

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「食品中の自然毒等のリスク管理のための研究」

令和7年度 分担研究報告書

汎用性の高い植物性自然毒（きのこ）の分析法・同定法の確立

及び

自然毒リスクプロファイルの更新、消費者に対する効果的な情報提供方法の提案

研究分担者 柴田 識人 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 部長

南谷 臣昭 岐阜県保健環境研究所 食品安全検査センター 専門研究員

研究要旨：

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

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

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

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

研究協力者

竹内 浩（岐阜県保健環境研究所）

友澤 潤子（滋賀県衛生科学センター）

谷口 賢（名古屋市衛生研究所）

山口 瑞香（大阪健康安全基盤研究所）

野村 千枝（大阪健康安全基盤研究所）

吉岡 直樹（兵庫県立健康科学研究所）

原 有紀（三重県保健環境研究所）

吉村 英基（三重県保健環境研究所）

平井 知里（福井県衛生環境研究センター）

土屋 小百合（福井県衛生環境研究センター）

有沢 拓也（富山県衛生研究所）

茅原田 一（岐阜市衛生試験所）

田島 祥吾（石川県保健環境センター）

小郷 沙矢香（静岡県環境衛生科学研究所）

木村 亜莉沙（静岡市環境保健研究所）

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

A. 研究目的

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

令和 3-5 年度厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業「自然毒等のリスク管理のための研究 (21KA1005; 研究代表者：鈴木敏之)」において、きのこ及び高等植物に関する見直しに着手した。本分担研究では、その継続作業を行うとともに動物性自然毒のリスクプロファイルの見直しを行う。

B. 研究方法

1. 分析法

1.1 試薬・試液

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

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

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

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

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

1.2 装置

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

機関 L の使用装置

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

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

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

1.3 LC-MS/MS 測定条件

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

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

1.4 試験溶液の調製

分析法 2 の試験溶液調製法の概略を図 1-1 に示す。

1.4.1 抽出

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

1.4.2 精製

抽出液を 2 mL 採り、遠心沈殿管 (10-15 mL 容) にセットした Captiva EMR-Lipid カートリッジに負荷し、常温、1,000×g で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てた。このカートリッジを別の遠心沈殿管にセットして、さらに抽出液 1 mL を負荷し、同様に遠心分離して溶出液を採取した。

1.4.3 誘導体化

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

1.5 定量

検量線用標準溶液の調製のため、最初に以下の溶液を調製した。

① 1 µg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液

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

② 0.1 µg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液

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

③ 1 µg/mL 2 種混合内部標準溶液

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

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

1.6 模擬試料

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

きのこのシチュー

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

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

ベニテングタケ添加試料

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

1.7 標準添加法による模擬試料の値付け

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

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

1.8 均質性試験、安定性試験

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

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

1.9 ブランク試験

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

1.10 室間共同試験

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

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

2. 同定法

2.1 子実体サンプル採取情報

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

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

2.2 DNA 抽出方法

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

2.3 DNA 配列による菌種推定

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

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

ITS 周辺塩基配列⁵⁾：

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

rpb2 遺伝子配列⁶⁾：

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

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

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

2.4 種特異的配列の探索

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

2.5 リアルタイム PCR

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

2.6 デジタル PCR

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

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

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

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

2.8 熱分解試験

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

2.9 全ゲノムシーケンス

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

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

2.10 アセンブリ評価

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

3. 「自然毒のリスクプロファイル」の更新

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

C. D. 研究結果及び考察

1. 分析法

1.1 試験に用いた模擬試料

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

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

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

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

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

1.2 模擬試料の均質性と安定性

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

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

1.3 室間共同試験

1.3.1 各機関の定性結果と選択性

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

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

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

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

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

1.3.2 データスクリーニングと外れ値検定

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

1.3.3 妥当性確認の結果

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

パラメーターはいずれも農水省のガイドラインに適合していた（表1-6）。

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

1.3.4 内部標準補正について

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

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

2. 同定法

2.1 リアルタイム PCR 法によるドクツルタケ特異的遺伝子検査法の開発

2.1.1 テングタケ属子実体サンプルの菌種推定

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

2.1.2 ドクツルタケ遺伝子検査法の特異性確認

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

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

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

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

2.1.4 ドクツルタケ遺伝子検査法の検出限界および増幅効率評価

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

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

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

2.1.5 ゲノム熱分解による検出性能への影響

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

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

2.2 リアルタイム PCR 法を用いたイボテングタケ特異的検査法の開発

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

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

2.2.2 イボテングタケ特異的リアルタイム PCR の特異性評価

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

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

2.3 イボテングタケ 2 個体のゲノムアセンブリ

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

2.3.1 rpb2 領域の塩基配列による種推定

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

2.3.2 全ゲノムシーケンス

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

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

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

2.3.3 ミトコンドリアゲノムの探索

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

2.3.4 リードフィルタリングとゲノムアセンブリ

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

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

2.3.5 ドラフトゲノムの評価と比較

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

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

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

2.3.6 イボテングタケのゲノムアセンブリの総括

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

3. 「自然毒のリスクプロファイル」の更新

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

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

E. 結論

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

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

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

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

F. 研究発表・業績

1. 論文発表

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

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

2. 学会発表

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

3. 行政関係者向け説明会

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

4. 市民向け発表会

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 参考文献

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

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

表 1-1 室間共同試験参加 15 機関の LC-MS/MS 測定条件

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

* A value reflecting the reduction in injection volume

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

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

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

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

表 1-2 機関 L の MS/MS 条件

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

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

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

表 1-3 室間共同試験のクライテリア(農水省のガイドラインをもとに作成)

