

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）  
総括研究報告書

食品中の自然毒等のリスク管理のための研究

研究代表者 鈴木 敏之 水産技術研究所 環境・応用部門長

研究要旨：

「雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握」においては、宮城県気仙沼市および神奈川県横須賀市で雑種ふぐの現地調査を行い、各水揚げ地において 519～2871 個体を調査した結果、雑種混獲率は 2.1～14.7%だった。また、しらすに混入したふぐ仔稚魚 965 個体を調査した結果、3 種が見いだされた。フグおよび雑種フグの分析では、北海道で水揚げされた雑種フグ：トラフグ×マフグの雄個体の精巢において、10 MU/g を超える毒性が検出された。両親ともに精巢は可食部位となっており、これまで報告されている顕性遺伝とは異なる結果を得た。これまで、他地域を含めた同雑種フグを分析してきたが同じような事例は見られなかった。1 個体しか入手できなかったため、今後は個体数を増やして、その毒性を明らかにしていく必要がある。その他地域で入手した個体で珍しいのは、ヒガンフグとクサフグの個体であったが、卵巣の毒力が高く (> 10 MU/g)、その他部位は 10 MU/g 以下と低かった。個体数を増やして安全性を調べる必要があると思われる。フグ稚魚については、TTX の添加回収試験で 70%以上と良好な回収率を示した。また、フグ稚魚によって毒性が異なることが明らかとなった。ただし、シロサバフグと分類されても低毒力の TTX が検出される事例が散見された。シマフグ稚魚は有毒個体が多く、食品上安全とされる 10 MU/g を超える個体も見られた。本年度は 108 個体を調べたが、次年度以降も検体数と地域を増やして、地域差や種類の影響などを評価していく必要があると考えられる。

「国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立」では、二枚貝からの M-toxin 類の精製技術の確立を行い、6 成分 (M1、M3～5-HA、M9、M10) を単離した。また、今年度予定していた M2 の合成を完了し、来年度予定していた M4 の合成も今年度実施した。さらに、Na<sup>+</sup>チャネル阻害活性による毒性評価のため、アッセイ法の最適化をテトロドトキシン (TTX)、decarbamoyle STX (dcSTX)、neoSTX を用いて行った。最適化された条件下において、不斉全合成された M2 について毒性評価を実施したところ、他麻痺性貝毒成分と同様、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル阻害作用があることを確認した。一部の成分について、定量 NMR による値付けを行うことで標準品とし、毒化二枚貝中の M-toxin 類の含有量を調べた。その結果、二枚貝の採取時期によっては、全毒成分における組成 (モル比) の 50%前後が M-toxin 類であることを確認した。次年度以降の精製用原料として、国内沿岸で採取された二枚貝を探索したところ、西日本産のヒオウギガイに C3&4 および M7&M9 を含有していることを確認した。これまでに国内沿岸で C3&4 を含む毒化二枚貝の報告は少ないが、本研究ではその代謝物の存在を初めて確認した。今後、確立した精製法による M-toxin 類の単離を継続し、構造確認や毒性評価などを行うことで、機器分析法導入時に必要となる M-toxin 類を選定することが出来る見込みである。北海道噴火湾にて養殖されている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結果、両者に相関はなく、本海域には麻痺性貝毒産生物とは異なる TTX 産生物が存在するこ

とを示唆するデータを得た。また、TTX による二枚貝の毒化原因生物の解明を目指して、その探索に資するメタバーコーディングによる餌生物解明に先立ち、二枚貝由来の rDNA の PCR 増幅に有用なペプチド核酸 (PNA clamp) を設計し、その増幅抑制効果を検証した。その結果、設計した PNA は、二枚貝の中でもとりわけホタテガイの rDNA の PCR 増幅を高効率で抑制した。本 PNA は、ホタテガイの餌生物の解明、さらにはその毒化原因生物の解明に有用と考えられる。

「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」においては、我が国において健康被害が懸念され、特に注意が必要な植物性自然毒を特定することを目的とし、国内外で発生した健康被害事例のほか、諸外国の規制、検出事例、注意喚起等の情報を収集し整理した。その結果、健康被害事例が多く、調査した国・地域の多くで注意喚起がなされていたのはシアン化合物、ピロリジジナルカロイド、グリコアルカロイド、トロパンアルカロイド、グラヤノトキシン等であった。このうち、ピロリジジナルカロイドは諸外国において健康被害事例が複数報告されており、死亡者も発生していた。また、EU では近年、規制値が設定され、ハーブ類等では当該規制値を超過する事例が多数報告されている。以上のことから、ピロリジジナルカロイドは特に注意が必要な自然毒と考えられ、我が国でのリスク管理の要否を検討するうえで健康被害が懸念されるのか確認が必要である。しかし、我が国では主なばく露源の一つであるハーブ類等に含まれるピロリジジナルカロイドの含有量が十分把握されていない。そのため、今後、国内流通製品の汚染実態を調査する必要があると考えられた。実態調査が必要と考えられたピロリジジナルカロイドについて、次年度以降に実施する分析法開発及び実態調査に向けて予備的な検討も実施した。

「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」では、先の厚生労働科学研究 (H30-食品-一般-008 及び 21KA1005) において、わが国で食中毒の発生件数が多い植物性自然毒を対象として、有毒植物の毒成分の一斉分析法と、毒きのこの毒成分一斉分析法 1 及び 2 の 3 つの分析法を開発した。本研究は、毒きのこの毒成分一斉分析法 1 及び 2 について、実際の毒きのこを含む模擬試料を用いて試験室間共同試験を実施した。毒きのこの毒成分一斉分析法 1 では、ドクツルタケを含むきのこシチューを模擬試料として、試験室間共同試験を実施した。参加 11 機関は、模擬試料に含まれる  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの 2 種類の毒成分を正しく同定することができた。またこの 2 成分の定量結果を解析したところ、それぞれ回収率は 102%、84.7%、併行精度 ( $RSD_r$ ) は 2.1%、1.2%、室間精度 ( $RSD_R$ ) は 6.6%、7.3%、HorRat 値は 0.7、0.8 となり、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に適合した。複雑なマトリックスを多く含む食品を用いて試験室間共同試験により分析法の妥当性が確認されたことから、本法の汎用性が示された。毒きのこの毒成分一斉分析法 2 では、市販のシイタケを用いて 1 mg/kg と 10 mg/kg の 2 濃度での添加回収試験を行い、単一試験室で妥当性確認を行った。各濃度において、分析対象の 5 成分 (ムスカリン、イボテン酸、ムシモール、プロパルギルグリシン、アシルグリシン) の真度は 74.6-108%、92.2-113%、併行精度 ( $RSD_r$ ) は  $\leq 2.9\%$ 、 $\leq 2.8\%$ 、室内精度 ( $RSD_{WR}$ ) は  $\leq 7.0\%$ 、 $\leq 8.1\%$  となり、厚生労働省の農薬等の妥当性評価ガイドラインに適合した。本法はアセタケ科のきのこやテングタケ属のきのこによる食中毒の際に適用可能な分析法であることが示唆された。

*Amanita* (テングタケ属) に属する *Amanita virosa* (ドクツルタケ) は致死性の高い猛毒き

のこであるが、本年度は、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を検討した。テングタケ属の Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域の系統解析と我々が独自開発した種特異的核酸配列探索ツール (BLAST\_TSN) により、ドクツルタケに特異的なプライマー及びプローブを設計した。同プライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR 法は、ドクツルタケ以外のテングタケ属きのこに交差反応しなかったことから、開発した遺伝子検査法の特異性が良好であると示された。本法は各自治体の食中毒原因究明のための利用に期待される。

また、食中毒事例が多い毒きのこであるテングタケに着目した。テングタケはテングタケ属毒きのこであるが、そのゲノム情報が公的データベースに十分には収載されておらず、遺伝子検査法の開発のネックとなっている。そこで、テングタケと推定される国内採取個体のゲノム解析を行った。ロングリードシーケンシングと *de novo* アセンブリにより、高品質なテングタケドラフトゲノムを構築した。当該ドラフトゲノムからはアマトキシン類のペプチドをコードする遺伝子配列は見つからなかった。今後、遺伝子アノテーション等を付け、公開することを目指すと共に、テングタケを検出する遺伝子検査法の開発を試みる。

「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」においては、「自然毒等のリスク管理のための研究(21KA1005)」で整理した知見を踏まえ、新しい知見をもとに更新作業を行った。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・グループ長  
渡邊 龍一・水産技術研究所・主任研究員  
内田 肇・水産技術研究所・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  
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

ふぐをはじめとする海洋生物毒を有する魚介類の喫食や、きのこを含む有毒植物の誤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、これまで毒化が確認されていなかった貝類の麻痺性貝毒による毒化や、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。本研究は、食品中の動物性／植物性自然毒に係る最新の知見を収集・整理し、関係行政機関や事業者への効果的な対策、及び消費者への正確な情報提供のための手法を確立することを目指す。

「自然毒等のリスク管理のための研究(21KA1005)」の研究成果を踏まえ、引き続き雑種ふぐの発生状況、毒化状況及び流通状況にかかる知見を蓄積するとともに、しらす干しについて、ふぐ仔稚魚の混入状況や毒含量を調べる。麻痺性貝毒機器分析法の確立においては、先の研究成果を踏まえ、二枚貝代謝毒である M 毒群を対象に、

これらの毒成分を単離または化学合成し、毒性評価を行うとともに、LC/MS/MS 法の前処理条件などを改良し、二枚貝代謝毒も含めた分析法を確立する。さらにテトロドトキシン (TTX) 群については、TTX による毒化の季節変動を LC/MS/MS を用いて調べるとともに、二枚貝が TTX により毒化する時期の餌料生物調査も合わせて行い、TTX による二枚貝の毒化機構を推定する。

植物性自然毒については、「自然毒等のリスク管理のための研究 (21KA1005)」の研究成果を踏まえ、地方衛生研究所 (地研) が参加する試験室間共同試験により、開発した「有毒きのこの一斉分析法 1 (分析法 1)」及び「有毒きのこの一斉分析法 2 (分析法 2)」の汎用性を確認するとともに、中毒発生時に原因究明にあたる地研の検査技術の強化を図る。

また地衛研で行われている遺伝子検査による植物毒 (きのこ) の鑑別において、検査法の性能向上と簡便化を目的に、全ゲノム解析に基づく遺伝子検査法の開発・改良を行う。

厚生労働省ホームページ (HP) に掲載されている「自然毒のリスクプロファイル」について更新を行い、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。

植物性自然毒に関して国内で発生した食中毒事例のほか、諸外国の健康被害事例や規制、注意喚起等の情報を調査する。また、調査結果を基に、我が国で特に注意が必要と考えられる化合物について分析法を開発し、国内流通食品の汚染実態を調査する。

## 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

調査地において水揚げされた選別前の天然フグについて外部形態に基づき種・雑種鑑別を行い、種組成および雑種と思われ

る種類不明フグの個体数を数えた。種類不明フグの一部については、生鮮状態で毒性試験用に皮、筋肉、肝臓、およ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フグの 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、日本産トラフグ属魚類 11 種の種特異的遺伝マーカーの一塩基多型 (SNPs) を TaqMan アッセイにより遺伝子型決定し、種・雑種判別を行う。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。また、各雑種個体から腑分けされた 4 部位 (皮、筋肉、肝臓、生殖腺) の冷凍試料から、食品衛生検査指針理化編 (2015) に準じた方法で毒の抽出を行い、得られた抽出液を毒性評価用に水産技術研究所に送付した。

しらす加工品に混入していたふぐ仔稚魚について顕微鏡下で種鑑別を行い、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、トラフグ属魚類については前述の TaqMan アッセイ、サバフグ属魚類についてはミトコンドリア DNA の COI 領域の塩基配列に基づき種・雑種判別を行い、残りの魚体を毒性評価用に水産技術研究所に送付した。また、国内で漁獲されるサバフグ属魚類全 7 種について、それぞれの種の形態学的特徴を典型的にもつ個体よりゲノム DNA を抽出し、トラフグ属魚類における高橋ら (2023) の方法に従い、種特異的 SNPs マーカーを得た。

雑種フグ中の TTX 分析は、北海道、青森県、宮城県、福島県、千葉県、神奈川県、石川県、長崎県で採取されたフグおよび雑種フグ 39 検体について、皮、筋肉、精巢、肝臓、卵巣といった各組織に腑分けした。腑分け前にほぼすべての個体については、冷凍したものをを用いた。フグおよび雑種フグの皮、筋肉、精巢、肝臓については、組織 2.00 g に対し、0.1 % 酢酸溶液 8 mL を添加して、ホモジナイズした。それを 95 °C 以上の湯浴中で 10 分間加温し、放冷によって室温程度まで冷却後、遠心分離して上清を回収し、適宜希釈して、機器分析に供した。卵巣組織はその重量 2.00 g に対し、0.1 % 酢酸溶液 9 mL を添加し、ホモジナイズした。それを 95 °C 以上の湯浴中で 10 分間加温し、氷冷して室温程度まで冷却後、遠心分離して上清を 20 mL メスフラスコに回収した。生じた残渣に 0.1 % 酢酸溶液 9 mL をもう一度添加し、懸濁後、遠心分離して上清を先ほどと同様のメスフラスコに回収し、0.1 % 酢酸溶液にて 20 mL に定容した。それらを適宜希釈して、HILIC-MS/MS 分析に供した。得られた分析結果から TTX 類の含量を算出した。TTX の定量には、先の事業で調製し、定量 NMR にて値付けした TTX 標準物質を用いた。そのほかの類縁体については、東北大学山下教授より恵与していただいたコモフグ卵巣の活性炭処理液に含まれる成分を指標に定量した。毒力計算に際し、EFSA の論文にまとめられている細胞毒性値を使って、TTX を 1 とした時の相対毒力値(Relative potency)として用いた。すなわち、TTX:1, 4-epiTTX: 0.16, 4,9-anhydroTTX: 0.02, 11-nor-TTX-6-ol: 0.17, 11-deoxyTTX:0.14, 5-deoxyTTX: 0.03, 6, 11-dideoxyTTX: 0.02, 5,11-dideoxyTTX: 0.02, 4-epi-5,6,11-

trideoxyTTX: 0.01, 5,6,11-trideoxyTTX: 0.01, 4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 0.01, 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX: 0.01, 11-oxo-TTX:1 とした。HILIC-MS/MS の分析条件は、麻痺性貝毒用に調製した BEH Amide カラムを用いて行った。この時、カラムの劣化程度にもよるが、TTX は 6-7 分程度に検出された。

しらす加工品に混入するフグ稚魚の分析に関しては、選別されたフグ稚魚の半乾燥重量に応じて、抽出溶媒の量を変えて、次の通り実施した。フグ稚魚の重量を測定後、はさみで細かく切った。抽出溶媒である 0.1%酢酸溶液は、個体重量が 100mg 以下の場合は 0.5 mL、100-200 mg の場合は 1 mL、200-400 mg の場合は 2 mL、400mg 以上は 3 mL とした。良く攪拌後、沸騰湯浴中で 10 分間加熱した。氷冷ののち、遠心分離し、上清を 0.45 μm コスモスピンフィルターに移し遠心濾過によって、ろ液を得た。そのろ液を分析用バイアルに分注し、HILIC-MS/MS で分析した。

## 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

### B.2.1 M-toxin 類の単離、合成技術の確立

Numano S., Yotsu-Yamashita M. *et al.*, *Chemosphere*, 2021 を基にし、一部改良した方法とした。検討用のサンプルは、東日本で毒化したホタテガイと西日本産ヒオウギガイとした。まず、二枚貝の希塩酸抽出液を活性炭に通した後、oasis HLB や限外ろ過によって粗抽出液を得た。次に、陽イオン性交換樹脂およびゲル濾過のカラムに通し、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) である TSKgel amide80 で精製した。

STX 骨格不斉合成法をもとに、D-リンゴ酸を原料として、化学合成により全て官能基が保護された STX 骨格を不斉合成し

た。得られた STX 骨格の官能基変換により M2 と M4 の合成を行った。

### B.2.2 毒性評価法の最適化および M2 の毒性評価

Na<sup>+</sup>チャネル阻害活性の確認を目的とした細胞毒性試験を実施するにあたり、Neuro2A アッセイを行った。まず、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞株及び実験培地の選択、試薬 (Ouabain および Veratridine) の混合比及びその反応時間について試験条件の最適化の検討をした。検討用の試験液として TTX、neoSTX および dcSTX を用いた。次に、最適化した条件において、東京農工大学の長澤教授らによって不斉全合成された M2 を Neuro2A アッセイで評価した。

### B.2.3 国内沿岸で毒化した二枚貝中の M-toxin 類探索

日本沿岸におけるプランクトンの発生状況や出荷規制状況を確認し、研究用として毒化した二枚貝を入手した。前年度までの本事業において、高毒化したホタテガイの部位別 (貝柱、中腸腺、腎臓、生殖腺、鰓) 分析を行い、M-toxin 類の主な蓄積部位が中腸腺と腎臓であることを明らかにしている。そこで、本研究では、東日本よりホタテガイ、アカザラガイ、西日本よりヒオウギガイを入手し、中腸腺と腎臓の分析を行った。各二枚貝について、公定法の希塩酸抽出もしくは既報 (沼野ら, 食品衛生学雑誌, 2024) に従って 1%酢酸抽出を行い、ENVI-Carb で精製したものを LC-MS/MS で分析した。探索の対象は、M1~M4、M5-HA、M6-HA、M7~10 とした。M-toxin 類は標準品が発売されていないため、測定して得られたクロマトグラムと既報のクロマトグラムとを比較することにより、化合物を推定した。

### B.2.4. ホタテガイから検出されるフグ毒 TTX の変動と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

北海道噴火湾にて養殖されているホタテガイを 2023 年 6 月から 2024 年 5 月まで定期的に採捕し、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、残りの半量を機器分析用に使用した。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、グラファイトカーボンを充填した固相カートリッジに供し、脱塩・洗浄後、20%アセトニトリル+1%酢酸溶液 2mL にて吸着した毒を溶出させた。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。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。

また、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) を設計した。まず、二枚貝ならびにその餌生物と想定される微細藻の 18S rDNA V8-V9 領域の塩基配列を用いて多重配列を作成し、これを用いてホタテガイを含むイタヤガイ科の二枚貝に特異的な塩基配列を検索し、これに結合する PNA clamp である BlockptPNA を設計した。本 PNA を用いて、これと塩基置換数が異なる二枚貝 3 種 (ホタテガイ、アサリ、ミドリイガイ) および微細藻類 3 種 (*Heterosigma akashiwo*、*Alexandrium catenella*、*Azadinium poporum*) のゲノム DNA を鋳型として、18S rDNA V8-V9 領域を増幅対象とする PCR を行った。その際、本 PNA の添加濃度 (0.2-1.0 μM) とアニーリング温度 (60-65°C) を変化させた。得ら

れた増幅産物を電気泳動に供し、これにより得られたバンドの濃淡から本 PNA による rDNA の増幅抑制効果を評価した。また、プライマーの Tm 値に対しアニーリング温度を高く設定する際、得られる増幅産物量の減少が懸念されるため、アニーリング温度の上昇に伴う増幅産物量の変化を同様の方法により評価した。

### 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 諸外国の規制，注意喚起，健康被害事例等の文献調査

植物性自然毒に関する規制や消費者への注意喚起等については各国政府の食品安全当局等の公表資料を中心に調査した。食品への植物性自然毒の混入事例は 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)」のデータや各国当局の公表資料を対象に調査した。国内外の健康被害事例に関しては各国当局の公表資料及び関連文献を調査した。いずれも 2024 年 10 月 4 日までに公表されている情報を対象とした。

#### B.3.2 ピロリジジナルカロイド分析法開発に向けた予備的検討

##### B.3.2.1 試薬及び試液

水及びメタノールは関東化学製の LC/MS 用を用いた。ギ酸及びギ酸アンモニウムは富士フイルム和光純薬製の特級を用いた。ピロリジジナルカロイドの各標準品は PhytoLab 製を用いた。

##### B.3.2.2 装置及び測定条件

LC-MS/MS 装置は、Nexera X3（島津製作所製）及び Triple Quad 7500（Sciex 製）を使用し、以下の条件で測定した。

カラム Luna Omega（内径 2.1 mm，長さ 100 mm，粒子径 1.6  $\mu\text{m}$ ，

phenomenex 製）； カラム温度 40°C； 注入量 2  $\mu\text{L}$ ； 移動相 0.1 vol%ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液（A 液）及び 0.1 vol%ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム・メタノール溶液（B 液）； 流速 0.3 mL/min； グラジエント条件 0 分（A : B=95 : 5）→12 分（A : B=85 : 15）→20 分（A : B=65 : 35）→25 分（A : B=50 : 50）→25.01 分（A : B=5 : 95）→30 分（A : B=5 : 95）→30.01 分（A : B=95 : 5）； イオン化法 ESI（+）； イオンスプレー電圧 2500 V； ヒーター温度 700°C； カーテングス 窒素，35 psi； ネブライザーガス ドライエア，50 psi； ターボガス ドライエア，90 psi； コリジョンガス 窒素，9； 測定モード 選択反応モニタリング（SRM）

### 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 毒きのこの毒成分一斉分析法 1

##### B.4.1.1 試薬・試液

$\alpha$ -アマニチン、ファロイジン（富士フイルム和光純薬（株）製）、 $\beta$ -アマニチン、 $\gamma$ -アマニチン（Enzo Life Sciences 社製）の 4 成分は、メタノールに溶解し 100  $\mu\text{g/mL}$  の標準原液を調製した。これらを混合し、メタノールで希釈して 10  $\mu\text{g/mL}$  の 4 種混合標準溶液を調製した。

内部標準のバージニアマイシン B（Santa Cruz Biotechnology 社製）は、メタノールに溶解し、200  $\mu\text{g/mL}$  の標準原液を調製した。これをメタノールにより希釈し、10  $\mu\text{g/mL}$  の内部標準溶液とした。

10%トリクロロ酢酸（TCA）水溶液はナカライテスク（株）製又は富士フイルム和光純薬（株）製の特級試薬を用いて調製した。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。

検量線用標準溶液の希釈に用いた 0.2%TCA 含有 60%メタノール水溶液は、10%TCA 水溶液 2 mL 及びメタノール 60 mL を量り採り、水で 100 mL に定容して調製した。

その他試験溶液の調製及び LC-MS/MS 測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用又は LC-MS 用を使用した。

#### B.4.1.2 模擬試料

試験室間共同試験の模擬調理試料として、Jansson らの報告<sup>1)</sup>に準拠してドクツルタケを含むきのこのシチューを調製した。ドクツルタケは、2023 年 10 月に岐阜県内の山林で採取後、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で冷凍してあったものを使用した。

##### きのこのシチュー

原材料：マッシュルーム 770 g、シイタケ 165 g、ヒラタケ 110 g、ナメコ 55 g、バター 913 g、小麦粉 36.3 g、生クリーム（乳脂肪分 35%）462 mL、オリーブオイル 5.5 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。

##### 模擬試料

ドクツルタケ 10 本のうち 3 本について  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの含有と濃度を確認した ( $\alpha$ -アマニチン濃度：365~425 mg/kg、ファロイジン濃度：169~348 mg/kg)。この含有量を目安として、別途調製均質化したきのこシチュー 950 g にドクツルタケを 140 g 加えて加熱、混和し、常温に戻してフードプロ

セッサーを用いて均一化した。

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

#### B.4.1.3 装置及び測定条件

試験室間共同試験に参加した 11 機関は、いずれもトリプル四重極型的高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた。各機関の測定条件を B.4.1 表 1-1 に示した。

#### B.4.1.4 試験溶液の調製

毒きのこの毒成分一斉分析法 1 の試験溶液調製法の概略を、B.4.1 Scheme 1 に示した。

##### B.4.1.4.1 抽出

試料 5.0 g を 50 mL のポリプロピレン (PP) 製遠心沈殿管に量り採り、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 50 mL の標線まで加えた。転倒混和後、常温、 $2,000\times g$  で 5 分間遠心分離し、上清をメスフラスコに採り、メタノールを加えて正確に 50 mL とした。

##### 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、 $1,000\times g$  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ガラス製の遠心沈殿管 (10 mL 容) 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得られた溶出液を採り、60%メタノール水溶液を用いて、10 mL に定容したものを試験溶液とした。

#### B.4.1.5 定量

10  $\mu\text{g/mL}$  の 4 種アマニタトキシン混合標準溶液を 60%メタノール水溶液で 10 倍希釈した後、0.2%TCA 含有 60%メタノール水溶液により希釈して 1-50 ng/mL の

検量線用の標準溶液を調製した。内部標準溶液を共注入で使用する場合は、同様に 10 µg/mL の内部標準溶液を 60%メタノール水溶液で 10 倍希釈した後、0.2%TCA 含有 60%メタノール水溶液により希釈して 10 ng/mL の溶液を調製した。それぞれ 5 µL (機関 E は 2 µL) を LC-MS/MS に注入して絶対検量線法または内部標準法により定量値を求めた。

#### B.4.1.6 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  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの濃度 ( $x$  mg/kg) をもとに、試料中の添加濃度が 0、0.5 $x$ 、 $x$ 、1.5 $x$ 、2 $x$ 、2.5 $x$ 、3 $x$  と 7 濃度になるように  $\alpha$ -アマニチンとファロイジン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.4.1.7 均一性試験、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<sup>2)</sup>に従い、F 検定により均一性を確認した。

試験室間共同試験の実施期間前後において、模擬試料の  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンを 2 併行で定量し、模擬試料に含まれる測定対象化合物の実施期間中の安定性を評価した。

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

#### B.4.1.8 ブランク試験

模擬試料の調製に用いたドクツルタケ

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.4.1.9 試験室間共同試験

実施期間は令和 6 年 10 月 1 日-11 月 25 日の約 2 か月間とした。4 種混合標準溶液、内部標準溶液、及び模擬試料を参加 11 機関に配布した。参加機関は標準溶液に含まれる 4 種の毒成分 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -アマニチン及びファロイジン) 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 2 併行の定量試験を行い、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、Cochran 検定と Grubbs 検定により外れ値を棄却した<sup>3)</sup> (B.4.1.図 1)。このデータから回収率 (%)、併行精度 ( $RSD_r$ , %) 及び室間精度 ( $RSD_R$ , %) を求めた。回収率は B.4.1.6 標準添加法による模擬試料の値付けで求めた真の値の推定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.4.1.8 ブランク試験により求めた選択性とともに、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<sup>4)</sup> (以下、農水省のガイドライン) に従って評価した。また、3 機関のデータについて内部標準補正の有無による定量値の比較も行った。

<sup>3)</sup> Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC Int. (2002)

<sup>4)</sup> 分析法の妥当性確認に関するガイドライン、農林水産省、令和元年 10 月

#### B.4.2 毒きのこの毒成分一斉分析法 2

##### B.4.2.1 試料

添加回収試験用に、シイタケ (生、市販

品) を用いた。

#### B.4.2.2 試薬・試液

(+)-ムスカリン塩酸塩、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-アシルグリシンは Combi-Blocks 社製の標準試薬を用いた。内部標準は東京化成工業 (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 500 µg/mL の標準原液を調製した。このうち、ムスカリン塩酸塩、イボテン酸、ムシモール、L-プロパルギルグリシン及び L-アシルグリシンの 5 つの標準原液を混合し、50%メタノール水溶液で希釈して 100 及び 10 µg/mL の 5 種きのこ毒混合標準溶液を調製し添加回収試験に用いた。

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 (3 mg/mL)) は、Waters 社製の AccQ-Tag™ Ultra Derivatization Kit 付属のカルバミン酸 6-アミノキノリル-*N*-スクシイミジル (AQC) 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 LC-MS/MS 測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用又は LC-MS 用を用いた。

