

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

食品中の自然毒等のリスク管理のための研究

令和7年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 敏之

令和8（2026）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

食品中の自然毒等のリスク管理のための研究 -----	1
鈴木敏之	

II. 分担研究報告

1. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握 -----	30
高橋 洋・辰野竜平・渡邊龍一・沼野 聡・土方悠希・内田 肇・小澤真由 ・松嶋良次・鈴木敏之・上間 匡	
2. 国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立 -----	35
沼野 聡・渡邊龍一・内田 肇・小澤真由・松嶋良次・鈴木敏之・長澤和夫 ・足立真佐雄・土方悠希	
3. 植物性自然毒の食中毒の発生動向の分析による効果的な防止策の提案 -----	41
志田（齊藤）静夏	
4. 汎用性の高い植物性自然毒（きのこ）の分析法・同定法の確立及び 自然毒リスクプロファイルの更新、消費者に対する効果的な情報提供方法の 提案 -----	56
柴田識人・南谷臣昭	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	96
---------------------------	----

食品中の自然毒等のリスク管理のための研究

研究代表者 鈴木 敏之 北里大学 教授

研究要旨：

「雑種ふぐの発生状況及び流通状況の把握」

海洋生物毒による食中毒は毎年発生し、死亡例もある。温暖化に伴う漁場変化や雑種ふぐの増加、さらにしらす加工品へのふぐ仔稚魚混入が懸念されている。本研究では、天然ふぐの水揚げ地で雑種ふぐの混獲率と流通状況を調査し、しらす混入ふぐの種判別と毒性試験を行った。調査の結果、雑種混獲率は地域により 0～14.77%であった。しらす混入ふぐ 7,025 個体の解析では 10 種が確認され、約 96%がシロサバフグであった。シロサバフグ仔稚魚 332 検体について TTX 分析を行い、一部はマウス毒性試験も実施し、食品衛生上のリスク評価に資する基礎データを得た。

「麻痺性貝毒の機器分析法の確立」

LC-MS/MS による麻痺性貝毒分析の進展により、二枚貝に M-toxin 類が含まれることが判明している。公定法を機器分析へ移行するには、M-toxin 類の構造・毒性解明と標準品確保が必要である。今年度は、M1、M3、M5-HA、M9、M10 の精製、M2・M4 の不斉合成、M8 の誘導合成、qNMR による濃度決定、Na⁺チャネル阻害活性評価、毒化貝の M-toxin 含有量調査を実施した。結果として、一部 M-toxin に弱い阻害活性が確認され、含有量や蓄積部位が貝種・時期で異なることが明らかとなった。また、近年二枚貝から微量の TTX が検出されているため、麻痺性貝毒分析に TTX を含める必要性も検討している。北日本のホタテおよび西日本のマガキの調査では、麻痺性貝毒と TTX に相関はなく、異なる毒化原因生物の存在が示唆された。メタバーコーディング解析では微細藻類や動物プランクトンが検出されたが、既報の TTX 保有生物は確認されなかった。

「植物性自然毒（きのこ含む）の食中毒防止策」

海外で汚染事例が多いピロリジジンアルカロイド（PAs）について、汚染実態調査に向けた分析法を開発した。超臨界流体クロマトグラフィーを用い、3-ヒドロキシフェニルカラムとギ酸アンモニウム含有メタノールを用いた条件で 40 種の PAs を良好に分離できた。性能評価でも良好な直線性・精度が得られ、ハーブ・スパイス中の PAs 調査に有用であることが示された。予備調査では国内流通品からも比較的高濃度の PAs が検出され、広範な調査の必要性が示唆された。

「植物性自然毒（きのこ）の分析法・同定法の確立」

毒きのこによる食中毒は毎年発生し、迅速な原因究明が重要である。既存の一斉分析法を改良し、15 機関による室間共同試験でムスカリン、イボテン酸、ムシモールの正確な同定と良好な再現性を確認した。遺伝子検査では、ドクツルタケ特異的リアルタイム PCR 法の性能評価を行い、さらにイボテンタケの ITS 解析とドラフトゲノム構築を実施した。

「自然毒リスクプロファイルの更新」

新知見を反映した更新作業を進めており、消費者にとってより有用な資料となることが期待される。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び

所属研究機関における職名

松嶋 良次・水産技術研究所・主幹研究員
渡邊 龍一・水産技術研究所・グループ長
内田 肇・水産技術研究所・主任研究員
小澤 眞由・水産技術研究所・研究員
沼野 聡・水産技術研究所・任期付研究員
山下 まり・東北大学・大学院農学研究科・教授

上間 匡・国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生
管理部長

高橋 洋・水産大学校・生物生産学科教授
辰野 竜平・水産大学校・食品科学科准教授
長澤 和夫・国立大学法人東京農工大学・大学院工
学研究院教授
足立 真佐雄・国立大学法人高知大学・教育研究部
自然科学系農学部門教授

土方 悠希・愛知県衛生研究所・生物学部・医動物研究室主任
志田 静夏・国立医薬品食品衛生研究所・食品部第三室長
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
柴田 識人・国立医薬品食品衛生研究所・生化学部長

A. 研究目的

A-1. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握

国内の主要な天然ふぐ水揚げ地において、雑種ふぐの混獲率及び流通先における流通状況を把握すること、また、しらす加工品に混入するふぐ仔稚魚（しらす混入ふぐ）について、その種構成や毒性を把握することは、ふぐ食の安全を確保する上で極めて重要である。そこで本研究では、国内の主要な天然ふぐ水揚げ地における雑種ふぐの発生・流通状況を明らかにし、見いだされた雑種ふぐの毒性評価を行うこと、またしらす混入ふぐの種・雑種判別技術を開発し、その種構成や毒性評価を行うことを通じて、ふぐによる中毒被害を未然に防ぐための効果的な対策に資する知見を得ることを目的とした。

A-2. 国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

麻痺性貝毒 (PST) はサキシトキシン (STX) を基本骨格とし、C トキシンや GTX など約 70 種が知られる。国内の毒化二枚貝では C1&2、GTX1~6、dcSTX、neoSTX、STX が主要成分とされてきたが、約 20 年前に国外で新規代謝物 M-toxin 類の存在が提唱された。M1~M12 が想定され、M1~M4 および M5-HA、M6-HA の構造は決定されているが、多くは未解明である。M-toxin 類は C11 位の脱硫酸体で、11-hydroxy または 11-dihydroxy 構造を持つ。

M-toxin 類の毒性は不明で標準物質もなく、LC-MS/MS による定量ができないため、二枚貝の毒力算出に反映できない。令和 4 年度には、マウス毒性試験と LC-MS/MS 測定値 (C1,

C2, GTX1~6, STX, TTX) から換算した毒力が一部で乖離し、M-toxin 類が毒力に寄与している可能性が示唆された。未測定の間までは毒力を過小評価する恐れがあるため、構造解明・毒性評価・定量法の確立が重要である。

本事業では、二枚貝からの単離精製、化学誘導、不斉合成により M-toxin 類を調製し毒性評価を行う。また、M-toxin を含む LC-MS/MS 分析法を確立し、国内で毒化する主要二枚貝（ホタテガイ、ヒオウギガイ）における含有量と蓄積部位を明らかにする。

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

近年、世界各国の沿岸域において、二枚貝から微量のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX) が相次いで検出されている。TTX は、フグや巻貝、カニ、ヒラムシ、ヒモムシなどに含有していることが知られているが、その食物連鎖や毒化機構の全容は明らかになっていない。また、麻痺性貝毒の機器分析法導入時に、TTX を測定対象とするかが重要となる。

本事業では、二枚貝中の TTX の餌生物を特定するために、北日本で採取したホタテガイ中腸腺および西日本で採取したマガキ中腸腺に含まれる麻痺性貝毒と TTX の季節変動を LC-MS/MS で調べた後、18S rDNA V8-V9 領域を対象としたメタバーコーディングを行うことで中腸腺に含まれる餌生物相を解析し、毒産生生物を絞り込む。また、二枚貝における TTX 含有量を継続的に調査する。

A-3. 植物性自然毒（きのこ含む）の食中毒の発生動向の分析による効果的な防止策の提案

植物性自然毒の摂取による食中毒事例は毎年報告されており、死亡者も発生している。諸外国では安全性の懸念から基準値の設定等の対策が講じられているものであっても、我が国では規制が設けられておらず、一般食品として流通している場合もある。本研究では、我が国で特に注意が必要と考えられる植物性自然毒について、国内流通食品の汚染実態を調査することを最終目的としている。昨年度実施した諸外国の植物性自然毒に関する規制や注意喚起、健康被害事例等の調査の結果、ピロリジニアルカロイド (PAs) は諸外国においてハーブ・スパイス等の汚染事例が多く、健康

被害が発生していることが示され、国内流通食品における汚染実態調査が必要であると考えられた。今年度は汚染実態調査に向けてハープ・スパイス中の PAs 分析法の確立を目的とした。

A-4. 汎用性の高い植物性自然毒（きのこ）の分析法・同定法の確立

動物や植物にはヒトや動物に有害な「自然毒」を含むものがあり、食中毒統計では動物性と植物性に分類される。本分担研究では、自然毒による食中毒の把握と予防策に資するため、①植物性自然毒（特にきのこ）の毒成分分析法・遺伝子検査法の確立、②地方衛生研究所での鑑別能力向上を目的とした。

きのこ中毒では、調理済み残品からの成分同定や DNA 抽出が困難で、形態鑑別も限界があるため、迅速で確実な分析法の整備が必要である。本研究では、既開発の毒成分一斉分析法 1・2 を基盤に、ドクツルタケを含むきのこシチューを用いた室間共同試験で分析法 1 の妥当性を確認し、翌年度にはベニテングタケを加えた模擬試料で分析法 2 の妥当性を検証した。これらの方法は、アマニタトキシン、イルジン S、ウスタル酸、ムスカリン、イボテン酸、ムシモールなどを ODS カラムで分析可能とする工夫が特徴である。

遺伝子検査法では、まず致死性の高いドクツルタケ特異的リアルタイム PCR 法を開発し、性能評価を進めている。また、ゲノム情報が未整備のテングタケやイボテングタケについて国内採取個体のゲノム解析を行い、ドラフトゲノムを構築した。今後はイボテングタケ特異的 PCR 法の開発と全ゲノム情報の取得を進め、原因不明のきのこ中毒にも対応可能な鑑別体制の強化を図る。

A-5. 自然毒のリスクプロファイルの更新、消費者に対する効果的な情報提供方法の提案

平成 20-21 年度厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業「自然毒のリスクプロファイル作成を目指した調査研究（研究代表者：塩見一雄）」において「自然毒のリスクプロファイル」が作成され、厚生労働省では、各自然毒に関する正しい知識の普及

と注意喚起のために、これをホームページ上に公開している。

「自然毒のリスクプロファイル」
(https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/poison/index.html)

ここでは、毒成分を含む動物、きのこ、高等植物の種類毎に、その分類と特徴、写真、毒成分、中毒症状などが表形式で簡潔に記載され、その自然毒に関する概要を理解できるようにまとめられている。ただ、公開されてから 10 年以上が経過したが、その間、記載内容についての簡単な修正等に留まっていた。そのため、公開後の新しい知見を含めた全般的な見直しが必要である。

令和 3-5 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「自然毒等のリスク管理のための研究（21KA1005；研究代表者：鈴木敏之）」において、きのこ及び高等植物に関する見直しに着手した。本分担研究では、その継続作業を行うとともに動物性自然毒のリスクプロファイルの見直しを行う。

B. 研究方法

B-1. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握

(1) 雑種ふぐ

調査地において水揚げされた選別前の天然ふぐについて外部形態に基づき種・雑種鑑別を行い、種組成及び雑種と思われる種類不明ふぐの個体数を数え、さらに各個体から DNA 試料を採取した。種類不明ふぐの一部については、生鮮状態で毒性試験用に皮、筋肉、肝臓、及び生殖腺に腑分けし、各組織の重量を測定した後、冷凍で実験室まで持ち帰った。また、水揚げ地市場からふぐを購入した水産加工業者等において聞き取り調査を行い、また購入したふぐの鑑別が可能であれば鑑別を行い、雑種フグの流通状況を調査した。

実験室において、雑種と思われる種類不明ふぐの DNA 試料（右胸鰭もしくは筋肉のエタノール固定試料）よりゲノム DNA を磁性ビーズまたはアルカリ法を用いた精製法により抽出した。抽出したゲノム DNA を鋳型として、自然毒等のリスク管理のための研究（21KA

1005)」で開発した日本産トラフグ属魚類 11 種の種特異的一塩基多型 (SNP) に基づく種・雑種判別マーカー (Takahashi et al., 2023) 及び今年度開発した日本産サバフグ属魚類 7 種の同様の種・雑種判別マーカーについて、TaqMan アッセイによる遺伝子型決定を行い、種・雑種判別を行った。種・雑種判別結果に基づき、現地調査における種類不明フグの個体数などから雑種の混獲率を推計した。

(2) しらす混入ふぐ仔稚魚

しらす主要漁場 10 海域から得たしらす混入ふぐ 7,025 個体について外部形態で属・種を鑑別し、サバフグ属・トラフグ属を含む 377 個体から DNA を抽出して種・雑種判別を行った。判別後の魚体は毒性評価用として送付した。前年度・今年度に DNA マーカーでシロサバフグと判定された 332 検体について、乾燥または生原料を粉碎し、0.1%酢酸で抽出後、HILIC カラムを用いた LC-MS/MS で TTX 分析を実施した。連続分析での感度低下を避けるため標準物質を適宜測定し、LOD・LOQ を確認した。

TTX が検出された検体のうち 10 検体と、陰性 1 検体をマウス毒性試験に供した。食品衛生検査指針に基づき ddY 系マウスに検液 0.9 mL を腹腔内投与し、致死時間からマウス単位 (MU) を算出した。エンドポイントは 30 分とし、試験は動物実験委員会の承認を得て実施した。

B-2. 国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

前年度までに確立した精製法により、ホタテガイ・ヒオウギガイ・アサリから M1、M3、M5-HA、M9、M10 を得た。さらに化学誘導法で市販 GTX1&4 を脱硫酸化し M8 を作製した。不斉合成では M2・M4 の酸化反応が不完全だったため、HILIC カラムで混合物を分離し純品を得た。得られた M-toxin 類は qNMR により濃度を決定した。

今年度は収量の多い M1、M3、M5-HA、M4 を対象に、Neuro2A 細胞を用いた Na⁺チャネル阻害活性試験を実施し、前年度の M2、dcSTX、neoSTX、TTX のデータと比較して

EC50 を評価した。

M-toxin の含有量と蓄積部位については、東日本で毒化したホタテガイを用いて継続調査した。冷蔵で受領した検体を貝柱・中腸腺・腎臓・生殖腺・鰓に分け、希塩酸抽出後、ENVI-Carb 固相で精製し、LC-MS/MS により分析した。

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

北日本の養殖ホタテガイを定期的に採取し、中腸腺に含まれる麻痺性貝毒とテトロドトキシン (TTX) の季節変動を調査した。2 個体を合一してホモジネートを作製し、半量をメタバーコーディング、半量を LC-MS/MS 分析に使用した。中腸腺に 1%酢酸を加えて抽出後、ENVI-Carb 固相で精製し、最適化した LC-MS/MS 条件で麻痺性貝毒および TTX を測定した。標準品には NRC 認証標準物質を用い、サキシトキシンのみ鏡像異性体を使用した。西日本のマガキでも同様の処理を行った。

また、前年度に設計したホタテガイ rDNA の PCR 増幅を抑制する PNA clamp を用い、18S rDNA V8-V9 領域のメタバーコーディングにより中腸腺に含まれる餌生物組成を解析した。さらに、16S rDNA V3-V4 領域を対象としたメタバーコーディングにより、細菌組成の解析も実施した。

B-3. 植物性自然毒 (きのこ含む) の食中毒の発生動向の分析による効果的な防止策の提案

B-3-1. 試料

ナツメグ、ターメリック、オレガノ、ローズマリー、サボリー、タイム、マジョラム、クミン、ディルシード及びセージをインターネットにより購入し、試料として用いた。

B-3-2. 試薬等

PAs (ピロリジジナルカロイド) 標準品は PhytoLab 製を使用した。

固相抽出には Waters 製 Oasis MCX および Oasis MAX (500 mg/6 mL) を用い、ろ過には Agilent 製 Captiva PTFE フィルタバイアル (0.22 µm) を使用した。

B-3-3. 装置

超遠心粉碎機は ZM200 (Retsch 製) を用いた。超純水精製装置は Milli-Q Integral 10 (Merck 製) を用いた。振とう機は SR-2DW

(タイテック製)を用いた。遠心分離機はフロア型冷却遠心機 S700FR (久保田商事製)を用いた。ロータリーエバポレーターは N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000 (東京理化学器械製)を用いた。

SFC-MS/MS は Nexera UC 及び LCMS-8060NX (ともに島津製作所製)を用いた。データ解析は LabSolutions (島津製作所製)を用いて行った。

B-3-4. 測定条件

(1) SFC 条件

Shim-pack UC-RP/UC-diol/UC-HyP (3 μm , 2.1 $\times$ 150 mm) を使用し、カラム温度は 43 $^{\circ}\text{C}$ 、注入量は 1 μL とした。移動相には CO_2 と 23 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液を用い、流速は 1 mL/min とした。メイクアップ溶液は 0.1% 酢酸・メタノール (0.2 mL/min) とした。

(2) MS 条件

ESI(+) モードで SRM 測定した。

B-3-5. 標準溶液調製法

PA 標準品をメタノールに溶解し 0.5 mg/mL の原液とし、必要に応じてメタノールで希釈して使用した。

B-3-6. 試料粉砕法

オレガノは乳鉢または 0.50 mm スクリーン付き超遠心粉砕機で粉砕しパウダー化。他の試料は既存のパウダー製品をそのまま使用した。

B-3-7. 試験溶液調製法

試料 2.00 g に 0.1 mol/L 硫酸/メタノール (1/1, v/v) 10 mL を加え 10 分間振とうしたのち、3,430 $\times$ g で 5 分間遠心分離した。残渣に 0.1 mol/L 硫酸/メタノール (1/1, v/v) 10 mL を加え 10 分間振とうしたのち、3,430 $\times$ g で 5 分間遠心分離した。上清を合わせ、0.1 mol/L 硫酸/メタノール (1/1, v/v) で 20 mL に定容した。定容液 10 mL を、メタノール 5 mL 及び水/メタノール (1/1, v/v) 5 mL でコンディショニングした Oasis MCX に負荷した。Oasis MCX を水/メタノール (1/1, v/v) 5 mL 及びメタノール 5 mL で洗浄した。予め 25 w/w% アンモニア水/メタノール (1/49, v/v) 5 mL でコンディショニングした Oasis MAX を Oasis MCX の下に連結し、25 w/w% アンモ

ニア水/メタノール (1/49, v/v) 10 mL で溶出した。溶出液をエバポレーターで濃縮し、窒素気流下で乾固した。メタノール 1 mL に溶解し、孔径 0.22 μm の PTFE メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

B-3-8. 分析法の性能評価

ナツメグを用い、確立した分析法の選択性、直線性、真度及び精度並びにマトリックスの影響を評価した。直線性の評価には、添加濃度 1, 5, 10, 50 及び 100 $\mu\text{g/kg}$ の 5 点からなるマトリックス検量線を用いた。真度及び精度は、添加濃度 1 $\mu\text{g/kg}$ において 1 日 2 併行の試験を 5 日間実施することにより求めた。マトリックス影響は、1 ng/mL (添加濃度 1 $\mu\text{g/kg}$ 相当) の 40 種 PA 標準溶液のピーク面積と、同濃度のマトリックス標準溶液のピーク面積比を百分率 (%) で算出した。

B-4. 汎用性の高い植物性自然毒 (きのこ) の分析法・同定法の確立

B-4-1. 分析法

B-4-1-1. 試薬・試液

ムスカリン、イボテン酸、ムシモール、L-プロパルギルグリシン、L-アシルグリシンは各社の標準試薬を使用し、内部標準にはムスカリン-d9 ヨージドと O-Methyl-D-tyrosine (MTY) を用いた。これらを 50%メタノール水溶液に溶解し、100 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液を調製した。5 種毒成分と 2 種内部標準は、それぞれ混合して 10 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液とした。

抽出には 10%TCA 水溶液を用い、精製には Captiva EMR-Lipid カートリッジを使用した。誘導体化には AQC 試薬 (3 mg/mL) と専用ほう酸緩衝液を用いた。検量線用の希釈溶媒は 2%TCA 含有 80%メタノール水溶液とし、その他の溶媒は残留農薬試験用または LC-MS 用の高純度品を使用した。

B-4-1-2. 装置

ホモジナイザー及びジェネレーターシャフト、アルミブロックヒーター並びにトリプル四重極型の液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) は、室間共同試験に参加した各機関が保有する装置を使用した。例として、機関 L が使用した装置を以下に示す。

機関 L の使用装置

ホモジナイザー及びジェネレーターシャフト:ヒスコトロンNS-51 及びNS-10P(10.5 mmφ×140 mm) ((株) マイクロテック・ニチオン(現: (株) 日本精機製作所))

アルミブロックヒーター: Reacti-Thermo™ Heating Module (Thermo Fisher Scientific 社)

LC-MS/MS: Exion LC AD-5500+ QTRAP Activated (Sciex 社)

B-4-1-3. LC-MS/MS 測定条件

室間共同試験に参加した 15 機関は、いずれもトリプル四重極型の LC-MS/MS を用いた。詳細は分担報告書を参照。

B-4-1-4. 試験溶液の調製

分析法 2 の試験溶液調製法の概略を図 B-4-1 に示す。

B-4-1-4-1. 抽出

試料 5.0 g に内部標準溶液 0.5 mL を加えて混和・30 分静置後、10%TCA 水溶液 10 mL とメタノール 10 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした。刃をメタノールで洗浄し、さらにメタノールを加えて 35 mL とした後、2,000 ×g・5 分間遠心し上清を回収した。残渣にメタノール 15 mL を加えて再度遠心し、上清を先のフラスコに合わせてメタノールで 50 mL に定容した。

B-4-1-4-2. 精製

抽出液を 2 mL 採り、遠心沈殿管(10-15 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×g で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てた。このカートリッジを別の遠心沈殿管にセットして、さらに抽出液 1 mL を負荷し、同様に遠心分離して溶出液を採取した。

B-4-1-4-3. 誘導体化

2 mL の不活性処理済みガラス製スクリーバイアルに、B-4-1-4-2. 精製で得られた溶出液 100 µL を 量り採り、ほう酸緩衝液 300 µL を加えて混和后、さらに AQC 試薬アセトニトリル溶液(3 mg/mL) 100 µL を加えて混和した。スクリーキャップを閉めて密閉後、アルミブロックヒーターで 55°C、10 分間加熱した。室温に戻した後、水 500 µL を入れて混和したものを試験溶液とした (0.01 g sample/mL)。

B-4-1-5. 定量

検量線用標準溶液の調製のため、最初に以

下の溶液を調製した。

① 1 µg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液

10 µg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液 1 mL 及び 10%TCA 水溶液 2 mL に、メタノールを加えて 10 mL に定容した。(この溶液の組成は 2%TCA 含有 75%メタノール水溶液となる。)

② 0.1 µg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液

①の 1 µg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液を 2%TCA 含有 80%メタノール水溶液で 10 倍希釈した。

③ 1 µg/mL 2 種混合内部標準溶液

10 µg/mL 2 種混合内部標準溶液を 2%TCA 含有 80%メタノール水溶液で 10 倍希釈した。

①又は②と③を混合し、2%TCA 含有 80%メタノール水溶液で希釈することにより、2 種混合内部標準 100 ng/mL を含有する 0、10、20、50、100、200 ng/mL の 5 種きのこ毒混合標準溶液を調製した。これらの 6 溶液 100 µL を 2 mL の不活性処理済みガラス製スクリーバイアルにそれぞれ量り採り、B.1.4.3 誘導体化に従って誘導体化したものを検量線用標準溶液とした(0、1、2、5、10、20 ng/mL)。それぞれ LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法又は内部標準補正法で定量を行った。

B-4-1-6. 模擬試料

室間共同試験の模擬試料は、Jansson らの報告 [1] に従い、ベニテングタケを含むきのこのシチューを調製して用いた。ベニテングタケは、2023 年 10 月に岐阜県内の山林で採取後、-20°C 以下で冷凍してあったものを凍結粉碎して用いた。

きのこのシチュー

原材料:マッシュルーム 700 g、シイタケ 150 g、ヒラタケ 100 g、ナメコ 50 g、バター 83 g、小麦粉 33 g、生クリーム(乳脂肪分 35%) 420 mL、オリーブオイル 5 mL

調理法: 弱火でバターを溶かし、小麦粉を入れ混ぜたところに、細切して冷凍したきのこを入れ、全体がしんなりとするまで 10 分くらい加熱した。生クリームを入れ、弱火で 5 分加熱しながら混ぜた。仕上げにオリーブオイルを加えた。これをフードプロセッサーにより

粉碎均質化した。

ベニテングタケ添加試料

粉碎均質化したきのこシチュー約 950 g に凍結粉碎したベニテングタケ約 44 g を加えて 10 分間加熱、混和し、常温に戻してフードプロセッサを用いて均質化したものを模擬試料とした。

¹⁾ Jansson, D., Fredriksson, S., Herrmann, A., and Nilsson, C. Forensic Sci. Int., 221, 44-49 (2012)

B-4-1-7. 標準添加法による模擬試料の値付け

あらかじめ絶対検量線法により求められた模擬試料中のムスカリンクロリド、イボテン酸及びムシモールの濃度 (x mg/kg) をもとに、試料中の添加濃度が 0、 $0.5x$ 、 x 、 $1.5x$ 、 $2x$ 、 $2.5x$ 、 $3x$ と 7 濃度になるように標準溶液を模擬試料に添加した。**B-4-1-4. 試験溶液の調製**に従い抽出・精製し、LC-MS/MS により分析した。毒成分の添加量に対するピーク面積をプロットしたデータを最小二乗法により直線回帰し、その x 切片から抽出液中の毒成分の濃度を求めた。また、 x 切片の標準偏差に係数として 2.571 を乗じることにより、95%信頼限界を求めて不確かさとした。

B-4-1-8. 均質性試験、安定性試験

模擬試料をそれぞれ 25 g ずつ量り採り、24 個のポリエチレン製容器に取り分けた。このうち 6 個の容器をランダムに選択し、1 容器につき 2 本ずつ分析用試料を定量した。Thompson らの報告²⁾に従い、F 検定により均質性を確認した。

室間共同試験開始前、途中及び終了後の 3 回にわたり、模擬試料に含まれるムスカリンクロリド、イボテン酸及びムシモールの 3 成分をそれぞれ 3 併行で定量し、実施期間中の安定性を評価した。

²⁾ Thompson, M. and Wood, R. J. AOAC Int. 76, 924-940 (1993)

B-4-1-9. ブランク試験

模擬試料の調製に用いたベニテングタケを加える前のきのこのシチューを、**B-4-1-4. 試験溶液の調製**により抽出・精製し、LC-MS/MS により分析して、妨害ピークの有無を確かめた。

B-4-1-10. 室間共同試験

試験は令和 7 年 10 月 1 日～12 月 26 日の約 3 か月で実施し、5 種混合標準溶液・2 種内部標準溶液・模擬試料を 15 機関に配布した。ムスカリンのみ定量した 3 機関を除く 12 機関では、標準溶液中の 4 成分から試料に含まれる 2 成分を同定し、ムスカリンを含む 3 成分の定量 ($n=2$) を行い、分析条件と結果を報告した。

提出データは分析カラムの違いで 2 群に分け、Cochran 検定と Grubbs 検定で外れ値を除外した。各データセットについて、付与値に対する真度、併行精度 (RSD_r)、室間精度 (RSD_R) を算出し、HorRat 値は RSD_R を Horwitz 式の予測精度 (PRSD_R) で割って求めた。これらの指標とブランク試験による選択性を合わせ、農水省「分析法の妥当性確認ガイドライン」に基づき評価した。

B-4-2. 同定法

B-4-2-1. 子実体サンプル採取情報

日本各地で採取された多数のきのこ (子実体) サンプルを国立衛研にご提供頂いた。表現型からテングタケ属と思われる子実体について、採取地や採取日、子実体の状態を写真に記録の後、土汚れを水洗いした上で 1 センチ角に細断し、凍結乾燥機 FDU-1200 (EYELA) を用いて凍結乾燥処理を実施し、使用するまで -30℃で保存した。

B-4-2-2. DNA 抽出方法

Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 法 (一部改変) にて、子実体から DNA を抽出した。詳細は以下の通りである。凍結乾燥した子実体 0.1 g を液体窒素下で破碎し、1.5% CTAB バッファー 5 mL を加えて 56℃で 30 分加温した。CIA (クロロホルム : イソアミルアルコール = 24 : 1) を加えて混和・遠心し上清を回収し、同操作を 1/2 量の CIA で再度行った。得られた上清に 10% CTAB 溶液 (1/10 量) と CTAB 沈殿バッファー (1.5 倍量) を加えて沈殿させ、遠心後の沈殿を 1 M NaCl と RNaseA で溶解した。最後にイソプロパノール沈殿で DNA を回収し、超純水に溶解した。抽出 DNA は NanoDrop One で濃度測定した。

B-4-2-3. DNA 配列による菌種推定

ゲノム DNA を抽出した後、ITS 周辺塩基配列 (核 small subunit ribosomal DNA (SSU

rDNA) 部分配列から、ITS1、5.8S rDNA、ITS2 を経て、large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA) 部分配列までを含む一連の配列) および RNA polymerase II subunit B (rpb2) 遺伝子配列の相同性を以って菌種の推定を行った。各領域は THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて PCR 増幅を実施した。PCR 増幅に使用したプライマーセットは以下の通り。

ITS 周辺塩基配列³⁾：

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

rpb2 遺伝子配列⁴⁾：

Am-6F: 5'-TGGGGAATGGTRTGYCCTGC-3'

Am-7R: 5'-CCCATKGCTTGTTRCCCATGGC-3'

増幅した PCR 断片は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) で精製の後、サンガーシーケンスにより配列を決定した。得られた塩基配列は NCBI の BLAST 検索ツールを用いて相同性検索を実施し、各配列ともに 99%以上 (片方しか配列登録がされてない場合は片方のみ) の結果を以って菌種の推定を実施した。

³⁾ Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White T. J. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)

⁴⁾ Cai, Q., Tulloss, R. E., Tang, L. P., Tolgor, B., Zhang, P., Chen, Z. H., and Yang, Z. L. BMC Evol Biol, 14, 143 (2014)

B-4-2-4. 種特異的配列の探索

NCBI より収集したテングタケ属 528 種の ITS 周辺の塩基配列を用いて、ドクツルタケまたはイボテングタケに特異的な塩基配列の探索を行った。なお探索には、我々が開発した BLAST_TSN (https://github.com/NIHS-DNFI/BLAST_TSN/) シェルを一部改変して使用した。具体的な動作は、ドクツルタケまたはイボテングタケの ITS 周辺の塩基配列を window サイズ 25 塩基、step サイズ 1 塩基の Sliding Window 方式で、自身以外の 527 種テングタケ属 ITS 周辺の塩基配列に対して BLAST 検索を行い、他種に相同性の高い塩基

配列を除外することで、ドクツルタケまたはイボテングタケに特異的な塩基配列を抽出した。

B-4-2-5. リアルタイム PCR

設計したプライマー・プローブの特異性はリアルタイム PCR で確認した。TaqMan 法では FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche) を用いた。反応溶液 (25 μ L) は、2 $\times$ FastStart Universal Probe Master (Rox) 12.5 μ L, 各プライマー 500 nM, プローブ 1 μ M, 鋳型 DNA 50 ng/well (熱分解試験に供する鋳型 DNA は 5 ng/well), 純水を加えて調製した。PCR 条件は、50 $^{\circ}$ C 2 分、95 $^{\circ}$ C 10 分間のプレヒート後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分の 2 ステップ PCR を 40 サイクルとした。SYBR 法では THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いた。反応溶液 (25 μ L) の組成は、2 $\times$ THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix 12.5 μ L, 各プライマー 300 nM, 鋳型 DNA 5 μ L, 純水を加えて調製した。PCR 条件は、95 $^{\circ}$ C 10 分間プレヒート後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分の 2 ステップ PCR を 40 サイクル行い、その後 65 $^{\circ}$ C から 97 $^{\circ}$ C の融解曲線を得た。

B-4-2-6. デジタル PCR

ドクツルタケ特異的リアルタイム PCR 法の陽性対照として、増幅領域 (89 bp) を組み込んだ合成プラスミドを使用した。デジタル PCR (Bio-Rad QX200) でプラスミドのコピー数を絶対定量した。プラスミドは 10 ng/ μ L のサケ精子 DNA で段階希釈し、PCR に供した。

反応液 (20 μ L) は、ddPCR Supermix、プライマー (900 nM)、プローブ (250 nM)、プラスミド 1 μ L を含めて調製し、ドロップレット生成後に PCR を実施した。PCR 条件は 95 $^{\circ}$ C 10 分、続いて 94 $^{\circ}$ C 30 秒・60 $^{\circ}$ C 1 分の 40 サイクル、98 $^{\circ}$ C 10 分で失活とした。反応後、Droplet reader で陽性・陰性ドロップレットを計数し、3 ウェル併行で測定した。解析は QX Manager v1.2 を用いた。

B-4-2-7. リアルタイム PCR による特異的遺伝子検査法の検出限界および増幅効率の評価

デジタル PCR によりコピー数定量した陽性コントロールプラスミドを用いて、特異的検査法の検出限界および増幅効率の評価を行った。検出限界は 95%以上の確率で検出される最低濃度（コピー数/ウェル）とした。ドクツルタケゲノム DNA を用いた増幅効率の評価では、陽性コントロールプラスミド同様、10 ng/μL に希釈した断片化処理済みのサケ精子由来 DNA でドクツルタケゲノム DNA を段階希釈し、リアルタイム PCR に供した。

B-4-2-8. 熱分解試験

ドクツルタケの高分子量ゲノム DNA を 95℃で 5～120 分加熱し、断片化の程度をアガロース電気泳動で確認した。得られた断片化 DNA (5 ng/well) を TaqMan 法リアルタイム PCR に供し、特異的遺伝子検査法の検出性能を評価した。比較として、ITS 領域を増幅するユニバーサルプライマーを用いた SYBR 法でも同様に測定した。

B-4-2-9. 全ゲノムシーケンス

イボテングタケの全ゲノム de novo アセンブリのため、PacBio Revio system により長鎖リードの全ゲノムシーケンスを実施した。抽出 DNA は Short Read Eliminator Kit で短鎖を除去し、SMRTbell prep kit と g-tube を用いてライブラリ調製後、Revio で HiFi リードを取得した。

得られたリードは minimap2 で細菌・ミトコンドリア配列を除去し、NanoFilt により長さ・品質でフィルタリングした。最終的に hifiasm を用いて de novo アセンブリを行った。

B-4-2-10. アセンブリ評価

アセンブリしたドラフトゲノムの完全性評価には BUSCO (ver. 5.8.3) を用い、真菌 (fungi_odb12)、担子菌門 (basidiomycota_odb12)、真正担子菌綱 (agaricomycetes_odb12)、ハラタケ目 (agaricales_odb12) の 4 種データセットで解析した。また、土壌由来の細菌混入を確認するため bacteria_odb12 も使用した。

さらに D-GENIES により、イボテングタケ 2 個体間の比較に加え、昨年度構築したテングタケゲノムおよび NCBI 登録の担子菌類ゲノム (表 B-4-1) とドットプロット比較

を行った。

B-5. 自然毒のリスクプロファイルの更新、消費者に対する効果的な情報提供方法の提案

「自然毒のリスクプロファイル」は厚生労働省 HP に掲載予定のため、令和 3-5 年度厚生労働科学研究費補助金事業 (21KA1005) において厚生労働省の食中毒担当部署 (医薬・生活衛生局食品監視安全課) と協議して決定した掲載項目等に従って、新規知見をもとに更新作業を実施した。

C. 研究結果及び考察

C-1. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握

(研究結果)

(1) 雑種ふぐ

調査地で水揚げされた天然フグについて外部形態で種・雑種を判別し、種組成と種類不明個体数を記録、併せて DNA 試料を採取した。種類不明フグの一部は皮・筋肉・肝臓・生殖腺に分けて重量測定後、毒性試験用として冷凍保存した。また、水産加工業者への聞き取りや購入個体の鑑別により、雑種フグの流通状況も調査した。

実験室では、種類不明フグの胸鰭または筋肉のエタノール固定試料から、磁性ビーズまたはアルカリ法でゲノム DNA を抽出した。抽出 DNA を鋳型に、自然毒等のリスク管理のための研究 (21KA1005)」で開発したトラフグ属 11 種および今年度開発したサバフグ属 7 種の SNP マーカーを用いて TaqMan アッセイにより遺伝子型を決定し、種・雑種判別を行った。判別結果と現地調査の個体数情報から、雑種の混獲率を推計した。

(2) しらす混入ふぐ仔稚魚

主要 10 海域から得たしらす混入フグ 7,025 個体を外部形態で属・種鑑別し、そのうちサバフグ属・トラフグ属を含む 377 個体から DNA を採取した。DNA はアルカリ法で抽出し、既報および今年度開発の SNP マーカーを用いて TaqMan アッセイにより種・雑種判別を行った。判別済み個体の残りは毒性評価用として水産技術研究所へ送付した。

前年度・今年度に DNA マーカーでシロサバ

フグと判別された 332 検体について、乾燥または生原料を粉碎後、0.1%酢酸で抽出し、遠心・合一・定容後にろ過して LC-MS/MS (HILIC カラム) で TTX を分析した。連続測定による感度低下を考慮し、標準物質で適宜 LOD・LOQ を確認した。

TTX が検出された検体のうち 10 検体と、陰性 1 検体をマウス毒性試験に供した。ddY 系マウスに検液 0.9 mL を腹腔内投与し、食品衛生検査指針のマウス検定法に基づき毒性を評価した (致死時間 30 分をエンドポイント)。試験は愛知県衛生研究所の動物実験委員会承認を得て実施した。

(考察)

(1) 雑種ふぐ

今年度調査した 3 地点のうち、宮城県気仙沼市では前年同様に雑種混獲率が高く (14.8%)、継続的な調査が必要と判断された。主な雑種はショウサイフグ×ゴマフグで、毒性部位は両親種と同様であることが確認されている。