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

表 1-4 室間共同試験の結果—ムスカリンクロリド

ACQUITY column

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

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

Xselect column

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

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

表 1-5 室間共同試験の結果ーイボテン酸

ACQUITY column

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

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

Xselect column

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

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

表 1-6 室間共同試験の結果—ムシモール

ACQUITY column

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

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

Xselect column

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

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

表 2-1. 参照した NCBI genome assembly 情報

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

表 2-2. テングタケ属 64 個体の菌種推定結果

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

N.A.: 読み取り不可

N.D.: 登録配列なし

表 2-3. イボテングタケ③のリードフィルタリング結果

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

表 2-4. イボテングタケ④のリードフィルタリング結果

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

表 2-5. フィルタリング前後におけるゲノムアセンブリ結果

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

* : raw リードをリードフィルタリングなしでアセンブルしたもの

** : リードフィルタリングを施した後にアセンブルしたもの

表 2-6. bacteria_odb12 を用いた BUSCO

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

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

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

表 2-7. イボテングタケ①のドラフトゲノム評価結果(評価②**)

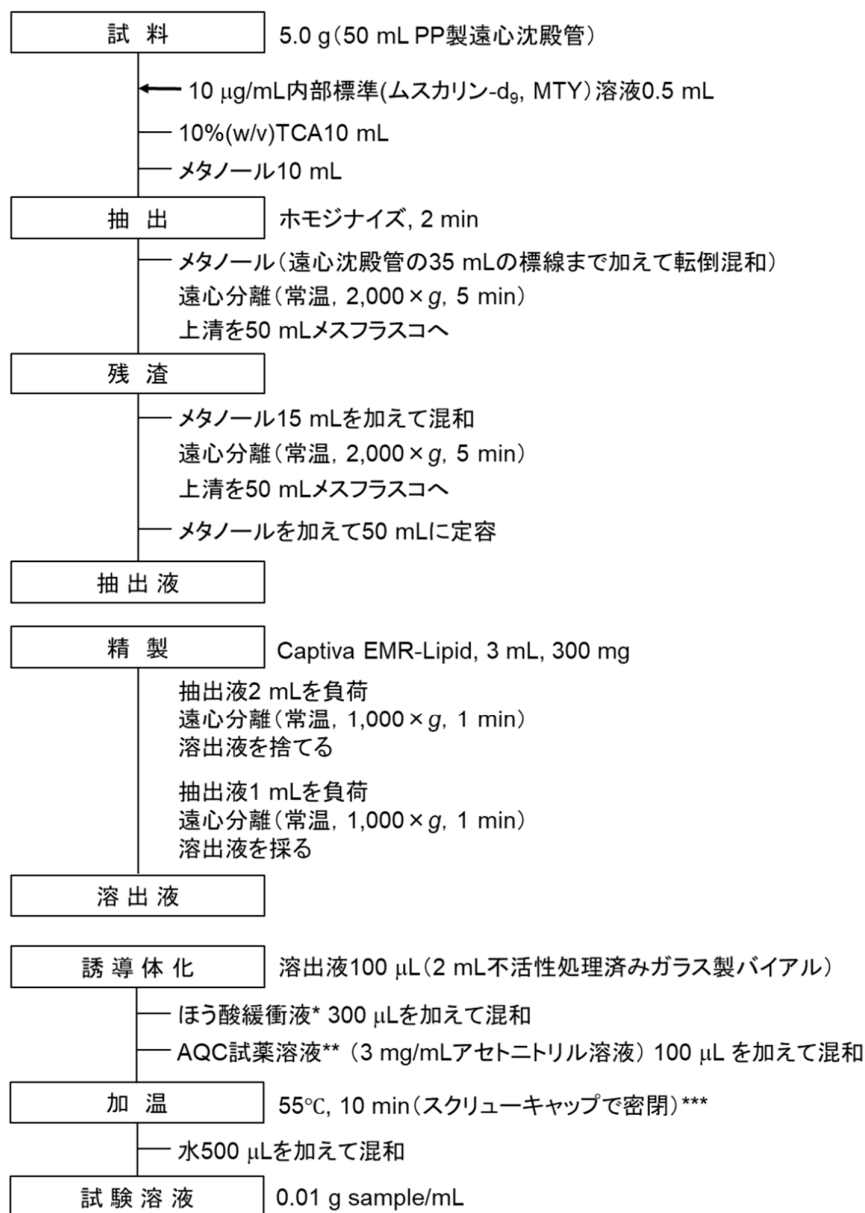
BUSCO データセット	fungi_odb12	basidiomycota_odb12	agaricomycetes_odb12	agaricales_odb12	bacteria_odb12
Complete BUSCOs (%)	97.9	97.6	95.1	91.1	9.5
Complete and single-copy BUSCOs (%)	97.0	96.8	94.6	90.7	9.5
Complete and duplicated BUSCOs (%)	0.9	0.7	0.6	0.4	0
Fragmented BUSCOs (%)	0.7	0.6	1.2	1.5	22.4
Missing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

