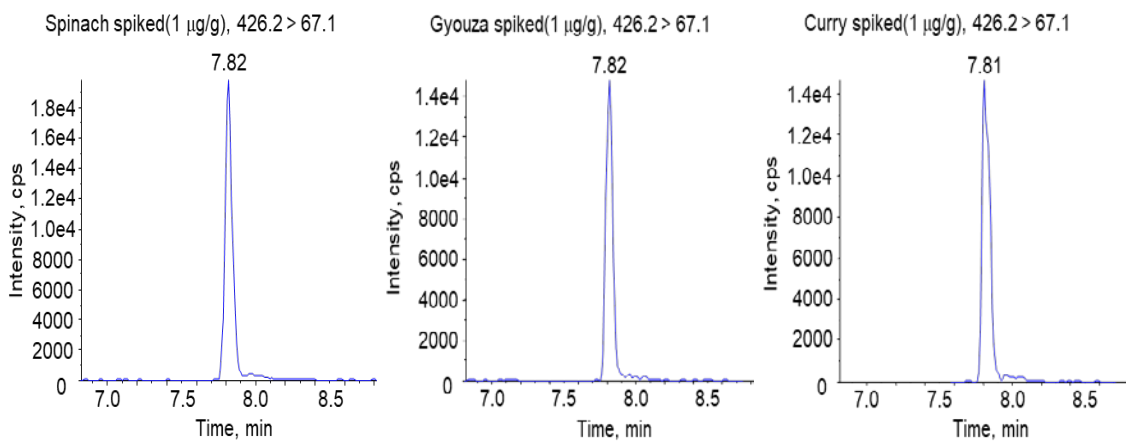


標準溶液 10 ng/mL

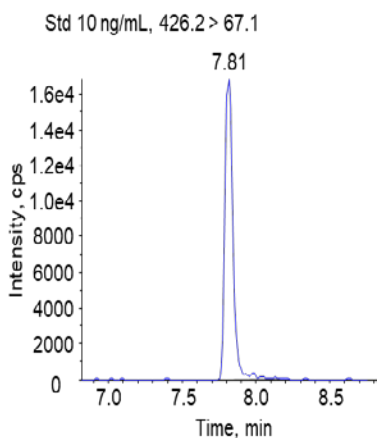
図 30. コルヒチンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 400.2 > 358.2



ブランク試料

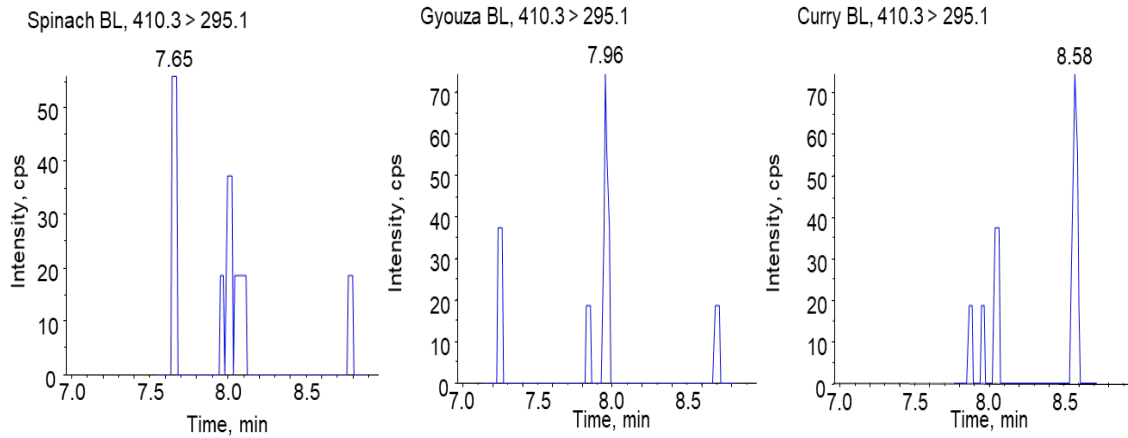


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

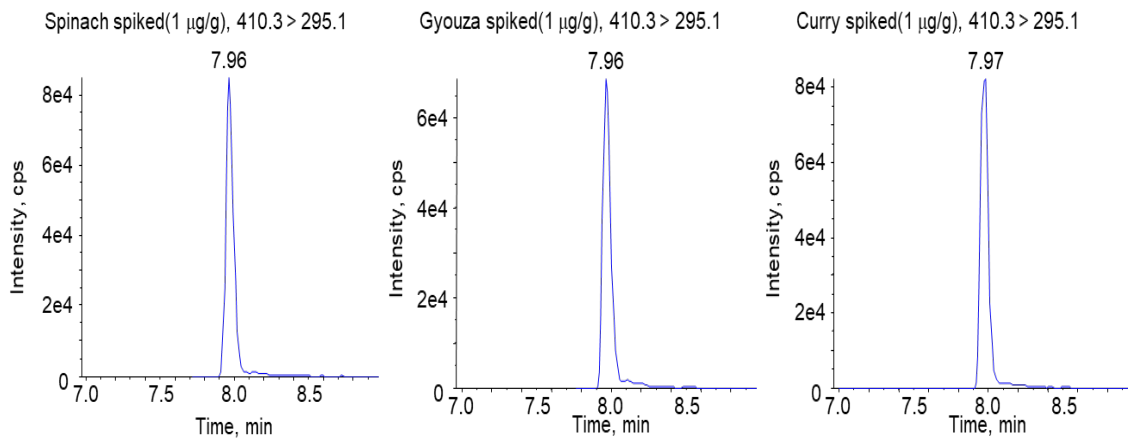


標準溶液 10 ng/mL

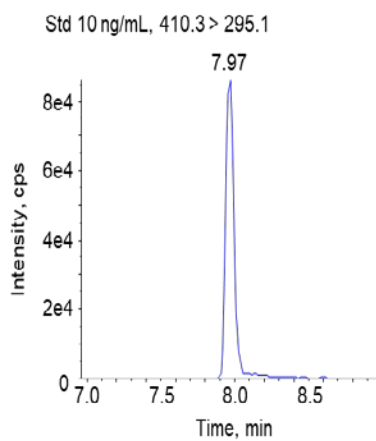
図 31. ジェルビンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 426.2 > 67.1



ブランク試料

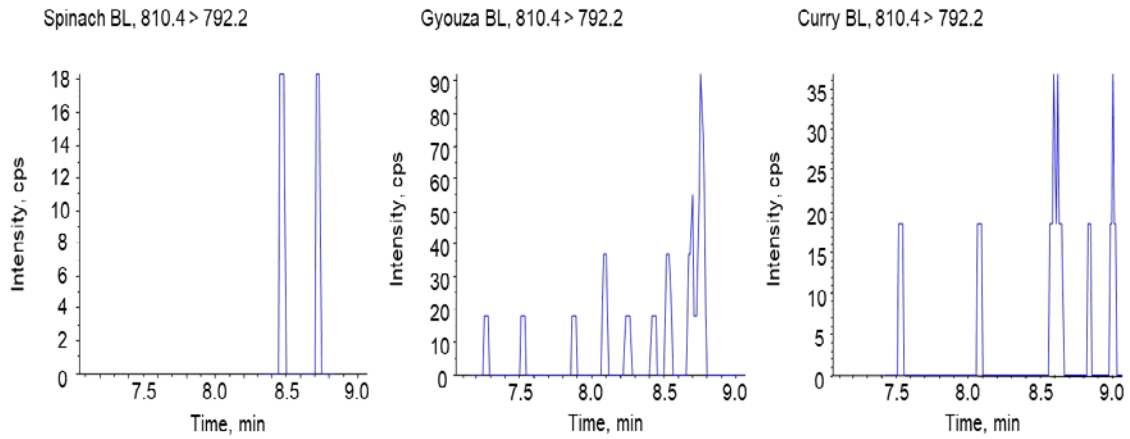


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

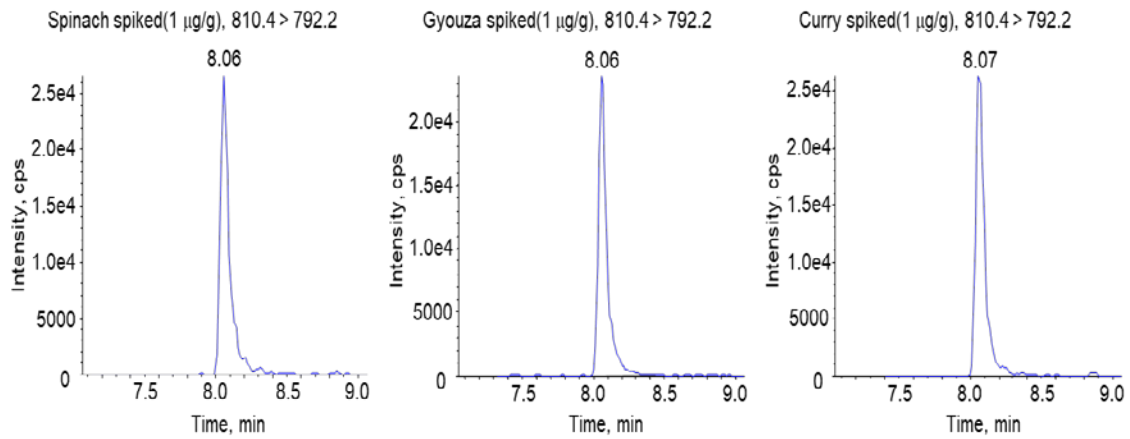


標準溶液 10 ng/mL

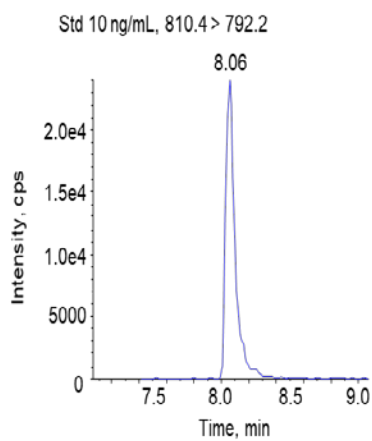
図 32. ベラトラミンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 410.3 > 295.1



ブランク試料

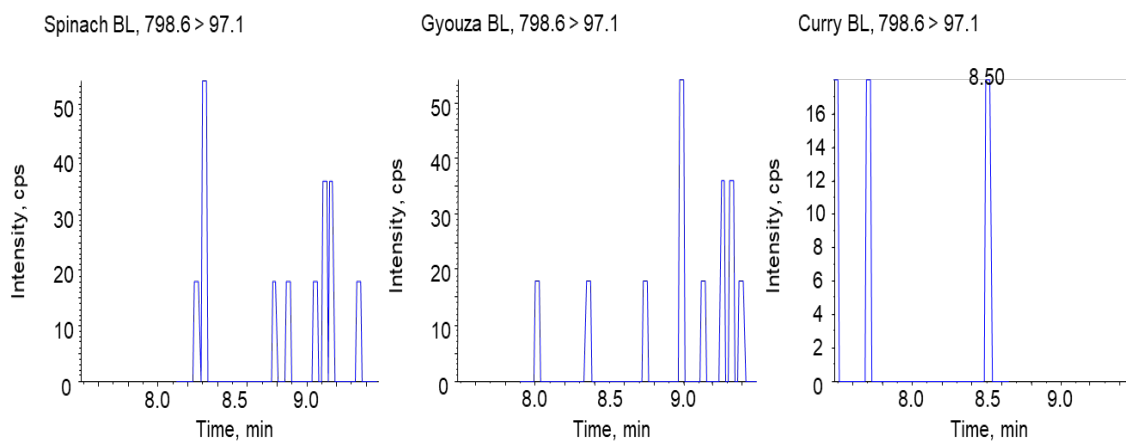


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

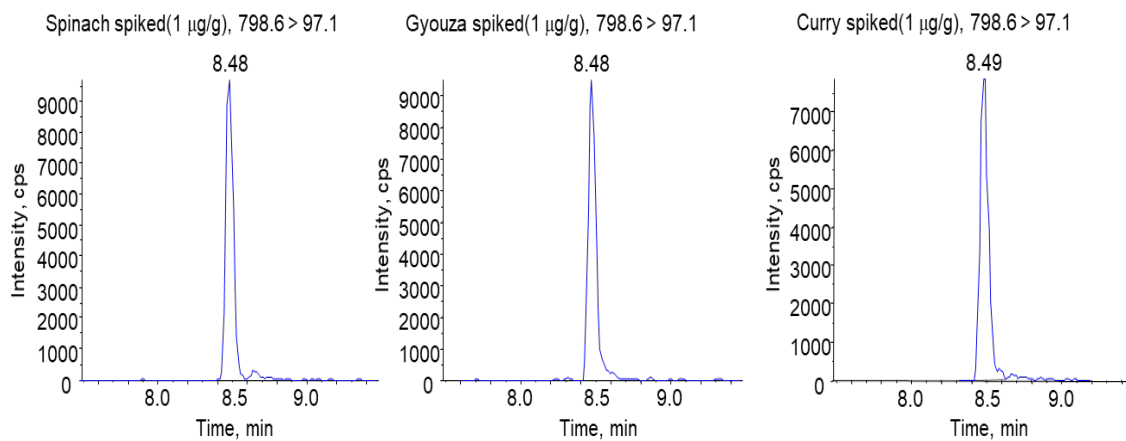


標準溶液 10 ng/mL

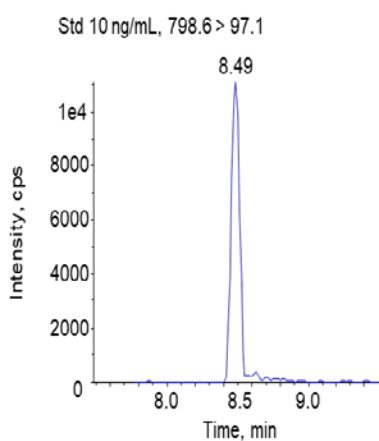
図 33. プロトベラトリン B の LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 810.4 > 792.2



ブランク試料

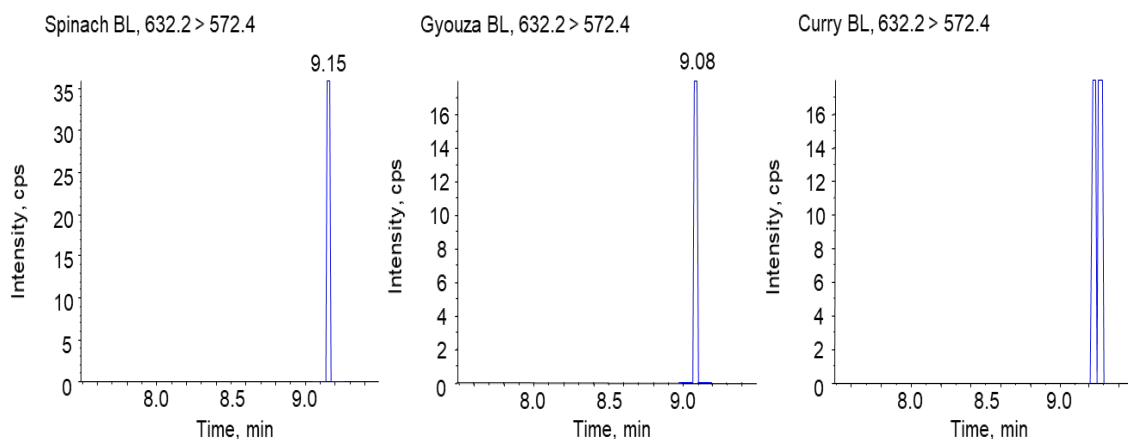


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

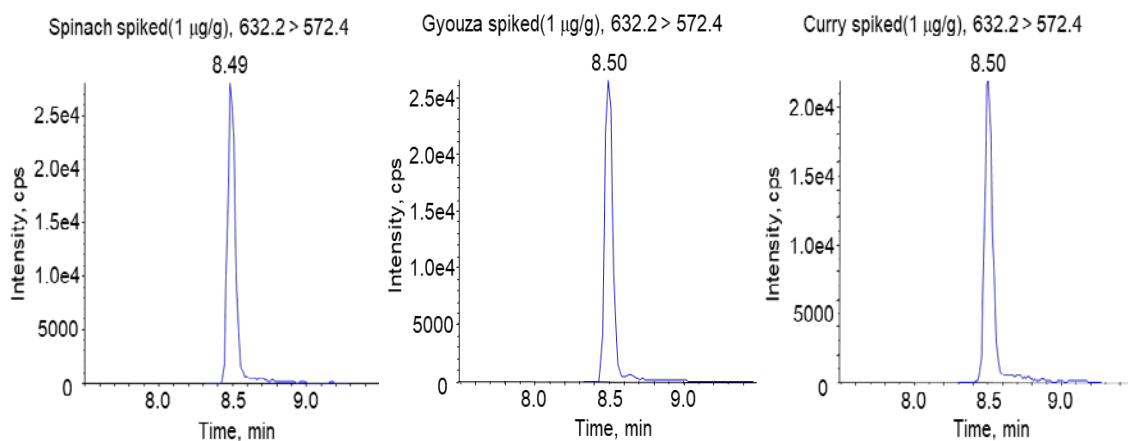


標準溶液 10 ng/mL

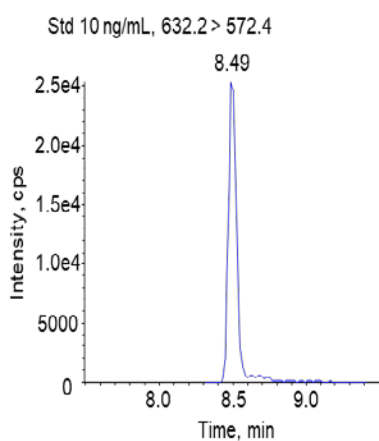
図 34. ジゴキシンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 798.6 > 97.1



ブランク試料

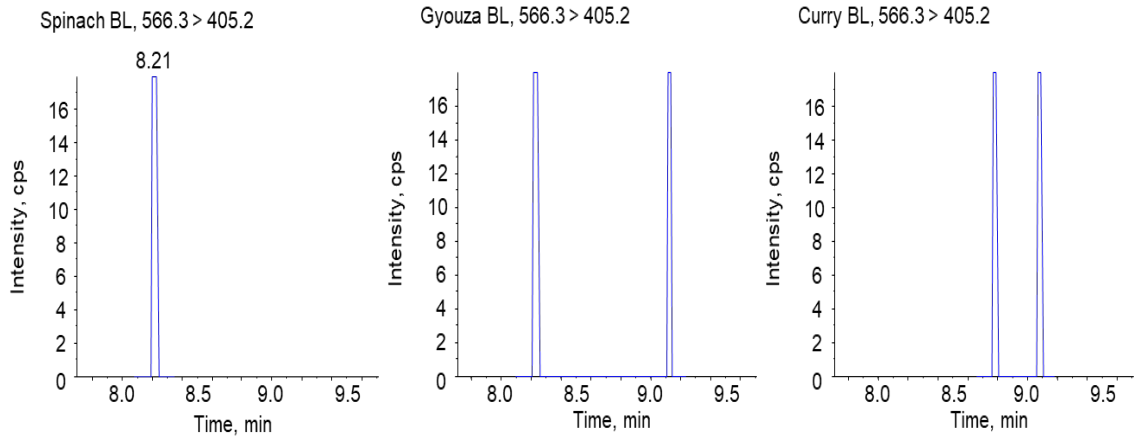


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

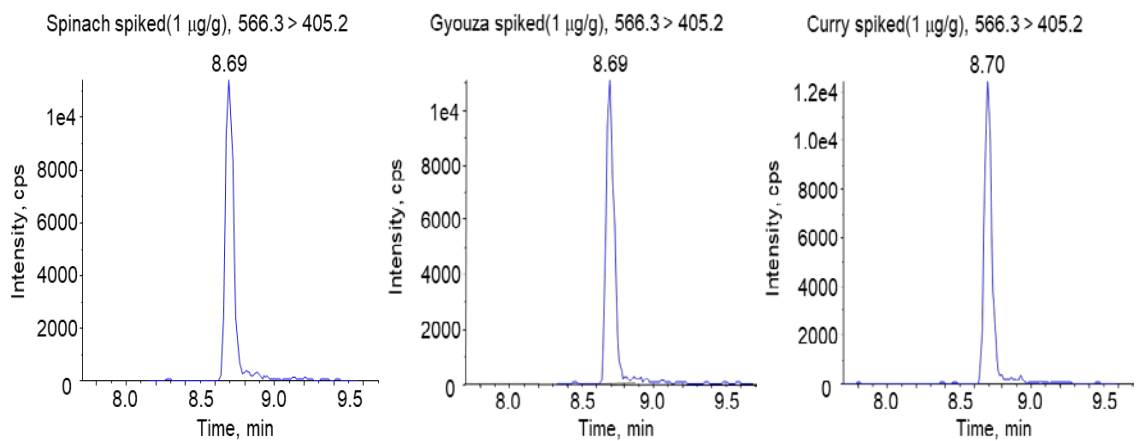


標準溶液 10 ng/mL

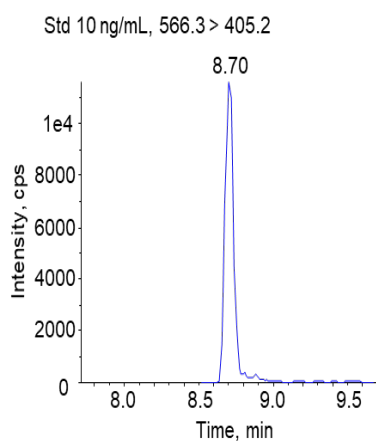
図 35. メサコニチンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 632.2 > 572.4