#### B.4.2.3 装置

ホモジナイザーは、(株) マイクロテック・ニチオン製のヒスコトロン NS-51 (ジェネレーターシャフト NS-10P (10.5 mm φ×140 mm)) を用いた。アルミブロックヒーターは、Thermo Fisher Scientific 社製の Reacti-Thermo™ Heating Module を用いた。LC-MS/MS 装置は、Sciex 社製の Exion LC AD-5500+ QTRAP Activated を用いた。

#### B.4.2.4 LC-MS/MS 測定条件

きのこ毒 5 成分及び内部標準 1 成分の測定条件を B.4.2 表 2-1 及び 2-2 に示した。

#### B.4.2.5 試験溶液の調製

きのこの分析法 2 の試験溶液調製法の概略を、B.4.2 Scheme 2 に示した。

##### B.4.2.5.1 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 の内部標準 (MTY) 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。

##### B.4.2.5.2 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.4.2.5.3 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.4.2.5.2** 精製で得られた溶出液 100  $\mu\text{L}$  を量り採り、ほう酸緩衝液 300  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  を入れて混和したものを試験溶液とした (0.01 g sample/mL)。

#### B.4.2.6 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 $\mu\text{g/mL}$ 5 種きのご毒混合標準溶液

10  $\mu\text{g/mL}$  5 種きのご毒混合標準溶液 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 $\mu\text{g/mL}$ 5 種きのご毒混合標準溶液

①の 1  $\mu\text{g/mL}$  5 種きのご毒混合標準溶液を 2%TCA、80%メタノール水溶液で 10 倍希釈した。

##### ③ 1 $\mu\text{g/mL}$ 内部標準 (MTY) 溶液

100  $\mu\text{g/mL}$  内部標準 (MTY) 溶液 (50%メタノール水溶液) を 2%TCA 含有 80%メタノール水溶液で 100 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、内部標準 (MTY) 100 ng/mL を含有する、0、10、20、50、100、200 ng/mL の 5 種きのご毒混合標準溶液を調製した。これらの 6 溶液 100  $\mu\text{L}$  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.4.2.5.3** 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 5  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS に注入し、

ムスカリン塩酸塩は絶対検量線により、その他の 4 成分は絶対検量線法と内部標準補正法の両方で定量を行った (内部標準補正は試験溶液を希釈しない場合のみ)。

#### B.4.2.7 添加回収試験による妥当性確認

分析対象化合物を含まないことを確認したシイタケ 5 g に、5 種きのご毒混合標準溶液 (100 と 10  $\mu\text{g/mL}$  の 2 濃度) 及び内部標準 (MTY) 溶液 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) をそれぞれ 0.5 mL ずつ添加し、混和後 30 分間静置したものを添加試料とした (添加濃度: 10 及び 1 mg/kg)。各濃度で 2 回併行 5 日間の添加回収試験を行い、**B.4.2.6** 定量で作成した検量線で定量した。一元配置の分散分析により真度 (%)、併行精度 (RSD<sub>r</sub>, %) 及び室内精度 (RSD<sub>wr</sub>, %) を求めて、厚生労働省の「食品中の残留農薬等の妥当性評価ガイドライン<sup>5)</sup> (以下、厚労省のガイドライン)」に従って評価した。

<sup>5)</sup> 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について、厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 (食安発 1224 第 1 号、平成 22 年 12 月 24 日)

#### B.4.3 植物性自然毒(きのこ)の鑑別に係る遺伝子検査法の検討

##### ・子実体サンプル採取情報

テングタケ属と推定されるきのこ(子実体)について、採取地や採取日、子実体の状態を記録後、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、使用するまで -30~80°C で保存した。

##### ・DNA 抽出方法

全ての子実体からの DNA 抽出は、Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) を用いた。凍結乾燥済サンプル 0.2 g を液体窒素中で乳鉢乳棒を用い

て破碎した後、2.5 mL の 1.5% CTAB バッファー (1.5% CTAB、100 mM Tris-HCl (pH 8)、1.4 M NaCl、20 mM EDTA (pH 8)、1% ポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone: PVP)、1% ポリビニルポリピロリドン (Polyvinylpolypyrrolidone: PVPP)、2% 2-メルカプトエタノール: 2-ME) を添加し、56°C で 30 分間加温した。加温後の溶液に、1.75 mL 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 30 rpm、30 分間転倒混和後、遠心 (5,000 rpm、7 分間、室温) して上清を回収した。さらに、回収した上清にその 1/2 倍量の CIA を添加し、50 rpm、30 分間転倒混和後、遠心 (5,000 rpm、7 分間、室温) し、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、2.5 mL の CTAB 沈殿バッファー (1.0% CTAB、50 mM Tris-HCl (pH 8)、10 mM EDTA (pH 8)) を添加して転倒混和した。遠心 (5,000~10,000 rpm、10 分間、室温) して得られた沈殿に対し、500 µL の 1 M NaCl および 1 µL の 100 mg/mL RNaseA を添加し、56°C 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およびエタノール沈殿により脱塩し、超純水に再懸濁したものを DNA 溶液とした。抽出したゲノム DNA は NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) で濃度を測定した。

#### ・種推定

rRNA 遺伝子のうち、真菌の同定や系統分類で用いられる ITS 領域、および RNA polymerase II (rpb2) の配列に基づいてサンプルの同定を行った。両遺伝子領域を増幅するために ITS は ITS1: 5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'、ITS4: 5' -

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al, *PCR protocols*:1990: p.315-322)、rpb2 は Am-6F : 5' -TGGGGAATGGTRTGYCCTGC-3' および Am-7R : 5' -CCCATKGCTTGTTRCCCATGGC-3' (Cai et al, 2014, *BMC Evol Biol.*) をプライマーとして用いた PCR を行った。増幅したアンプリコンを NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) で精製後、サンガー法により塩基配列を決定し、NCBI の BLAST を用いて、相同性の高い種を同サンプルの種として推定した。

#### ・テングタケ属 ITS 配列の収集と系統解析

NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で種名が掲載されている担子菌門テングタケ属 444 種と、外群として *Lepiota venenata* (キツネノカラカサ属、和名なし)、*Limacella glioderma* (チャヌメリカラカサタケ)、*Limacella glischra* (ヌメリカラカサ属、和名なし) の rRNA 周辺配列を収集した (B.4.3 表 1)。収集した rRNA 遺伝子周辺配列は MAFFT (v7.525) を用いて多重アライメントし、ModelTest-NG (v0.1.7) でモデル推定し、RAxML-NG (v1.2.2) で系統樹推定した。

#### ・ドクツルタケの種特異的配列の探索

ドクツルタケ種特異的なプライマー・プローブ配列の探索には、塩基配列情報を基に特異的核酸配列を探索するプログラム BLAST\_TSN

([https://github.com/NIHS-DNFI/BLAST\\_TSN/](https://github.com/NIHS-DNFI/BLAST_TSN/)) (Sugino et al, 2025, *ACS Agric. Sci. Technol.*) を一部改変して用いた。ドクツルタケの 18S rRNA 遺伝子配列 695 塩基 (GenBank: AB015676.1) から 1 塩基 sliding

window 方式により 25 mer の 671 種の配列を生成し、それらをクエリとして、ドクツルタケ以外の 443 種テングタケ属 ITS 配列に対して BLAST 検索を実施し、配列類似性のない配列、すなわちドクツルタケに特異的な配列を抽出した (B.4.3 図 2A)。

#### ・ドクツルタケ特異的遺伝子検査法

BLAST\_TSN で抽出したドクツルタケ特異的な配列を基に、ドクツルタケ特異的リアルタイム PCR 用プライマー・プローブを設計した。

設計したプライマー・プローブを用いた検査法の特異性は、FastStart Universal Probe Master (Rox)

(Roche) を用いた TaqMan リアルタイム PCR 法で確認した。

#### ・ロングリードシークエンス

テングタケの *de novo* 全ゲノムアセンブリを実施するにあたり、PromethION (Oxford Nanopore Technologies) を使用してロングリードシークエンスを実施した。CTAB 法により抽出した DNA から、Short Read Eliminator Kit を用いて短い配列を除去し、Ligation Sequencing Kit V14 (SQK-LSK114) に従ってシークエンスライブラリを調製した。フローセルは FRO-PRO 114M を使用した。

PromethION から取得したナノポア電流測定値は、Oxford Nanopore Technologies が提供するベースコーラーである dorado (v 0.7.3) の duplex モードによって塩基配列に読み替え、3 種類のロングリード用アセンブラ Flye (v 2.9)、NECAT (v0.0.1)、PECAT (v0.0.3) により、アセンブリを検討した。PECAT ののみ、dorado の correct モードによる読み取りエラー修正モードを実行した。

ドラフトゲノムの完全性を評価する

ため、Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO) (v 5.7.1) を利用し、オーソログデータセットは担子菌門が属する菌界として「fungi\_odb10」、および担子菌の分類グループの中でも大きな集団であるハラタケ目として「agaricales\_odb10」を利用した。また、きのこ採取環境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を調査するための「bacteria\_odb10」を利用した。また、D-GENIES のウェブブラウザ版 (<https://dgenies.toulouse.inra.fr/>) を用いて、既報にある他種の担子菌類ゲノムと比較した。

#### ・ミトコンドリア環状ゲノムの探索

真核生物の 1 つの細胞には細胞核が 1 つに対し、多数のミトコンドリアが存在している。よって、全ゲノムシークエンスにより得られたリードのカバレッジは核ゲノムよりミトコンドリアゲノムのカバレッジの方が高いと考えられる。そこで、構築したコンティグの中で、シークエンスリードのカバレッジが著しく高いコンティグをミトコンドリアゲノム由来配列と推測した。アライナー minimap2 (v 2.17-r941) を用いて、シークエンスリードを構築したコンティグにマッピングしたのち、計算ツール CoverM (v 0.7.0) でコンティグごとのカバレッジを取得した。

さらに、環状のミトコンドリアゲノムを得るため、ミトコンドリアゲノムと推測したコンティグにマッピングされたシークエンスリードを、細菌などの環状ゲノム構築に特化したアセンブリツール hybracter (v 0.9.0) を使用して、ミトコンドリアゲノム配列のアセンブリおよび環状化を検討した。

#### ・リードのフィルタリング

テングタケ全ゲノムアセンブリを行

うにあたり、全ゲノムシーケンスリードから不要なリードフィルタリングを検討した。実施した工程を B.4.3 図 6 に示した。第一に、ミトコンドリア由来と推定したリードを除外した。次に、細菌（他種）ゲノムに相同性の高いシーケンスリードを除外した。そのために、minimap2 を用いて除外対象の細菌ゲノムの参照配列にシーケンスリードを一度マッピングし、Samtools (v 1.11) を用いて、マッピングされなかったリードを抽出した。除外対象の細菌ゲノムの参照配列には *Rhanella* 属細菌ゲノム (*Rahnella* sp. Y9602, complete genome, Sequence ID: CP002505.1) を用いた。

#### ・既知毒性関連遺伝子の遺伝子座探索

厚生労働省の公開する「自然毒リスクプロファイル」において、テングタケ属担子菌に報告の多い毒成分アマトキシン類、ファロトキシン類のアミノ酸配列 (B.4.3 表 2) を基に BLAST プログラムの tblastn (クエリ: アミノ酸配列、データベース: 核酸配列) により探索した。本研究で実行した tblastn では、クエリ配列が短いため、すべてオプション (-word\_size 2, -evalue 10000) を設定して実行した。

### 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。

#### (倫理面への配慮)

特になし。

## 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

宮城県気仙沼市および神奈川県横須賀市において漁獲された計 9 種 2871 個体および 2 種 519 個体を調査した結果、雑種混獲率はそれぞれ 14.7% および 2.1% だった。また、しらす加工品に混入するふぐ仔稚魚について、漁獲海域 7 地点から 965 個体を形態学的に調査し、そのうち 108 個体について DNA マーカーによる種判別を行った結果、3 種 (シロサバフグ 64 個体、ナシフグ 32 個体、シマフグ 12 個体) に分けられた。以上より、種・雑種判別された個体の一部を、毒性評価用の検体として水産技術研究所に送付した。

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魚類の種・雑種判別用 TaqMan アッセイに引き続き、サバフグ属魚類でも同様のアッセイを開発するために、日本産サバフグ属魚類全 7 種の DNA 試料を採集し、そのゲノム DNA から次世代シーケンス解析用ライブラリを作成した後に、NovaSeq X plus 型シーケンサーによる次世代シーケンス解析に供した。その結果、各種に特異的な SNPs マーカーが、4495 座位検出された。最も少ない種はシロサバフグで 240 座位、最も多い種はドクサバフグで 1291 座位だった。無毒とされる 3 種 (シロサバフグ、クロサバフグ、クマサカフグ) は互いに近縁で、マーカー座位数が少なかった。

今年度実施された 2 地点のうち、宮城県気仙沼市は、前年度まで実施された自然毒等のリスク管理のための研究 (21KA1005) 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 14.7%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、ショウサイフグとゴマフグ間の雑種である。一方、前年度まで実施された自然毒等のリスク管理のための研究(21KA1005)において、トラフグを主な対象とする漁業の漁獲物に、比較的多くの雑種が含まれてい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 2.1%と前年度の 7.9%から大幅に減少した。なお、この海域では、トラフグとマフグ間の雑種のみが見られた。

以上のように、昨年度および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フグの混獲率が明らかになった。

しらす加工品に混入するふぐ仔稚魚の調査では、トラフグ属魚類およびサバフグ属魚類の仔稚魚は外部形態による種同定形質に乏しく、外部形態に基づく種鑑別は困難で時間がかかった。一方、両属の鑑別は、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。トラフグ属魚類については、自然毒等のリスク管理のための研究(21KA1005)」で種・雑種判別用 TaqMan アッセイが開発されているため、DNA 分析による種・雑種鑑別は迅速かつ簡便に実施可能である。一方、サバフグ属魚類はそのような種・雑種判別用アッセイは開発されておらず、しらす混入ふぐの多くがサバフグ属魚類のシロサバフグであることを考えると、同様のアッセイをサバフグ属魚類においても開発する必要があると考えられる。

雑種フグ中の TTX 分析では、雑種フグにおける各組織が可食かどうかの判断をするため、各組織に含まれる TTX 含量を調べた。地域別に分析結果を説明する。

北海道では、トラフグとマフグの交雑種 1 個体を組織別に分析した。その結果、肝臓で 40 MU/g、皮で 6.4 MU/g、筋肉で 1.9 MU/g であった。精巢では 10.7 MU/g と食品上安全とされる 10 MU/g をわずかに超えた。これまでの調査では、精巢で 10 MU/g を超える検体は見つけられず、本分析によって初めて明らかとなった。トラフグもマフグも精巢は可食部位となっているが、交雑種では、その安全性について検討する必要がある。青森県でも、トラフグとマフグの交雑種 1 個体を組織別に分析した。卵巣、皮、筋肉、肝臓の順に、578.4、9.8、5.4、92.9 MU/g であった。皮はわずかに 10 MU/g を下回ったが、トラフグとマフグの場合、毒性部位が顕性遺伝することが知られている。これまでの分析で 10 MU/g を超えるものがあり、本交雑種の皮については、その安全性について検討する必要がある。宮城県では、ゴマフグとショウサイフグの交雑種(2 個体)、クサフグとヒガンフグの交雑種、クサフグの計 4 個体を分析した。ゴマフグとショウサイフグの交雑種(2 個体)は、いずれも各組織が 10MU/g 以下であった。他雑種フグに比べて、検体の入手が困難であるクサフグとヒガンフグの交雑種は、卵巣が 89.1 MU/g、皮と筋肉、肝臓はいずれも 10 MU/g 以下であった。

福島県では、トラフグとマフグの交雑種(3 個体)、(トラフグとマフグの交雑種) × トラフグの戻り交雑(2 個体)の計 5 個体を分析した。トラフグとマフグの交雑種では、卵巣が 300 MU/g 以上と高く、皮も 5.6-21.3 MU/g であり、顕性遺伝が認められた。(トラフグとマフグの交雑種) × トラフグの戻り交雑(2 個体)では、卵巣が 39、129 MU/g と高かったが、皮や筋肉、肝臓には 10 MU/g 以下の毒性しか認められなかった。千葉県では、ゴマフグと

ショウサイフグの交雑種、トラフグとマフグの交雑種（5 個体）、マフグ、ショウサイフグ、トラフグ（5 個体）、カナフグの計 14 個体を分析した。ゴマフグとショウサイフグの交雑種では、卵巣が 101 MU/g と高かったが、その他組織は、2 MU/g 以下ととても低かった。トラフグとマフグの交雑種ではいずれの組織も 10 MU/g を超えなかった。神奈川県では、トラフグとマフグの交雑種（10 個体）を分析した。生殖巣で 0.0-179 MU/g と幅はあったが、その他組織では、肝臓で 19MU/g（1 個体）、皮で 10.4 MU/g（1 個体）と 10MU/g を超える検体が散見された。石川県ではトラフグとマフグの交雑種（1 個体）を分析した。いずれの組織も 1 MU/g 以下であった。長崎県では、トラフグ（2 個体）を分析した。いずれの組織も 3 MU/g 以下であった。

しらす加工品に混入するフグ稚魚の TTX 分析では、しらす加工品に含まれるフグ稚魚について、それに含まれる TTX が効率よく回収できているかの試験はこれまでに実施されていない。そこで、形態的にシロサバフグと思われるフグ稚魚（10 mg 程度）に TTX を 1 ng/mL, 2 ng/mL となるように添加し、残渣を取り除いた後、抽出液を適宜希釈して HILIC-MS/MS で分析した。その結果、どちらの濃度も 70%程度の回収率で TTX を検出できることが分かった。これから求められる TTX の検出限界は、50 ng/g フグ稚魚であり、1 MU（マウスユニット）= 220 ng とすると、0.23 MU/g であった。フグの可食部位として安全と認められる値は 10 MU/g であり、これを検出するには十分な検出感度を有していると考えられる。

しらす加工品の製造中に選別されたフグ稚魚の毒性についてシロサバフ

グ、ナシフグ、シマフグの計 108 検体について調べた。産地は国内 7 地点（A～G）とした。

産地 A～D で採取されたシロサバフグとナシフグからは TTX が検出されなかった。産地 E で採取されたシマフグ 12 検体全てから TTX が検出され、陽性であった。そのうちの 3 個体が 10 MU/g を超えていた。産地 F で採取されたシロサバフグとナシフグにおいては、シロサバフグ 1 個体から微量（<0.5 MU/g）であるが、TTX が検出された。シロサバフグ稚魚から TTX が検出される事例は初めてであるが、本事業では、ミトコンドリア DNA のみを用いており、さらに精度の高い方法で検出し、判別を確定させる必要があることが分かった。

産地 G においては、シロサバフグ稚魚 1 個体から微量（<0.5 MU/g）であるが、TTX が検出された。ナシフグ稚魚 1 個体からも TTX が同様に微量（<1.5 MU/g）検出された。

## 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

### C.2.1 M-toxin 類の単離、合成技術の確立

方法 B.2.1 に従って、ホタテガイより精製を行ったところ、M1、M3、M5-HA が単離出来た。また、ヒオウギガイを同手法で精製したところ、同様に M1、M3、M5-HA が単離出来た。加えて、C3&C4 由来の推定 M9 を単離出来ることを確認した。一方で、TSKgel-amide80 では M2 と M6-HA、M4 と M10 の溶出がそれぞれほぼ同時であり、単離が不可能であった。そこで、TSKgel amide80 で溶出した M4 および M10 画分について、別の HILIC カラムに通すことで、それぞれが単離出来ることを確認した。M2 や M6-HA の単離法は今後検討が必要であ

るが、既に構造確認がなされていることや、当事業で長澤らによって合成される予定であるため優先度が低いと考えた。今年度精製した M1、M3、M4、M10 については、収量が少なかったが定量 NMR 法による値付けを行った。

M-toxin の合成においては、令和 6 年度に予定していた M2 の合成を行った。具体的には、D-リンゴ酸 30 g を出発原料として、18 工程を経て、全て官能基が保護された STX 骨格 1 g を不斉合成した。ついで STX 骨格から 6 工程を経ることで M2 を 6 mg 合成した。続いて、令和 7 年度に予定していた M4 の合成も前倒しで行った。2016 年にオックスフォード大学の DuBois らが報告した酸化法を参考に、M2 の水酸基の酸化を検討した結果、M4 への変換はできたものの、酸化反応を完結させることが困難であった。そのため、M4 と M2 の混合物のサンプルを 12 mg 得た。M2 から M4 への酸化反応に関して、M2 が水などのプロトン性溶媒にしか溶けないため、酸化反応条件が限られている。そのため、中間体の官能基が保護された STX 骨格から直接 M4 への変換を検討することで、より効率よく M4 を合成できると考える。

### C.2.2 毒性評価法の最適化および M2 の毒性評価

Neuro2A の細胞株選定では、2 つの株を対象とした。複数回試験をした際のデータの安定性、継代した際の細胞増殖能を比較し、細胞株を決定した。

毒性試験には RPMI 培地を使用し、細胞内に Na<sup>+</sup>流入を活性化する試薬 (Ouabain および Veratridine) の混合比を変更し、TTX を参照試薬として毒性評価条件を検討した。試薬については、Veratridine と比較して Ouabain のほうが、濃度に対する細胞毒性の影響が大きいいため、Veratridine の濃度を一定とし、添加する Ouabain の濃度を 1.0~5.0mM で変更した複数の試薬混合比におい

て試験を実施し、条件の最適化を行った。TTX の 50% 効果濃度 (EC<sub>50</sub>) は 2.50±0.31 nM であった。Yotsu-Yamashita M. *et al.*, *Toxicol*, 2003 において TTX の EC<sub>50</sub> は 4.60±0.70 nM と報告されており、近い値が得られたため最適化ができたと考えられた。同条件において、NeoSTX 及び dcSTX について毒性評価を行ったところ、それぞれの EC<sub>50</sub> は 3.10±0.43 nM と 22.39±3.37 nM であり、PSTs 成分について毒性評価を出来ることを確認した。

M-toxin 類のうち、GTX2&3 の代謝物と提唱されている M2 についての細胞毒性を評価したところ、EC<sub>50</sub> 値が 139.27±36.68 nM であり、TTX や neoSTX、dcSTX の毒力よりも低かったが、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネル阻害作用を有する成分であることを確認した。(C.2 Fig.1)

### C.2.3 国内沿岸で毒化した二枚貝中の M-toxin 類探索

東日本で毒化したホタテガイ、アカザガイには、主に M1~4、M5-HA、M6-HA、M8、M10 が含有していた。これらの貝種において、GTX2&3、GTX1&4 が高濃度に蓄積しているため、その代謝物である M4 や M8、M10 が高感度で検出されたものと考えられた。また、採取日によって代謝物群の組成に差があり、変換や貝体外への排出が起きたものと考えた。定量 NMR 法で値付けした M-toxin 類を標準として中腸腺中の定量を行ったところ、採取日によっては全毒成分における組成 (モル比) の 50%前後が M-toxin 類であることを確認した。

西日本で毒化したヒオウギガイには、主に M1~3、M5-HA が含有していた。加えて、C3&4 由来の M7&9 が含有していることを確認した (C.2 Fig.1)。M9 については、MS/MS フラグメント解析により、既報で M9 と推定された化合物と同一のものであることが分かった。国内沿岸における C3&4 に毒化した二枚貝の報告は少なく、M7&

9の検出例は本研究が初めてである。

東日本のホタテガイやアカザラガイと、西日本のヒオウギガイで蓄積していた M-toxin 類が異なるが、これは毒化原因となった有毒プランクトンの種類に起因すると考えられる。プランクトンの発生状況を把握し、同地域で毒化した二枚貝を入手することで、有用な精製の原料を確保できるものと考えた。

#### C.2.4. ホタテガイから検出されるフグ毒 TTX の変動と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

北海道噴火湾にて養殖されているホタテガイを 2023 年 6 月から 2024 年 5 月まで定期的に採捕し、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結果、麻痺性貝毒による二枚貝の毒化は、5 月頃の有毒プランクトンの出現後 6-7 月にピークを迎え、その後減少していき、2024 年 5 月には再度、二枚貝の毒化の兆候が見られた。一方、TTX による二枚貝の毒化時期は、麻痺性貝毒による二枚貝の毒化時期とは重なっておらず、相関はないことから、本海域には麻痺性貝毒産生生物とは異なる TTX 産生生物が存在ことを示唆するデータを得た。

また、ホタテガイをはじめとするイタヤガイ科の二枚貝や、その想定餌生物のゲノムを鋳型として用いて、アニーリング温度を変化させてそれらの rDNA の増幅を試みたところ、アニーリング温度を 65°C に設定した場合に得られる増幅産物量が、60°C に設定した試験区のそれに比べ有意に減少することが判明した。また、ホタテガイをはじめとするイタヤガイ科の二枚貝に特異的結合すると考えられる BlockptPNA を新たに設計した。本 PNA を用いて、その配列と比較して塩基置換数が 1 以下のホタテガイおよびアサリのゲノム DNA を鋳型として用いた試験区では、その添加濃度やアニーリング温度に関わらず、PNA 非添加区のそれ

に比べ得られる増幅産物量が有意に減少した。また、2 塩基の置換を有するミドリイガイでは、その添加濃度が 1.0  $\mu$ M、アニーリング温度が 65°C の場合のみ増幅抑制が見られ、想定餌生物として用いた 9 塩基以上の置換を有する微細藻 3 種ではいずれの場合も増幅抑制が見られなかった。

### 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 諸外国の規制、注意喚起、健康被害事例等の文献調査

##### C.3.1.1 諸外国における規制状況

アメリカでは連邦規則集 (Code of Federal Regulations) の Title 21 に規制値又は食品への混入が禁止されている自然毒が記載されており、エルカ酸、イソサフロール、サフロール、ジヒドロサフロール及びクマリンがある<sup>1)</sup>。エルカ酸については「一般的には安全とみなされている (GRAS: Generally Recognized As Safe)」物質として規制値が定められているが、その他の化合物については食品への混入そのものが禁止されている。また、エフェドリンアルカロイドを含むダイエットサプリメントの販売を禁止する最終規則が平成 16 年 2 月 6 日に公布されている。EU では規則 2023/915 にて自然毒を含む様々な物質の食品中への最大規制値が定められている<sup>2)</sup>。アヘンアルカロイドや  $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノールといった向精神性の自然毒や、肝毒性及び発がん性が指摘されているピロリジジンアルカロイドに対して規制値が定められていることが他国と比べて特徴的である。うちピロリジジンアルカロイドについては、ハーブティー類、乾燥ハーブ類、クミン、花粉製品、サプリメントなどについて規制値が設定されている。イギリスは EU 離脱に際

し、EU 規則 2023/915 の前身となる EC 規則 1881/2006 を採用し、現行の EU 規則 2023/915 よりも規制値が定められている物質が少ない<sup>3)</sup>。カナダでは、カナダ保健省（Health Canada）が通知する「食品中の汚染物質及びその他の不純物リスト（List of Contaminants and Other Adulterating Substances in Foods）」にて自然毒を含む様々な物質の食品中への混入の禁止又は規制値を定めている<sup>4)</sup>。この通知は食品医薬品規則（Food and Drug Regulations）の Division 15 下で規定されている<sup>5)</sup>。特徴的な点としては、ジャガイモに含まれるグリコアルカロイドや綿実粉に含まれるゴシポールに対しても規制値が設定されている点が挙げられる。オーストラリア及びニュージーランドでは共同の規制である食品基準コード（Food Standards Code）の Standard 1.4.1 において食品中に混入する自然毒等の規制に関する記載があり、Schedule 19 には具体的な物質名、食品名及び規制値が明示されている<sup>6)</sup>。特徴的なものは、アロイン、キニーネ、クァシン、サントニン、ツジヨン、ツチン、ヒペリシン、プレゴン、ベルベリン及びルピンアルカロイドといった物質に規制値が設定されている点である。これらの物質については今回調査した他の国・地域では規制されていないものであった。また、アルコール飲料への規制値が多く設定されている点も特徴的であった。