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

表 2-8. イボテングタケ②のドラフトゲノム評価結果(評価②**)

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

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



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

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

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

***バイアルをアルミブロックに入れて加熱

図 1-1 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 前処理操作フロー

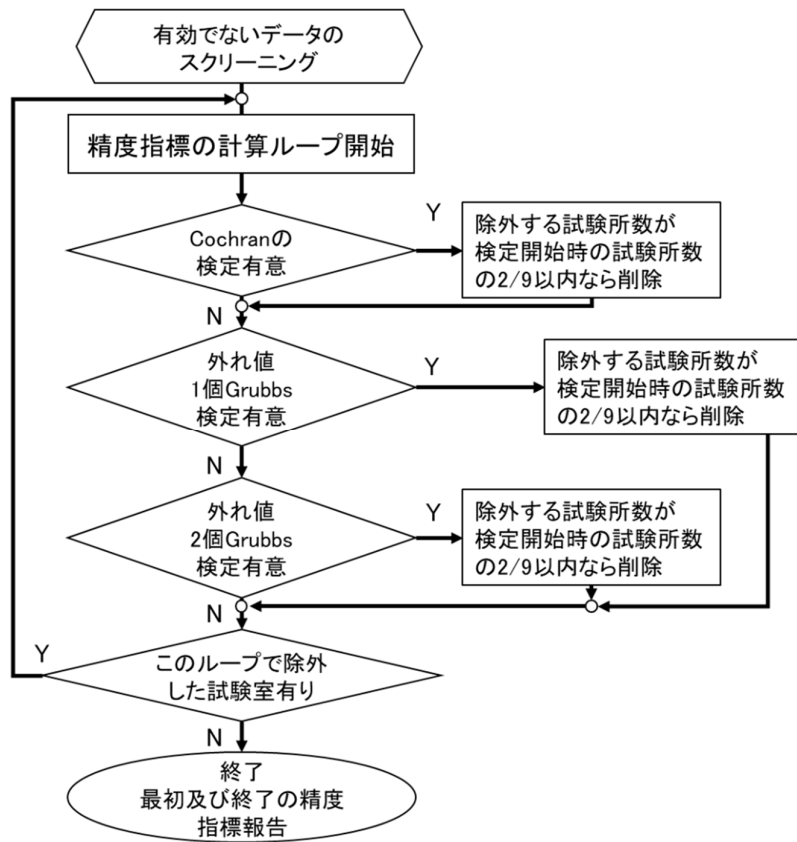


図 1-2 室間共同試験のデータのスクリーニング及び検定のフローチャート

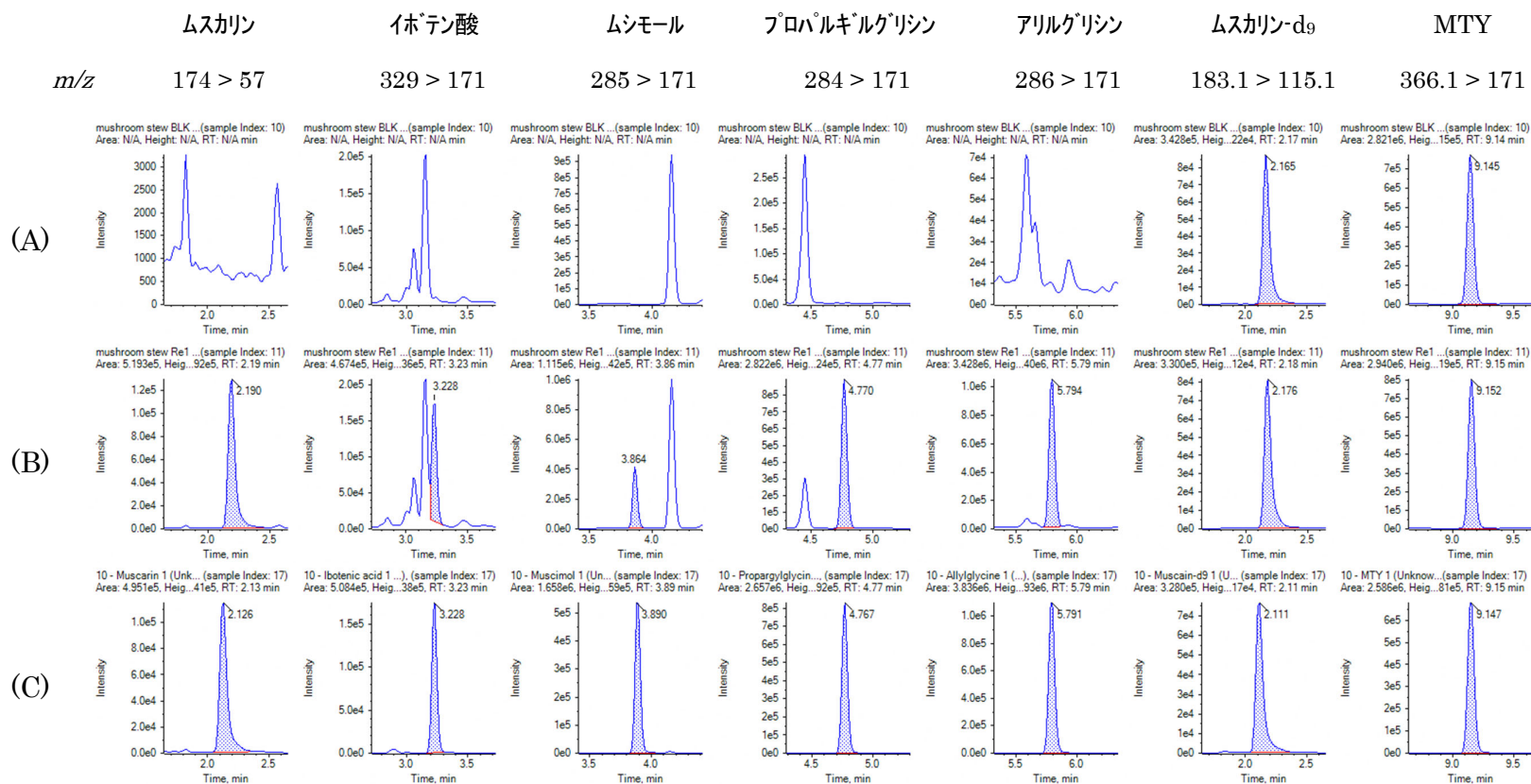


図 1-3 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 の分析対象化合物の SRM クロマトグラム (Condition a in Table 1-1)