ブランク 試料

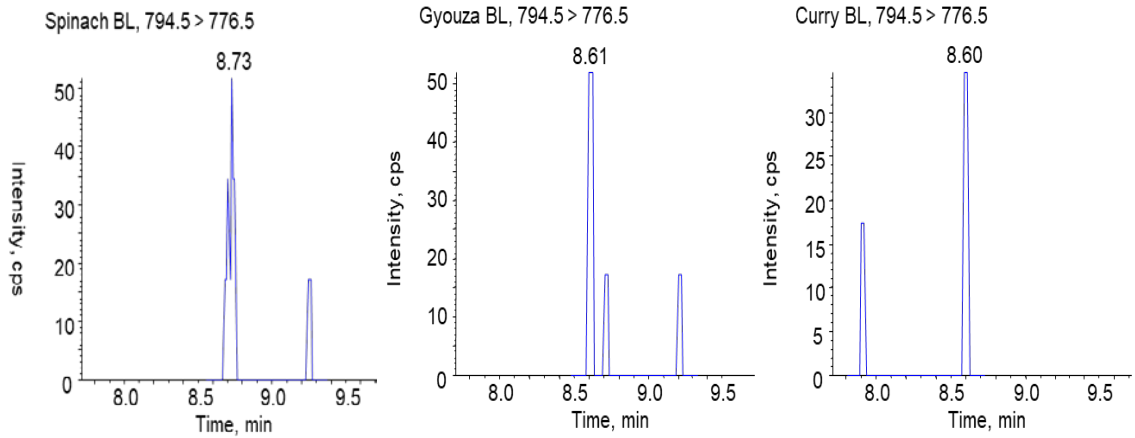


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

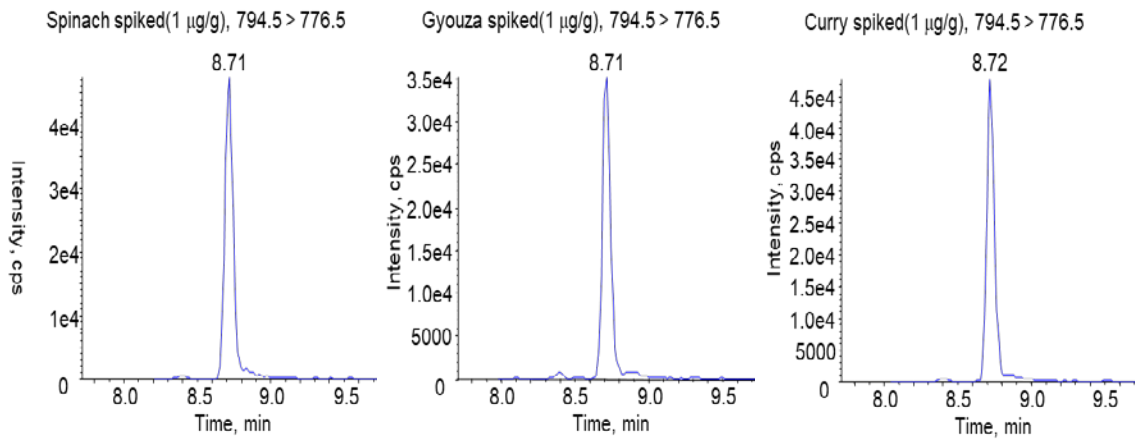


標準溶液 10 ng/mL

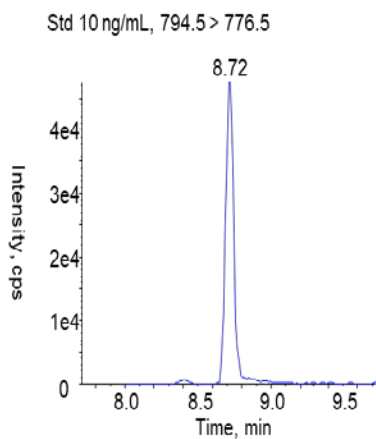
図 36. シマリンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 566.3 > 405.2



ブランク試料

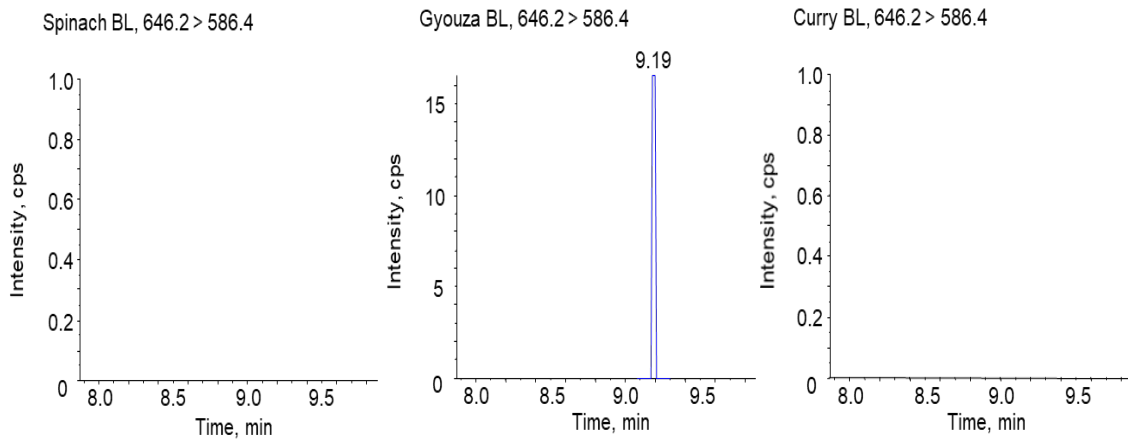


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

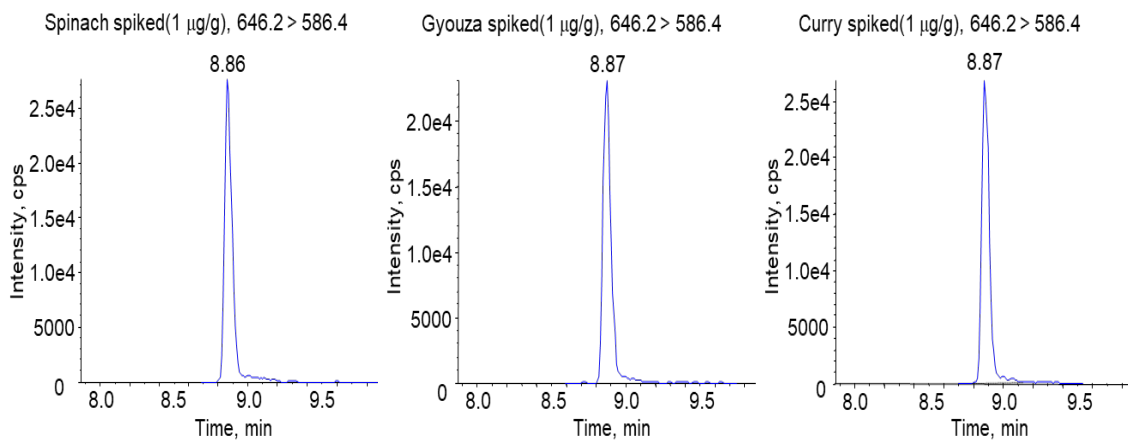


標準溶液 10 ng/mL

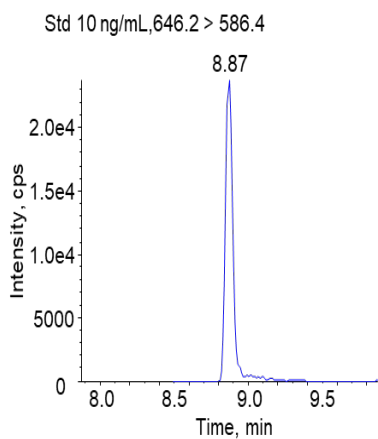
図 37. プロトベラトリン A の LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 794.5 > 776.5



ブランク試料

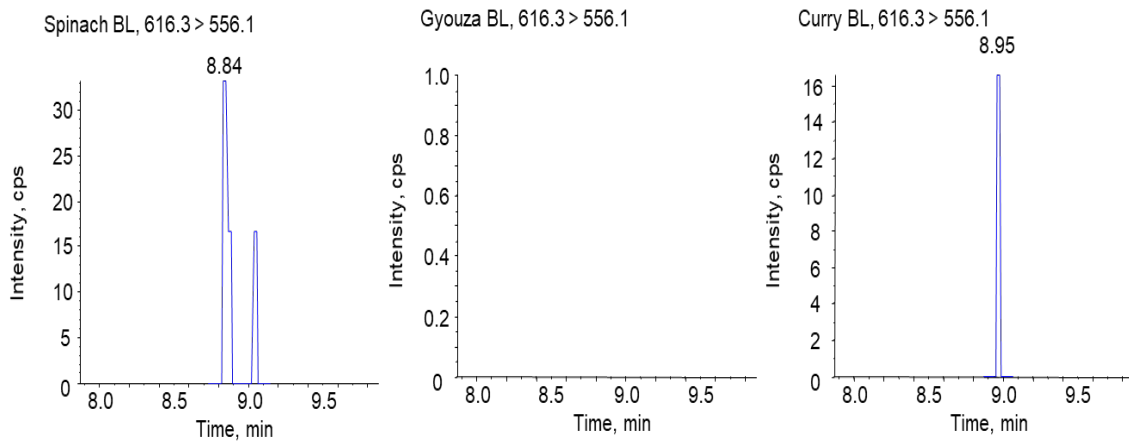


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

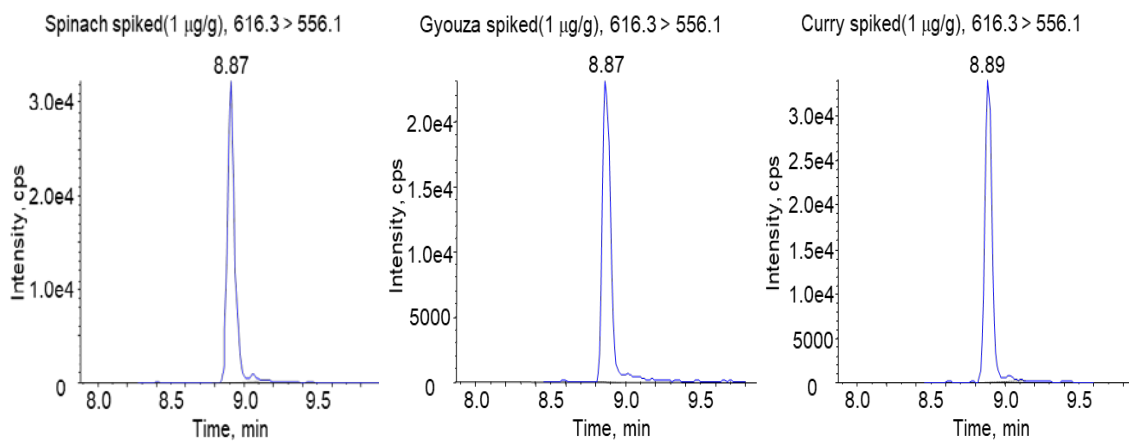


標準溶液 10 ng/mL

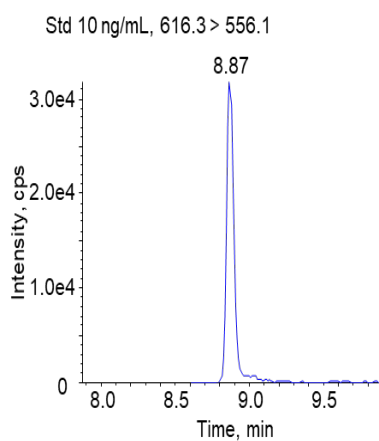
図 38. アコニチンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 646.2 > 586.4



ブランク試料

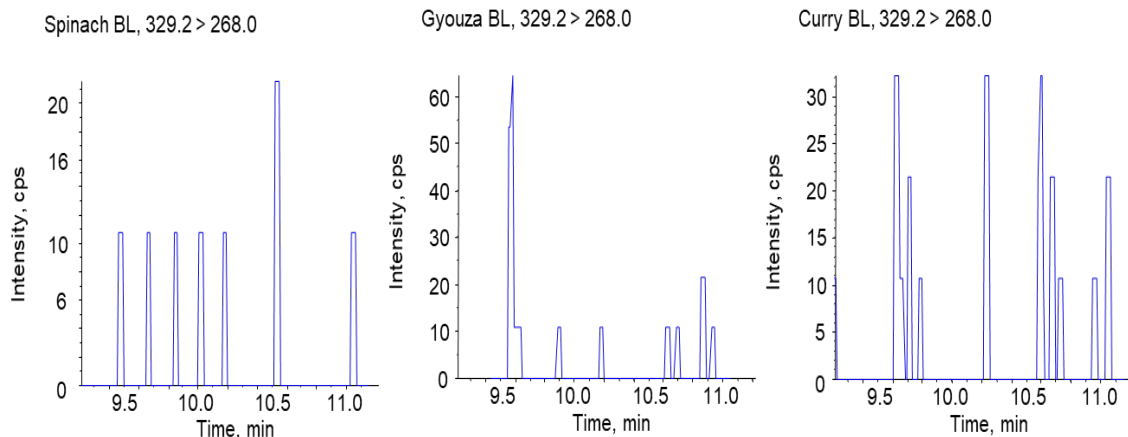


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

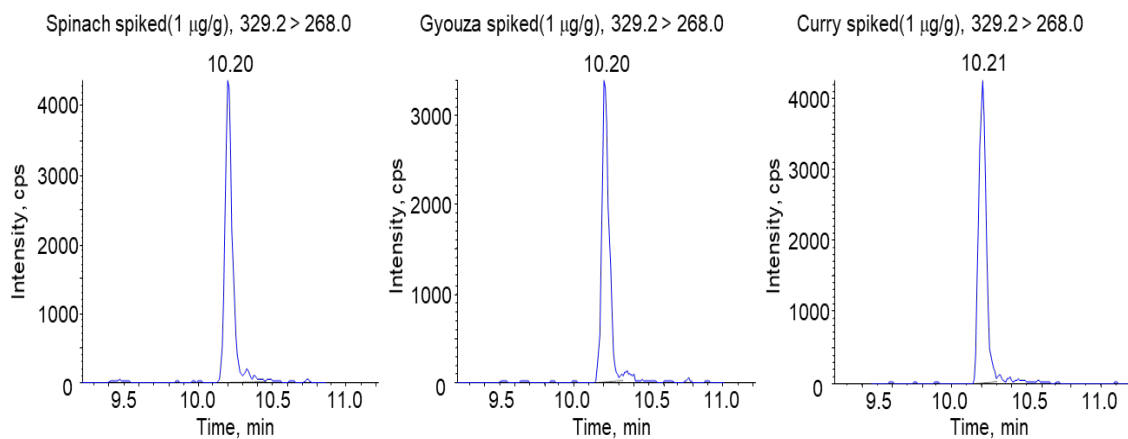


標準溶液 10 ng/mL

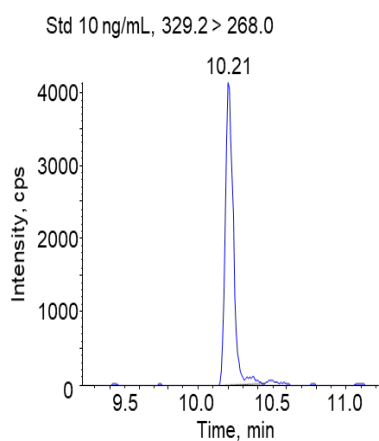
図 39. ヒパコニチンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 616.3 > 556.1



ブランク 試料



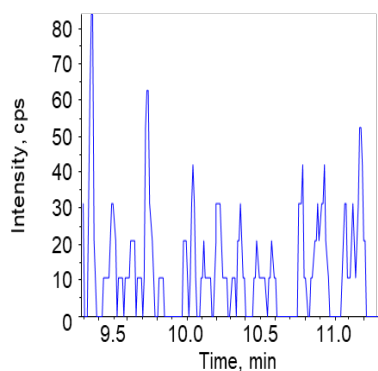
添加回収 (添加濃度 1 µg/g)



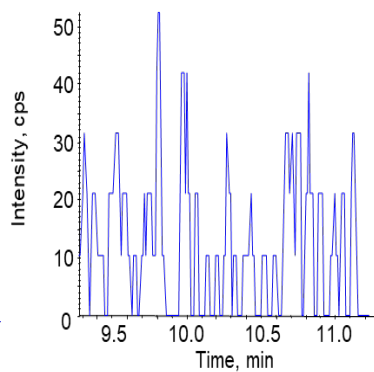
標準溶液 10 ng/mL

図 40. アリストロキア酸Ⅱの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 329.2 > 268.0

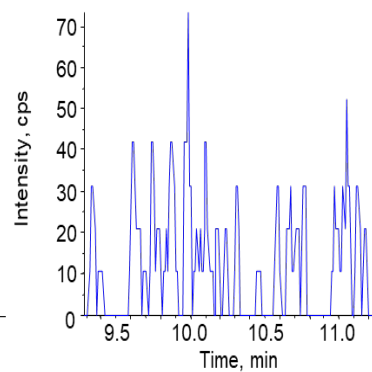
Spinach BL, 594.4 > 577.6



Gyouza BL, 594.4 > 577.6

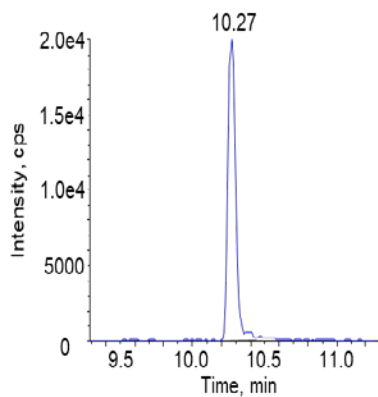


Curry BL, 594.4 > 577.6

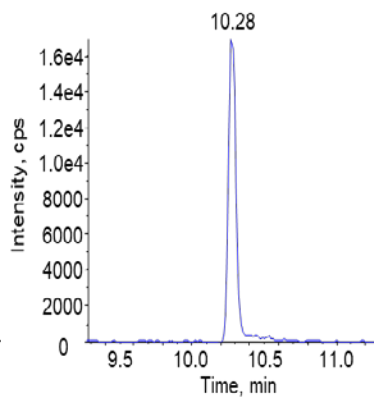


ブランク試料

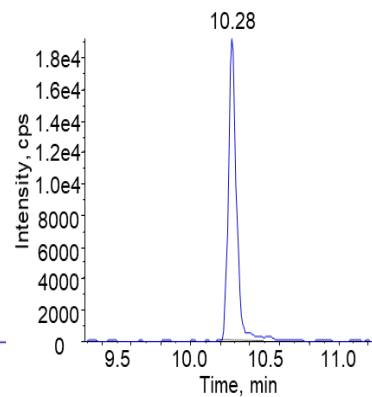
Spinach spiked(1 µg/g), 594.4 > 577.6



Gyouza spiked(1 µg/g), 594.4 > 577.6

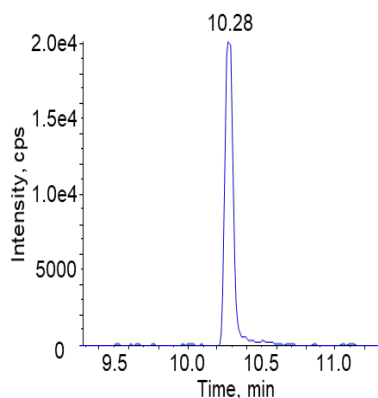


Curry spiked(1 µg/g), 594.4 > 577.6



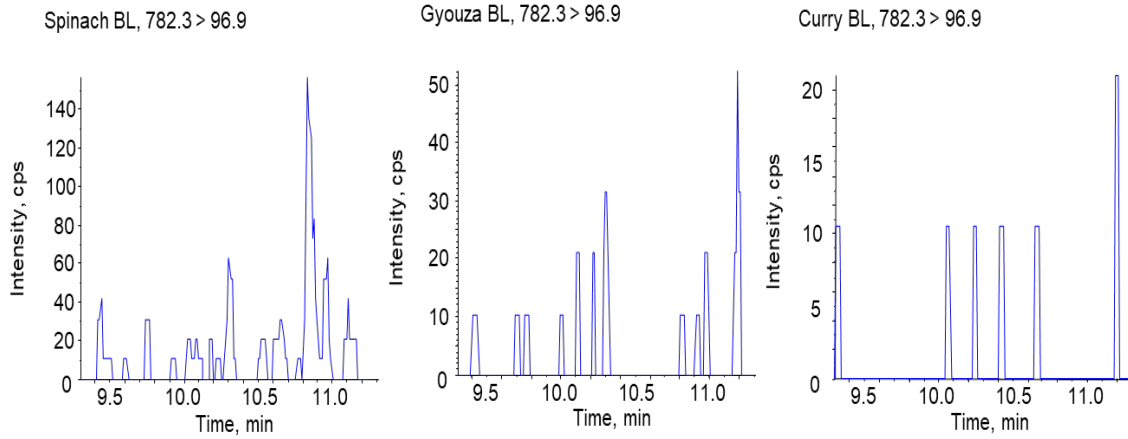
添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