なお、ピロリジジンアルカロイドを多く含むコンフリー（シンフィツム）については、諸外国で健康被害が多数発生したことから、我が国ではコンフリー含有製品の販売等の禁止（食安基発第 0614001 号，平成 16 年 6 月 14 日）、カナダでは当局の許可を得ている製品以外は販売禁止、オーストラリアではコン

フリーを禁止植物としている。

<sup>1)</sup> アメリカ: Code of Federal Regulations, Title 21, Food and Drugs

<https://www.ecfr.gov/current/title-21>

<sup>2)</sup> EU: Commission Regulation (EU) 2023/915

[https://eur-](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj)  
[lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj)

<sup>3)</sup> イギリス: Commission Regulation (EU) 1881/2006

[https://www.legislation.gov.uk/eur/20](https://www.legislation.gov.uk/eur/2006/1881/annex)  
[06/1881/annex](https://www.legislation.gov.uk/eur/2006/1881/annex)

<sup>4)</sup> カナダ: List of contaminants and other adulterating substances in foods

[https://www.canada.ca/en/health-](https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/contaminants-adulterating-substances-foods.html)  
[canada/services/food-nutrition/food-](https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/contaminants-adulterating-substances-foods.html)  
[safety/chemical-](https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/contaminants-adulterating-substances-foods.html)  
[contaminants/contaminants-](https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/contaminants-adulterating-substances-foods.html)  
[adulterating-substances-foods.html](https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/contaminants-adulterating-substances-foods.html)

<sup>5)</sup> カナダ: Food and Drug Regulations, Division 15, Adulteration of Food

[https://laws-](https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/C.R.C.%2C_c._870/page-42.html#h-573261)  
[lois.justice.gc.ca/eng/regulations/C.R.](https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/C.R.C.%2C_c._870/page-42.html#h-573261)  
[C.%2C\\_c.\\_870/page-42.html#h-](https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/C.R.C.%2C_c._870/page-42.html#h-573261)  
[573261](https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/C.R.C.%2C_c._870/page-42.html#h-573261)

<sup>6)</sup> オーストラリア・ニュージーランド: Food Standards Code legislation  
[https://www.foodstandards.gov.au/fo](https://www.foodstandards.gov.au/food-standards-code/legislation)  
[od-standards-code/legislation](https://www.foodstandards.gov.au/food-standards-code/legislation)

### C.3.1.2 諸外国における注意喚起事例

アメリカでは食品医薬品局 (FDA) が「Natural Toxins in Food」というウェブページを開設し、代表的な自然毒について紹介している。また、「Bad Bug Book」というハンドブックにおいて様々な自然毒の毒性や由来植物等を詳細に解説している。EU では自然毒に特化し

たウェブページは見当たらないが、欧州食品安全機関（EFSA）がプレスリリースを通じて個別に注意喚起を発信している。また、EFSAの食品中の汚染物質に関するパネル（CONTAM: The Panel on Contaminants in the Food Chain）がリスク評価に関する報告書を公表している。イギリスでは、食品基準庁（FSA）が「Plant toxins」というウェブサイトにおいて代表的な植物性自然毒や関連する規制について紹介しているほか、当局の行った実態調査の結果についても公表している。カナダでは、Health Canadaが「Natural Toxins」というウェブサイトにおいて当局の取り組みや各自然毒の解説、規制に関する情報を提供している。オーストラリア・ニュージーランドでは、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）が個別の植物性自然毒について注意喚起を発信している。香港では、食物環境衛生署 食物安全センター（CFS）が個別の植物性自然毒について注意喚起を行っているほか、「Natural Toxins in Food Plants」という代表的な植物性自然毒について簡潔にまとめた報告書を公表している。

最も多くの当局から注意喚起が出されていたのはシアン化合物であり、今回調査した全ての国・地域で注意喚起が行われていた。次いでピロリジジナルカロイド、グリコアルカロイド、トロパンアルカロイドの順で多かった。ピロリジジナルカロイドについては、EU、イギリス及び香港で実態調査が進められており、その結果が公表されていた。特に、EFSAは実態調査に加え、ばく露量推定及び健康リスク評価も実施していた。イギリスの食品基準庁（FSA）は、調査対象となった食品のほとんどが低レベルであったものの、発がんリスクを低減さ

せるためにはピロリジジナルカロイドのばく露を抑える必要があると注意喚起している。香港の食物環境衛生署食物安全センター（CFS）は、実態調査の結果を基にばく露量推定を行った。CFSの報告書によると、成人における推定ばく露量では健康被害の可能性は低いとされているが、さらにばく露量を低減するためには汚染源の特定、生産工程の管理、バランスの取れた食事が重要であると注意喚起している。FDAも「Bad Bug Book」にてピロリジジナルカロイドの毒性やばく露源等を解説している。

FDAは植物性自然毒を含むサプリメントに関して、健康リスクがあるものについては販売禁止や注意喚起を行っている。具体的には、エフェドリンアルカロイド（心筋梗塞や脳梗塞等のリスク）、カバ（肝障害）及びクラトム（肝障害やてんかん等のリスク）についての情報が掲載されていた。エフェドリンアルカロイド及びカバについては、海外での健康被害の発生を受けて、我が国でも情報提供と注意喚起を行うとともに、無承認無許可医薬品に該当するとして全国自治体へ監視指導等と呼び掛けた（医薬監麻発第0912004号/食新発第0912001号、平成14年9月12日；医薬監麻発第1128002号、平成14年11月28日）。

### C.3.1.3 検出事例

RASFFはEC規則178/2002のもとで運用されている食品及び飼料に関する緊急警告システムである。EU加盟国、ノルウェー、リヒテンシュタイン、アイスランド及びスウェーデンにおいて食料や飼料に有害物質が検出されるなどの健康リスクが確認された場合、その情報がRASFFを通じて全加盟国に共有される。当該製品がEU域外の国と輸出入される場合には、当該国にも情報が提供される。通知には「Alert」、「Information」

及び「Border rejection」の3種類がある。「Alert」は市場に流通している製品に深刻な健康リスクがあり、迅速な対応が必要であること、「Information」は市場に出回っている製品にリスクが確認されたが、即時の対応は必要ないこと、「Border rejection」は製品に健康リスクが判明し、EU及び欧州経済領域(EEA)への通関が拒否されたことを示している。2020年から2024年10月4日までに、植物性自然毒の食品から検出事例は265件報告されていた。最も多く報告されたのはピロリジジナルカロイドで167件であった。次いで、トロパンアルカロイド(33件)、シアン化合物(26件)、ルピナルカロイド(19件)の順であった。これらの自然毒について諸外国での検出事例を以下に述べる。

#### (1) ピロリジジナルカロイド

RASFFに報告された検出事例の大半はハーブ類であり、特にクミン(71件)及びオレガノ(52件)でほとんどが占められていた。これらの食品のピロリジジナルカロイド含有量はEUの規制値(オレガノが1000 µg/kg, クミンは400 µg/kg)を大幅に上回るものが多かった。検出食品の産地としてはトルコ産が多かった。ハーブは様々な料理に用いられることから、意図せずともピロリジジナルカロイドにばく露するリスクがあることが示唆され、注意が必要である。ハーブ類以外には紅茶や緑茶といった茶類から検出される事例もあった。

オランダ食品安全研究所(RIKILT)、ドイツ連邦リスク評価研究所(BfR)及びスペインカタルーニャ州政府農業技術研究所(IRTA)は市場に流通する動物性食品(肉類, 卵, 牛乳・乳製品)及び植物性食品(茶類, ハーブ類, サプリメント)を含む105製品を対象としたピロリジジナルカロイドの含有実態調査

を実施した<sup>7)</sup>。動物性食品からはほとんど検出されなかったが、茶類(ハーブティーを含む)の91%、サプリメントの60%から検出された。茶類では、特にレイボスティーにおける含有量が比較的高かった一方、緑茶における含有量は低かった。FSAが実施した実態調査<sup>8)</sup>では、茶類の20%、ハーブティーの50%、植物由来サプリメントの11%、はちみつの65%からピロリジジナルカロイドが検出された。CFSが実施した調査<sup>9)</sup>では、乾燥ハーブ・スパイス(オレガノやクミン等)の74%からピロリジジナルカロイドが検出され、その含有量も他の食品より多かった。特に含有量が多かったハーブ・スパイスは、オレガノ、タラゴン、クミンであった。その他、シリアル<sup>57%</sup>、卵<sup>33%</sup>、牛乳・乳製品<sup>28%</sup>、はちみつの100%から検出された。

<sup>7)</sup> Mulder, P. P., et al. Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in food. EFSA Supporting Publications, 2015, 12, 859E.

<sup>8)</sup> Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in Food <https://www.food.gov.uk/research/chemical-hazards-in-food-and-feed/occurrence-of-pyrrolizidine-alkaloids-in-food>

<sup>9)</sup> Dietary Exposure to Pyrrolizidine Alkaloids of Hong Kong Adult Population [https://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme\\_rafs/programme\\_rafs\\_fc\\_01\\_35.html](https://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/programme_rafs_fc_01_35.html)

#### (2) トロパンアルカロイド

RASFF上のデータからは、トロパンアルカロイドが検出された食品の傾向は読み取れず、様々な食品から検出されていた。EFSAが実施した市販の1709製品を対象としたトロパンアルカロイ

ドの実態調査<sup>10)</sup>では、小麦粉の21.3%、乳幼児向けシリアル<sup>11)</sup>の20.0%、シリアルの6.8%、ビスケット及びパステイの14.6%、パンの15.8%、ハーブティー（乾燥品）の70.2%、豆製品・炒め物の26.2%、ジャガイモの100%及びナスの92.7%からトロパンアルカロイドが検出された。なお、この調査ではアトロピンやスコポラミンといったトロパン骨格をもつ化合物に加え、ノルトロパン骨格をもつカリステギン類をトロパンアルカロイドと総称しており、ジャガイモ及びナスから検出されたのは後者のカリステギン類であった。トロパンアルカロイドが検出される原因として、チョウセンアサガオが雑草として食用植物の近辺に生育し、収穫時に誤って混入する事例が知られている<sup>11)</sup>。そのため、RASFFに報告された事例やEFSAの調査でシリアル等から検出された事例は、食品の由来植物自体にトロパンアルカロイドが含まれていたのではなく、チョウセンアサガオ等のトロパンアルカロイドを含有する植物が混入した可能性が考えられた。

<sup>10)</sup> Mulder, P. P., et al. Occurrence of tropane alkaloids in food. EFSA Supporting Publications, 2016, 13, 1140E.

<sup>11)</sup> Caprai, E., et al. Case reports of tropane alkaloid contamination in spinach from Italy and its potential implications for consumer health. Food Control, 2024, 160, 110334.

### (3) シアン化合物

シアン配糖体はキャッサバやアプリコットカーネル等に含まれていることがよく知られているが、サプリメントや小麦粉からの検出事例も報告されていた。シアン配糖体を健康促進目的でサプリメントに配合して販売する事例もあり<sup>12)</sup>、これらの報告事例も同様のケース

か、あるいは何らかの段階でシアン配糖体を含む植物が混入した事例であると推測された。

<sup>12)</sup> ビワの種子を使用した健康茶等に含まれるシアン化合物に関する情報提供一体内で分解して青酸を発生するおそれがあるため過剰な摂取に注意！

[https://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20180614\\_2.html](https://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20180614_2.html)

### (4) ルピンアルカロイド

ルピンアルカロイドの混入事例も多数報告されている。ルピン豆にはルパニンやスパルテインが多く含まれていることが知られており、RASFFには2件報告されていた。その他多数報告されていたのはマトリンやオキシマトリンであった。マトリンやオキシマトリンはマメ科クララ属等の植物に含まれるアルカロイドであり、ルピンアルカロイドの中でもマトリン型アルカロイドに分類される。クララ (*Sophora flavescens*) の根の抽出物にはマトリンやオキシマトリンが多く含まれ、中国等において農薬として用いられることがある。また、マトリンについては中国で農薬登録されている。一方、EUではマトリンやオキシマトリンは承認されておらず、一律基準 (Default MRL) である0.01 mg/kgが適用される。ぶどうやアボカド等からのマトリンやオキシマトリンの検出事例があるが、これらは農薬として使用されたものが一律基準を超過した事例と考えられる。中国産のはちみつからの検出事例も多数報告されているが、中国原産はちみつの一部はマメ科クララ属のアオバナエンジュを蜜源としており、はちみつ中のマトリン型アルカロイドは農薬として使用されたものが混入したのではないとする報告もある<sup>13)</sup>。

<sup>13)</sup> Zhuyang, W., et al.

Comprehensive investigation of the content and the origin of matrine-type alkaloids in Chinese honeys. *Food Chemistry*, 2023, 402, 134254.

#### C.3.1.4 健康被害事例

植物性自然毒を原因とする健康被害事例を C.3 Table 1 にまとめた。

##### (1) グリコアルカロイドによる健康被害

我が国ではグリコアルカロイドによる健康被害事例が多く報告され、その原因は全てジャガイモであった。グリコアルカロイドはジャガイモの皮や芽の部分に多く含まれ、嘔吐や下痢等を引き起こす。小学校における集団食中毒の発生事例が多かった。ジャガイモを調理して摂取する際は、皮が緑化したものは使用しない等の注意が必要である。

##### (2) トロパンアルカロイドによる健康被害

トロパンアルカロイドによる食中毒は、国内外において多数報告されていた。主な原因としてチョウセンアサガオが挙げられ、今回の調査でもチョウセンアサガオが原因とされた事例が確認された。チョウセンアサガオの根はゴボウに、開花前のつぼみはオクラに、種子はゴマに似ているため、国内では誤食の事例が多数報告されている。一方、今回調査した海外の事例の中には、チョウセンアサガオ以外の植物（ハウレンソウ等の薬物野菜、穀物及び豆類）を原因とする健康被害も確認された。これは前項でも述べたように、当該植物にトロパンアルカロイドが含まれていたのではなく、当該植物の近辺に生育していたチョウセンアサガオが収穫時に混入したことが原因と考えられる。

##### (3) グラヤノトキシンによる健康被害

グラヤノトキシンによる健康被害事

例も国内外で複数報告されている。グラヤノトキシンはツツジ科の植物に由来し、蜜蜂がグラヤノトキシンを含む植物から蜜を集めてくることではちみつが汚染される。日本国内で採蜜されたものについては、1966年に長野県で発生した集団食中毒<sup>14)</sup>以外の報告は見当たらなかった。健康被害事例は、トルコやネパール等の海外の特定の地域で採蜜されたはちみつによるものが多く、C.3 Table 1 に示す国内ではちみつによる発生事例は輸入品によるものであった。

<sup>14)</sup> 安江政一, 榊原仁作, 伊奈郊二. ホツツジ *Tripetaleia paniculata* SIEB. Et ZUCC. の成分研究 (第1報) 葉の成分についてその 1. 薬学雑誌, 1971, 91, 138-141.

##### (4) シアン化合物による健康被害

シアン化合物による健康被害事例も報告されている。タケノコ、キャッサバ、アプリコットカーネルによる健康被害は適切な処理を行わずにシアン配糖体が残存したまま摂取したことが原因であった。これらの食品を摂取する際は、十分な加熱等の適切な処理を行うことが重要である。また、サプリメントによる健康被害も報告されており、これはアミグダリン含有サプリメントを治療目的で摂取した事例であった。なお、アミグダリン等のシアン配糖体に疾病の治療効果は認められていない。

##### (5) ピロリジジナルカロイドによる健康被害

ピロリジジナルカロイドは肝毒性を有し、特に肝中心静脈塞栓症を引き起こすことが知られている。コンフリーはピロリジジナルカロイドを含む代表的な植物であり、コンフリーを含むサプリメントの摂取による健康被害事例が報告されている。また、母親がピロリジジナルカロイドを含むハーブティー

を摂取し、乳児に健康被害が生じた事例や、妊娠中の女性がピロリジジンアルカロイドを含むハーブを使用した料理を喫食したことにより胎児に健康被害が生じ、緊急帝王切開後に死亡した事例も報告されている。これらの事例から、ピロリジジンアルカロイドは母乳や胎盤を通して乳児や胎児に健康被害をもたらす可能性があると考えられる。さらに、アフガニスタンではピロリジジンアルカロイドによる集団食中毒が報告されている。健康被害が発生した家庭の小麦粉からは一般家庭よりも高濃度のピロリジジンアルカロイドが検出されており、ピロリジジンアルカロイドを含む雑草が小麦に混入したことが原因と推察されている。

#### (6) その他の健康被害

強心配糖体の一種であるオレアンドリンによる健康被害事例が国内で報告されている。オレアンドリンはキョウチクトウの葉に含まれており、C.3 Table 1 に示す2例はキョウチクトウの葉を自殺目的で摂取した事例であった。また、中国ではゲルセジン型アルカロイドによる集団食中毒が報告されている。ゲルセジン型アルカロイドはゲルセミウム・エレガンス (*Gelsemium elegans*) に含まれる呼吸麻痺等を引き起こす猛毒である。蜂がゲルセミウム・エレガンスを蜜源とすることによりはちみつが汚染されたことが原因と考えられる。

食用との誤認による健康被害が多いものとして、きのこ類がある。ツキヨタケは食用であるヒラタケ、ムキタケ、シイタケに似ており、誤食による健康被害事例が国内を中心に複数報告されている。また、ニセクロハツについても食用きのこ誤認して喫食し、健康被害が発生した事例が報告されている。非常に毒性が強く死亡に至った事例もあり、注意

が必要である。ヒカゲシビレタケは幻覚作用を示すシロシビン等を含み、マジックマッシュルームの一種として麻薬及び向精神薬取締法で所持等が規制されている。C.3 Table 1 の報告事例は、食用のハタケシメジと誤認したことによるものであった。その他、アセタケ属きのこのムスカリンや、テングタケ又はベニテングタケのムッシモール・イボテン酸による健康被害事例が報告されている。国外では、タマゴテングダケのアマトキシシンによる健康被害事例が報告されている。食用きのこの区別が不確かな場合は食べない等の対策を徹底する必要がある。

#### C.3.2 ピロリジジンアルカロイド分析法の開発に向けた予備的検討

本検討では、EU で規制値 2) が設定されている 21 化合物及びこれらと共溶出することが知られている 14 化合物を含めた 40 化合物を検討対象化合物とした (C.3 Table 2)。ピロリジジンアルカロイド分析における課題の一つとして、各化合物の個別定量が困難であることが挙げられる。ピロリジジンアルカロイドは通常、LC-MS/MS で分析されるが、多くの異性体が存在するため、個別定量するためには LC による分離が必要となる。しかし、逆相クロマトグラフィーでは、異性体間の保持時間が極めて近接する場合が多く、各化合物を完全に分離することは難しい。このため、ピロリジジンアルカロイドの分析では、化合物間の十分な分離が得られない場合、合計ピーク面積を用いた定量が一般的に行われる。しかし、実態調査において正確なピロリジジンアルカロイド濃度を求めるためには、各化合物を個別に定量する必要がある。また、各化合物の存在比率は植物種の特異性の手がかりとなり、汚染原因の解明にも活用できる可能性があること

から、個別定量が望ましい。そこで、本研究では、検討対象化合物を個別に定量することを目的として、LC-MS/MS 測定条件を検討した。

### C.3.2.1 移動相条件の検討

移動相の有機溶媒としてメタノール及びアセトニトリルを検討したところ、検討対象化合物の多くでメタノールの方がピーク強度が高くなった。また、添加剤としてギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウムを検討した結果、検討対象化合物のほとんどでギ酸含有ギ酸アンモニウム溶液を用いたときに感度が最大となった。これらの結果から、移動相には 0.1 vol% ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液及び 0.1 vol% ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム・メタノール溶液を用いることとした。

### C.3.2.2 分析カラムの検討

分析カラムとして InertSustain C18 PEEK (2.1×100 mm, 2 µm, ジーエルサイエンス製)、InertSustain AQ-C18 (2.1×100 mm, 1.9 µm, ジーエルサイエンス製)、XBridge BEH C18 (2.1×100mm, 2.5 µm, Waters 製)、Shim-pack Scepter C18-120 (2.1×150 mm, 1.9 µm, 島津製作所製) 及び Luna Omega (2.1×100 mm, 1.6 µm, phenomenex 製) を用いて、各化合物の分離を比較した。その結果、Luna Omega で最も化合物同士の分離が良好であった (C.3 Fig. 1)。EU で規制値が設定されている 21 化合物 (1~21) のうち、①intermedine (7)/lycopsamine (11)、② intermedine N-oxide ( 8 ) /lycopsamine N-oxide ( 12 )、③ senecionine (15) /senecivernine (19) 及び ④ senecionine N-oxide ( 16 ) /senecivernine N-oxide (20) はピークが近接しており、ベースライン分離が困難

であると報告されている<sup>15)</sup>。本検討で確立した条件では、これらの化合物をいずれもベースラインまで完全に分離することができた。一方で、共溶出が報告されている 14 化合物を含めた場合、一部の化合物にピークの重なりが見られた。特に⑤Lycopsamine (11) / Indicine (26) /Rinderine (30)、⑥Intermedine N-oxide (8) /Indicine N-oxide (27)、⑦Retrorsine (13) /Integerrimine N-oxide (34) は完全に保持時間が一致した。本検討では酸性の移動相を用いて検討を行ったが、アルカリ性の移動相を用いた場合、異なる分離を示すことが知られている。このため、次年度は移動相や分析カラム等の測定条件をさらに検討し、各化合物を分離できる条件を模索する予定である。

<sup>15)</sup> EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. EFSA Journal, 2017, 15, e04908.

## 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 毒きのこの毒成分一斉分析法 1 の試験室間共同試験による妥当性確認

#### C.4.1.1 試験に用いた模擬試料

ドクツルタケ (*Amanita virosa*、別名 Destroying Angel) は、わが国のきのこ中毒で最も死亡事例が多いきのこである。ドクツルタケを誤って食べると、比較的長い潜伏期間 (6 時間~24 時間) を経てコレラ様の症状 (嘔吐、腹痛、下痢) が現れる。いったん症状は治まるが、食後 48 時間過ぎから肝機能が悪化しはじめ、重症の場合は 5 日~8 日後に肝不全を発症し、多臓器不全を経て死に至る<sup>6)</sup>、

7)。

ドクツルタケの毒成分はアマニタトキシシンと総称される複数の環状ポリペプチドである。アマニタトキシシンはドクツルタケ以外に、シロタマゴテングタケ (*A. veruna*)、タマゴタケモドキ (*A. subjunquillea*) などのテングタケ属のきのこや、コレラタケ (*Garerina fasciculata*) などのケコガサタケ属のきのこにも含まれており、これらの毒きのこによる中毒事例も報告されている<sup>6), 8)</sup>。

今回、調理済みの中毒残品を想定した模擬試料として、Jansson らの報告<sup>9)</sup>をもとにドクツルタケを含む「きのこシチュー」を作製した。標準添加法による値付けの結果、 $\alpha$ -アマニチンは  $42.3 \pm 6.5$  mg/kg、ファロイジンは  $44.3 \pm 2.8$  mg/kg となった。 $\alpha$ -アマニチンの経口致死量はヒトで 5 mg と推定されていることから、今回のきのこシチューは約 120 g で致死量に達する高濃度のアマニタトキシシンを含む試料である。これを市販の標準試薬の添加により作製した場合 400 万円以上と試算され、現実的ではない。しかし、今回は実際の毒きのこを使用して作製した模擬試料を値付けすることにより、実際の食中毒事例を反映した試験室間共同試験が実施可能となった。

<sup>6)</sup> Garcia, J., Costa, V., Carvalho, A., Baptista, P., Pinho, P., Bastos, M. and Carvalho, F. Food Chem. Toxicol. 86, 41-55 (2015)

<sup>7)</sup> Barbosa, I., Domingues, C. Ramos, F. and Barbosa R. J. Pharm. Biomed. Anal. 232, 115421 (2023)

<sup>8)</sup> 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

#### C.4.1.2 模擬試料の均一性と安定性

模擬試料に含まれる  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの容器間の分散比はそれぞれ

0.37 と 0.91 となり、F 境界値 (4.39) よりも小さく、十分に均一であることが確かめられた。

実施期間前後の定量値の比は、 $\alpha$ -アマニチンが 99.0%、ファロイジンが 105.1% となり安定性が確かめられた。

#### C.4.1.3 有毒植物毒成分の妥当性確認

##### C.4.1.3.1 各機関の定性結果と選択性

11 機関全てが模擬試料に含まれる  $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの 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、 $\alpha$ -アマニチン、ファロイジンのいずれのクロマトグラムにも定量を妨害するピークは検出されなかった。今回の模擬試料は、脂質やたんぱく質に加えきのこ由来の夾雑物質など、複雑なマトリックスを多く含む試料であったが、選択性は良好であった。

##### C.4.1.3.2 データスクリーニングと外れ値検定

参加 11 機関の前処理操作フローは同一であった。しかし、使用した MS/MS のメーカーやスペックが異なり、イオン化特性や測定感度に大きな違いがあると推測された。分析法の開発において使用した Sciex 社の MS/MS の場合、アマニタトキシシン類は ESI(-)の方が S/N がより高かった。そのため、今回参加した機関のうち Sciex 社の MS/MS を使用した 5 機関は ESI(-)で測定を行った。一方で他メーカーの MS/MS を使用した 6 機関については、機関 E の  $\alpha$ -アマニチンを除き、ESI(+ )での分析結果が報告された。これらの機関の MS/MS 測定においては、ESI(+ )の方が ESI(-)よりも測定感度が高かったと推測される。機関 E では標準溶液に含

まれるβ-アマニチンの測定感度がESI(+))において十分ではなく、ESI(-))で測定した方が良好な感度となったため、αとγ-アマニチンとともにESI(-))で測定した(B.4.1表1-1)。

データスクリーニングにおいては、試験溶液の希釈率について外れ値検定を行った上で、0.4-1 mg sample/mLの範囲内の希釈率で測定した9機関のデータを採用することとした。また、Cochran検定により、機関Iのα-アマニチンのデータ、機関FとIのファロイジンのデータがそれぞれ棄却された(C.4表1-2)。

#### C.4.1.3.3 各種パラメーターの評価

回収率、併行精度、室間精度、HorRat値はいずれも農水省のガイドラインに適合していた(C.4表1-2及び1-3)。

回収率はα-アマニチンで102%と良好な結果となったが、ファロイジンは84.7%となった。この理由として、ファロイジンはα-アマニチンより疎水性が高いため、抽出回数1回の本分析法ではファロイジンは十分に回収されず、低い定量値となったことが考えられた。

この仮説を検証するため、模擬試料の1回抽出と2回抽出の定量値を比較した( $n=12$ )。1回抽出のファロイジンの定量値の平均は34.7 mg/kgであったのに対して、2回抽出は36.0 mg/kgとなり、片側t検定で有意差が認められた。ただしその差はわずかであり、抽出回数による影響は限定的と考えられた。

#### C.4.1.3.4 ファロイジンの異性化

試験室間共同試験に参加した機関Hから、TCAを添加した標準溶液を長期保存した結果、ファロイジンのクロマトグラム上に保持時間の小さい別のピークが検出されたとの報告があった。これを検証するため、1 mg/kgの濃度の添加回収のクロマトグラムを確認したところ、フ