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

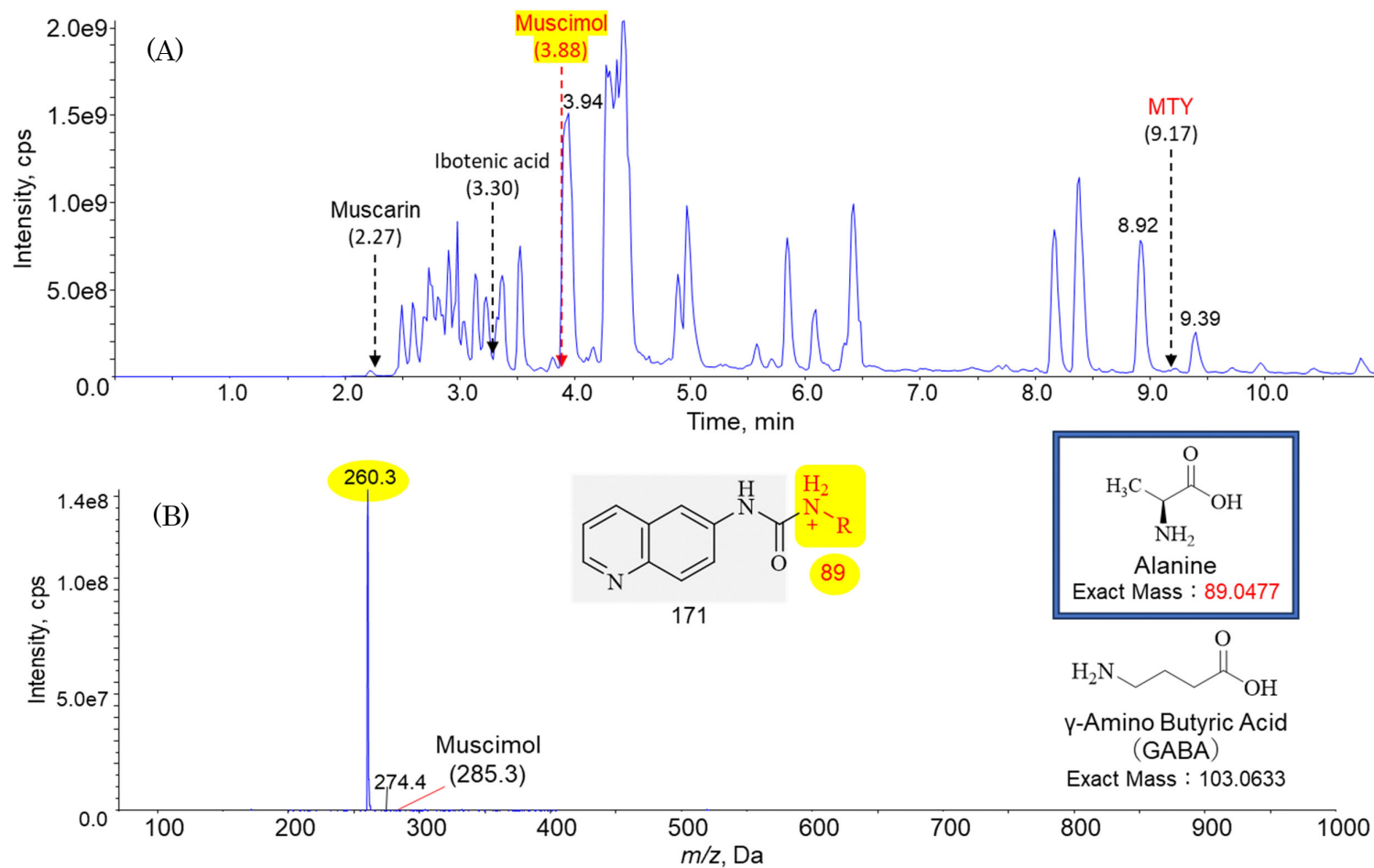


図 1-4 模擬試料(きのこシチュー)試験溶液(0.01 g sample/mL)の m/z 171 におけるプリカーサーイオンスキャン結果

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

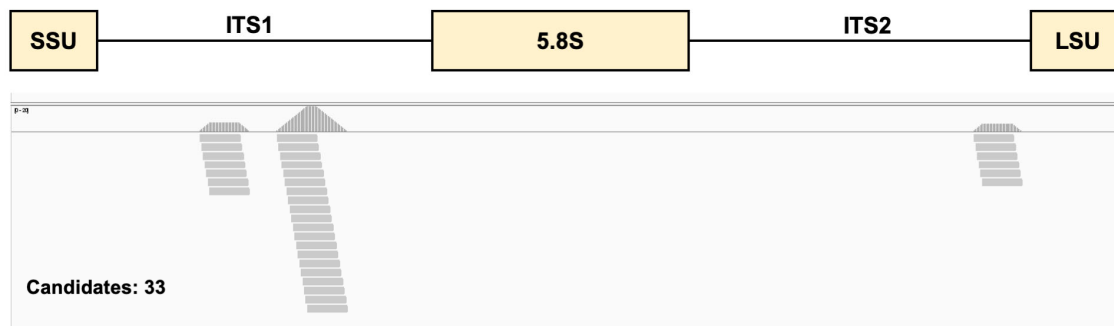


図 2-1. BLAST_TSN 解析によるドクツルタケ特異的配列の同定