神奈川県横須賀市では雑種混獲率が 4.8%で、R5 年度 7.9%、R6 年度 2.1%と変動しつつも他海域より高い傾向が続いた。ここではトラフグ×マフグのみが確認され、皮毒性が優性遺伝する可能性から、可食部位の誤判別に注意が必要である。

宮崎県都農町では 5 種が確認され、雑種は 0%だったが、排除対象のドクサバフグが 7 個体混獲された。本種は近年愛知県でも報告があり、漁獲・流通およびしらす混入状況の監視が必要と考えられる。現地では漁業者による適切な排除が行われていた。

以上より、主要水揚げ地のうち雑種混獲率の高い海域や、ドクサバフグ混獲の実態が明らかとなり、今後のリスク管理に向けた継続調査の重要性が示された。

(2) しらす混入ふぐ仔稚魚

今年度開発したサバフグ属の種・雑種判別マーカーにより、しらす混入フグの同定が大幅に迅速・簡便化された。外部形態でも、サバフグ属は体側下部の銀白色帯によりトラフグ属と容易に区別できた。全国から集めた混入フグの約 96%がシロサバフグであり、近年の回収事例でも本種が原因と考えられることから、シロサバフグ仔稚魚の毒性評価が重要と判断

された。

シロサバフグ仔稚魚 332 検体の LC-MS/MS 分析では一部から TTX が検出されたが、マウス毒性試験では設定エンドポイント (30 分) まで全個体が生存した。2 年間でナシフグ・シマフグ・シロサバフグ計 440 検体を分析した結果、ナシフグは低毒力個体が一部存在し、シマフグは全個体が TTX を持つものの毒量は極めて少なかった。シロサバフグはこれらよりさらに低毒力であった。

しらす加工品では「10.4 kg に仔稚魚 1 個体」の混入割合とされ、混入フグの大半が低毒力のシロサバフグであることから、摂食による健康被害リスクは低いと考えられる。次年度は調査海域の拡大と多種の仔稚魚の解析を予定している。

C-2. 国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

二枚貝由来または化学誘導で得た M1、M3、M5-HA、M8、M9、M10 は、LC-MS/MS と NMR により既報構造と一致した。不斉合成で得た M4 (M2 との混合物) も HILIC 精製で分離でき、NMR は既報と一致した。

qNMR により M1:41.4 μM、M3:219 μM、M4:492 μM、M5-HA:46 μM と定量し、Neuro2A アッセイでは EC50 が M1:168 nM、M3:788 nM、M4:176 nM、M5-HA:>4,600 nM であった。前年度の M2 (139 nM) と合わせ、5 成分の活性評価が完了した。M3・M4 は M1・M2 の C11 位 dihydroxy 体であり、monohydroxy 体より Na⁺チャネル阻害活性が弱かった。これは増加した -OH 基が結合を妨げるためと考えられる。

M5-HA は基本骨格が 6-6-5 員環と特異で、4,600 nM でも阻害活性が見られず、骨格変化により結合性が低下したと推察された。C13 脱硫酸体 M6-HA は活性が期待されるが、既報では 140 nM で活性が確認されていない。次年度は M6-HA と M8～M10 の Neuro2A アッセイを実施し EC50 を取得する予定である。

M-toxin 類の蓄積は毒化レベルで異なり、高毒化時は中腸腺・腎臓に高濃度で、他組織 (生

殖腺・鰓・外套膜・貝柱)にも分布した。中腸腺では組成比の 70~80% を占めることもある。一方、低毒化時は中腸腺・腎臓のみで最大 40% 程度であり、毒化とともに M-toxin への変換や排泄が進むと考えられた。高毒化では排泄が遅れ、毒化が長期化することが示唆された。

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

北日本のホタテガイでは、前年度同様に夏~秋に TTX が検出され、2024 年 12 月の 5 m 層で最大 23.4 µg TTX eq./kg (中腸腺)だった。麻痺性貝毒(春~初夏)とは季節が異なり、濃度も低かった。一方、西日本のマガキでは、麻痺性貝毒が落ち着く 6 月下旬に TTX が検出され、2025 年 6 月に最大 101 µg TTX eq./kg を示した。

中腸腺のメタバーコーディングでは、渦鞭毛藻・緑藻などの微細藻類や甲殻類・ホヤ類が検出されたが、既知の TTX 保有生物(オオツノヒラムシ、アカハナヒモムシ等)は検出されなかった。細菌解析では *Synechococcus* 属シアノバクテリアが優占していた。現時点では検出割合のみの情報であるため、今後は定量 PCR 法を確立し、餌生物・細菌の rDNA 量と TTX 濃度の関係を解析し、TTX 生産生物の特定を進める予定である。

C-3. 植物性自然毒(きのこ含む)の食中毒の発生動向の分析による効果的な防止策の提案

C-3-1. 分析カラムの検討

昨年度 LC-MS/MS で分離困難だった PAs について、今年度は分離能の高い SFC を用いて検討した。Shim-pack UC-RP、UC-Diol、UC-HyP の 3 種カラムを比較したところ、UC-HyP が最も良好で、seneciphylline/spartioidine はベースライン分離、N-oxide 体もピークトップで分離した。

UC-HyP を用いてカラム温度を検討した結果、40℃では一部の化合物が未分離、45℃では別の組が未分離となったが、43℃ではすべてのピークトップ分離が可能であった。最適化条件では 40 種の PAs についてベースライン分離またはピークトップ分離が達成され、汚染実態調査に適した条件と判断された。このため、分析カラムとして Shim-pack

UC-HyP を用いることとした。

C-3-2. 試験溶液の調製

PAs 分析では一般に 0.05 mol/L 硫酸が抽出溶媒として用いられるが、有機溶媒を含まないため食品によっては十分抽出されない可能性がある。そこで本検討では 0.1 mol/L 硫酸/メタノール(1/1)を抽出溶媒として採用した。

抽出液は pH 2 未満の含水溶媒であるため、シリカ系ではなく広い pH 範囲で利用できるポリマー系固相ミニカラムを選択した。PAs は塩基性化合物であることから、まず Oasis MCX (逆相-強陽イオン交換)を用いて抽出液を負荷し、水/メタノールで洗浄後、25%アンモニア水/メタノール(1/49)で溶出したところ、全ての PAs で良好な回収率が得られたが、夾雑成分の除去が不十分であった。そこで、MCX の下に Oasis MAX (逆相-強陰イオン交換)を連結し、25%アンモニア水/メタノール(1/49)で溶出したところ、酸性夾雑成分の除去が改善され、精製効果が向上した。

C-3-3. マトリックスの影響

ナツメグ、ターメリック、オレガノ、ローズマリーを用いてマトリックスの影響を評価したところ、PAs は化合物により 57.1~216.3% と大きく影響を受けることが示された。試料 2.00 g を秤取し、その 1.00 g 相当を精製に用いる本法では、夾雑物が多く残存し、溶媒標準溶液を用いた絶対検量線法の適用が困難と判断された。

retrorsine-N-oxide、lycopsamine、intermedine など一部の PAs でマトリックス間の違いが見られたものの、全体としては類似した傾向を示した。以上より、本法ではマトリックス検量線法を用いて定量することとした。

C-3-4. 分析法の性能評価

40 種の PAs を含有していないことをあらかじめ確認したナツメグを用いて分析法の性能評価を行った。

C-3-4-1. 選択性

ナツメグにおいては、妨害ピークは認められなかった。

C-3-4-2. 直線性

いずれの化合物においても 1~100 µg/kg の範囲で良好な直線性($R^2>0.99$)が確認された。

C-3-4-3. 真度及び精度

添加濃度 1 µg/kg において、1 日 2 併行の添加回収試験を 5 日間実施し、真度及び精度を評価した。真度は 84.9~101.3%と、併行精度は 2.0~16.3%, 室内精度は 3.0~16.7%であり、良好であった。Heliosupine は併行精度及び室内精度ともに最も大きい値となった。Heliosupine ではマトリックスの影響が 57.1%と大きく、夾雑成分の影響を強く受けたことがばらつきの一因となった可能性が示唆された。

C-3-5. 汚染実態の予備調査

開発した分析法を用い、国内流通ハーブ・スパイスの PAs 汚染実態の予備調査を行った。試料は EU の「食品及び飼料に関する緊急警告システム (RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed)」の検出事例を参考に選定し、定量にはナツメグのマトリックス検量線を使用した。その結果、ディルシードを除く全試料から PAs が定量下限以上で検出された。特にオレガノ、クミン 2、セージでは 737.2~2,459.7 µg/kg と高濃度で、EU 規制値 (EU 2023/915) を超過していた。

C-4. 汎用性の高い植物性自然毒 (きのこ) の分析法・同定法の確立

C-4-1. 分析法

C-4-1-1. 試験に用いた模擬試料

テングタケ (*A. pantherina*) とベニテングタケ (*A. muscaria*) は国内のきのこ中毒で発生件数が多く、誤食後 30 分ほどで消化器症状や中枢神経系の興奮・抑制など複雑な症状を呈し、重症化することもある。発症率はベニテングタケよりテングタケが高いとされる。

毒成分はイボテン酸とムシモールで、いずれもグルタミン酸や GABA に類似した構造を持ち、同様の作用機序と考えられる。ベニテングタケにはムスカリンも含まれるが量が少なく、ムスカリン様症状は稀である。一方、他の一部きのこには多量のムスカリンが含まれる。

本年度は、昨年度のドクツルタケに続き、ベニテングタケを含む模擬試料を用いて室間共同試験を実施した。Jansson らの方法に基づく「きのこシチュー」を作製し、標準添加法で値付けした結果、模擬試料中のムスカリンク

ロリドは 2.92 ± 0.20 mg/kg、イボテン酸 17.6 ± 1.7 mg/kg、ムシモール 0.582 ± 0.046 mg/kg であった。

C-4-1-2. 模擬試料の均質性と安定性

模擬試料に含まれるムスカリンクロリド、イボテン酸及びムシモールの容器間の分散比はそれぞれ、0.69、1.01 及び 1.47 となり、F 境界値 (4.39) よりも小さく、十分に均質であることが確かめられた。

室間共同試験実施前の定量値に対する実施期間中、実施期間後の定量値は、ムスカリンクロリド、イボテン酸及びムシモールのいずれも $\pm 5\%$ 以内であったことから、実施期間を通じて安定性が確保されていた。

C-4-1-3. 室間共同試験

C-4-1-3-1. 各機関の定性結果と選択性

参加 15 機関のうち 3 機関はムスカリンクロリドのみを定量し、残る 12 機関は混合標準溶液中の 4 成分のうち、イボテン酸とムシモールを正しく同定できた。ブランク試験ではイボテン酸・ムシモール・プロパルギルグリシン周辺に夾雑ピークが見られ、特にイボテン酸は前ピークとの分離度が 1.0 未満となる場合があり、1 mg/kg 程度の定量に影響が懸念された。

令和 6 年度の単一試験室で用いた Luna Omega Polar C18 は、イボテン酸と夾雑成分の分離に優れていたが、保管中に分離特性が変化し誤認の可能性が判明した。一方、ACQUITY UPLC HSS T3 は 1 か月以上保管しても分離特性が安定していた。このため今回の室間共同試験では、ACQUITY (1.8 µm) と同固定相の Xselect HSS T3 (3.5 µm) の 2 種類を推奨カラムとして提示し、最適化条件に基づき妥当性確認を行った。

C-4-1-3-2 データスクリーニングと外れ値検定

15 機関すべてで前処理フローは同一だったが、装置仕様により分離条件が異なった。データスクリーニングでは、カラム種・温度・流速が異なる 4 機関 (E, G, A, F) を除外し、11 機関のデータを採用した。

これら进行分析カラム (ACQUITY/Xselect) 別に分け、イボテン酸は絶対検量線、ムスカリンクロリドとムシモールは絶対検量線法と内

部標準法の両方を用い、計 10 データセットを妥当性確認の対象とした。Cochran 検定と Grubbs 検定を行った結果、いずれのデータセットにも外れ値は認められなかった。

C-4-1-3-3. 妥当性確認の結果

ムスカリンクロリドとイボテン酸の真度・併行精度・室間精度・HorRat は、ACQUITY と Xselect のどちらのカラムでも農水省ガイドラインに適合した。ムシモールは真度が 80% 未満だったが、精度指標は基準を満たした。

真度低下の原因を調べるため、模擬試料の m/z 171 のプリカーサーイオンスキャンを行ったところ、ムシモール保持時間直後 (3.88→3.91 min) に大きな夾雑ピークが確認された。 m/z 260.3 から分子量 89 と推定され、アラニンと同定された。きのこシチュー原材料にはアミノ酸が多く含まれ、とくに高濃度のアラニンがイオン化抑制を引き起こし、ムシモールの真度を低下させたと考えられた。

C-4-1-3-4. 内部標準補正について

ムスカリンクロリドでは、ムスカリン-d9 による内部標準補正を用いることで一部機関で真度が向上し、室間精度と HorRat も ACQUITY/Xselect の両カラムで大きく改善した。安定同位体標識標準の使用は分析法の標準化に有効と示唆された。

一方、ムシモールは内部標準 MTY を用いると真度が低下した。ブランク試験溶液から作製したマトリックス標準では、0.01 g/mL の希釈で面積比が 122% となり、マトリックス希釈によりイオン化促進が弱まったことが確認された。保持時間直後にアラニン由来の大きな夾雑ピークが存在し、これがイオン化促進を引き起こして MTY の補正を乱し、真度低下につながったと考えられた。なお、この現象は令和 6 年度のシイタケ試験では見られず、きのこシチュー特有のマトリックスの影響と判断された。

C-4-2. 同定法

C-4-2-1. リアルタイム PCR 法によるドクツルタケ特異的遺伝子検査法の開発

C-4-2-1-1. テングタケ属子実体サンプルの菌種推定

本検査法の特異性試験に供するため、ご提供いただいたテングタケ属と思われる子実体か

らゲノムを抽出し、ITS 周辺塩基配列および rpb2 遺伝子配列の増幅・解析を行い、データベース上の配列情報と照会した。その結果、少なくとも片方の配列がデータベース上に登録されている配列と $\geq 99.0\%$ の相同性を示した 64 個体について、それぞれ 47 種の菌種として推定した。

C-4-2-1-2. ドクツルタケ遺伝子検査法の特異性確認

今年度新たに追加した 23 種を含むテングタケ属 47 種のゲノムを用いて、改めてリアルタイム PCR 法 (TaqMan 法) によるドクツルタケ遺伝子検査法の特異性を確認した。なお本検査法に使用するプライマー・プローブセットは昨年度の検討 (テングタケ属 443 種の ITS 周辺配列を用いて BLAST_TSN 解析) に基づいて設計されたものだが、今年度新たに 85 種を追加した計 528 種の ITS 周辺塩基配列を用いた BLAST_TSN 解析を行ったが、同様の結果となっている。

特異性試験の結果を図 C-4-1 に示す。新たに入手した *Amanita rimosa* やクロタマゴテングタケ、タマゴタケモドキといったドクツルタケ近縁種においても増幅は確認されなかったことから、ドクツルタケへの高い特異性が示唆された。

C-4-2-1-3. デジタル PCR によるドクツルタケ陽性コントロールプラスミドの定量

ドクツルタケ陽性コントロールプラスミドを 0.1~100 fg/ μ L の段階希釈で PCR に供し、陰性・陽性ドロップレット数を測定してコピー数を算出した。得られた各濃度のコピー数を平均した結果、本プラスミドの重量当たりコピー数は 127.8 コピー/fg と求められた。

C-4-2-1-4. ドクツルタケ遺伝子検査法の検出限界および増幅効率評価

陽性コントロールプラスミドを用いて検出限界を評価したところ、95% 以上の検出率を示す最小濃度は 6.4 コピー/ウェルであった (図 C-4-1 A)。増幅効率の評価では、プラスミド (6.4~63,900 コピー/ウェル) の C_q 値は $R^2 = 0.9897$ 、効率 91.0% と良好な直線性を示した (図 C-4-1 B)。さらに、ドクツルタケのゲノム DNA (0.5 pg~50 ng/ウェル) で

も $R^2 = 0.9992$ 、効率 96.9%と高い直線性が得られた (図 C-4-1 C)。

これらより、昨年度開発したリアルタイム PCR によるドクツルタケ特異的遺伝子検査法は、高い特異性・十分な感度・広い濃度範囲で安定した増幅効率を有することが確認された。

C-4-2-1-5. ゲノム熱分解による検出性能への影響

ドクツルタケのゲノム DNA を加熱処理すると、電気泳動でバンドが低分子側へ移動し、熱分解が確認された (図 C-4-2 A)。この DNA を用いて、本検査法 (増幅長 89 bp) と ITS 領域 (671 bp) の増幅性を比較したところ、ITS は 95°C10 分までしか増幅されなかったのに対し、本検査法は 95°C60 分処理後でも増幅が可能であった (図 C-4-2 B)。

この結果から、本検査法は加熱調理済み食品や吐しゃ物など、断片化した DNA でも検出性能を維持できると示唆された。従来の ITS 増幅は 600–700 bp と長く、断片化 DNA には不向きである一方、本検査法は短い増幅領域を用いるため、食中毒時の原因毒きのこ同定に有効と期待される。

C-4-2-2. リアルタイム PCR 法を用いたイボテングタケ特異的検査法の開発

C-4-2-2-1. BLAST_TSN を用いたイボテングタケ特異的な塩基配列の探索

ドクツルタケ同様に、テングタケ属 528 種の ITS 周辺塩基配列から、イボテングタケ以外の種に相同性の高い塩基配列を BLAST_TSN により選抜し、それら配列を除くことで、イボテングタケに特異的な塩基配列を探索した。その結果、複数のイボテングタケ特異的塩基配列が見出された (図 C-4-3)。

C-4-2-2-2. イボテングタケ特異的リアルタイム PCR の特異性評価

BLAST_TSN で得たイボテングタケ特異的配列を基にプライマーを設計し、テングタケ属 55 個体・47 種を対象に SYBR 法リアルタイム PCR を実施した。イボテングタケ 3 個体のみで明確な増幅が見られ、近縁種 (ウスキテングタケ、ベニテングタケ、オウテングタケ、*A. subglobosa*、テングタケ) では増幅なかったことから、高い特異性が示唆された (図 C-4-4)。

一部の非イボテングタケで $C_q > 35$ の弱い非特異的増幅が見られたが、昨年度のドクツルタケ検査法と同様、TaqMan 法に切り替えることで非特異的反応を抑制できる可能性が高い。適切な加水分解プローブを設計すれば、より高い特異性が期待される。

C-4-2-2-3. イボテングタケ 2 個体のゲノムアセンブリ

イボテングタケは芳香を持ち、主に消化器症状を起こす毒きのこで、形態や毒性成分が似たテングタケも国内に広く分布し、両者とも誤食事例がある。現在は ITS など部分配列で種推定が可能だが、全ゲノム配列は公的データベースに存在しない。

本報告では、国内で採取されたイボテングタケと推定される 2 個体について個別にゲノムアセンブリを行い、ゲノム情報の取得と個体間・種間の配列比較を実施した。

C-4-2-2-3-1. rpb2 領域の塩基配列による種推定

愛知県で採取された子実体サンプル No. 45, 46 より抽出した DNA を用いて、サンガーシーケンスにより 2 個体分の rpb2 領域を確認した。この配列について BLAST 検索を行い、NCBI データベースと照合した結果、本サンプルは学名 *Amanita ibotengutake* (*A. ibotengutake*) (Sequence ID:MH486051.1) と相同率が 99.84%および 96.36%であり、形態的特徴からも 2 個体とも *A. ibotengutake* と推定した。以降、本サンプルは個体識別のために【イボテングタケ③】および【イボテングタケ④】とした。

C-4-2-2-3-2. 全ゲノムシーケンス

得られた HiFi リードを用いたドラフトゲノム作成の検討フローを図 C-4-5 に示した。

【イボテングタケ③】は 1,736,913 リード、【イボテングタケ④】は 784,413 リードが得られた (表 C-4-1, C-4-2)。

Raw リードのアセンブリ (アセンブリ①) を BUSCO (bacteria_odb12) で評価したところ、Complete BUSCO は【③】で 99.1%、【④】で 12.1%となり、両サンプルに細菌由来リードが混入していると推測された。特に【③】は細菌リードが多いと判断され、続いてリードのフィルタリングを行った。

C-4-2-2-3-3. ミトコンドリアゲノムの探索
minimap2 を用いて、昨年度アセンブルした
テングタケ (NIHS テングタケ) ミトコンドリア
環状ゲノム (54,066 bp) にマッピングした
リードを回収した。ミトコンドリア由来と考
えられるリードは【イボテングタケ③】は
84,460 リード、【イボテングタケ④】は 77,302
リードであった (表 C-4-1, C-4-2)。また、昨
年度同様にこれらリードをアセンブリすると、
2 個体とも 56,395 bp で環状に繋がった。

C-4-2-2-3-4. リードフィルタリングとゲノムアセンブリ

Raw リードの BUSCO (bacteria_odb12)
結果から、特に【イボテングタケ③】で細菌由
来リードの混入が多いと判断され、細菌ゲノ
ムを鋳型にフィルタリングを実施した。【④】
についても同様に除去を行い、残存リードは
【③】で 1,650,055、【④】で 706,988 とな
った (表 C-4-1, C-4-2)。

さらにアセンブリ精度向上のため NanoFilt
により最適なトリミング条件を検討した結
果、【③】は read quality ≥ 30 ・最短 13,000
bp で 82,868 リード、【④】は read quality
 ≥ 30 ・最短 10,000 bp で 107,474 リードが得
られた。これによりアセンブリのコンティグ
数は【③】25 本、【④】16 本となった (表 C-
4-3)。

C-4-2-2-3-5. ドラフトゲノムの評価と比較
イボテングタケ③・④のドラフトゲノムを
BUSCO (fungi / basidiomycota /
agaricomycetes / agaricales / bacteria) で評
価したところ、両個体とも Complete BUSCO
が 91~98%と高く、担子菌門~ハラタケ目の
主要遺伝子が十分に網羅されていた (表 C-4-
4, C-4-5)。bacteria_odb12 の値も他のリファ
レンス (8.6~11.2%) と同程度で、特に③で
は細菌リードが適切に除去されたことが確認
された (表 C-4-6)。

D-GENIES による相同性比較では、まず本
研究でアセンブリした 2 個体間で高い相同
性が認められた (図 C-4-6 A)。さらに、同じ
テングタケ節のテングタケ (全長 39.9 Mb) と
は 1 箇所逆位が見られ (図 C-4-6 B, C-4-6
D)、ベニテングタケ (*A. muscaria*, 40.7 Mb)
ともコンティグ数の違いに関わらず全体的に

高い相同性を示した (図 C-4-6 C, C-4-6 E)。

C-4-2-2-3-6 イボテングタケのゲノムアセンブリの総括

イボテングタケは 2002 年に国内で新種登録
されたが、NCBI に全ゲノム情報がなく、類縁
毒きのことの比較や毒成分の遺伝的背景解明
のため、ゲノム取得は重要である。本研究では
2 個体のドラフトゲノムを構築し、BUSCO
による完全性評価と D-GENIES による比較
解析を行った。

得られたコンティグ数は【③】25 本、【④】
16 本で、ベニテングタケの 1000 本超と比べ
て大幅に高精度であった。また、マツタケ (コ
ンティグ 13 本) の染色体レベルに近い構造を
示し、担子菌類として十分な品質と判断され
た。子実体由来で他生物リードを含む試料か
ら高品質ゲノムを構築できた点は大きな進展
であり、今後の遺伝子検査法の改良や毒成分
の遺伝的解析に有用と考えられる。さらに
RNA-seq や遺伝子アノテーションを進め、全
遺伝子情報の取得も予定している。

C-5. 自然毒のリスクプロファイルの更新、消費者に対する効果的な情報提供方法の提案

自然毒のリスクプロファイル更新にあたり、
厚生労働省と協議のうえ決定した掲載項目に
基づき、動物性自然毒の内容を新知見に沿っ
て順次改訂している。更新では、様式・記載項
目の統一、より鮮明な写真の掲載、新情報の反
映、引用文献の整理を重点的に実施し、令和 7
年度は研究分担者の協力で巻貝 (フグ毒) など
を対象に作業を進めた。

「自然毒のリスクプロファイル」は消費者だ
けでなく、研究者・自治体・メディアなど幅広
い層が利用しており、多くの自治体が食中毒
情報ページで参考資料としてリンクを掲載し
ている。更新後は厚生労働省ホームページで
公開され、より有用な資料となることが期待
される。

D. 結論

D-1. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握

雑種ふぐの水揚げ状況は、宮城県及び神奈川
県においては引き続き多く混獲されており、

また宮崎県ではドクサバフグの混獲があった。しらす加工品に混入するふぐ仔稚魚の多くはシロサバフグであり、本種仔稚魚の毒性試験の結果は低毒力であった。

D-2. 国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立

令和7年度の研究では、M-toxin 類の構造確認、Neuro2A アッセイ試験、ホタテガイにおける蓄積部位および濃度の確認を行った。引き続き、令和8年度に当事業で M-toxin 類の Na⁺チャネルの阻害活性を確認することで、機器分析法導入時の測定対象を選定することが出来る。

二枚貝中の TTX は、これまでの知見と同じように夏～秋にかけて貝類中の濃度が上昇することを確認した。DNA メタバーコーディングにより、各季節にどのような餌を取り込んでいるかを明らかにした。同手法を用いて、引き続き TTX 生産生物を絞り込んでいく予定である。

D-3. 植物性自然毒（きのこ含む）の食中毒の発生動向の分析による効果的な防止策の提案

本研究では、ハーブ・スパイス中のピロリジジンアルカロイド (PAs) 汚染実態調査に向け、分析法の開発を行った。3-ヒドロキシフェニル基固定相カラムと、ギ酸アンモニウム含有メタノールをモディファイアとした SFC-MS/MS により、40 種の PAs をベースラインまたはピークトップで分離できた。性能評価でも良好な結果が得られ、本法がハーブ・スパイス中の PAs 分析に有用であることが示された。

さらに予備調査では、国内流通品の一部から比較的高濃度の PAs が検出され、今後はより多様な製品を対象とした汚染実態調査の必要性が示唆された。

D-4. 汎用性の高い植物性自然毒（きのこ）の分析法・同定法の確立

本研究では、毒きのこ食中毒の原因究明に資する分析法の妥当性確認として、昨年度に続きベニテングタケを用いたきのこシチューの室間共同試験を実施した。分析法 2 はムスカ

リン・イボテン酸・ムシモールの同定に問題はなく、ムスカリンクロリドとイボテン酸の定量はガイドラインに適合した。一方、ムシモールのきのこ由来アミノ酸の影響で定量値が低下し、内部標準 MTY もマトリックスによるイオン化促進を受け補正值を低下させた。内部標準には改善の余地があるものの、本法は実際の食中毒検査に適用可能と示された。

遺伝子検査法では、昨年度開発したドクツルタケ特異的リアルタイム PCR 法を評価し、高い特異性・十分な感度・広い濃度範囲で安定した増幅効率を確認した。加熱によるゲノム断片化にも耐性があり、従来の ITS 増幅法より実用性が高いことが示唆された。

さらにイボテングタケについて、ITS から特異的配列を抽出し設計した SYBR 法プライマーが高い特異性を示した。また、全ゲノムシークエンスと de novo アセンブリにより高品質なドラフトゲノムを構築した。得られた特異的配列とゲノム情報は、今後の PCR 法の特異性向上や毒成分の遺伝的背景解明に有用と期待される。

D-5. 自然毒のリスクプロファイルの更新、消費者に対する効果的な情報提供方法の提案

進行中の「自然毒のリスクプロファイル」の更新作業を完了させ、厚生労働省ホームページへの掲載を目指す。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Frontiers in Marine Science. 12:1437097. DOI: 10.3389/fmars.2025.1437097. 29 April 2025. Genetic differentiation between captive and wild populations induced by selective breeding in morphologically diverse *Takifugu* pufferfish. Nobuhisa Kajino, Hyoun-Joong Kim, Hyun-Ki Hong, Wan-Ok Lee, Hiroshi Takahashi, Kwang-Sik Choi, Hyung-Bae Jeon.
- 2) Food Safety. D-25-00021. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.D-25-00021Accepted. 20 April 2026, Occurrence of natural

interspecific hybrids in the pufferfish, genus *Takifugu*, and their tetrodotoxin-accumulating tissues. Ryohei Tatsuno, Hiroshi Takahashi.

- 3) Scientific Reports. 3276 (2026). DOI: 10.1038/s41598-025-31307-4. Accepted. 16 February 2026, Large-scale environmental DNA survey reveals niche axes of a regional coastal fish community. Yutaka Osada, Masaki Miya, Hitoshi Araki, Hideyuki Doi, Akihito Kasai, Reiji Masuda, Toshifumi Minamoto, Satoru Seino, Teruhiko Takahara, Satoshi Yamamoto, Hiroki Yamanaka, Mitsuhiro Aizu-Hirano, Keiichi Fukaya, Takehiko Fukuchi, Ryo O. Gotoh, Masakazu Hori, Midori Iida, Tomohito Imaizumi, Tadashi Kajita, Takashi Kanbe, Tanaka Kenta, Yumi Kobayashi, Tomohiko Matsuura, Hiroki Mizumoto, Hiroyuki Motomura, Hiroaki Murakami, Kenji Nohara, Shin-ichiro Oka, Tetsuya Sado, Hiroshi Senou, Koichi Shibukawa, Tomoki Sunobe, Hiroshi Takahashi, Koji Takayama, Katsuhiko Tanaka, Hisashi Yamakawa, Satoru Yokoyama, Seokjin Yoon, Michio Kondoh.
- 4) Food Control, 2025, 111251. DOI: 10.1016/j.foodcont.2025.111251. Optimal machine learning algorithm for prediction model for retention times of plant toxins. Masaru Taniguchi, Shoichiro Noguchi, Hidenobu Kawashima, Jun Sugiura, Tomoyuki Tsuchiyama, Tomiaki Minatani, Hitoshi Miyazaki, Kei Zaitzu.

2. 学会発表

- 1) 2025 年度日本魚類学会年会、2025 年 11 月 22 日 (土)、東京海洋大学、演題：日本産サバフグ属魚類 *Lagocephalus* 全 7 種およびそれらの雑種を迅速に判別できる新たな SNP マーカーセット、講演者：高橋 洋・安松篤紀・沖村未和子・柿岡 諒
- 2) 2025 年度日本魚類学会年会、2025 年 11 月 22 日 (土)、東京海洋大学、演題：自然下でのトラフグ属 2 種ペア間の交雑ダイナミクスに

関するゲノム分析、講演者：熊谷英紀・沖村未和子・武藤 望生・永野 惇・柿岡 諒・高橋 洋

- 3) 2026 年度水産海洋シンポジウム「水産資源解析×ゲノミクス=ゲノム水産資源解析：現代的統合と今後の展開」、2026 年 3 月 21 日 (土)、東京海洋大学、演題：自然種間交雑現象×集団ゲノミクス：トラフグ属魚類 2 種ペア間の交雑ダイナミクス、講演者：高橋 洋・熊谷英紀・沖村未和子・武藤 望生・永野 惇・柿岡 諒
- 4) 令和 8 年度日本水産学会春季大会、2026 年 3 月 26 日 (木)、東京海洋大学、演題：トラフグとマフグの雑種における部位別テトロドトキシン含量、講演者：辰野竜平・宮田祐実・福田 翼・古下 学・沼野 聡・渡邊龍一・鈴木敏之・高橋 洋
- 5) 漁場環境保全関係研究開発推進会議 赤潮貝毒部会 東日本貝毒分科会 (2025、仙台)、演題：我が国沿岸の二枚貝における麻痺性貝毒 C3 および C4 の蓄積について、講演者：沼野 聡、稲葉 彩、渡邊龍一、西村朋宏、毛利文香、宮村和良、加賀新之助、渡邊志穂、内田 肇、小澤真由、松嶋良次
- 6) 第 11 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2025、埼玉)、演題：LC-MS/MS を用いた麻痺性貝毒分析に関する研究、講演者：沼野 聡、内田 肇、小澤真由、松嶋良次、渡邊龍一
- 7) マリンバイオテクノロジー学会 (2025、広島) (優秀演題)、演題：二枚貝の rDNA の PCR 増幅を特異的に抑制する PNA clamp の開発、講演者：飯島巧望、山口晴生、大西浩平、夏池真史、渡邊龍一、小澤真由、内田 肇、沼野 聡、松嶋良次、鈴木敏之、足立真佐雄
- 8) 第 31 回 日本食品化学会 総会・学術大会 (2025、滋賀)、演題：LC-MS/MS を用いた毒化ホタテガイ中の麻痺性貝毒組成の解析、講演者：沼野 聡、渡邊龍一、内田 肇、小澤真由、松嶋良次、鈴木敏之
- 9) 第 121 回 食品衛生学会 学術講演会 (2025、東京)、演題：アサリにおける麻痺性貝毒代謝物 (M1) の精製法と毒性評価、講演者：土方悠希、長谷川晶子、沼野 聡、渡邊龍一、小澤真由、内田 肇、松嶋良次、鈴木敏之、安井善宏
- 10) 第 62 回 全国衛生化学技術協議会 年会

(2025、群馬)(優秀演題賞)、演題：麻痺性貝毒代謝物 M-toxin の精製法と毒性評価、講演者：土方悠希、長谷川晶子、沼野 聡、渡邊龍一、小澤真由、内田 肇、松嶋良次、鈴木敏之、安井善宏

11) 日本農芸化学会 2026 年度 京都大会(2026、京都)、演題：サキシトキシン類縁体 M8 の化学誘導と生物活性およびホタテガイからの同定、講演者：佐藤真友、蒲生賢志、沼野 聡、渡邊龍一、長 由扶子、工藤雄大、此木敬一、山下まり

12) 令和 8 年度日本水産学会春季大会(2026、東京)(優秀演題)、演題：北海道産ホタテガイのフグ毒による毒化状況ならびに餌生物の網羅的解析、講演者：飯島巧望、渡邊龍一、沼野聡、小澤真由、内田 肇、松嶋良次、鈴木敏之、夏池真史、水上卓哉、大西浩平、山口晴生、足立真佐雄

13) 第 62 回全国衛生化学技術協議会年会、2025 年 11 月(高崎市)、演題：「植物性自然毒に係る諸外国の規制等及び健康被害事例の調査研究」、講演者：望月龍、志田(齊藤)静夏、登田美桜、鈴木敏之、堤智昭

14) 第 121 回日本食品衛生学会学術講演会、東京都、2025 年 10 月、演題：LC-MS/MS によるわが国の主な毒きのこの多成分同時分析法の開発、講演者：友澤潤子、南谷臣昭、竹内浩、谷口賢、山口瑞香、野村千枝、吉岡直樹、阿部尚仁、鈴木敏之、登田美桜

15) 第 62 回全国衛生化学技術協議会年会、高崎市、2025 年 11 月、演題：有毒きのこの模擬調理試料を用いた試験室間共同試験(アマニタトキシン)、講演者：竹内浩、南谷臣昭、小郷沙矢香、木村亜莉沙、佐原甲一、有沢拓也、川端陽子、藤田結美、細野加芳、深津浩佑、茅原田一、原有紀、鈴木敏之、登田美桜、遠藤利加

16) 第 62 回全国衛生化学技術協議会年会、高崎市、2025 年 11 月、演題：有毒植物による食中毒対応を目的とした血清中植物毒成分の分析法の検討、講演者：谷口賢、川島英頌、土山智之、南谷臣昭、野口昭一郎

17) 第 62 回全国衛生化学技術協議会年会、高崎市、2025 年 11 月、演題：リアルタイム PCR 法によるドクツルタケ特異的遺伝子検知法の

開発、講演者：成島純平、杉野御祐、吉場聡子、曾我慶介、柴田識人

18) 第 56 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、岐阜市、2025 年 11 月、演題：LC-MS/MS による食中毒原因植物性自然毒の多成分迅速分析法の開発、講演者：南谷臣昭、谷口賢、友澤潤子、竹内浩、太田康介、高橋正幸、登田美桜

19) 日本薬学会第 146 年会(シンポジウム「有毒植物による健康被害と薬学の役割」)、吹田市、2026 年 3 月、演題：LC-MS/MS による植物性自然毒の包括的定量分析法の開発に向けた取り組み、講演者：南谷臣昭

3. 行政関係者向け説明会

1) 令和 7 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会、神戸市、2025 年 11 月、演題：毒きのこの遺伝子検査法に関する取り組み、講演者：柴田識人

2) 令和 7 年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸支部衛生化学部会、岐阜市、2026 年 2 月、演題：令和 7 年度地域保健総合推進事業 精度管理に用いた試験法の性能評価、講演者：竹内浩、南谷臣昭、遠藤利加

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

1. 特許取得

1) トラフグ属魚類の種又は雑種判別方法、特許、特許第 7791518 号(P7791518)、令和 3 年 11 月 10 日、令和 7 年 12 月 16 日、発明者：高橋洋・柿岡 諒、特許権者：国立研究開発法人水産研究・教育機構

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 B-4-1. 参照した NCBI genome assembly 情報

	NCBI ベニテングタケ	NCBI シイタケ	NCBI マツタケ
GenBank No.	GCA_000827485	GCA_021015755	GCA_026075535
Taxon	Amanita muscaria Koide BX008	Lentinula edodes (shiitake mushroom)	Tricholoma matsutake
全コンティグ数	1,101	128	13
全塩基長 (bp)	40,699,759	45,594,472	161,040,721
最短塩基長 (bp)	1,011	2,320	9,869,253
平均塩基長 (bp)	36,966.20	356,206.80	12,387,747.80
最大塩基長 (bp)	1,491,530	2,350,089	19,249,005
N50	168,151	692,557	12,376,747
N50 リード数	54	22	6
GC (%)	41.86	46.17	45.5

表 C-4-1. イボテングタケ③のリードフィルタリング結果

イボテングタケ①	Raw リード	フィルタ I		フィルタ II		フィルタⅢ後のリード
		フィルタ I 後のリード	ミトコンドリア由来リード	フィルタ II 後のリード	細菌由来リード	
全リード数	1,736,913	1,652,453	84,460	1,650,055	2,398	82,868
全長	18,122,775,340	17,260,935,317	861,840,023	17,235,129,469	25,805,848	1,183,070,833
塩基長	最短	135	3,397	135	4,925	13,000
(bp)	平均	10,433.90	10,204.10	10,445.20	10,761.40	14,276.60
	最大	28,814	19,672	28,814	19,847	21,412
N50	10,604	10,619	10,325	10,618	10,995	14,073
N50 リード数	8,616	8,586	5,747	8,585	894	4,139
GC (%)	45.85	46.97	23.38	46.97	48.42	46.97