アロイジンと同一のSRM条件で、ファロイジン( $t_R=7.2$  min)の前に異性体( $t_R=5.5$  min)と思われるピークが検出された。このピークは用時調製した標準溶液では見られず、TCAを含む溶媒(0.2%TCA含有60%メタノール水溶液)で希釈した5日後にファロイジンの6.3%、50日後にファロイジンの60.9%までのピーク高さとなった。

添加回収試験において、ファロイジンの異性化の影響がどの程度あるかを検証するため、異性体のピークを合算して求めた定量値から回収率を求めた。異性体を含めない場合の回収率が91.9%であったのに対して、異性体を含めた回収率は95.7%となり3.8%上昇した。試験溶液の調製においては、10%のTCA水溶液を加えてホモジナイズする操作があるため、標準溶液に比してより異性化が進行しやすいと推測される。同時に添加回収試験を行ったα-アマニチンの回収率96.5%と同等であったことから、ファロイジンの異性化の影響がα-アマニチンとファロイジンの回収率の差につながったことが示唆された。

#### C.4.1.3.5 内部標準補正について

3機関のデータについて内部標準補正の有無による定量値の比較を行った。バージニアマイシンBをLC-MS/MS測定時の内部標準として用いて補正した定量値は、α-アマニチン、ファロイジンともに内部標準補正なしの結果と比較して大きな差はなく、回収率、併行精度、室間精度、HorRat値はいずれも農水省のガイドラインに適合していた(C.4表1-4及び1-5)。今回の内部標準はLC-MS/MS測定の測定感度の変動を補正する目的で使用したが、システムの違いに由来する保持時間の差を予測する上でも有効な指標となるため、使用が推奨される。

#### C.4.2 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 の単一試験室における妥当性確認

本法は、アセタケ類をはじめとする広い範囲のきのこに含まれるムスカリンと、テングタケ属のきのこに含まれるイボテン酸、ムシモール、プロパルギルグリシン、アシルグリシンを同時に測定する分析法として開発した。先の厚生労働科学研究(21KA1005)において、7種の市販きのこを用いた添加回収試験(添加濃度:1 mg/kg、n=3)の結果について報告した。7種全てのきのこにおいて、対象とした5成分の選択性は良好で、回収率はいずれも50-150%の範囲内であり、相対標準偏差は5%以内となったことから、きのこ中に1 mg/kgの濃度で含まれる毒成分を誤りなく識別することが可能であることを示した。また一部きのこで回収率が低下する主な原因がイオン化抑制であることが明らかとなった。

今回、市販のシイタケを用いて2濃度(添加濃度:1及び10 mg/kg)の添加回収試験を行い、単一試験室における真度(%)、併行精度(RSD<sub>r</sub>,%)及び室内精度(RSD<sub>wr</sub>,%)を求めた(C.4表2-3及び2-4)。1 mg/kgの添加回収試験の結果は、絶対検量線法と内部標準法の両方も、厚労省のガイドラインに適合しており、良好な結果となった。10 mg/kgの添加濃度においては、検量線の範囲に収まるように、試験溶液を10倍希釈して定量を行った。したがって内部標準補正法は実施していない。1 mg/kgで回収率が74.6%と比較的低かったムシモールが、10 mg/kgでは92.2%と改善しており、希釈によるイオン化抑制の回避が認められた。

以上により、本法はアセタケ類などのきのこによるムスカリン中毒や、テングタケ属のきのこによる食中毒の際に適用可能な分析法であることが示唆され

た。今後、分析法1と同様に、実際の毒きのこを含む模擬調理試料を用いて試験室間共同試験を行い、汎用性を検証する予定である。

#### C.4.3 植物性自然毒(きのこ)の鑑別に 係る遺伝子検査法の検討

(研究結果)

##### C.4.3.1 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 ・ゲノムDNA抽出および種の推定

多数の子実体サンプルからゲノム抽出を実施し、概ね高品質なゲノムを回収することに成功したが、サンプルの状態が悪くゲノム収量が少ない、もしくは分解の著しいものが存在した。一例として、C.4図1に4種のテングタケ属ゲノムのアガロースゲル電気泳動図を示した。C.4図1において、分解が著しいシロテングタケおよびタマシロオニタケについてはより状態の良い別個体から再度ゲノム抽出を実施し、種の推定を行った。

高品質なゲノムを抽出できたサンプルについてはITSおよびrpb2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、データベース上の配列と高い相同性(概ね99%以上)を示した24種のテングタケ属について、それぞれの種を推定した(C.4表3)。なお、本研究でサンプルに供した個体の中には、データベース登録配列のいずれの配列とも相同性が低い、もしくは*Amanita sp.*として登録されている配列と相同性が高く、種推定が困難なサンプルが3個体存在したが、それらは不明種として特異性試験に供しないこととした。また*Amanita satotamagotake*(サトタマゴタケ)については長年タマゴタケと同一種とみなされてきた経緯から、タマゴタケで配列登録されているものの、最近の報告(Kodaira et al, 2024, *Mycoscience*)でPhylogroup B(サトタ

マゴタケグループ) に分類された個体由来の配列と相同性が高かったことから、サトタマゴタケと推定した。

#### ・ドクツルタケの種特異的配列の探索と近縁種の推定

NCBI で収集した 444 種テングタケ属の rRNA 遺伝子周辺配列を用いて、BLAST\_TSN によるドクツルタケ特異的な配列の探索を実施した。BLAST\_TSN のスキームとしては、まずドクツルタケの 18S rRNA 遺伝子配列 (695 塩基) の 5' 側から 25 塩基長で 1 塩基ずつの sliding window 方式で計 671 配列を生成する (B.4.3 図 2A)。次に、それらをクエリ配列としてドクツルタケ以外のテングタケ属 443 種に対して BLAST 検索した。BLAST 検索の結果から 443 種に対して相同性が低い配列、すなわちドクツルタケ特異的な配列を抽出した。BLAST 時の E-value の値を  $1e^{-4}$  に設定した結果、671 配列から 33 配列のドクツルタケ特異的配列が抽出された (B.4.3 図 2)。

ドクツルタケと他のテングタケ属のきのこの類縁関係を明らかにするために、NCBI より取得した 444 種テングタケ属および 3 種の外群生物の 18S rRNA 遺伝子周辺配列を用いて系統解析を実施した。多重アライメントは MAFFT の L-INS-i モードを使用した。その後トリミングは実施せずに、ModelTest-NG を使って最尤法で系統樹を作成する際の最適なモデル推定を実施した。その結果、BIC、AIC、AICc のいずれも GTR+I+G4 が最適と推定されたため、上記モデルにて RAxML-NG で系統樹構築を実施した (C.4 図 3)。構築した系統樹によるとドクツルタケに最も近縁な種は *Amanita amerivirosa* (*A. amerivirosa* 和名なし) であることが示唆された。*A. amerivirosa* は元々ドクツルタケと同一

種とみなされてきたが、2021 年に形態学的、または分子系統解析によりドクツルタケから独立する形で新種登録がなされた経緯 (Tulloss RE et al, *Amanitaceae*, 2021) もあり、2 種は非常に近縁と推察される。

#### ・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特異性確認試験

BLAST\_TSN により同定されたドクツルタケ特異的配列から、リアルタイム PCR 法による特異的遺伝子検査法の開発を試みた。食中毒の原因究明には嘔吐物のような DNA が分解されたサンプルも想定されるため、PCR 増幅産物長は約 100 塩基程度の短いものになるように検討した。ITS1 上にプライマーとプローブを設計したが、ドクツルタケにおける PCR 増幅産物長は 89 bp となる。444 種テングタケ属の中でドクツルタケおよび近縁な 14 種の rRNA 遺伝子の塩基配列をマルチプルアライメントした結果を C.4 図 4 に示した。これら近縁種のうち、*A. pallidorosea* (アケボノドクツルタケ) は入手できたので、アケボノドクツルタケを含め、24 種のテングタケ属ゲノムに対して、これらプライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR 法による特異性確認試験を行った。その結果、ドクツルタケのゲノムにのみ、Cq 値 15 ~ 18 で指数関数的な増幅が確認された (C.4 図 5)。なお、先述したアケボノドクツルタケにおいても交差反応性は確認されなかったことから、本研究で開発したリアルタイム PCR 法による遺伝子検査法はドクツルタケに特異的である可能性が示唆された。

#### C.4.3.2 テングタケのゲノムアセンブリ

次にドクツルタケの属する *Amanita* (テングタケ属) に着目した。テングタ

けは食中毒事例が多いものの、そのゲノム情報が公的データベースには十分に収載されていないため、遺伝子検査法などの開発が進んでいない。そこで、国内で採取されたテングタケと推定される個体のゲノム配列の解析を行い、ゲノム情報の取得を行った。

#### ・ITS領域の塩基配列による種推定

テングタケ子実体より抽出したゲノムDNAを用いて、サンガーシーケンスによりITS領域610 bp決定した。この配列についてBLAST検索を行い、データベースと相同性を照合した。本サンプルは学名 *Amanita pantherina* (*A. pantherina*) (Sequence ID: LC832100.1) および *Amanita subglobosa* (*A. subglobosa*) (Sequence ID: PQ855800.1) のITS領域と相同率が100%であった(C.4表4)。すなわちこの2種のきのこはITS領域の相同性は100%であり、この領域のみでは区別できない。一方で、日本国内では和名「テングタケ」は *A. pantherina* と記載されることが多く、厚生労働省リスクプロファイル等でも *A. pantherina* と記載されている。現時点において、日本国内のテングタケがどちらの種を指すか不明だが、以降本サンプルは「テングタケ」とした。

#### ・ロングリードシーケンス

ナノポアシーケンサーのリードは2,398,366リード、さらにdorado correctモードによるポリッシングを経て1,037,519リードに絞られた(C.4表5)。

本研究で検討した各アセンブラに対するコンティグ数およびBUSCO (*fungi\_odb10*, *bacteria\_odb10*)の結果はC.4表6に示す通りで、最も繋がってコンティグ数が少ないのは、55本のPECATだった。次いで、NECAT(90本)、Flye(459本)と続いた。BUSCO値は

アセンブリ間で差が小さく、99.2～99.4%と*fungi*の遺伝子網羅性が高かった。一方で、*bacteria\_odb10*のBUSCO値が一様に97%以上を示していたため、得られたシーケンスリード、および調製したライブラリは他種(細菌類)由来の配列を含んでいると推察された。

#### ・ミトコンドリアゲノムの探索

アセンブリによって得られたコンティグに対して、シーケンスリードをマッピングし、そのマッピングカバレッジが突出して高いコンティグのリードをミトコンドリア由来リードと推定した。ミトコンドリアゲノム由来と考えられるリードは1,328リードであった。また、hybracterによるアセンブリの結果、54,066 bpで環状になったことを確認し、BLAST検索でも他のテングタケ属担子菌のミトコンドリア配列と相同性が高いことがわかった。

#### ・リードのフィルタリング

Flyeで構築したコンティグのBUSCO値から、細菌属由来のゲノムがコンタミネーションしていることが示唆されていた(C.4表6)。さらに、コンティグの一部をNCBI BLASTで類似性検索を行うと、*Rhanella*属細菌と相同性が高いことが判明した。高品質なテングタケゲノムを構築するにあたり、他生物由来のコンタミリードは除かれていることが望ましい。そこで、全ゲノムシーケンスリードからミトコンドリアゲノム由来及び、*Rhanella*属細菌ゲノム(*Rahnella* sp. Y9602, complete genome, Sequence ID: CP002505.1) (Martinez et al, *J Bacteriol*, 2012) 由来リードを除くために、B.4.3図6のスキームに従い、リードのフィルタリングを実施した。細菌属由来リードの除去を実施した結果、テングタケ核ゲノム由来であると考えられるリードが967,282であった(B.4.3図

6)。これらリードから Flye で構築されたコンティグを BUSCO で評価した際、fungi\_odb10 の Complete BUSCO は 99.4%を維持しつつ、bacteria\_odb10 は 97%以上であったのが 5.6%まで減少した (C.4 表 7)。

一方、フィルタリングで除かれた細菌属由来と考えられる 68,909 リードから hybracter で構築したコンティグの Complete BUSCO 値は、fungi\_odb10 が 5.9%、bacteria\_odb10 は 99.2%であったことから、初期アセンブリの bacteria\_odb10 の BUSCO 値が高くなる原因となったリードの大部分が除かれたことが確認された。

#### ・PECAT を用いたコンティグ構築

得られたシーケンズリードから、ミトコンドリアゲノムおよび他種由来のリードを除いたリード群を用い、最も繋がりの良い良好であった PECAT によるアセンブルを行い、その評価結果を C.4 表 7 に示した。コンティグは 20 本に絞られた。併せて BUSCO (fungi\_odb10、bacteria\_odb10、agaricales\_odb10) でテングタケゲノムとしての完全性を評価したところ、Complete BUSCO 値はそれぞれ 99.6%、5.6%、95.4%であり、担子菌類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、これらコンティグ 20 本をドラフトゲノムとした。

また、本研究において構築されたドラフトゲノムと、既報の担子菌類ゲノムを比較した結果、全染色体の両末端まで繋がった Telomere-to-Telomere ゲノムとして報告されたキシメジ属に属するマツタケ (*Tricholoma matsutake*、GenBank No. GCA\_026075535.2、コンティグ数 13、全長 161 Mb) とはゲノム全体の相同性が低かった (C.4 図 7A)。一方で、テングタケと同じ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ゲノム全体的に相同性が高いことがわかった (C.4 図 7B)。

#### ・既知のテングタケ毒性成分について

テングタケの毒性成分は、厚生労働省自然毒リスクプロファイルによると、イボテン酸、ムシモール、スチゾロビン酸、ムスカリン類、アマトキシン類、アリルグリシン、プロパルギルグリシン 150 が挙げられている。中でもアマトキシン類は猛毒で、食品衛生の観点では重要な毒性成分の一つである。アマトキシン類は環状ペプチドであり、前駆体ペプチドから、酵素切断やコアペプチド部分の環状化と修飾などを経て、生合成される (C.4 図 8)。この前駆体ペプチドをコードする遺伝子座が知られていることから、ゲノム配列を基にしたアマトキシン類の有無を推定することができる。コアペプチドのアミノ酸配列が既知のアマトキシン類 5 種類 (B.4.3 表 2) に関して、テングタケドラフトゲノムにおいて相同性検索を実施した。アミノ酸配列をクエリとする tblastn では、該当アミノ酸配列と完全一致する配列は検出されなかった。

#### (考察)

#### ・リアルタイム PCR 法によるドクルツタケ特異的遺伝子検査法の開発

毒きのこ誤食による食中毒発生時の迅速な原因究明の一環として、本研究ではリアルタイム PCR 法によるドクルツタケ特異的遺伝子検査法について検討した。今回開発したドクルツタケ特異的遺伝子検査法は、ドクルツタケを特異的に検出し、国内で採れたその他 24 種のテングタケ属ゲノムには交差反応性は確認されなかった。今回開発した PCR 法の増幅配列長は 89 bp と比較的短いため、嘔吐物等からドク

ルツタケを誤食したことを確認する際にも有用な方法論と考えられる。また今回の検討では、一般的にきのこの種の遺伝子鑑別に利用される rRNA 遺伝子配列周辺の可変領域 ITS を標的として、種特異的核酸配列探索ツール BLAST\_TSN を活用することで、ドクツルタケを特異的に検出できるプライマー・プローブセットを見出すことできた。ドクツルタケにはアケボノドクツルタケなどの近縁種が存在しており、C.4 図 4 にも示すように rRNA 遺伝子周辺の配列としても非常に相同性が高いが、ドクツルタケを特異的に検出することに成功した。したがって、この BLAST\_TSN を活用することで、近縁種のある他の毒きのこについても、特異的に判別できる遺伝子検査法の開発が期待される。

本研究で開発したリアルタイム PCR 法による遺伝子検査法はドクツルタケ特異的鑑別手法として新規性が高いと考えられる。一方で、近年、急速にテングタケ属を対象としたスクリーニング検知法に関する論文が見られる。これまで報告されたテングタケ属毒きのこのスクリーニング検査法（リアルタイム PCR や等温反応による）に関する論文について調査し、C.4 表 8 に一覧として示した。2020 年以前の論文は定性 PCR による方法論が多かったが、近年報告される方法はリアルタイム PCR 法による特異性の高い TaqMan 法によるものが増えている傾向であった。また ITS 領域を標的とした方法以外に、アマトキシン類の前駆体ペプチドをコードする遺伝子座に保存されている塩基配列を標的とした方法論も見られた。こうしたスクリーニング検査法は、食中毒原因の特定には向かないものの、猛毒なアマトキシン類を含むきのこの有無を網羅的かつ迅速に判定する際には有用であると考えられる。今回の検討で用いた BLAST\_TSN は、こうした複数の生物種にのみ共通する核酸

配列の探索にも有効であることから (Sugino et al, 2025, *ACS Agric. Sci. Technol.*)、テングタケ属毒きのこのスクリーニング検査法に適した PCR 法の開発にも役立つと期待される。引き続き、国内での食中毒事例を調査しつつ、各検査機関の要望に即した毒きのこ検出法の開発を進めていく。

#### ・国内テングタケ名の妥当性について

和名テングタケは一般的に学名 *A. pantherina* (Sequence ID: LC832100.1) を指すことが多い。しかし、*A. subglobosa* (Sequence ID: PQ855800.1) も *A. pantherina* と ITS 配列部分の相同性が 100%であることを踏まえると、我が国で採取されるテングタケが *A. pantherina* 及び *A. subglobosa* のどちらであるのか厳密には判別できていないと考えられる。rRNA 遺伝子配列周辺以外の他配列のシーケンスを比較することで、両者を判別する方法を確立し、種推定の確度を向上することが必要と考えられる。今回のゲノム解析では、両者の可能性を想定しつつ「テングタケ」と称してドラフトゲノムの構築を試みたが、こうした解析結果が *A. pantherina* と *A. subglobosa* の遺伝子鑑別に役立つと期待される。

#### ・他生物由来ゲノムリード除去について

今回用いたテングタケ子実体のサンプルは自然環境由来なため、サンプルに付着した土に細菌等がコンタミネーションする可能性もあり、その場合は全ゲノムシーケンスデータ中にも細菌由来リードが含まれることも考えられる。除去リードだけを用いてアセンブリされた配列は BUSCO 値 (bacteria\_odb10: 99.2%) で、フィルタリング前後のテングタケのゲノムアセンブリの BUSCO (Fungi\_odb10: 99.4%→99.4%、bacteria\_odb10: 97.6%→5.6%) であったことから (B.4.3 図 6)、本フィルタリングで適切に細菌由来リード

が除かれていると考えられた。今後も細菌由来のリードのコンタミネーションを除く際に、BUSCO を用いてコンタミネーション種を推定することは有効な手段と考えられる。

#### ・テングタケのドラフトゲノムについて

これまで近縁種でゲノムが GenBank に公開されているのはベニテングタケのコンティグ数 1,011 本、BUSCO 値 98.8% (fungi\_odb10) のアセンブリがあるが、世界的に見てもまだ高品質のゲノムの報告は少ない。本研究ではコンティグ数が 20 本、BUSCO 値 99.6% (fungi\_odb10) と他の報告と比べ、高品質でかつ繋がったドラフトゲノムが構築できたと考えられる。

#### ・アマトキシン類など毒性関連遺伝子について

アマトキシン類にはアマトキシン、ファロトキシン類にはファロイジン等が挙げられるが、今回解析に供したテングタケのドラフトゲノムからは上記毒性ペプチド配列と一致する配列は見つからなかった。過去にテングタケからアマトキシンを検出した報告はあるが (Faulstich et al, 1976, *FEBS letters*)、テングタケの誤同定やアマトキシン誤検出、またはテングタケ個体の多様性による可能性も考えられる。本研究結果を基に、今後はテングタケ別個体において、ゲノム解析と化学分析の結果を組み合わせ考察し、テングタケのアマトキシン類産生について検証する必要があるだろう。

### 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

#### (研究結果)

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、更新作業の優先課題とされた、

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、現行版で写真が未掲載のものについての入手・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。現在、必要な写真と資料を入手しつつ更新作業を進めている最中である。

#### (考察)

「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。

## 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、宮城県においては引き続き多く混獲されており、神奈川県においては昨年度から大幅に減少していた。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、海域によりそれらにナシフグやシマフグが混じっていた。サバフグ属魚類においても、トラフグ属魚類で開発されたものと同様の種・雑種判別用アッセイの開発が必要である。

トラフグの皮は可食部位であるが、他の雑種、特に皮が非可食部位のフグと交雑すると、顕性遺伝により雑種の皮は有毒部位となる。これまでの知見通りに、分析した交雑種の有毒部位は、片親が有毒部位である場合には有毒であった。しかし、例外も一例だけ見られた。それは、北海道で採取

されたトラフグとマフグの交雑種の精巢において 10 MU/g を超える毒性が認められたことである。その他地域で採取されたトラフグとマフグの交雑種の精巢からは毒性がほとんど検出されなかった。地域の影響を受けている可能性も考えられるが、検体数が少ないため、正しく判断するのは難しい。現状のデータをそのまま用いれば、トラフグとマフグの交雑種の精巢についてはその安全性については検討が必要である。

しらす加工品に混入するフグ稚魚についても HILIC-MS/MS にて TTX を分析し、その個体が持つ毒量を算出した。シロサバフグで TTX が検出された 2 個体についてはさらなる遺伝子解析が必要であることが判明した。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、シマフグは検査した 12 個体全てが陽性であり、そのうちの 3 個体が 10 MU/g を超えていた。ただし、個体の持つ毒量とすると、最大でも 0.4 MU であり、非常に含量は少ない。成魚とは異なり、稚魚であるため、魚体重が非常に小さいことや保有している毒量も少なく、フグ稚魚の個体全てを摂食したとしても、リスクは低いと思われるが、その取扱いについては今後の検討が必要である。

## 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 6 年度の研究では、M-toxin 類の単離技術を確立した。また国内沿岸で毒化した二枚貝における M-toxin 類を探索し、貝種による蓄積の差などを確認した。今後、当事業で単離もしくは合成した M-toxin 類を用いて毒性評価を行うことで、機器分析法で標準品が必要な化合物を選定することが出来る。M-toxin 類の合成においては、M2

から M4 への酸化反応に関して、M2 が水などのプロトン性溶媒にしか溶けないため、酸化反応条件が限られている。そのため、中間体の官能基が保護された STX 骨格から直接 M4 への変換を検討することで、より効率よく M4 を合成できると考える。

細胞毒性試験による M-toxin 類の毒性評価を行うため、TTX 等成分を用いた試験条件の検討を行い、最適化を行った。合成 M2 標準品について、検討した試験条件で毒性評価を行い、他の PST s 成分と同様に、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル阻害作用による毒性があることを確認した。今後、当事業で単離及び合成した M-toxin 類を用いて毒性評価を行う予定である。

北海道噴火湾のホタテガイの中腸腺に含まれる麻痺性貝毒と TTX の季節変動を調べた結果、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 産生生物が存在ことを示唆するデータを得た。

TTX 蓄積に関与するホタテガイ餌生物を探索するために、新たに設計した PNA は、塩基置換数が 1 以下の二枚貝の rDNA の PCR 増幅抑制に有用であり、最適な PCR 条件はその添加濃度が 1.0 μM、アニーリング温度が 62.5°C であると考えられた。今後は、本 PNA ならびにこれを用いた PCR 最適条件のもとで、メタバーコーディングを行うことにより、ホタテガイの餌生物が網羅的に解明され、その中から TTX による毒化原因生物が解明されることが望まれる。

## 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、植物性自然毒に関する諸外国の規制、注意喚起事例、検出事例及び国内外の健康被害事例を調査し、整理した。我が国とは対照的に、アメリカ、EU、イギリス、カナダおよびオーストラリア・ニュージーランドでは一部の植物性自然毒

について食品に含まれる規制値が定められているか、混入そのものが禁止されている。特にピロリジジナルカロイドに関しては、EUにおいて近年規制値が設定され、RASFF上で規制値を超過して検出された事例が多数報告されていた。報告事例のほとんどがハーブ類であった。EU、イギリス及び香港ではピロリジジナルカロイドの含有実態調査が行われ、その結果をもとに注意喚起がなされている。FDAも自然毒に関するハンドブックにおいてピロリジジナルカロイドの毒性やばく露源等を紹介している。また、諸外国ではピロリジジナルカロイドを含む食品の摂取による健康被害事例が複数報告されており、死亡者も発生している。以上の結果を踏まえると、ピロリジジナルカロイドは特に注意が必要な自然毒と考えられ、我が国でのリスク管理の可否を検討するうえで健康被害が懸念されるのか確認が必要である。しかし我が国では主なばく露源の一つであるハーブ類等に含まれるピロリジジナルカロイドの含有量が十分把握されていない。そのため、今後、国内流通製品の汚染実態を調査する必要があると考えられた。

#### 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

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として開発した2つの分析法について妥当性確認を実施した。

毒きのこの毒成分一斉分析法1は、中毒事例や死亡事例が多い5きのこ群（ツキヨタケ、ドクツルタケ、カエントケ、カキシメジ、ニセクロハツ）の9成分を対象とする分析法である。複雑なマトリックスを多く含む試料として「きのこのシチュー」を調製し、これに実際の毒きのこであるドクツルタケを加えることで、食中毒事例の残品を想定した模擬試料を作製した。標準

添加法による値付けを行った上で参加11機関に配布し、試料に含まれる毒成分の同定と定量を行った。いずれの機関も模擬試料に含まれる $\alpha$ -アマニチンとファロイジンの2種類の毒成分を正しく同定することができた。分析法の妥当性確認を行った結果、 $\alpha$ -アマニチンとファロイジンともに農水省のガイドラインに適合していた。脂質やたんぱく質に加え、きのこ由来の夾雑物質など、複雑なマトリックスを多く含む食品を用いて試験室間共同試験により分析法の妥当性が確認されたことから、本法の汎用性が示された。

毒きのこの毒成分一斉分析法2は、アセタケ類をはじめとする広い範囲のきのこに含まれるムスカリンと、テングタケ属のきのこに含まれるイボテン酸、ムシモール、プロパルギルグリシン、アシルグリシンを同時に測定する分析法である。シイタケを用いて1 mg/kgと10 mg/kgの添加回収試験を行い、単一試験室で妥当性確認を行った結果、分析対象の5成分全てが厚労省のガイドラインに適合していた。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。

きのこによる食中毒の中でも国内致死率の高いドクルツタケに注目し、BLASTプログラム（BLAST\_TSN）を応用し、リアルタイムPCR法によるドクルツタケ特異的遺伝子検査法のプライマー及びプローブをデザインした。同プライマー・プローブを用いて、テングタケ属内のきのこにおける交差反応性を確認したところ、ドクルツタケのみで検出されたことから、開発したリアルタイムPCR法の特異性は良好で、各自治体の食中毒原因究明のための利用に期待される。

また、国内食中毒件数の多いテングタケのゲノム情報を取得するため、*de novo* アセンブリにより高品質なテングタケドラフトゲノムを構築した。当該ドラフトゲ

ノムからはアマトキシン類のコアペプチドをコードする塩基配列は見つからなかった。今後、遺伝子アノテーション等を付け、公開することを目指すと共に、テングタケを検出するための遺伝子検査法の開発を行う予定である。

#### 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

きのこ及び高等植物に関する「自然毒のリスクプロファイル」を進めている。今後動物性自然毒のリスクプロファイルの見直しも行い、更新作業の完了を目指す。

#### E. 研究危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yasuyuki Hashiguchi, Teppei Mishina, Hirohiko Takeshima, Kouji Nakayama, Hideaki Tanoue, Naohiko Takeshita, Hiroshi Takahashi. Draft genome of akame (*Lates japonicus*) reveals possible genetic mechanisms for long-term persistence and adaptive evolution with low genetic diversity. *Genome Biol. Evol.* 2024. evae174. DOI: 10.1093/gbe/evae174.