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

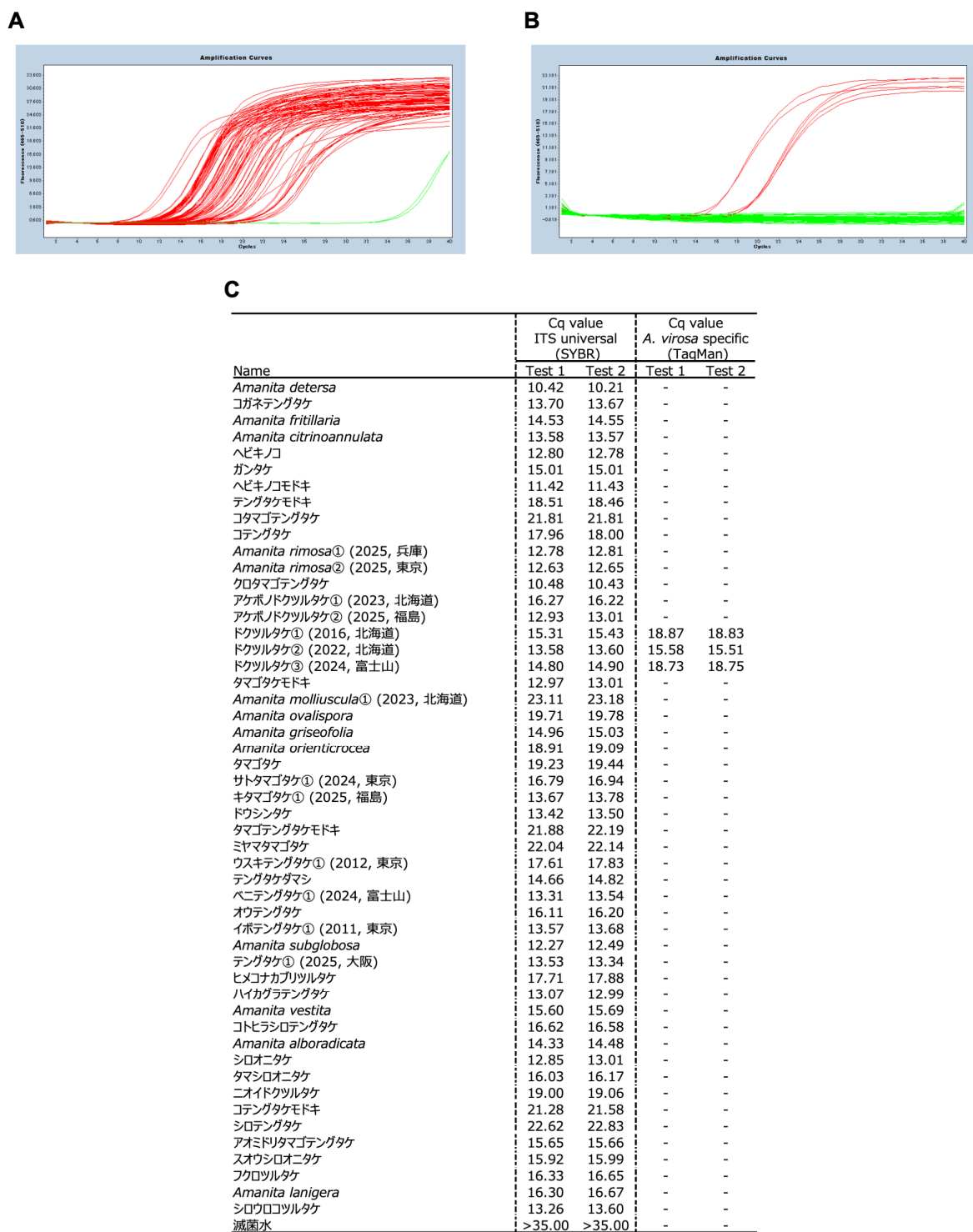


図 2-2. ドクツルタケを標的としたリアルタイム PCR 法の特異性試験結果

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

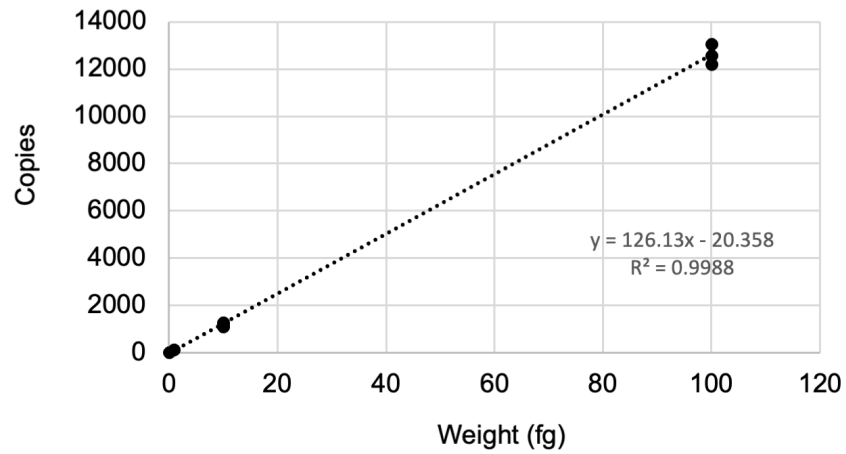


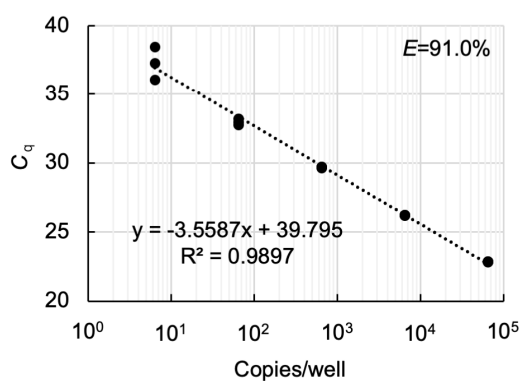
図 2-3. ドクツルタケ陽性コントロールプラスミドのコピー数定量

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