表 C-4-2. イボテングタケ④のリードフィルタリング結果

イボテングタケ②	Raw リード	フィルタ I		フィルタ II		フィルタⅢ後のリード
		フィルタ I 後のリード	ミトコンドリア由来リード	フィルタ II 後のリード	細菌由来リード	
全リード数	784,413	707,111	77,302	706,988	123	107,474
全長	7,376,425,731	6,650,289,479	726,136,252	6,649,070,201	1,219,278	1,242,591,683
塩基長	最短	102	670	102	4,946	10,000
(bp)	平均	9,403.80	9,393.50	9,404.80	9,912.80	11,561.80
	最大	23,517	19,922	23,517	19,344	20,633
N50	9,573	9,574	9,562	9,574	9,887	11,347
N50 リード数	8,025	7,960	5,555	7,958	51	5,145
GC (%)	44.65	46.96	23.5	46.96	50.16	46.95

表 C-4-3. フィルタリング前後におけるゲノムアセンブリ結果

	イボテングタケ③		イボテングタケ④	
	アセンブリ①*	アセンブリ②**	アセンブリ①*	アセンブリ②**
全コンティグ数	1,130	25	867	16
全塩基長 (bp)	73,587,993	41,065,779	59,740,335	41,188,258
最短塩基長 (bp)	11,234	10,645	11,151	10,645
平均塩基長 (bp)	65,122.10	1,642,631.20	68,904.70	2,574,266.10
最大塩基長 (bp)	7,563,569	4,179,306	4,305,046	4,277,001
N50	2,556,606	3,804,980	2,930,352	3,905,033
N50 コンティグ数	9	6	8	6
GC(%)	40.41	46.96	40.66	46.94

* : raw リードをリードフィルタリングなしでアセンブルしたもの

** : リードフィルタリングを施した後にアセンブルしたもの

表 C-4-4. イボテングタケ①のドラフトゲノム評価結果 (評価②**)

BUSCO データセット	fungi_odb12	basidiomycota_odb12	agaricomycetes_odb12	agaricales_odb12	bacteria_odb12
Complete BUSCOs (%)	97.9	97.6	95.1	91.1	9.5
Complete and single-copy BUSCOs (%)	97.0	96.8	94.6	90.7	9.5
Complete and duplicated BUSCOs (%)	0.9	0.7	0.6	0.4	0
Fragmented BUSCOs (%)	0.7	0.6	1.2	1.5	22.4
Missing BUSCOs (%)	1.4	1.8	3.6	7.4	68.1
Total BUSCO groups searched (n)	1122	2409	3398	3408	116

** : リードフィルタリングを施した後にアセンブルして BUSCO 評価したもの

表 C-4-5. イボテングタケ②のドラフトゲノム評価結果 (評価②**)

BUSCO データセット	fungi_odb12	basidiomycota_odb12	agaricomycetes_odb12	agaricales_odb12	Bacteria_odb12
Complete BUSCOs (%)	97.8	97.6	95.1	91.1	9.5
Complete and single-copy BUSCOs (%)	96.9	96.8	94.5	90.7	9.5
Complete and duplicated BUSCOs (%)	0.9	0.7	0.6	0.4	0
Fragmented BUSCOs (%)	0.8	0.6	1.2	1.5	22.4
Missing BUSCOs (%)	1.4	1.8	3.7	7.4	68.1
Total BUSCO groups searched (n)	1122	2409	3398	3408	116

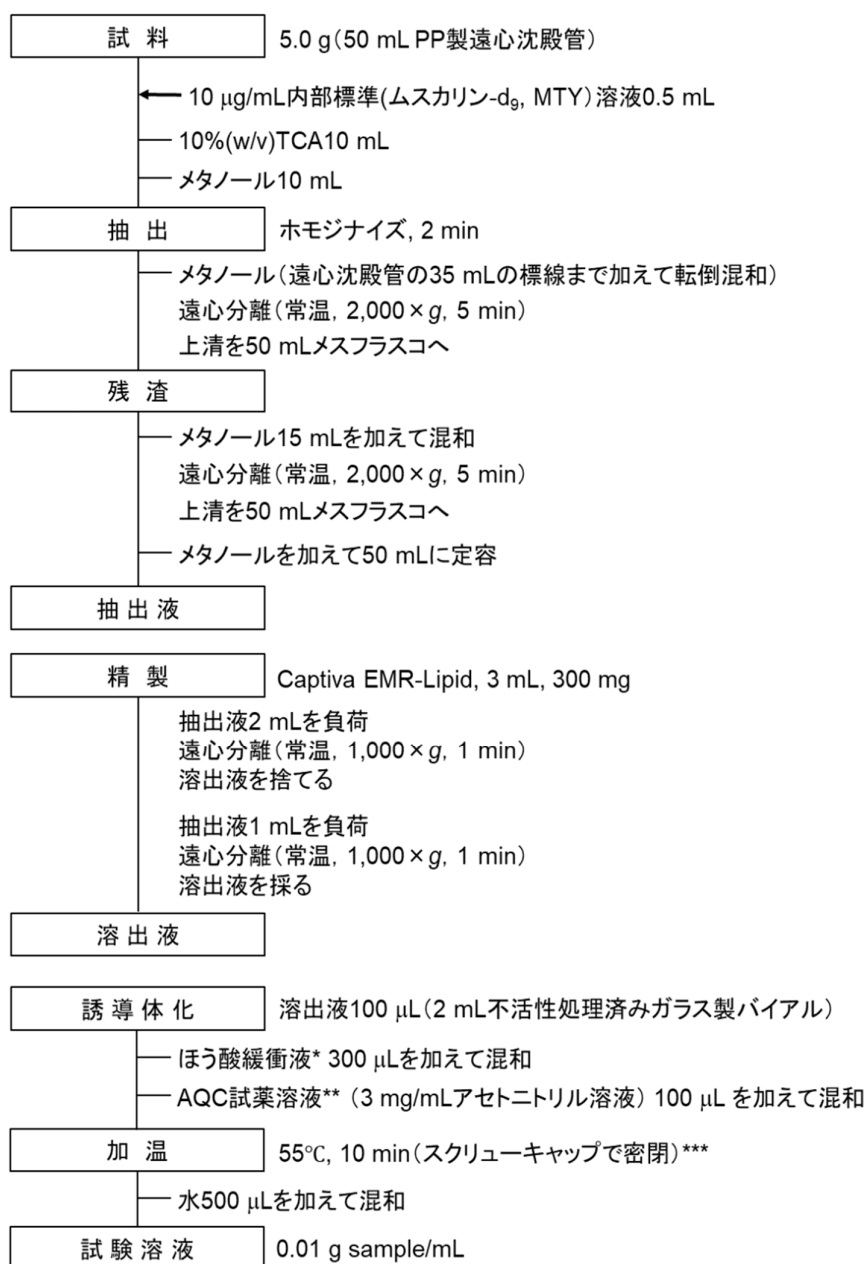
** : リードフィルタリングを施した後にアセンブルして BUSCO 評価したもの

表 C-4-6. *bacteria_odb12* を用いた BUSCO

BUSCO 解析対象	イボテンガタケ③		イボテンガタケ④		NIHS	NCBI	NCBI	NCBI
	コンティグ 評価①*	コンティグ 評価②**	コンティグ 評価①*	コンティグ 評価②**	テンガタケ	ベニテンガタケ	マツタケ	シイタケ
BUSCO データセット	<i>bacteria_odb12</i>							
Complete BUSCOs (%)	99.1	9.5	12.1	9.5	9.5	10.3	11.2	8.6
Complete and single-copy BUSCOs (%)	97.4	9.5	12.1	9.5	9.5	10.3	11.2	8.6
Complete and duplicated BUSCOs (%)	1.7	0	0	0	0	0	0	0
Fragmented BUSCOs (%)	0.9	22.4	22.4	22.4	16.4	16.4	15.5	25
Missing BUSCOs (%)	0	68.1	65.5	68.1	74.1	73.3	73.3	66.4
Total BUSCO groups searched (n)	116	116	116	116	116	116	116	116

* : raw リードをリードフィルタリングなしでアセンブルして BUSCO 評価したもの

** : リードフィルタリングを施した後にアセンブルして BUSCO 評価したもの



*APDSタグワコー用ほう酸緩衝液(富士フィルム和光純薬, 019-23151)を使用

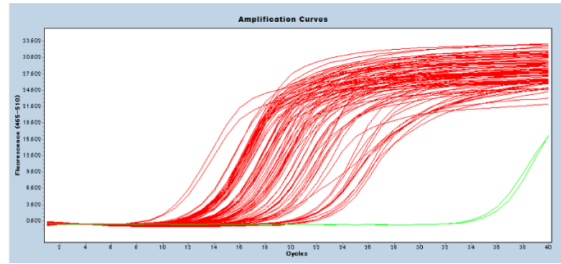
**AccQ•Tag™ Ultra Derivatization Kit (Waters, Part#. 186003836)を使用

AccQTag™ Ultra-2A (Reagent powder, 3 mg)にAccQTag™ Ultra-2B アセトニトリル100%を1 mL入れて1分間超音波で溶解

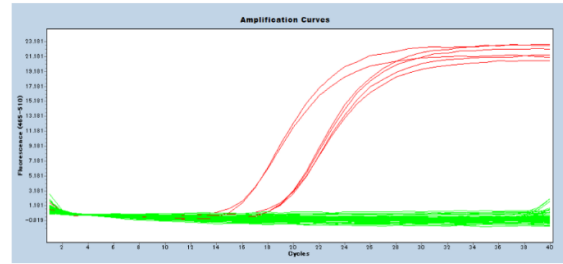
***バイアルをアルミブロックに入れて加熱

図 B-4-1 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 前処理操作フロー

A



B

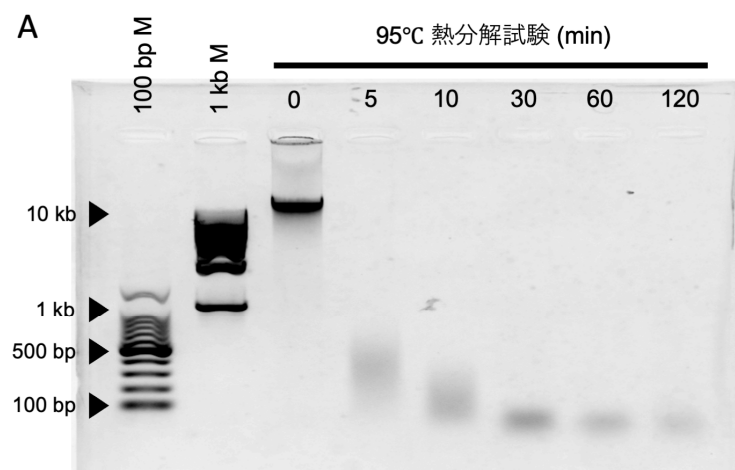


C

Name	Cq value ITS universal (SYBR)		Cq value <i>A. virosa</i> specific (TaqMan)	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
<i>Amanita detersa</i>	10.42	10.21	-	-
コガネテングタケ	13.70	13.67	-	-
<i>Amanita fritillaria</i>	14.53	14.55	-	-
<i>Amanita citrinoannulata</i>	13.58	13.57	-	-
ヘビキノコ	12.80	12.78	-	-
ガングタケ	15.01	15.01	-	-
ヘビキノコモドキ	11.42	11.43	-	-
テングタケモドキ	18.51	18.46	-	-
コタマゴテングタケ	21.81	21.81	-	-
コテングタケ	17.96	18.00	-	-
<i>Amanita rimosa</i> ① (2025, 兵庫)	12.78	12.81	-	-
<i>Amanita rimosa</i> ② (2025, 東京)	12.63	12.65	-	-
クロタマゴテングタケ	10.48	10.43	-	-
アケボノドクツルタケ① (2023, 北海道)	16.27	16.22	-	-
アケボノドクツルタケ② (2025, 福島)	12.93	13.01	-	-
ドクツルタケ① (2016, 北海道)	15.31	15.43	18.87	18.83
ドクツルタケ② (2022, 北海道)	13.58	13.60	15.58	15.51
ドクツルタケ③ (2024, 富士山)	14.80	14.90	18.73	18.75
タマゴタケモドキ	12.97	13.01	-	-
<i>Amanita molliuscula</i> ① (2023, 北海道)	23.11	23.18	-	-
<i>Amanita ovalispora</i>	19.71	19.78	-	-
<i>Amanita griseofolia</i>	14.96	15.03	-	-
<i>Amanita orienticrocea</i>	18.91	19.09	-	-
タマゴタケ	19.23	19.44	-	-
サトタマゴタケ① (2024, 東京)	16.79	16.94	-	-
キタマゴタケ① (2025, 福島)	13.67	13.78	-	-
ドウシントケ	13.42	13.50	-	-
タマゴテングタケモドキ	21.88	22.19	-	-
ミヤマタマゴタケ	22.04	22.14	-	-
ウスキテングタケ① (2012, 東京)	17.61	17.83	-	-
テングタケタマシ	14.66	14.82	-	-
ベニテングタケ① (2024, 富士山)	13.31	13.54	-	-
オウテングタケ	16.11	16.20	-	-
イボテングタケ① (2011, 東京)	13.57	13.68	-	-
<i>Amanita subglobosa</i>	12.27	12.49	-	-
テングタケ① (2025, 大阪)	13.53	13.34	-	-
ヒメコナカプリツルタケ	17.71	17.88	-	-
ハイカグラテングタケ	13.07	12.99	-	-
<i>Amanita vestita</i>	15.60	15.69	-	-
コトヒラシロテングタケ	16.62	16.58	-	-
<i>Amanita alboradicata</i>	14.33	14.48	-	-
シロオニタケ	12.85	13.01	-	-
タマシロオニタケ	16.03	16.17	-	-
ニオイドクツルタケ	19.00	19.06	-	-
コテングタケモドキ	21.28	21.58	-	-
シロテングタケ	22.62	22.83	-	-
アオミドリタマゴテングタケ	15.65	15.66	-	-
スオウシロオニタケ	15.92	15.99	-	-
フクロツルタケ	16.33	16.65	-	-
<i>Amanita lanigera</i>	16.30	16.67	-	-
シロウロコツルタケ	13.26	13.60	-	-
滅菌水	>35.00	>35.00	-	-

図 C-4-1. ドクツルタケを標的としたリアルタイム PCR 法の特異性試験結果

テングタケ属 51 個体 47 種のゲノムを用いて特異性試験を実施した。(A) ITS ユニバーサルプライマーを用いた陽性対照試験 (SYBR 法) と、(B) ドクツルタケ特異的 PCR 法 (TaqMan 法) を実施した (n=2)。(C) 特異性試験に使用したゲノムと Cq 値一覧を示す。35 サイクル以降で増幅した場合は Cq 値が付かないため、>35 と表記。-は不検出。



B

95°C (min)	Cq value ITS universal (SYBR)		Cq value <i>A. virosa</i> specific (TaqMan)	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
0	16.73	16.85	20.51	20.18
5	26.73	26.74	22.28	22.12
10	29.55	29.58	23.53	23.62
30	-	-	28.75	28.77
60	-	-	31.43	31.04
120	-	-	-	-

図 C-4-2. ドクツルタケ特異的検知法の熱分解試験

(A) 熱処理したドクツルタケゲノム DNA のアガロース電気泳動像。

(B) 熱処理したドクツルタケゲノム DNA を用いたリアルタイム PCR 結果。 - は不検出。

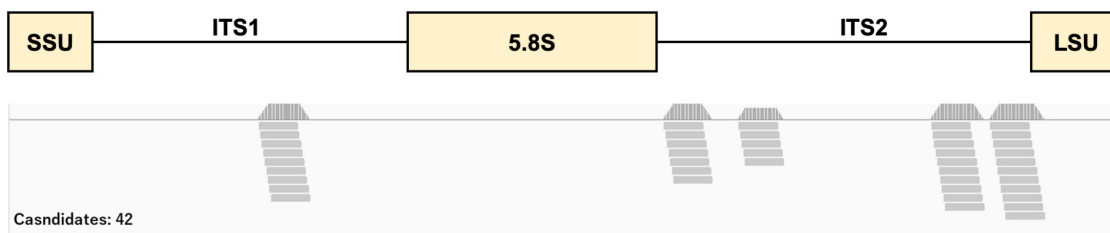
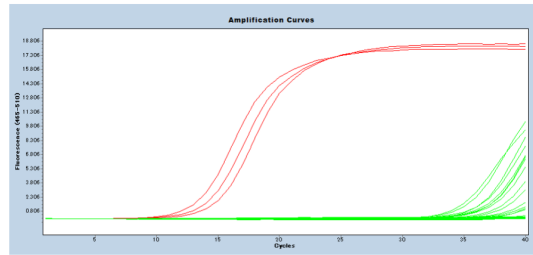


図 C-4-3. BLAST_TSN 解析によるイボテングタケ特異的配列の同定

BLAST_TSN 解析で同定されたイボテングタケ特異的配列（25 塩基長）を元の ITS 周辺配列にアライメントすることで、イボテングタケ特異的な配列数および位置関係を可視化した。これらの情報を基に、Fwd/Rev プライマーを設計した。

A



B

Name	Cq value A. ibotengutake specific (SYBR)
<i>Amanita detersa</i>	-
コガネテングタケ	>35
<i>Amanita fritillaria</i>	-
<i>Amanita citrinoannulata</i>	>35
ヘビキノコ	>35
ガンタケ	>35
ヘビキノモドキ	-
テングタケモドキ	-
コタマゴテングタケ	-
コテングタケ	-
<i>Amanita rimosa</i> ① (2025, 兵庫)	>35
クロタマゴテングタケ	>35
アケボノドクツルタケ① (2023, 北海道)	>35
ドクツルタケ③ (2024, 富士山)	-
タマゴタケモドキ	>35
<i>Amanita molliuscula</i> ① (2023, 北海道)	>35
<i>Amanita ovalispora</i>	-
<i>Amanita griseofolia</i>	-
<i>Amanita orienticrocea</i>	>35
タマゴタケ	>35
サトタマゴタケ① (2024, 東京)	-
キタマゴタケ① (2025, 福島)	-
ドウシタケ	>35
タマゴテングタケモドキ	-
ミヤマタマゴタケ	>35
ウスキテングタケ① (2012, 東京)	>35
ウスキテングタケ② (2012, 東京)	-
ウスキテングタケ③ (2025, 福島)	-
ウスキテングタケ④ (2025, 大阪)	-
テングタケダマシ	-
ベニテングタケ① (2024, 富士山)	-
ベニテングタケ② (2025, 北海道)	-
ベニテングタケ③ (2025, 北海道)	-
オウテングタケ	-
イボテングタケ① (2011, 東京)	14.65
イボテングタケ② (2024, 長野)	13.87
イボテングタケ③ (2024, 愛知)	12.96
<i>Amanita subglobosa</i>	-
テングタケ① (2025, 大阪)	-
テングタケ② (2025, 宮城)	-
ヒメコナカブリツルタケ	-
ハイカグラテングタケ	-
<i>Amanita vestita</i>	-
コヒラシロオニタケ	-
<i>Amanita alboradicata</i>	-
シロオニタケ	>35
タマシロオニタケ	-
ニオイドクツルタケ	-
コテングタケモドキ	>35
シロテングタケ	-
アオミドリタマゴテングタケ	-
スオウシロテングタケ	-
フクロツルタケ	-
<i>Amanita lanigera</i>	>35
シロフクロツルタケ	-
滅菌水	-

図 C-4-4. イボテングタケ特異的リアルタイム PCR 法の特異性試験結果

テングタケ属 55 個体 47 種のゲノムを用いて特異性試験を実施した。(A) イボテングタケ特異的 PCR 法 (SYBR 法) の増幅曲線を示す (n=1)。(B) 特異性試験に使用したゲノムと Cq 値一覧を示す。35 サイクル以降で増幅した場合は Cq 値が付かないため、>35 と表記。-は不検出。

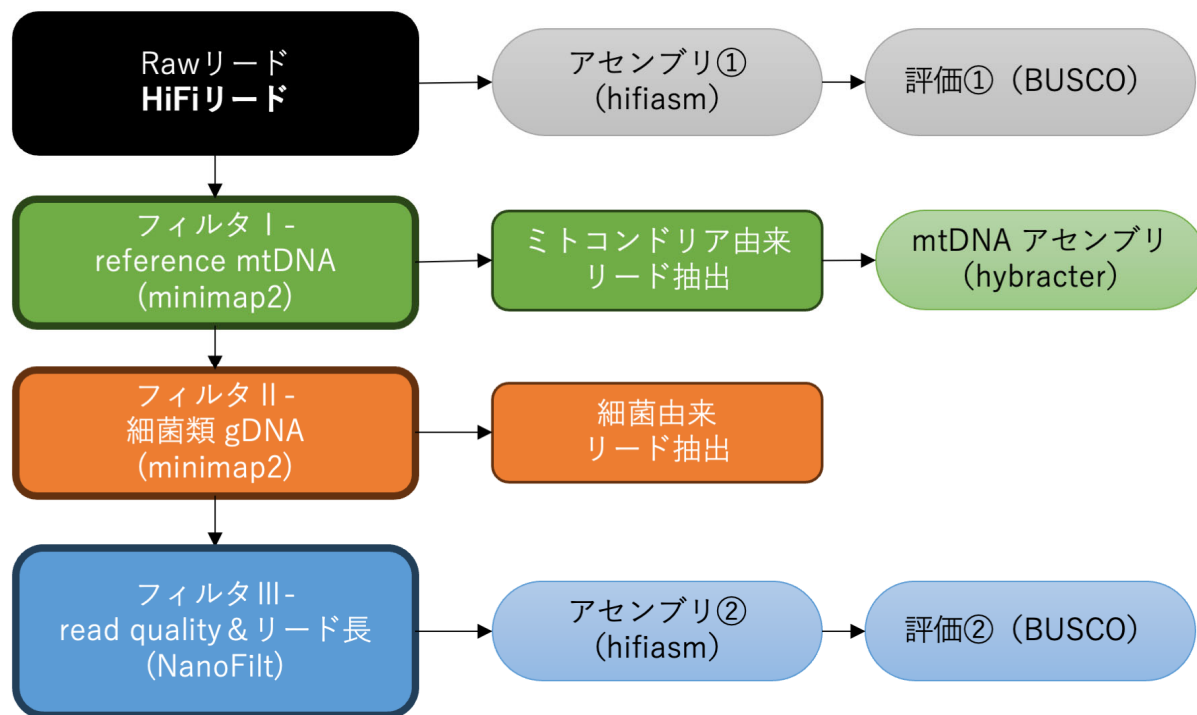


図 C-4-5. ゲノムアセンブリ検討スキーム

イボテングタケ 2 個体のドラフトゲノムを得るスキームを示した。HiFi リードを Raw リードとした。フィルタ I では minimap2 を使用してミトコンドリア DNA にマッピングするリードをミトコンドリア由来リードとして除いた。ミトコンドリア DNA 由来のリードは hybracter を用いてアセンブルした。続くフィルタ II では minimap2 によって細菌類ゲノム DNA にマッピングするリードを細菌由来リード（コンタミネーションリード）として除いた。フィルタ III では read quality 下限およびリード長下限を絞ることでアセンブリに使用するリード数を最適化した。Raw リード及びフィルタ III を経たリードを hifiasm でアセンブルし（アセンブル①または②）、BUSCO を使用してイボテングタケゲノムとしての完全性を評価した（評価①または②）。

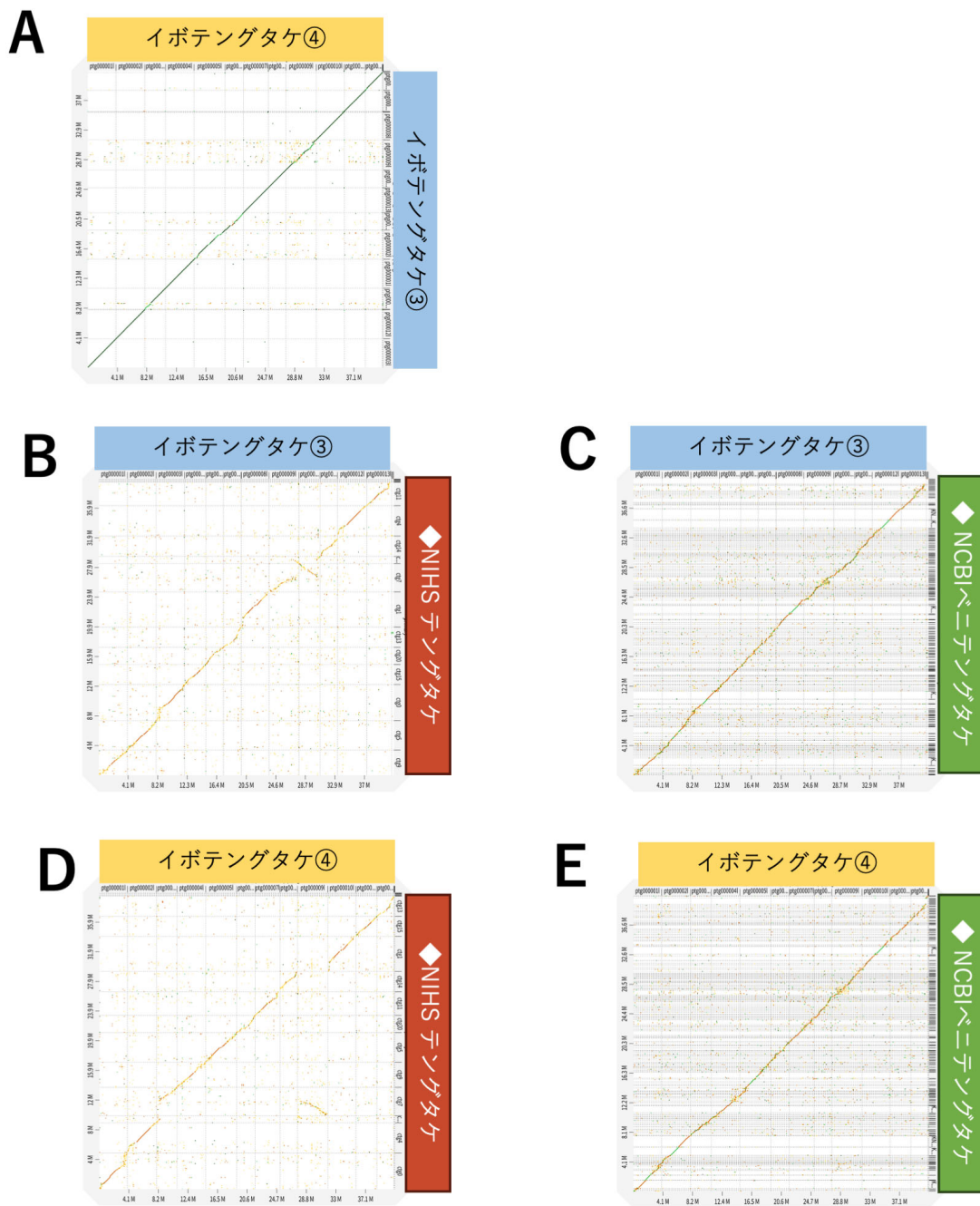


図 C-4-6. イボテングタケドラフトゲノムおよび近縁種ゲノムとの比較 (D-GENIES)

A : イボテングタケ④×イボテングタケ③、B : イボテングタケ③×テングタケ(NIHS)、C : イボテングタケ③×ベニテングタケ(NCBI)、D : イボテングタケ④×テングタケ(NIHS)、E : イボテングタケ④×ベニテングタケ(NCBI)。

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
（分担）研究報告書

食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
－雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握－

研究分担者 高橋 洋 水産大学校 教授
辰野竜平 水産大学校 准教授
渡邊龍一 水産技術研究所 安全管理グループ長
沼野 聡 水産技術研究所 任期付研究員
土方悠希 愛知県衛生研究所 医動物研究室 主任
内田 肇 水産技術研究所 主任研究員
小澤真由 水産技術研究所 研究員
松嶋良次 水産技術研究所 主幹研究員
鈴木敏之 北里大学 海洋生命科学部 教授
上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部 部長

研究協力者 長谷川晶子 愛知県衛生研究所 医動物研究室 室長
小栗健二 東京ふぐ卸売協同組合
長井遼太 東京都市市場衛生検査所検査課
白川祐一 東京都市市場衛生検査所検査課
長田泰幸 東京都市市場衛生検査所検査課
内藤義和 東京都市市場衛生検査所
大城直雅 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部 室長

研究要旨：ふぐをはじめとする海洋生物毒を有する魚介類の喫食による食中毒事例は毎年報告されており、死亡者も発生している。また、近年、温暖化による海水温の上昇の影響により、ふぐの漁獲海域の変化や雑種ふぐの発生による食中毒も懸念されている。また、しらす加工品に混入するふぐ仔稚魚（しらす混入ふぐ）については、その種構成や毒性の評価を通じて、適正な取り扱いが望まれている。本中課題では、国内の天然ふぐ水揚げ地において、水揚げされた天然ふぐにおける雑種ふぐの混獲率及び流通先における流通状況の調査、並びにしらす混入ふぐの種・雑種判別及び毒性試験を実施し、雑種フグやしらす混入ふぐの食品衛生上のリスク管理に資する知見を得ることを目的とした。今年度は、雑種ふぐ及びドクサバフグの水揚げ地における現地調査から、各地の雑種混獲率が0～14.77%と推定された。また、しらす混入ふぐ7,025個体について種・雑種判別を行った結果、フグ科魚類10種が見いだされ、そのうち約96%がシロサバフグであることが示された。シロサバフグ仔稚魚のうち332検体についてLC-MS/MSによるテトロドトキシン（tetrodotoxin, TTX）群の分析を行い、重量別（5～500 mg）及び複数地域の解析を実施した。さらに、TTXを検出した一部サンプルについては、我が国の検査法（参考法）であるマウス毒性試験を実施し、これらの結果から、食品衛生上のリスク評価の基礎データが得られた。

A. 研究目的

国内の主要な天然ふぐ水揚げ地において、雑種ふぐの混獲率及び流通先における流通状況を把握すること、また、しらす加工品に混入するふぐ仔稚魚（しらす混入ふぐ）について、その種構成や毒性を把握することは、ふぐ食の安全を確保する上で極めて重要である。そこで本研究では、国内の主要な天然ふぐ水揚げ

地における雑種ふぐの発生・流通状況を明らかにし、見いだされた雑種ふぐの毒性評価を行うこと、またしらす混入ふぐの種・雑種判別技術を開発し、その種構成や毒性評価を行うことを通じて、ふぐによる中毒被害を未然に防ぐための効果的な対策に資する知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 雑種ふぐ

調査地において水揚げされた選別前の天然ふぐについて外部形態に基づき種・雑種鑑別を行い、種組成及び雑種と思われる種類不明ふぐの個体数を数え、さらに各個体から DNA 試料を採取した。種類不明ふぐの一部については、生鮮状態で毒性試験用に皮、筋肉、肝臓、及び生殖腺に腑分けし、各組織の重量を測定した後、冷凍で実験室まで持ち帰った。また、水揚げ地市場からふぐを購入した水産加工業者等において聞き取り調査を行い、また購入したふぐの鑑別が可能であれば鑑別を行い、雑種フグの流通状況を調査した。

実験室において、雑種と思われる種類不明ふぐの DNA 試料（右胸鰭もしくは筋肉のエタノール固定試料）よりゲノム DNA を磁性ビーズまたはアルカリ法を用いた精製法により抽出した。抽出したゲノム DNA を鋳型として、自然毒等のリスク管理のための研究（21KA1005）」で開発した日本産トラフグ属魚類 11 種の種特異的一塩基多型（SNP）に基づく種・雑種判別マーカー（Takahashi et al., 2023）及び今年度開発した日本産サバフグ属魚類 7 種の同様の種・雑種判別マーカーについて、TaqMan アッセイによる遺伝子型決定を行い、種・雑種判別を行った。種・雑種判別結果に基づき、現地調査における種類不明フグの個体数などから雑種の混獲率を推計した。

(2) しらす混入ふぐ仔稚魚

しらすの主要な漁獲地である 10 海域からしらす混入ふぐ 7,025 個体を手し、顕微鏡下で外部形態に基づく属・種鑑別を行った後に、サバフグ属魚類及びトラフグ属魚類各種を含む 377 個体について魚体の一部から微量の DNA 試料を得た。DNA 試料からアルカリ法によってゲノム DNA を抽出した後、前述のトラフグ属魚類及びサバフグ属魚類の種・雑種判別マーカーに基づき種・雑種判別を行い、判別済み個体の残りの魚体を毒性評価用に水産技術研究所に送付した。

前年度及び今年度に DNA マーカーにより、シロサバフグ（国内 6 地点より採取）と判別した検体 332 検体について、次のとおり機器分析を実施した。シロサバフグの乾燥もしくは生原料について、重量を測定後、はさみとスパーテルを用いて細かく粉碎した。抽出は、重量に応じて 0.1%酢酸を添加後、ボルテックスで攪拌後に沸騰湯浴中で 10 分間加熱し

た。氷冷後、遠心分離して上清を得た。残渣に対して、0.1%酢酸を添加し、混合後に遠心分離で得られた上清を 1 回目の上清と混合し、重量に応じた一定量にメスアップした。フィルターろ過して得たる液を分析用バイアルに分注し、親水性相互作用（HILIC）カラムを用いた LC-MS/MS 分析を行った。LC-MS/MS における連続分析における感度低下やカラム分離不良を考慮し、標準物質を適宜測定することで、LOD（検出下限）及び LOQ（定量下限）を確認した。また、LC-MS/MS の分析によりテトロドトキシン（tetrodotoxin, TTX）が検出された検体のうち、10 検体をマウス毒性試験に供した。ブランクとして、TTX が検出されなかった 1 検体も試験に供した。食品衛生検査指針のマウス検定法（参考法）に従い、ddY 系マウス（オス、体重 19～21g）を用いて毒性評価をした。マウス検定法では、検液 1.0 mL を 3～5 匹のマウスに腹腔内投与することとなっているが、今回はろ液の抽出量の問題からマウス 1 匹に 0.9 mL の検液を投与した。フグ毒の致死時間-マウス単位（MU, 1 MU とは体重 20g のマウスが 30 分で死亡する毒量）換算表では、致死時間 25 分で 1.05 MU であるためエンドポイントを 30 分に設定した。なお、試験に先立って愛知県衛生研究所における動物実験委員会の承認を得た。

C. 研究結果

(1) 雑種ふぐ

宮城県、神奈川県、及び宮崎県において、漁獲された計 6 種 4,224 個体、2 種 249 個体、及び 5 種 177 個体を調査した結果、雑種混獲率はそれぞれ 14.77%、4.82%、及び 0%だった。なお、宮崎県ではドクサバフグ 7 個体の混獲があり、これらは漁業者により流通前に適切に排除されていた。

東京都卸売市場に搬入された種類不明ふぐ 8 検体を手し、外部形態的特徴をまとめた。8 検体の水揚げ地は宮城県 3 検体、神奈川県 2 検体、茨城県、千葉県、福島県各 1 検体であった。R6 年度以降、種類不明ふぐの搬入が少なく、年による種類不明ふぐの漁獲状況や出荷先の変動の可能性が示された。

(2) しらす混入ふぐ仔稚魚

外部形態に基づく属・種鑑別の結果、6,866 個体がフグ科魚類と鑑別され、そのうちモヨウフグ属の 2 個体を除く 6,864 個体がサバフグ属またはトラフグ属魚類だった。これら 2 属のうち外部形

態によって鑑別された各種を含む 377 個体について DNA マーカーによる種・雑種判別を行った結果、9 種に分けられ、雑種はいなかった。この結果と、外部形態による鑑別結果を合わせると、しらす混入ふぐのうち約 96% がシロサバフグと推定された。

今年度は、しらすへの混入率が高いものの、成魚ではほぼ無毒として知られているシロサバフグを中心に分析を実施した。シロサバフグ仔稚魚 332 検体の TTX について、LC-MS/MS による分析を行った結果、うち 60 検体が LOD (検出下限, 0.3~0.7 ng/mL) 以上であった (検出率 18.0%)。LOQ (定量下限, 0.9~2.4 ng/mL) 以上は 4 検体であった (検出率 3.0%)。全 332 検体のうち、最大濃度は 20.5 ng/g であり、1 MU = 220 ng とすると、0.09 MU/g に相当した。通知「フグの衛生確保について (昭和 58 年 12 月環乳第 59 号)」より、10 MU/g 以下の場合は食用に供しても健康を害するおそれがないと判断されるため、今回の結果である最大 0.09 MU/g は非常に低毒力と判断された。

TTX を検出したシロサバフグ仔稚魚 10 検体 (TTX 含量 3.5~20.5 ng/g、マウスユニット換算値 0.02~0.09 MU/g) について、マウス毒性試験に供したところ、全てのマウスがエンドポイント (30 分) まで生存した。また、ブランクとした TTX 不検出の抽出液についても、マウスが 30 分まで生存した。LC-MS/MS による分析対象以外の毒成分が含有していた場合、マウス毒性試験において評価することが出来る。しかし、今回の結果より、マウス毒性試験で毒力に影響する検出可能な量のフグ毒及びその類縁体などの化合物は含有していないと考えられた。

D. 考察

(1) 雑種ふぐ

今年度実施された 3 地点のうち、宮城県気仙沼市は、自然毒等のリスク管理のための研究 (21K A1005) 及び前年度の調査において、他の海域に比べて雑種混獲率が極めて高い海域だった (13.35~16.50%)。今年度の調査でも、雑種混獲率は引き続き 14.8% と高く、継続的な現地調査の必要性が示された。なお、この海域における雑種の多くは、シロサイフグとゴマフグ間の雑種であり、それらの毒性に関する定量的調査の結果、有毒部位は両親種と同様であることが示されている (Takahashi et al., in prep.)。

前年度、比較的多くの雑種が含まれる可能性が示唆されていた神奈川県横須賀市における雑種混獲率は 4.8% であり、R5 年度の 7.9%、R6 年度の 2.1% から変化しており、やはり他の海域に比べて高い雑種混獲率を示したことから、継続的な現地調査の必要性が示された。なお、この海域では、昨年度までと同様、トラフグとマフグ間の雑種のみが見られた。本組み合わせでは、皮の毒性が優性遺伝することが示唆されており (Tatsuno et al., 2019)、雑種を誤って皮が可食部位となっているトラフグとして流通させないよう注意が必要である。