2) Akane Matsumoto, Muneo Kobayashi, Hiroshi Takahashi, Masakazu Kondo, Shinya Yasumoto. The susceptibility of larvae and juvenile koi carp to carp edema virus. *Fish Pathol.* 2024. 59: 9-16.

3) 高橋 洋. 2024. 解説：雑種フグの危険性、監修：「ふぐ処理者」のためのフグ図鑑. 柴田書店（編）, pp. 102-105, 116-153. 最新ふぐ調理大全. 株式会社柴田書店, 東京.

4) 沼野 聡、渡邊龍一、小澤眞由、内田肇、松嶋良次、鈴木敏之、ホタテガイ中の麻痺性貝毒およびテトロドトキシンを対

象とした液体クロマトグラフィータンデム型質量分析法の妥当性評価、*食品衛生学雑誌* Vol.65、No.5、129-135

##### 2. 学会発表

1) 2024 年度日本魚類学会年会、2024 年 9 月 8 日（日）、福岡工業大学、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、講演者：高橋 洋・熊谷英紀・沖村未和子・永野 惇・武藤望生・柿岡 諒

2) 13th International Symposium on Toxic Microorganisms “ Approaches for risk analysis and food safety”、2024 年 9 月 17 日（火）、星稜会館、演題：TTX accumulation in hybrid pufferfish caught off the coast of Japan、講演者：Ryohei Tatsuno, Yumi Miyata, Hiroyuki Yoshikawa, Yasuko Ino, Tsubasa Fukuda, Manabu Furushita, Hiroshi Takahashi

3) 第 120 回日本食品衛生学会学術講演会、2024 年 11 月 8 日（金）、愛知県（中部大学春日井キャンパス）、演題：フグおよび雑種フグの卵巣に含まれるテトロドトキシンおよびその類縁体の組成と毒力の比較解析、講演者：渡邊龍一・沼野 聡・糸田将太・辰野竜平・小澤眞由・内田 肇・松嶋良次・山下まり・高橋 洋・鈴木敏之

4) 第 61 回全国衛生化学技術協議会年会、2024 年 11 月 22 日（金）、大阪府（フェニーチェ堺）、演題：山形県沖雑種フグの両親種判別および部位別テトロドトキシン含有量、講演者：太田康介・真田拓生・高橋洋・沼野 聡・長岡由香

5) International Conference on Food Safety and 39th KoSFoS Annual Meeting、2024 年 11 月 22 日（金）、Haevichi Hotel & Resort Jeju（韓国）、演題：Recent distributional shifts and natural hybridization in pufferfish (*Takifugu* spp.) in Japan、講演者：Hiroshi Takahashi（招待講演）

6) 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（2024、

仙台)、麻痺性貝毒の機器分析法導入に向けた妥当性評価試験および代謝物 (M-toxins) 研究について、沼野 聡、渡邊龍一、小澤眞由、内田肇、松嶋良次、鈴木敏之、

7) 第 61 回全国衛生化学技術協議会年会 (2024、大阪)、愛知県産アサリにおける M-toxins の蓄積時期と PSTs 成分との関連性、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

8) 第 120 回日本食品衛生学会 学術講演会 (2024、愛知)、麻痺性貝毒ゴニオトキシン類の代謝物 (M-toxins) に関する検討、沼野 聡、渡邊龍一、内田 肇、小澤眞由、松嶋良次、鈴木敏之

9) 第 120 回日本食品衛生学会 学術講演会 (2024、愛知)、LC-MS/MS を用いた麻痺性貝毒検査法の妥当性確認、沼野 聡、渡邊龍一、内田 肇、小澤眞由、松嶋良次、鈴木敏之

10) 令和 7 年度 日本水産学会 春季大会 (2025、神奈川)、ヒオウギガイとアカザラガイにおける麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin 類) の蓄積、沼野 聡、渡邊龍一、内田 肇、小澤眞由、松嶋良次、鈴木敏之

11) 『第 40 回有機合成化学セミナー』、P-64、新潟、2024 年 9 月、「11 位にアラルキル基を有するサキシトキシン誘導体の合成と Na チャネル阻害活性評価」、石塚颯、高柳 優夏、小林 巧、吉尾 柊太郎、千葉 修、前野 華子、濡木 絢斗、広川 貴次、山下 まり、此木 敬一、長澤 和夫

12) Soga, K., Yoshiba, S., Narushima, K., Shibata, N., Kondo, K. Genome analysis of toxic mushrooms, *Pleurocybella porrigens*, using both short- and long-read sequencing technologies.、IUMS2024、Florence、Italy、2024 年 10 月 23-25 日

13) 第 47 回日本分子生物学会年会、福岡、2024 年 11 月 27-29 日、生物種特異的遺伝子配列探索ツール BLAST\_TSN の開

発、成島純平、杉野御祐、曾我慶介、吉場聡子、柴田識人。

14) 第 61 回全国衛生化学技術協議会年会、堺市、2024 年 11 月、有毒植物の模擬調理試料を用いた試験室間共同試験 (アトロピン、スコポラミン)、竹内浩、南谷臣昭、谷口賢、有沢拓也、堀井裕子、中山恵理子、土屋小百合、林克弘、木村亜莉沙、竹田正美、三野真輝、海野明広、茅原田一、池谷実穂、宮城島利英、鈴木敏之、登田美桜、遠藤利加

### 3. 行政関係者向け説明会

1) 令和 6 年度食品安全行政講習会、2024 年 6 月 12 日 (水)、三田共用会議所講堂、合計約 200 名、厚生労働省、「気候変動による雑種フグの増加とその対策—気候変動下でふぐ食の安全・安心をどのように確保するのか?—」という演題で講演した。講演者：高橋 洋

2) 令和 6 年度トラフグ全国協議会、2024 年度 12 月 12 日 (木)、ホテルチュエリッヒ別館、約 30 名、水産研究・教育機構水産資源研究所、「東京湾におけるトラフグとマフグの交雑現象について」という演題で講演した。講演者：高橋 洋

3) 令和 6 年度第 3 回三重県食品衛生監視員研修会、2025 年 1 月 17 日 (金)、三重県勤労者福祉会館 5 階第 2 教室、合計約 50 名、三重県医療保健部、「気候変動による雑種フグの増加とその対策 (伊勢湾近海の分布状況) について」という演題で講演する予定。講演者：高橋 洋

4) 2024 年 9 月、地方衛生研究所東海・北陸ブロック理化学部門専門家会議、岐阜市、アマニタトキシンの化学と毒性、南谷臣昭

5) 地方衛生研究所北海道・東北・新潟ブロック専門家会議、山形市、2024 年 10 月、

汎用性の高い植物性自然毒の分析法の開発、南谷臣昭

6) 令和6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、四日市市、2025年2月、食中毒残品を想定した模擬調理試料中のアマニタトキシン類の定性・定量、竹内浩、南谷臣昭、遠藤利加

**G. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）**

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

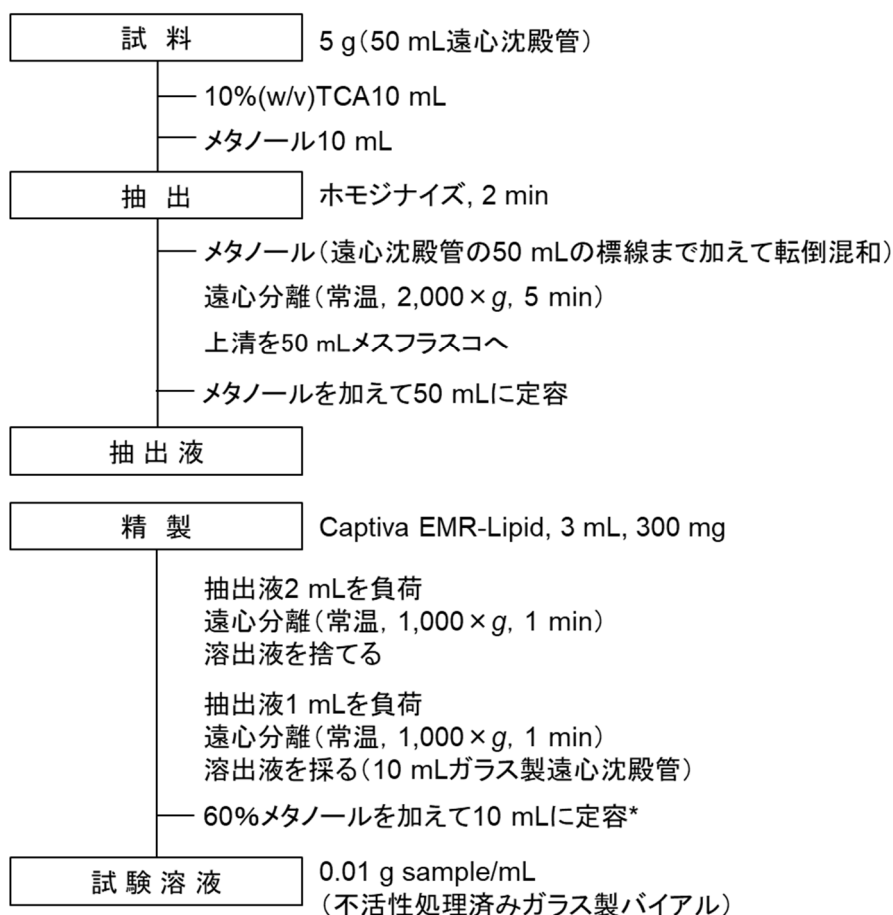
表 1-1 試験室間共同試験参加 11 機関の LC-MS/MS 測定条件

Laboratory		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
LC	Manufacturer	Shimadzu	Shimadzu	Sciex	Waters	Waters	Waters	Waters	Agilent	Shimadzu	Sciex	Sciex
	Instrument	LC20AD	LC-40D XR	Exion LC 2.0+	ACQUITY UPLC H-Class	ACQUITY UPLC H-Class	ACQUITY UPLC H-Class	ACQUITY UPLC I-Class Plus	1260 Infinity II	LC20AD	Exion LC AD	Exion LC AD
MS/MS	Manufacturer	Sciex	Shimadzu	Sciex	Waters	Waters	Waters	Waters	Agilent	Sciex	Sciex	Sciex
	Instrument	API4000	8045	QTRAP4500	Xevo TQ-S micro	Xevo TQ-S micro	Xevo TQ-XS	Xevo TQ-S micro	6470 LC/MS	4000Q TRAP	Triple Quad 5500+	Triple Quad 5500+
Column		Xbridge Shield RP18 (Waters)										
		2.1×150 mm, 3.5 μm										
Mobile phase	Solvent A	0.05% formic acid										
	Solvent B	Methanol										
Gradient method	% of solvent B	10%(0 min) → 100%(10 min, 2 min hold) → 10%(12.1 min) → 10%(20 min)										
Flow rate (mL/min)		0.2										
Column temperature (°C)		40										
Injection volume (μL)		5				2		5				
Dilution factor (g sample/mL)		0.5	1	0.5	0.5	0.4 *	0.4	2	10	1	1	0.5
Electrospray ionization (+/-)		-	+	-	+	-/+ **	+	+	+	-	-	-
Precursor ion (m/z)	α-Amanitin	917.4	919.5	917.3	919.6	917.3	920.0	919.6	919.4	917.3	917.3	917.3
	Phalloidin	787.4	789.4	787.3	789.3	789.3	789.7	789.3	789.3	787.3	787.3	787.3
Quantifier ion (m/z)	α-Amanitin	899.3	86.1	899.4	86.2	205.0	85.9	86.2	86.1	899.4	899.4	899.4
	Phalloidin	743.3	130.1	743.3	86.2	86.2	85.9	86.2	789.3	743.4	743.4	743.4

\* A value reflecting the reduction in injection volume

\*\* -: α-Amanitin, +: Phalloidin

B.4.1 Scheme 1



\* 内部標準を入れる場合は10 ng/mLの内部標準溶液をHPLCのオートサンプラーで5 μL共注入  
(共注入の機能がないHPLCの場合は定容前に100 ng/mLの内部標準溶液を1 mL添加)

**Scheme 1 毒きのこの毒成分一斉分析法 1 前処理操作フロー**

B.4.1.図 1

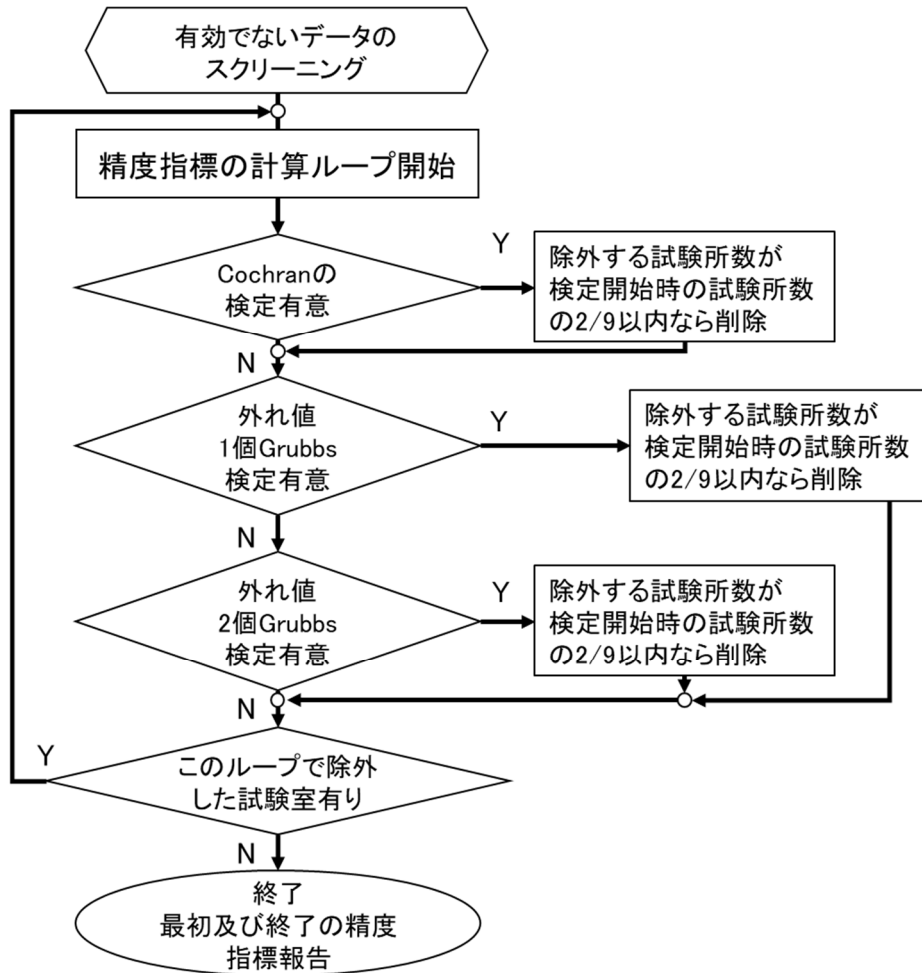


図 1 試験室間共同試験のデータのスクリーニング及び検定のフローチャート

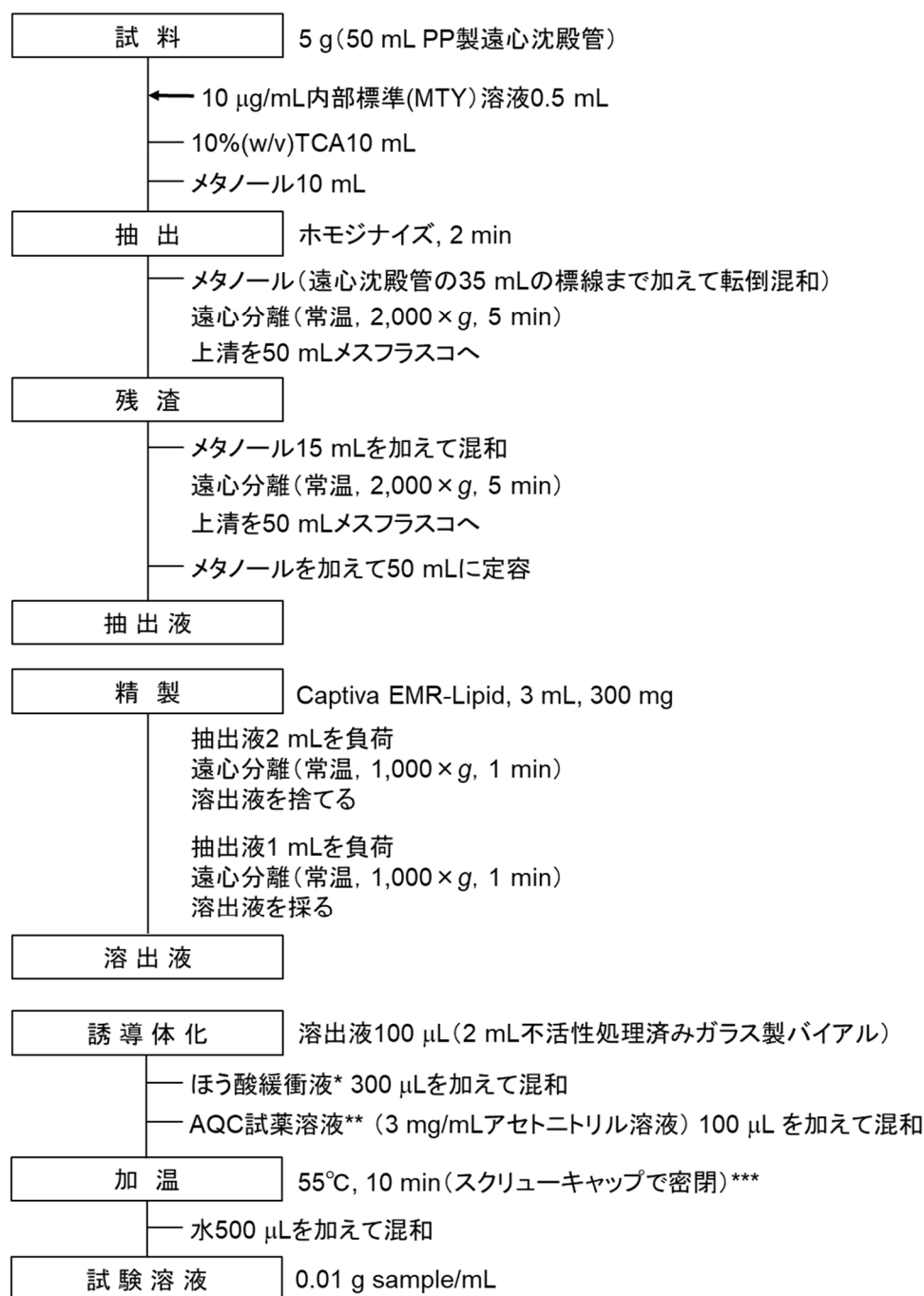
B.4.2 表 2-1

Column		Luna Omega Polar C18 (2.1×150 mm, 1.6 μm) (Phenomenex)
Mobile phase	Solvent A	0.1% Formic acid
	Solvent B	0.1% Formic acid in acetonitrile
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
Column temperature (°C)		35
Injection volume (μL)		5
Parameter \ Porarity		ESI(+)
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

B.4.2 表 2-2

表 2-2 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 の SRM トランジション							
No.	Compound name	RT (min)	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	Muscarin	2.2	174	57	51	31	6
			174	43	51	49	10
2	Ibotenic acid	3.4	329	171	90	30	10
			329	116	90	70	10
3	Muscimol	4.1	285	171	90	30	10
			285	116	90	70	10
4	Propargylglycine	4.9	284	171	90	30	10
			284	116	90	70	10
5	Allylglycine	5.8	286	171	90	30	10
			286	116	90	70	10
IS	MTY (Internal standard)	9.2	366.1	171	90	30	10
			366.1	116	90	70	10