Std 10 ng/mL, 594.4 > 577.6

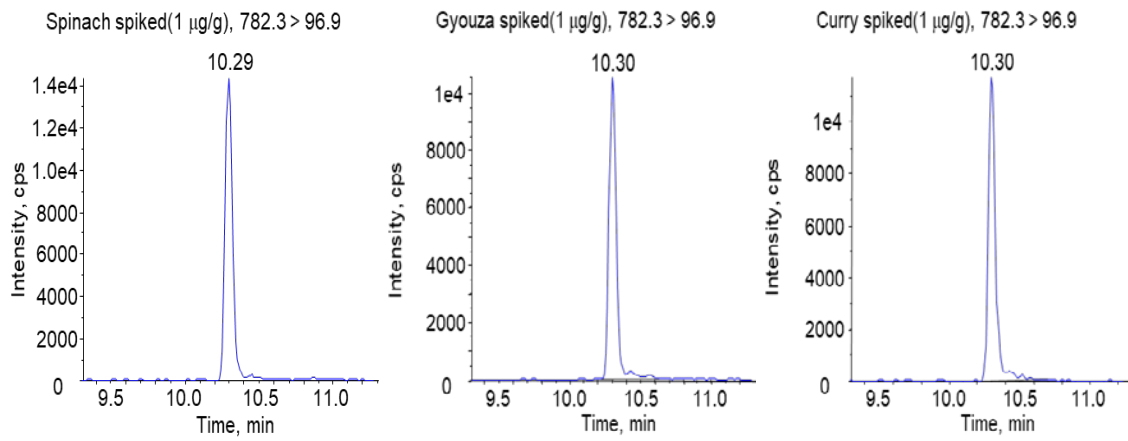


標準溶液 10 ng/mL

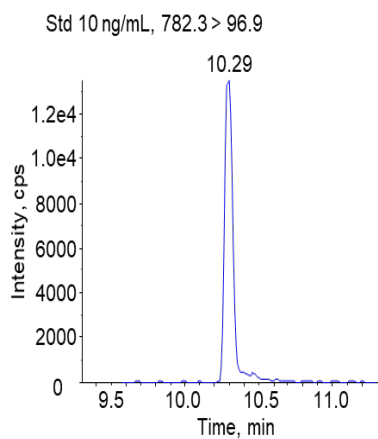
図 41. オレアンドリンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 594.4 > 577.6



ブランク試料

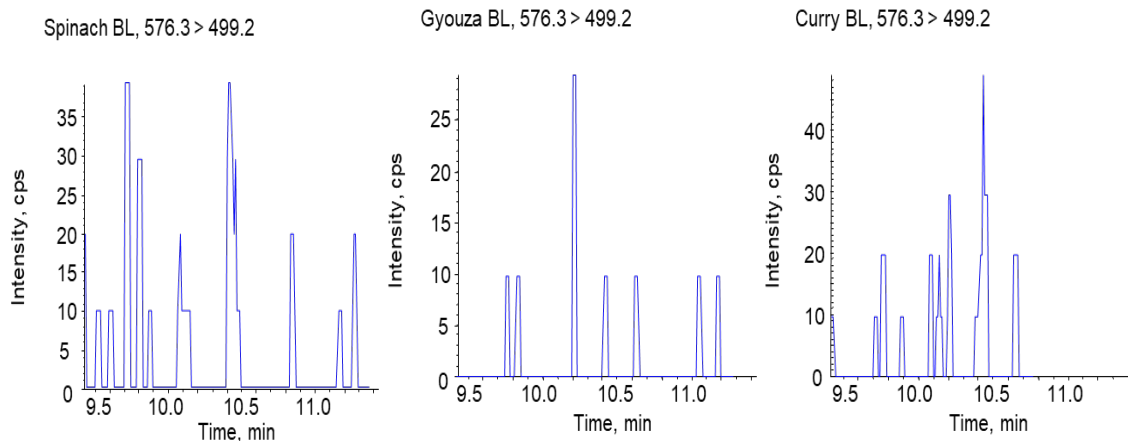


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

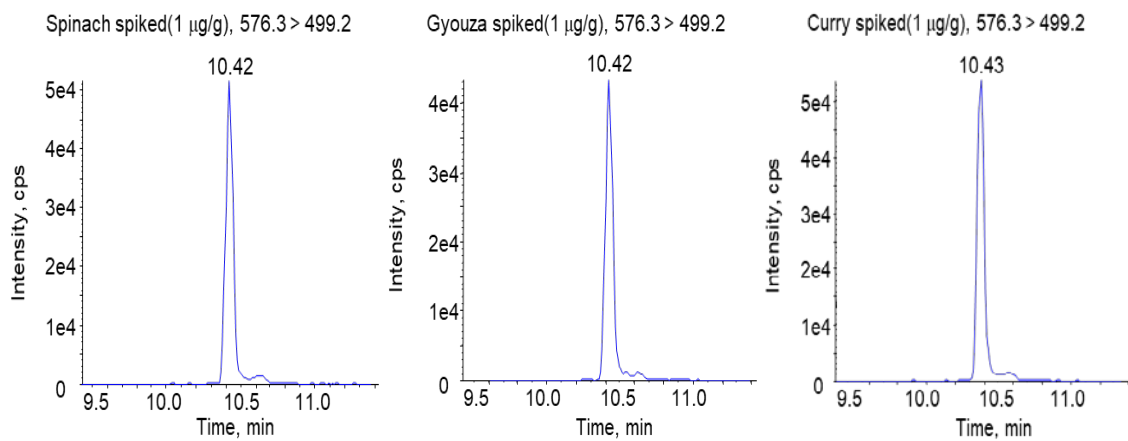


標準溶液 10 ng/mL

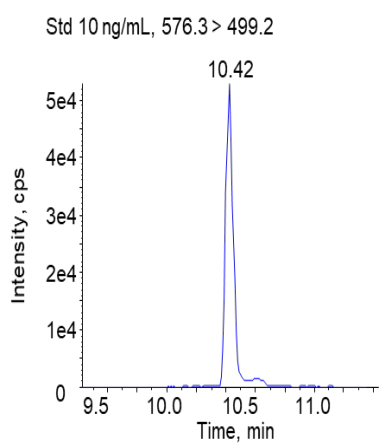
図 42. ジギトキシンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 782.3 > 96.9



ブランク試料

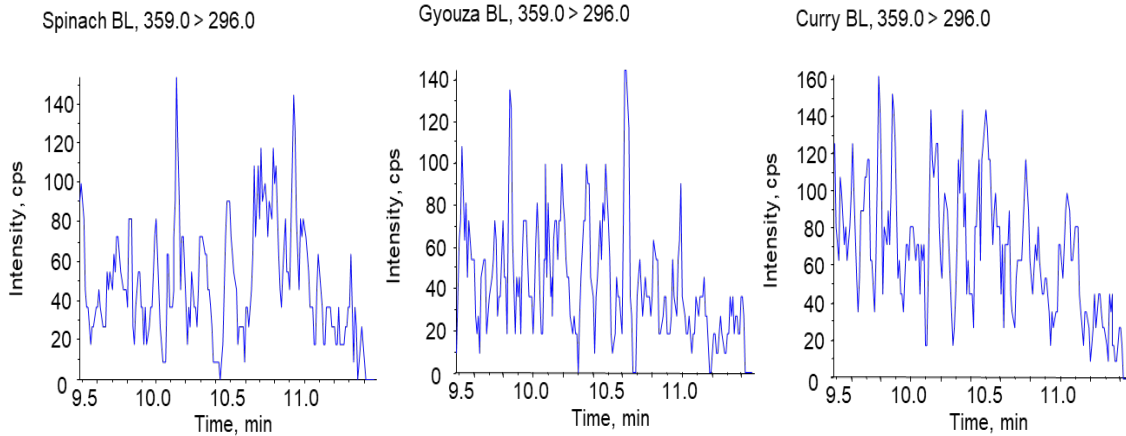


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

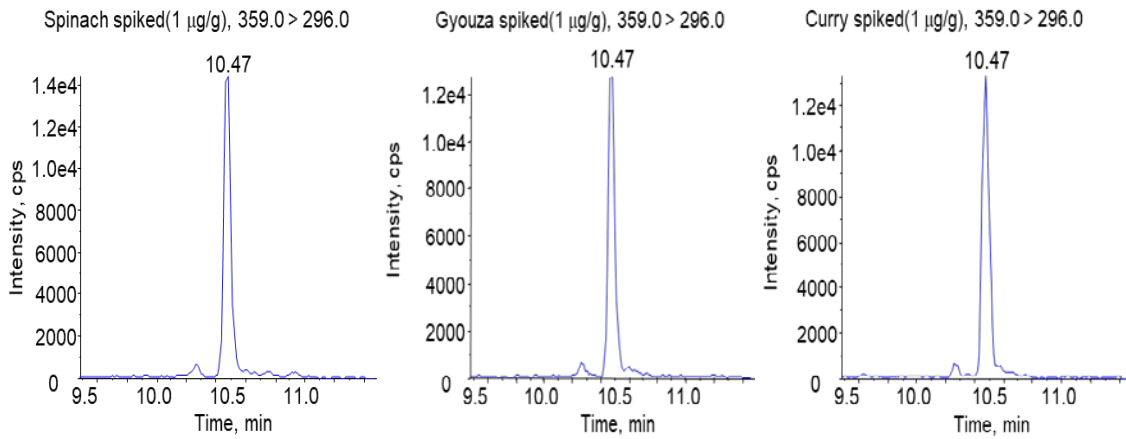


標準溶液 10 ng/mL

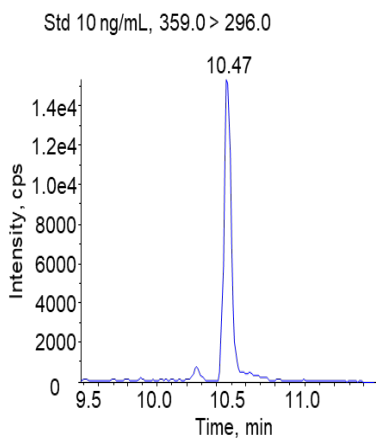
図 43. ククルピタシン B の LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 576.3 > 499.2



ブランク試料

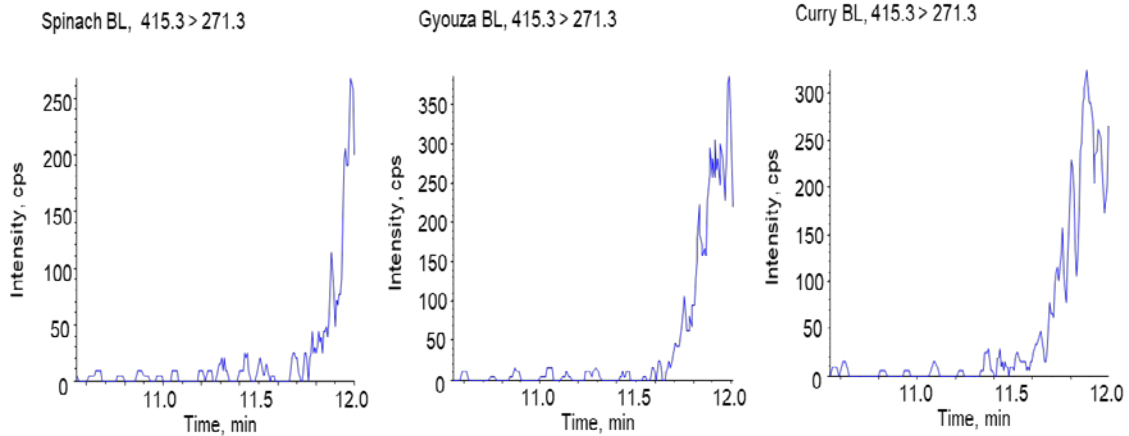


添加回収 (添加濃度 1 µg/g)

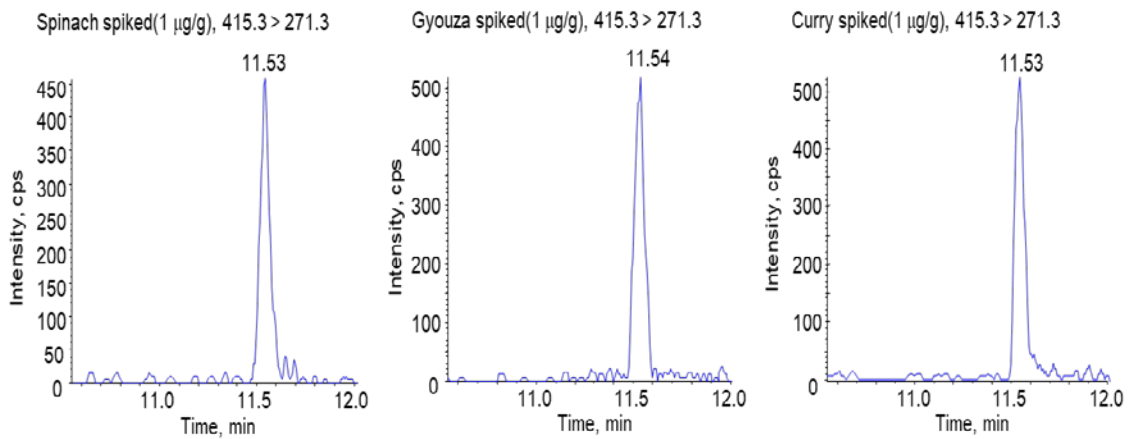


標準溶液 10 ng/mL

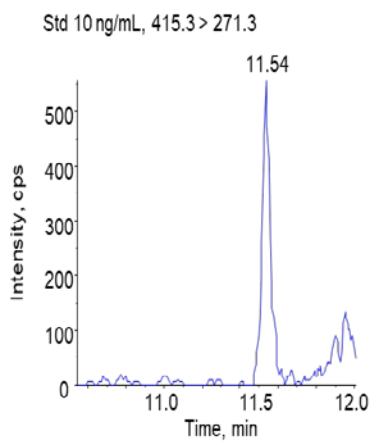
図 44. アリストロキア酸 I の LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 359.0 > 296.0



ブランク試料

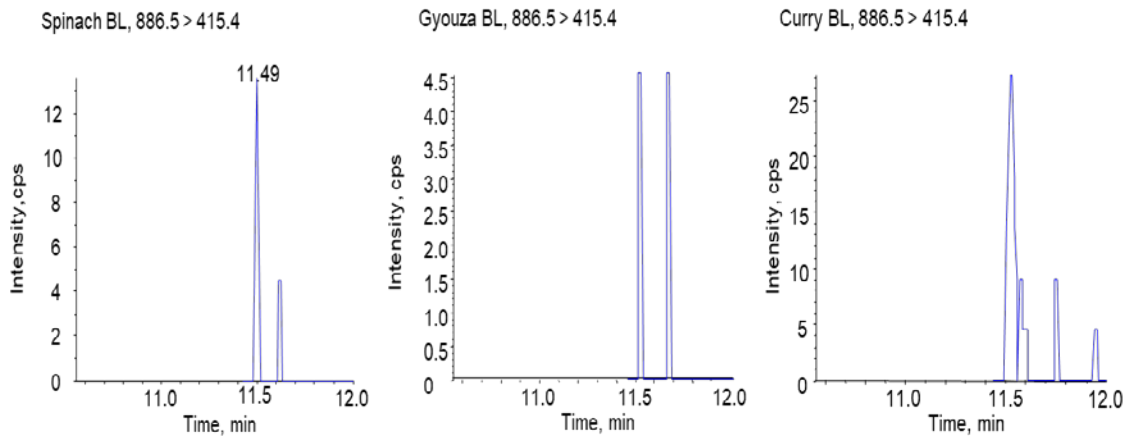


添加回収 (添加濃度 1 $\mu\text{g/g}$)

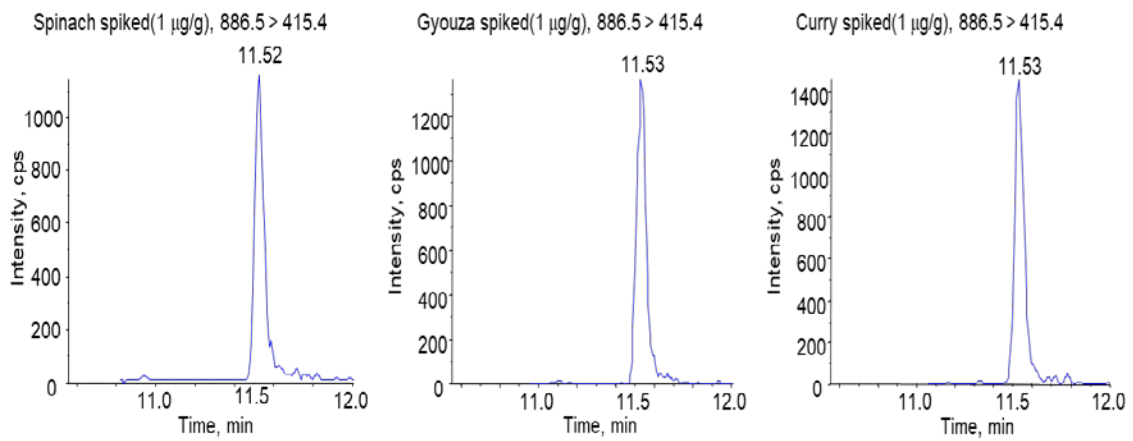


標準溶液 10 ng/mL

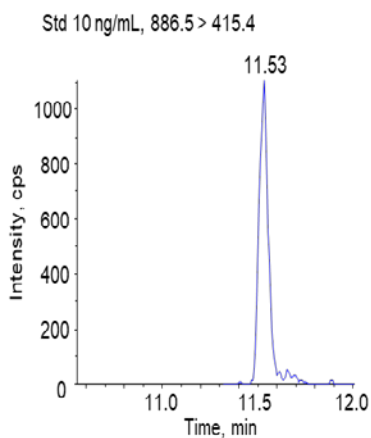
図 45. ジオスゲニンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 415.3 > 271.3



ブランク試料



添加回収 (添加濃度 1 µg/g)



標準溶液 10 ng/mL

図 46. ジオスシンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 886.5 > 415.4

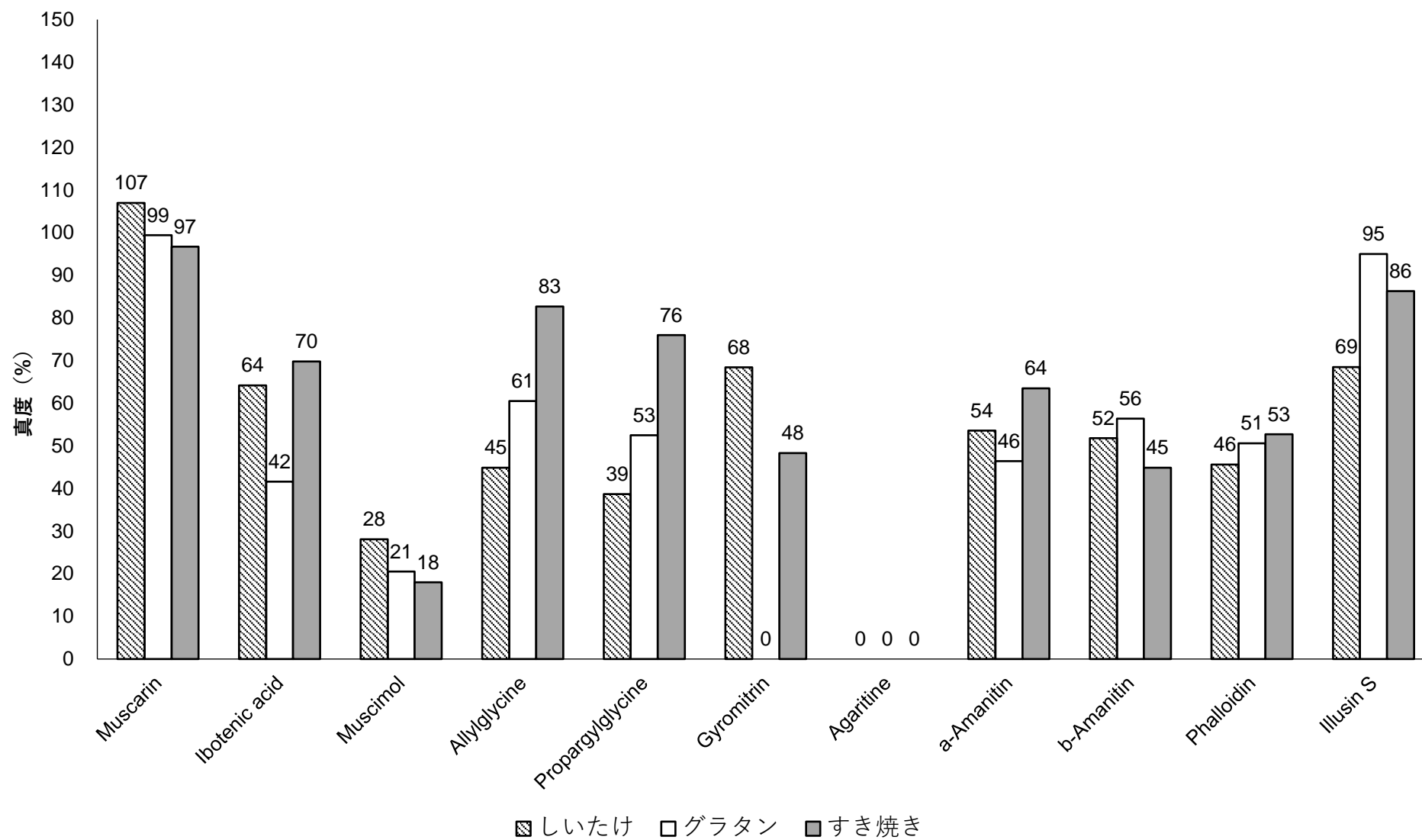


図 47. キノコの添加回収試験の結果 (コリンを除く 11 成分、添加濃度 1 μg/g (n=1))