サバフグ属魚類の主な水揚げ地の一つである宮崎県都農町で行われた現地調査では、5 種が確認され、雑種混獲率は 0% だったものの、通知「フグの衛生確保について (昭和 58 年 12 月環乳第 59 号)」において確実な排除が求められているドクサバフグ 7 個体の混獲があった。本種は近年愛知県でも 2 個体の漁獲が報告されていることから (中野・荒木, 2025)、漁獲・流通状況及びその仔稚魚のしらす混入状況に注視していく必要があると考えられる。なお、都農町における現地調査では、ドクサバフグは漁業者により適切に排除されていた。

以上のように、今年度の調査により、天然フグの主な水揚げ地のうち、雑種混獲率の高い海域における雑種及びドクサバフグの混獲率が明らかになった。

(2) しらす混入ふぐ仔稚魚

しらす混入ふぐの調査では、今年度開発されたサバフグ属魚類の種・雑種判別マーカーにより大幅に種・雑種判別の迅速化・簡便化が実現した。なお、トラフグ属とサバフグ属の仔稚魚の外部形態に基づく鑑別は、サバフグ属において体側下部に銀白色の帯が縦走することから容易だった。これらの方法に基づき、全国各地から集められたしらす混入ふぐについて種・雑種判別を行ったところ、その大半 (約 96%) はシロサバフグであることが明らかになり、また近年の回収事例のうち原因種の外部形態が明らかになっている 21 事例の全てが、外部形態より本種と考えられることから、しらす混入ふぐの適正な取り扱い上、本種の毒性評価が極めて重要であることが示唆された。

シロサバフグ仔稚魚 332 検体について TTX 群の LC-MS/MS 分析を行った結果、一部の個体から TTX を検出した。また、一部個体についてマウス毒性試験を実施した結果、設定したエンドポイン

ト (30 分) まで生存した。

前年度はナシフグ、シマフグ、シロサバフグの仔稚魚を分析したが、今年度はシロサバフグの仔稚魚を中心に分析をした。2 年間で全 440 検体のフグの仔稚魚を分析し、それぞれの個体を持つ TTX 毒量を算出した。ナシフグについては、全ての個体ではないが、TTX を有する個体が存在することが判明した。ただし、分析した個体数は少ないものの、2 MU/g 以下と毒力が低いため、リスクは少ないと思われる。一方、シマフグの仔稚魚は検査した 12 個体全てが TTX を有しており、そのうちの 3 個体が 10 MU/g を超えていた。ただし、個体あたりの毒量は最大でも 0.4 MU であり、非常に少ない。一方で、シロサバフグの仔稚魚は、ナシフグやシマフグの仔稚魚よりも毒力が低いことが明らかとなった。

豊洲市場塩干仲卸で組織する塩干魚業会私信によると、しらす加工品 10.4 kg にふぐ仔稚魚 1 個体という混入割合であること (桐明ら, 2016)、また本研究で得られたしらす混入ふぐの大半がシロサバフグであったことや、シロサバフグ仔稚魚が低毒力であったことより、しらす加工品に混入したシロサバフグ仔稚魚を摂食したとしても健康被害発生のリスクは低いと思われる。

次年度は、採取地域の拡大や多種のフグ仔稚魚の調査を行う予定である。

E. 結論

雑種ふぐの水揚げ状況は、宮城県及び神奈川県においては引き続き多く混獲されており、また宮崎県ではドクサバフグの混獲があった。しらす加工品に混入するふぐ仔稚魚の多くはシロサバフグであり、本種仔稚魚の毒性試験の結果は低毒力であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nobuhisa Kajino, Hyoun-Joong Kim, Hyun-Ki Hong, Wan-Ok Lee, Hiroshi Takahashi, Kwang-Sik Choi, Hyung-Bae Jeon. Genetic differentiation between captive and wild populations induced by selective breeding in morphologically diverse *Takifugu* pufferfish. *Frontiers in Marine Science*. 2025. 12:1437097. DOI: 10.3389/fmars.2025.1437097
- 2) Ryohei Tatsuno, Hiroshi Takahashi. Occurrence of natural interspecific hybrids in the pufferfish, genus *Takifugu*, and their tetrodotoxin-accumulating tissues. *Food Safety*. 2026. D-25-00021. DOI:

10.14252/foodsafetyfscj.D-25-00021

- 3) Yutaka Osada, Masaki Miya, Hitoshi Araki, Hideyuki Doi, Akihide Kasai, Reiji Masuda, Toshifumi Minamoto, Satoquo Seino, Teruhiko Takahara, Satoshi Yamamoto, Hiroki Yamanaka, Mitsuhiro Aizu-Hirano, Keiichi Fukaya, Takehiko Fukuchi, Ryo O. Gotoh, Masakazu Hori, Midori Iida, Tomohito Imaizumi, Tadashi Kajita, Takashi Kanbe, Tanaka Kenta, Yumi Kobayashi, Tomohiko Matsuura, Hiroki Mizumoto, Hiroyuki Motomura, Hiroaki Murakami, Kenji Nohara, Shin-ichiro Oka, Tetsuya Sado, Hiroshi Senou, Koichi Shibukawa, Tomoki Sunobe, Hiroshi Takahashi, Koji Takayama, Katsuhiko Tanaka, Hisashi Yamakawa, Satoru Yokoyama, Seokjin Yoon, Michio Kondoh. Large-scale environmental DNA survey reveals niche axes of a regional coastal fish community. *Scientific Reports*. 2026. 3276 (2026). DOI: 10.1038/s41598-025-31307-4

2. 学会発表

- 1) 2025 年度日本魚類学会年会、2025 年 11 月 22 日 (土)、東京海洋大学、演題：日本産サバフグ属魚類 *Lagocephalus* 全 7 種およびそれらの雑種を迅速に判別できる新たな SNP マーカーセット、講演者：高橋 洋・安松篤紀・沖村未和子・柿岡 諒
- 2) 2025 年度日本魚類学会年会、2025 年 11 月 22 日 (土)、東京海洋大学、演題：自然下でのトラフグ属 2 種ペア間の交雑ダイナミクスに関するゲノム分析、講演者：熊谷英紀・沖村未和子・武藤望生・永野 惇・柿岡 諒・高橋 洋
- 3) 2026 年度水産海洋シンポジウム「水産資源解析×ゲノミクス=ゲノム水産資源解析：現代的統合と今後の展開」、2026 年 3 月 21 日 (土)、東京海洋大学、演題：自然種間交雑現象×集団ゲノミクス：トラフグ属魚類 2 種ペア間の交雑ダイナミクス、講演者：高橋 洋・熊谷英紀・沖村未和子・武藤 望生・永野 惇・柿岡 諒
- 4) 令和 8 年度日本水産学会春季大会、2026 年 3 月 26 日 (木)、東京海洋大学、演題：トラフグとマフグの雑種における部位別テトロドトキシン含量、講演者：辰野竜平・宮田祐実・福田 翼・古下 学・沼野 聡・渡邊龍一・鈴木敏之・高橋 洋

G. 知的財産の出願・登録状況

- 1) トラフグ属魚類の種又は雑種判別方

法、特許、特許第 7791518 号(P7791518)、
令和 3 年 11 月 10 日、令和 7 年 12 月 16
日、発明者：高橋 洋・柿岡 諒、特許
権者：国立研究開発法人水産研究・教育
機構

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
（分担）研究報告書

食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
－国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立－

研究分担者	沼野 聡	水産技術研究所	任期付研究員
	渡邊龍一	水産技術研究所	安全管理グループ長
	足立真佐雄	高知大学	教授
	長澤和夫	東京農工大学	教授
	山下まり	東北大学	教授
	土方悠希	愛知県衛生研究所	医動物研究室 主任
	内田 肇	水産技術研究所	主任研究員
	小澤真由	水産技術研究所	研究員
	松嶋良次	水産技術研究所	主幹研究員
	鈴木敏之	北里大学	海洋生命科学部 教授
	長谷川晶子	愛知県衛生研究所	医動物研究室 室長
研究協力者			

要旨：近年、LC-MS/MS を用いた麻痺性貝毒の機器分析法の発達に伴い、毒化した二枚貝に代謝物（M-toxin 類）を含有していることが報告されている。公定法であるマウス毒性試験法から機器分析法へ移行を検討する際、M-toxin 類の構造や毒性を明らかにし、測定対象成分の標準品を確保することが重要となる。

今年度は、前年度までに確立した精製技術や化学誘導法を用いて M1、M3、M5-HA、M9、M10 の精製、M2 および M4 の不斉合成、M8 の化学誘導による調製、定量 NMR (qNMR) 法を用いた各 M-toxin 類の濃度決定、Neuro2A 細胞を用いた各 M-toxin 類の Na⁺チャネル阻害活性評価、毒化二枚貝中の M-toxin 類の含有量を調べた。その結果、一部の M-toxin 類に弱い Na⁺チャネル阻害活性が確認されると共に、毒化二枚貝中における M-toxin 類の含有量や蓄積部位が、貝種や時期によって異なることが明らかとなった。今後、機器分析法導入時に測定対象となる M-toxin 類を選定することが出来る見込みである。

また、近年、世界各国の沿岸域において、二枚貝から微量のフグ毒（tetrodotoxin, TTX）が相次いで検出されている。毒化原因生物は、オオツノヒラムシやアカハナヒモムシの関与が示唆されているが、食物連鎖や毒化機構の全容は明らかになっていない。また、麻痺性貝毒の機器分析法導入時に、TTX を測定対象とするかが重要となる。

今年度は、前年度に引き続き、北日本で採取したホタテガイ中腸腺に含まれる麻痺性貝毒と TTX の季節変動を LC-MS/MS で調べた。両者に相関はなく、本海域には麻痺性貝毒産生生物とは異なる TTX 産生生物が存在することを示唆するデータを得た。西日本のマガキを

対象とした試験でも、同様の結果を得た。二枚貝におけるメタバーコーディングによる餌生物解明において、ホタテガイ由来の rDNA 増幅を高効率で抑制する必要があったため、前年度にペプチド核酸 (PNA clamp) を設計した。今年度は、設計した PNA ならびにこれを用いた PCR 最適条件下で、18S rDNA V8-V9 領域を対象としたメタバーコーディングを行い、中腸腺に含まれる餌生物組成を解析した。その結果、渦鞭毛藻や単細胞緑藻等の微細藻類や、甲殻類やホヤ類等の動物が検出された。一方で、オオツノヒラムシやアカハナヒモムシなどの既報の TTX 保有生物は検出されなかった。また、16S rDNA V3-V4 領域を対象とした細菌組成解析では、*Synechococcus* 属のシアノバクテリアが大半を占めることが明らかとなった。

今後は、LC-MS/MS 分析で TTX 陽性になったサンプルについて、メタバーコーディングによって毒化原因生物の特定を行う予定である。

A. 研究目的

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish toxin, PST) は、サキシトキシン (saxitoxin, STX) を基本骨格として、異なる置換基を持つ C トキシンやゴニオトキシン (gonyautoxin, GTX) など約 70 種類が知られる化合物群である。わが国で毒化した二枚貝における主要成分として C1&2、GTX1~6、dcSTX (decarbamoyl STX)、neoSTX、STX などが知られてきた。加えて、約 20 年前には、Quilliam, M.らによって、国外の二枚貝中に含まれる新規類縁体として麻痺性貝毒代謝物 M-toxin 類の存在が提唱された。C1&C2 由来の M1、M3、M5、C3&4 由来の M7、M9、M11、GTX2&3 由来の M2、M4、GTX1&4 由来の M8、M10、M12 が存在すると提唱され、M1~M4 までが NMR による構造決定がなされた (Dell' Aversano, *J. Nat. Prod.*, 2012)。また、ヘミアミナール構造を有する M-toxin を構造決定し、M5-HA および M6-HA と命名している (Numano, Yotsu-Yamashita, *Chemosphere*, 2021)。それ以外の成分 (M5~12) については、詳細な構造情報が未だ不明である。M-toxin 類の構造上の特徴は、C11

位における脱硫酸体であり、11-hydroxy 体もしくは 11-dihydroxy 体となっていることである。M-toxin 類の毒性は未だ不明であると共に、認証標準物質が発売されていないため、LC-MS/MS による定性および定量が出来ない。よって、毒化二枚貝における麻痺性貝毒の毒力の算出が出来ない状況にある。令和 4 年度の本事業において、マウス毒性試験による毒力と LC-MS/MS から得られた毒値 (測定対象成分: C1, C2, GTX1~6, STX, TTX) から換算した毒力とが、一部乖離する結果となった。このことより、試料中に含まれる M-toxin 類が、毒力にある程度寄与している可能性が示唆された。LC-MS/MS で M-toxin 類を未測定とした場合、毒化試料中の毒力を過小評価する可能性がある。したがって、M-toxin 類の構造確認や毒性評価、二枚貝中における定性および定量が重要となる。

本事業では、二枚貝からの単離精製や化学誘導、不斉合成により調製した M-toxin 類について、毒性評価を行う。また、LC-MS/MS を用いて、M-toxin 類も含めた分析法を確立する。さらに、国内沿岸で毒化する主要な二枚貝 (ホタテガイ、ヒオウギガイ)

における M-toxin 類の含有量や蓄積部位について明らかにする。

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

近年、世界各国の沿岸域において、二枚貝から微量のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX) が相次いで検出されている。TTX は、フグや巻貝、カニ、ヒラムシ、ヒモムシなどに含有していることが知られているが、その食物連鎖や毒化機構の全容は明らかになっていない。また、麻痺性貝毒の機器分析法導入時に、TTX を測定対象とするかが重要となる。

本事業では、二枚貝中の TTX の餌生物を特定するために、北日本で採取したホタテガイ中腸腺および西日本で採取したマガキ中腸腺に含まれる麻痺性貝毒と TTX の季節変動を LC-MS/MS で調べた後、18SrDNA V8-V9 領域を対象としたメタバーコーディングを行うことで中腸腺に含まれる餌生物相を解析し、毒産生生物を絞り込む。また、二枚貝における TTX 含有量を継続的に調査する。

B. 研究方法

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

前年度までに確立した精製法を用いて、ホタテガイやヒオウギガイ、アサリから M1、M3、M5-HA、M9、M10 を得た。また、化学誘導法を検討し、市販の GTX1&4 の脱硫酸化を行い、M8 を得た。不斉合成は、令和 6 年度に M2 および M4 を得ていたが、酸化反応が完結出来なかったため、M2 と M4 の混合物を親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) カラム精製することで、それぞれの精製物を得た。マレイン酸を用いた定量 NMR (qNMR) 法により、得られた M-

toxin 類の濃度決定を行った。今年度、収量が十分であった M1、M3、M5-HA、M4 について、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞を用いた Na⁺チャネル阻害活性試験を行った。前年度には、同試験法において M2 や dcSTX、neoSTX、TTX を行ったため、得られた結果を基に各化合物の 50%効果濃度 (EC₅₀) を比較検討した。

M-toxin 類の含有量および蓄積部位については、前年度に引き続き、東日本で毒化したホタテガイを用いて調べた。凍結融解による組織汚染を防ぐために、産地より冷蔵で届いた検体を、部位別 (貝柱、中腸腺、腎臓、生殖腺、鰓) に解剖した。公定法に準じて、希塩酸抽出を行った後、既報 (Boundy et al. 2015, *J. Chromatogr.A* 1387, p1) に従って固相カートリッジ ENVI-Carb で精製したものを LC-MS/MS で分析した。

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

北日本で養殖されたホタテガイを定期的に採捕し、その中腸腺に含まれる麻痺性貝毒とテトロドトキシンの季節変動を調べた。ホタテガイ中腸腺は 2 個体を合一してホモジネートを調製し、半量をメタバーコーディング用に、残りの半量を LC-MS/MS による分析用に使用した。機器分析用のホタテガイ中腸腺ホモジネートの重量に対し、2 倍容の 1%酢酸溶液を添加し、混合した。遠心分離後に得た上清 0.4ml を、既報 (Boundy et al. 2015, *J. Chromatogr.A* 1387, p1) に従って固相カートリッジ ENVI-Carb で精製したものを LC-MS/MS で分析した。溶出液は適宜希釈して、LC/MS/MS 分析に供した。LC/MS/MS の分析条件は既報 (Boundy et al. 2015, *J. Chromatogr.A* 1387, p1) の条件

を最適化して用いた。TTX を含め、麻痺性貝毒標準品は、カナダの NRC が提供している認証標準物質を用いた。サキシトキシンのみ鏡像異性体を用いた。西日本のマガキについても同様に処理した。

また、前年度に 18SrDNA V8-V9 領域を対象としたメタバーコーディングによるホタテガイの餌生物の解明に先立ち、ホタテガイの rDNA の PCR 増幅抑制に有用なペプチド核酸 (PNA clamp、BlockptPNA) を設計した。今年度は、本 PNA を用いて、ホタテガイ中腸腺に含まれる餌生物組成を解明した。また、16S rDNA V3-V4 領域を対象とするメタバーコーディングにより、ホタテガイ中腸腺に含まれる細菌組成についても解明した。

C. 研究結果と考察

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

二枚貝からの精製や化学誘導によって得た M1、M3、M5-HA、M8、M9、M10 において、LC-MS/MS による MS/MS スペクトルや NMR スペクトルは、既報で構造決定や提唱されている構造を支持するものであった。また不斉合成によって得た M4 (M2 との混合物) は、HILIC カラムによる精製によって、M2 と M4 をそれぞれ分離することができ、既報の NMR スペクトルと一致した。

マレイン酸を用いた qNMR 法による定量によって、M1 : 41.4 μ M、M3 : 219 μ M、M4 : 492 μ M、M5-HA : 46 μ M と濃度決定した。それぞれの化合物を Neuro2A アッセイに供したところ、M1 : 167.89 $\pm$ 28.52 nM、M3 : 787.96 $\pm$ 95.60 nM、M4: 176.48 $\pm$ 24.12 nM、M5-HA: > 4,600 nM の 50%効果濃度 (EC₅₀) であった。前年度の M2 : 139.27 $\pm$ 36.68 nM

と合わせて、5 成分の Neuro2A アッセイを実施済みとなった。M3 は M1 の C11 位における dihydroxy 体、同じく M4 は M2 の C11 位における dihydroxy 体である。Neuro2A アッセイの結果より、dihydroxy 体の Na⁺チャネル阻害活性は、monohydroxy 体よりも弱くなる傾向があった。おそらく Na⁺チャネルの結合に際して、増加した-OH 基が障壁になっているものと考えられる。

一方で、M5-HA は、麻痺性貝毒の基本骨格 (6-5-5 員環) と異なり、特異的な骨格 (6-6-5 員環) を有する。今回の Neuro2A アッセイにより、3,250 nM で阻害活性が見られなかったことから、骨格の変化によって、Na⁺チャネルへの結合性が低下したのと考えられる。

GTX5 の C13 位が脱硫酸して STX になった場合、毒性が高くなることが知られている。同様に、M5-HA の C13 位が脱硫酸した M6-HA は、Na⁺チャネルの阻害活性を確認できる可能性がある。しかし、M6-HA は、既報 (Numano, Yotsu-Yamashita, *Chemosphere*, 2021) において、140 nM で試験を実施し、Na⁺チャネル阻害活性が確認出来なかった。次年度に合成予定の M6-HA および、精製で得られた M8~M10 について、Neuro2A アッセイを実施することで、M-toxin 類の EC₅₀ 値を得たいと考える。

M-toxin 類の含有量および蓄積部位については、ホタテガイで高毒化した場合と低毒化した場合で異なることが分かった。高毒化の際、M-toxin 類は中腸腺および腎臓に高濃度で蓄積しているが、生殖腺や鰓、外套膜、貝柱からも検出された。一方で、低毒化の際には、中腸腺と腎臓のみ検出された。高毒化した中腸腺は、全組成比において最大 70

～80%近くを M-toxin 類で占めることがあるが、低毒化の中腸腺では最大 40%であった。低毒化した場合は、毒化と共に M-toxin への変換および体外への排泄が進んでいると考えられた。一方で、高毒化した場合は、各部位へ毒が分布していくことが判明し、体外への排泄が遅くなることから、毒化の長期化が起きているものと考えられた。

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

北日本で採取したホタテガイについては前年度までの成果と同じく、夏～秋にかけて検出した。2023～2025 年の 9 月から 12 月のサンプルにおける TTX 濃度の最大は、2024 年 12 月に 5 m 層より採取された検体で、23.4 μg TTX eq./kg 中腸腺であった。麻痺性貝毒は春頃に *Alexandrium* 属の発生によって毒化し、初夏に最大濃度を迎えるため、季節が異なっている。加えて、麻痺性貝毒に比べて、非常に低濃度の蓄積であった。西日本で採取したマガキ中腸腺を分析したところ、北日本で見られた 9 月～12 月ではなく、麻痺性貝毒による毒化が落ち着いた 6 月下旬に TTX による毒化が見られた。TTX 濃度の最大は、2025 年 6 月に採取された検体で、101 μg TTX eq./kg 中腸腺であった。

中腸腺における 18S rDNA V8-V9 領域を対象としたメタバーコーディングの結果、渦鞭毛藻や単細胞緑藻等の微細藻類や、甲殻類やホヤ類等の動物が検出された。一方で、オオツノヒラムシやアカハナヒモムシなどの既報の TTX 保有生物は検出されなかった。また、16S rDNA V3-V4 領域を対象とした細菌組成解析では、*Synechococcus* 属のシアノバクテリアが大半を占めることが明らかとなった。いずれの結果も現時点では

検出割合であるため、今後定量 PCR 法を確立し、餌生物ならびに細菌の rDNA 量と TTX 濃度との関係などを明らかにし、TTX 生産生物の特定を行う予定である。

D. 結論

令和 7 年度の研究では、M-toxin 類の構造確認、Neuro2A アッセイ試験、ホタテガイにおける蓄積部位および濃度の確認を行った。引き続き、令和 8 年度に当事業で M-toxin 類の Na⁺チャネルの阻害活性を確認することで、機器分析法導入時の測定対象を選定することが出来る。

二枚貝中の TTX は、これまでの知見と同じように夏～秋にかけて貝類中の濃度が上昇することを確認した。DNA メタバーコーディングにより、各季節にどのような餌を取り込んでいるかを明らかにした。同手法を用いて、引き続き TTX 生産生物を絞り込んでいく予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

○ 沼野 聡、稲葉 彩、渡邊龍一、西村朋宏、毛利文香、宮村和良、加賀新之助、渡邊志穂、内田 肇、小澤眞由、松嶋良次、我が国沿岸の二枚貝における麻痺性貝毒 C3 および C4 の蓄積について、漁場環境保全関係研究開発推進会議 赤潮貝毒部会 東日本貝毒分科会 (2025、仙台)

○ 沼野 聡、内田 肇、小澤眞由、松嶋良次、渡邊龍一、LC-MS/MS を用いた麻痺性貝毒

分析に関する研究、第 11 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2025、埼玉)

G. 学会発表

○ 飯島巧望、山口晴生、大西浩平、夏池真史、渡邊龍一、小澤眞由、内田肇、沼野聡、松嶋良次、鈴木敏之、足立真佐雄、二枚貝の rDNA の PCR 増幅を特異的に抑制する PNA clamp の開発、マリンバイオテクノロジー学会 (2025、広島)、優秀演題

○ 沼野 聡、渡邊龍一、内田 肇、小澤眞由、松嶋良次、鈴木敏之、LC-MS/MS を用いた毒化ホタテガイ中の麻痺性貝毒組成の解析、第 31 回 日本食品化学会 総会・学術大会 (2025、滋賀)

○ 土方悠希、長谷川晶子、沼野 聡、渡邊龍一、小澤眞由、内田 肇、松嶋良次、鈴木敏之、安井善宏、アサリにおける麻痺性貝毒代謝物 (M1) の精製法と毒性評価、第 121 回 食品衛生学会 学術講演会 (2025、東京)

○ 土方悠希、長谷川晶子、沼野 聡、渡邊龍一、小澤眞由、内田 肇、松嶋良次、鈴木敏之、安井善宏、麻痺性貝毒代謝物 M-toxin の精製法と毒性評価、第 62 回 全国衛生化学技術協議会 年会 (2025、群馬)、優秀演題賞

佐藤真友、○ 蒲生賢志、沼野 聡、渡邊龍一、長 由扶子、工藤雄大、此木敬一、山下まり、サキシトキシン類縁体 M8 の化学誘導と生物活性およびホタテガイからの同定、日本農芸化学会 2026 年度 京都大会 (2026、京都)

○ 飯島巧望、渡邊龍一、沼野 聡、小澤眞由、内田 肇、松嶋良次、鈴木敏之、夏池真史、水上卓哉、大西浩平、山口晴生、足立真佐雄、北海道産ホタテガイのフグ毒による毒化状況ならびに餌生物の網羅的解析、令和 8 年度 日本水産学会 春季大会 (2026、東京)、優秀演題

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

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）

令和 7 年度 分担研究報告書

植物性自然毒の食中毒の発生動向の分析による効果的な防止策の提案

分担研究者 志田（齊藤）静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 第三室長

研究要旨

植物性自然毒の一種であり、海外においてハーブ・スパイス等での汚染事例が多く、健康被害も報告されているピロリジジナルカロイド (PAs) について、その汚染実態調査に向けた分析法開発を行った。ピロリジジナルカロイドは類似構造を有する化合物が多いことから、分離能の高い超臨界流体クロマトグラフィーを用いて検討した。オクタデシル基＋極性官能基、ジオール基及び 3-ヒドロキシフェニル基を固定相とするカラムを検討したところ、3-ヒドロキシフェニルカラムを用い、ギ酸アンモニウム含有メタノール溶液をモディファイアとしてグラジエント溶出することで、40 種の PAs についてベースライン分離又はピークトップ分離を達成できることが示された。さらに、分析法の性能評価試験から、40 種の PAs 全てで良好な直線性 ($R^2>0.99$) 並びに良好な真度・精度 (真度：84.9～101.3%，併行精度：2.0～16.3%，室内精度：3.0～16.7%) が確認され、本法はハーブ・スパイス中の PAs の汚染実態調査に有用な分析法であることが示された。また、予備調査の結果、我が国で流通するハーブ・スパイスにおいても比較的高濃度の PAs の含有が確認され、今後、より幅広い製品を対象とした汚染実態調査の必要性が示唆された。

研究協力者

望月龍

(国立医薬品食品衛生研究所 食品部)

A. 研究目的

植物性自然毒の摂取による食中毒事例は毎年報告されており、死亡者も発生している。諸外国では安全性の懸念から基準値の設定等の対策が講じられているものであっても、我が国では規制が設けられておらず、一般食品として流通している場合もある。本研究では、我が国で特に注意が必要と考えられる植物性自然毒について、国内流通食品の汚染実態を調査することを最終目的としている。昨年度実施した諸外国の植物性自然毒に関する規制や注意喚

起、健康被害事例等の調査の結果、ピロリジジナルカロイド (PAs) は諸外国においてハーブ・スパイス等の汚染事例が多く、健康被害が発生していることが示され、国内流通食品における汚染実態調査が必要であると考えられた。今年度は汚染実態調査に向けてハーブ・スパイス中の PAs 分析法の確立を目的とした。

B. 研究方法

1. 試料

ナツメグ、ターメリック、オレガノ、ローズマリー、サボリー、タイム、マジョラム、クミン、ディルシード及びセージをインターネットにより購入し、試料として用いた。

2. 試薬等

メタノールは富士フイルム和光純薬製の LC/MS 用を用いた。ギ酸アンモニウムは富士フイルム和光純薬製の HPLC 用を用いた。0.1 v/v% ギ酸メタノール溶液は Solstice Advanced Materials 製の LC/MS 用を用いた。硫酸は Merck 製の容量分析用を用いた。水／メタノール (1/1, v/v) は関東化学製の医薬品試験用を用いた。25 w/w% アンモニア水は Merck 製の LC/MS 用を用いた。水は超純水精製装置で精製したものを用いた。PAs の各標準品は PhytoLab 製を用いた (純度は表 1 に示す)。固相ミニカラムは Waters 製の Oasis MCX 及び Oasis MAX (ともに 500 mg/6 mL) を用いた。メンブランフィルターは Agilent 製の Captiva PTFE フィルターバイアル (孔径 0.22 µm) を用いた。

3. 装置

超遠心粉碎機は ZM200 (Retsch 製) を用いた。超純水精製装置は Milli-Q Integral 10 (Merck 製) を用いた。振とう機は SR-2DW (タイテック製) を用いた。遠心分離機はフロア型冷却遠心機 S700FR (久保田商事製) を用いた。ロータリーエバポレーターは N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000 (東京理化器械製) を用いた。

SFC-MS/MS は Nexera UC 及び LCMS-8060NX (ともに島津製作所製) を用いた。データ解析は LabSolutions (島津製作所製) を用いて行った。

4. 測定条件

(1) SFC 条件

カラム: Shim-pack UC-RP, UC-diol 及び UC-HyP (全て 3 µm, 2.1 mm i.d. x 150 mm, 島津製作所製)

カラム温度: 43°C

注入量: 1 µL

移動相: (A) CO₂, (B) 23 mM ギ酸アンモニウムメタノール溶液

流速: 1 mL/min

グラジエント: 0 分 (A:B=95:5) → 2 分 (A:B=95:5) → 18 分 (A:B=82:18) → 18.1 分 (A:B=60:40) → 23 分 (A:B=60:40) → 23.1 分 (A:B=95:5) → 25 分 (A:B=95:5)

BPR 圧力: 100 bar

BPR 温度: 50°C

メイクアップ溶液: 0.1 v/v% ギ酸メタノール溶液 (流速: 0.2 mL/min)

(2) MS 条件

イオン化法: ESI(+)

ネブライザーガス: 3 L/min

ヒーティングガス: 17 L/min

ドライイングガス: 3 L/min

インターフェイス温度: 400°C

DL 温度: 300°C

ヒートブロック温度: 500°C

CID ガス: Ar, 270 kPa

インターフェイス電圧: 1 kV

測定モード: SRM

トランジション: 表 2 のとおり

5. 標準溶液調製法

各 PAs 標準品をメタノールに溶解し 0.5 mg/mL の標準原液とし、メタノールで適宜希釈して用いた。

6. 試料粉碎法

オレガノは、試料量に応じ乳鉢又は孔径 0.50 mm のスクリーンを装着した超遠心粉碎機を用いて粉碎し、パウダー状にした。

その他の試料についてはパウダー状の製品をそのまま用いた。

7. 試験溶液調製法

試料 2.00 g に 0.1 mol/L 硫酸／メタノール (1/1, v/v) 10 mL を加え 10 分間振とうしたのち、 $3,430 \times g$ で 5 分間遠心分離した。残渣に 0.1 mol/L 硫酸／メタノール (1/1, v/v) 10 mL を加え 10 分間振とうしたのち、 $3,430 \times g$ で 5 分間遠心分離した。上清を合わせ、0.1 mol/L 硫酸／メタノール (1/1, v/v) で 20 mL に定容した。定容液 10 mL を、メタノール 5 mL 及び水／メタノール (1/1, v/v) 5 mL でコンディショニングした Oasis MCX に負荷した。Oasis MCX を水／メタノール (1/1, v/v) 5 mL 及びメタノール 5 mL で洗浄した。予め 25 w/w%アンモニア水／メタノール (1/49, v/v) 5 mL でコンディショニングした Oasis MAX を Oasis MCX の下に連結し、25 w/w%アンモニア水／メタノール (1/49, v/v) 10 mL で溶出した。溶出液をエバポレーターで濃縮し、窒素気流下で乾固した。メタノール 1 mL に溶解し、孔径 0.22 μm の PTFE メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

8. 分析法の性能評価

ナツメグを用い、確立した分析法の選択性、直線性、真度及び精度並びにマトリックスの影響を評価した。直線性の評価には、添加濃度 1, 5, 10, 50 及び 100 $\mu\text{g/kg}$ の 5 点からなるマトリックス検量線を用いた。真度及び精度は、添加濃度 1 $\mu\text{g/kg}$ において 1 日 2 併行の試験を 5 日間実施することにより求めた。マトリックスの影響は、1 ng/mL (添加濃度 1 $\mu\text{g/kg}$ に相当) の 40 種 PAs 標準溶液のピーク面積に対する、同濃

度の 40 種 PAs マトリックス標準溶液のピーク面積比を百分率 (%) で算出した。なお、マトリックス標準溶液は、ブランク試験溶液を「7. 試験溶液調製法」に従って調製後、溶媒を除去し、1 ng/mL の 40 種 PAs 標準溶液を加えて溶解することで調製した。

C. 研究結果及び考察

1. 分析カラムの検討

昨年度の LC-MS/MS を用いた検討では分離できない化合物があったため、今年度は分離能が高い超臨界流体クロマトグラフィ (SFC) を用いて検討を行った。オクタデシル基+極性官能基、ジオール基及び 3-ヒドロキシフェニル基を固定相とした Shim-pack UC-RP, UC-Diol 及び UC-HyP を用いて検討を行った (図 1)。モディファイアにはギ酸アンモニウム含有メタノール溶液を用いた。その結果、UC-RP では seneciphylline 及び spartioidine, 並びに senecionine-*N*-oxide 及び senecivernine-*N*-oxide が分離しなかった。UC-Diol では、seneciphylline 及び spartioidine はベースライン分離したものの、senecionine-*N*-oxide 及び senecivernine-*N*-oxide が分離しなかった。UC-HyP では、seneciphylline 及び spartioidine はベースライン分離し、senecivernine-*N*-oxide 及び senecionine-*N*-oxide はベースライン分離には至らなかったものの、ピークトップは分離した。これらの結果から、検討した 3 種の Shim-pack カラムの中では UC-HyP が最も良好な分離を示した。

次に、UC-HyP を用いてカラム温度について検討した (図 2)。40°C では retrorsine と senecivernine-*N*-oxide, 並びに usaramine と integerrimine-*N*-oxide が分離しなかった一

方で, lycopsamine と rinderine ではピークトップの分離が認められた. 45°C では retrorsine と senecivernine-*N*-oxide, 並びに usaramine と integerrimine-*N*-oxide が分離した一方で, lycopsamine と rinderine が分離しなかった. 43°C ではいずれも少なくともピークトップでの分離が認められ, 完全な重なりが認められなかったことから, カラム温度は 43°C が適切であると考えられた. 最適化した条件におけるクロマトグラムを図 3 に示す. 40 種の PAs についてベースライン分離又はピークトップ分離を達成できることが示された. 汚染実態調査ではより多くの PAs を分別定量できる必要があることから, Shim-pack UC-HyP を分析カラムとして用いることとした.

2. 試験溶液の調製

PAs 分析では, 一般に 0.05 mol/L 硫酸が抽出溶媒として用いられる. これは PAs の非 *N*-オキシド体が塩基性化合物であり, 酸性条件下でプロトン化すること, 及び *N*-オキシド体が比較的高い極性を有することに基づくものである. ドイツ連邦リスク評価研究所 (BfR) が公開しているはちみつ及びハーブティーを対象とした分析法においても 0.05 mol/L 硫酸が抽出溶媒として採用されている. しかし, これらの方法では抽出溶媒に有機溶媒が含まれていないことから, 食品試料によっては十分な抽出が得られない可能性がある. このため, 本検討では 0.1 mol/L 硫酸/メタノール (1/1, v/v) を抽出溶媒として用いた.

精製に用いる固相ミニカラムについては, 抽出液が pH 2 未満の含水溶媒であることから, シリカ系充填剤ではなく, 使用可能な pH 範囲が広いポリマー系充填剤を

選択した. また, PAs の非 *N*-オキシド体が塩基性化合物であることから, 逆相-強陽イオン交換型ミニカラムである Oasis MCX を用いて精製を行った. PAs を含む抽出液を Oasis MCX ミニカラムに負荷し, 水及びメタノールで洗浄後, 25 w/w%アンモニア水/メタノール (1/49, v/v) で溶出したところ, 全ての PAs で良好な回収率が得られた. しかしながら, 本操作のみでは夾雑成分の除去が不十分であった. そこで, 酸性夾雑成分の除去を目的として, 抽出液を Oasis MCX に負荷し, 水及びメタノールで洗浄後, 下部にポリマー系逆相-強陰イオン交換ミニカラムである Oasis MAX を接続し, 25 w/w%アンモニア水/メタノール (1/49, v/v) で PAs を溶出する方法とした.