## B.4.2 Scheme 2



\* 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

Scheme 2 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 前処理操作フロー

表1. NCBIより収集したテングタケ属および近縁種のITS配列一覧

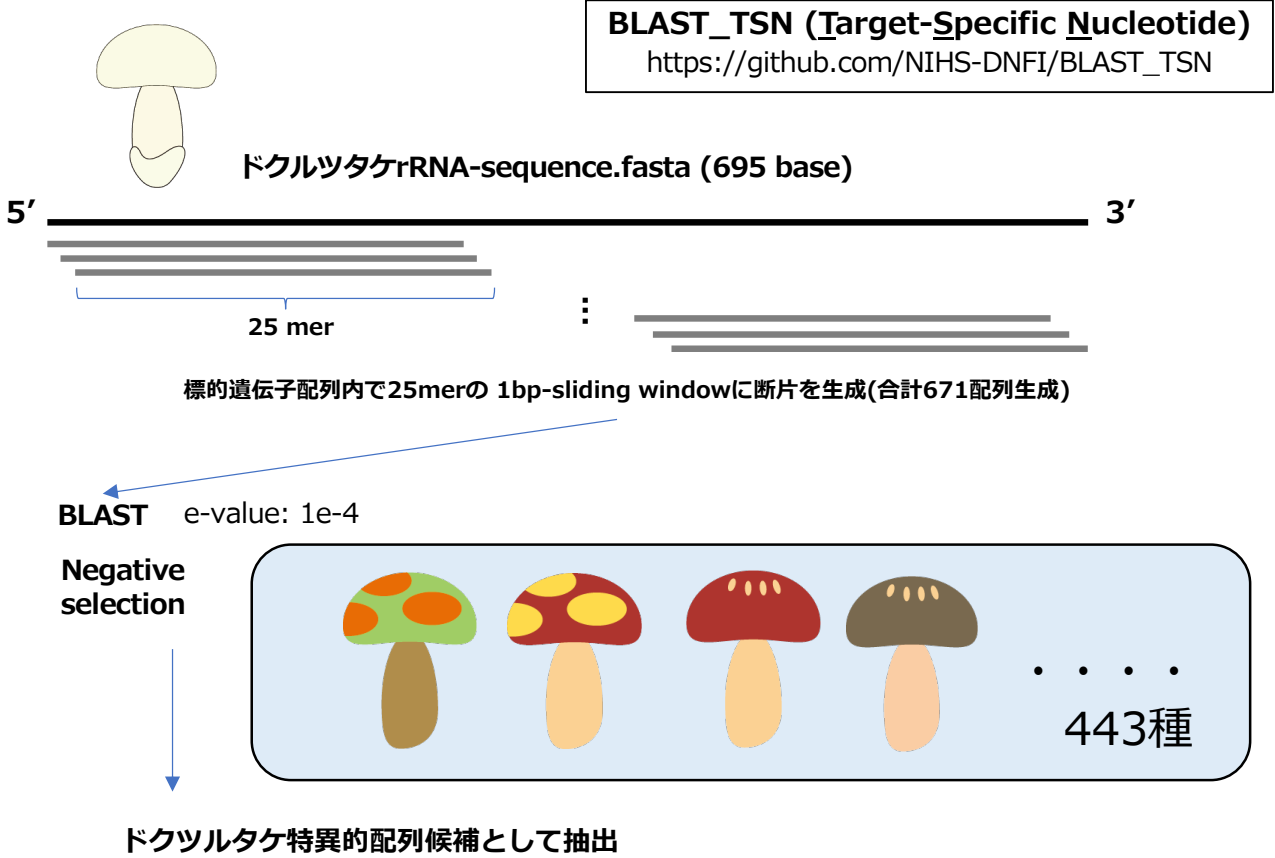
Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.	Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.	Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.
<i>Amanita abrupta</i>	78360	AB015685	<i>Amanita changtuna</i>	2303082	MH508299	<i>Amanita fulginea</i>	67708	KJ466377
<i>Amanita abscondita</i>	2950456	ON705265	<i>Amanita chepangiana</i>	67699	KU714569	<i>Amanita fulgineodisca</i>	699466	FJ890027
<i>Amanita ahmadii</i>	1986131	MF070490	<i>Amanita chiui</i>	2303083	OR058505	<i>Amanita fulgineoides</i>	580329	JX998024
<i>Amanita albidostipes</i>	2303070	MH508501	<i>Amanita chrysolema</i>	3029462	EU071911	<i>Amanita fulva</i>	67709	MK580751
<i>Amanita albifragilis</i>	3039890	OQ780692	<i>Amanita chufornis</i>	2730955	MT395378	<i>Amanita fulvisquamata</i>	3039892	OQ780690
<i>Amanita albocreata</i>	1812970	KU248128	<i>Amanita cinctipes</i>	1622100	OR354937	<i>Amanita fulvoalba</i>	2479931	PP102313
<i>Amanita alboflavescens</i>	576575	KM052555	<i>Amanita cinereocoma</i>	1004477	MK580797	<i>Amanita fulvogrisea</i>	3068476	OR420078
<i>Amanita albogriseascens</i>	2610870	MN490654	<i>Amanita cinereopannosa</i>	596273	MH508306	<i>Amanita fulvovoides</i>	2610874	MT980918
<i>Amanita albolimbatata</i>	2779467	MT966937	<i>Amanita cinerocradecata</i>	2303084	MH508307	<i>Amanita fulvopulverulenta</i>	2733429	MT446251
<i>Amanita alboradicata</i>	2806914	MW016760	<i>Amanita cingulata</i>	2038155	MF952721	<i>Amanita fulvopyramidalis</i>	2803005	MT878221
<i>Amanita alboverrucosa</i>	226593	AY194973	<i>Amanita cinis</i>	2983844	MF489725	<i>Amanita fuscoflava</i>	2303094	MH508372
<i>Amanita alliodora</i>	1906100	KX185611	<i>Amanita cinnamomea</i>	2019495	MF461576	<i>Amanita fuscosquamata</i>	226594	AY194974
<i>Amanita alpinicola</i>	1804615	KR152655	<i>Amanita cistetorum</i>	2014971	KX834236	<i>Amanita garabitoana</i>	1262676	JX844710
<i>Amanita alseides</i>	2611043	OQ440800	<i>Amanita citrina</i>	67700	KY587527	<i>Amanita gardneri</i>	1982021	KU057387
<i>Amanita altipes</i>	262234	MH508254	<i>Amanita citrinoannulata</i>	2303085	OQ780697	<i>Amanita gemmata</i>	67710	KY596001
<i>Amanita amerivirosa</i>	1906117	PP977127	<i>Amanita citrinoinduciata</i>	2303086	MH508320	<i>Amanita gilbertii</i>	235528	MT594493
<i>Amanita aminoaliphatica</i>	2035819	KY606981	<i>Amanita clarisquamata</i>	67702	MK388161	<i>Amanita gioiosa</i>	2268035	MH603599
<i>Amanita annulata</i>	2870554	MZ005573	<i>Amanita claristriata</i>	3039891	OQ780688	<i>Amanita glareata</i>	1972505	MT462515
<i>Amanita annulatovaginata</i>	353749	MZ345324	<i>Amanita codinae</i>	1004479	MZ493179	<i>Amanita goossensfontanae</i>	2733442	MT446263
<i>Amanita aporema</i>	1971393	KU714575	<i>Amanita compacta</i>	2820045	MW775275	<i>Amanita grandis</i>	683160	GQ925397
<i>Amanita aprica</i>	1427689	KF561973	<i>Amanita concentrica</i>	188874	KU904816	<i>Amanita griseoloides</i>	2820041	MW192459
<i>Amanita arctica</i>	2014970	ON059325	<i>Amanita congolensis</i>	1004518	MK327255	<i>Amanita griseoacerulea</i>	2954326	ON994667
<i>Amanita arenaria</i>	676151	GQ925388	<i>Amanita conicoverrucosa</i>	226592	AY194972	<i>Amanita griseofarinosa</i>	223911	MH508374
<i>Amanita arenarioides</i>	2820043	MW775309	<i>Amanita constricta</i>	225430	MK580747	<i>Amanita griseofolia</i>	576577	MW192459
<i>Amanita arenicola</i>	874262	KU985210	<i>Amanita coryli</i>	2610873	OM273377	<i>Amanita griseofusca</i>	2301203	MH241057
<i>Amanita areolata</i>	267472	AB167727	<i>Amanita craspedodermata</i>	1291138	KC155382	<i>Amanita griseopantherina</i>	262246	OR766046
<i>Amanita argentea</i>	2610871	ON922911	<i>Amanita cresulata</i>	1004481	MK167208	<i>Amanita griseoturcosa</i>	267473	AB167728
<i>Amanita arkansana</i>	1262670	OM987376	<i>Amanita cretaeoverruca</i>	2972978	OP235485	<i>Amanita griseoumbonata</i>	2303095	MH508389
<i>Amanita armillariiformis</i>	2970140	HQ625012	<i>Amanita crocea</i>	262261	MF278767	<i>Amanita griseoverrucosa</i>	262262	FJ441044
<i>Amanita atrocheae</i>	235524	MG926558	<i>Amanita curtipes</i>	258490	PP680674	<i>Amanita groenlandica</i>	2014973	KX834241
<i>Amanita aspericeps</i>	2303071	MH508255	<i>Amanita cyanochlorinosma</i>	2479930	MK064187	<i>Amanita guyanensis</i>	2479932	MK064193
<i>Amanita asteropus</i>	1968644	KY274813	<i>Amanita cylindrispora</i>	235527	MT356997	<i>Amanita gymnopus</i>	1621049	MH508393
<i>Amanita atkinsoniana</i>	1004473	MW899480	<i>Amanita daucipes</i>	1004482	OP743556	<i>Amanita hamadae</i>	2303096	MH508395
<i>Amanita atrobrunnea</i>	1824567	KY747455	<i>Amanita decipiens</i>	2811194	MW589095	<i>Amanita harkoneniana</i>	2591481	MK570923
<i>Amanita atrofusca</i>	262241	AY436446	<i>Amanita detersa</i>	2303087	MH508328	<i>Amanita heishidingensis</i>	1415364	KC429051
<i>Amanita augusta</i>	1236747	JX515564	<i>Amanita diemii</i>	1965122	KY462705	<i>Amanita hemibapha</i>	67743	FJ441038
<i>Amanita aureofloccosa</i>	2607670	ON695871	<i>Amanita digitosa</i>	3082948	OR725117	<i>Amanita herculis</i>	3068928	OR501895
<i>Amanita australis</i>	700565	GU222314	<i>Amanita djarilmari</i>	1982020	KU057382	<i>Amanita hesleri</i>	1004502	MT036486
<i>Amanita austroviridis</i>	1229395	JX398324	<i>Amanita drumingensis</i>	2801441	OP028514	<i>Amanita heterochroma</i>	3141181	PP696889
<i>Amanita avellaneosquamata</i>	67693	MH508258	<i>Amanita drummondii</i>	1628811	KF859754	<i>Amanita hiltonii</i>	2729196	MT365223
<i>Amanita badia</i>	2986848	OP663323	<i>Amanita dryophila</i>	2014972	ON954752	<i>Amanita huijsmanii</i>	2610875	MW426546
<i>Amanita ballerina</i>	1978193	MW029919	<i>Amanita echinulata</i>	2733428	MT446255	<i>Amanita hunanensis</i>	1729787	KU714581
<i>Amanita basiana</i>	1588741	KP258986	<i>Amanita egregia</i>	1004484	KU714563	<i>Amanita ibotengutake</i>	188935	AB211054
<i>Amanita basii</i>	1262671	MW857546	<i>Amanita eijii</i>	576576	FJ441039	<i>Amanita imazekii</i>	118142	KT779090
<i>Amanita basiorubra</i>	1453772	KF803245	<i>Amanita elata</i>	1621061	OR229914	<i>Amanita incarnatifolia</i>	67714	KU714561
<i>Amanita battarrae</i>	1638308	MK580788	<i>Amanita electra</i>	2611046	MN490646	<i>Amanita intermedia</i>	2600627	MW589076
<i>Amanita beckeri</i>	1032528	ON287053	<i>Amanita eliae</i>	1032529	OR015876	<i>Amanita inzengae</i>	3162776	PP907077
<i>Amanita betulae</i>	2610872	MN490668	<i>Amanita elliptica</i>	2303088	MH508336	<i>Amanita jacksonii</i>	87329	MZ668036
<i>Amanita bingensis</i>	2733427	MZ345346	<i>Amanita elongata</i>	2303089	MN992294	<i>Amanita japonica</i>	67715	AB015684
<i>Amanita bisporigera</i>	87325	EU819411	<i>Amanita emodotrygon</i>	1902620	MF489728	<i>Amanita javanica</i>	552858	ON059326
<i>Amanita breckonii</i>	1477852	KJ535439	<i>Amanita esculenta</i>	262242	KP004947	<i>Amanita junquillea</i>	2681214	MW589077
<i>Amanita brunneitoxicaria</i>	1978194	MH793561	<i>Amanita eulypti</i>	1837098	OQ200140	<i>Amanita kalamandae</i>	1705360	KP898379
<i>Amanita brunneofulginea</i>	67694	MH508270	<i>Amanita excelsa</i>	67703	MW258872	<i>Amanita kalasinensis</i>	2974062	OM040562
<i>Amanita brunneola</i>	2972980	OP235499	<i>Amanita exilis</i>	2855729	MZ508449	<i>Amanita karea</i>	2761461	MT863765
<i>Amanita brunneolimbatata</i>	2303073	MH508273	<i>Amanita exitialis</i>	262245	JX998027	<i>Amanita kitamagotake</i>	2040641	MN919348
<i>Amanita brunneolocularis</i>	699465	FJ890033	<i>Amanita farinosa</i>	67704	FJ441036	<i>Amanita konajensis</i>	2795595	OR473059
<i>Amanita brunneomaculata</i>	2303074	MH508280	<i>Amanita fense</i>	2802024	MT108788	<i>Amanita kotohiraensis</i>	578074	MK388155
<i>Amanita brunneoprocera</i>	2019491	MF461573	<i>Amanita fibrillosa</i>	1229397	JX398314	<i>Amanita lactea</i>	3132125	PP892757
<i>Amanita brunneosquamata</i>	2019492	MF461582	<i>Amanita flammeola</i>	1156803	MF461585	<i>Amanita lanigera</i>	2303098	PP768065
<i>Amanita brunneostrobilipes</i>	2303075	MH508282	<i>Amanita flavella</i>	3018987	OQ200141	<i>Amanita lanivoluta</i>	1691414	KT354671
<i>Amanita brunneoumbonata</i>	2019493	MF461579	<i>Amanita flavidocerea</i>	2019496	MF461578	<i>Amanita lavendula</i>	235526	MK580744
<i>Amanita brunnescens</i>	87326	MK580732	<i>Amanita flavidogrisea</i>	2019497	MF461574	<i>Amanita lepiotoides</i>	2615137	MN497357
<i>Amanita bweyeyensis</i>	2591480	MK570919	<i>Amanita flavipes</i>	67705	KF245912	<i>Amanita lesueurii</i>	1229392	JX398315
<i>Amanita caccina</i>	3028195	ON768707	<i>Amanita flavoconica</i>	71931	EU819463	<i>Amanita levistriata</i>	1656275	KU248113
<i>Amanita caesarea</i>	67695	KU714579	<i>Amanita flavofloccosa</i>	2303090	MH508352	<i>Amanita lignitincta</i>	67716	FJ441045
<i>Amanita caesareoides</i>	1243991	ON059316	<i>Amanita flavopantherina</i>	2303091	ON131735	<i>Amanita lippiae</i>	1588743	KP258991
<i>Amanita calida</i>	2878721	OK316926	<i>Amanita flavorubens</i>	1004486	OR506120	<i>Amanita liquii</i>	262247	MH508427
<i>Amanita calyptrotoides</i>	1262675	KP258994	<i>Amanita flavorubescens</i>	87327	GQ166902	<i>Amanita lividopallescens</i>	2014974	MH603609
<i>Amanita calyptroderma</i>	1194922	MK580737	<i>Amanita flavosquamata</i>	2303092	ON059324	<i>Amanita longipes</i>	596274	FJ596833
<i>Amanita canescens</i>	2517780	MK461188	<i>Amanita foetidissima</i>	2488683	MK116537	<i>Amanita longistriata</i>	67717	KJ798812
<i>Amanita caojizong</i>	2303076	MH508287	<i>Amanita franchetii</i>	87328	JX515561	<i>Amanita loosei</i>	1260096	OP082440
<i>Amanita carneiphylla</i>	1229396	JX398325	<i>Amanita franzii</i>	2303093	MW036452	<i>Amanita luteolovelata</i>	1004504	MK415847
<i>Amanita castanea</i>	1938718	KU904823	<i>Amanita friabilis</i>	1004475	MK248266	<i>Amanita luteoparva</i>	2019499	MF461575
<i>Amanita cecilliae</i>	67696	OK299148	<i>Amanita fritillaria</i>	67706	ON010560	<i>Amanita macrocarpa</i>	1352050	KY747471
<i>Amanita cerris</i>	3118364	PP258972	<i>Amanita frostiana</i>	67707	OL741520	<i>Amanita madagascariensis</i>	2955310	ON843333

B.4.3 表1 (つづき)

表1. NCBIより収集したテングタケ属および近縁種のITS配列一覧 (つづき)

Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.	Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.	Scientific name	Taxonomy ID	GenBank Accession No.
<i>Amanita mafingensis</i>	1156804	JQ512089	<i>Amanita parvifritillaria</i>	2303112	ON768701	<i>Amanita smithiana</i>	1004520	KY606983
<i>Amanita magnivelaris</i>	248095	OP643379	<i>Amanita parvirisea</i>	2952545	ON768716	<i>Amanita solaniolens</i>	1001054	MK580791
<i>Amanita magniverrucata</i>	80575	KR919765	<i>Amanita parvipantherina</i>	262253	KF650998	<i>Amanita solitaria</i>	67729	MH63602
<i>Amanita magnivolvata</i>	2019500	MF461570	<i>Amanita peckiana</i>	71932	MW464411	<i>Amanita spadicea</i>	2610879	OP663324
<i>Amanita mairei</i>	2014976	MN490682	<i>Amanita pekeoides</i>	2761465	MT863761	<i>Amanita spissa</i>	103545	MW589090
<i>Amanita malleata</i>	2014977	MN545697	<i>Amanita pelioma</i>	1004510	OR945128	<i>Amanita spissacea</i>	78359	KM052552
<i>Amanita mallee</i>	2972979	OP235475	<i>Amanita peltigera</i>	2695030	MN894311	<i>Amanita sponsa</i>	3024587	OQ357630
<i>Amanita manginiana</i>	67718	KT779083	<i>Amanita persicina</i>	1662139	PP850626	<i>Amanita spreta</i>	1262681	MK900625
<i>Amanita manicata</i>	940657	HQ625014	<i>Amanita phalloides</i>	67723	KX449212	<i>Amanita squarrosipes</i>	2303139	MH508613
<i>Amanita mansehraensis</i>	2231777	MT445430	<i>Amanita pinophila</i>	2303114	MH508505	<i>Amanita stranella</i>	596281	FJ596814
<i>Amanita mappa</i>	2493756	MN257614	<i>Amanita pleropus</i>	235535	AY325823	<i>Amanita strobiliformis</i>	67730	MZ005547
<i>Amanita marinae</i>	3022902	OQ310901	<i>Amanita polypyraxis</i>	1004511	PP156188	<i>Amanita suballiaacea</i>	500611	KJ466419
<i>Amanita mamorata</i>	235529	MG252696	<i>Amanita ponderosa</i>	258489	AY486234	<i>Amanita suberis</i>	2974053	PP469622
<i>Amanita masasiensis</i>	1156805	JQ512090	<i>Amanita populiphila</i>	1004512	KU985228	<i>Amanita subfrostiana</i>	67731	KF651010
<i>Amanita melleialba</i>	1821586	ON131736	<i>Amanita porphyria</i>	78358	MK580674	<i>Amanita subfulginea</i>	1506952	MN061276
<i>Amanita melleiceps</i>	78362	KM052539	<i>Amanita praeclara</i>	2321192	MH806862	<i>Amanita subglobosa</i>	67732	KX810031
<i>Amanita meridioeciliae</i>	3080063	OR652332	<i>Amanita praelongispora</i>	1004513	MK580762	<i>Amanita subhemibapha</i>	2303140	PQ062265
<i>Amanita merxmulleri</i>	1965123	HQ625291	<i>Amanita prairicola</i>	940658	KX4625015	<i>Amanita subjunquillea</i>	67733	FJ176733
<i>Amanita miculifera</i>	2303101	MH508434	<i>Amanita preissii</i>	1925421	JX398317	<i>Amanita submaculata</i>	2072937	PP977140
<i>Amanita millsii</i>	1982019	KY977714	<i>Amanita princeps</i>	552863	MW403852	<i>Amanita submelleialba</i>	2831105	MZ045687
<i>Amanita minima</i>	2733444	MT446261	<i>Amanita protracta</i>	1579108	KP224326	<i>Amanita submembranacea</i>	619305	KM658295
<i>Amanita minutisquama</i>	2303102	MH508435	<i>Amanita proxima</i>	1004514	MH603601	<i>Amanita suborientiflava</i>	2019501	MF461584
<i>Amanita mira</i>	67719	MH508437	<i>Amanita pruitii</i>	941433	KM096565	<i>Amanita subovalispora</i>	2019502	MF461580
<i>Amanita modesta</i>	1506948	KT894851	<i>Amanita pseudoarenaria</i>	2820044	MW775311	<i>Amanita subpallidorosea</i>	1660029	KP691676
<i>Amanita molliuscula</i>	1506954	MN061272	<i>Amanita pseudoargentea</i>	3132126	PP476815	<i>Amanita subparvipantherina</i>	1660236	MG030644
<i>Amanita morenoi</i>	1965124	KY462557	<i>Amanita pseudofritillaria</i>	2950480	ON768702	<i>Amanita supravolvata</i>	1588744	MN490647
<i>Amanita morrisii</i>	1590092	KR919760	<i>Amanita pseudogemmata</i>	222257	OQ983890	<i>Amanita sychno pyramidata</i>	78363	MH508633
<i>Amanita mortenii</i>	1756904	KT317711	<i>Amanita pseudoinculta</i>	683165	GQ925389	<i>Amanita taiepa</i>	700566	MT863755
<i>Amanita multisquamosa</i>	1004505	MK560090	<i>Amanita pseudopantherina</i>	2303116	PP549977	<i>Amanita tanzanica</i>	1156807	JF710838
<i>Amanita mumura</i>	2761462	MT863748	<i>Amanita pseudoporphyrina</i>	67725	FJ441046	<i>Amanita tenuifulva</i>	2303141	MH508635
<i>Amanita murrilliana</i>	1262677	MK569745	<i>Amanita pseudoprinceps</i>	2303117	PQ062259	<i>Amanita thiersii</i>	235537	ON256802
<i>Amanita muscaria</i>	41956	AB015700	<i>Amanita pseudosculpta</i>	2952645	OP106386	<i>Amanita timida</i>	2303142	MH508636
<i>Amanita mutabilis</i>	1004508	MK580717	<i>Amanita pseudosychno pyramidata</i>	1821588	OM510279	<i>Amanita torrendii</i>	683164	GQ925387
<i>Amanita nana</i>	3056481	OR434193	<i>Amanita pseudovaginata</i>	67726	FJ441042	<i>Amanita tuza</i>	1911238	KT874956
<i>Amanita nauseosa</i>	226595	HQ625013	<i>Amanita punctata</i>	226597	AB015693	<i>Amanita umbrinolutescens</i>	67735	OM970906
<i>Amanita nehuta</i>	1962286	MT863749	<i>Amanita pupatja</i>	2820046	JX398329	<i>Amanita vaginata</i>	67736	DQ974691
<i>Amanita neocinctipes</i>	2303103	MH508443	<i>Amanita pyramidata</i>	2303118	MH508535	<i>Amanita validiuscula</i>	2972981	OP235502
<i>Amanita neoovoidea</i>	223910	KX270315	<i>Amanita pyramidifera</i>	226598	AY194979	<i>Amanita varicolor</i>	1507764	KP711844
<i>Amanita nigrescens</i>	1962288	MT863754	<i>Amanita quenda</i>	1601845	KP137063	<i>Amanita velatipes</i>	2303143	MK564535
<i>Amanita nothofagi</i>	2761463	MT863759	<i>Amanita radiata</i>	2086342	MT071958	<i>Amanita veldiei</i>	2321195	MH836565
<i>Amanita nouhvae</i>	1965125	MH930242	<i>Amanita ravenelii</i>	2303119	OP743683	<i>Amanita velosa</i>	315260	MT551941
<i>Amanita novinupta</i>	405908	DQ974690	<i>Amanita ravicrocina</i>	2906732	OM040567	<i>Amanita verna</i>	112270	OM451533
<i>Amanita oberwinklerana</i>	578075	FJ176724	<i>Amanita regalis</i>	188873	MW553145	<i>Amanita vernicoccora</i>	1055356	KY655747
<i>Amanita oberwinkleriana</i>	3049723	OR058509	<i>Amanita reidii</i>	235536	AY325824	<i>Amanita verrucosivolvata</i>	67737	MW192485
<i>Amanita oblongospora</i>	1055977	JF907762	<i>Amanita retenta</i>	2303120	MH508541	<i>Amanita vestita</i>	1415362	KC429048
<i>Amanita ochracea</i>	2303104	KU714564	<i>Amanita rhacopus</i>	1507762	KY655763	<i>Amanita vidua</i>	2913269	OR293358
<i>Amanita ochrophylla</i>	226596	AY194977	<i>Amanita rhopalopus</i>	87331	MK571178	<i>Amanita virgineoides</i>	67738	FJ441032
<i>Amanita ochroterrea</i>	1456998	KF815735	<i>Amanita rhimosa</i>	580330	JX998018	<i>Amanita virginiana</i>	1262682	MK580719
<i>Amanita ocreata</i>	235532	GQ486874	<i>Amanita ristichii</i>	1004517	JX844737	<i>Amanita virosa</i>	78357	AB015676
<i>Amanita oleosa</i>	683163	GQ925399	<i>Amanita roanakensis</i>	1962199	OR825556	<i>Amanita virosiformis</i>	2541715	MK580779
<i>Amanita olivaceobrunnea</i>	2153249	MH166780	<i>Amanita robusta</i>	2733430	MT829161	<i>Amanita viscidolutescens</i>	2771316	MW000471
<i>Amanita olivaceofusca</i>	2303105	MH508456	<i>Amanita rosealamellata</i>	226599	KP866164	<i>Amanita vittadinii</i>	1004525	MH603603
<i>Amanita olivaceo-grisea</i>	1756905	MH248267	<i>Amanita roseolifolia</i>	2303121	MH508548	<i>Amanita vladimirii</i>	2785055	MW208927
<i>Amanita olivovaginata</i>	2983845	MF489722	<i>Amanita roseotincta</i>	1368465	PP526046	<i>Amanita volvata</i>	67739	MT345230
<i>Amanita onusta</i>	1004509	MZ668200	<i>Amanita rubescens</i>	71933	EU819464	<i>Amanita wadjukiorum</i>	1390192	KF258722
<i>Amanita oreina</i>	3068721	OR419842	<i>Amanita rubiginosa</i>	2303123	MH508565	<i>Amanita wadulawitu</i>	1246612	JX398328
<i>Amanita orienticrocea</i>	2303106	OQ553810	<i>Amanita rubroflava</i>	2303124	MH508566	<i>Amanita walpolei</i>	1456999	KF815736
<i>Amanita orientifulva</i>	262250	FJ441035	<i>Amanita rubromarginata</i>	1262680	PQ062262	<i>Amanita wellsii</i>	1004526	KU248115
<i>Amanita orientigemmata</i>	262251	ON131764	<i>Amanita rubrovolvata</i>	67727	ON059317	<i>Amanita westii</i>	1004527	OP163232
<i>Amanita orsonii</i>	1812971	KX270327	<i>Amanita rufobrunnescens</i>	1811828	ON971238	<i>Amanita xanthocephala</i>	226601	MT571657
<i>Amanita ovalispora</i>	576578	FJ441041	<i>Amanita rufoferruginea</i>	1816455	KU497532	<i>Amanita xerocybe</i>	1291139	KT724071
<i>Amanita ovoidea</i>	2035817	MH603605	<i>Amanita sabulicola</i>	2716916	MT180988	<i>Amanita xylinivolvata</i>	699468	ON134034
<i>Amanita pachycolea</i>	80576	KT874953	<i>Amanita sabulosa</i>	2820042	KF859749	<i>Amanita yangii</i>	2950479	ON794873
<i>Amanita pachyvolvata</i>	2610876	MN490701	<i>Amanita sculpta</i>	654434	ON768719	<i>Amanita yanshanensis</i>	3144888	PP768066
<i>Amanita pakistanica</i>	1906111	KX061525	<i>Amanita sepiacea</i>	262258	MW258870	<i>Amanita yenii</i>	2303144	MH508652
<i>Amanita pallidocarnea</i>	2303107	MH508482	<i>Amanita shennongjiana</i>	2303125	MH508590	<i>Amanita yuaniana</i>	67740	KU714560
<i>Amanita pallidorosea</i>	1324310	KJ466382	<i>Amanita siamensis</i>	2303126	ON131776	<i>Amanita zambiana</i>	1004528	JX844751
<i>Amanita pallidoverruca</i>	2915010	OM509734	<i>Amanita silvicola</i>	80577	GQ250408	<i>Amanita zangii</i>	1506958	KY747470
<i>Amanita pallidozonata</i>	2303109	MH508486	<i>Amanita silvifuga</i>	940659	HQ625016	<i>Amanita zonata</i>	2303145	ON794400
<i>Amanita paludosa</i>	2135321	MW526935	<i>Amanita similis</i>	1156806	KU714573	<i>Lepiota venenata</i>	2136145	MK095189
<i>Amanita pantherina</i>	67721	AB096044	<i>Amanita simulans</i>	2014969	KX834253	<i>Limacella glioderma</i>	67741	MK412398
<i>Amanita pantherinoides</i>	2291733	OM212972	<i>Amanita sinensis</i>	67728	KY747458	<i>Limacella glischna</i>	56179	KT168211
<i>Amanita parvivolvata</i>	1590093	MK580721	<i>Amanita singeri</i>	1004519	MK461186			
<i>Amanita parva</i>	3127508	PP436690	<i>Amanita sincoflava</i>	545494	KJ638257			
<i>Amanita parvicurta</i>	2303111	MH508490	<i>Amanita sinocitrina</i>	2303127	MN627099			

A



B

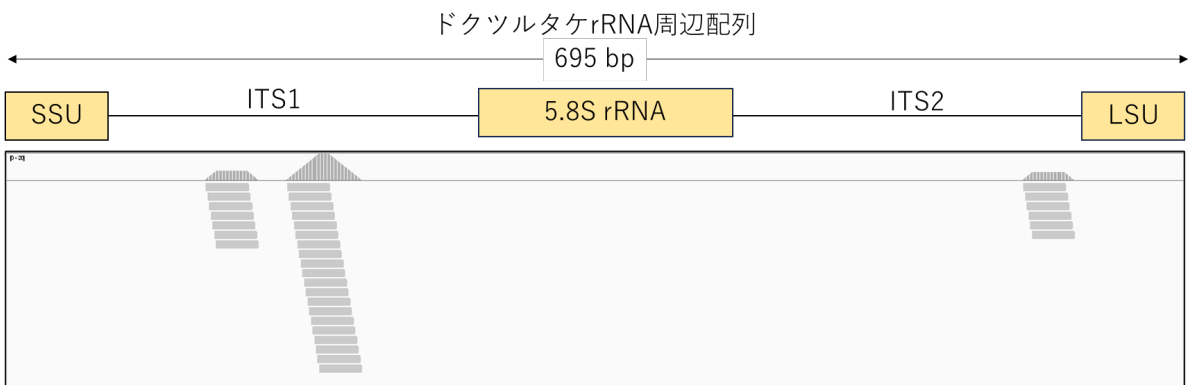


図2. BLAST\_TSNにより同定されたドクツルタケ特異的配列

A)ドクツルタケ特異的配列抽出スキームをBLAST\_TSNで構築。ドクツルタケrRNAの遺伝子配列から25mer × 671種の配列を生成し、443種のドクツルタケ以外のAmanita属きのこのrRNA遺伝子配列に相同性の低い配列をBLASTによるネガティブセレクションにより抽出した。

B)BLAST\_TSNにより同定されたドクツルタケ特異的配列を、ドクツルタケrRNA遺伝子配列にアライメントした結果をIGVで示した。ドクツルタケ特異的配列はITS1上に27配列、ITS2上に6配列の計33配列が同定された。

B.4.3 図6

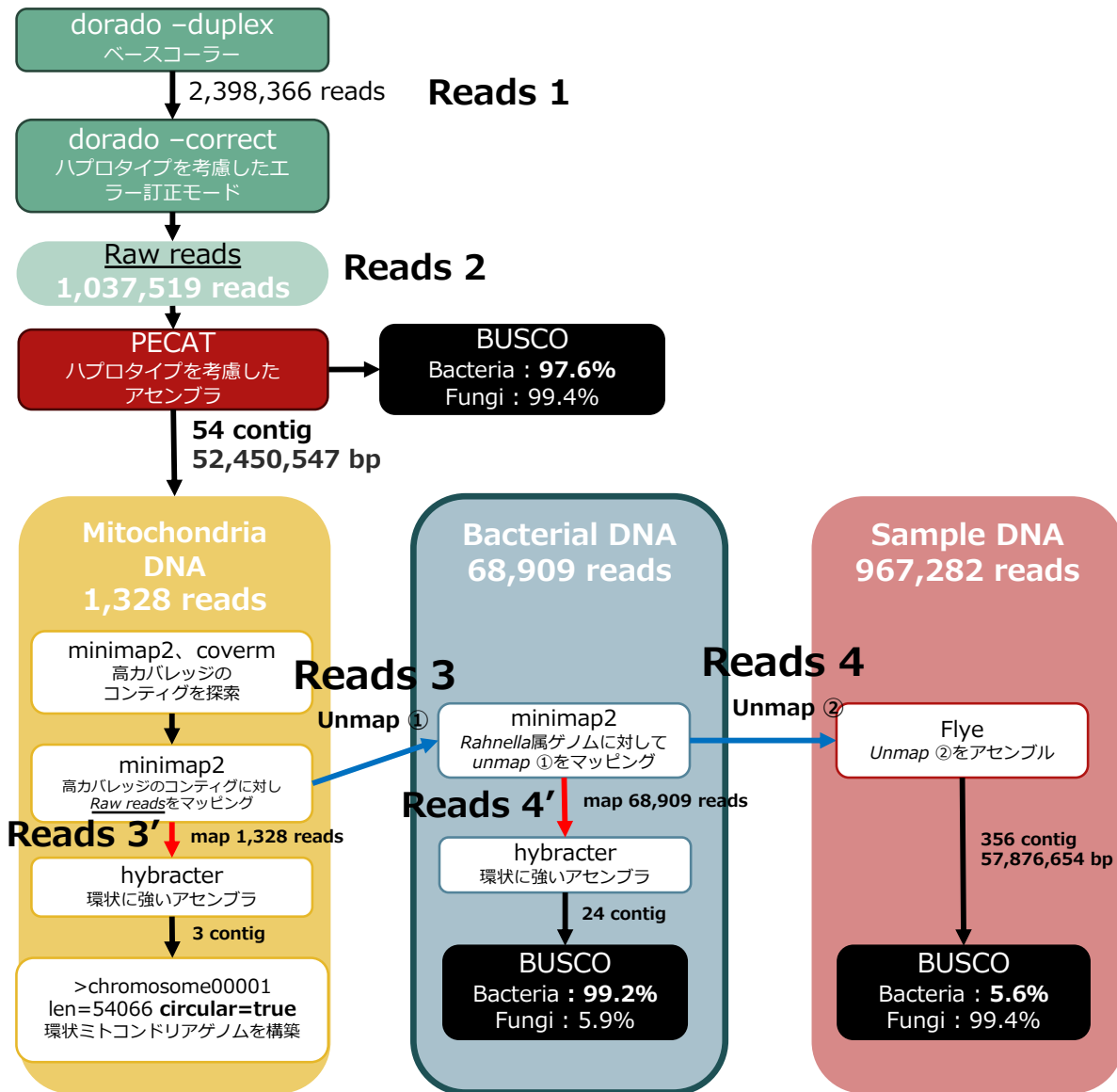


図6. シークエンスリードのベースコールおよびフィルタリングのスキーム

ロングリードシーケンスの全リードであるraw readsから、ミトコンドリアゲノム由来のリードを除外し、次に細菌ゲノム由来のリードを除外するまでの概要を表す。ミトコンドリア由来のリードは環状ゲノム構築に成功した。細菌ゲノム由来のリードから構築したコンティグは、妥当なBUSCO値を示した。また、残ったリードで構築したコンティグのBUSCO値からは、細菌ゲノム由来リードの減少が認められた。図中のBUSCO値はヒットしたBUSCO idのうち、statusがcompleteに分類される割合を示している。