A

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

B



C

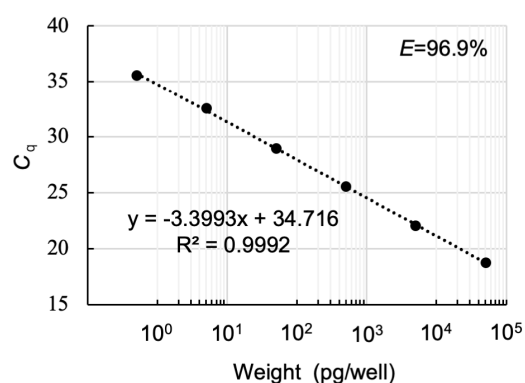


図 2-4. ドクソルタケ特異的検知法の検出限界試験および増幅効率試験

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

なお、増幅効率 は以下のように算出。

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

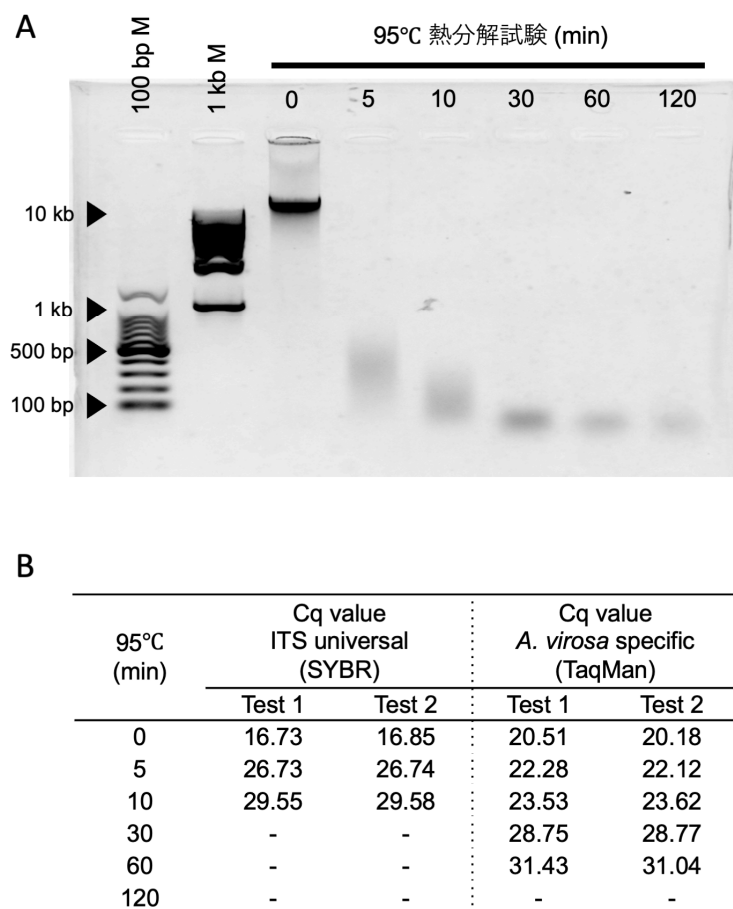