3. マトリックスの影響

40 種 PAs を含有していないあるいは含有量が少ないことをあらかじめ確認したナツメグ, ターメリック, オレガノ及びローズマリーを用いてマトリックスの影響を検討した. 試料中濃度 1 µg/kg 相当における, 溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液の面積比を図 4 に示す. 化合物によって 57.1~216.3%と大きくマトリックスの影響を受けていることが示唆された. 本法は試料量 2.00 g を秤取し, そのうち 1.00 g 相当を精製に用いていることから, 分析に用いる試料量が多く, 測定に影響を与える夾雑物を十分に除去できなかったと考えられる. retrorsine-*N*-oxide, lycopsamine, intermedine, echinatine, rinderine 及び monocrotaline でマトリックス間の違いが多少見られたものの, 全体としてはマトリックス間で類似した傾向を示していた. 以上の結果から, 本法では溶媒標準溶液を用い

た絶対検量線法の適用が難しいと判断し、マトリックス検量線を採用することとした。

4. 分析法の性能評価

40 種の PAs を含有していないことをあらかじめ確認したナツメグを用いて分析法の性能評価を行った。

4.1. 選択性

ナツメグにおいては、妨害ピークは認められなかった。

4.2. 直線性

1–100 µg/kg における、マトリックス検量線(重み付け 1/x)の回帰式及び決定係数(R^2)を表 3 に示す。いずれの化合物においても 1–100 µg/kg の範囲で良好な直線性($R^2>0.99$)が確認された。

4.3. 真度及び精度

添加濃度 1 µg/kg において、1 日 2 併行の試験を 5 日間実施し、真度及び精度を評価した(表 4)。真度は 84.9–101.3%と良好な結果であった。併行精度は 2.0–16.3%、室内精度は 3.0–16.7%であり、良好であった。Heliosupine は併行精度及び室内精度ともに最も大きい値となった。Heliosupine ではマトリックスの影響が 57.1%と大きく(図 4)、夾雑物の影響を強く受けたことがばらつきの一因となった可能性が示唆された。

5. 汚染実態の予備調査

開発した分析法を用い、国内で流通するハーブ・スパイス中の PAs 汚染実態の予備調査を行った。試料は、EU の「食品及び飼料に関する緊急警告システム (RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed)」における検出事例を参考に選定した。また、2 及び 3 の検討結果から、定量はナツメグを用

いたマトリックス検量線を用いて行った。各 PA の定量結果及び PAs の合計値を表 5 に示す。ディルシード以外全ての試料から PAs が定量下限以上検出された。特に、オレガノ (2.で用いたものとは異なる試料)、クミン 2 及びセージについては 737.2–2,459.7 µg/kg と高濃度で検出され、EU の基準値を超過していた¹⁾。

D. 結論

本研究では、ハーブ・スパイス中の PAs の汚染実態調査に向け、分析法の開発を行った。3-ヒドロキシフェニル基を固定相とするカラムを用い、ギ酸アンモニウム含有メタノール溶液をモディファイアとした SFC-MS/MS 測定により、40 種の PAs についてベースライン分離又はピークトップ分離を達成した。さらに、分析法の性能評価の結果、本法の良好な性能が確認され、ハーブ・スパイス中の PAs の汚染実態調査に有用な分析法であることが示された。また、予備調査の結果、我が国で流通するハーブ・スパイスにおいても比較的高濃度の PAs の含有が確認され、今後、より幅広い製品を対象とした汚染実態調査の必要性が示唆された。

参考資料

- 1) Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 望月龍, 志田(齊藤)静夏, 登田美桜,
鈴木敏之, 堤智昭「植物性自然毒に係
る諸外国の規制等及び健康被害事例
の調査研究」第 62 回全国衛生化学技
術協議会年会, 2025 年 11 月(高崎市)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 PAs 標準品の純度一覧

化合物	純度 (%)
Senecionine	99
Senecionine- <i>N</i> -oxide	91
Retrorsine	100
Retrorsine- <i>N</i> -oxide	89
Seneciphylline	100
Seneciphylline- <i>N</i> -oxide	94
Senecivernine	92
Senecivernine- <i>N</i> -oxide	94
Senkirkine	99
Integerrimine	97
Integerrimine- <i>N</i> -oxide	94
Spartiodine	95.7
Spartiodine- <i>N</i> -oxide	91.1
Usaramine	94
Usaramine- <i>N</i> -oxide	100
Erucifoline	100
Erucifoline- <i>N</i> -oxide	94
Lycopsamine	99
Lycopsamine- <i>N</i> -oxide	100
Echimidine	80
Echimidine- <i>N</i> -oxide	99
Intermedine	99
Intermedine- <i>N</i> -oxide	96
Indicine	87
Indicine- <i>N</i> -oxide	100
Heliotrine	90
Heliotrine- <i>N</i> -oxide	100
Europine	87
Europine- <i>N</i> -oxide	95
Lasiocarpine	100
Lasiocarpine- <i>N</i> -oxide	95
Echinatine	87
Echinatine- <i>N</i> -oxide	99
Heliosupine	89
Heliosupine- <i>N</i> -oxide	100
Rinderine	100
Rinderine- <i>N</i> -oxide	99
Monocrotaline	100
Monocrotaline- <i>N</i> -oxide	91
Trichodesmine	100

表 2 Shim-pack UC-HyP における保持時間及び SRM 条件

化合物	保持時間 (分)	定量用		定性用	
		トランジション	CE	トランジション	CE
Senecionine	6.3	336.1 > 120.2	-29	336.1 > 94.3	-32
Senecionine- <i>N</i> -oxide	12.8	352.1 > 118.1	-36	352.1 > 94.1	-46
Retrorsine	12.1	352.0 > 120.2	-31	352.0 > 138.2	-31
Retrorsine- <i>N</i> -oxide	18.2	368.1 > 94.1	-45	368.1 > 118.2	-32
Seneciphylline	7.4	334.0 > 120.2	-32	334.0 > 94.1	-36
Seneciphylline- <i>N</i> -oxide	13.9	350.0 > 120.2	-33	350.0 > 94.1	-43
Senecivernine	5.9	336.0 > 120.1	-33	336.0 > 308.2	-27
Senecivernine- <i>N</i> -oxide	12.6	352.0 > 118.3	-32	352.0 > 94.2	-44
Senkirkine	13.0	366.0 > 168.3	-30	366.0 > 122.2	-33
Integerrimine	7.4	336.0 > 94.1	-35	336.0 > 120.3	-29
Integerrimine- <i>N</i> -oxide	13.8	352.1 > 118.3	-37	352.1 > 94.1	-42
Spartiodine	8.4	334.1 > 306.2	-26	334.1 > 120.2	-26
Spartiodine- <i>N</i> -oxide	14.7	350.0 > 118.1	-34	350.0 > 94.2	-40
Usaramine	13.3	352.0 > 120.1	-33	352.0 > 94.2	-42
Usaramine- <i>N</i> -oxide	19.1	368.0 > 94.1	-44	368.0 > 118.1	-35
Erucifoline	10.9	350.1 > 94.1	-37	350.1 > 120.1	-30
Erucifoline- <i>N</i> -oxide	17.6	366.1 > 118.1	-33	366.1 > 94.1	-42
Lycopsamine	15.8	300.1 > 156.3	-30	300.1 > 94.2	-27
Lycopsamine- <i>N</i> -oxide	16.8	316.1 > 172.2	-30	316.1 > 94.1	-38
Echimidine	10.0	398.0 > 120.1	-28	398.0 > 220.2	-20
Echimidine- <i>N</i> -oxide	13.8	414.1 > 254.2	-32	414.1 > 396.3	-25
Intermedine	15.3	300.2 > 94.0	-26	300.2 > 138.2	-22
Intermedine- <i>N</i> -oxide	16.4	316.1 > 172.1	-30	316.1 > 94.3	-43
Indicine	14.8	300.0 > 94.1	-26	300.0 > 138.3	-23
Indicine- <i>N</i> -oxide	15.9	316.1 > 172.2	-29	316.1 > 138.1	-31
Heliotrine	13.3	314.1 > 138.3	-22	314.1 > 156.1	-28
Heliotrine- <i>N</i> -oxide	14.8	330.1 > 172.3	-30	330.1 > 111.2	-42
Europine	15.7	330.1 > 138.3	-23	330.1 > 94.1	-45
Europine- <i>N</i> -oxide	17.2	346.0 > 172.3	-28	346.0 > 111.2	-48
Lasiocarpine	7.6	412.1 > 120.2	-30	412.1 > 336.3	-21
Lasiocarpine- <i>N</i> -oxide	14.4	428.1 > 254.1	-31	428.1 > 410.2	-26
Echinatine	16.5	300.1 > 138.3	-24	300.1 > 156.3	-26
Echinatine- <i>N</i> -oxide	17.5	316.0 > 172.1	-29	316.0 > 111.1	-41
Heliosupine	10.6	398.1 > 120.2	-28	398.1 > 220.2	-19
Heliosupine- <i>N</i> -oxide	15.9	414.0 > 94.1	-43	414.0 > 254.2	-32
Rinderine	15.9	300.0 > 156.2	-29	300.0 > 138.2	-22
Rinderine- <i>N</i> -oxide	17.1	316.0 > 172.2	-27	316.0 > 111.1	-41
Monocrotaline	13.0	326.0 > 94.2	-45	326.0 > 121.2	-29
Monocrotaline- <i>N</i> -oxide	18.9	342.1 > 137.3	-31	342.1 > 236.3	-28
Trichodesmine	10.2	354.0 > 120.2	-37	354.0 > 222.3	-30

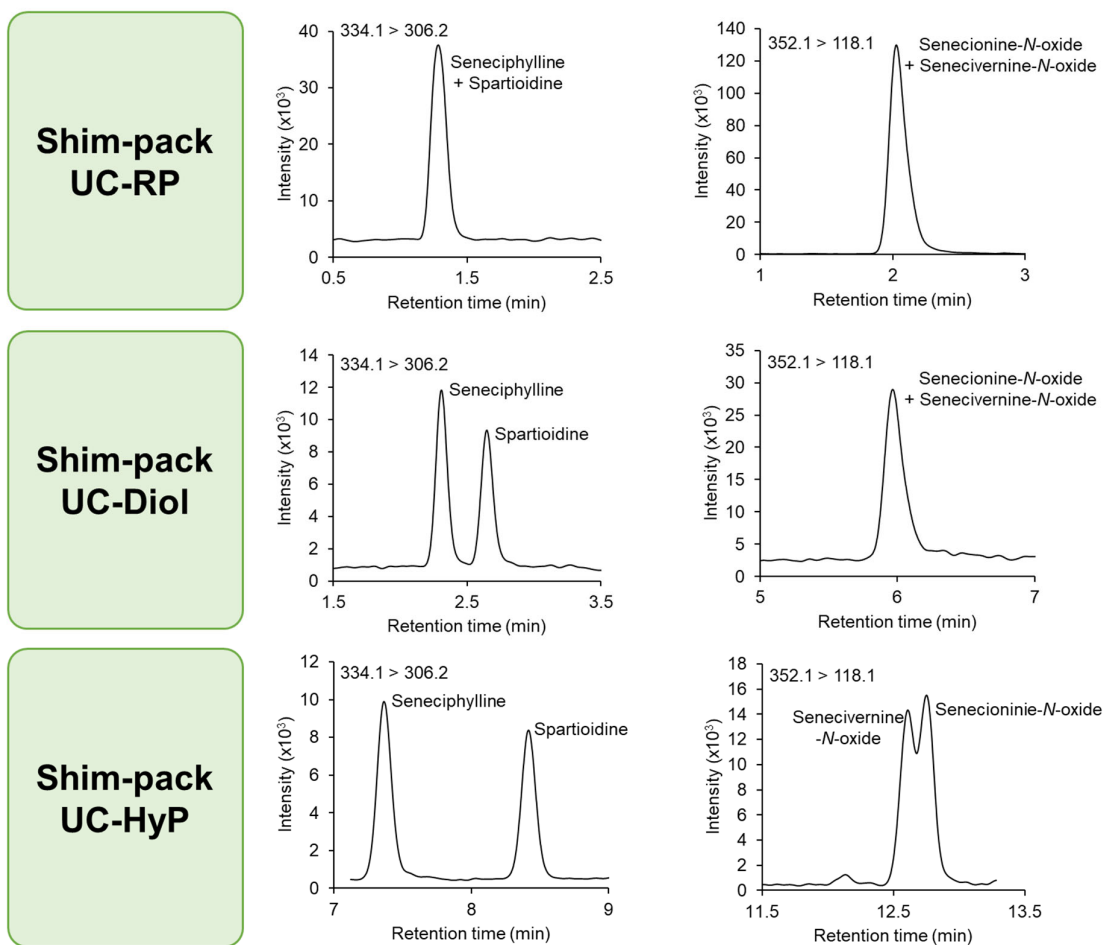


図 1 Shim-pack UC-RP, Diol 及び HyP の比較.

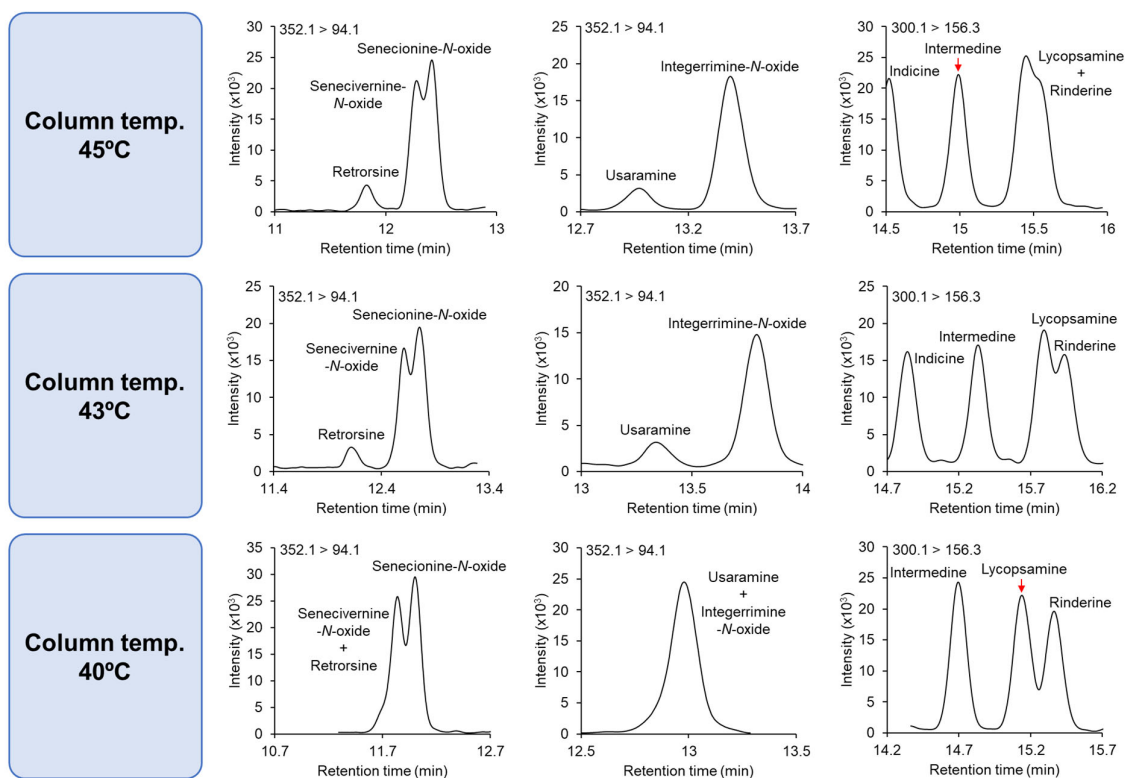


図2 カラム温度の比較. カラム温度以外の測定条件は B.研究方法の 4 を参照.

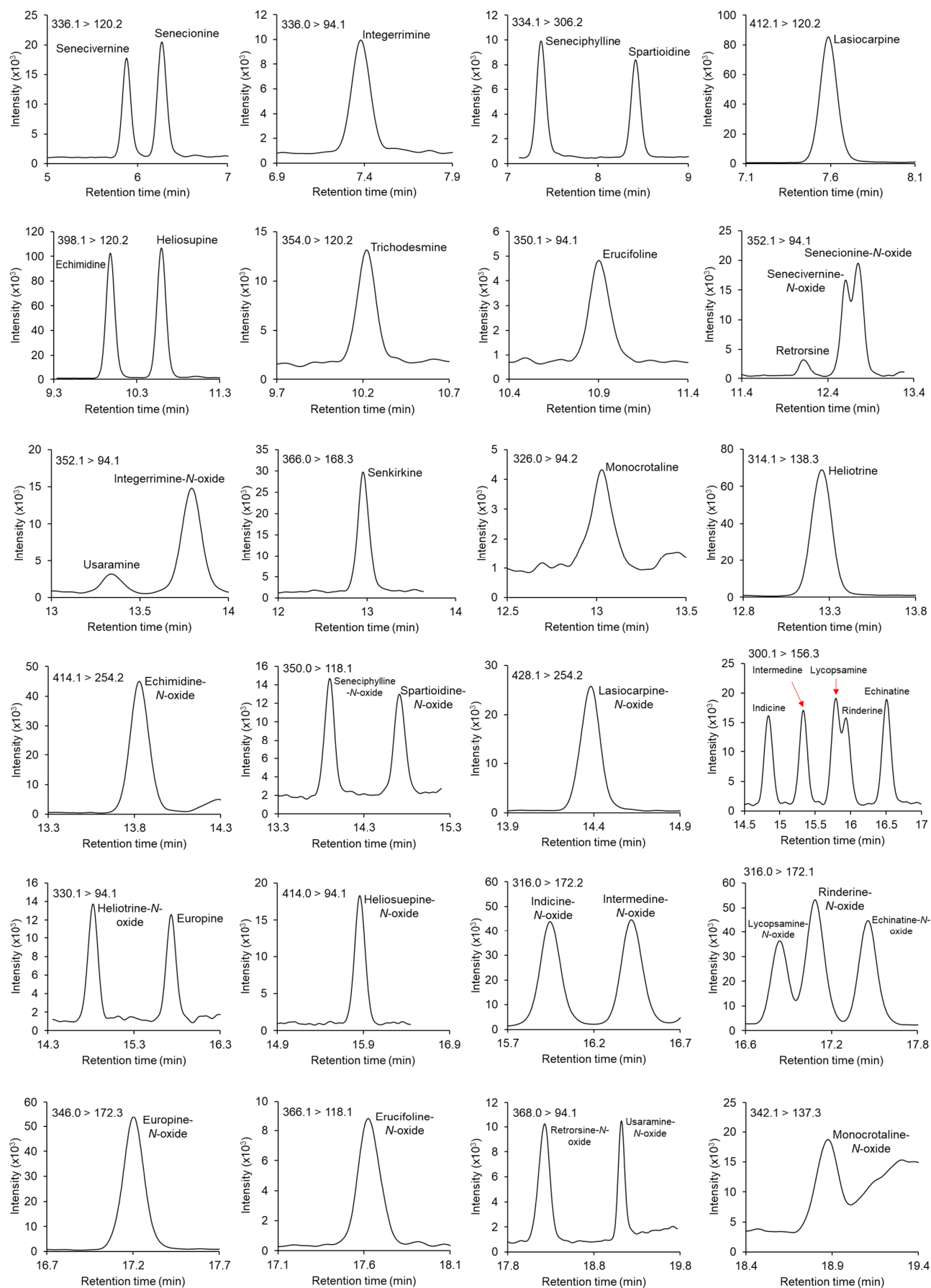


図3 Shim-pack UC-HyP による PAs 標準溶液 (各 1 ng/mL) クロマトグラム例.

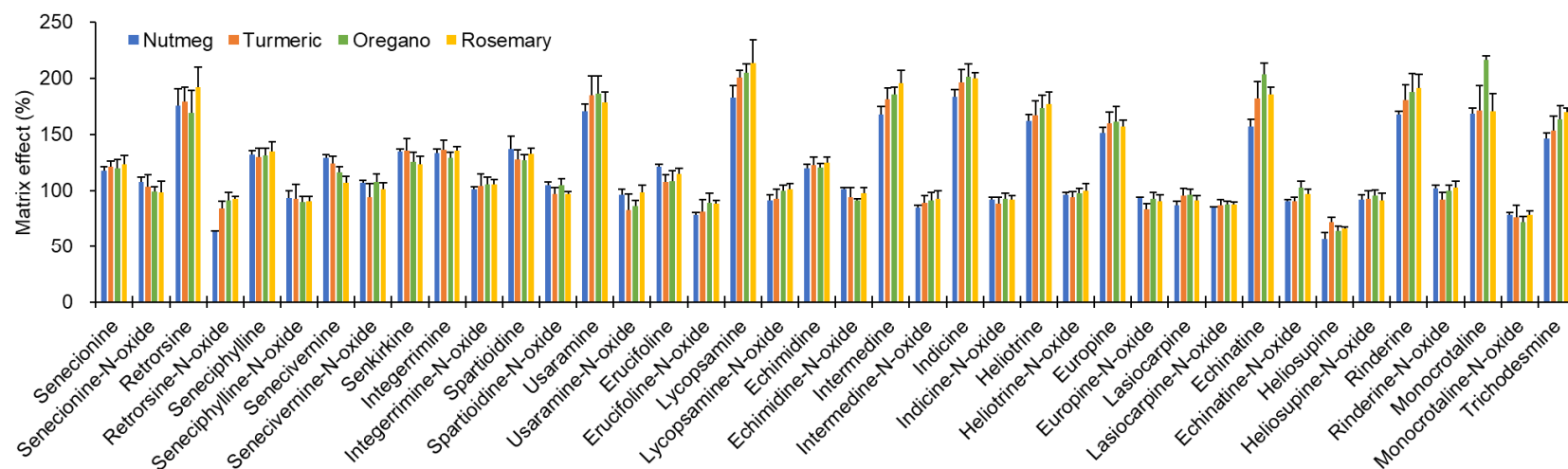


図4 マトリックスの影響. 溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比の平均値+標準偏差. $n = 3$.

表3 マトリックス検量線の回帰式及び決定係数.

化合物	回帰式	決定係数
Senecionine	$y = 246141x - 37144.9$	0.9991
Senecionine- <i>N</i> -oxide	$y = 127359.4x - 17188.31$	0.9999
Retrorsine	$y = 96924.82x - 6839.46$	0.9999
Retrorsine- <i>N</i> -oxide	$y = 109232.1x - 6666.26$	0.9999
Seneciphylline	$y = 196533.2x - 17556.2$	0.9993
Seneciphylline- <i>N</i> -oxide	$y = 147328.1x - 6346.55$	0.9998
Senecivernine	$y = 235203.2x + 2786.369$	0.9997
Senecivernine- <i>N</i> -oxide	$y = 128065.5x - 12467.4$	0.9996
Senkirkine	$y = 321812.2x - 18013$	0.9999
Integerrimine	$y = 123290.5x - 4027.62$	0.9997
Integerrimine- <i>N</i> -oxide	$y = 131690.5x - 7485.24$	1.0000
Spartiodine	$y = 123702.9x - 6907.23$	0.9998
Spartiodine- <i>N</i> -oxide	$y = 123183.7x - 2276.33$	0.9999
Usaramine	$y = 103209.5x - 13967.8$	0.9997
Usaramine- <i>N</i> -oxide	$y = 65201.71x - 9625.43$	0.9999
Erucifoline	$y = 58015.93x - 350.069$	0.9999
Erucifoline- <i>N</i> -oxide	$y = 83439.75x - 4061.18$	0.9998
Lycopsamine	$y = 345277.6x - 19266.9$	0.9997
Lycopsamine- <i>N</i> -oxide	$y = 400545.6x - 10453.3$	1.0000
Echimidine	$y = 1323857x - 98491.4$	0.9999
Echimidine- <i>N</i> -oxide	$y = 409170.2x - 26637.6$	0.9999
Intermedine	$y = 572000.1x - 45703$	1.0000
Intermedine- <i>N</i> -oxide	$y = 425113.9x - 10102.3$	0.9999
Indicine	$y = 604556.5x - 40038.2$	0.9998
Indicine- <i>N</i> -oxide	$y = 445247.5x - 13453.9$	1.0000
Heliotrine	$y = 1118507x - 166790$	0.9986
Heliotrine- <i>N</i> -oxide	$y = 879143x - 79833.5$	0.9991
Europine	$y = 964926.1x - 71895.6$	0.9989
Europine- <i>N</i> -oxide	$y = 581628.1x - 40035.8$	0.9999
Lasiocarpine	$y = 691803.3x - 51190.3$	0.9988
Lasiocarpine- <i>N</i> -oxide	$y = 228987.2x + 10639.49$	1.0000
Echinatine	$y = 600995.6x - 24002.2$	0.9997
Echinatine- <i>N</i> -oxide	$y = 475616.7x - 43101.5$	0.9996
Heliosupine	$y = 537902.8x - 71753.2$	0.9966
Heliosupine- <i>N</i> -oxide	$y = 165808.3x - 1188.73$	1.0000
Rinderine	$y = 261831.5x - 23776.1$	1.0000
Rinderine- <i>N</i> -oxide	$y = 620875.3x - 35257.6$	0.9998
Monocrotaline	$y = 110938.1x - 15097.6$	0.9996
Monocrotaline- <i>N</i> -oxide	$y = 199961.3x - 67446$	0.9998
Trichodesmine	$y = 223859x - 7349.61$	0.9999

表 4 真度及び精度 (%).

	真度	併行精度	室内精度
Senecionine	90.7	4.5	5.3
Senecionine- <i>N</i> -oxide	101.3	4.1	8.4
Retrorsine	89.7	5.2	9.0
Retrorsine- <i>N</i> -oxide	96.7	3.0	3.0
Seneciphylline	86.1	3.0	7.2
Seneciphylline- <i>N</i> -oxide	91.6	4.0	4.2
Senecivernine	88.1	5.4	6.5
Senecivernine- <i>N</i> -oxide	91.0	3.2	4.4
Senkirkine	92.7	2.9	7.8
Integerrimine	88.2	6.0	8.8
Integerrimine- <i>N</i> -oxide	93.4	2.5	8.5
Spartioidine	88.1	6.9	8.0
Spartioidine- <i>N</i> -oxide	85.2	2.6	7.2
Usaramine	93.3	6.3	8.9
Usaramine- <i>N</i> -oxide	94.9	4.2	6.4
Erucifoline	88.4	4.9	4.9
Erucifoline- <i>N</i> -oxide	93.3	5.7	6.7
Lycopsamine	92.7	6.9	7.8
Lycopsamine- <i>N</i> -oxide	94.6	2.6	6.8
Echimidine	90.3	7.1	7.1
Echimidine- <i>N</i> -oxide	97.5	4.9	5.4
Intermedine	93.5	5.6	5.6
Intermedine- <i>N</i> -oxide	94.9	5.4	7.0
Indicine	91.9	4.6	7.2
Indicine- <i>N</i> -oxide	98.8	5.5	5.5
Heliotrine	92.4	5.0	6.2
Heliotrine- <i>N</i> -oxide	96.2	4.6	6.4
Europine	85.0	4.5	5.6
Europine- <i>N</i> -oxide	89.3	3.4	4.8
Lasiocarpine	86.7	11.9	14.5
Lasiocarpine- <i>N</i> -oxide	90.9	3.6	4.4
Echinatine	94.3	5.3	5.3
Echinatine- <i>N</i> -oxide	96.3	4.3	5.6
Heliosupine	84.9	16.3	16.7
Heliosupine- <i>N</i> -oxide	89.8	3.9	6.6
Rinderine	93.5	5.2	6.8
Rinderine- <i>N</i> -oxide	96.0	2.0	5.8
Monocrotaline	95.1	7.8	9.9
Monocrotaline- <i>N</i> -oxide	93.4	3.2	5.7
Trichodesmine	85.8	8.0	11.3

表 5 各試料の PAs 定量値及び定量値の合計 (µg/kg). <LOQ は定量下限値 (1 µg/kg) 未満を示す.

Compound	Oregano	Savory	Thyme	Marjoram	Cumin1	Cumin2	Dillseed	Sage
Senecionine	<LOQ	<LOQ	1.3	4.3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Senecionine- <i>N</i> -oxide	2.7	1.0	2.3	13.8	1.8	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Retrorsine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Retrorsine- <i>N</i> -oxide	<LOQ	<LOQ	1.4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Seneciophylline	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Seneciophylline- <i>N</i> -oxide	5.2	<LOQ	<LOQ	1.3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Senecivernine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Senecivernine- <i>N</i> -oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.2	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Senkirkine	<LOQ	<LOQ	1.3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Integerrimine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Integerrimine- <i>N</i> -oxide	1.7	<LOQ	<LOQ	4.2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Spartiodine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Spartiodine- <i>N</i> -oxide	1.1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Usaramine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Usaramine- <i>N</i> -oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Erucifoline	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Erucifoline- <i>N</i> -oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Lycopsamine	9.6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Lycopsamine- <i>N</i> -oxide	1.8	6.5	1.7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Echimidine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Echimidine- <i>N</i> -oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Intermedine	<LOQ	1.4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Intermedine- <i>N</i> -oxide	1.4	10.3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Indicine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Indicine- <i>N</i> -oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Heliotrine	53.7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13.7	6.9	<LOQ	<LOQ
Heliotrine- <i>N</i> -oxide	598.0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5.6	17.9	<LOQ	2.2
Europine	52.2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	133.3	343.0	<LOQ	45.2
Europine- <i>N</i> -oxide	528.7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	59.3	1552.9	<LOQ	450.0
Lasiocarpine	61.3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	61.2	111.2	<LOQ	12.7
Lasiocarpine- <i>N</i> -oxide	544.6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	37.1	375.7	<LOQ	95.2
Echinatine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	6.8
Echinatine- <i>N</i> -oxide	3.5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.4	<LOQ	97.8
Heliosupine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.7	2.7	<LOQ	1.6
Heliosupine- <i>N</i> -oxide	10.6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3.7	<LOQ	4.3
Rinderine	<LOQ	<LOQ	4.2	<LOQ	5.1	26.2	<LOQ	6.2
Rinderine- <i>N</i> -oxide	16.3	<LOQ	1.8	<LOQ	1.1	18.0	<LOQ	10.8
Monocrotaline	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Monocrotaline- <i>N</i> -oxide	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Trichodesmine	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Total	1892.4	19.3	14.0	24.6	321.0	2459.7	0	732.7

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「食品中の自然毒等のリスク管理のための研究」

令和7年度 分担研究報告書

汎用性の高い植物性自然毒（きのこ）の分析法・同定法の確立

及び

自然毒リスクプロファイルの更新、消費者に対する効果的な情報提供方法の提案

研究分担者 柴田 識人 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 部長

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

研究要旨：

植物性自然毒による食中毒は年間数十件発生しており、死亡事例も報告されている。中毒発生時の迅速な原因究明は、患者の救命と食中毒の再発防止の注意喚起につながる。だが、特に毒きのこを対象とした分析法・同定法は未だ十分に整備されているとはいえない。本研究では、特に毒きのこによる食中毒の原因究明にとって有用な分析法（化学分析）と同定法（遺伝子解析）を確立し、その汎用性を検証することを目的とする。そして消費者に向けた自然毒に関する効果的と期待される情報提供の方法を提案するべく、厚生労働省ホームページに掲載されている「自然毒リスクプロファイル」の更新を目的とする。

分析法として、先の厚生労働科学研究（H30-食品-一般-008 及び 21KA1005）において開発した「毒きのこの毒成分一斉分析法2」を改良し、地方衛生研究所15機関の協力により室間共同試験による妥当性確認を行った。配布試料は、Jansson et al. (2012)を参考にベニテングタケを含むきのこシチューを作製して用いた。いずれの機関も含有毒成分3種（ムスカリン、イボテン酸及びムシモール）を誤りなく同定することができ、良好な定量再現性が得られた。

同定法として、リアルタイムPCR法を用いたドクツルタケ（*Amanita virosa*）特異的遺伝子検査法をこれまでに開発したが、今年度はその特異性や性能評価（検出感度や増幅効率等）を実施した。また *Amanita*（テングタケ属）に属する他のテングタケ属きのこであるイボテングタケ（*Amanita ibotengutake*）について、Internal Transcribed Spacer（ITS）領域の系統解析によりリアルタイムPCR法を用いた特異的遺伝子検査法に適用可能な特異的塩基配列を見出すと共に、全ゲノムシーケンシングと *de novo* アセンブリにより、高品質なイボテングタケドラフトゲノムを構築した。

さらに「自然毒リスクプロファイル」について、新しい知見をもとに更新作業を行っている。更新版は消費者をはじめとした多くの人にとって、より有用な参考資料になることが期待される。

研究協力者

竹内 浩（岐阜県保健環境研究所）

友澤 潤子（滋賀県衛生科学センター）

谷口 賢（名古屋市衛生研究所）

山口 瑞香（大阪健康安全基盤研究所）

野村 千枝（大阪健康安全基盤研究所）

吉岡 直樹（兵庫県立健康科学研究所）

原 有紀（三重県保健環境研究所）

吉村 英基（三重県保健環境研究所）

平井 知里（福井県衛生環境研究センター）

土屋 小百合（福井県衛生環境研究センター）

有沢 拓也（富山県衛生研究所）

茅原田 一（岐阜市衛生試験所）

田島 祥吾（石川県保健環境センター）

小郷 沙矢香（静岡県環境衛生科学研究所）

木村 亜莉沙（静岡市環境保健研究所）

鈴木 友理（愛知県衛生研究所）
池谷 美穂（浜松市保健環境研究所）
木谷 聖（金沢市環境衛生試験所）
登田 美桜（国立医薬品食品衛生研究所）
曾我 慶介（国立医薬品食品衛生研究所）
成島 純平（国立医薬品食品衛生研究所）
相澤（杉野） 御祐（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

動物や植物の中には、ヒトや動物の健康に有害な影響をもたらす成分を含むものがある。その成分を「自然毒」と呼び、厚生労働省の食中毒統計では動物性自然毒（フグ毒、貝毒など）と植物性自然毒（きのこ、高等植物の毒成分）に分類される。本分担研究では、これら自然毒に起因する食中毒事例の把握とその予防策に資する検討を目的に次の2つの課題に取り組むこととした。

第1に、地方衛生研究所（以下、地研）における植物性自然毒（きのこ）の鑑別に適用可能な毒性成分分析法や遺伝子検査法の確立を本分担研究課題の目的とした。

植物性自然毒に起因する中毒発生時な迅速な原因究明は、患者の救命と食中毒の再発防止の注意喚起につながる。地研では、食中毒事件の発生時に中毒残品（患者が喫食したものの残品）の化学分析や遺伝子解析を行い、植物種や毒成分の同定を行っている。しかし、調理済みの中毒残品からの成分の同定、DNAの抽出は困難である。特にきのこの場合、形態による鑑別が困難で、原因となったきのこ種が不明となった事例も散見される。従って、こうした原因不明のきのこ中毒の事例にも適用可能で、迅速な鑑別に資する検査法の効率化や性能向上は必須となる。本分担研究課題では分析法と同定法について取り組んだ。

分析法として、先の厚生労働科学研究（H30-食品-一般-008；研究代表者：登田美桜、及び21KA1005；研究代表者：鈴木敏之）において、毒きのこの毒成分一斉分析法1及び2を開発した

（以下、分析法1及び2）。分析法1は、死亡事例が多いドクツルタケのアマニトキシシン4成分をはじめ、カエンタケのサトラトキシシンH、中毒の発生頻度が高いツキヨタケのイルジンS、カキシメジのウスタル酸の7成分に、近年死亡事例が散発しているニセクロハツの指標成分であるシクロプロピルアセチル-(R)-カルニチンを加えた8成分を対象とする。分析法2は、中毒の発生頻度が高いテングタケやベニテングタケのイボテン酸、ムシモール、タマシロオニタケやシロオニタケのアリルグリシン、プロパルギルグリシン、さらにアセタケ科やハイイロシメジ属など広範囲のきのこに含まれるムスカリンを加えた5成分を対象とする。これらの5成分はいずれも高極性化合物であり、通常は親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）などの分析手法が必要となる。本分析法は、ムスカリンについては試験溶液調製時に添加するトリクロロ酢酸（TCA）とのイオンペア形成を利用し、その他のアミノ酸類についてはカルバミン酸6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシンイミジル（AQC）によるプレカラム誘導体化を行った後、オクタデシルシリル化シリカゲル（ODS）カラムを用いた逆相クロマトグラフィーにより分離・分析する手法である。

令和6年度は、中毒事例や死亡事例が多いドクツルタケを含むきのこシチューを用いて分析法1の室間共同試験による妥当性確認を行い、良好な結果を得た。令和7年度は、同じくきのこシチューに、ムスカリン、イボテン酸及びムシモールの3種の毒成分を含有するベニテングタケを加えた模擬試料を作製し、地研15機関に配布して室間共同試験による分析法2の妥当性確認を行い、毒成分の同定能力と定量性能を検証した。

同定法として、食中毒事例の多い毒きのこについて、公的データベースNCBI（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）における識別用のリボソームRNA（rRNA）遺伝子のInternal Transcribed Spacer（ITS）領域や全ゲノム配列の整

備状況に基づき、目的に応じたリアルタイム PCR 法や等温増幅反応等の遺伝子検査法の開発を行う。そのために、我が国における植物性自然毒（きのこ）の食中毒統計において、患者数が多く、遺伝子検査法の開発報告の無い毒きのこを対象とした。

令和 6 年度の検討で、致死性の高い猛毒きのこドクツルタケ (*Amanita virosa*) 特異的リアルタイム PCR 法を開発した。また、ドクツルタケの属するテングタケ属 (*Amanita*) に着目し、同じく食中毒事例が多いものの、NCBI 等の公的データベースではゲノム情報を利用できないテングタケについて、テングタケと推定された国内採取個体のゲノム解析を行い、ドラフトゲノムを構築した。

令和 7 年度は、開発したドクツルタケ特異的遺伝子検査法の検出感度や増幅効率等の性能評価を行う。また、テングタケと同じテングタケ属テングタケ節で食中毒事例の多いイボテングタケ (*Amanita ibotengutake*) についても、リアルタイム PCR 法を用いた特異的遺伝子検査法開発を検討する。さらに、イボテングタケもテングタケ同様に公的ゲノムデータベースでは全ゲノム情報を利用できないことから、イボテングタケと推定された国内採取個体を用いてゲノム解析を行い、全ゲノム情報取得に着手する。

本分担研究課題における第 2 の目的は、厚生労働省のホームページ上に公開している「自然毒のリスクプロファイル」

(https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/poison/index.html) の見直しとした。平成 20-21 年度厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業「自然毒のリスクプロファイル作成を目指した調査研究（研究代表者：塩見一雄）」において「自然毒のリスクプロファイル」が作成され、厚生労働省では、各自然毒に関する正しい知識の普及と注意喚起のために、これを公開している。ここでは、毒成分を含む動物、きのこ、高等植物の種類毎に、その分類と特徴、写真、毒成分、中毒症状

などが表形式で簡潔に記載され、その自然毒に関する概要を理解できるようにまとめられている。ただ、公開されてから 10 年以上が経過したが、その間、記載内容についての簡単な修正等に留まっていた。そのため、公開後の新しい知見を含めた全般的な見直しが必要である。

令和 3-5 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「自然毒等のリスク管理のための研究 (21KA1005; 研究代表者：鈴木敏之)」において、きのこ及び高等植物に関する見直しに着手した。本分担研究では、その継続作業を行うとともに動物性自然毒のリスクプロファイルの見直しを行う。

B. 研究方法

1. 分析法

1.1 試薬・試液

(+)-ムスカリニコクロリド及びイボテン酸は Sigma-Aldrich 社製の標準試薬を用いた。ムシモールは Tronto Research Chemicals 社製の標準試薬を用いた。L-プロパルギルグリシン及び L-アリルグリシンは Combi-Blocks 社製の標準試薬を用いた。内部標準は Tronto Research Chemicals 社製の(+)-ムスカリン-d₉ ヨージド及び東京化成工業 (株) 製の O-Methyl-D-tyrosine (MTY) を用いた。それぞれ、50%メタノール水溶液に溶解し 100 µg/mL ((+)-ムスカリン-d₉ ヨージドは、(+)-ムスカリン-d₉ クロリドに換算して 100 µg/mL に相当) の標準原液を調製した。ムスカリニコクロリド、イボテン酸、ムシモール、L-プロパルギルグリシン及び L-アリルグリシンの 5 種の標準原液を混合し、50%メタノール水溶液で希釈して 10 µg/mL の 5 種きのこ毒混合標準溶液を調製した。同様に 2 種の内部標準原液から 10 µg/mL の 2 種混合内部標準溶液を調製した。