## B.4.3 表2

表2 アマトキシソ類のクエリとして用いたアミノ酸配列

毒素名	クエリ配列	クエリアミノ酸配列
$\alpha$ -amanitin	$\alpha$ アマニチンコアペプチド	IWGIGCNP
$\beta$ -amanitin	$\beta$ アマニチンコアペプチド	IWGIGCDP
amanexitide	amanexitideコアペプチド	VFSLPVFFP
phallectidin	phallectidinコアペプチド	AWLVDCP
phalloidin	ファロイジンコアペプチド	AWLATCP

C.2 Fig.1

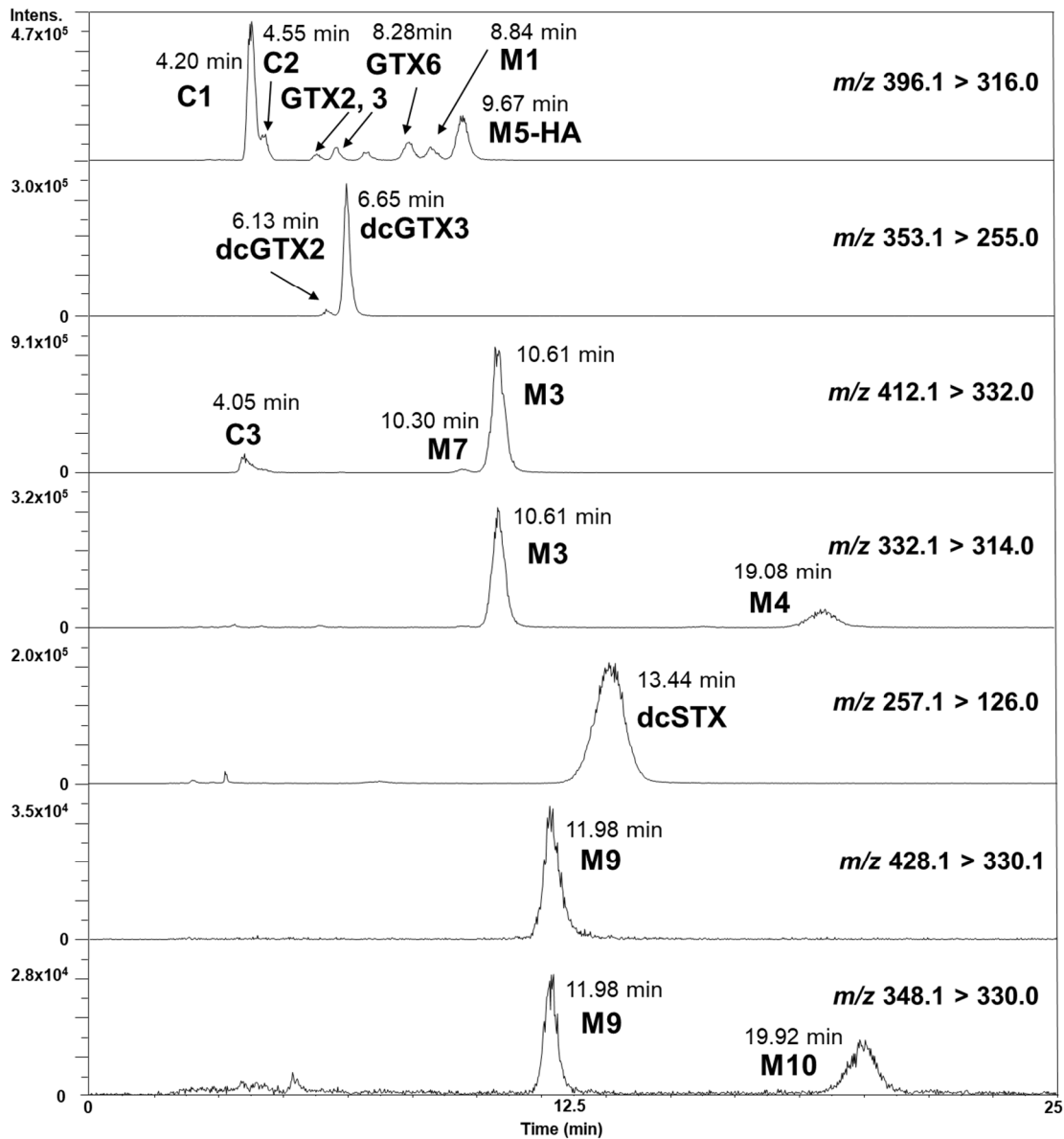


Fig.1 西日本産ヒオウギガイに含まれる PSTs のクロマトグラム

<分析条件>

カラム : TSKgel-amide80 (2.0 mm I.D. × 15 cm, 5 μm、東ソー)

移動相 : 2 mM HCOONH<sub>4</sub>, 60% MeCN, 0.0125% HCOOH

流速 : 0.2 mL/min, isocratic

**C.3 Table 1** Table 1. 国内外における植物性自然毒による健康被害事例

自然毒名	発生年	発生源・地域	食品	規模（死亡は判明分）	引用
アマトキシン	2016	アメリカ	タマゴテングダケ	14名	1
イルジンS	2023	日本（兵庫）	ツキヨタケ	4名	2
	2022	日本（栃木）	ツキヨタケ	7名	3
	2021	日本（秋田）	ツキヨタケ	4名	4
	2015	日本（長野）	ツキヨタケ	6名	5
オレアンドリン	2022	日本（兵庫）	キョウチクトウの葉	1名	6
	2020	日本（群馬）	キョウチクトウの葉	1名	7
グラヤノトキシン	不明	アメリカ	はちみつを含む酒	3名	8
	2023	香港	はちみつ	2名	9
	2023	日本（福岡）	アセビ	1名	10
	2022	日本（埼玉）	はちみつ	1名	11
	不明	トルコ	はちみつ	1名	12
	2015	韓国	ツツジの酒	6名	13
グリコアルカロイド	2023	日本（東京）	ジャガイモ	20名	14
	2022	日本（長野）	ジャガイモ	46名	15
	2020	日本（兵庫）	ジャガイモ	16名	16
	2017～2019	日本（鳥取）	ジャガイモ	1名	17
	2018	日本（大阪）	ジャガイモ	不明	18
	2009～2018	日本（岡山）	ジャガイモ	不明	19
	2017	日本（北海道）	ジャガイモ	78名	20
	2016	日本（静岡）	ジャガイモ	不明	21
	2015	香港	ジャガイモ	2名	22
	2015	日本（福井）	ジャガイモ	31名	23
	2015	日本（奈良）	ジャガイモ	31名	24
	2014	日本（北海道）	ジャガイモ	不明	25
	ゲルセジン型アルカロイド	2010～2019	中国	はちみつ	94名（17名死亡）
2016		中国	はちみつ	不明（死者あり）	27
シアン	2023	香港	タケノコ	2名	28
	2021	チェコ	サプリメント	不明	29
	2017	日本（鹿児島）	キャッサバ	不明	30
	2017	不明	アブリコットカーネル	1名	31
	2017	ウガンダ	キャッサバ	98名（2名死亡）	32
シクロプロペンカルボン酸	2023	日本（愛知）	ニセクロハツ	1名	33
	不明	日本（愛知）	ニセクロハツ	1名（死亡）	34
シロシピン	2023	日本（茨城）	ヒカゲシビレタケ	2名	35
ツチン	2008	ニュージーランド	はちみつ	22名	36
トロパンアルカロイド	2022	イタリア	薬物野菜	13名	37
	2021	スロバキア	ハウレンソウ	100名以上	38
	2019	ウガンダ	トウモロコシ・大豆ブレンド	298名（5名死亡）	39
	2018	日本	チョウセンアサガオ	1名	40
	2009～2018	日本（岡山）	不明	不明	19
	2017	日本	チョウセンアサガオ	2名	41
	2016	日本（東京）	不明	不明	42
	2015	台湾	チョウセンアサガオ	1名	43

ピロリリジンアルカロイド	不明	アメリカ	ハーブティー, コンフリーサプリメント	1名	44
	不明	不明	ハーブティー (母親が摂取)	1名 (乳児)	44
	不明	不明	ハーブ (母親が摂取)	1名 (死亡, 乳児)	44
	2008	アフガニスタン	小麦粉	67名 (4名死亡)	45
フィトヘマグルチニン	2024	ドイツ	グミ	1名	46
	2017	中国	インゲンマメ	約100名	47
ムスカリン	2023	日本 (青森)	アセタケ属キノコ	3名	48
ムッシモール・イボテン酸	2023	日本 (北海道)	テングタケ	1名	49
	2023	日本 (東京)	テングタケ	4名	50
	2016	日本 (北海道)	ベニテングタケ	1名	51

- 1) Vo KT, et al. Amanita phalloides Mushroom Poisonings — Northern California, December 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2017, 66, 549–553.
- 2) 原崎聡子. ツキヨタケによる食中毒事例. 食衛誌. 2024, 65, J-116–J-117.
- 3) 大内忠信. ツキヨタケによる食中毒事例. 食衛誌. 2023, 64, J-130–J-132.
- 4) 関谷優晟. ツキヨタケを原因とする食中毒事例について. 食衛誌. 2022, 63, J-113–J-114.
- 5) 小林史岳ら. ツキヨタケ中毒の6例. 日農医誌. 2017, 66, 499–503.
- 6) 松本優ら. キョウチクトウ中毒により完全房室ブロックを呈した1症例. 日集中医誌. 2022, 29, 543–544.
- 7) 神戸将彦ら. キョウチクトウ大量摂取の1例. 北関東医学. 2020, 70, 359–362.
- 8) Ali H, et al. Mad Honey Ingestion Leading to Grayanotoxin Poisoning During the Burning Man Music Festival: A Case Series. 2024, *Cureus* 16, e62755.
- 9) <https://www.fsc.go.jp/fscis/foodSafetyMaterial/show/svu06170310360>
- 10) 梶山翼ら. 馬酔木の摂取によるグラヤノトキシン中毒が疑われた一例. 中毒研究. 2023, 36, 213.
- 11) 岡崎友香ら. 個人輸入した蜂蜜摂取後に眼瞼下垂・構音障害をきたしグラヤノトキシン中毒が疑われた事例. 中毒研究. 2022, 35, 75–76.
- 12) DiSalvo, P., et al. Confirmed grayanotoxin poisoning with bradycardia from a gift of imported honey. *J. Emerg. Med.*, 2022, 63, e45–e48.
- 13) Choi, H. L., et al. Relationship between blood toxin level and clinical features in patients with grayanotoxin poisoning – six clinical cases. *Clin. Toxicol.* 2017, 55, 991–995.
- 14) 小学校のじゃがいも調理実習におけるソラニン類による食中毒について. 食衛誌. 2024, 65, J-34–35.
- 15) 荻原弥生ら. 小学校で栽培したジャガイモによるソラニン類の食中毒について. 信州公衆衛生雑誌. 2023, 18, 34–35.
- 16) 吉岡直樹ら. 小学校の調理実習で発生したジャガイモによる食中毒事例. 兵庫県立健康科学研究所研究報告. 2020, 2, 32–36.
- 17) 田邊奈都子ら. 自然毒等による食中毒及び有症苦情の検査事例について(2017～2019). 鳥取県衛生環境研究所報. 2021, 60, 32–36.
- 18) 山口瑞香ら. ジャガイモによる食中毒疑い事例について. 大阪健康安全基盤研究所研究年報. 2018, 2, 60–62.
- 19) 難波順子ら. 岡山県で発生した植物性自然毒による食中毒事例への対応について(平成21～30年). 岡山県環境保健センター年報. 2020, 43, 135–143.
- 20) 中本哲ら. 千歳市内の小学校で発生したジャガイモによる集団食中毒の事例. 市立千歳市民病院医誌. 2017, 13, 7–9.
- 21) 渡邊愛子ら. ジャガイモ食中毒事例による緊急検査. 静岡県環境衛生科学研究所報告. 59, 39–42.
- 22) [https://www.cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia\\_pub/multimedia\\_pub\\_fs112\\_01.html](https://www.cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia_pub/multimedia_pub_fs112_01.html)
- 23) 澤崎加奈恵ら. 小学校で発生したジャガイモによるソラニン類食中毒事例. 福井県衛生環境センター年報. 2015, 13, 102–103.
- 24) 折口菜都希ら. ジャガイモによる食中毒事件の発生について. 奈良県保健研究センター年報. 2015, 49, 59–60.
- 25) 藤本啓ら. 2014年度内小学校で発生したジャガイモ喫食による植物性自然毒の食中毒事例について. 北海道公衆衛生学雑誌. 2016, 29, 147–150.
- 26) Liu, Z. T., et al. Analysis on wild honey poisoning events from 2010 to 2019 in Yunnan Province, 2020.
- 27) Yang, S., Liu, Y., et al. Gelsedine-type alkaloids: Discovery of natural neurotoxins presented in toxic honey. *Journal of hazardous materials*, 2020, 381, 120999.
- 28) <https://www.info.gov.hk/gia/general/202308/10/P2023081000739.htm?fontSize=1>
- 29) <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/462917>
- 30) 山下清佳ら. 食品中のシアン化合物含有量と低減方法に関する調査研究. 鹿児島県健康保健センター所報. 2024, 24, 33–39.
- 31) Konstantatos A, et al. An unusual presentation of chronic cyanide toxicity from self-prescribed apricot kernel extract, *BMJ Case Rep.* 2017, 2017: bcr-2017-220814.
- 32) Alitubeera PH, et al. Outbreak of Cyanide Poisoning Caused by Consumption of Cassava Flour — Kasese District, Uganda, September 2017. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2019, 68, 308–311.
- 33) 海野明広. ニセクロハツによる食中毒事例. 食衛誌. 2024, 65, 5, J-115–J-116.
- 34) 有馬一ら. ニセクロハツによる重症キノコ食中毒の1例. 日農医誌. 2022, 71, 357–362.
- 35) 高木亜祐実. ヒカゲシビレタケによる食中毒. 食衛誌. 2024, 65, 2, J-35–J-36.
- 36) Beasley, M., et al. Poisoning due to tutin in honey: a report of an outbreak in New Zealand. *N. Z. Med. J.*, 2018, 131, 59-71.
- 37) Caprai, E., et al. Case reports of tropane alkaloid contamination in spinach from Italy and its potential implications for consumer health. *Food Control*, 2024, 160, 110334.
- 38) <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/470490>
- 39) Mutebi, R.R., et al. Large outbreak of Jimsonweed (*Datura stramonium*) poisoning due to consumption of contaminated humanitarian relief food: Uganda, March–April 2019. *BMC Public Health*, 2022, 22, 623.
- 40) 山本基佳ら. チョウセンアサガオ中毒 乾燥した食用黄花菜との誤認. 中毒研究. 2018, 31, 270–272.
- 41) 竹島慎一ら. チョウセンアサガオにより急性脳症を呈した夫婦例 症例報告と文献レビュー. 臨床神経学. 2017, 57, 225–229.
- 42) 木村圭介ら. 化学物質及び自然毒による食中毒及び有症苦情事例(平成28年). 東京都健康安全センター研究年報. 2018, 68, 143–150.
- 43) <https://www.fsc.go.jp/fscis/foodSafetyMaterial/show/svu04250710493>
- 44) <https://www.food.gov.uk/business-guidance/plant-toxins>
- 45) Kakar F, et al. An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in Western afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. *J. Toxicol.*, 2010, 2010, 313280.
- 46) <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/709479>
- 47) [https://www.cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia\\_pub/multimedia\\_pub\\_fs139\\_04.html](https://www.cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia_pub/multimedia_pub_fs139_04.html)
- 48) 成田留衣. アセタケ属キノコ (コブアセタケ類似種) による食中毒事例. 食衛誌. 2024, J-114–J-115.
- 49) 松本悠ら. 慢性透析患者が急性テングタケ中毒となり, 緊急透析で解毒した1例. 日本集中治療医学会雑誌. 2023, 30, 252–253.
- 50) 内藤月乃. テングタケによる食中毒事例. 食衛誌. 2024, 65, J-117–J-119.
- 51) 久保彰則ら. キノコ中毒の1例. 岩見沢市立総合病院医誌. 2016, 42, 17–20.

C.3 Table 2

Table 2. 検討対象化合物及び LC-MS/MS 測定における保持時間

No.	化合物名	分子式	保持時間
1	Echimidine	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>7</sub>	12.4
2	Echimidine <i>N</i> -oxide	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>8</sub>	12.4
3	Europine	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	9.2
4	Europine <i>N</i> -oxide	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>7</sub>	6.0
5	Heliotrine	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>5</sub>	8.2
6	Heliotrine <i>N</i> -oxide	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	5.2
7	Intermedine	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	5.1
8	Intermedine <i>N</i> -oxide	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	6.5
9	Lasiocarpine	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>7</sub>	15.2
10	Lasiocarpine <i>N</i> -oxide	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>8</sub>	16.9
11	Lycopsamine	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	5.4
12	Lycopsamine <i>N</i> -oxide	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	6.8
13	Retrorsine	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	7.6
14	Retrorsine <i>N</i> -oxide	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>7</sub>	8.0
15	Senecionine	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	10.2
16	Senecionine <i>N</i> -oxide	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	10.9
17	Seneciphylline	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	8.3
18	Seneciphylline <i>N</i> -oxide	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	9.0
19	Senecivernine	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	9.8
20	Senecivernine <i>N</i> -oxide	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	10.4
21	Senkirkine	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	12.8
22	Echinatine	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	5.4
23	Echinatine <i>N</i> -oxide	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	6.3
24	Heliospine	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	12.6
25	Heliospine <i>N</i> -oxide	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>8</sub>	14.3
26	Indicine	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	5.4
27	Indicine <i>N</i> -oxide	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	6.5
28	Integerrimine	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	10.1
29	Integerrimine <i>N</i> -oxide	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	14.3
30	Rinderine	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	5.3
31	Rinderine <i>N</i> -oxide	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	6.1
32	Spartioidine	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	8.2
33	Spartioidine <i>N</i> -oxide	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	9.0
34	Usaramine	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	7.6
35	Usaramine <i>N</i> -oxide	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>7</sub>	8.2
36	Erucifoline	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	4.4
37	Erucifoline <i>N</i> -oxide	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	5.5
38	Monocrotaline	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	3.2
39	Monocrotaline <i>N</i> -oxide	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	4.9
40	Trichodesmine	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	7.6

C.3 Fig. 1

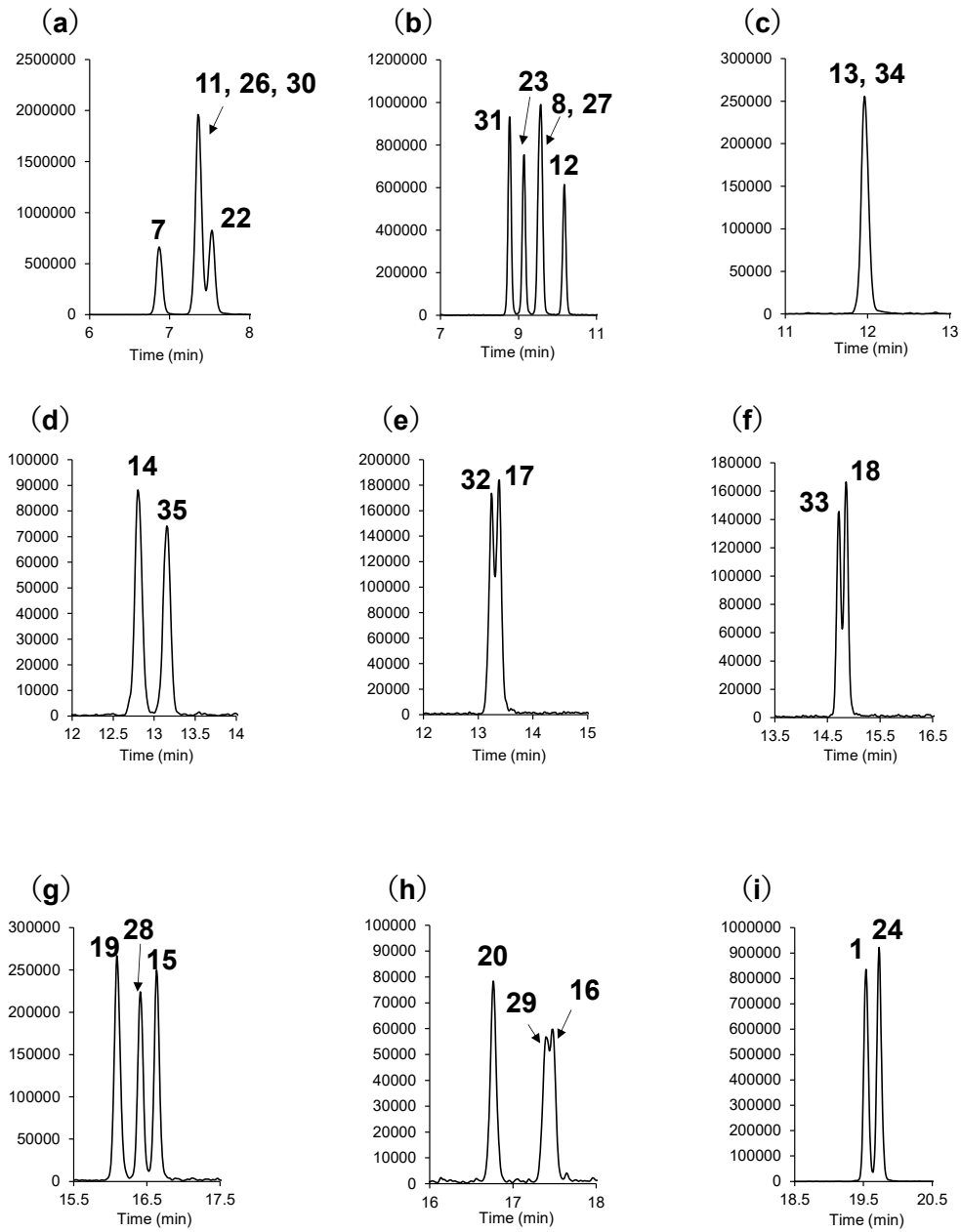


Fig. 1. SRM クロマトグラム (0.5 ng/mL)

(a)  $m/z$  300.3→138.1; (b)  $m/z$  316.3→172.1; (c)  $m/z$  352.3→324.2; (d)  $m/z$  368.3→94.0;  
(e)  $m/z$  334.3→306.2; (f)  $m/z$  350.3→94.0; (g)  $m/z$  336.3→308.2; (h)  $m/z$  352.3→94.0;  
(i)  $m/z$  398.3→120.1

分析カラム : Luna Omega (2.1×100 mm, 1.6 μm, phenomenex 製)

C.4 表 1-2

表 1-2 試験室間共同試験の結果

Laboratory	α-Amanitin		Phalloidin	
	A	44.4	46.4	41.1
B	44.4	42.9	36.2	36.4
C	43.8	43.8	34.5	34.9
D	41.0	41.0	35.8	35.7
E	40.4	40.9	35.8	36.9
F	43.4	43.4	32.7*	29.1*
I	36.2*	43.6*	47.5*	36.2*
J	47.4	47.0	41.2	41.2
K	37.3	39.8	36.5	37.3
Mean (mg/kg)	43.0		37.5	
Mean recovery (%)	102		84.7	
Outlier (Cochran parameters)	1		2	
Outlier (single Grubbs parameters)	0		0	
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		0	
Repeatability relative SD [RSD <sub>r</sub> , %]	2.1		1.2	
Reproducibility relative SD [RSD <sub>R</sub> , %]	6.6		7.3	
Predicted reproducibility relative SD [PRSD <sub>R</sub> , %]	9.1		9.3	
HorRat value	0.7		0.8	

\*Outliers of the Cochran test

C.4 表 1-3

表 1-3 試験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 <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)
Recovery Repeatability Reproducibility	≧ 100 mg/kg	90~107	≦ 16	≦ 5.3
	≧ 10 mg/kg	80~110	≦ 22	≦ 7.3
	≧ 1 mg/kg	80~110	≦ 32	≦ 11
	HorRat value ≦ 2			

C.4 表 1-4

表 1-4 3 機関による試験室間共同試験の結果- $\alpha$ -アマニチン/内標補正の有無の比較

Laboratory	IS(-)		IS(+)	
	E	40.4	40.9	41.6
J	47.4	47.0	43.1	45.6
K	37.3	39.8	35.3	38.7
Mean (mg/kg)	42.1		41.0	
Mean recovery (%)	99.6		96.9	
Repeatability relative SD [RSD <sub>r</sub> , %]	2.5		3.2	
Reproducibility relative SD [RSD <sub>R</sub> , %]	10.9		6.1	
Predicted reproducibility relative SD [PRSD <sub>R</sub> , %]	9.1		9.1	
HorRat value	1.2		0.7	

C.4 表 1-5

表 1-5 3 機関による試験室間共同試験の結果-ファロイジン/内標補正の有無の比較

Laboratory	IS(-)		IS(+)	
	E	35.8	36.9	36.5
J	41.2	41.2	37.4	39.9
K	36.5	37.3	34.5	36.3
Mean (mg/kg)	38.2		37.2	
Mean recovery (%)	86.1		83.9	
Repeatability relative SD [RSD <sub>r</sub> , %]	1.5		3.9	
Reproducibility relative SD [RSD <sub>R</sub> , %]	7.0		5.2	
Predicted reproducibility relative SD [PRSD <sub>R</sub> , %]	9.2		9.3	
HorRat value	0.8		0.6	

C.4 表 2-3

表 2-3 妥当性確認の結果（試料：シイタケ、添加濃度：1 mg/kg）

Analyte	Quantification by absolute calibration curve			Quantification by internal standard correction			Criteria*		
	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)
Muscarin	108	1.6	3.7	—	—	—	70-120	< 10	< 15
Ibotenic acid	86.7	2.9	4.2	87.7	2.5	2.6	70-120	< 10	< 15
Muscimol	74.6	2.2	2.5	75.1	1.7	3.2	70-120	< 10	< 15
Propargylglycine	96.8	1.8	3.0	97.7	1.4	3.4	70-120	< 10	< 15
Allylglycine	100	1.6	7.0	101	2.6	6.8	70-120	< 10	< 15