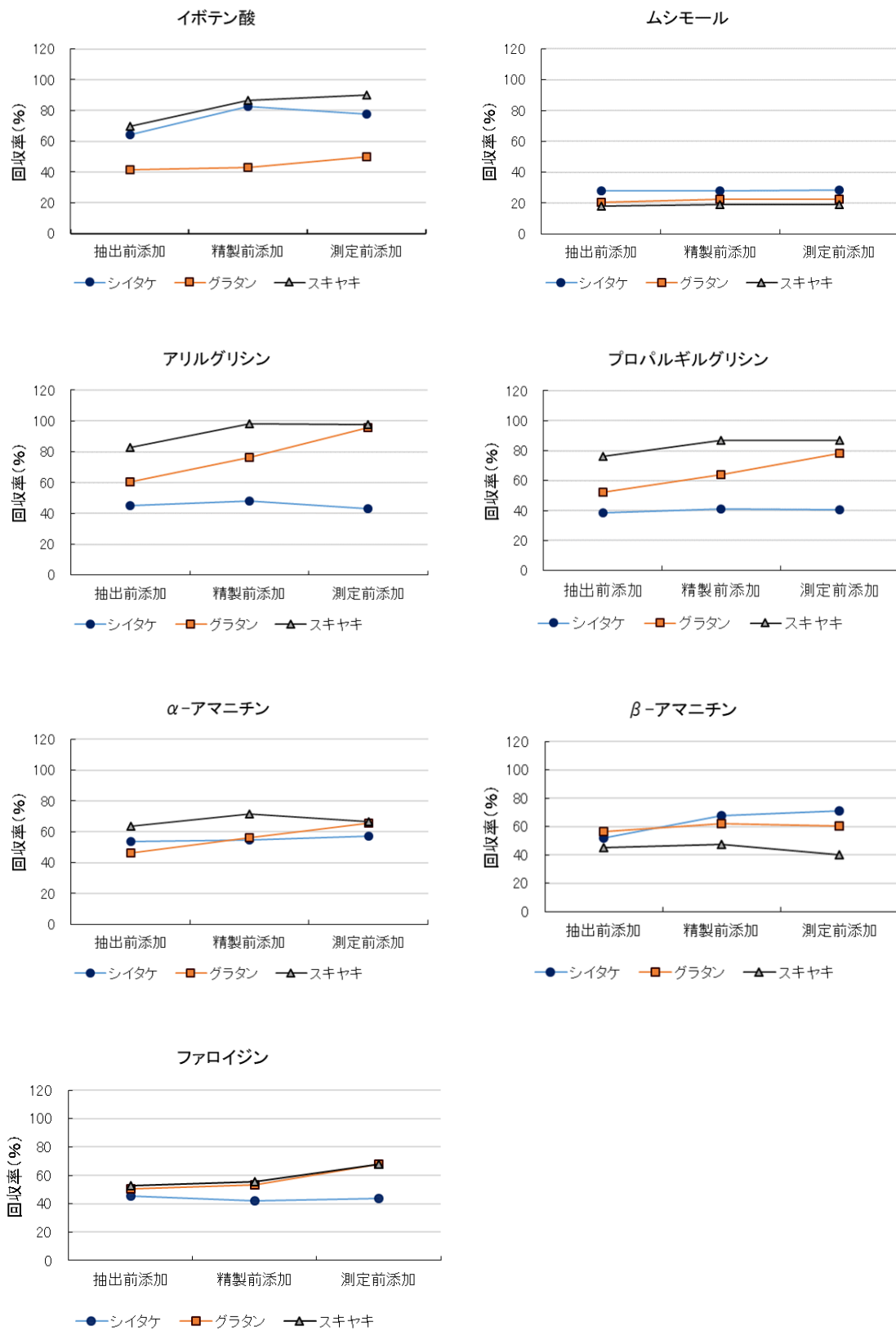


図 48. キノコの抽出前添加、精製前添加、測定前添加（添加濃度 1 μg/g (n=1)）

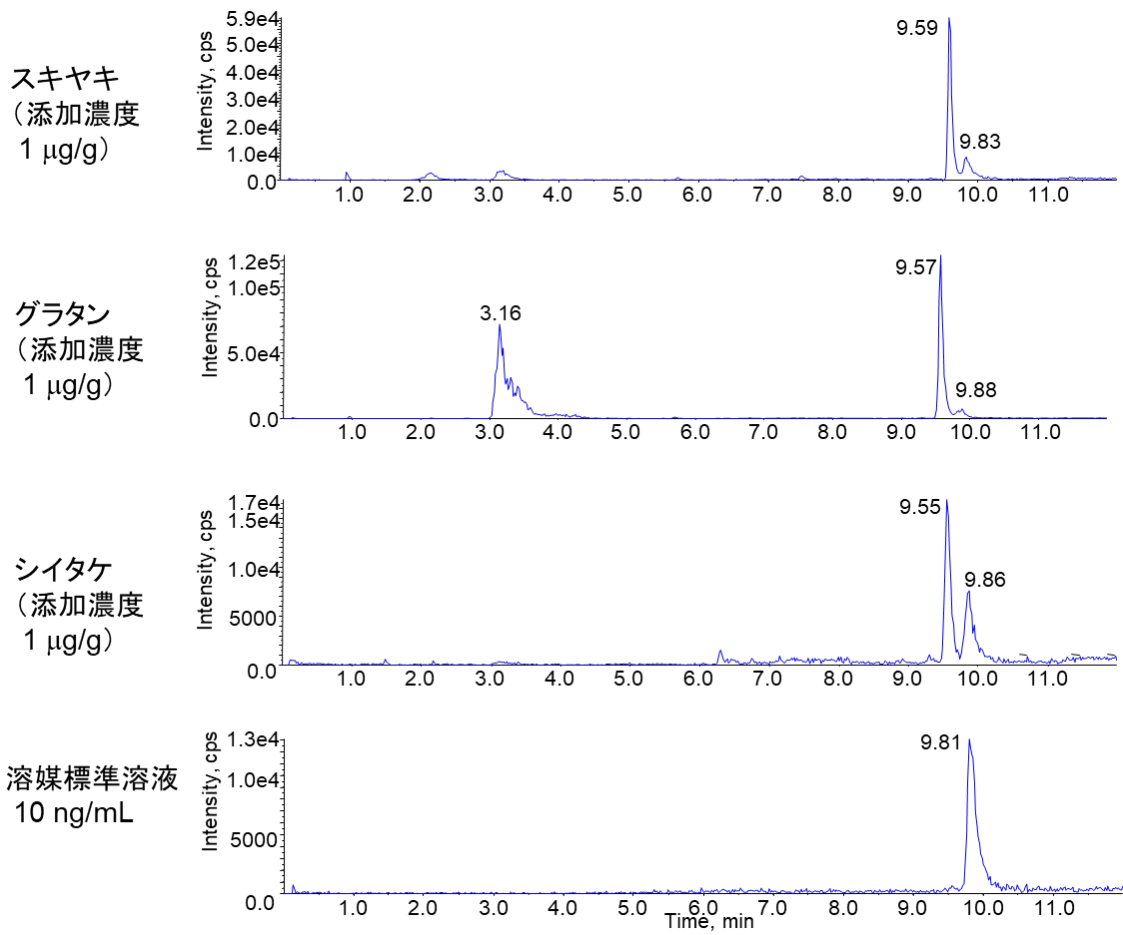


図 49. イブuprofen の LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 159.0 > 113.0

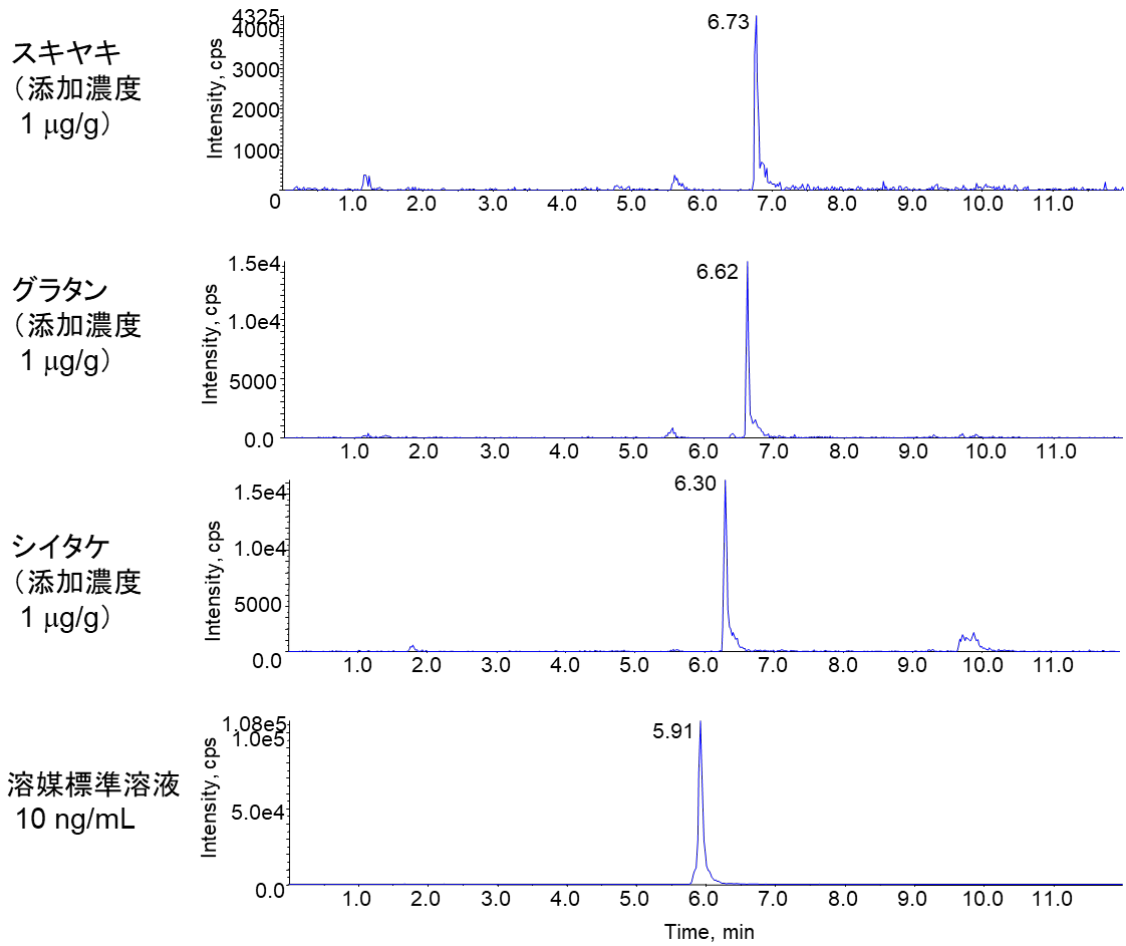


図 50. ムシモールの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM トランジション 定量 m/z 115.0 > 98.0

令和元年度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

植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究

研究分担報告書

「食中毒の病因植物種の遺伝子解析による同定法の開発及びデータベースの作製」

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

遺伝子配列に基づく特異的な検出同定法を、中毒事例が多いきのこ 2 種、植物 5 種について簡易法と確定法おそれぞれの検出法を確立してきた。これらの検出法を広く使用してもらうため、さらに、これを基本にして、新たな標的に対する試験法を自ら作成できるようにする目的で、試験法プロトコール、プライマー情報、関連する遺伝子配列情報、中毒統計情報をまとめて整理した自然毒データベース MushPlant を作製して公開した。

野外で実施可能な LAMP 法を用いた有毒植物 5 種に対する検査法の開発を行った。

各有毒植物特異的な LAMP 法用のプライマーを設計し、その性能確認をした。標的とする有毒植物で増幅を示したプライマーについて、さらに増幅反応時間の短縮と検出感度の向上のために追加ループプライマーを設計して検討した。また、多数の植物間での交差性を確認し、標的となる有毒植物と特異性の高いプライマーセットを選出した。スイセンを除く有毒植物 4 種について、食用植物 20 種とも交差反応しない検出系を確立できた。

研究協力者

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

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

I. 自然毒データベースの作製

A. 研究目的

日本国内において、自然毒が原因となる食中毒事例は毎年報告されている。植物性自然毒による食中毒は、細菌ウイルスなどを含めた食中毒全体では 10%に満たないが、イヌサフランやニセクロハツ摂取など死に至るケースも報告され

ている。このような背景から、自然毒のリスクに関する情報提供による健康被害防止を目的に、平成 22 年厚生労働科学研究「自然毒のリスクプロファイル作成を目指した調査研究」の成果として、自然毒のリスクプロファイルをホームページで公開し、その後も情報の更新を行いながら現在に至っている。また、そ

の間著者らは簡便な検査法による摂取前検査とともに形態学的な判別ができない試料においても確実な同定が可能な遺伝子検査法の開発に力を入れてきた。これまでに、きのこでは食中毒事例の大部分を占めるものの形態学的な判別が難しいクサウラベニタケ近縁種やツキヨタケの、また、高等植物では食中毒事例が多いイヌサフラン、スイセン、バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブトの遺伝子検査法（簡便な PCR-RFLP 法と確定 Real-time PCR 法）を開発してきた。しかしながら、これらの方法ですべての植物性自然毒による食中毒原因種をカバーすることは難しく、また、地域により原因種は異なる。そこで、これらの手法が広く活用され、場合により改良されると同時に、新たな標的植物あるいはきのこについての検査法開発を自ら行える環境を作成して提供することが重要と考えて植物性自然毒のデータベースを新たに構築することとした。

今回、厚労省内にある自然毒データベースである「自然毒のリスクプロファイル」のうち、植物性自然毒について内容改定を行うとともに、遺伝子検査法に関する詳細情報を加えて国立医薬品食品衛生研究所生化学部内に植物性自然毒データベース (MushPlant) として整備することとした。

B. 研究方法

国立医薬品食品衛生研究所生化学部内の植物性自然毒データベースに掲載

する情報、必要な資料を作成した。

(1) 厚労省・自然毒リスクプロファイルのホームページの各項目内にある食中毒統計からきのこを原因とする食中毒と有毒植物を原因とする食中毒情報を抜粋し、2000年から2018年まで年次ごとに整理集計して、その年に報告された原因食物とその発生件数、摂食者総数、患者数、死者数を表にまとめた独立したページを作成した。年次推移もグラフで表示した。

(2) 厚労省・自然毒リスクプロファイルのホームページの植物性自然毒項個別データを整理した。きのこの項においては、最近の知見により、クサウラベニタケをクサウラベニタケ近縁種とし、3種があることを記載した。すなわち、クサウラベニタケは日本で食中毒が多いきのこで、これまで欧州起源の *Entoloma rhodopolium* と考えられてきたが、その形態学的な多様性から一つの種ではなく複数の種から構成されるのではないかという指摘は以前からされており、最近の詳細な分類学的研究からクサウラベニタケは少なくとも3種類の異なるきのこから構成されることが明らかになったため*、クサウラベニタケ近縁種として一つのグループの中にこれらの3種を含めた。

・クサウラベニタケモドキ

E. subrhodopolium

Kondo&Nagasawa

・ニセクサウラベニタケ

E. pseudorhodopolium

Kondo&Nagasawa

・コガタクサウラベニタケ

E. lacus Kondo

(3) 有毒きのこではツキヨタケおよびクサウラベニタケ近縁3種について、また、有毒植物ではイヌサフラン、スイセン、バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブトの5種について、検査・同定法として遺伝子検査法(PCR-RFLP法およびリアルタイムPCR法)に関する情報を記載した。【有毒きのこ】ツキヨタケおよびクサウラベニタケ近縁3種の遺伝子検査法について I.PCR-RFLP法と II.Real-time PCRを用いた方法の二章からなる実験手順書を作成し、詳細に示した。それぞれの試験に使用するプライマー・プローブの配列情報も記載した。

【有毒植物】イヌサフラン、スイセン、バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブトの5種の遺伝子検査法に関しても同様に示した。標的植物あるいはきのこの配列に関する情報も別表に一覧した。

(4) (3) 以外の標的きのこ、あるいは植物についての遺伝子検査法を自ら作成可能にするための手順概要を記載し、分析スキームを作成した。分析スキームは、行うべき実験手順をフローチャートで示し、検査方法を選択するフローをわかりやすく示した。

(5) 各項目に分散していた食中毒情報を一元化して植物性自然毒データベースとして整理し、生化学部ホームページ内に新しく設けることで、年次変化や中

毒発生傾向などを把握しやすくなることが期待される。

* *Sci. Rep.*, 7: 14942,

DOI:10.1038/s41598-017-14466-x

(2017)

C. 研究結果および考察

まず、データベースにスキームを掲載して分析すべき対象がすでに方法が確立しているものか、新規に開発すべきものかを図で示し分かりやすくした(図1、図2AB)。図1では、有毒植物、有毒きのこの分析スキームをそれぞれ示した。新たに分析法を確立する場合は、図2の分析法開発スキームに従って行うようになっている。今後、開発スキームの改良と併行して提供情報を充実させていくことが必要と考えている。

すでに方法が確立している有毒きのこ(ツキヨタケ、クサウラベニタケ近縁3種)と有毒植物5種の分析の場合は、検査・同定法欄の簡易検査法(PCR-RFLP)または確定検査法(Real-time PCR)の項に示された実施手順概要、配列情報、プライマー・プローブ情報、標準プラスミド配列を参考にして検査を実施することができる。

例としてツキヨタケによる食中毒の判別について記述する。原因食物としてツキヨタケを疑う場合、まず簡易検査法(PCR-RFLP)に従い、必要な試薬・消耗品および検査用プライマーを準備して手順通りにPCRテンプレート調製したのちPCR試験の産物を制限酵素処理したものから得られた電気泳動像より

食毒の判別を行う。この方法でツキヨタケと形態が似ている他の食用きのこを区別することができる。さらに正確に判別したい場合は、確定検査法 (Real-time PCR) に従い、試験する。この方法でツキヨタケ特異的な増幅の有無で判別することができる。

クサウラベニタケ近縁 3 種と有毒植物 5 種においても同様に行うことができる。

食用／有毒含めて開発過程で解析した配列は NCBI に登録をして Accession # を取得している。これらの配列情報 (採取サンプルの解析を含む) は一覧表に整理してあるため (図 3、4)、入手したい配列は表の Accession # をクリックすることで NCBI の該当するホームページから必要な配列情報を得ることができ、方法の改良を行うことも可能となった。

一方、新たに分析法を確立する場合は、分析法開発スキームに従って行う。

まず、よく間違える食用のものと標的とする有毒種のサンプルから、DNA 抽出を行い ITS 領域の解析、およびデータベース上の該当データと併せてアラインメントから特異的な領域を選定する。選定した有毒植物種特異的配列を用いて実際の試料 (食用と有毒植物) を用いて特異性を確認する。また、加工調理された場合も想定して、可能範囲でその他の作物についても交差藩王性を検証したうえで、試験法として確立するものとする。

次に、各項目に分散していた食中毒情報を一元化して、食中毒統計情報として新たなページを作成して整理するとともに (図 5)、年次推移をグラフで表示した。また原因種の個別データも整理して掲載した。