図 2-5. ドクツルタケ特異的検知法の熱分解試験

(A) 熱処理したドクツルタケゲノム DNA のアガロース電気泳動像。

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

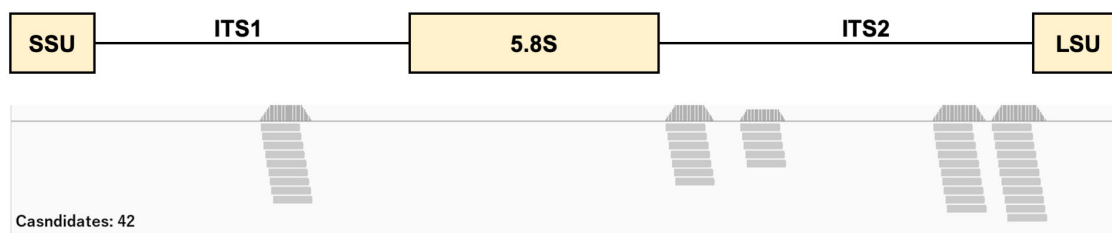


図 2-6. BLAST_TSN 解析によるイボテングタケ特異的配列の同定

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

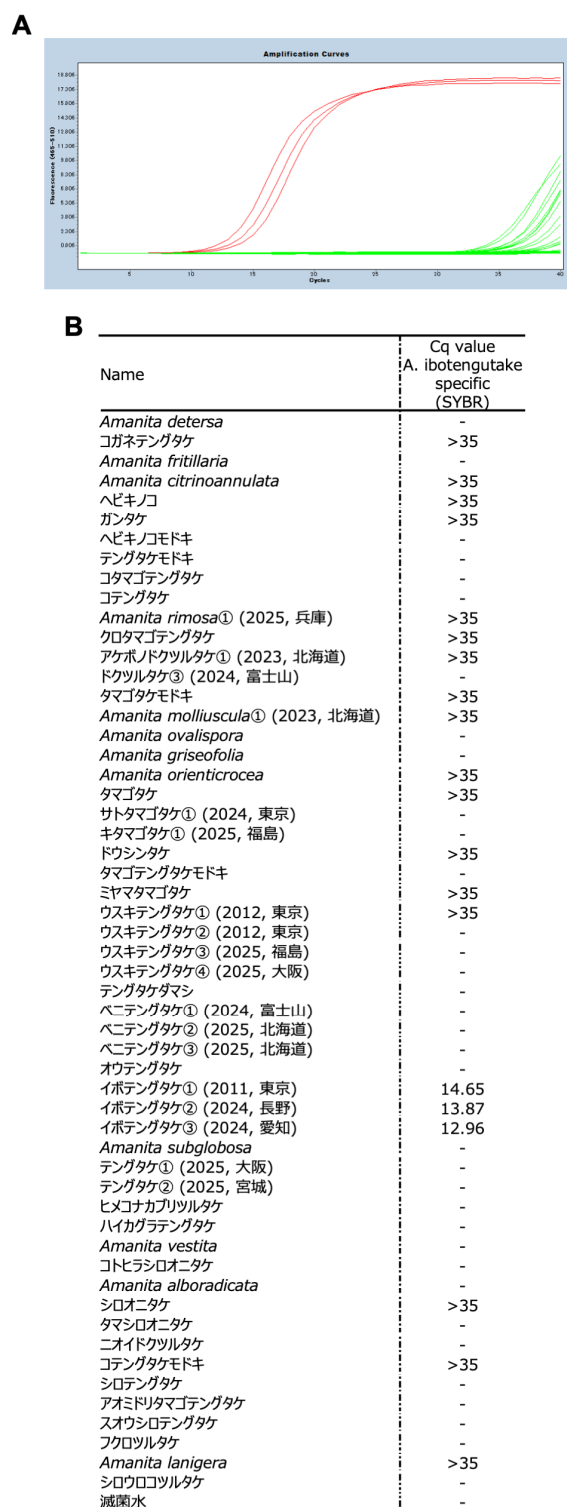


図 2-7. イボテングタケ特異的リアルタイム PCR 法の特異性試験結果