抽出に用いた 10%TCA 水溶液は、ナカライテスク (株) 製の特級試薬等を用いて調製した。精製カートリッジは、Agilent Technologies 社製の

Captiva EMR-Lipid (3 mL, 300 mg) を使用した。誘導体化に用いたほう酸緩衝液は、富士フイルム和光純薬 (株) 製の APDS タグワコー用ほう酸緩衝液を用いた。誘導体化試薬溶液 (AQC 試薬アセトニトリル溶液) は、Waters 社製の AccQ-Tag™ Ultra Derivatization Kit 付属の AQC 試薬 3 mg を、同キット付属の脱水アセトニトリル 1 mL に溶解して、3 mg/mL の溶液を調製して用いた。

検量線用標準溶液の希釈に用いた 2%TCA 含有 80%メタノール水溶液は、10%TCA 水溶液 20 mL にメタノールを加えて 100 mL に定容して調製した。

その他試験溶液の調製及び測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用又は液体クロマトグラフィー質量分析用を用いた。

1.2 装置

ホモジナイザー及びジェネレーターシャフト、アルミブロックヒーター並びにトリプル四重極型の液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) は、室間共同試験に参加した各機関が保有する装置を使用した。例として、機関 L が使用した装置を以下に示す。

機関 L の使用装置

ホモジナイザー及びジェネレーターシャフト：ヒスコトロン NS-51 及び NS-10P (10.5 mmφ×140 mm) ((株) マイクロテック・ニチオン (現：(株) 日本精機製作所))

アルミブロックヒーター： Reacti-Thermo™ Heating Module (Thermo Fisher Scientific 社)

LC-MS/MS： Exion LC AD-5500+ QTRAP Activated (Sciex 社)

1.3 LC-MS/MS 測定条件

室間共同試験に参加した 15 機関は、いずれもトリプル四重極型の LC-MS/MS を用いた (表 1-1)。このうち分析法 2 と全く同一条件で試験を実施した機関は 11 機関あり、それぞれ HPLC の耐圧性

能に応じて 2 種類の分析カラムのいずれか又は両方を用いた (表 1-1 の Condition a, b)。また、MRM 条件の例として機関 L の条件を表 1-2 に示す。

1.4 試験溶液の調製

分析法 2 の試験溶液調製法の概略を図 1-1 に示す。

1.4.1 抽出

試料 5.0 g を 50 mL の PP 製遠心沈殿管に量り採り、10 µg/mL の 2 種混合内部標準溶液 0.5 mL を添加し、混和後 30 分間静置した。10%TCA 水溶液 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、ホモジナイザーの刃をメタノールで洗い、さらにメタノールを PP 製遠心沈殿管の 35 mL の標線まで加えた。常温、2,000×g で 5 分間遠心分離し、上清を 50 mL メスフラスコに採った。遠心沈殿管の残渣にメタノールを 15 mL 加えて混和後、常温、2,000×g で 5 分間遠心分離して、上清を採り、先のメスフラスコに合わせ、メタノールを加えて正確に 50 mL とした。

1.4.2 精製

抽出液を 2 mL 採り、遠心沈殿管 (10-15 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×g で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てた。このカートリッジを別の遠心沈殿管にセットして、さらに抽出液 1 mL を負荷し、同様に遠心分離して溶出液を採取した。

1.4.3 誘導体化

2 mL の不活性処理済みガラス製スクリューバイアルに、B.1.4.2 精製で得られた溶出液 100 µL を量り採り、ほう酸緩衝液 300 µL を加えて混和後、さらに AQC 試薬アセトニトリル溶液 (3 mg/mL) 100 µL を加えて混和した。スクリューキャップを閉めて密閉後、アルミブロックヒーターで 55°C、10 分間加熱した。室温に戻した後、水 500 µL を入れて混和したものを試験溶液とした (0.01 g sample/mL)。

1.5 定量

検量線用標準溶液の調製のため、最初に以下の溶液を調製した。

① 1 µg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液

10 µg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液 1 mL 及び 10%TCA 水溶液 2 mL に、メタノールを加えて 10 mL に定容した。(この溶液の組成は 2%TCA 含有 75%メタノール水溶液となる。)

② 0.1 µg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液

①の 1 µg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液を 2%TCA 含有 80%メタノール水溶液で 10 倍希釈した。

③ 1 µg/mL 2 種混合内部標準溶液

10 µg/mL 2 種混合内部標準溶液を 2%TCA 含有 80%メタノール水溶液で 10 倍希釈した。

①又は②と③を混合し、2%TCA 含有 80%メタノール水溶液で希釈することにより、2 種混合内部標準 100 ng/mL を含有する 0、10、20、50、100、200 ng/mL の 5 種きのこ毒混合標準溶液を調製した。これらの 6 溶液 100 µL を 2 mL の不活性処理済みガラス製スクリーバイアルにそれぞれ量り採り、**B.1.4.3 誘導体化**に従って誘導体化したものを検量線用標準溶液とした (0、1、2、5、10、20 ng/mL)。それぞれ LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法又は内部標準補正法で定量を行った。

1.6 模擬試料

室間共同試験の模擬試料は、Jansson らの報告¹⁾に従い、ベニテングタケを含むきのこのシチューを調製して用いた。ベニテングタケは、2023 年 10 月に岐阜県内の山林で採取後、-20℃以下で冷凍してあったものを凍結粉碎して用いた。

きのこのシチュー

原材料:マッシュルーム 700 g、シイタケ 150 g、ヒラタケ 100 g、ナメコ 50 g、バター 83 g、小麦粉 33 g、生クリーム (乳脂肪分 35%) 420 mL、オリーブオイル 5 mL

調理法:弱火でバターを溶かし、小麦粉を入れ混ぜたところに、細切して冷凍したきのこを入れ、全体がしんなりとするまで 10 分くらい加熱した。生クリームを入れ、弱火で 5 分加熱しながら混ぜた。仕上げにオリーブオイルを加えた。これをフードプロセッサーにより粉碎均質化した。

ベニテングタケ添加試料

粉碎均質化したきのこシチュー約 950 g に凍結粉碎したベニテングタケ約 44 g を加えて 10 分間加熱、混和し、常温に戻してフードプロセッサーを用いて均質化したものを模擬試料とした。

1.7 標準添加法による模擬試料の値付け

あらかじめ絶対検量線法により求められた模擬試料中のムスカリンクロリド、イボテン酸及びムシモールの濃度 (x mg/kg) をもとに、試料中の添加濃度が 0、0.5x、x、1.5x、2x、2.5x、3x と 7 濃度になるように標準溶液を模擬試料に添加した。

B.1.4 試験溶液の調製に従い抽出・精製し、LC-MS/MS により分析した。毒成分の添加量に対するピーク面積をプロットしたデータを最小二乗法により直線回帰し、その x 切片から抽出液中の毒成分の濃度を求めた。また、x 切片の標準偏差に係数として 2.571 を乗じることにより、95%信頼限界を求めて不確かさとした。

1.8 均質性試験、安定性試験

模擬試料をそれぞれ 25 g ずつ量り採り、24 個のポリエチレン製容器に取り分けた。このうち 6 個の容器をランダムに選択し、1 容器につき 2 本ずつ分析用試料を定量した。Thompson らの報告²⁾に従い、F 検定により均質性を確認した。

室間共同試験開始前、途中及び終了後の 3 回にわたり、模擬試料に含まれるムスカリンクロリド、イボテン酸及びムシモールの 3 成分をそれぞれ 3 併行で定量し、実施期間中の安定性を評価した。

1.9 ブランク試験

模擬試料の調製に用いたベニテングタケを加える前のきのこのシチューを、**B.1.4 試験溶液の調製**により抽出・精製し、LC-MS/MSにより分析して、妨害ピークの有無を確かめた。

1.10 室間共同試験

実施期間は令和7年10月1日-12月26日の約3か月間とした。きのこ毒5種混合標準溶液、2種混合内部標準溶液、及び模擬試料を参加15機関に配布した。参加機関のうち、ムスカリンクロリドの定量のみ実施した3機関を除く12機関については、標準溶液に含まれるムスカリンクロリド以外の4種の毒成分（イボテン酸、ムシモール、プロパルギルグリシン及びアリアルグリシン）の中から試料に含まれる2種の毒成分を同定したうえで、ムスカリンクロリドを含めた3成分の定量試験（ $n=2$ ）を行い、分析条件と定量結果を報告した。

各機関の分析条件を精査してデータのスクリーニングを行い、分析カラムの違いにより2群のデータセットに分けた上で、Cochran検定とGrubbs検定を行った³⁾（図1-2）。それぞれのデータセットについて、真度（%）、併行精度（ RSD_r , %）及び室間精度（ RSD_R , %）を求めた。真度は**B.1.7 標準添加法による模擬試料の値付け**により求めた真の値の推定値（付与値）に対する定量値の平均値の百分率とした。HorRat値は室間精度（ RSD_R , %）とHorwitzの式から予測される室間精度の（ $PRSD_R$, %）の比とした。これらの4つのパラメーターを**B.1.9 ブランク試験**により求めた選択性ととも、農林水産省の分析法の妥当性確認に関するガイドライン⁴⁾（以下、農水省のガイドライン）に従って評価した（表1-3）。

2. 同定法

2.1 子実体サンプル採取情報

日本各地で採取された多数のきのこ（子実体）サンプルを国立衛研にご提供頂いた。表現型から

テングタケ属と思われる子実体について、採取地や採取日、子実体の状態を写真に記録の後、土汚れを水洗いした上で1センチ角に細断し、凍結乾燥機 FDU-1200（EYELA）を用いて凍結乾燥処理を実施し、使用するまで-30℃で保存した。

2.2 DNA 抽出方法

Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 法（一部改変）にて、子実体からDNAを抽出した。詳細は以下の通りである。凍結乾燥済みサンプル0.1gを液体窒素中で乳鉢乳棒を用いて破碎した後、5mLの1.5%CTABバッファー[1.5%CTAB、100mM Tris-HCl (pH 8)、1.4M NaCl、20mM EDTA (pH 8)、1%ポリビニルピロリドン、1%ポリビニルポリピロリドン、2%2-メルカプトエタノールを添加し、56℃で30分間加温した。加温の後、2.5mLのCIA（クロロホルム：イソアミルアルコール = 24：1）を添加し、Bio RS-24 Mini Rotator（BIOSAN）にて30rpm、10分間転倒混和後、遠心（8000×g、10分間、室温）して上清を回収した。この上清に対して、1/2倍量のCIAを上清に添加し、30rpm、10分間転倒混和後、遠心（8000×g、10分間、室温）して上清を回収した。この上清に対して、1/10倍量の10%CTAB水溶液を添加して転倒混和後、1.5倍量のCTAB沈殿バッファー（1.0%CTAB、50mM Tris-HCl (pH 8)、10mM EDTA (pH 8)）を添加して転倒混和した。遠心（8000×g、10分間、室温）して得られた沈殿に対し、500μLの1M NaClおよび1μLの100mg/mL RNaseAを添加し、56℃で加温しながら沈殿を溶解した。最後にイソプロパノール沈殿により得られたDNAを超純水に再懸濁した。抽出したゲノムDNAはNanoDrop One（Thermo Fisher Scientific）で濃度を測定した。

2.3 DNA 配列による菌種推定

ゲノムDNAを抽出した後、ITS周辺塩基配列（核small subunit ribosomal DNA（SSU rDNA）部分配列から、ITS1、5.8S rDNA、ITS2を経て、large

subunit ribosomal DNA (LSU rDNA) 部分配列までを含む一連の配列) および RNA polymerase II subunit B (rpb2) 遺伝子配列の相同性を以って菌種の推定を行った。各領域は THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて PCR 増幅を実施した。PCR 増幅に使用したプライマーセットは以下の通り。

ITS 周辺塩基配列⁵⁾：

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

rpb2 遺伝子配列⁶⁾：

Am-6F: 5'-TGGGGAATGGTRTGYCCTGC-3'

Am-7R: 5'-CCCATKGCCTTGTTRCCCATGGC-3'

増幅した PCR 断片は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) で精製の後、サンガーシーケンスにより配列を決定した。得られた塩基配列は NCBI の BLAST 検索ツールを用いて相同性検索を実施し、各配列ともに 99%以上 (片方しか配列登録がされていない場合は片方のみ) の結果を以って菌種の推定を実施した。

2.4 種特異的配列の探索

NCBI より収集したテングタケ属 528 種の ITS 周辺の塩基配列を用いて、ドクツルタケまたはイボテングタケに特異的な塩基配列の探索を行った。なお探索には、我々が開発した BLAST_TSN (https://github.com/NIHS-DNFI/BLAST_TSN/) シェルを一部改変して使用した。具体的な動作は、ドクツルタケまたはイボテングタケの ITS 周辺の塩基配列を window サイズ 25 塩基、step サイズ 1 塩基の Sliding Window 方式で、自身以外の 527 種テングタケ属 ITS 周辺の塩基配列に対して BLAST 検索を行い、他種に相同性の高い塩基配列を除外することで、ドクツルタケまたはイボテングタケに特異的な塩基配列を抽出した。

2.5 リアルタイム PCR

設計したプライマー・プローブの特異性はリアルタイム PCR で確認した。TaqMan 法では FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche) を用いた。反応溶液 (25 μ L) は、2 $\times$ FastStart Universal Probe Master (Rox) 12.5 μ L, 各プライマー 500 nM, プローブ 1 μ M, 鋳型 DNA 50 ng/well (熱分解試験に供する鋳型 DNA は 5 ng/well), 純水を加えて調製した。PCR 条件は、50°C 2 分、95°C 10 分間のプレヒート後、95°C 15 秒、60°C 1 分の 2 ステップ PCR を 40 サイクルとした。SYBR 法では THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いた。反応溶液 (25 μ L) の組成は、2 $\times$ THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix 12.5 μ L, 各プライマー 300 nM, 鋳型 DNA 5 μ L, 純水を加えて調製した。PCR 条件は、95°C 10 分間プレヒート後、95°C 15 秒、60°C 1 分の 2 ステップ PCR を 40 サイクル行い、その後 65°C から 97°C の融解曲線を得た。

2.6 デジタル PCR

リアルタイム PCR 法によるドクツルタケ遺伝子検査法において増幅する塩基配列 (89 塩基対) の人工遺伝子が組み込まれたプラスミド (Eurofins Genomics 社により合成) を陽性コントロールプラスミドとして用いた。デジタル PCR システム QX200 (Bio-Rad 社) を用いて、陽性コントロールプラスミドのコピー数の絶対定量を行った。陽性コントロールプラスミドは、10 ng/ μ L に希釈した断片化処理済みのサケ精子由来 DNA (バイオダイナミクス) を用いて段階希釈し、PCR に供した。反応溶液 (20 μ L) の組成は以下の通り。2 $\times$ ddPCR Supermix for Probe (no dUTP) (Bio-Rad) 10 μ L, 各プライマー 900 nM, プローブ 250 nM, 陽性コントロールプラスミド溶液 1 μ L, 純水を加えて調製した。反応溶液を調製後、Droplet generator を用いてドロップレットを形成、PCR 反応を実施した。PCR 条件は、95°C 10 分間プレヒート後、94°C 30

秒、60℃ 1 分の 2 ステップ PCR を 40 サイクル行い、98℃ 10 分間失活処理後、4℃ ホールドとした。PCR 反応後の溶液は Droplet reader を用いて、陰性及び陽性ドロップレット数をそれぞれカウントした。なお、PCR 反応およびデジタル PCR 測定は 3 ウェル並行で実施した。デジタル PCR データは QX Manager v1.2 で解析した。

2.7 リアルタイム PCR による特異的遺伝子検査法の検出限界および増幅効率の評価

デジタル PCR によりコピー数定量した陽性コントロールプラスミドを用いて、特異的検査法の検出限界および増幅効率の評価を行った。検出限界は 95%以上の確率で検出される最低濃度（コピー数/ウェル）とした。ドクツルタケゲノム DNA を用いた増幅効率の評価では、陽性コントロールプラスミド同様、10 ng/μL に希釈した断片化処理済みのサケ精子由来 DNA でドクツルタケゲノム DNA を段階希釈し、リアルタイム PCR に供した。

2.8 熱分解試験

ドクツルタケの高分子量ゲノム DNA を、サーマルサイクラーを用いて 95℃で 5, 10, 30, 60, 120 分間加熱し、その断片化度合をアガロース電気泳動によって評価した。熱処理した断片化 DNA は 5 ng/well をリアルタイム PCR (TaqMan 法) に供し、ドクツルタケ特異的遺伝子検査法の検出性能を評価した。比較対象として前述の ITS 領域増幅用のユニバーサルプライマーセット⁵⁾を SYBR 法で利用した。

2.9 全ゲノムシーケンス

イボテングタケの全ゲノム *de novo* アセンブリを実施するにあたり、PacBio Revio system (Pacific Bioscience) を使用して全ゲノムシーケンスを実施した。抽出した DNA から、Short Read Eliminator Kit (Pacific Bioscience) を用いて短い DNA を除去した後、SMRTbell prep kit (Pacific Bioscience)、

g-tube (Covaris) を使用してライブラリ調製し、シーケンス反応を行った。反応完了後、PacBio Revio system 装置内のデフォルトワークフローに従いベースコールされた塩基配列データ (HiFi リード) から、不要配列の除去のためにアライナーツール minimap2 (ver. 2.30-r1287) を用い、細菌やミトコンドリア由来配列を除いた。またリード長やクオリティトリミングツール NanoFilt (ver. 2.8.0) を用いて適宜リードを選抜した。アセンブラツール hifiasm (ver. 0.25.0-r726) を用いてアセンブリを行った。

2.10 アセンブリ評価

本研究でアセンブリしたドラフトゲノムの完全性を評価するため、Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO) (ver. 5.8.3) を利用し、担子菌類に関連するオーソログデータセットは fungi_odb12 [n=1122]: 真菌、basidiomycota_odb12 [n=2409]: 担子菌門、agaricomycetes_odb12 [n=3398]: 真正担子菌綱、agaricales_odb12 [n=3408]: ハラタケ目を使用した。また、サンプルを採取した土壌からコンタミネーションする可能性のある真正細菌由来遺伝子の混入度合いを確認するために、bacteria_odb12 [n=116] のデータセットを用いた。さらに、ドットプロット可視化ツール Dot plot large GENomes in an Interactive, Efficient and Simple way (D-GENIES) を用いて、イボテングタケ 2 個体間および昨年度当所で構築したテングタケゲノム、NCBI に登録されている担子菌類ゲノムのアセンブリ情報 (表 2-1) と比較した。

3. 「自然毒のリスクプロファイル」の更新

「自然毒のリスクプロファイル」は厚生労働省 HP に掲載予定のため、令和 3-5 年度厚生労働科学研究費補助金事業 (21KA1005) において厚生労働省の食中毒担当部署 (医薬・生活衛生局食品監視安全課) と協議して決定した掲載項目等に従って、新規知見をもとに更新作業を実施した。

C. D. 研究結果及び考察

1. 分析法

1.1 試験に用いた模擬試料

テングタケ (*Amanita pantherina*、別名 Panthercap) 及びベニテングタケ (*Amanita muscaria*、別名 Fly Agaric) は、わが国のきのこ中毒の中で、発生件数上位を占める毒きのこである。テングタケやベニテングタケを誤って食べると、食後30分くらい経ってから、消化器症状（腹痛、嘔吐、下痢）や中枢神経系の興奮（心拍数の増加、幻覚、振せん、痙攣）と抑制（錯乱、傾眠、構音障害、呼吸抑制、昏睡）を伴う複雑な症状を引き起こし、重症化する場合もある⁷⁾⁹⁾。また、ベニテングタケよりもテングタケの方が高い発症率を示すことが報告されている⁷⁾。

テングタケ及びベニテングタケの毒成分はイボテン酸及びムシモールとされる。いずれもイソキサゾール骨格を有し、イボテン酸がアミノ酸でその脱炭酸体がムシモールの関係にある。それぞれ化学構造が興奮性の神経伝達物質のグルタミン酸と抑制性の神経伝達物質のGABAに似ていることから、作用機序もこれらと同様と考えられている⁹⁾。

また、ベニテングタケはその学名からも分かる通り、ムスカリンを含有している。ムスカリンはコリン作動性の神経系のアゴニストであることから、発汗や流涎、流涙などを起こす¹⁰⁾。しかし、ベニテングタケに含まれるムスカリンは少量のため、ベニテングタケによる食中毒においてムスカリン様症状が見られるケースは少ない¹⁰⁾。一方で、アセタケ科やハイイロシメジ属の一部のきのこには、ベニテングタケよりも多量のムスカリンが含まれるとされている¹⁰⁾。

今回、令和6年度に実施したドクツルタケを含む模擬試料を用いた室間共同試験に続き、実際の毒きのことしてベニテングタケを含む模擬試料を作製し、室間共同試験を行った。Jansson らの報告

りをもとに「きのこシチュー」を作製した点は令和6年度と同様である。標準添加法による値付けの結果、模擬試料に含まれるムスカリンクロリドは 2.92 ± 0.20 mg/kg、イボテン酸は 17.6 ± 1.7 mg/kg、ムシモールは 0.582 ± 0.046 mg/kg となった。

1.2 模擬試料の均質性と安定性

模擬試料に含まれるムスカリンクロリド、イボテン酸及びムシモールの容器間の分散比はそれぞれ、0.69、1.01 及び 1.47 となり、F 境界値 (4.39) よりも小さく、十分に均質であることが確かめられた。

室間共同試験実施前の定量値に対する実施期間中、実施期間後の定量値は、ムスカリンクロリド、イボテン酸及びムシモールのいずれも $\pm 5\%$ 以内であったことから、実施期間を通じて安定性が確保されていた。

1.3 室間共同試験

1.3.1 各機関の定性結果と選択性

参加 15 機関のうち 3 機関はムスカリンクロリドの定量のみの参加であった。それ以外の 12 機関は、配布した混合標準溶液に含まれていたイボテン酸、ムシモール、プロパルギルグリシン及びアシルグリシンの 4 成分のうち、イボテン酸とムシモールの 2 種類の毒成分を正しく同定することができた。

ブランク試験においては、イボテン酸、ムシモール及びプロパルギルグリシンの前後に夾雑ピークが見られた。特にイボテン酸は直前のピークとの分離度が定量に必要とされる 1.0 を下回る場合があり、1 mg/kg 程度の定量を行う場合に影響があると考えられた (図 1-3)。

令和6年度に実施した単一試験室における妥当性確認では、分析カラムとして Phenomenex 社製の Luna Omega Polar C18 を採用した。イボテン酸とシイタケ等のきのこ由来の夾雑成分との分離度を Waters 社製の ACQUITY UPLC HSS T3 と比較

したところ、Luna Omega Polar C18 は分離度がより大きく、定量に適していたためである。しかし、Luna Omega Polar C18 は開封後の保管期間中に分離特性が変化し、イボテン酸と夾雑成分の分離度が低下することが判明し、夾雑成分をイボテン酸と誤認するおそれがあった。

一方で、ACQUITY UPLC HSS T3 は1か月以上の長期保管後も分離特性が変化せず、イボテン酸と夾雑成分の分離度の変化も見られなかった。そのため、今回の室間共同試験においては、ACQUITY UPLC HSS T3（粒子径 1.8 mm、以下 ACQUITY）と、同一の固定相を有する Xselect HSS T3（粒子径 3.5 mm、以下 Xselect）の2つの分析カラムについて、最適化した分離条件を参考として示した上で妥当性確認を行った。

1.3.2 データスクリーニングと外れ値検定

参加 15 機関の前処理操作フローは同一であった。しかし、各機関の装置の制約により、分離条件に違いが生じた。データスクリーニングにおいては、分離カラムが異なる（機関 E、G）、カラム温度が異なる（機関 A）、流速が異なる（機関 F）4機関を除く 11 機関のデータを採用することとした。これらのデータを分析カラム（ACQUITY 及び Xselect）により2つに分け、さらにイボテン酸については絶対検量線の結果について、ムスカリンクロリド及びムシモールは絶対検量線法と内部標準法の2種類の結果について、合計 10 個のデータセットを妥当性確認の対象とした。それぞれのデータセットについて、Cochran 検定と Grubbs 検定により外れ値検定を実施したところ、いずれのデータセットにおいても棄却されたデータはなかった。

1.3.3 妥当性確認の結果

ムスカリンクロリド及びイボテン酸の真度、併行精度、室間精度、HorRat値は、ACQUITYとXselectのいずれの分析カラムにおいても、農水省のガイドラインに適合していた（表1-4及び1-5）。ムシモールは、真度が80%を下回ったが、精度に関する

パラメーターはいずれも農水省のガイドラインに適合していた（表1-6）。

ムシモールの真度が低下した原因を確かめるため、模擬試料の試験溶液について m/z 171 におけるプリカーサーイオンスキャンを行ったところ、ムシモールの保持時間（3.88 min）の直後に巨大な夾雑ピークの存在が認められた。保持時間3.91 minのプリカーサーイオンスペクトル m/z 260.3 から、誘導体化前の分子量は89と推定され、アミノ酸のアラニンと同定された（図1-4）。きのこシチューの原材料のきのこには、アミノ酸が豊富に含まれており、その中でも比較的高濃度に含まれるアラニンがイオン化抑制を引き起こしたと考えられた。

1.3.4 内部標準補正について

ムスカリンクロリドはムスカリン- d_9 を内部標準補正として用いた結果、一部の機関で真度が向上した。一方で、室間精度及びHorRat値は、ACQUITYとXselectのいずれの分析カラムを用いた場合も大きく向上した（表1-4）。ムスカリンの安定同位体標識標準による内部標準補正は、分析法の標準化に寄与することが示唆された。

ムシモールは MTY を内部標準として用いた結果、真度が低下した。きのこシチューのブランク試験溶液から、マトリックス標準溶液を調製し、溶媒標準溶液と面積値を比較したところ、0.01 g sample/mL の希釈倍率で 122% の面積比になった。マトリックスの濃度を希釈するとイオン化促進の影響が小さくなったことから、内部標準補正による真度の低下は、MTY のイオン化促進によるものと推定された。令和 6 年度にシイタケへの添加回収試験による妥当性確認を行った時には、このような現象は認められなかったことから、きのこシチュー由来のマトリックスによるイオン化促進と考えられた。

2. 同定法

2.1 リアルタイム PCR 法によるドクツルタケ特異的遺伝子検査法の開発

2.1.1 テングタケ属子実体サンプルの菌種推定

本検査法の特異性試験に供するため、ご提供いただいたテングタケ属と思われる子実体からゲノムを抽出し、ITS 周辺塩基配列および *rpb2* 遺伝子配列の増幅・解析を行い、データベース上の配列情報と照会した。その結果、少なくとも片方の配列がデータベース上に登録されている配列と $\geq 99.0\%$ の相同性を示した 64 個体について、それぞれ 47 種の菌種として推定した（表 2-2）。

2.1.2 ドクツルタケ遺伝子検査法の特異性確認

今年度新たに追加した 23 種を含むテングタケ属 47 種のゲノムを用いて、改めてリアルタイム PCR 法（TaqMan 法）によるドクツルタケ遺伝子検査法の特異性を確認した。なお本検査法に使用するプライマー・プローブセットは昨年度の検討（テングタケ属 443 種の ITS 周辺配列を用いて BLAST_TSN 解析）に基づいて設計されたものだが、今年度新たに 85 種を追加した計 528 種の ITS 周辺塩基配列を用いた BLAST_TSN 解析を行ったが、同様の結果となっている。

特異性試験の結果を図 2-2 に示す。新たに入手した *Amanita rimosa* やクロタマゴテングタケ、タマゴタケモドキといったドクツルタケ近縁種においても増幅は確認されなかったことから、ドクツルタケへの高い特異性が示唆された。

2.1.3 デジタル PCR によるドクツルタケ陽性コントロールプラスミドの定量

段階希釈（0.1, 1, 10, 100 fg/ μ L）したドクツルタケ陽性コントロールプラスミドを PCR に供した後、陰性及び陽性ドロップレット数を測定した。コピー数定量を行い、プラスミド重量とコピー数の関係を図 2-3 に示した。各濃度のプラスミドで算出されたコピー数を平均化した結果、本陽性コントロールプラスミドの重量当たりのコピー数は 127.8 コピー/fg であった。

2.1.4 ドクツルタケ遺伝子検査法の検出限界および増幅効率評価

コピー数を定量した陽性コントロールプラスミドを用いて、本検査法の検出限界を評価したところ、検出率が 95%以上の最低濃度は 6.4 コピー/ウェルであった（図 4A）。

また本検査法の増幅効率評価として、陽性コントロールプラスミド（1 ウェルあたり 6.4 コピーから 63900 コピー）を用い、各濃度における C_q 値をプロットしたところ、直線性が $R^2 = 0.9897$ で、増幅効率（E）=91.0%となった（図 4B）。さらに、ドクツルタケのゲノム DNA（1 ウェルあたり 0.5 pg から 50 ng）を用いて同様な評価を行うと、直線性は $R^2 = 0.9992$ で、増幅効率（E）=96.9%となった（図 4C）。

以上の結果より、昨年度に開発した、リアルタイム PCR 法を用いたドクツルタケ特異的遺伝子検査法はドクツルタケに特異的で、十分な検出感度を有し、幅広い濃度レンジにおいて一定の増幅効率を示すことが分かった。

2.1.5 ゲノム熱分解による検出性能への影響

加熱調理によるドクツルタケゲノム熱分解が本検査法の性能に与える影響を検討した。高分子量のドクツルタケゲノム DNA を加熱処理し、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、加熱時間依存的にバンドが低分子量側にシフトしていることから、ゲノム DNA が熱分解されていることが確認された（図 2-5A）。上記ゲノム DNA セットを用いて、本検査法（増幅長:89 塩基対）とユニバーサルプライマーセットによる ITS 増幅（増幅長:671 塩基対）を比較した。ITS プライマーセットは 95°C 10 分までの処理でしか増幅が見られなかった。一方で本検査法では、95°C 60 分までの処理において、 C_q 値は高くなるものの、増幅は見られた（図 2-5B）。従って、本検査法は加熱調理されたサンプルにおいてもある程度の検出性能を保持していることが示唆された。食中毒発生時の原因毒きのこの同定を目的として PCR を実施する際に

は、必ずしも高分子量の精製ゲノムを得られるとは限られず、調理済み食品や吐しゃ物等に含まれる断片化したゲノムサンプルからの検出性能も重要である。従来法では ITS 領域を増幅、配列をデータベースに照会することで原因毒きのこを推定するが、増幅塩基配列長が 600-700 塩基であるために断片化ゲノムサンプルへの適用性には限界がある。一方で、本検査法は増幅塩基配列長が短いために食中毒原因毒きのこの同定において想定される断片化 DNA 試料に対して有効な検出手法となることが期待できる。

2.2 リアルタイム PCR 法を用いたイボテングタケ特異的検査法の開発

2.2.1 BLAST_TSN を用いたイボテングタケ特異的な塩基配列の探索

ドクツルタケ同様に、テングタケ属 528 種の ITS 周辺塩基配列から、イボテングタケ以外の種に相同性の高い塩基配列を BLAST_TSN により選抜し、それら配列を除くことで、イボテングタケに特異的な塩基配列を探索した。その結果、複数のイボテングタケ特異的塩基配列が見出された(図 2-6)。

2.2.2 イボテングタケ特異的リアルタイム PCR の特異性評価

BLAST_TSN により見出されたイボテングタケ特異的塩基配列を基に、プライマーセットを設計した。55 個体 47 種のテングタケ属のゲノムに対し、イボテングタケを標的として今回設計したプライマーセットを用いてリアルタイム PCR (SYBR 法) を実施した。その結果、イボテングタケ 3 個体に対して増幅反応が見られた一方で、イボテングタケに特に近縁とされるウスキテングタケやベニテングタケ、オウテングタケ、*Amanita subglobosa*、テングタケにおいては明確な増幅反応は確認されなかった。現時点では SYBR 法での検討にとどまるものの、本法はイボテングタケに高い特異性を有することが示唆された(図 2-7)。なお一部非イボテングタケサンプルにおいて Cq 値

35 を超える増幅が確認されている。ただし昨年実施したドクツルタケ特異的遺伝試験法の開発時にも SYBR 法での検討の際には同様な弱い非特異的な増幅反応が見られたが、適切な加水分解プローブを設計し、TaqMan 法に切り替えることでこうした増幅は抑制された。イボテングタケに関しても TaqMan 法に切り替えることで、非特異的な増幅反応を抑制し、より高い特異性が得られると期待される。

2.3 イボテングタケ 2 個体のゲノムアセンブリ

イボテングタケは主に消化器系の食中毒を引き起こすきのこで、特徴的な芳香を持つ。さらにイボテングタケによく似た特徴(形態や毒性成分)を持つ毒きのことしてテングタケも国内に広く分布しており、どちらも国内で誤食事例の報告がある。現在この 2 種は ITS 等の部分配列解析による種推定が可能だが、公的データベースにおいて全ゲノム配列を参照できない。本報告では国内で採取されたイボテングタケと推定される 2 個体のゲノムアセンブリを個体ごとに行い、ゲノム情報の取得および個体間・種間の配列比較を行った。

2.3.1 rpb2 領域の塩基配列による種推定

愛知県で採取された子実体サンプル No. 45, 46 より抽出した DNA を用いて、サンガーシーケンスにより 2 個体分の rpb2 領域を確認した。この配列について BLAST 検索を行い、NCBI データベースと照合した結果、本サンプルは学名 *Amanita ibotengutake* (*A. ibotengutake*) (Sequence ID:MH486051.1) と相同率が 99.84% および 96.36% であり、形態的特徴からも 2 個体とも *A. ibotengutake* と推定した。以降、本サンプルは個体識別のために【イボテングタケ③】および【イボテングタケ④】とした。

2.3.2 全ゲノムシーケンス

得られた HiFi リードからドラフトゲノムを得るまでに検討したスキームを図 2-8 に示した。

【イボテングタケ③】について、ベースコール後に得られた HiFi リードは 1,736,913 リードであった。【イボテングタケ④】について、ベースコール後の HiFi リードは 784,413 リードであった(表 2-3,4)。

Raw リードのアセンブリ結果「アセンブリ①」については表 2-5 に、「アセンブリ①」を使用した BUSCO (bacteria_odb12) の結果を表 2-6 に示した。この bacteria_odb12 の Complete BUSCO 値は【イボテングタケ③】で 99.1%、【イボテングタケ④】で 12.1%を示していたことから、イボテングタケ 2 個体のシーケンスリードにはサンプル採取の際に付着したと思われる細菌由来のリードが含まれていると推測した。また、これらの BUSCO 値から細菌リードは【イボテングタケ③】の方が【イボテングタケ④】よりも細菌由来のリードが多く含まれていると推測し、続いてリードのフィルタリングを実施した。

2.3.3 ミトコンドリアゲノムの探索

minimap2 を用いて、昨年度アセンブルしたテングタケ (NIHS テングタケ) ミトコンドリア環状ゲノム (54,066 bp) にマッピングしたリードを回収した。ミトコンドリア由来と考えられるリードは【イボテングタケ③】は 84,460 リード、【イボテングタケ④】は 77,302 リードであった(表 2-3,4)。また、昨年度同様にこれらリードをアセンブリすると、2 個体とも 56,395 bp で環状に繋がった。

2.3.4 リードフィルタリングとゲノムアセンブリ

Raw リードによるアセンブリの BUSCO (bacteria_odb12) 値から、特に【イボテングタケ③】のリードにおいて細菌由来のゲノムが多くコンタミネーションしている可能性が示唆されていた(表 2-6)。そこで細菌ゲノムデータを鋳型にして細菌由来ゲノムのリードを除いた。続いて【イボテングタケ④】のシーケンスリードについても同様のフィルタリングを実施した。細菌由来リードのフィルタリングを実施して残ったリードは【イボテングタケ③】が 1,650,055 リード、【イボ

テングタケ④】が 706, 988 リードであった(表 2-3,4)。さらにアセンブリを改善するため、NanoFilt を用いてアセンブリで使用するリードの最良のトリミング条件を検討した結果、【イボテングタケ③】は NanoFilt 条件: read quality ≥ 30 、最短リード長=13,000 で 82,868 リード、【イボテングタケ④】は NanoFilt 条件: read quality ≥ 30 、最短リード長=10,000 で 107,474 リード(表 2-3,4)、アセンブリのコンティグ数は【イボテングタケ③】は 25 本、【イボテングタケ④】は 16 本であった(表 2-5)。

2.3.5 ドラフトゲノムの評価と比較

BUSCO (fungi_odb12、basidiomycota_odb12、agaricomycetes_odb12、agaricales_odb12、bacteria_odb12) でイボテングタケゲノムとしての完全性を評価したところ、【イボテングタケ③】ドラフトゲノムの Complete BUSCO 値はそれぞれ 97.9%、97.6%、95.1%、91.1%、9.5%、【イボテングタケ④】ドラフトゲノムの Complete BUSCO 値はそれぞれ 97.8%、97.6%、95.1%、91.1%、9.5%、であり、担子菌門・真正担子菌綱・ハラタケ目の主要遺伝子の網羅性が高いことが示唆された(表 2-7,8)。さらに bacteria_odb12 についての Complete BUSCO 値において他のリファレンスゲノム (8.6~11.2%) と同等で、特にイボテングタケ③からは細菌由来リードを適切に除けたことを示している(表 2-6)。

続いて D-GENIES を用いたゲノム配列相同性の比較解析を実施した。まず、本研究でアセンブリしたイボテングタケ 2 個体のドラフトゲノムを比較した結果、高い相同性が確認された(図 2-9A)。次にイボテングタケと同じテングタケ属テングタケ節であり、形態的特徴も非常に似たテングタケ (令和 6 年度研究報告書、コンティグ数 19、全長 39.9Mb) のドラフトゲノムとの比較を行った。イボテングタケとテングタケとの比較では 1 箇所の逆位がみられた(図 2-9B,9D)。さらに、同じくテングタケ属に分類されるベニテングタケ (*Amanita*

muscaria, GenBank No. GCA_000827485.1 コンティグ数 1,101、全長 40.7 Mb) のドラフトゲノムとは、コンティグ数に差があるにもかかわらず全体的に相同性が高かった (図 2-9C,9E)。