過去 18 年の統計情報から、同定された原因きのこに関しては、ツキヨタケまたはクサウラベニタケ類が主要な原因きのこであった。事例発生件数総数は、きのこの生育状況や採取数が天候や社会情勢の影響を受けることを考慮する必要があるが、年 16 件から 86 件までの幅があった。死者数は少ないが数年ごとに発生し、合計 13 名であった。ドクツルタケやニセクロハツ、カエントケが原因と判明した例もあったが、原因種不明の場合も多く存在する。ツキヨタケまたはクサウラベニタケ類だけをみるとツキヨタケは毎年一定数の中毒が発生する傾向であるが、クサウラベニタケは中毒事例総数が多い時に多い傾向が見て取れる。中毒事例総数が多い時は、きのこ類が豊作の時で、そのようなときは、食用のウラベニホテイシメジに食らえて通常小さい有毒のクサウラベニタケが大きく成長することで、判別が難しくなっていることが原因の一つと考えられた。

D. 結論

食中毒統計情報から掲載検査法分析スキーム、分析法開発スキーム、配列情報のほか、分類のための分子系統樹解析

例を示した、新たな植物性自然毒データベース MushPlant を構築した。

本データベースを活用することにより、各試験機関は既法の遺伝子検査法の実行や改良を行えるだけでなく、新たな標的に対する試験査法の開発が可能となる。

II. LAMP 法を用いた簡易検出法の開発

A. 研究目的

有毒植物による食中毒事例はスイセン、バイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオ、トリカブトで多く発生し、食中毒事例全体の約7割を占める。特に、イヌサフランでは死亡事例も報告されている。山菜採り、家庭菜園での採取や採取した植物の譲渡などによる「家庭」での食中毒発生が多くを占めており、迅速簡便な有毒植物の同定法が求められてきた。そのようなニーズに対応すべく LAMP 法を用いた有毒植物の判別法の開発について検討を行った。植物の DNA バーコーディング領域である ITS 領域、*rbcL* 領域、*matK* 領域および *psbA-trnH* 領域の塩基配列情報をもとに LAMP 法用プライマーを設計し、その選択性や増幅反応時間について検討を行った。さらに、増幅反応時間の短縮や検出感度の向上のために追加で設計したループプライマーの性能についても検討を行った。また、設計したプライマーセットを用いた LAMP 法の特異性についても確認し、標的となる有毒植物由来 DNA を選択的に増幅するプライマーセ

ットを選抜した。特異性の高いプライマーを用いた迅速簡便な LAMP 法が確立できれば、2 時間以内に原因植物の特定が可能となり、有毒植物が疑われる食中毒の早期原因究明に有用であると考えられる。

B. 研究方法

(1) 試料

本研究で用いた有毒植物（トリカブト 4 種、イヌサフラン、スズラン 2 種、バイケイソウ、スイセン、チョウセンアサガオ 3 種）および誤認されやすい食用植物（ニリンソウ、ギョウジャニンニク、ギボウシ 2 種、ニラ）は北海道立衛生研究所の薬用植物園で採取したものを使用した。その他の誤認されやすい食用植物（モロヘイヤ、オクラ、ゴボウ）は国内産（北海道、沖縄県、群馬県）の市販品を試料として用いた。

(2) DNA 抽出

各試料からの DNA 抽出は、DNeasy plant mini kit (QIAGEN)を用いた。抽出した DNA 溶液の濃度は、超微量分光光度計 NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific)を用いて定量した。

(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 時間もしくは 2 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）

を用いた。

C. 研究結果および考察

トリカブト、イヌサフラン、バイケイソウ、スイセン、チョウセンアサガオそれぞれの ITS 領域、*rbcL* 領域、*matK* 領域および *psbA-trnH* 領域の配列情報をもとに各有毒植物の検知を目的とした LAMP 法用プライマーを設計した。標的とする有毒植物及び誤認されやすい食用植物を対象に各プライマーを用いた LAMP 法を実施したところ、いくつかのプライマーで標的となる有毒植物で増幅を示すことが確認できた。増幅反応は、多くは反応開始後、30 分から 40 分程度で増幅し始めるが、中には 60 分過ぎから増幅を示すものもあった。

反応時間の短縮と検出感度の向上を目的にループプライマーを追加設計し、その効果を確認した (図 8~12)。本来ループプライマーは、2 本まで設計できるが、配列とプライマーの相性の関係で一部のプライマーについてはループプライマーが 1 本だけであった (図 4) が、いずれも反応開始から 20 分前後で増幅の立ち上がり確認できるようになった。これにより、60 分の反応時間で十分に増幅を確認できるようになった。

ループプライマーを含む LAMP 法用プライマーセットの特異性を確認するため、合計 20 種の有毒植物および食用植物に対し LAMP 法を実施した (図 13)。その結果、トリカブト検出用、イヌサフラン検出用、バイケイソウ検出用、チョウセンアサガオ検出用に設計したプラ

イマーセットで、標的となる有毒植物以外では増幅しないことが確認できた。しかし、スイセン検出用に設計したプライマーを用いた LAMP 法では、反応時間が 60 分を過ぎたあたりから多くの植物種で増幅を示したため、再度プライマー設計から見直すこととした。

D. 結論

作成した LAMP 法プライマーおよびループプライマーのセットの中から、トリカブト検出用、イヌサフラン検出用、バイケイソウ検出用、チョウセンアサガオ検出用の 4 種類のプライマーセットを選出した。この 4 種類のプライマーセットは、有毒植物および食用植物 (合計 20 種類) との交差性試験を実施しても、それぞれ標的とする有毒植物種以外では増幅を示さず、特異性が高いことが確認された。

LAMP 法用のプライマーの設計に際して、植物 DNA バーコード領域である ITS 領域、*rbcL*、*matK* および *psbA-trnH* 領域を対象に配列情報からプライマーを設計し、LAMP 法を実施した結果、ITS 領域もしくは *matK* 領域を対象としたプライマーで、十分な増幅速度を示し、特異性が高いものが得られた。これは、ITS 領域や *matK* 領域の配列情報に、有毒植物の品種間では共通配列が多く、また有毒植物と食用植物との品種間では、特徴的な差異が適度にあり、そこが LAMP 法の選択特異性に適していたためと考えられる。

今後は、各プライマーセットでの

LAMP 法の検出感度の確認や、また加熱・消化処理した有毒植物の検出の可否などを確認していく。また、スイセン検出用プライマーについては、再度調整をして特異性の高いプライマーを作出する。

今回作成したイヌサフラン用プライマーセットは、イヌサフランと同様に食用植物のギョウジャニンニクと誤認して食中毒を引き起こす恐れのあるスズランでは増幅を示さなかった。ギョウジャニンニクに似た有毒植物の判定をする際には、イヌサフランと共にスズランも検出できると応用の幅が広がるので、今後スズラン検出用のプライマーの設計についても検討を行う。

I. II. 共通

E. 業績

論文発表

- 1) 近藤一成、坂田こずえ、加藤怜子、菅野陽平、武内伸治、佐藤正幸：有毒クサウラベニタケ近縁種のリアルタイム PCR 法による同定. *食衛誌* **60** (5)、144-150、2019
- 2) Narushima, J., Kimata, S., Soga, K., Sugano, Y., Kishine, M., Takabatake, R., Mano, J., Kitta, K., Kanamaru, S., Shirakawa, N., Kondo, K., Nakamura, K.: Rapid DNA template preparation directly from a rice sample without purification for loop-mediated

isothermal amplification (LAMP) of rice genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **84**, 670-677, 2020

学会発表

- 1) 成島純平、中村公亮、木俣真弥、曾我慶介、菅野陽平、岸根雅宏、高畠令王奈、真野潤一、橘田和美、金丸俊介、白川七海、近藤一成：コメ由来遺伝子の高精度検査を可能にする簡易法の開発. 日本食品衛生学会第 115 回学術講演会、東京、2019 年 10 月
- 2) 菅野陽平：LAMP 法（ループ介在等温増幅法）による自然毒の遺伝子検査へのアプローチ. 第 56 回全国衛生化学技術協議会年会 部門別研究会 食品部門、広島、2019 年 12 月
- 3) 坂田こずえ、加藤怜子、近藤一成：自然毒データベースの改定について. 第 56 回全国衛生化学技術協議会年会、広島、2019 年 12 月
- 4) Kondo, K., Sakata, K., Kato, R., Noguch, A.: Identification of toxic plants that cause severe food poisoning using real-time PCR. *Recent Advances in Food Analysis Prague, Czech Republic, Nov.5-8 (2019)*

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1 生化学部ホームページ上に記載したデータベースのウェブサイト

生化学部は、分子生物学・免疫学・分離食品、薬品、化粧品、医薬品外、また、放射線の安全管理、業務の研究業務は、研究所内各部署および外、消費者庁、食品安全委員会と連携

データベース

GMO-db
Comprehensive DataBase on Biotech Products

GMO-db provides indispensable information on official detection methods of genetically modified crops, guidelines for method development, biotechnologies including genome editing, risk assessment standard, allergenicity assessment guidelines, and status of GMO development. More than 20 years have passed since GM crop was commercially introduced to the market. GM crop cultivation has spread worldwide. However, public understanding is not yet progressing. GMO-db can help understand the latest biotechnologies and safety assessment.

MushPlant
DataBase on toxic Mushrooms and Plants

MushPlant database was built for the purpose of preventing health hazards by natural poisons. The database includes statistical data of food poisoning cases caused by mushrooms and mushrooms between 2000 and 2016. DNA-based identification methods based upon specific loci (eg. ITS, RPB2, matK), sequence data links, analytical methods, and examples of molecular phylogenetic study. These data and information can help you understand the risk of natural toxins in toxic mushrooms/plants and identify them correctly.

ADFS

植物性自然毒データベース
MushPlant: database on Toxic Plants and Mushrooms

(背景) 自然界に存在する植物・動物にはヒトに対して有害な作用を有する生理活性物質を持つものが数多く存在する。このため、山菜取りやきのご持りにおいて有毒な品種であるのに食用の品種と誤って判断、摂取することで毎年食中毒事例が報告されている。そこで、自然毒による健康被害を防止する目的で、平成21年厚生労働省HP内に「自然毒のリスクプロファイル」として自然毒データベースを公開してきた。今回、有害植物及び菌類(きのこ)に対する遺伝子検査法を追加更新し、生化学部内に植物性自然毒データベースとして新たに公開した。

(目的) これまでに、形態学的な判別が難しく、かつ食中毒事例が多いクサウラボニタケ近縁種やツキヨタケ、イヌサフラン、スイセン、バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブトの遺伝子検査法 (PCR-RFLP法とReal-time PCR法) を開発してここに公開した。しかし、これらの方法ですべての食中毒原因種をカバーすることは難しく、また地域により原因種は異なる。そこで、これらの手法が広く活用されると同時に、新たな種別植物あるいはきのこについて、自ら検査法開発を行える環境を作成して提供することが重要と考えられた。MushPlantデータベースでは、掲載している検査法を実施できるとともに、必要に応じて新たな検査法開発を支援するための情報を提供する。

	植物	きのこ
中毒統計情報	統計および年次推移 (Excel形式)	統計および年次推移 (Excel形式)
Sequences	有毒5種 (Excel形式)	ツキヨタケ (Excel形式) クサウラボニタケ (Excel形式)
検査・同定法 (RFLP, Real-timePCR)	有毒5種 (pdf)	ツキヨタケ (pdf) クサウラボニタケ (pdf)
個別データ	有毒植物 (link)	有毒きのこ (pdf)

① 分析スキーム (pdf)

② 分子系統樹解析 (分枝解析) の例

本データベースの作成および維持は、厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進事業 (H20-食品一般-015, H22-食品一般-011, H24-食品一般-007, H27-食品一般-007, H30-食品一般-008) の支援により実施されている。

(参考文献)

(1) Sugano, Y., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Fukuda, N., Suzuki, T., Kondo, K. Rapid identification method of *Omphalotus japonicus* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Food Hyg. Saf. Sci., 58, 113-123 (2017).

(2) Kondo, K., Nakamura, K., Ishigaki, T., Sakata, K., Noguchi, A., Fukuda, N., Nagasawa, E., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T. Molecular phylogenetic analysis of new *Entoloma rhodopili*-um-related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP. Sci. Rep., 7, 14627. doi:10.1038/s41598-017-14627-1 (2017).

図2-A 有毒きのこの分析スキーム

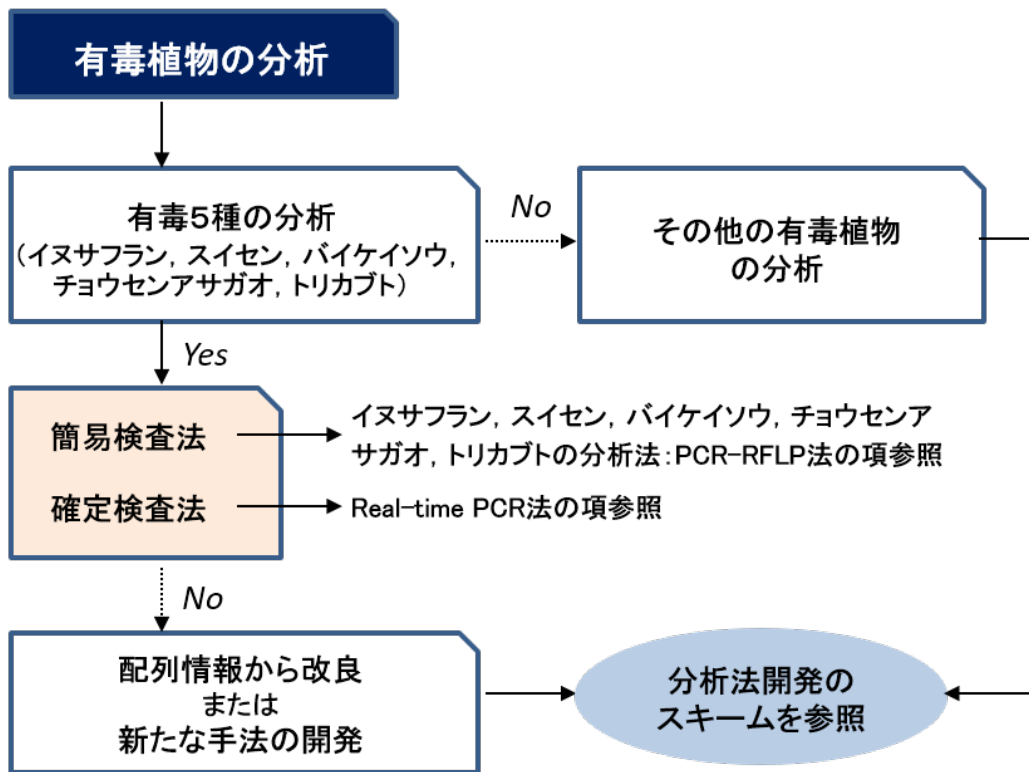


図2-B 有毒植物の分析スキーム

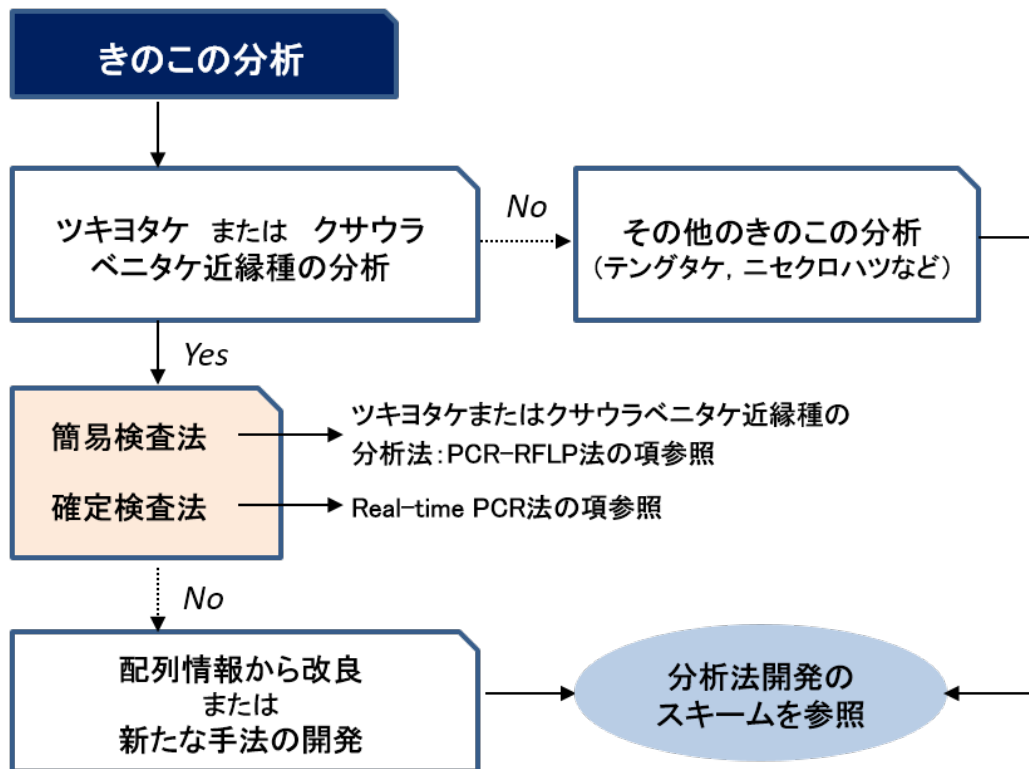


図3 分析法開発のスキーム

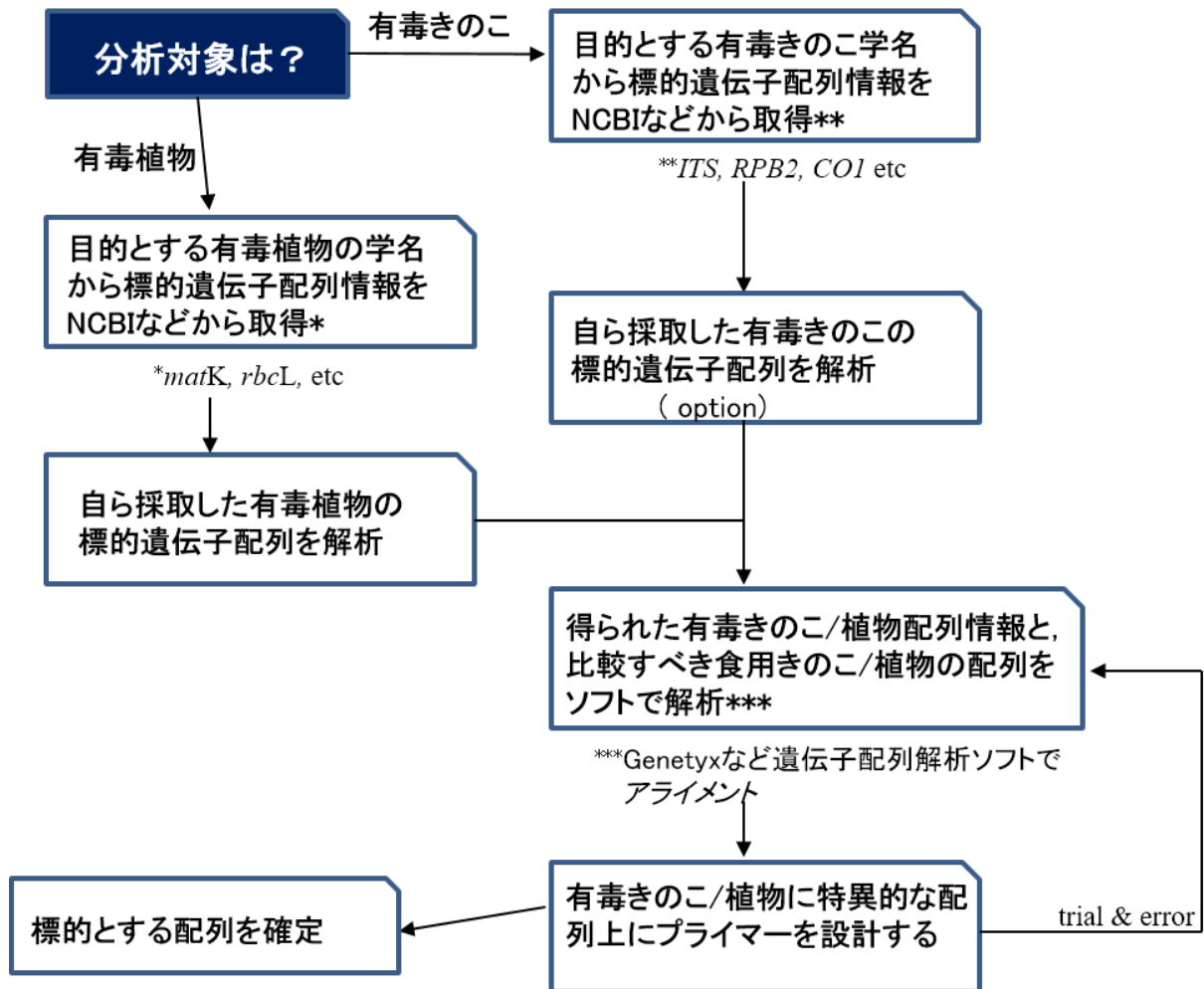


図4 配列情報一覧 (植物)