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

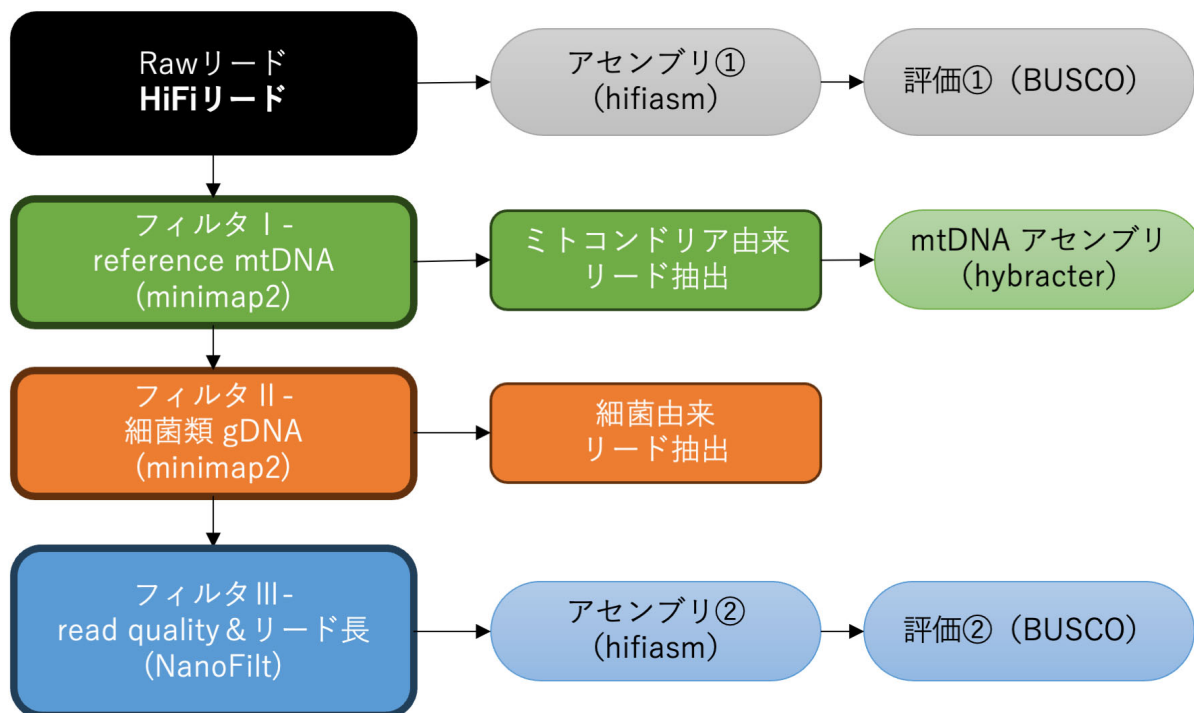


図 2-8. ゲノムアセンブリ検討スキーム

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

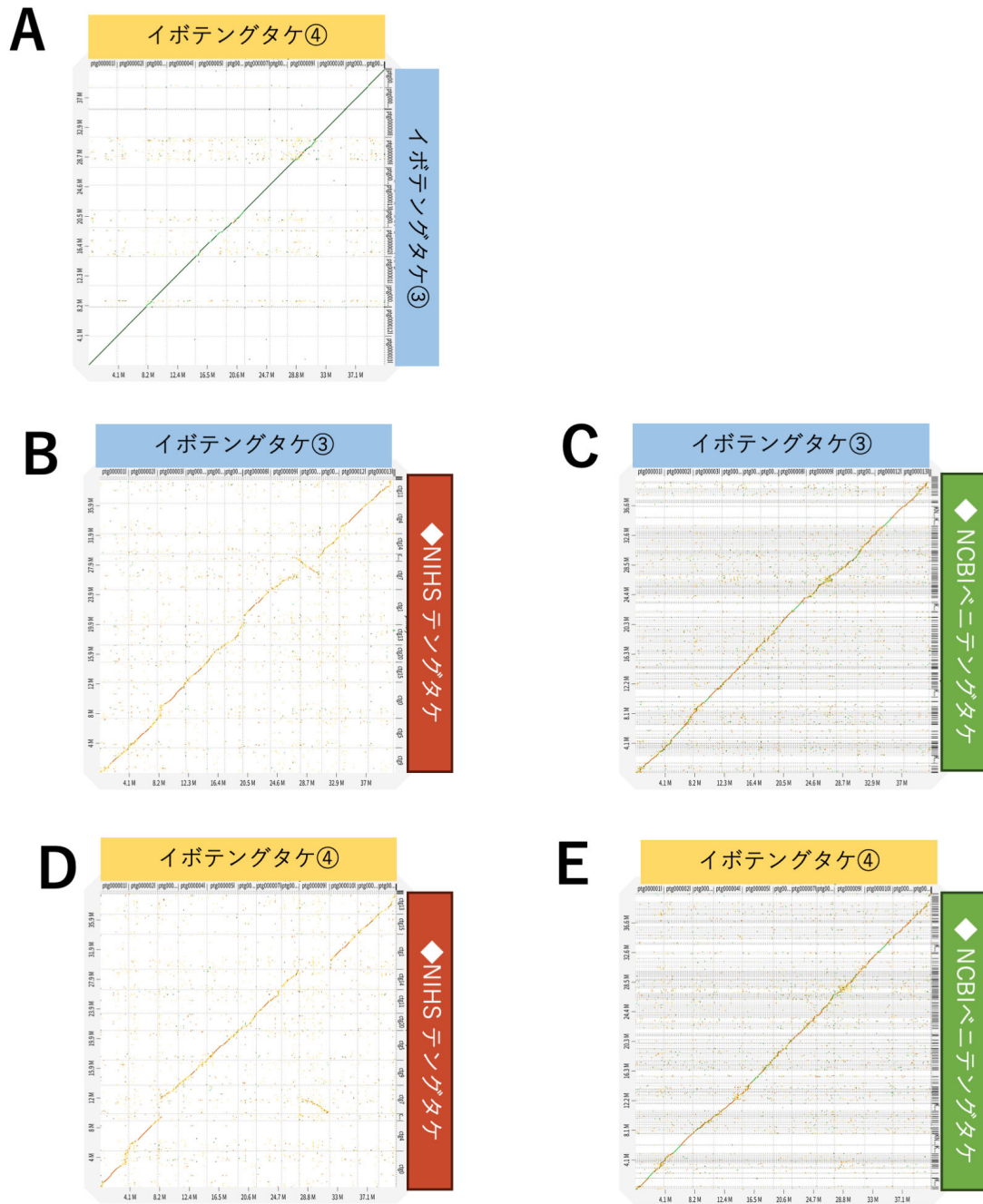


図 2-9. イボテングタケドラフトゲノムおよび近縁種ゲノムとの比較(D-GENIES)

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