\*食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成22年度12月24日厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第1224第1号）

C.4 表 2-4

表 2-4 妥当性確認の結果（試料：シイタケ、添加濃度：10 mg/kg）

Analyte	Quantification by absolute calibration curve			Quantification by internal standard correction			Criteria*		
	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)	Trueness (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>WR</sub> (%)
Muscarin	113	2.8	3.7	—	—	—	70-120	< 10	< 15
Ibotenic acid	93.2	2.6	6.1	—	—	—	70-120	< 10	< 15
Muscimol	92.2	2.4	5.0	—	—	—	70-120	< 10	< 15
Propargylglycine	106	2.6	6.3	—	—	—	70-120	< 10	< 15
Allylglycine	92.4	2.7	8.1	—	—	—	70-120	< 10	< 15

\*食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成22年度12月24日厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第1224第1号）

C.4 図 1

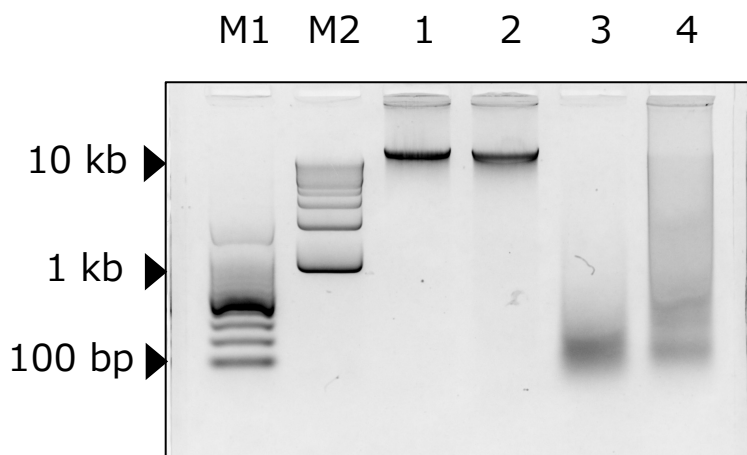


図1. テングタケ属の子実体から抽出したゲノムDNAのアガロースゲル電気泳動図

抽出したゲノムDNAを1%アガロースゲルで電気泳動した。1: *Amanita molliuscula* (和名無し), 2: *Amanita orienticrocea* (コガネツルタケ), 3: *Amanita cf. neoovoidea* (シロテングタケ), 4: *Amanita cf. sphaerobulbosa* (タマシロオニタケ), M1: 100 bp Ladder, M2: 1 kb Ladder

C.4 表 3

表3. 本研究で推定したテングタケ属サンプル一覧

学名	和名	採取地	採取日	Identity of rRNA (%)	Identity of rpb2 (%)
<i>Amanita ibotengutake</i>	イボテングタケ	小金井市	2011.10.12	-	99.68%
<i>Amanita lanigera</i>	-	小金井市	2012.9.29	99.03%	99.83%
<i>Amanita orientigemmata</i>	ウスキテングタケ	小金井市	2012.9.30	99.72%	99.84%
<i>Amanita neoovoidea</i>	シロテングタケ	八王子市	2012.10.3	-	98.77%
<i>Amanita pallidorosea</i>	アケボノドクツルタケ	札幌市桜山	2023.8.19	100%	100%
<i>Amanita molliuscula</i>	-	札幌市桜山	2023.9.23	100%	99.81%
<i>Amanita oberwinklerana</i>	ニオイドクツルタケ	横浜市	2024.6.30	-	100%
<i>Amanita orienticrocea</i>	コガネツルタケ	横浜市	2024.6.30	99.38%	99.85%
<i>Amanita spissacea</i>	ヘビキノコモドキ	横浜市	2024.6.30	99.66%	99.66%
<i>Amanita satotamagotake</i>	サトタマゴタケ	高尾山	2024.7.28	99.67% <sup>†</sup>	100%
<i>Amanita flavipes</i>	コガネテングタケ	長野	2024.7.28	-	100%
<i>Amanita muscaria</i>	ベニテングタケ	長野	2024.7.28	100%	98.56%
<i>Amanita caesareoides</i>	タマゴタケ	富士山	2024.9.7	100%	100%
<i>Amanita regalis</i>	オウテングタケ	富士山	2024.9.7	100%	N.A.
<i>Amanita sepiacea</i>	テングタケモドキ	富士山	2024.9.17	100%	100%
<i>Amanita sphaerobulbosa</i>	タマシロオニタケ	宇津峰山	2024.9.26	N.A. <sup>‡</sup>	100%
<i>Amanita virosa</i>	ドクツルタケ	富士山	2024.9.30	100%	99.84%
<i>Amanita citrina</i>	コタマゴテングタケ	富士山	2024.9.30	-	99.37%
<i>Amanita porphyria</i>	コテングタケ	富士山	2024.9.30	99.53%	100%
<i>Amanita pseudoporphyria</i>	コテングタケモドキ	福島	2024.10.3	-	99.20%
<i>Amanita virgineoides</i>	シロオニタケ	福島	2024.10.3	-	100%
<i>Amanita longistriata</i>	タマゴテングタケモドキ	福島	2024.10.4	100%	-
<i>Amanita imazekii</i>	ミヤマタマゴタケ	富士山	2024.10.7	100%	-
<i>Amanita sychnopyraxis</i>	テングタケタマシ	広島	2024.11.1	99.79%	98.31%

<sup>†</sup>サトタマゴタケとタマゴタケのrRNA配列は同一であり、全てタマゴタケとして登録されているため、ここではタマゴタケのrRNA配列との相同性を示す

<sup>‡</sup>NCBIデータベースに配列の登録なし

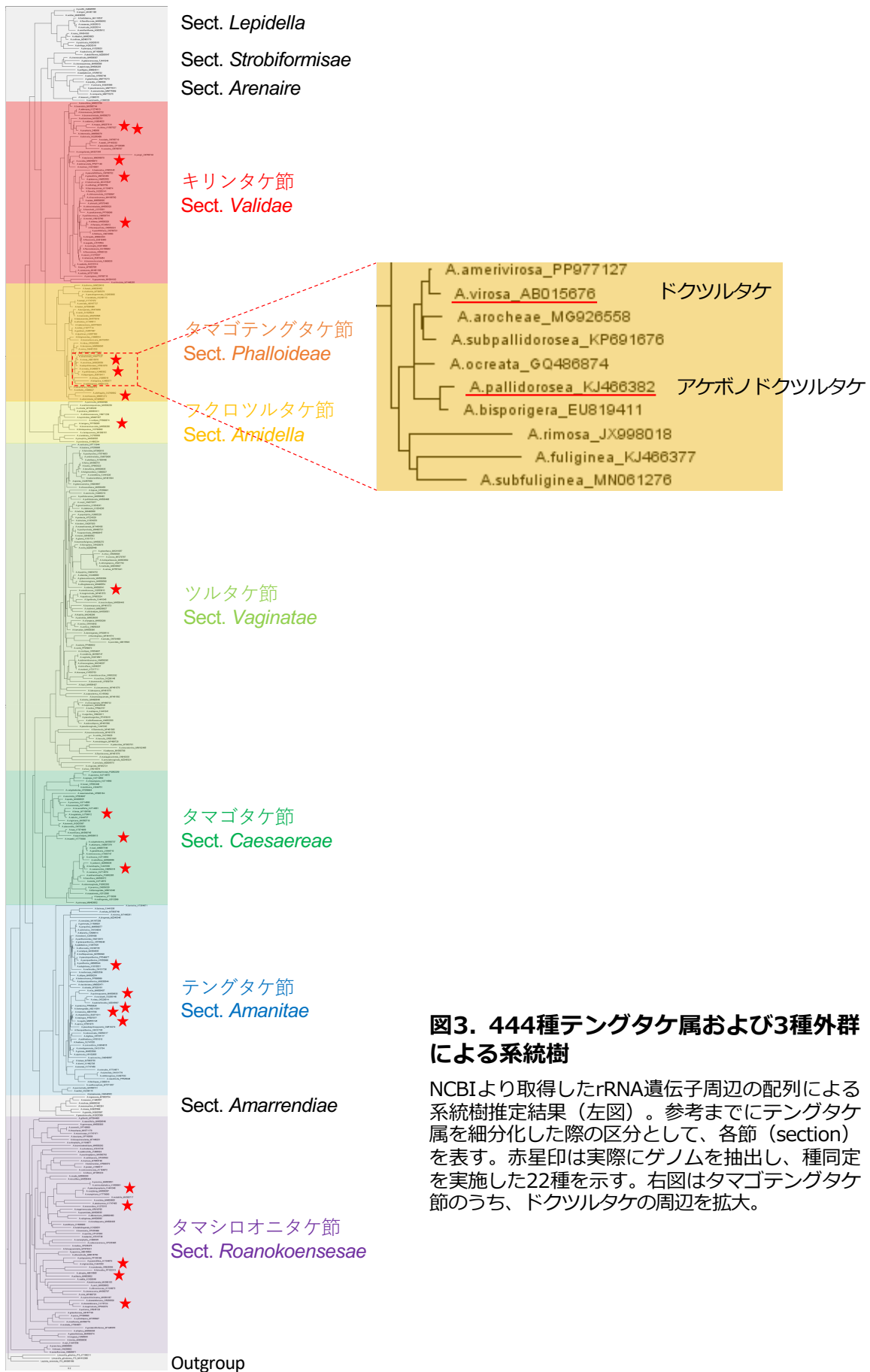


図3. 444種テングタケ属および3種外群による系統樹

NCBIより取得したrRNA遺伝子周辺の配列による系統樹推定結果（左図）。参考までにテングタケ属を細分化した際の区分として、各節（section）を表す。赤星印は実際にゲノムを抽出し、種同定を実施した22種を示す。右図はタマゴテングタケ節のうち、ドクツルタケの周辺を拡大。

C.4 4

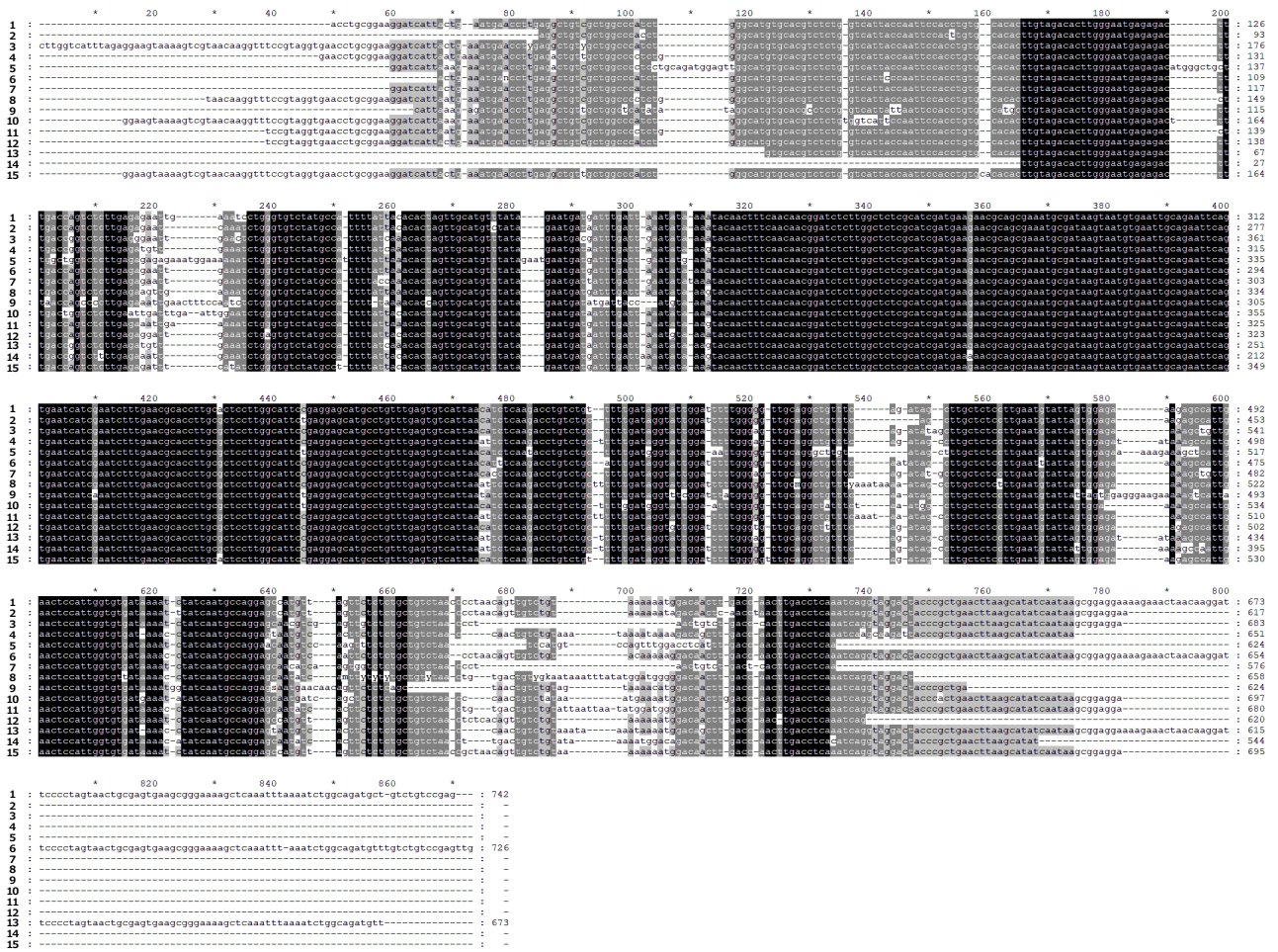
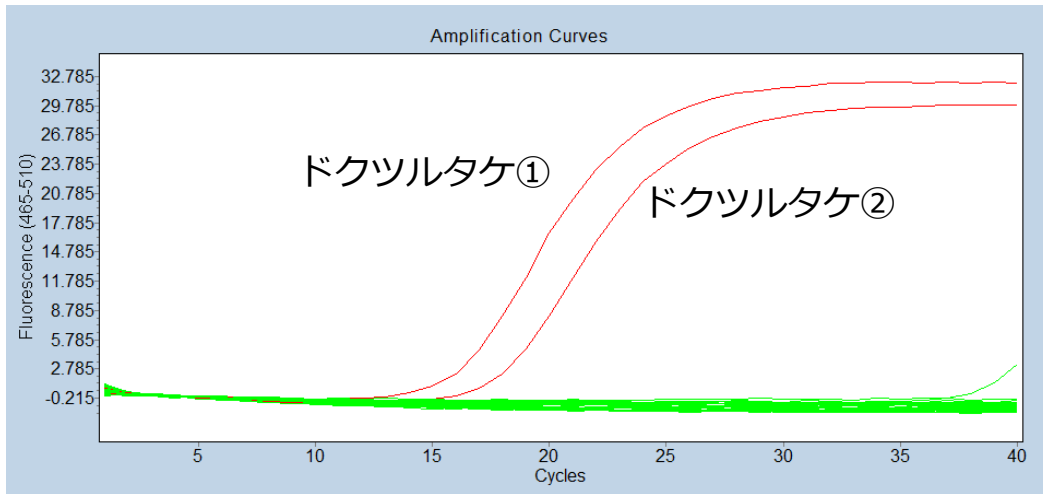


図4. ドクツルタケ近縁種とのrRNA周辺配列の比較

444種のテングタケ属の系統解析の結果、特にドクツルタケに近縁な14種テングタケ属のrRNA周辺配列と多重アライメントを実施した。多重アライメントに使用した種は以下の通り。

- 1: *Amanita amerivirosa*, 2: *Amanita arocheae*, 3: *Amanita bisporigera*,
- 4: *Amanita decipiens*, 5: *Amanita fuliginea*, 6: *Amanita ocreata*,
- 7: *Amanita pallidorozea*, 8: *Amanita phalloides*, 9: *Amanita rimosa*,
- 10: *Amanita subfuliginea*, 11: *Amanita subjunquillea*, 12: *Amanita subpallidorozea*,
- 13: *Amanita verna*, 14: *Amanita vidua*, 15: *Amanita virosa*.



サンプル名	Cq値
コタマゴテングタケ	-
コテングタケ	-
テングタケモドキ	-
コガネテングタケ	-
ヘビキノコモドキ	-
ドクツルタケ①	15.85
ドクツルタケ②	17.59
アケボノドクツルタケ	-
<i>Amanita molliuscula</i>	-
コガネツルタケ	-
タマゴタケ	-
タマゴテングタケモドキ	-
ミヤマタマゴタケ	-
イボテングタケ	-
ベニテングタケ	-
オウテングタケ	-
ウスキテングタケ	-
テングタケダマシ	-
シロオニタケ	-
タマシロオニタケ	-
ニオイドクツルタケ	-
シロテングタケ	-
コテングタケモドキ	-
<i>Amanita lanigera</i>	-
SDW	-

図5.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の特異性確認

テングタケ属キノコ24種のゲノムを用いた特異性試験の結果、本法はドクツルタケのみで増幅が確認された。ドクツルタケのみ2個体用いた。

C.4 表 4

表4. テングタケITS配列のNCBI BLAST検索結果

Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<i>Amanita sp.</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	693	OR058499.1
<i>Amanita pantherina</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	619	LC832100.1
<i>Amanita subglobosa</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	655	PQ855800.1
<i>Amanita subglobosa</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	723	KX810031.1
<i>Amanita pantherina</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	671	MW554376.1
<i>Amanita subglobosa</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	715	ON059314.1
<i>Amanita pantherina</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	674	OQ430774.1
<i>Amanita pantherina</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	703	AB096044.1
<i>Amanita sp.</i>	1127	1127	100%	0	100.00%	673	OR058500.1

C.4 表 5

表5. 各ステップにおけるシーケンスリードの統計値

リード名	reads 1	reads 2	reads 3'	reads 3	reads 4'	reads 4
step	ベースコール (dorado duplex) 後	読み取りエラー訂正 (dorado correct) 後	ミトコンドリアゲノム 由来リード	reads 2 からミトコ ンドリアゲノム由来 リードを抜いた後	バクテリアゲノム由来 リード	reads 3 からバクテ リアゲノム由来リード を抜いた後
リード数	2,398,366	1,037,519	1,328	1,036,191	68,909	967,282
トータル塩基数	33,422,856,116	21,234,493,332	22,382,259	21,212,111,073	1,286,335,346	19,925,775,727
最小塩基長	5	2	226	2	266	2
平均塩基長	13,935.70	20,466.60	16,854.10	20,471.20	18,667.20	20,599.80
最大塩基長	1,196,182	156,474	99,422	156,474	129,944	156,474
配列長： 25パーセントイル	3,374	9,088	5,188	9,098	8,565	9,139
配列長：中央値	8,714	15,854	6,583	15,861	14,588	15,958
配列長： 75パーセントイル	19,130	27,434	24,813	27,436	24,595	27,666
N50	25,880	28,345	33,806	28,340	24,771	28,587
N50の配列数	57,864	48,488	224	48,473	12,547	47,672
GC(%)	44.4	46.44	40.79	46.44	48.97	46.28
全リード中割合 (%)	100	43.3	0.1	43.2	2.9	40.3
全塩基中割合 (%)	100	63.5	0.1	63.5	3.8	59.6

※リード名に関しては図6 参照

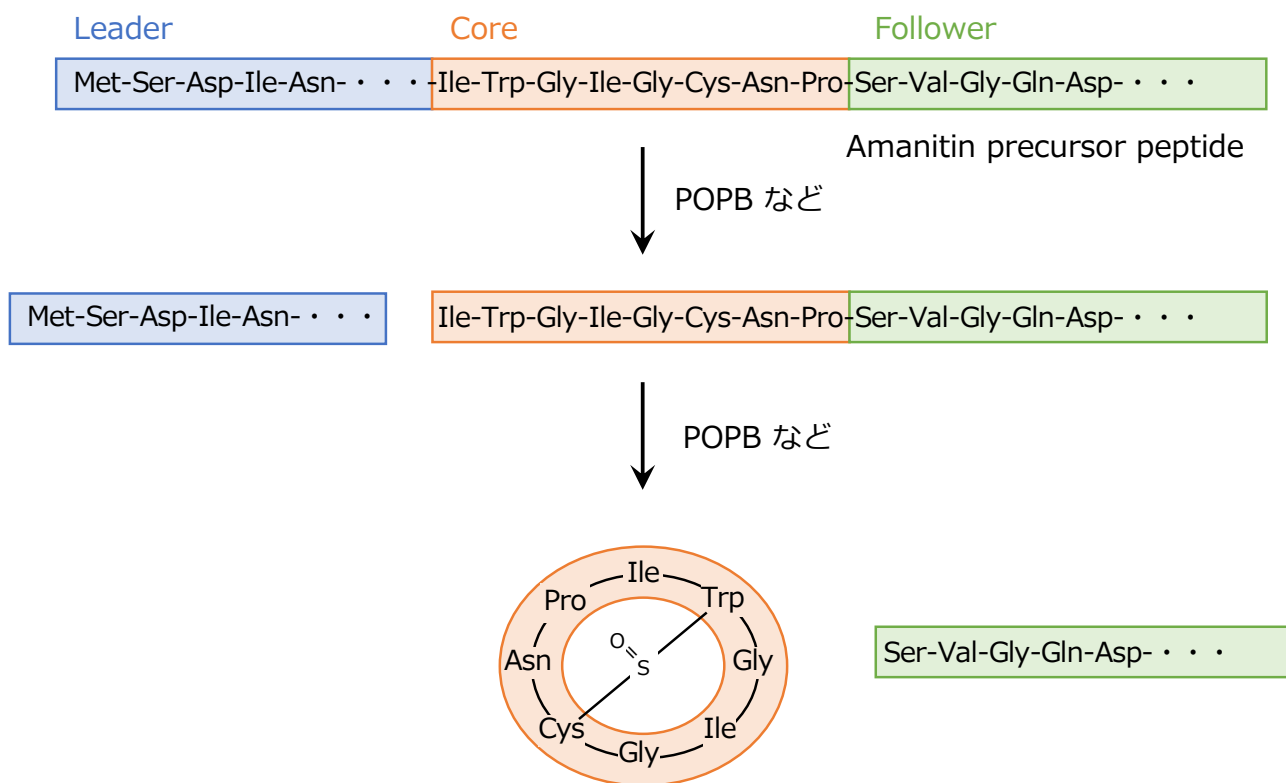
表6. PromethIONの全ゲノムシーケンスによるアセンブリとBUSCO値

ベースコーラー	dorado duplex		dorado duplex		dorado duplex + dorado correct	
アセンブラ	Flye		NECAT		PECAT	
全コンティグ数	459		90		55	※primary
全塩基長	79,160,358		69,843,935		52,450,547	
最短塩基長	532		6,994		6,944	
平均塩基長	172,462.70		776,043.70		953,646.30	
最大塩基長	4,258,084		5,547,760		5,549,241	
N50	342,400		1,456,692		3,792,753	
N50 コンティグ数	63		13		6	
GC(%)	46.82		46.44		47.31	
BUSCO database	fungi_odb1	bacteria_odb1	fungi_odb1	bacteria_odb1	fungi_odb1	bacteria_odb1
	0	0	0	0	0	0
Complete BUSCOs (%)	99.40%	98.40%	99.20%	97.60%	99.40%	97.60%
Complete and single-copy BUSCOs (%)	68.50%	8.10%	69.00%	96.00%	83.00%	59.70%
Complete and duplicated BUSCOs (%)	30.90%	90.30%	30.20%	1.60%	16.40%	37.90%
Fragmented BUSCOs (%)	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.60%
Missing BUSCOs (%)	0.60%	1.60%	0.80%	2.40%	16.40%	0.80%
Total BUSCO groups searched (n)	758	124	758	124	758	124

※PECATで得られる2つのコンティグファイル「primary.fasta」「alternate.fasta」の内、「primary.fasta」を使用して解析した。

表7. フィルタリングリードを用いたアセンブリ結果とBUSCOスコア

ベースコール	dorado duplex		dorado duplex		dorado duplex + dorado correct		
リード由来	-		-				
アセンブラ	細菌属		テングタケ		テングタケ		
アセンブラ	hybracter		Flye		PECAT		
num_seqs	24		356		20		
sum_len	10,298,663		57,876,654		44,265,375		
min_len	1,801		1,173		41,995		
avg_len	429,111		162,574.90		2,213,268.80		
max_len	3,226,132		2,052,353		9,294,163		
sum_gap	0		0		0		
N50	936,362		404,489		3,808,859		
N50_num	3		41		5		
GC(%)	49.84		46.19		46.4		
BUSCO database	fungi_odb10	bacteria_odb10	fungi_odb10	bacteria_odb10	fungi_odb10	bacteria_odb10	agaricales_odb10
Complete BUSCOs (%)	5.90%	99.20%	99.40%	5.60%	99.60%	5.60%	95.40%
Complete and single-copy BUSCOs (%)	1.70%	21.00%	88.30%	5.60%	84.60%	5.60%	81.90%
Complete and duplicated BUSCOs (%)	4.20%	78.20%	11.10%	0.00%	15.00%	0.00%	13.50%
Fragmented BUSCOs (%)	1.80%	0.80%	0.00%	18.50%	0.00%	17.70%	0.40%
Missing BUSCOs (%)	92.30%	0.00%	0.60%	75.90%	0.40%	76.70%	4.20%
Total BUSCO groups searched (n)	758	124	758	124	758	124	3870



### 図8. アマニチンの生合成

$\alpha$ -アマニチンの前駆体ペプチドから、環状化 $\alpha$ -アマニチンの生合成を図示。  
POPB (prolyl oligopeptidase B)などにより、アマニチンの前駆体ペプチドからコアペプチド部分が切り出され、このコアペプチドが環状化する。

表8. テングタケ属の遺伝子検出法に関する論文または書籍

No.	方法	標的遺伝子	検出対象	参照	国
1	サンガーSeq ➔BLAST	ITS、mtDNA	<i>Amanita</i> 属等	rDNAのITS領域のBLAST検索による比較 White et al, 1990, PCR protocol	(書籍)
2	定性PCR 635bp	GPD (glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase)	<i>A. phalloides</i>	Kotlowski et al, 2007, J Food Biochem	ポーランド
3	SYBR-Real- time PCR	毒遺伝子	<i>A. phalloides</i>	Epis et al, 2009, Mycologia	イタリア
4	DNAアレイ	ITS	<i>Amanita</i> species	Harper et al, 2011, J Forensic Sci	米国
5	定性PCR 204bp	ITS	<i>A. Phalloides</i> 等 猛毒種3種	Gausterer et al, 2014, Forensic Sci Int Genet	オーストリア
6	RCA、 定性PCR	AMA	<i>A. phalloideae</i> 節	He et al, 2019, FoodChem	中国
7	LAMP	ITS	<i>A. citrinoannulata</i>	Gao et al, 2022, FoodChem-Oxf	中国
8	TaqMan- Real-time PCR	ITS	10種の強毒Amanita 属	Zhao et al. 2023, LWT	中国
9	定性PCR 300bp	リーダーペプチド MSDIN配列	<i>Amanita</i> 属	Parmen et al, 2023, Trends in Sciences	タイ
10	TaqMan- Real-time PCR	ITS	<i>A. Phalloideae</i> 節	Duan et al, 2024, Front Microbiol	中国
11	SYBR-Real- time PCR	AMA1 ( $\alpha$ -amanitin)	Amanitin産生きのこ	Hoa et al, 2024, Vietnam Journal of Food Control	ベトナム
12	TaqMan- Real-time PCR	ITS	<i>A. exitialis</i>	Zhang et al, 2024, Food Chem	中国
13	DNA- Barcoding	ITS、RPB2	<i>Amanita</i> 属	Xing RR et al. 2024. Appl Microbiol Biotechnol.	中国