学名	rbcL		matK		trnH-psbA	
	length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.
<i>Allium tuberosum</i>	1,434	JN969266	1,552	this study	577	GQ434888
<i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i>	1,334	HM640487	1,563	HM640601	644	GQ923940
<i>Narcissus tazetta</i>	703	GQ436660	1,565	HMO11047	558	GQ436660
<i>Narcissus elegans</i> スイセン	1,341	AF116972	882	KU127381		
<i>Hosta sieboldiana</i>	1,469	this study	1,604	this study	686	this study
<i>Hosta plantaginea</i>	1,334	HM640480	1,566	HM640594	656	KC704294
<i>Hosta rectifolia</i>	1,327	L10253				
<i>Veratrum album</i> subsp. <i>oxysepalum</i>	1,225	JN417478	1,536	JF807719	314	JF807759
<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>stamineum</i>			1,536	JF807731	301	JF807783
<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>micranthum</i>			1,536	JF807729	289	KT254787
<i>Veratrum stamineum</i>	1,384	KM242996	1,555	AB040184		
<i>Veratrum album</i>	1,390	D28168	1,537	JF807687	294	KJ395078
<i>Veratrum maackii</i>	1,390	AB018849	1,556	AB040183	309	JF807786
<i>Veratrum parviflorum</i>	1,365	AJ235813				
<i>Veratrum virginicum</i>	1,371	AJ276348	1,509	KM242777		

NCBI matK
配列ページへ
JUMP

click

図5 配列情報一覧 (きのこ)

sample name	location	year	morphologically	genetically identified as	Accession #		
					ITS	RPB2	
KUB 1	frozen	Yamagata	2010	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma subrhodopolum</i>	LC088033	LC148032
KUB 2	frozen	Yamagata	2010	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma</i> sp.	LC088034	LC148033
KUB 3	freeze-dried	Yamagata	2010	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma subrhodopolum</i>	LC088035	LC148034
KUB 4	freeze-dried	Shimane	2008	<i>Entoloma rhodopolum</i>	—	—	—
KUB 5	freeze-dried	Shimane	2008	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma pseudorhodopolum</i>	LC088036	LC148035
KUB 6	freeze-dried	Shimane	2008	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma pseudorhodopolum</i>	LC088037	LC148036
KUB 7	freeze-dried	Shimane	2008	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma pseudorhodopolum</i>	LC088038	LC148037
KUB 8	freeze-dried	Shimane	2008	<i>Entoloma rhodopolum</i>	—	—	—
KUB 9	freeze-dried	Shimane	2008	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma pseudorhodopolum</i>	LC088039	LC148038
KUB 10	freeze-dried	Shimane	2008	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma pseudorhodopolum</i>	LC088040	—
KUB 11	freeze-dried	Shimane	2008	<i>Entoloma rhodopolum</i>	—	—	—
KUB 101	frozen	Niigata	2011	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma pseudorhodopolum</i>	LC088041	LC148039
KUB 102	frozen	Niigata	2011	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma pseudorhodopolum</i>	LC088042	LC148040
KUB 103	frozen	Hokkaido	2011	<i>Entoloma rhodopolum</i>	—	—	—
KUB 104	frozen	Tokyo	2011	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma lacus</i>	LC088043	LC148041
KUB 105	frozen	Tokyo	2011	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma lacus</i>	LC088044	—
KUB 106	frozen	Tokyo	2011	<i>Entoloma rhodopolum</i>	<i>Entoloma lacus</i>	LC088045	LC148042

NCBI ITS
配列ページへ
JUMP

click

図6 食中毒統計情報

発生年	発生件数	摂食者総数	患者数	死者数	患者数	死者数
2000(H12)						
2001(H13)						
2002(H14)						
2010(H22)						
クサウラベニタケ類	28	125	86	0	0	0
2018(H30)						
ツキヨタケ	7	15	13	0	0	0
クサウラベニタケ	3	7	7	0	0	1
ニセショウロ属	2	4	3	0	0	1
ハイイロシメジ	1	5	3	0	0	0
カヤタケ属	1	3	3	0	0	0
テングタケ	1	2	2	0	0	0
カキシメジ	1	1	1	0	0	0
ドクカラカサタケ	1	1	1	0	0	0
タマゴタケモドキ	1	1	1	0	0	1
ニセクロハツ	1	1	1	1	0	1
不明	2	8	8	0	0	0
自然毒（キノコ）の合計	21	48	43	1		

図7 食中毒患者数の年次推移

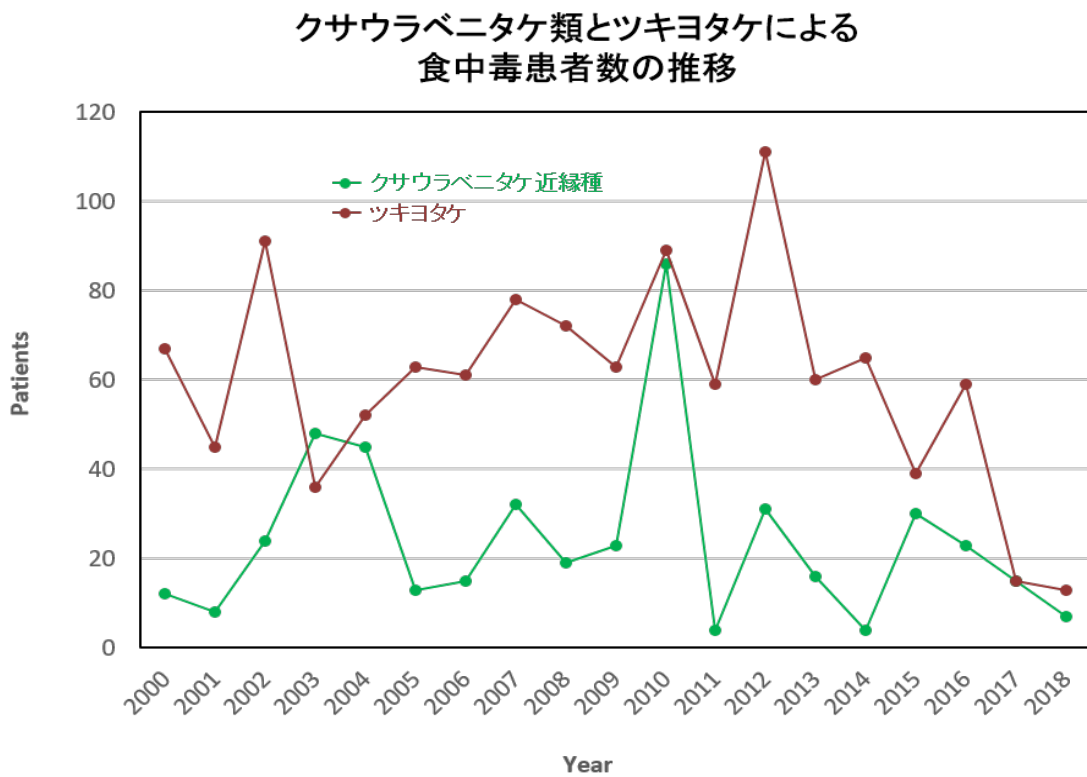
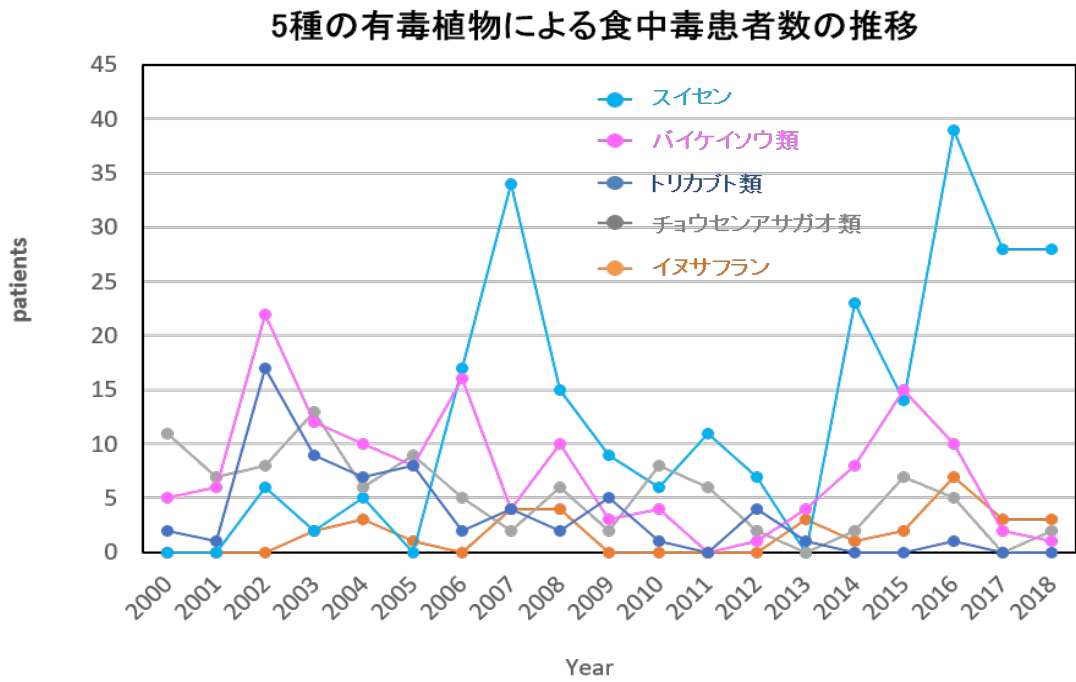
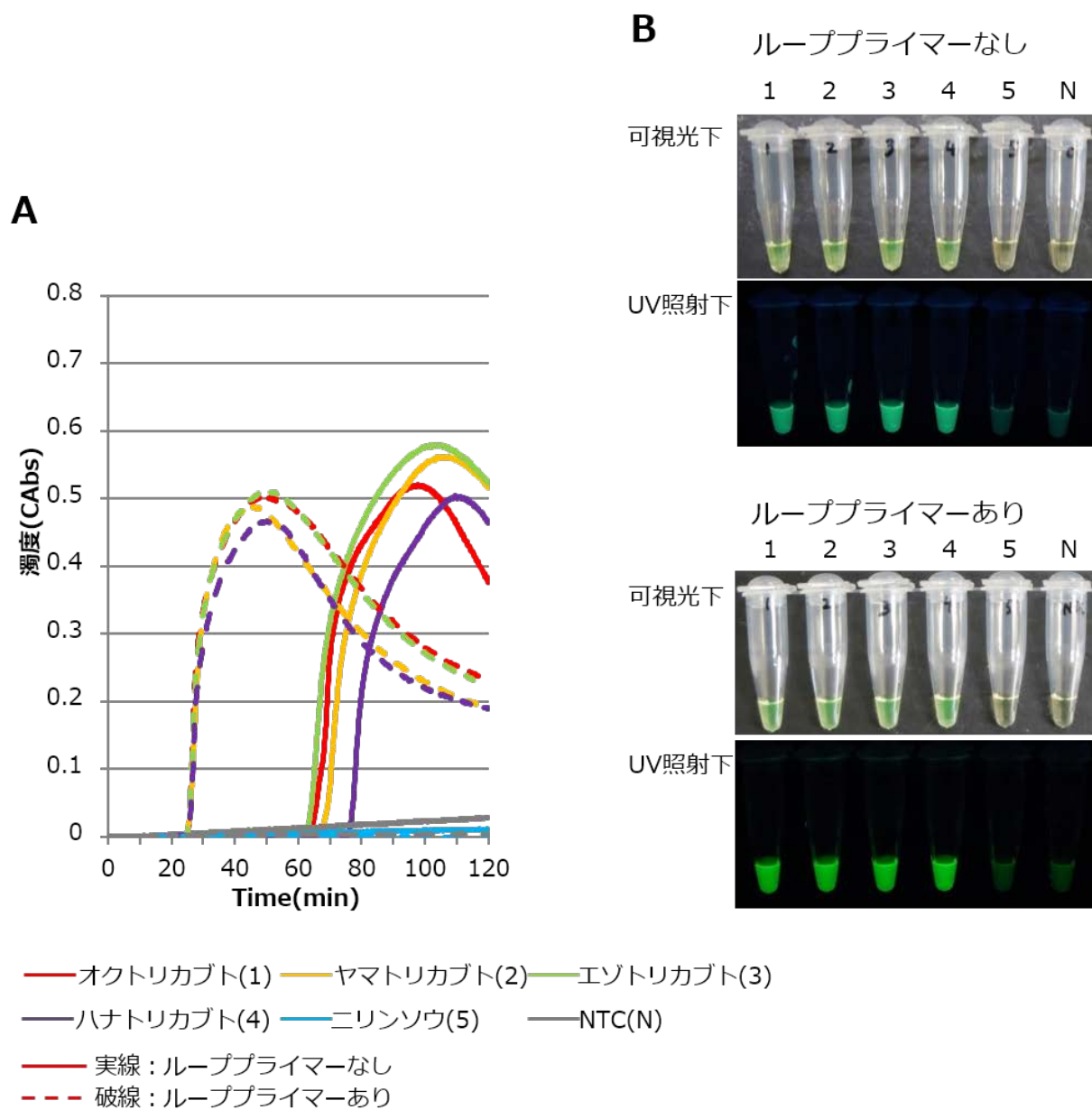
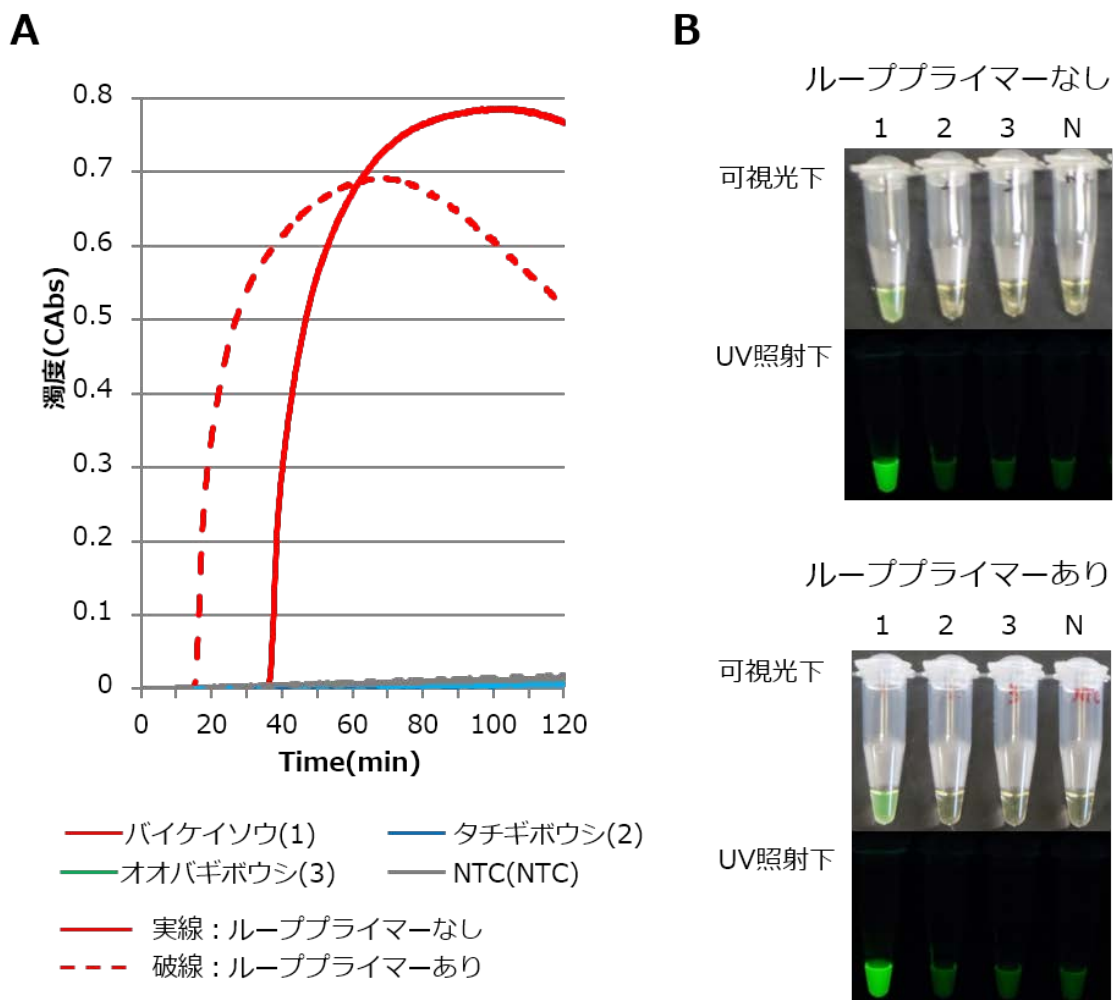


図8 トリカブト検出用プライマーを用いたLAMP法



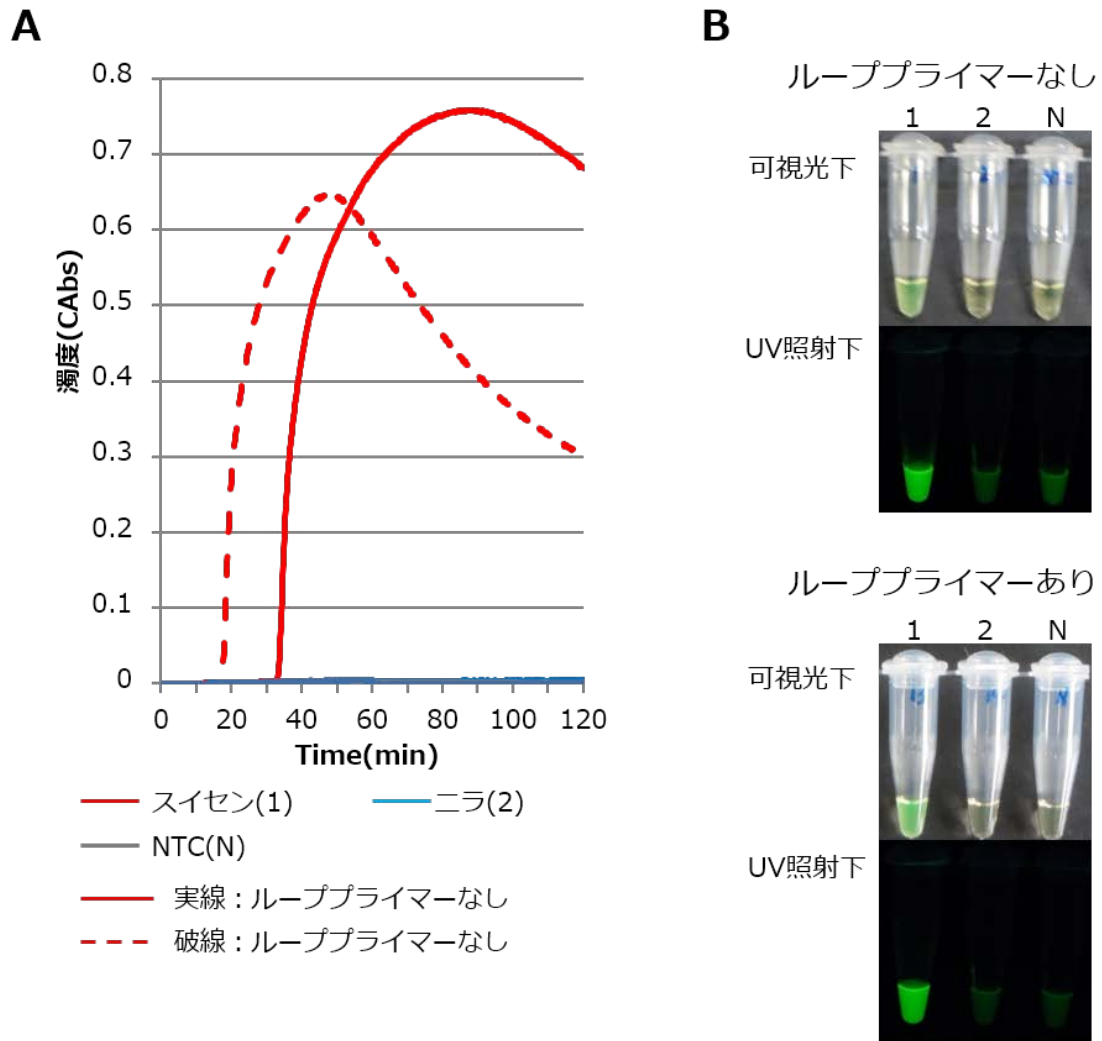
トリカブトのITS領域を標的としたプライマー(4本)およびループプライマーを加えたプライマーセット(合計6本)を用いてLAMP法を実施した。(A)濁度を指標としたLAMP法の増幅、(B)蛍光目視試薬を添加し、LAMP法を行った反応チューブの写真(可視光下/UV照射下)。