2.3.6 イボテングタケのゲノムアセンブリの総括

イボテングタケの全ゲノムデータは現在 NCBI データベースに無いが、イボテングタケという菌種は日本国内で 2002 年に新種として登録された菌種であり¹¹⁾、毒きのこ類縁種との比較や毒成分の遺伝的背景を理解するためにも、全ゲノム配列の取得は今後重要な課題と考えられる。本研究ではイボテングタケ 2 個体分のドラフトゲノムを構築し、BUSCO による完全性評価や D-GENIES によるゲノム比較解析を実施した。構築したドラフトゲノムについて、最終的なコンティグ本数は【イボテングタケ③】が 25 本、【イボテングタケ④】は 16 本 (表 2-5) であった。同じテングタケ節に属し、参照可能なベニテングタケゲノム配列のコンティグが 1000 本以上であったことを考えると、格段に精度の高いドラフトゲノムを構築したと言える。また、コンティグの両端にテロメアリピートを持ち、染色体レベルに組みあがったゲノムの代表としてマツタケ (NCBI マツタケ: *Tricholoma matsutake*) のゲノムを参照すると全コンティグ数は 13 本であったことから (表 2-1)、【イボテングタケ③】及び【イボテングタケ④】ともに担子菌類の染色体レベルのアセンブリと考えられる。単離培養が困難な子実体から、他の生物由来のリードを除去し、高いクオリティのゲノムを構築できたことはゲノム解析において大きな進歩と考えられる。本研究で構築したイボテングタケドラフトゲノムは遺伝子検査法の開発・改良やその他の毒成分の遺伝的背景を探るツールとして有用だろう。一方で、RNA シークエンス解析、遺伝子アノテーション・機能推定等を行い、ゲノムのみならず全遺伝子情報も今後取得する予定である。

3. 「自然毒のリスクプロファイル」の更新

自然毒のリスクプロファイルの更新にあたり、厚生労働省の食中毒担当部署と協議して決定した掲載項目等に従って、現在、新規知見をもとに動物性自然毒に関する更新作業を順次実施している。更新作業では、優先課題とされた、様式や記載項目の統一、より鮮明で特徴を捉えた写真の掲載、新しい知見の反映、引用・参考資料の記載を中心に検討した。令和 7 年度は、本研究班の研究分担者の協力を得て巻貝 (フグ毒) などを対象に実施した。

「自然毒のリスクプロファイル」は一般消費者に限らず、研究者、地方自治体、メディアなどの情報源にもなっており、ユーザーの裾野はとても広い。例えば、地方自治体のホームページでは、食中毒に関する情報提供のページで「自然毒のリスクプロファイル」を参考資料として紹介しリンクを貼っているところも多い。本分担研究で更新作業が終了した後は、厚生労働省ホームページに掲載予定である。更新版は、消費者をはじめとした多くの人にとって、より有用な参考資料になることが期待される。

E. 結論

わが国の毒きのこによる食中毒の原因究明に有用な分析法の妥当性確認のため、令和 6 年度に引き続き、きのこシチューを用いた室間共同試験を実施した。ムスカリン、イボテン酸及びムシモールの 3 種の毒成分を含有するベニテングタケを原材料の一部として用いることで、実際の食中毒残品を想定した模擬試料を作製した。分析法 2 は、ムスカリン、イボテン酸及びムシモールの同定能力に問題がないことが確かめられ、ムスカリンクロリド及びイボテン酸の定量結果は農水省のガイドラインに適合する良好な結果が得られた。ムシモールは、きのこ由来のアミノ酸の影響により定量値が低下した。また、内部標準の MTY はきのこシチュー由来のマトリックスによるイオン化促

進を受け、内部標準補正後の定量値を低下させることが明らかとなった。内部標準の選択にさらなる改良の余地があるものの、本法は実際の食中毒の原因究明に適用可能な分析法であることが示唆された。

一方、遺伝子検査法に基づく毒きの同定法として、昨年度開発したリアルタイム PCR 法によるドクツルタケ特異的検査法の評価を実施した。その結果、ドクツルタケに特異的で、十分な検出感度を有し、幅広い濃度レンジにおいて一定の増幅効率を示すことが分かった。さらに食中毒発生時のサンプルを想定して、ゲノム熱分解による検査性能への影響を検討したところ、ある程度のゲノム断片化にも抵抗性であり、従来の遺伝子鑑別法より有用であることが示唆された。また他のテングタケ属きのこであるイボテングタケについて、ITS 領域よりイボテングタケ特異的塩基配列を見出し、これを基に設計したプライマーによるリアルタイム PCR 法 (SYBR 法) がイボテングタケに高い特異性を示すことが分かった。さらに全ゲノムシーケンスと *de novo* アセンブリにより高品質なイボテングタケドラフトゲノムを構築した。今回見出されたイボテングタケ特異的塩基配列に基づいて、今後リアルタイム PCR 法による遺伝子検査法の特異性や性能の評価を進める。また今回得られた全ゲノム情報は、遺伝子検査法のさらなる特異性や性能向上に、そして毒性成分の産生機序の解明に役立つと期待される。

さらに、進行中の「自然毒のリスクプロファイル」の更新作業を完了させ、厚生労働省ホームページへの掲載を目指す。

F. 研究発表・業績

1. 論文発表

- 1) Taniguchi, M., Noguchi, S., Kawashima, H., Sugiura, J., Tsuchiyama, T., Minatani, T.,

Miyazaki, H., and Zaitzu, K. *Food Control*, **174**, 111251 (2025)

2. 学会発表

- 1) 友澤潤子、南谷臣昭、竹内浩、谷口賢、山口瑞香、野村千枝、吉岡直樹、阿部尚仁、鈴木敏之、登田美桜：LC-MS/MS によるわが国の主な毒きのこの多成分同時分析法の開発、第 121 回日本食品衛生学会学術講演会、東京都、2025 年 10 月
- 2) 竹内浩、南谷臣昭、小郷沙矢香、木村亜莉沙、佐原甲一、有沢拓也、川端陽子、藤田結美、細野加芳、深津浩佑、茅原田一、原有紀、鈴木敏之、登田美桜、遠藤利加：有毒きのこの模擬調理試料を用いた試験室間共同試験 (アマニタキシン)、第 62 回全国衛生化学技術協議会年会、高崎市、2025 年 11 月
- 3) 谷口賢、川島英頌、土山智之、南谷臣昭、野口昭一郎：有毒植物による食中毒対応を目的とした血清中植物毒成分の分析法の検討、第 62 回全国衛生化学技術協議会年会、高崎市、2025 年 11 月
- 4) 成島純平、杉野御祐、吉場聡子、曾我慶介、柴田識人。リアルタイム PCR 法によるドクツルタケ特異的遺伝子検知法の開発、第 62 回全国衛生化学技術協議会年会、高崎市、2025 年 11 月
- 5) 南谷臣昭、谷口賢、友澤潤子、竹内浩、太田康介、高橋正幸、登田美桜：LC-MS/MS による食中毒原因植物性自然毒の多成分迅速分析法の開発、第 56 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、岐阜市、2025 年 11 月
- 6) 南谷臣昭：LC-MS/MS による植物性自然毒の包括的定量分析法の開発に向けた取り組み、日本薬学会第 146 年会 (シンポジウム「有毒植物による健康被害と薬学の役割」)、吹田市、2026 年 3 月

3. 行政関係者向け説明会

- 1) 柴田識人. 毒きのこの遺伝子検査法に関する取り組み、令和7年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会、神戸市、2025年11月
- 2) 竹内浩、南谷臣昭、遠藤利加：令和7年度地域保健総合推進事業 精度管理に用いた試験法の性能評価、令和7年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸支部衛生化学部会、岐阜市、2026年2月

4. 市民向け発表会

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 参考文献

- 1) Jansson, D., Fredriksson, S., Herrmann, A., and Nilsson, C. *Forensic Sci. Int.*, **221**, 44-49 (2012)
- 2) Thompson, M. and Wood, R. J. *AOAC Int.* **76**, 924-940 (1993)
- 3) Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, *AOAC Int.* (2002)
- 4) 分析法の妥当性確認に関するガイドライン、農林水産省、2019
- 5) Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White T. J. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, *Academic Press* (1990)
- 6) Cai, Q., Tulloss, R. E., Tang, L. P., Tolgor, B., Zhang, P., Chen, Z. H., and Yang, Z. L. *BMC Evol Biol*, **14**, 143 (2014)
- 7) Moss, M. J. and Hendrickson, R. G. *Clin. Toxicol.*, **57**, 99-103 (2019)
- 8) 大作晃一、吹春俊光、吹春公子 おいしいきのこ毒きのこハンディ図鑑、東京、主婦の友社、2016

- 9) 上條吉人 臨床中毒学 第2版、東京、医学書院、2023
- 10) Lurie, Y., Wasser, S. P., Taha, M., Shehade, H., Nijim, J., Hoffmann, Y., Basis, F., Vardi, M., Lavon, O., Suaed, S., Bisharat, B., and Bentur, Y. *Clin. Toxicol.*, **47**, 562-565 (2009)
- 11) Oda, T., Yamazaki, T., Tanaka, C., Terashita, T., Taniguchi, N., and Tsuda M. *Mycol Progress*, **1**, 355-365 (2002)

表 1-1 室間共同試験参加 15 機関の LC-MS/MS 測定条件

Laboratory		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
LC	Manufacturer	Sciex	Shimadzu	Sciex	Shimadzu	Agilent	Agilent	Agilent	Waters	Waters	Sciex	Waters	Sciex	Waters	Sciex	Sciex
	Instrument	Exion LC 2.0+	LC-40D XR	ExionLC AE	LC20AD	1260 Infinity II	1260 Infinity III (Bio)	1290 Infinity II	ACQUITY UPLC H-Class	ACQUITY UPLC H-Class	Exion LC AD	ACQUITY UPLC H-Class PLUS	Exion LC AD	ACQUITY UPLC H-Class PLUS	Exion LC AC	Exion LC AD
MS/MS	Manufacturer	Sciex	Shimadzu	Sciex	Sciex	Agilent	Agilent	Agilent	Waters	Waters	Sciex	Waters	Sciex	Waters	Sciex	Sciex
	Instrument	QTRAP4500	8045	Triple Quad 5500+	4000Q TRAP	6470 LC/MS	Ultivo LC/MS	6470B LC/TQ	Xevo TQ-S micro	Xevo TQ-S micro	Triple Quad 5500+	Xevo TO Absolute XR	Triple Quad 5500+	Xevo TQ-S micro	QTRAP4500	Triple Quad 5500+
Column		a	b	b	b	c	b	d	a	a	a, b	a	a, b	a	b	a, b
Mobile phase		Solvent A	0.1% Formic acid in water													
Gradient method		Solvent B	0.1% Formic acid in acetonitrile													
Flow rate (mL/min)		% of solvent B	a	b	b	b	b	b	a	a	a	a, b	a	a, b	a	a, b
Column temperature (°C)			a	b	b	b	b	0.3	a	a	a	a, b	a	a, b	a	a, b
Injection volume (μL)			40	35	35	35	40	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Dilution factor (mg sample/mL)			5	5	5	5	1	5	1	5	5	5	5	5	5	5
Electrospray ionization (+/-)	Muscarin	5	0.5	2	5	2 *	5	1 *	1	5	5	2.5	5	2	5	5
	Ibotenic acid	0.5	1	-	0.5	-	0.5	0.2 *	1	-	0.5	0.25	0.5	0.2	0.5	0.5
	Muscimol	10	10	-	10	-	5	0.5 *	10	-	10	10	10	10	10	10
Precursor ion (m/z)	Muscarin	174	174.5	174	174	174	174	174	174	174	174	174	174	174	174	174
	Ibotenic acid	329	329	-	329	-	329	329	329	-	329	329	329	329	329	329
	Muscimol	285	285	-	285	-	285	285	285	-	285	285	285	285	285	285
Quantifier ion (m/z)	Muscarin	57	57.15	57	57	57.1	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
	Ibotenic acid	171	171	-	171	-	171	171	171	-	116	171	171	171	171	171
	Muscimol	171	171.15	-	171	-	171	171	171	-	171	171	171	171	171	171

* A value reflecting the reduction in injection volume

Conditon a		Column	ACQUITY UPLC HSS T3(2.1×150 mm, 1.8 μm) (Waters)
Gradient method	% of solvent B	2%(0 min)→10%(1 min) →30%(11 min)→95%(11.1-13 min) →2%(13.1-18 min)	
Flow rate (mL/min)		0.4	

Conditon b		Column	Xselect HSS T3 (2.1×150 mm, 3.5 μm) (Waters)
Gradient method	% of solvent B	0%(0 min) → 10%(2 min) →30%(22 min) → 95%(22.1-26 min) → 0%(26.1-36 min)	
Flow rate (mL/min)		0.2	

Column c: Xbridge Shield RP18(2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm) (Waters)

Column d: ACQUITY UPLC HSS T3(2.1×100 mm, 1.8 μm) (Waters)

表 1-2 機関 L の MS/MS 条件

LC	Exion LC AD (Sciex)
MS/MS	Triple Quad 5500+ ・ QTRAP Activated (Sciex)
Curtain gas (psi)	30
Collision gas (psi)	9
Ion Spray Voltage(V)	5000
Temperature (°C)	600
Ion Source Gas1 (psi)	60
Ion Source Gas2 (psi)	60

No.	Compound name	RT (min) * Condition a/b	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	Internal standard
1	Muscarin	2.2/5.1	174	57	51	31	6	Muscarin-d9
			174	43	51	49	10	
2	Ibotenic acid	3.3/6.1	329	171	90	30	10	MTY
			329	116	90	70	10	
3	Muscimol	3.9/7.0	285	171	90	30	10	MTY
			285	116	90	70	10	
4	Propargylglycine	4.8/8.5	284	171	90	30	10	MTY
			284	116	90	70	10	
5	Allylglycine	5.8/10.3	286	171	90	30	10	MTY
			286	116	90	70	10	
IS 1	Muscarin-d ₉	2.1/5.1	183.1	115.1	51	25	10	—
			183.1	69.1	51	29	8	
IS 2	MTY	9.1/16.6	366.1	171	90	30	10	—
			366.1	116	90	70	10	

* RT (min) values are slash-separated for each condition (a and b) in Table 1-1.

表 1-3 室間共同試験のクライテリア(農水省のガイドラインをもとに作成)

Matrix	Mushroom stew			
	Unit	Recovery(%)	RSD _R (%)	RSD _r (%)
Recovery Repeatability Reproducibility	≥ 10 mg/kg	80~110	≤ 22	≤ 7.3
	≥ 1 mg/kg	80~110	≤ 32	≤ 11
	≥ 0.1 mg/kg	80~110	< 44	≤ 15
	HorRat value ≤ 2			

表 1-4 室間共同試験の結果—ムスカリンクロリド

ACQUITY column

Laboratory	IS(-)		IS(+)		Criteria*
H	2.60	2.64	2.69	2.66	
I	2.54	2.62	2.53	2.59	
J	2.32	2.30	2.37	2.44	
K	2.16	2.16	2.41	2.25	
L	2.89	2.80	2.70	2.63	
M	2.44	2.35	2.70	2.73	
O	2.37	2.38	2.54	2.50	
Mean (mg/kg)	2.47		2.55		(1 ≦, <10)
Mean recovery (%)	84.6		87.4		80~110
Outlier (Cochran parameters)	0		0		—
Outlier (single Grubbs parameters)	0		0		—
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		0		—
Repeatability [RSD _r , %]	1.7		2.2		≦ 11
Reproducibility [RSD _R , %]	9.3		5.9		≦ 32
Predicted reproducibility [PRSD _R , %]	14.0		13.9		—
HorRat value	0.7		0.4		≦ 2

*Guidelines for the validation of analytical methods, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (2019)

Xselect column

Laboratory	IS(-)		IS(+)		Criteria*
B	2.93	2.99	2.70	2.87	
C	2.83	2.90	2.78	2.77	
D	2.45	2.40	2.67	2.76	
J	2.44	2.42	2.30	2.23	
L	3.14	2.97	2.84	2.69	
N	2.57	2.66	2.54	2.66	
O	2.92	2.99	2.50	2.54	
Mean (mg/kg)	2.76		2.69		(1 ≦, <10)
Mean recovery (%)	94.4		92.2		80~110
Outlier (Cochran parameters)	0		0		—
Outlier (single Grubbs parameters)	0		0		—
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		0		—
Repeatability [RSD _r , %]	2.2		2.1		≦ 11
Reproducibility [RSD _R , %]	9.7		5.7		≦ 32
Predicted reproducibility [PRSD _R , %]	13.7		13.8		—
HorRat value	0.7		0.4		≦ 2

*Guidelines for the validation of analytical methods, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (2019)

表 1-5 室間共同試験の結果ーイボテン酸

ACQUITY column

Laboratory	IS(-)		Criteria*
H	13.5	14.9	
J	18.3	20.6	
K	19.5	18.9	
L	18.0	18.3	
M	21.7	20.4	
O	20.1	21.0	
Mean (mg/kg)	18.4		(10 ≤, <100)
Mean recovery (%)	104.6		80~110
Outlier (Cochran parameters)	0		—
Outlier (single Grubbs parameters)	0		—
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		—
Repeatability [RSD _r , %]	4.9		≤ 7.3
Reproducibility [RSD _R , %]	13.6		≤ 22
Predicted reproducibility [PRSD _R , %]	10.3		—
HorRat value	1.3		≤ 2

*Guidelines for the validation of analytical methods, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (2019)

Xselect column

Laboratory	IS(-)		Criteria*
B	14.6	15.0	
D	20.0	21.3	
J	18.4	20.8	
L	17.2	17.4	
N	17.5	19.2	
O	20.9	22.1	
Mean (mg/kg)	18.1		(10 ≤, <100)
Mean recovery (%)	103.1		80~110
Outlier (Cochran parameters)	0		—
Outlier (single Grubbs parameters)	0		—
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		—
Repeatability [RSD _r , %]	5.3		≤ 7.3
Reproducibility [RSD _R , %]	13.6		≤ 22
Predicted reproducibility [PRSD _R , %]	10.3		—
HorRat value	1.3		≤ 2

*Guidelines for the validation of analytical methods, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (2019)

表 1-6 室間共同試験の結果—ムシモール

ACQUITY column

Laboratory	IS(-)		IS(+)		Criteria*
H	0.363	0.372	0.469	0.447	
J	0.479	0.484	0.356	0.338	
K	0.346	0.335	0.320	0.288	
L	0.464	0.462	0.373	0.365	
M	0.441	0.466	0.336	0.362	
O	0.527	0.541	0.456	0.452	
Mean (mg/kg)	0.440		0.380		(0.1 ≦, <1)
Mean recovery (%)	75.6		65.3		80~110
Outlier (Cochran parameters)	0		0		—
Outlier (single Grubbs parameters)	0		0		—
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		0		—
Repeatability [RSD _r , %]	2.1		3.9		≦ 15
Reproducibility [RSD _R , %]	16.6		16.7		<44
Predicted reproducibility [PRSD _R , %]	18.1		18.5		—
HorRat value	0.9		0.9		≦ 2

*Guidelines for the validation of analytical methods, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (2019)

Xselect column

Laboratory	IS(-)		IS(+)		Criteria*
B	0.266	0.283	0.275	0.283	
D	0.326	0.339	0.258	0.279	
J	0.370	0.361	0.320	0.293	
L	0.382	0.387	0.334	0.340	
N	0.457	0.470	0.472	0.437	
O	0.558	0.566	0.484	0.489	
Mean (mg/kg)	0.397		0.355		(0.1 ≦, <1)
Mean recovery (%)	68.2		61.1		80~110
Outlier (Cochran parameters)	0		0		—
Outlier (single Grubbs parameters)	0		0		—
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		0		—
Repeatability [RSD _r , %]	2.1		4.1		≦ 15
Reproducibility [RSD _R , %]	25.7		26.3		<44
Predicted reproducibility [PRSD _R , %]	18.4		18.7		—
HorRat value	1.4		1.4		≦ 2

*Guidelines for the validation of analytical methods, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (2019)

表 2-1. 参照した NCBI genome assembly 情報

	NCBI ベニテングタケ	NCBI シイタケ	NCBI マツタケ
GenBank No.	GCA_000827485	GCA_021015755	GCA_026075535
Taxon	Amanita muscaria Koide BX008	Lentinula edodes (shiitake mushroom)	Tricholoma matsutake
全コンティグ数	1,101	128	13
全塩基長 (bp)	40,699,759	45,594,472	161,040,721
最短塩基長 (bp)	1,011	2,320	9,869,253
平均塩基長 (bp)	36,966.20	356,206.80	12,387,747.80
最大塩基長 (bp)	1,491,530	2,350,089	19,249,005
N50	168,151	692,557	12,376,747
N50 リード数	54	22	6
GC (%)	41.86	46.17	45.5

表 2-2. テングタケ属 64 個体の菌種推定結果

No.	推定されたきのこ種	ITS 周辺配列		rpb2	
		Accession ID	Identities (%)	Accession ID	Identities (%)
1	<i>Amanita detersa</i>	MH508332.1	100	MH485954.1	100
2	コガネテングタケ	N.A.	N.A.	MH485980.1	100
3	<i>Amanita fritillaria</i>	MH508368.1	100	MH486006.1	99.5
4	<i>Amanita citrinoannulata</i>	MH508318.1	100	MH485938.1	100
5	ヘビキノコ	MW589090.1	99.3	MH486295.1	99.7
6	ガンタケ	MN794881.1	99.4	MH486220.1	99.5
7	ヘビキノモドキ	MH508610.1	99.7	MH486292.1	99.9
8	テングタケモドキ	MN794886.1	100	MN657440.1	100
9	コタマゴテングタケ	N.A.	N.A.	MH485937.1	99.4
10	コテングタケ	LC860712.1	100	MH486180.1	100
11	<i>Amanita rimosa</i> ① (2025, 兵庫)	KU518317.1	100	KJ466615.1	100
12	<i>Amanita rimosa</i> ② (2025, 東京)	KU518317.1	100	KJ466615.1	100
13	クロタマゴテングタケ	AB509768.1	100	MH486018.1	98.6
14	アケボノドクツルタケ① (2023, 北海道)	KU139507.1	100	KJ466608.1	100
15	アケボノドクツルタケ② (2025, 福島)	KJ739813.1	100	KJ466625.1	99.8
16	アケボノドクツルタケ③ (2025, 福島)	OR121082.1	100	MH486160.1	99.8
17	ドクツルタケ① (2016, 北海道)	AB015676.1	100	MW759809.1	100
18	ドクツルタケ② (2022, 北海道)	MG516218.1	100	MW759809.1	100
19	ドクツルタケ③ (2024, 富士山)	KJ466429.1	100	MW759809.1	99.8
20	タマゴタケモドキ	OR121083.1	100	MH486314.1	99.5
21	<i>Amanita molliuscula</i> ① (2023, 北海道)	MN061272.1	100	KJ466640.1	100
22	<i>Amanita molliuscula</i> ② (2025, 北海道)	PQ524988.1	100	KJ466640.1	99.8
23	<i>Amanita ovalispora</i>	N.A.	N.A.	OR051513.1	100
24	<i>Amanita griseofolia</i>	MH508378.1	99	MH486029.1	100
25	<i>Amanita orienticrocea</i>	OQ553810.1	99.4	OR051730.1	100
26	タマゴタケ	LC056756.1	100	LC723351.1	100
27	サトタマゴタケ① (2024, 東京)	LC056760.1	99.7	LC723327.1	100
28	サトタマゴタケ② (2024, 東京)	N.A.	N.A.	LC723332.1	99.4
29	キタマゴタケ① (2025, 福島)	LC056772.1	99.8	MH486064.1	99.8
30	キタマゴタケ② (2025, 福島)	N.A.	N.A.	MH486066.1	99.8
31	ドウシタケ	PQ613301.1	99.8	PP979479.1	99.5
32	タマゴテングタケモドキ	KM052529.1	100	N.A.	N.A.
33	ミヤマタマゴタケ	AB038764.1	100	N.A.	N.A.
34	ウスキテングタケ① (2012, 東京)	ON131764.1	99.7	MH486140.1	99.8
35	ウスキテングタケ② (2012, 東京)	ON131764.1	99.8	MH486140.1	99.2
36	ウスキテングタケ③ (2025, 福島)	ON131764.1	99.7	MH486140.1	99.7
37	ウスキテングタケ④ (2025, 大阪)	ON131764.1	99.8	N.A.	N.A.
38	テングタケダマシ	KU139494.1	99.8	MH486319.1	98.2
39	ベニテングタケ① (2024, 富士山)	MT578069.1	100	MT486101.1	99.4
40	ベニテングタケ② (2025, 北海道)	N.A.	N.A.	MH486100.1	99.9
41	ベニテングタケ③ (2025, 北海道)	N.A.	N.A.	MH486100.1	99.7
42	オウテングタケ	LT594941.1	100	N.D.	N.D.
43	イボテングタケ① (2011, 東京)	N.A.	N.A.	MH486051.1	99.7
44	イボテングタケ② (2024, 長野)	N.A.	N.A.	MH486051.1	99.9
45	イボテングタケ③ (2024, 愛知)	N.A.	N.A.	MH486051.1	99.9
46	イボテングタケ④ (2024, 愛知)	N.A.	N.A.	MH486051.1	99.6
47	<i>Amanita subglobosa</i>	ON794271.1	100	MH486302.1	100
48	テングタケ① (2025, 大阪)	AB080974.1	100	MH486303.1	98.5
49	テングタケ② (2025, 宮城)	AB080974.1	100	MH486303.1	98.3
50	ヒメコナブリツルタケ	KF017932.1	100	MH485973.1	99.1
51	ハイカラテングタケ	AB096057.1	99.5	KY656874.1	98.9
52	<i>Amanita vestita</i>	N.A.	N.A.	MH486335.1	100
53	コヒラシロオニタケ	N.A.	N.A.	MH486069.1	99.5
54	<i>Amanita alboradicata</i>	MW016760.1	99.8	MW546614.1	99.9
55	シロオニタケ	N.A.	N.A.	MH638336.1	100
56	タマシロオニタケ	N.D.	N.D.	MT412395.1	100
57	ニオイドクツルタケ	N.A.	N.A.	MH486115.1	100
58	コテングタケモドキ	N.A.	N.A.	MH486196.1	99.2
59	シロテングタケ	N.A.	N.A.	MH486106.1	99
60	アオミドリタマゴテングタケ	KT779080.1	99.4	N.D.	N.D.
61	スオウシロオニタケ	N.A.	N.A.	MH486323.1	100
62	フクロツルタケ	OR952537.1	99	N.D.	N.D.
63	<i>Amanita lanigera</i>	MH508418.1	99.1	MH486073.1	99.8
64	シロフクロツルタケ	LC844128.1	100	N.D.	N.D.

N.A.: 読み取り不可

N.D.: 登録配列なし

表 2-3. イボテングタケ③のリードフィルタリング結果

イボテングタケ①	Raw リード	フィルタ I		フィルタ II		フィルタ III 後のリード
		フィルタ I 後のリード	ミトコンドリア由来リード	フィルタ II 後のリード	細菌由来リード	
全リード数	1,736,913	1,652,453	84,460	1,650,055	2,398	82,868
全長	18,122,775,340	17,260,935,317	861,840,023	17,235,129,469	25,805,848	1,183,070,833
塩基長	最短	135	3,397	135	4,925	13,000
(bp)	平均	10,433.90	10,204.10	10,445.20	10,761.40	14,276.60
	最大	28,814	19,672	28,814	19,847	21,412
	N50	10,604	10,325	10,618	10,995	14,073
N50 リード数	8,616	8,586	5,747	8,585	894	4,139
GC (%)	45.85	46.97	23.38	46.97	48.42	46.97

表 2-4. イボテングタケ④のリードフィルタリング結果

イボテングタケ②	Raw リード	フィルタ I		フィルタ II		フィルタ III 後のリード
		フィルタ I 後のリード	ミトコンドリア由来リード	フィルタ II 後のリード	細菌由来リード	
全リード数	784,413	707,111	77,302	706,988	123	107,474
全長	7,376,425,731	6,650,289,479	726,136,252	6,649,070,201	1,219,278	1,242,591,683
塩基長	最短	102	670	102	4,946	10,000
(bp)	平均	9,403.80	9,393.50	9,404.80	9,912.80	11,561.80
	最大	23,517	19,922	23,517	19,344	20,633
	N50	9,573	9,562	9,574	9,887	11,347
N50 リード数	8,025	7,960	5,555	7,958	51	5,145
GC (%)	44.65	46.96	23.5	46.96	50.16	46.95

表 2-5. フィルタリング前後におけるゲノムアセンブリ結果

	イボテングタケ③		イボテングタケ④	
	アセンブリ①*	アセンブリ②**	アセンブリ①*	アセンブリ②**
全コンティグ数	1,130	25	867	16
全塩基長 (bp)	73,587,993	41,065,779	59,740,335	41,188,258
最短塩基長 (bp)	11,234	10,645	11,151	10,645
平均塩基長 (bp)	65,122.10	1,642,631.20	68,904.70	2,574,266.10
最大塩基長 (bp)	7,563,569	4,179,306	4,305,046	4,277,001
N50	2,556,606	3,804,980	2,930,352	3,905,033
N50 コンティグ数	9	6	8	6
GC(%)	40.41	46.96	40.66	46.94

* : raw リードをリードフィルタリングなしでアセンブルしたもの

** : リードフィルタリングを施した後にアセンブルしたもの

表 2-6. bacteria_odb12 を用いた BUSCO

BUSCO 解析対象	イボテングタケ③		イボテングタケ④		NIHS	NCBI	NCBI	NCBI
	コンティグ 評価①*	コンティグ 評価②**	コンティグ 評価①*	コンティグ 評価②**	テングタケ	ベニテングタケ	マツタケ	シイタケ
BUSCO データセット	bacteria_odb12							
Complete BUSCOs (%)	99.1	9.5	12.1	9.5	9.5	10.3	11.2	8.6
Complete and single-copy BUSCOs (%)	97.4	9.5	12.1	9.5	9.5	10.3	11.2	8.6
Complete and duplicated BUSCOs (%)	1.7	0	0	0	0	0	0	0
Fragmented BUSCOs (%)	0.9	22.4	22.4	22.4	16.4	16.4	15.5	25
Missing BUSCOs (%)	0	68.1	65.5	68.1	74.1	73.3	73.3	66.4
Total BUSCO groups searched (n)	116	116	116	116	116	116	116	116

* : raw リードをリードフィルタリングなしでアセンブルして BUSCO 評価したもの

** : リードフィルタリングを施した後にアセンブルして BUSCO 評価したもの

表 2-7. イボテングタケ①のドラフトゲノム評価結果(評価②**)

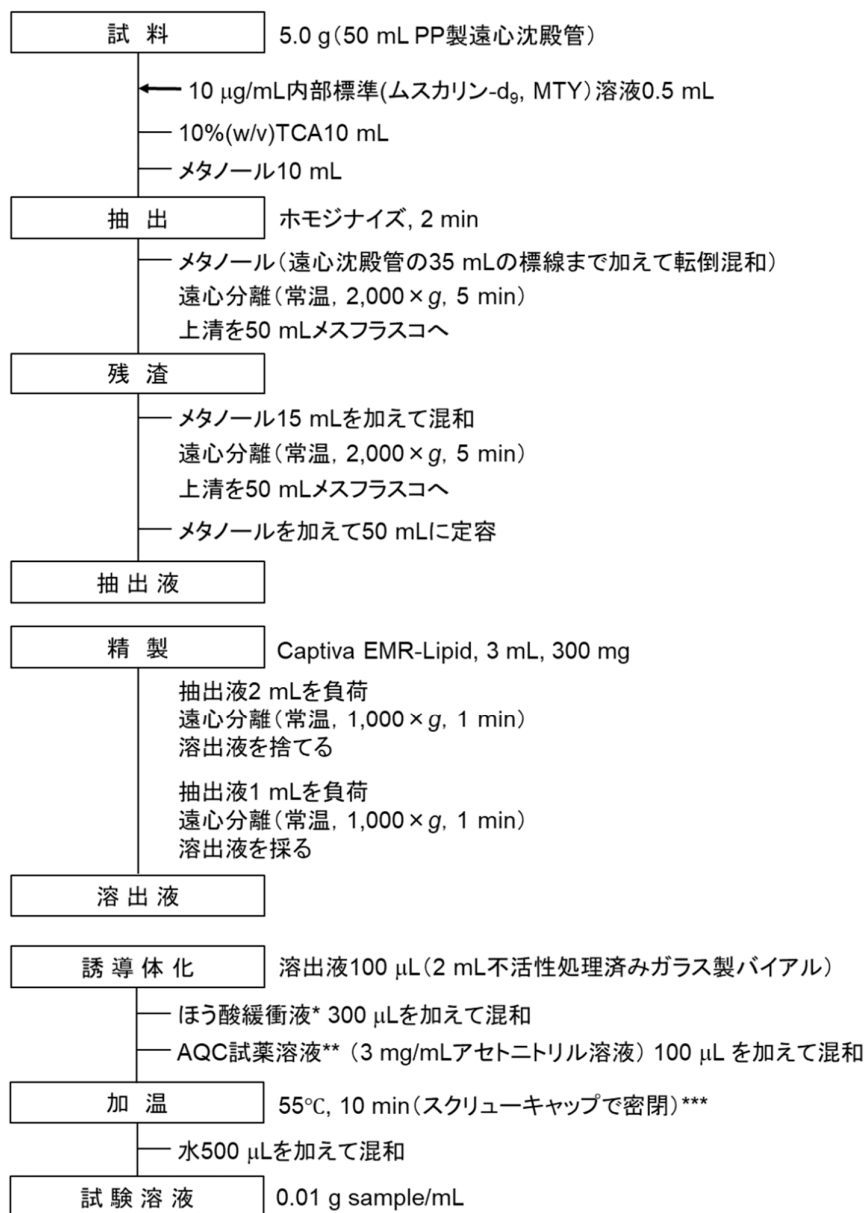
BUSCO データセット	fungi_odb12	basidiomycota_odb12	agaricomycetes_odb12	agaricales_odb12	bacteria_odb12
Complete BUSCOs (%)	97.9	97.6	95.1	91.1	9.5
Complete and single-copy BUSCOs (%)	97.0	96.8	94.6	90.7	9.5
Complete and duplicated BUSCOs (%)	0.9	0.7	0.6	0.4	0
Fragmented BUSCOs (%)	0.7	0.6	1.2	1.5	22.4
Missing BUSCOs (%)	1.4	1.8	3.6	7.4	68.1
Total BUSCO groups searched (n)	1122	2409	3398	3408	116

** : リードフィルタリングを施した後にアセンブルして BUSCO 評価したもの

表 2-8. イボテングタケ②のドラフトゲノム評価結果(評価②**)

BUSCO データセット	fungi_odb12	basidiomycota_odb12	agaricomycetes_odb12	agaricales_odb12	Bacteria_odb12
Complete BUSCOs (%)	97.8	97.6	95.1	91.1	9.5
Complete and single-copy BUSCOs (%)	96.9	96.8	94.5	90.7	9.5
Complete and duplicated BUSCOs (%)	0.9	0.7	0.6	0.4	0
Fragmented BUSCOs (%)	0.8	0.6	1.2	1.5	22.4
Missing BUSCOs (%)	1.4	1.8	3.7	7.4	68.1
Total BUSCO groups searched (n)	1122	2409	3398	3408	116

** : リードフィルタリングを施した後にアセンブルして BUSCO 評価したもの



*APDSタグワコー用ほう酸緩衝液(富士フィルム和光純薬, 019-23151)を使用

**AccQ・Tag™ Ultra Derivatization Kit (Waters, Part#. 186003836)を使用

AccQTag™ Ultra-2A (Reagent powder, 3 mg)にAccQTag™ Ultra-2B アセトニトリル 100%を1 mL入れて1分間超音波で溶解