図9 バイケイソウ検出用プライマーを用いたLAMP法



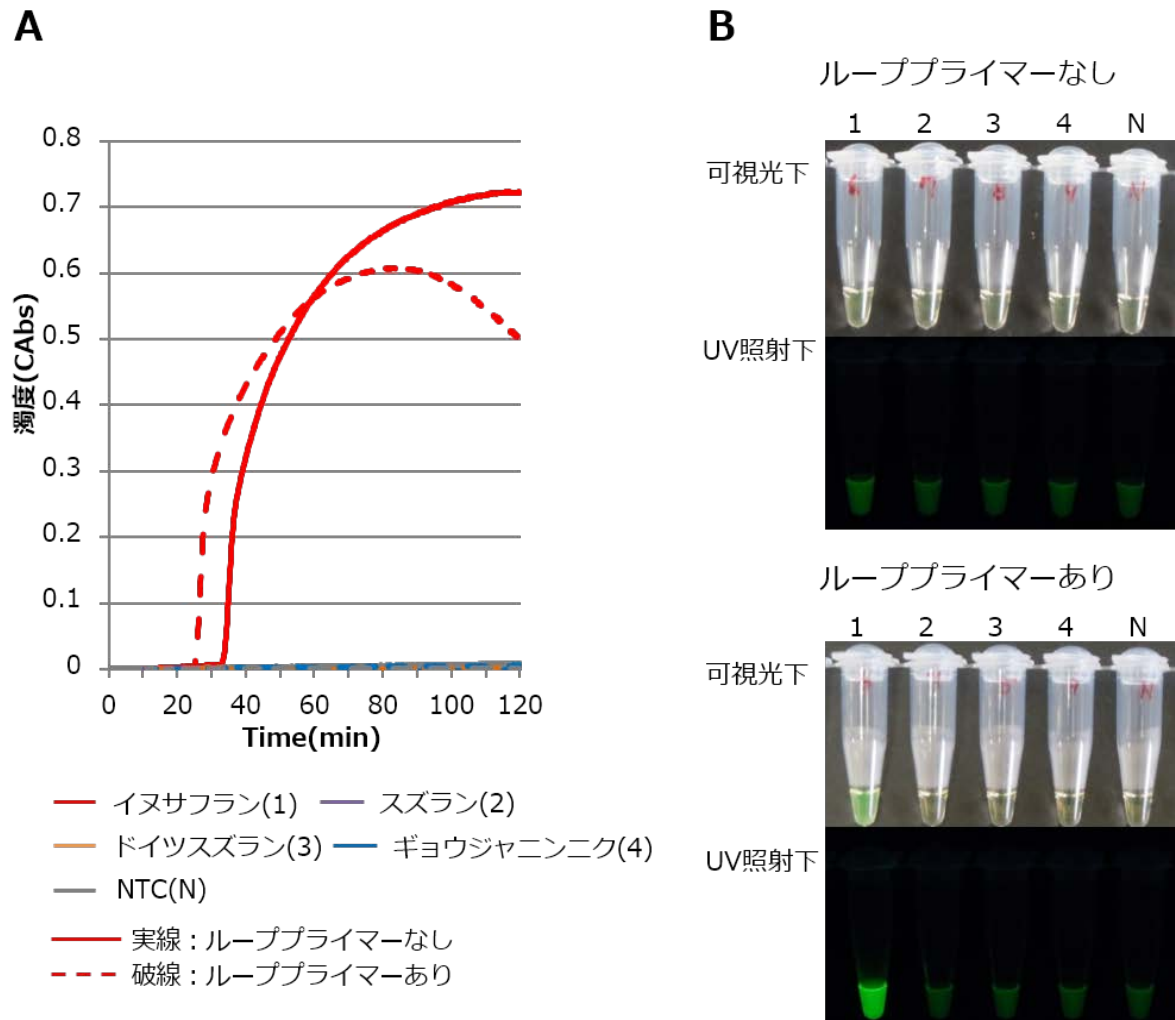
バイケイソウのITS領域を標的としたプライマー(4本)およびループプライマーを加えたプライマーセット(合計6本)を用いてLAMP法を実施した。(A)濁度を指標としたLAMP法の増幅、(B)蛍光目視試薬を添加し、LAMP法を行った反応チューブの写真(可視光下/UV照射下)。

図10 スイセン検出用プライマーを用いたLAMP法



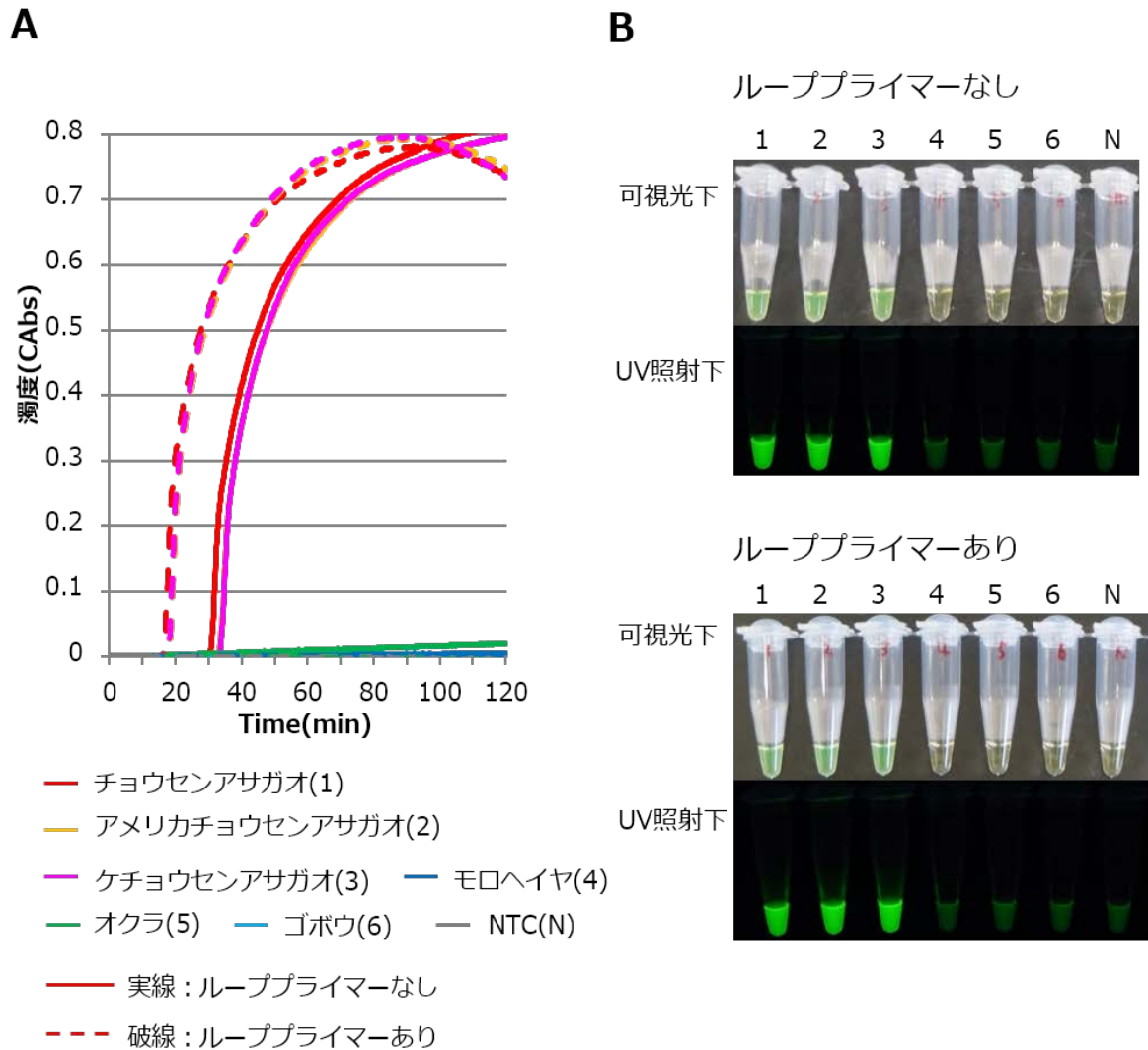
スイセンのITS領域を標的としたプライマー(4本)およびループプライマーを加えたプライマーセット(合計6本)を用いてLAMP法を実施した。(A)濁度を指標としたLAMP法の増幅、(B)蛍光目視試薬を添加し、LAMP法を行った反応チューブの写真(可視光下/UV照射下)。

図 1 1 イヌサフラン検出用プライマーを用いたLAMP法



イヌサフランのmatK領域を標的としたプライマー(4本)およびループプライマーを加えたプライマーセット(合計5本)を用いてLAMP法を実施した。(A)濁度を指標としたLAMP法の増幅、(B)蛍光目視試薬を添加し、LAMP法を行った反応チューブの写真(可視光下/UV照射下)。

図12 チョウセンアサガオ検出用プライマーを用いたLAMP法



チョウセンアサガオのmatK領域を標的としたプライマー(4本)およびループプライマーを加えたプライマーセット(合計6本)を用いてLAMP法を実施した。(A)濁度を指標としたLAMP法の増幅、(B)蛍光目視試薬を添加し、LAMP法を行った反応チューブの写真(可視光下/UV照射下)。

図 1 3 各有毒植物用LAMP法の交差性の確認

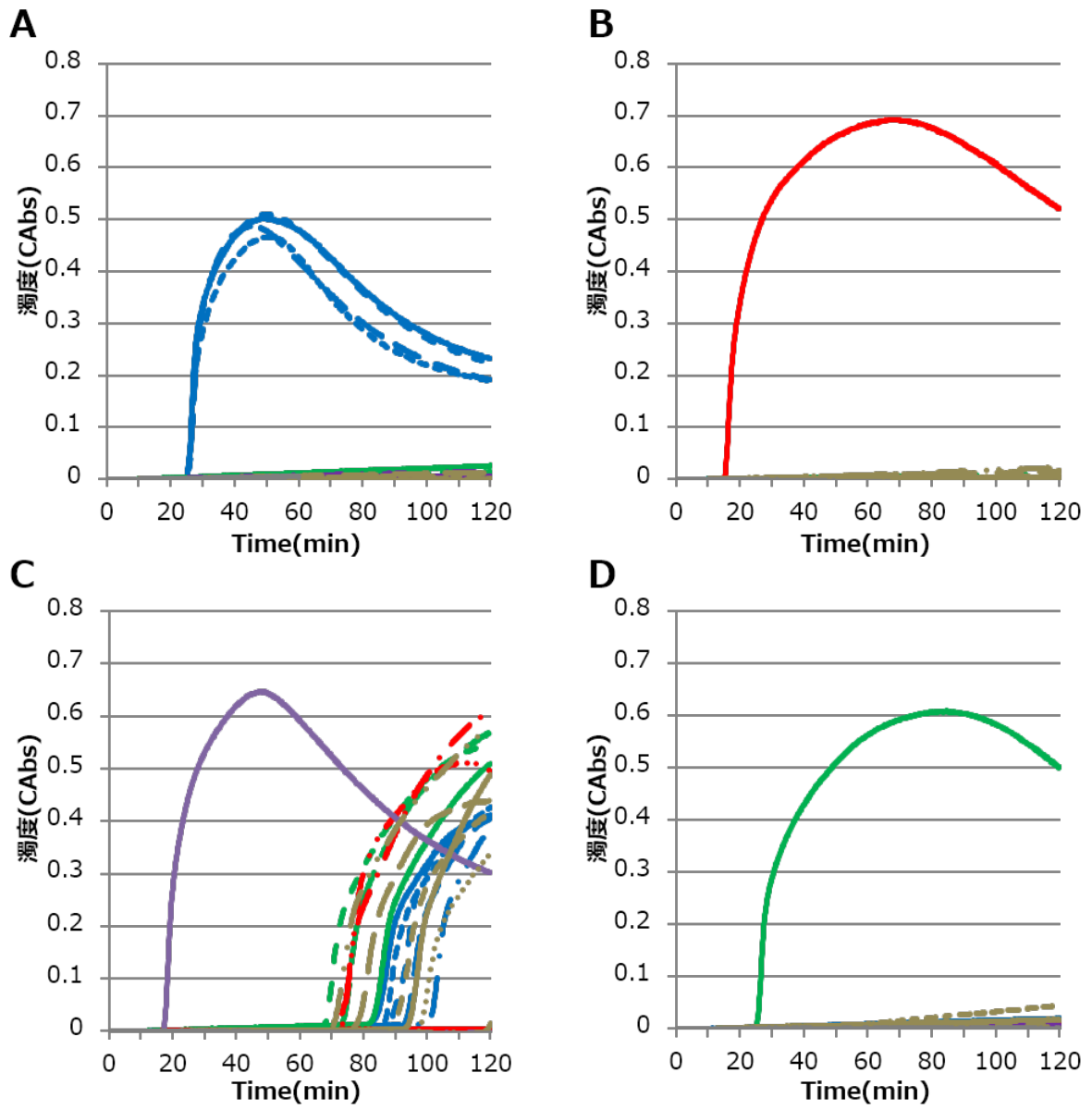
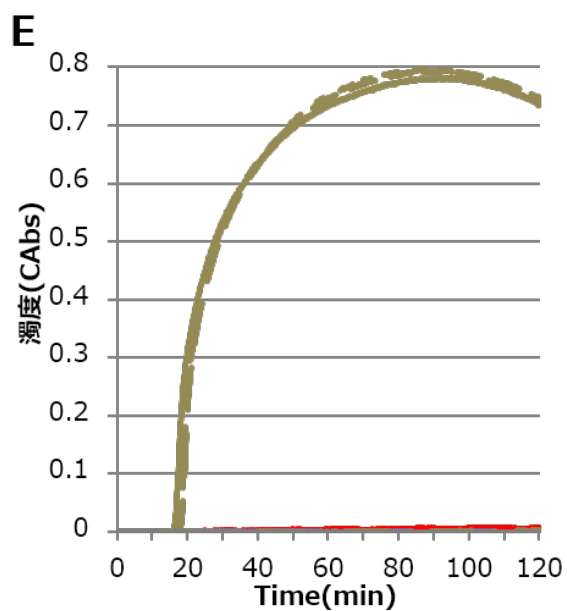


図 1 3 各有毒植物用LAMP法の交差性の確認(続き)



(A)トリカブト、(B)バイケイソウ、(C)スイセン、(D)イヌサフラン、(E)チョウセンアサガオの各種有毒植物検出用プライマーセット(ループプライマーを含む)を用いてLAMP法を実施した。

- | | | |
|------------------|-----------------|---------------|
| — オクトリカブト | — ヤマトリカブト | - - - エゾトリカブト |
| - - - ハナトリカブト | - · - ニリンソウ | |
| — イヌサフラン | — スズラン | - - - ドイツスズラン |
| - · - ギョウジャニンニク | | |
| - · - バイケイソウ | - · - タチギボウシ | - · - オオバギボウシ |
| — スイセン | - · - ニラ | |
| — チョウセンアサガオ | — アメリカチョウセンアサガオ | |
| - - - ケチョウセンアサガオ | - · - モロヘイヤ | |
| - · - オクラ | ゴボウ | — NTC |

令和元年度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

植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究

研究分担報告書

「植物性自然毒による食中毒事件に関する情報研究」

研究分担者 登田美桜 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

研究要旨

有毒植物による食中毒の発生予防と原因究明に役立つことを研究目的にしている。前年度の研究で、過去の食中毒事件について原因施設ごとの発生原因をまとめた。その結果、飲食店や旅館が原因施設として報告された事件ではプロの料理人であるにもかかわらず有毒植物と気付かずに誤って調理・提供していた。これらの事例は、見た目が酷似している場合には、普段から食材を扱っている人でも疑うことがないという状況をよく示しており、農産物直売所に納入された農産品に有毒植物が混入した事件でも同様のことが考えられた。また家庭で起きた事件では、食用にできる植物と間違い易い有毒植物があることを知らなかったという報告もあった。そのようなことから、有毒植物による食中毒の発生予防には消費者への徹底した知識普及や注意喚起が必要であることが示唆され、今後の情報提供の参考資料とするために、今年度は、国や都道府県、政令指定都市が有毒植物を原因とする食中毒についてどのような情報を提供しているのかを調査した。その結果、自治体によって提供する情報の質、量ともに大きく異なり、東日本に位置する自治体の方が充実していた。中には独自に注意喚起のためのリーフレット/パンフレットを作製している自治体もあった。それらは今後、自治体に関係なく広く利用できるリーフレット/パンフレットを作成する際に参考となる。さらに、有毒植物が原因と疑われる食中毒発生時の迅速な原因究明につなげるため、食中毒の原因特定の前線に位置づけられる全国地研の研究者等の意見をもとに原因究明を行う上での現状と問題点について調査し、改善のための方策の検討を開始した。

研究協力者

畝山智香子 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

與那覇ひとみ 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

A. 研究目的

これまでの研究において、植物性自然毒による食中毒事件のうち有毒植物

(注：公式な分類名は「高等植物」であ

るが、一般的に理解しやすいよう本報告では「有毒植物」と呼ぶ)」を原因とする事件の発生件数に増加の傾向が見られた。さらに近年は死亡者の発生が毎年報

告され食品安全行政における問題の一つになっていることから、その発生予防と発生時の原因究明につながる研究が必要とされており、本研究課題の今年度研究では主に次の2つの内容に取り組むことにした。

(1) 情報提供の状況について

本研究課題の平成30年度研究において原因施設ごとの発生原因をまとめた。その結果、飲食店や旅館が原因施設として報告された事件では、プロの料理人であるにもかかわらず有毒植物と気付かずに誤って調理・提供していた。これらの事例は、見た目が酷似している場合には、普段から食材を扱っている人でも疑うことがないという状況をよく示している。農産物直売所に納入される農産品に有毒植物が混入した事件についても同様のことが考えられた。その他、家庭で起きた事件では、山菜や、家庭菜園等で栽培する食用にできる植物と間違い易い有毒植物があることを知らなかったという報告もあった。そのため、有毒植物による食中毒の発生予防には消費者への徹底的な知識普及や注意喚起が必要であることが示唆された。

さらに、以前の研究（平成22年度厚生労働科学研究「食品中の自然毒のリスク管理に関する研究」分担研究）で実施した都道府県等の食品衛生担当部局（計136カ所）を対象にしたアンケート調査の結果において、多くの自治体が、自然毒による食中毒については注意喚起及びその危険性の周知がリスク低減に有効であると回答している。その

上、国への要望として自由にプリント・配付可能な資料の作成と公開があげられる回答が多かった。

このような状況から、要望のあった資料作成と公開を目標に、まず今年度は実態把握として、国や都道府県、政令指定都市（以下、「全国自治体」と書いた場合は「都道府県及び政令指定都市」のことを示す）が有毒植物を原因とする食中毒についてどのような情報を一般向けに提供しているのかを調査することにした。特に近年は情報提供の手段としてウェブサイトを利用することが多く、リーフレット/パンフレットや広報誌、季刊誌などの配布資料についても各自治体のウェブサイトでPDFファイルをダウンロード可能にしていることから、国と全国自治体の各々の関連ウェブサイトで公開されている情報を対象に調査することにした。

(2) 情報共有ネットワークについて

有毒植物を原因とする食中毒は、毎年全国で散発的に発生し、原因となる植物の種類が多種多様であることが一つの特徴である。食中毒の発生時に有毒植物の摂取が疑われると、当該地域の地方衛生研究所（以下、地研）に中毒残品が送付され、化学分析や遺伝子解析によって植物種及び毒成分の同定が行われる。しかし、地研によっては、さまざまな障害により、緊急対応が求められる状況であっても原因を同定するのに時間がかかってしまうことがある。そのような背景から、食中毒発生時の迅速な原因特定につ

なげるため、現状と問題点について関係者の意見をもとに調査し、改善のための方策について検討することにした。

B. 研究方法

(1) 情報提供の状況について

国（厚生労働省、農林水産省、消費者庁、内閣府食品安全委員会）、都道府県及び政令指定都市のウェブサイトを対象に次の項目について調査した。

- ① 食中毒の原因となる有毒植物に特化した注意喚起等のウェブサイトの有無
- ② 食中毒の原因となる有毒植物に関するリーフレット/パンフレットの有無
- ③ 公開している情報内容

（食中毒の発生予防のための知識普及として提供すると良いと考えられた内容を選択）

- 植物の種類
- 写真
- 植物の特徴
- 誤認しやすい植物
- 見分け方
- 発生しやすい季節
- 中毒症状
- 食中毒の事例

(2) 情報共有ネットワークについて

食中毒の原因特定の最前線に位置づけられる全国地研の研究者を対象にして、原因特定を行う上での問題点や現状について聞き取りを行った。さらに、それをもとに原因特定に役立つ情報を共有するためのネットワークの構造案をまとめ、さらに関係者の意見を聞くこと