***バイアルをアルミブロックに入れて加熱

図 1-1 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 前処理操作フロー

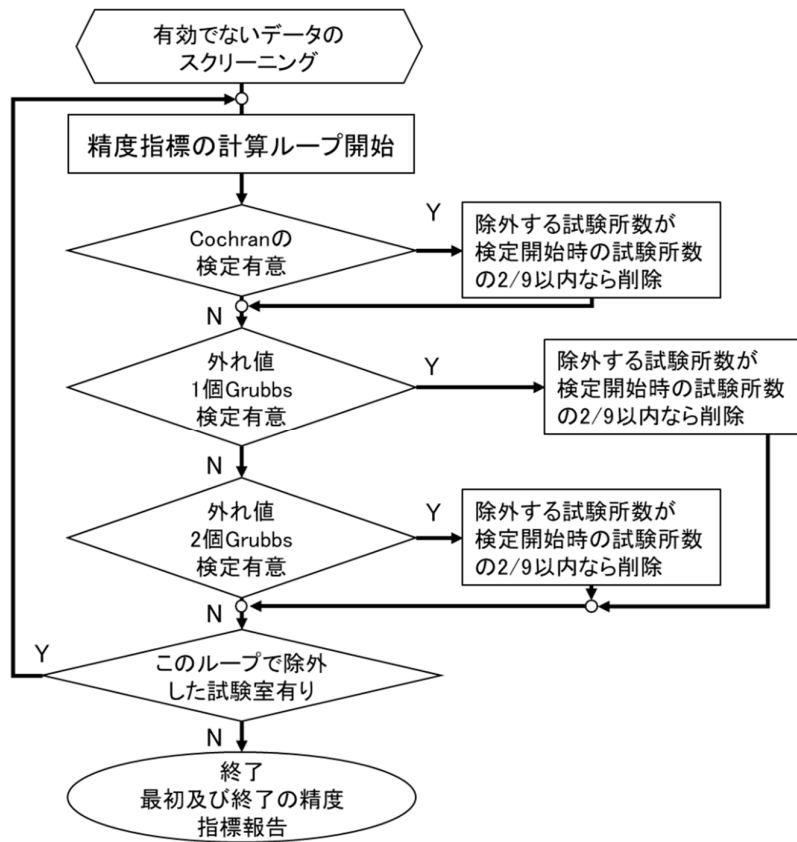


図 1-2 室間共同試験のデータのスクリーニング及び検定のフローチャート

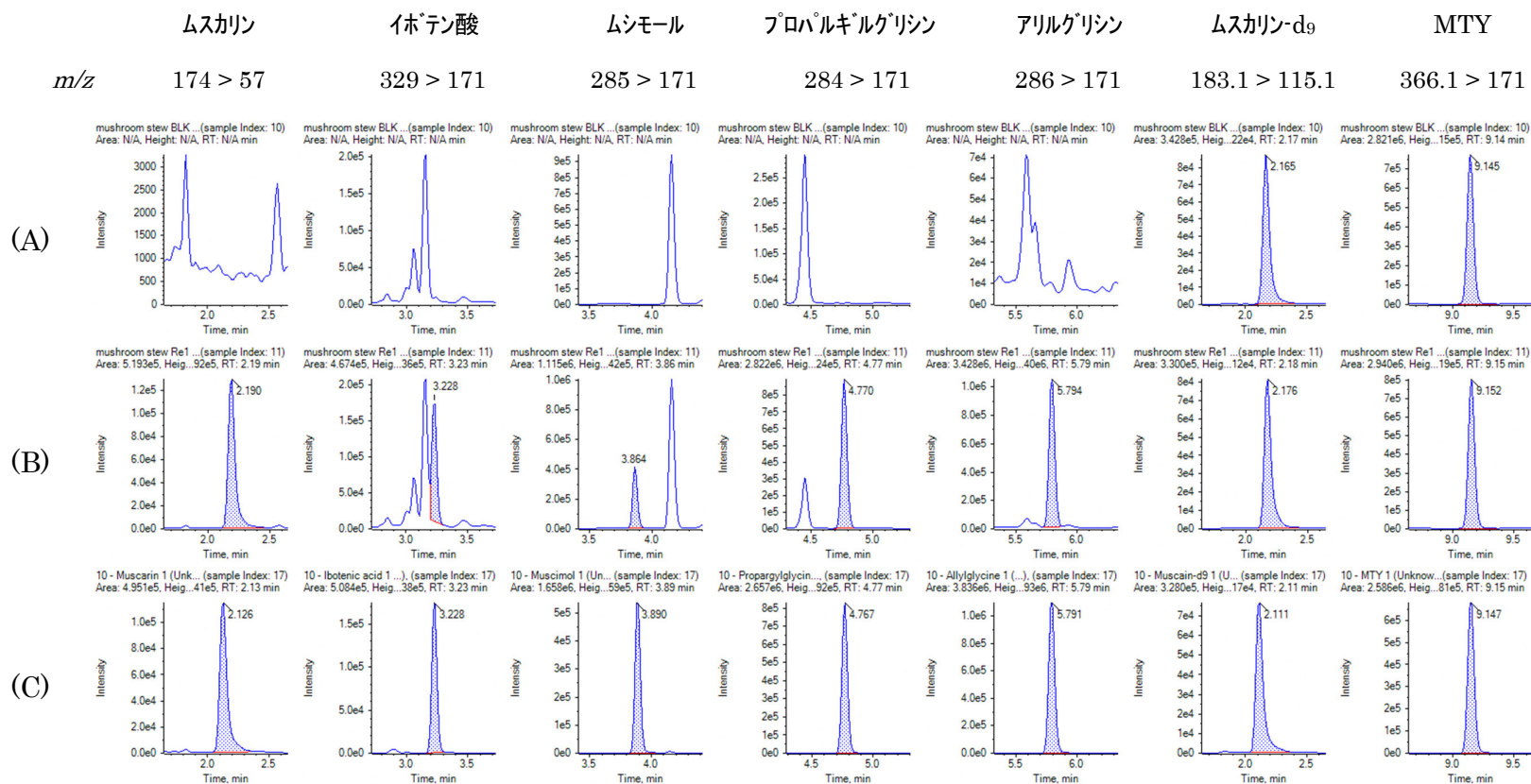


図 1-3 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 の分析対象化合物の SRM クロマトグラム (Condition a in Table 1-1)

(A):きのこのシチューブランク試料、(B):きのこのシチュー添加回収(添加濃度 1 mg/kg)、(C):標準溶液 10 ng/mL

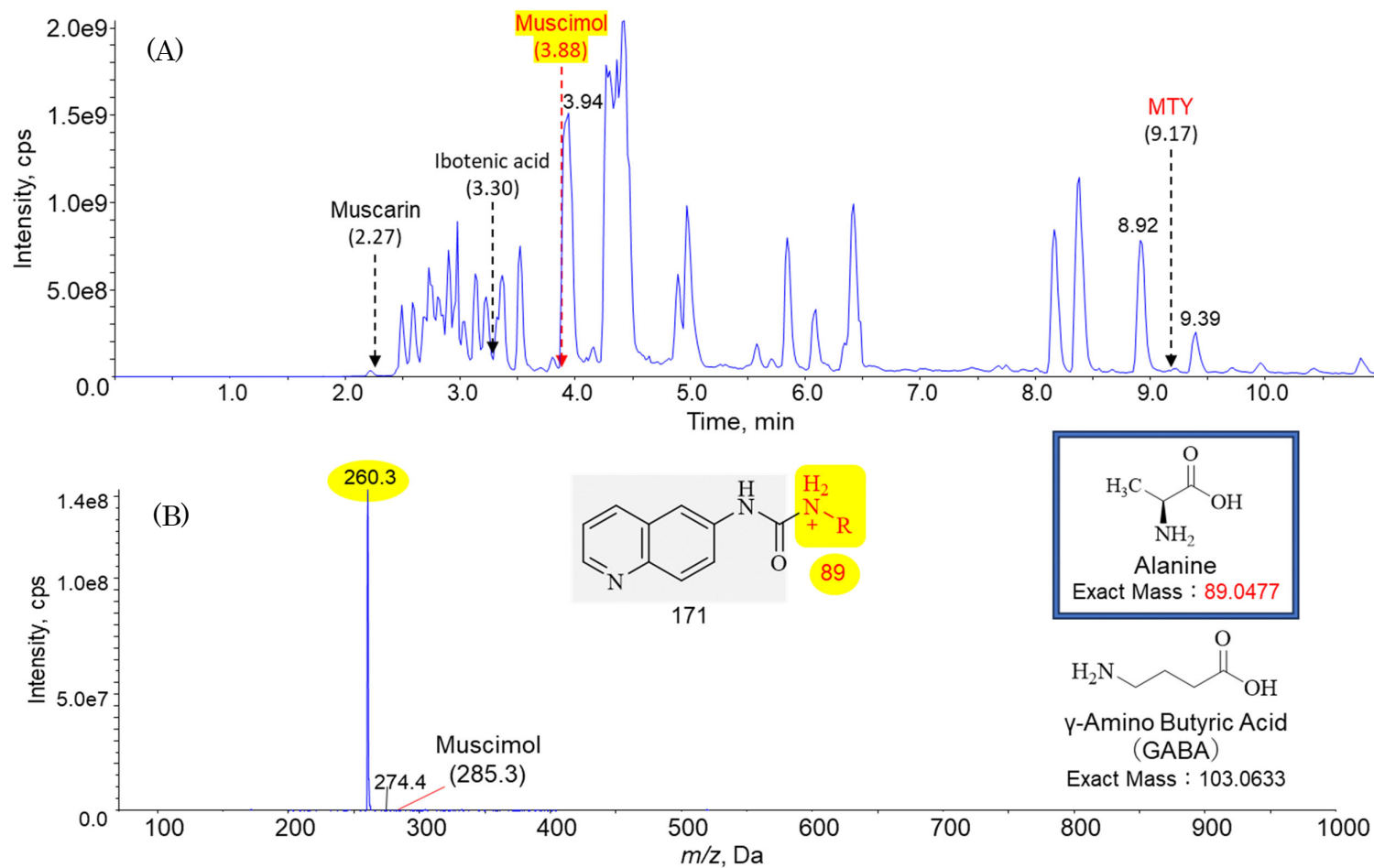


図 1-4 模擬試料(きのこシチュー)試験溶液(0.01 g sample/mL)の m/z 171 におけるプリカーサーイオンスキャン結果

(A):プリカーサーイオンスキャンクロマトグラム (B):保持時間 3.91 min におけるプリカーサーイオンスペクトル

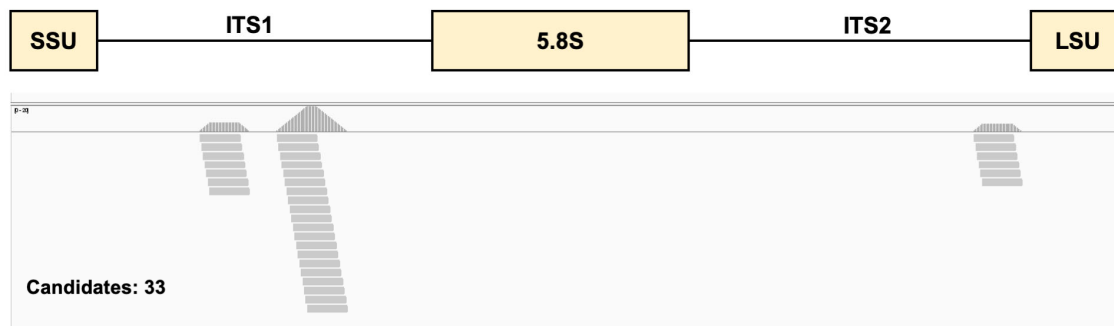


図 2-1. BLAST_TSN 解析によるドクツルタケ特異的配列の同定

BLAST_TSN 解析で同定されたドクツルタケ特異的配列 (25 塩基長) を元の ITS 周辺配列にアライメントすることで、ドクツルタケ特異的な配列数および位置関係を可視化した。これらの情報を基に、Fwd/Rev プライマーを設計した。

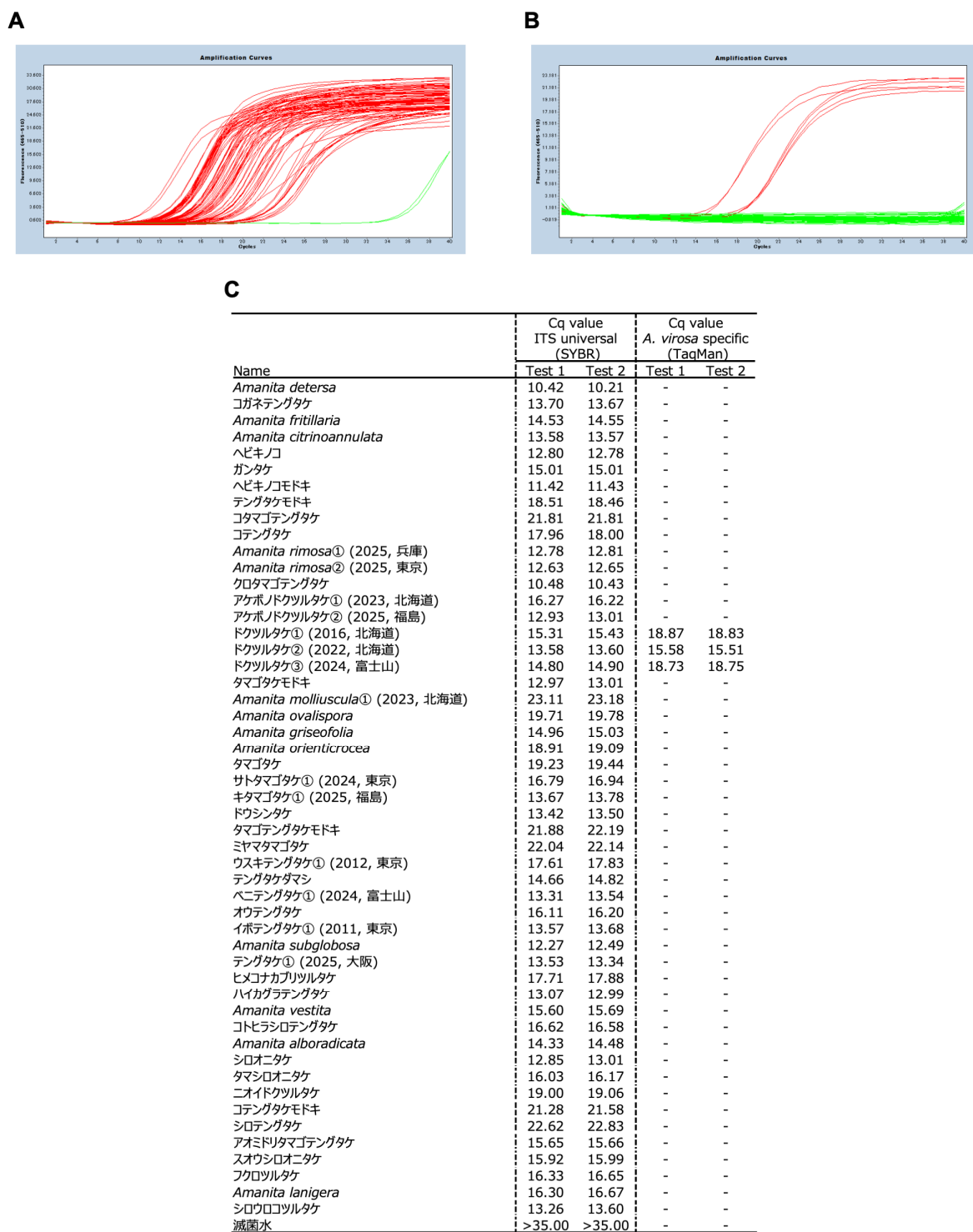


図 2-2. ドクツルタケを標的としたリアルタイム PCR 法の特異性試験結果

テングタケ属 51 個体 47 種のゲノムを用いて特異性試験を実施した。(A) ITS ユニバーサルプライマーを用いた陽性対照試験 (SYBR 法) と、(B) ドクツルタケ特異的 PCR 法 (TaqMan 法) を実施した (n=2)。(C) 特異性試験に使用したゲノムと Cq 値一覧を示す。35 サイクル以降で増幅した場合は Cq 値が付かないため、>35 と表記。- は不検出。

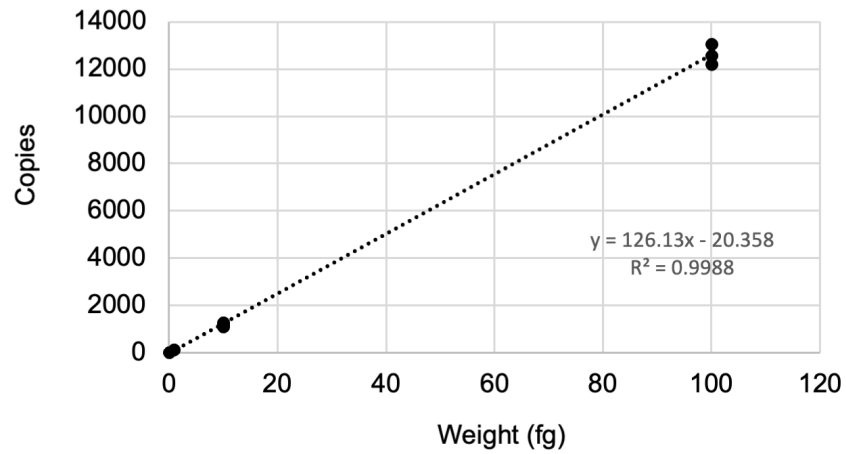


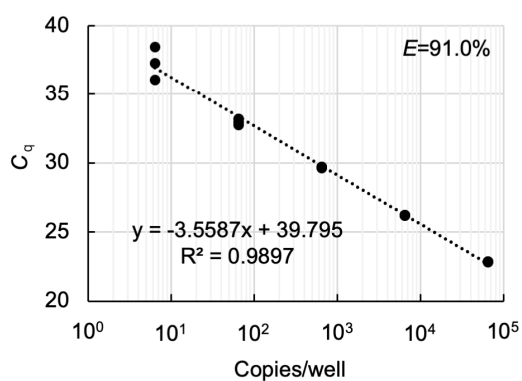
図 2-3. ドクツルタケ陽性コントロールプラスミドのコピー数定量

段階希釈した陽性コントロールプラスミドをデジタル PCR に供し、そのコピー数を算出。プラスミドの重量 (0.1-100 fg) と、定量されたコピー数をプロットしたところ、直線性を示した。各濃度 3 並行で測定を実施した。

A

	copies/well						
	0	0.6	6.4	63.9	639	6390	63900
試験数	3	12	12	12	12	3	3
検出数	0	7	12	12	12	3	3
検出率 (%)	0	58.3	100	100	100	100	100
平均Cq	-	38.76	36.08	32.37	29.04	26.23	22.87
SD	-	-	0.94	0.39	0.39	0.02	0.02

B



C

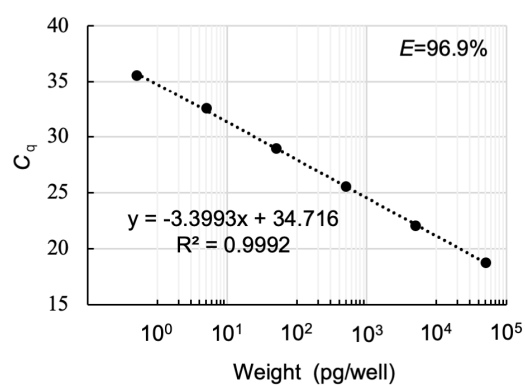


図 2-4. ドクソルタケ特異的検知法の検出限界試験および増幅効率試験

(A) 陽性コントロールプラスミドを用いた検出感度試験。検出率が 95%以上となる最低濃度を検出限界濃度とした。陽性コントロールプラスミド(6.4~63900 コピー/ウェル) (B)、またはドクソルタケゲノム DNA(0.5 pg~50 ng/ウェル)(C)を用いた増幅効率試験。図中には増幅効率(E)と直線性(R^2)を示した。横軸は log 標記。

なお、増幅効率 は以下のように算出。

$$E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$$

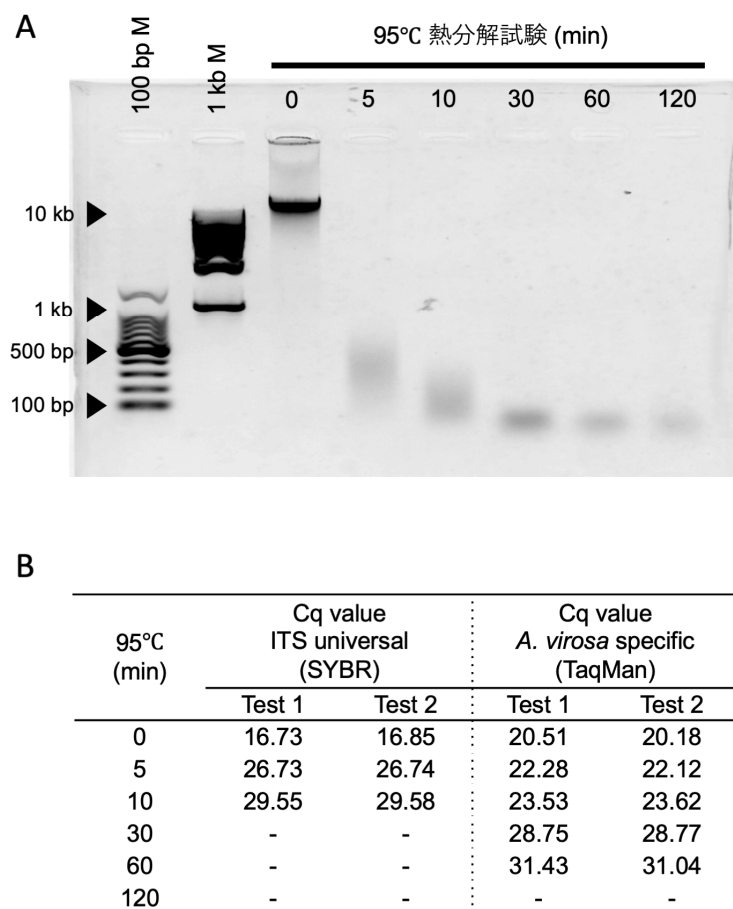


図 2-5. ドクツルタケ特異的検知法の熱分解試験

(A) 熱処理したドクツルタケゲノム DNA のアガロース電気泳動像。

(B) 熱処理したドクツルタケゲノム DNA を用いたリアルタイム PCR 結果。-は不検出。

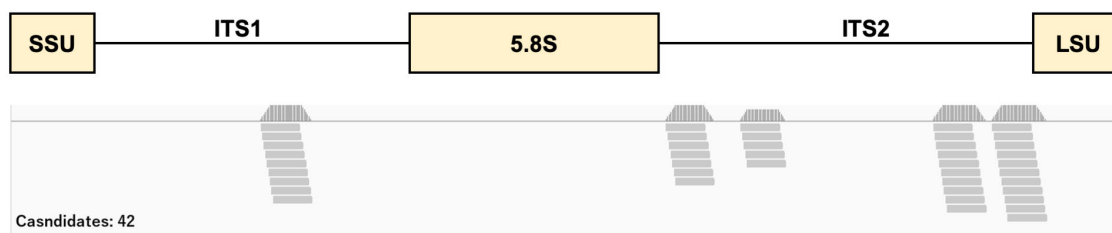


図 2-6. BLAST_TSN 解析によるイボテングタケ特異的配列の同定

BLAST_TSN 解析で同定されたイボテングタケ特異的配列(25 塩基長)を元の ITS 周辺配列にアライメントすることで、イボテングタケ特異的な配列数および位置関係を可視化した。これらの情報を基に、Fwd/Rev プライマーを設計した。

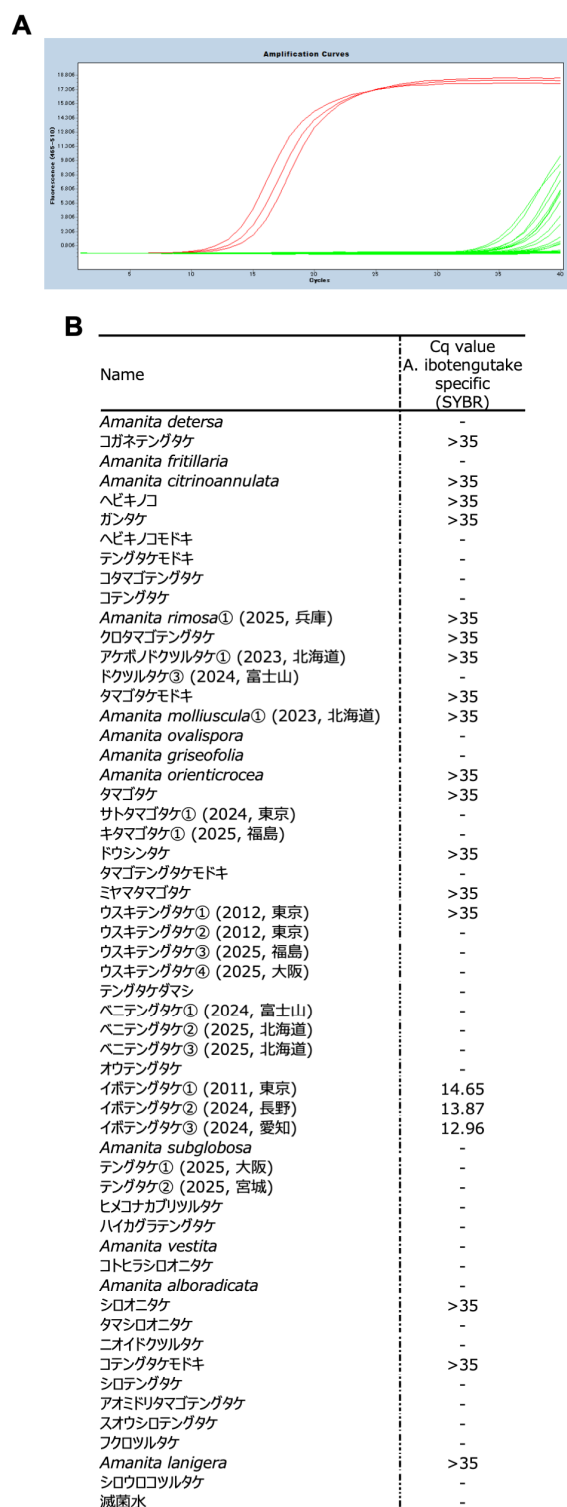


図 2-7. イボテングタケ特異的リアルタイム PCR 法の特異性試験結果

テングタケ属 55 個体 47 種のゲノムを用いて特異性試験を実施した。(A) イボテングタケ特異的 PCR 法 (SYBR 法) の増幅曲線を示す (n=1)。(B) 特異性試験に使用したゲノムと Cq 値一覧を示す。35 サイクル以降で増幅した場合は Cq 値が付かないため、>35 と表記。-は不検出。

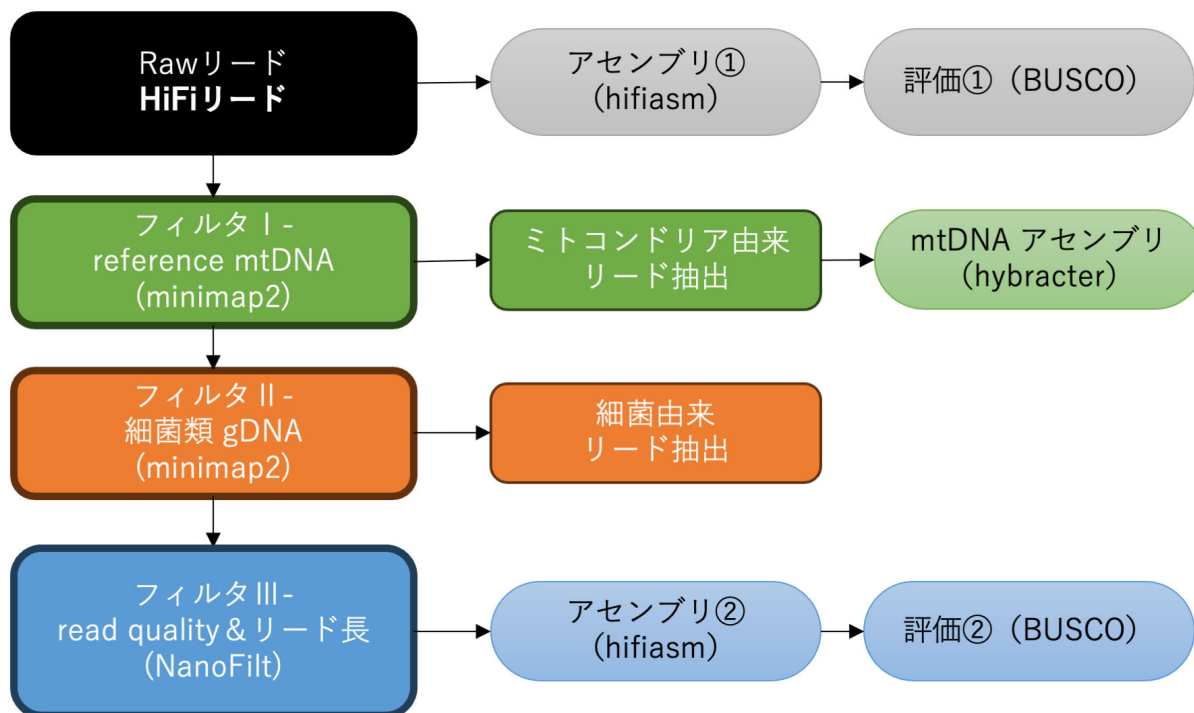


図 2-8. ゲノムアセンブリ検討スキーム

イボテングタケ 2 個体のドラフトゲノムを得るスキームを示した。HiFi リードを Raw リードとした。フィルタ I では minimap2 を使用してミトコンドリア DNA にマッピングするリードをミトコンドリア由来リードとして除いた。ミトコンドリア DNA 由来のリードは hybracter を用いてアセンブルした。続くフィルタ II では minimap2 によって細菌類ゲノム DNA にマッピングするリードを細菌由来リード(コンタミネーションリード)として除いた。フィルタ III では read quality 下限およびリード長下限を絞ることでアセンブリに使用するリード数を最適化した。Raw リード及びフィルタ III を経たリードを hifiasm でアセンブルし(アセンブル①または②)、BUSCO を使用してイボテングタケゲノムとしての完全性を評価した(評価①または②)。

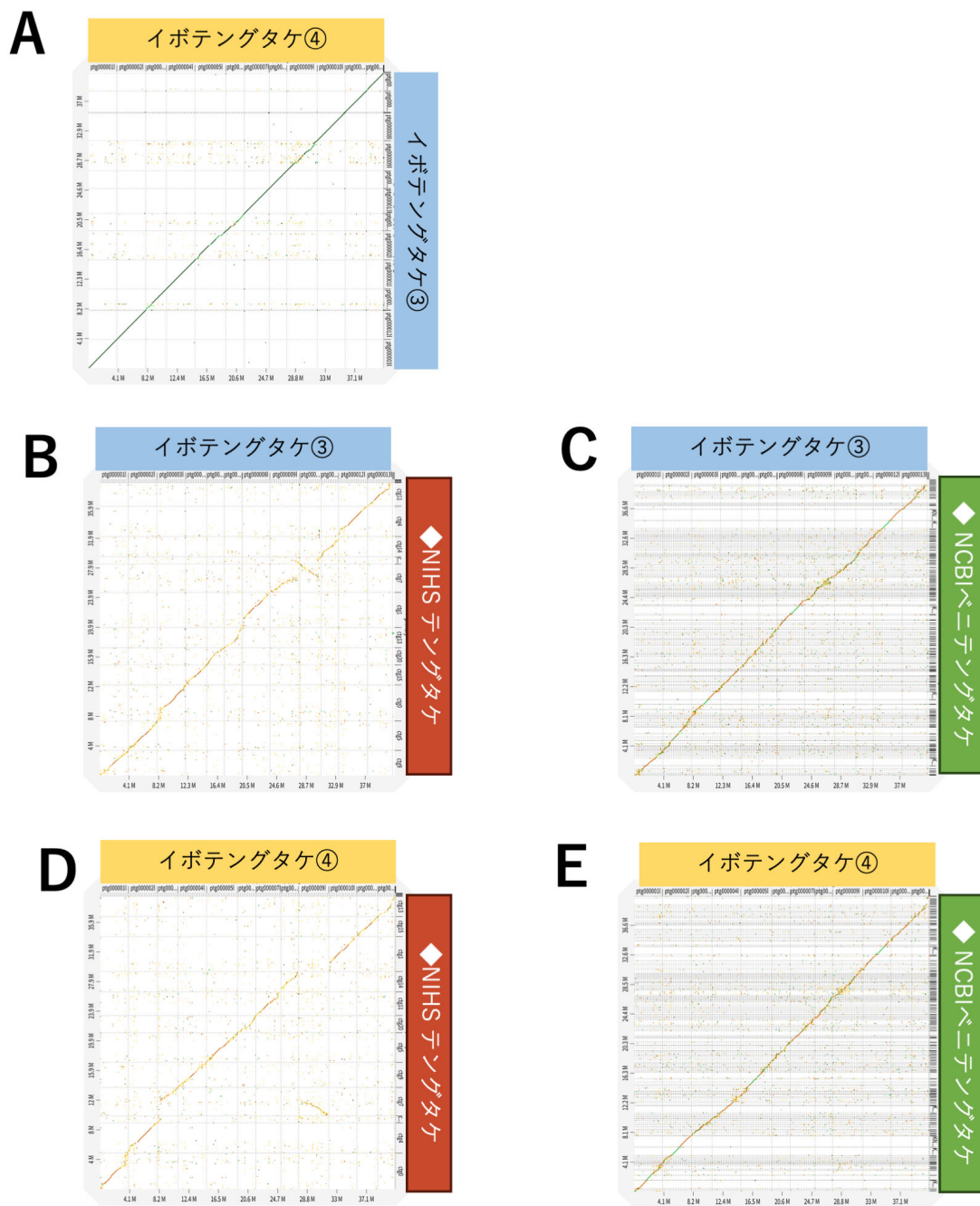


図 2-9. イボテングタケドラフトゲノムおよび近縁種ゲノムとの比較(D-GENIES)

A: イボテングタケ④×イボテングタケ③、B: イボテングタケ③×テングタケ(NIHS)、C: イボテングタケ③×ベニテングタケ(NCBI)、D: イボテングタケ④×テングタケ(NIHS)、E: イボテングタケ④×ベニテングタケ(NCBI)。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

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
Nobuhisa Kajino, H youn-Joong Kim, Hy un-Ki Hong, Wan-O k Lee, <u>Hiroshi Taka hashi</u> , Kwang-Sik C hoi, Hyung-Bae Jeon	Genetic differenti ation between cap tive and wild pop ulations induced by selective breed ing in morphologi cally diverse <i>Taki fugu</i> pufferfish.	Frontiers in Marine Scie nce.	12	1437097	2025
<u>Ryohei Tatsuno</u> , <u>Hir oshi Takahashi</u> .	Occurrence of nat ural interspecific hybrids in the pu fferfish, genus <i>Ta kifugu</i> , and their tetrodotoxin-accu mulating tissues.	Food Safety.	D-25-0 0021	DOI: 10.14 252/foodsaf etyfscj.D-25 -00021	2026

Yutaka Osada, Masaki Miya, Hitoshi Araki, Hideyuki Doi, Akihide Kasai, Reiji Masuda, Toshifumi Minamoto, Satoquo Seino, Teruhiko Takahara, Satoshi Yamamoto, Hiroki Yamana, Mitsuhiro Aizu-Hirano, Keiichi Fukaya, Takehiko Fukuchi, Ryo O. Gotoh, Masakazu Hori, Midori Iida, Tomohito Imaizumi, Tadaaki Kajita, Takashi Kanbe, Tanaka Kenta, Yumi Kobayashi, Tomohiko Matsura, Hiroki Mizumoto, Hiroyuki Motomura, Hiroaki Murakami, Kenji Nohara, Shin-ichiro Oka, Tetsuya Sado, Hiroshi Senou, Koichi Shibukawa, Tomoki Sunobe, <u>Hiroshi Takahashi</u> , Koji Takayama, Katsuhiko Tanaka, Hisashi Yamakawa, Satoru Yokoyama, Seokjin Yoon, Michio Kondoh.	Large-scale environmental DNA survey reveals niche axes of a regional coastal fish community.	Scientific Reports	16	3276	2026
Masaru Taniguchi, Shoichiro Noguchi, Hidenobu Kawashima, Jun Sugiura, Tomoyuki Tsuchiyama, <u>Tomiaki Minatani</u> , Hitoshi Miyazaki, Kei Zaitzu	Optimal machine learning algorithm for prediction model for retention times of plant toxins.	Food Control	174	111251	2025

厚生労働大臣
~~(国立医薬品食品衛生研究所長)~~ 殿
~~(国立保健医療科学院長)~~

機関名 北里大学
所属研究機関長 職 名 学長
氏 名 砂塚 敏明

次の職員の令和7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 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 海洋生命科学部・教授
- (氏名・フリガナ) 鈴木 敏之・スズキ トシユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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：)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年5月15日

厚生労働大臣殿

機関名 国立研究開発法人 水産研究・教育機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 芳野 正

次の職員の令和7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7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 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 水産技術研究所 水産物応用開発部 安全管理グループ・主幹研究員
(氏名・フリガナ) 松嶋良次・マツシマリョウジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年5月15日

厚生労働大臣殿

機関名 国立研究開発法人 水産研究・教育機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 芳野 正

次の職員の令和7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7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 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 水産技術研究所 水産物応用開発部 安全管理グループ・グループ長
(氏名・フリガナ) 渡邊龍一・ワタナベリュウイチ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年5月15日

厚生労働大臣殿

機関名 国立研究開発法人 水産研究・教育機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 芳野 正

次の職員の令和7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7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 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 水産技術研究所 水産物応用開発部 安全管理グループ・主任研究員
(氏名・フリガナ) 内田 肇・ウチダ ハジメ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年5月15日

厚生労働大臣殿

機関名 国立研究開発法人 水産研究・教育機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 芳野 正

次の職員の令和7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7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 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 水産技術研究所 水産物応用開発部 安全管理グループ・研究員
(氏名・フリガナ) 小澤 眞由・オザワ マユ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年5月15日

厚生労働大臣殿

機関名 国立研究開発法人 水産研究・教育機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 芳野 正

次の職員の令和7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7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 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 水産技術研究所 水産物応用開発部
安全管理グループ・任期付研究員
(氏名・フリガナ) 沼野 聡・ヌmano サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 東北大学
所属研究機関長 職 名 総長
氏 名 富永 悌二

次の職員の令和7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 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院農学研究科・教授
(氏名・フリガナ) 山下 まり・ヤマシタ マリ

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (有の場合はその内容:研究実施の際の留意点を示した)

(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
~~（国立医薬品食品衛生研究所長） 殿~~
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 （所属部署・職名） 食品衛生管理部・部長
（氏名・フリガナ） 上間 匡・ウエマ マサシ

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）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：）	☐	☒	☐		☐

（※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年5月15日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人水産研究・教育機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 芳野 正

次の職員の令和7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7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 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 水産大学校 生物生産学科・教授
(氏名・フリガナ) 高橋 洋・タカハシ ヒロシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年5月15日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人水産研究・教育機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 芳野 正

次の職員の令和7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7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 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 水産大学校 食品科学科・准教授
(氏名・フリガナ) 辰野 竜平・タツノ リョウヘイ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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

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 村瀬 真子

次の職員の令和7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7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 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 （所属部署・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）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：）	☐	☒	☐		☐

（※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

令和8年3月30日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品部・第三室長
(氏名・フリガナ) 志田 静夏・シダ シズカ

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 生化学部・部長

(氏名・フリガナ) 柴田 識人・シバタ ノリヒト

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式

令和8年 5月 11日

厚生労働大臣
~~(国立医薬品食品衛生研究所長)~~ 殿
~~(国立保健医療科学院長)~~

機関名 国立大学法人東京農工大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 中村 暢文

次の職員の令和7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7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 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 （所属部署・職名） 大学院工学研究院・教授
（氏名・フリガナ） 長澤 和夫・ナガサワ カズオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
		審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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： ）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

（※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年5月12日

厚生労働大臣
~~(国立医薬品食品衛生研究所長)~~ 殿
~~(国立保健医療科学院長)~~

機関名 国立大学法人高知大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 受田 浩之

次の職員の令和7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 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 教育研究部自然科学系農学部門・教授
(氏名・フリガナ) 足立 真佐雄・アダチ マサオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年4月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 愛知県衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 森 一明

次の職員の(元号) 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7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 食品中の自然毒等のリスク管理のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 生物学部 医動物研究室・主任
(氏名・フリガナ) 土方悠希・ヒジカタユウキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。