にした。

C. D. 研究結果及び考察

(1) 情報提供の状況について

食中毒の原因となる有毒植物について、国及び全国自治体による消費者向け情報の提供状況について調査し、その結果を解析した。

最初に、関係省庁の有毒植物に関するウェブサイト情報を表1にまとめた。

厚生労働省

厚生労働省では、配付資料として、有毒植物への注意を呼びかけるリーフレット、高齢者で中毒の発生が多いことから高齢者向けに注意を呼びかけるリーフレットを公表している。さらに、23種の有毒植物について、各々の特性や有毒成分についてまとめたリスクプロファイルを公開している。リスクプロファイルは簡易版と詳細版を掲載している。

全国自治体のうち有毒植物への注意喚起に特化したウェブサイトを公表しているところでは、その多くが厚生労働省のリーフレット及びリスクプロファイルにリンクを貼っていた。これら2つのリーフレットはA4版2枚（両面印刷で1枚となる）に構成され、配付しやすく最低限のポイントのみ記してある。ただ、食用にできる植物と誤認しやすい有毒植物や過去の食中毒発生状況は示されているものの、食用にできる植物との見分け方や有毒成分についての説明はない。詳細な知識はリス

クプロファイルから得ることは可能であるが、その他に配布版としても、現行のリーフレットよりは詳細で、ページ数は広く配付可能な程度に抑えたパンフレットの作成が望まれる。

農林水産省

農林水産省では、注意喚起と各種情報（例：厚生労働省、全国自治体や衛生研究所、大学などの関連サイト）へのリンクをまとめたウェブサイトとともに、野菜や山菜（ニラ、ギョウジャニンニク、ギボウシ類、フキ/ふきのとう）とそれらに似た有毒植物について説明したリーフレットを公開している。リーフレットはA4版2枚に構成され、野菜や山菜の特徴と、それらと間違えやすい有毒植物3~4種類の簡単な特徴をまとめている。厚生労働省のリーフレットやリスクプロファイルでは有毒植物別に紹介されているのに対し、農林水産省は野菜や山菜別にまとめ、それらと間違えやすい有毒植物があることを紹介しており、見分け方も説明している点が特徴である。この他、学校や家庭等の菜園でジャガイモを自ら栽培して食べる場合に食中毒を起こさないようにするためのリーフレットも公開している。

消費者庁

食品安全に関する情報の一つとして「自然毒」による食中毒への注意喚起のウェブサイトを開示している。ただし、各有毒植物についての説明は厚生労働省の自然毒のリスクプロファイルにリンクされていた。この他、独自に

実施した、消費者2,000人を対象にした意識・行動のアンケート調査の結果をもとに食中毒発生予防のためのポイントをまとめた資料（A4版7枚）を公表している。

内閣府食品安全委員会

有毒植物に特化した情報をまとめて提供する特別なウェブサイトはないが、ヒョウタンと白インゲン豆については食中毒が発生した年に各々の簡単な特徴と厚生労働省のリスクプロファイルへのリンクを貼ったウェブサイトを作成していた。その他、外部委託の調査事業である平成22年度食品安全確保総合調査「輸入食品等の摂取等による健康影響に係る緊急時に対応するために実施する各種ハザード（微生物・ウイルスを除く。）に関する文献調査」の一環で有毒植物10種類のハザード概要シート（案）がまとめられており、その報告書が公開されている。

全国自治体

食中毒の原因となる有毒植物について、全国自治体ウェブサイトにおける情報の提供状況（リーフレット/パンフレットでの掲載内容は除く）を表2-4にまとめた。

47都道府県のうち37カ所において、また20政令指定都市のうち19カ所において、有毒植物に関する知識普及や食中毒の注意喚起のための特別サイトが開示されていた（表2）。特別サイトを開設していなかった都道府県は西日本に集中しており、これは有毒植

物による食中毒の発生が東日本で多く、西日本では少ないという傾向の影響と考えられる。

情報が掲載されている有毒植物の種類は平均すると都道府県では4~5種類であり最も多かったのは東京都の31種類、政令指定都市では平均すると3種類で最多は札幌市の9種類であった

(表2)。掲載件数が多かった有毒植物は都道府県と政令指定都市ともにスイセン及びスノーフレック、バイケイソウ、トリカブト、チョウセンアサガオ、イヌサフランで、近年の食中毒発生件数の上位を占める種類を反映しており、ここ数年になって発生件数が急増しているスイセン及びスノーフレックの掲載が都道府県と政令指定都市ともに最多であった(表3)。さらに表には記さなかったが、都道府県では先の5種に次いで掲載が多かったのはジャガイモ、ドクゼリ、クワズイモ及びハシドリコロであった。ジャガイモについては、様々な有毒植物をまとめて紹介したウェブサイトとは別に、ジャガイモによる食中毒の注意喚起に特化したウェブサイトを公表している自治体が多かった。

次に、都道府県及び政令指定都市のウェブサイト上で提供している情報内容を表4にまとめた。有毒植物とそれと誤認しやすい食用植物(野菜、山菜)については50%以上の都道府県と政令指定都市が掲載しており、その他に掲載が多かったのは写真、中毒症状、食中毒事例であった。ただし写真

の掲載は、有毒植物とそれと誤認しやすい食用植物の両方を掲載している場合と、有毒植物しか掲載していない場合があった。一方、食用と有毒な植物の見分け方、有毒植物別の食中毒が発生しやすい季節、有毒成分について説明しているところは少なかった。予防につながる情報提供にするためには、より多くの自治体が写真とともに見分け方についても掲載することが望ましい。食中毒が発生しやすい季節については、食用植物と有毒植物を誤認しやすいのが新芽や若葉であることから、一般的には山菜採りシーズンの「春」とされることが多い。しかしながら、有毒植物の種類によってはそれ以外の季節に食中毒が発生しているケースもあり、一概に山菜採りの季節だけ注意すれば良いというわけではない(例:チョウセンアサガオの場合は蕾、葉、根とさまざまな部位が誤認され、注意すべき季節は部位によって異なる)。フランス食品・環境・労働衛生安全庁(ANSES)がフランス中毒管理センター(French poison control centres)の情報をもとにまとめた報告書では、季節ごとに誤認しやすい有毒植物と食用植物をまとめており、季節に応じて重点的に注意喚起できるような紹介をしている。これを参考に我が国の実態を反映させて、注意すべき有毒植物の種類を季節別にまとめた資料を作成すると有用と考えられた。

次に、リーフレット/パンフレットの発行について、都道府県の状況を表5、

政令指定都市の状況を表 6 にまとめた。

都道府県の中では 9 カ所でリーフレット/パンフレットの PDF を公表しており、季刊誌として発行されているものもあった。その中で東京都福祉保健局/東京都健康安全研究センターが作成した「身近にある有毒植物」に掲載されている植物の種類が最も多く、また掲載されている内容も充実していた。一方、政令指定都市では 4 都市でリーフレット/パンフレットを発行し、その中では札幌市と北海道が協力して発行している「(庭や野山の) 毒草ハンドブック」が植物の種類及び内容ともに充実していた。全国自治体が独自に発行しているリーフレット/パンフレットについては、今後作成する際に、掲載されている内容、量、全体の構成など多くのことを参考にしたいと考えている。

(2) 情報共有ネットワークについて

有毒植物が原因として疑われる食中毒の原因特定にあたり全国地研の現状と抱えている問題について、特に化学分析に関係することの聞き取りを行った。その結果、原因特定に時間がかかる理由として、食中毒発生時に分析対象の標準物質を所持していない、分析した経験がない、あるいは目的の分析法の知識を持ち合わせていない、という点が主な理由として挙げられた。これは有毒植物による食中毒が、全国で散発的に発生し、原因となる植物の種類も多岐にわたるといった特徴が影響している。標

準物質を揃えたくても、対象となる標準物質の種類が多すぎるため、そして発生が散発的すぎて標準物質を準備しておいても使用しないまま長期間保存することにより品質が劣化する可能性や、全く使用しない可能性もあり、予算上の問題から購入できない地研も少なくない。また当該地域で過去に経験したことの無い有毒植物による食中毒の場合には、新たに分析法を調べるところから作業を開始しなければならず、その作業に時間を要することもある。しかも近年は全国自治体における人事異動が以前よりも頻繁になり、長年に渡り食中毒の原因同定の経験を積んだ人材が地研に在席し続けることも難しくなっている。そのような場合の対処法として、地研の地域ブロックの中には協定を結びその地域ブロック内で協力できる体制を整えているところもあるが、地域ブロックを超えての相談が手続き上難しいこともあり、最終的には個人的なつながりを頼りにしていることが多いのが現状である。

そのような状況を受けて、現在、何処かに中心となる拠点をつくり、そこに必要とされる関係情報を集約して全国の地研をつなぐネットワークのシステム構築を考案中であり、その運営方法についても検討している。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 南谷臣昭、登田美桜、大城直雅：質量分析による自然毒食中毒の理解 課題と展望, *質量分析*, 67(2), 71-77, 2019

2. 学会発表

- 1) 谷口賢、南谷臣昭、友澤潤子、登田美桜：植物性自然毒の多成分同時分析法の開発：高等植物、令和元年度地方衛生研究所全国協議会、広島市、2019年12月
- 2) 友澤潤子、谷口賢、南谷臣昭、登田美桜：植物性自然毒の多成分同時分析法の開発：キノコ、令和元年度地方衛生研究所全国協議会、広島市、2019年12月

3. 行政関係者向け説明会

- 1) 登田美桜：「自然毒に関する最近の話題」令和元年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会、2019年11月、地方衛生研究所全国協議会近畿支部
- 2) 登田美桜：「国内における最近の自然毒による食中毒関連情報について」令和元年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸ブロック会議（2019.12）
- 3) 登田美桜、「国内における有毒植物による食中毒について」令和元年度岐阜県食品衛生監視員研修会（2020.1）
- 4) 登田美桜、「食中毒の原因となる自然毒について」令和元年度地方衛生研究所全国協議会衛生化学分野研修会（2020.2）

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1. 関係省庁による有毒植物に関する注意喚起/情報提供の状況

省庁	HP(タイトル)	HP	リーフレット/パンフレットの有無	リーフレット/パンフレット(タイトル)	リーフレット/パンフレット(PDF)	写真	植物の特徴	誤認しやすい植物	見分け方	発生しやすい季節	中毒症状	有毒成分	食中毒の事例	備考	植物の掲載数	
厚生労働省	有毒植物による食中毒に注意しましょう	https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/vudoku/index.html	有	有毒植物に要注意	https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000505251.pdf	○		○			○				4	
			有	おじいちゃん、おばあちゃん、食べないで！ それ、有毒植物ですよ！！	https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000505256.pdf	○		○			○				7	
	自然毒のリスクプロファイル	https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/poison/index.html				○	○	○		○		○	○	植物別に「概要版」と「詳細版」を掲載	23	
農林水産省	知らない野草、山菜は採らない、食べない！	https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/rinsanbutsu/naturaltoxins.html												注意喚起とともに、様々なウェブサイトへのリンク集を掲載	—	
	野菜・山菜とそれに似た有毒植物	http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/rinsanbutsu/leaflet.html	有	野菜・山菜とそれに似た有毒植物No.01 ニラ	http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/rinsanbutsu/pdf/01nira.pdf	○	○	○	○	○		○			4	
			有	野菜・山菜とそれに似た有毒植物No.02 ギョウジャニンニク	http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/rinsanbutsu/pdf/02gyouja.pdf	○	○	○	○	○			○			3
			有	野菜・山菜とそれに似た有毒植物No.03 ギボウシ類	http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/rinsanbutsu/pdf/03_giboushi.pdf	○	○	○	○	○			○			3
			有	野菜・山菜とそれに似た有毒植物No.04 フキ	https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/rinsanbutsu/attach/pdf/leaflet-2.pdf	○	○	○	○	○	○		○			2
知識があればこわくない！天然毒素	http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/foodpoisoning/naturaltoxin.html	有	ジャガイモによる食中毒を予防するためにできること	http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/foodpoisoning/naturaltoxin/potato.html	○	○		○		○			学校や家庭等の菜園でジャガイモ栽培を行う人向け	—		
消費者庁	自然毒をもつキノコや植物にはどのようなものがあるの？	https://www.caa.go.jp/policies/policy/consumer_safety/food_safety/food_safety_portal/natural_poison/												植物別に厚労省「自然毒のリスクプロファイル」にリンク	23	
			有	家庭菜園等における有毒植物による食中毒に御注意ください(消費者アンケート調査)	https://www.caa.go.jp/policies/policy/consumer_safety/release/pdf/160413kouhyou_1.pdf	○						○		—		
内閣府 食品安全委員会	※平成22年度食品安全確保総合調査「輸入食品等の摂取等による健康影響に係る緊急時に対応するために実施する各種ハザード(微生物・ウイルスを除く。)に関する文献調査報告書」(株式会社三菱総合研究所作成)の内容をハザード別の情報に掲載。 高等植物10種について:スイセン、バイケイソウ、トリカブト類、チョウセンアサガオ、クワズイモ、イヌサフラン、ジギタリス、ジャガイモ、ヨウシャヤマゴボウ、アジサイ	https://www.fsc.go.jp/fscjis/survev/shgw/cho20110080001												外部委託報告書	10	

表2. 都道府県及び政令指定都市による有毒植物に関する注意喚起/情報提供の状況

	47都道府県のうち	20政令指定都市のうち
有毒植物に関する特別サイトあり	37	19
そのうち厚労へのリンクあり	35	17
掲載有毒植物の数 (リーフレット/パンフレット除く)	平均4-5種類 (最大31種類)	平均3種類 (最大9種類)

表3. 都道府県及び政令指定都市が注意喚起/情報提供していることの多い有毒植物
(リーフレット/パンフレット除く)

掲載数が多い有毒植物(上位5つ)	37都道府県*のうち(件)	19政令指定都市*のうち(件)
スイセン及びスノーフレーク	18	11
バイケイソウ	17	4
トリカブト	13	8
チョウセンアサガオ	12	4
イヌサフラン(コルチカム)	10	8
*表2で有毒植物に関する特別サイトを開設していた自治体		

表4. 都道府県及び政令指定都市が注意喚起/情報提供に含めている内容
(リーフレット/パンフレット除く)

掲載内容(リーフレット/パンフレット除く)	37都道府県*のうち	19政令指定都市*のうち
写真	46%	32%
植物の特徴	30%	11%
誤認しやすい植物(食用と有毒なもの)	51%	53%
見分け方	19%	11%
食中毒が発生しやすい季節(有毒植物別の)	0%	0%
中毒症状	41%	32%
有毒成分	27%	5%
食中毒の事例	30%	26%
*表2で有毒植物に関する特別サイトを開設していた自治体		

表5. 都道府県が発行しているリーフレット/パンフレットについて

都道府県	リーフレット/パンフレット(タイトル)	リーフレット/パンフレットのPDF	写真	植物の特徴	誤認しやすい植物	見分け方	発生しやすい季節	中毒症状	有毒成分	食中毒の事例	その他	植物の掲載数
北海道	毒草ハンドブック	① http://www.pref.hokkaido.lg.jp/hf/kse/H30_dokusou_handbook_2.pdf ② http://www.pref.hokkaido.lg.jp/hf/kse/H30_dokusou_handbook_3.pdf ③ http://www.pref.hokkaido.lg.jp/hf/kse/H30_dokusou_handbook_4.pdf ④ http://www.pref.hokkaido.lg.jp/hf/kse/H30_dokusou_handbook_6.pdf ⑤ http://www.pref.hokkaido.lg.jp/hf/kse/H30_dokusou_handbook_5.pdf	○	○	○	○		○	○	○	札幌市と協力して作成	12
宮城県	毒草を食べないで！	https://www.pref.miyagi.jp/uploaded/attachment/603833.pdf	○	○	○	○		○			リーフレット: 釜蓋保健所黒川支所	3
山形県	毒に注意 山菜とキノコ	http://www.eiken.yamagata.yamagata.jp/rikagaku/pdf/cautions_of_poison_2015.pdf	○	○	○				○		パンフレット: 山形県衛生研究所 http://www.eiken.yamagata.yamagata.jp/rikagaku/rikagaku_gosyoku.html	8
群馬県	季刊誌 ぐんま食の安全情報 Vol.144 2018年5月号	https://www.pref.gunma.jp/contents/100063882.pdf	○		○			○			季刊誌: ぐんま食の安全情報に他の情報がある https://www.pref.gunma.jp/05/d6200163.html	5
埼玉県	「つけない」「ふやさない」「やっつける」食中毒 追放計画 2019	https://www.pref.saitama.lg.jp/a0708/kensyu-koza-panf/panf/documents/tsuiho2019.pdf	○		○			○			食中毒予防パンフレットの一部分として	3
	季刊誌 コバトンの安心情報 ①令和2年3月号(ジャガイモ) ②令和2年3月号(有毒植物)	① https://www.pref.saitama.lg.jp/a0708/kensyu-koza-panf/ansin-jocho/index.html ② https://www.pref.saitama.lg.jp/a0708/kensyu-koza-panf/ansin-jocho/documents/anshin2-4.pdf	○	○		○			○		ポスター: コバトンの安心情報 https://www.pref.saitama.lg.jp/a0708/kensyu-koza-panf/ansin-jocho/index.html	3
千葉県	季刊誌 食の安心安全レポート Vol.19 2011年3月発行	https://www.pref.chiba.lg.jp/eishi/documents/no19.pdf	○		○			○	○		パンフレット: 食の安全・安心レポート https://www.pref.chiba.lg.jp/eishi/anzenn-report.html	4
東京都 (東京都福祉保健局)	身近にある有毒植物	http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/pamphlet2/files/dokushoku29.pdf	○	○	○	○	○	○	○	○		32
	家庭園芸、ちょっとした注意で楽しく安全に	http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/pamphlet2/files/28kateiengi.pdf	○	○	○	○		○		○		3
長野県	シーズン注意喚起 有毒植物の誤食に注意しましょう	https://www.pref.nagano.lg.jp/shokusei/kenko/shokuhin/shokuchudoku/documents/yudoku1.pdf	○		○			○				6
岐阜県	有毒植物に注意しましょう！！	https://www.pref.gifu.lg.jp/kurashi/shoku/shokuhin/11222/doku-shokubutu.data/yuudokusyokubutu.pdf	○		○			○		○		4

表6. 政令指定都市が発行しているリーフレット/パンフレットについて

政令指定都市	リーフレット/パンフレット(タイトル)	リーフレット/パンフレットのPDF	写真	植物の特徴	誤認しやすい植物	見分け方	発生しやすい季節	中毒症状	有毒成分	食中毒の事例	その他	植物の掲載数
札幌市	生活に身近な植物 有毒植物による食中毒	https://www.city.sapporo.jp/hokenjo/shoku/pamph/kitchen_mail/documents/no45_p01_p02.pdf	○					○		○		7
	庭や野山の毒草ハンドブック	https://www.city.sapporo.jp/hokenjo/shoku/pamph/index.html	○	○	○	○		○	○	○	北海道と協力して作成	13
仙台市	表面 有毒植物による食中毒を防ぎましょう	https://www.city.sendai.jp/sekatsuese-shokuhin/kurashi/anzen/ese/shokuchudoku/documents/h28ver_yudokusyoku_omote.pdf	○		○			○				8
	中面 まちがえやすい有毒植物	https://www.city.sendai.jp/sekatsuese-shokuhin/kurashi/anzen/ese/shokuchudoku/documents/h28ver_yudokusvoku_ura2.pdf	○	○	○	○		○		○		2
神戸市	有毒な動植物の誤食に注意してください！	https://www.city.kobe.lg.jp/documents/2999/h30gogyoku.pdf			○					○		3
広島市	有毒植物に注意！	https://www.city.hiroshima.lg.jp/uploaded/attachments/26825.pdf									総合的な注意喚起	—

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
近藤一成、坂田 こずえ、加藤怜 子、菅野陽平、 武内伸治、佐藤 正幸	有毒クサウラベニタケ 近縁種のリアルタイムP CR法による同定	食品衛生学雑誌	60	144-150	2019
Narushima, J., Kimata, S., Soga, K., Sugano, Y., Kishine, M., Takabatake, R., Mano, J., Kitta, K., Kanamaru, S., Shirakawa, N., Kondo, K., Nakamura, K	Rapid DNA template preparation directly fr om a rice sample wit hout purification for l oop-mediated isotherm al amplification (LAM P) of rice genes.	Biosci. Biotechno l. Biochem.	84	670-677	2020

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴

次の職員の令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全情報部 第三室長
(氏名・フリガナ) 登田 美桜 (トダ ミオウ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品安全衛生研究機構
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 奥田晴彦

次の職員の令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 生化学部 部長
 (氏名・フリガナ) 近藤 一成 (コンドウ カズナリ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 岐阜県保健環境研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 細井 紀也



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 令和元年度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）
2. 研究課題名 植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究（H30-食品一般-008）
3. 研究者名 （所属部局・職名）岐阜県保健環境研究所 食品安全検査センター・専門研究員
（氏名・フリガナ）南谷 臣昭・ミナタニ トミアキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。