

食品中の自然毒等のリスク管理のための研究

研究代表者 鈴木 敏之 北里大学 教授

研究要旨：

「雑種ふぐの発生状況及び流通状況の把握」

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

「麻痺性貝毒の機器分析法の確立」

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

「植物性自然毒（きのこ含む）の食中毒防止策」

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

「植物性自然毒（きのこ）の分析法・同定法の確立」

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

「自然毒リスクプロファイルの更新」

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

研究分担者氏名・所属研究機関名及び

所属研究機関における職名

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

上間 匡・国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生
管理部長

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

土方 悠希・愛知県衛生研究所・生物学部・医動物研究室主任
志田 静夏・国立医薬品食品衛生研究所・食品部第三室長
南谷 臣昭・岐阜県保健環境研究所・食品安全検査センター専門研究員
柴田 識人・国立医薬品食品衛生研究所・生化学部長

A. 研究目的

A-1. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握

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

A-2. 国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

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

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

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

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

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

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

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

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

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

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

A-4. 汎用性の高い植物性自然毒（きのこ）の分析法・同定法の確立

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

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

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

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

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

と注意喚起のために、これをホームページ上に公開している。

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

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

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

B. 研究方法

B-1. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握

(1) 雑種ふぐ

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

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

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

(2) しらす混入ふぐ仔稚魚

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

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

B-2. 国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

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

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

EC50 を評価した。

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

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

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

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

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

B-3-1. 試料

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

B-3-2. 試薬等

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

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

B-3-3. 装置

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

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

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

B-3-4. 測定条件

(1) SFC 条件

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

(2) MS 条件

ESI(+) モードで SRM 測定した。

B-3-5. 標準溶液調製法

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

B-3-6. 試料粉砕法

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

B-3-7. 試験溶液調製法

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

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

B-3-8. 分析法の性能評価

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

B-4. 汎用性の高い植物性自然毒 (きのこ) の分析法・同定法の確立

B-4-1. 分析法

B-4-1-1. 試薬・試液

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

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

B-4-1-2. 装置

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

機関 L の使用装置

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

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

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

B-4-1-3. LC-MS/MS 測定条件

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

B-4-1-4. 試験溶液の調製

分析法 2 の試験溶液調製法の概略を図 B-4-1 に示す。

B-4-1-4-1. 抽出

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

B-4-1-4-2. 精製

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

B-4-1-4-3. 誘導体化

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

B-4-1-5. 定量

検量線用標準溶液の調製のため、最初に以

下の溶液を調製した。

① 1 μg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液

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

② 0.1 μg/mL 5 種きのこ毒混合標準溶液

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

③ 1 μg/mL 2 種混合内部標準溶液

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

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

B-4-1-6. 模擬試料

室間共同試験の模擬試料は、Jansson らの報告⁹⁾に従い、ベニテングタケを含むきのこのシチューを調製して用いた。ベニテングタケは、2023 年 10 月に岐阜県内の山林で採取後、-20°C 以下で冷凍してあったものを凍結粉碎して用いた。

きのこのシチュー

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

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

粉碎均質化した。

ベニテングタケ添加試料

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

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

B-4-1-7. 標準添加法による模擬試料の値付け

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

B-4-1-8. 均質性試験、安定性試験

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

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

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

B-4-1-9. ブランク試験

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

B-4-1-10. 室間共同試験

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

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

B-4-2. 同定法

B-4-2-1. 子実体サンプル採取情報

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

B-4-2-2. DNA 抽出方法

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

B-4-2-3. DNA 配列による菌種推定

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

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

ITS 周辺塩基配列³⁾：

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

rpb2 遺伝子配列⁴⁾：

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

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

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

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

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

B-4-2-4. 種特異的配列の探索

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

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

B-4-2-5. リアルタイム PCR

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

B-4-2-6. デジタル PCR

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

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

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

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

B-4-2-8. 熱分解試験

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

B-4-2-9. 全ゲノムシーケンス

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

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

B-4-2-10. アセンブリ評価

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

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

を行った。

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

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

C. 研究結果及び考察

C-1. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握

(研究結果)

(1) 雑種ふぐ

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

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

(2) しらす混入ふぐ仔稚魚

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

前年度・今年度に DNA マーカーでシロサバ

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

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

(考察)

(1) 雑種ふぐ

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

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

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

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

(2) しらす混入ふぐ仔稚魚

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

された。

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

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

C-2. 国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立

(1) 麻痺性貝毒の代謝物 (M-toxin)

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

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

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

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

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

(2) 二枚貝中のフグ毒 (tetrodotoxin, TTX)

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

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

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

C-3-1. 分析カラムの検討

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

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

UC-HyP を用いることとした。

C-3-2. 試験溶液の調製

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

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

C-3-3. マトリックスの影響

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

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

C-3-4. 分析法の性能評価

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

C-3-4-1. 選択性

ナツメグにおいては、妨害ピークは認められなかった。

C-3-4-2. 直線性

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

C-3-4-3. 真度及び精度

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

C-3-5. 汚染実態の予備調査

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

C-4. 汎用性の高い植物性自然毒 (きのこ) の分析法・同定法の確立

C-4-1. 分析法

C-4-1-1. 試験に用いた模擬試料

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

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

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

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

C-4-1-2. 模擬試料の均質性と安定性

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

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

C-4-1-3. 室間共同試験

C-4-1-3-1. 各機関の定性結果と選択性

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

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

C-4-1-3-2 データスクリーニングと外れ値検定

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

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

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

C-4-1-3-3. 妥当性確認の結果

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

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

C-4-1-3-4. 内部標準補正について

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

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

C-4-2. 同定法

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

C-4-2-1-1. テングタケ属子実体サンプルの菌種推定

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

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

C-4-2-1-2. ドクツルタケ遺伝子検査法の特異性確認

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

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

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

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

C-4-2-1-4. ドクツルタケ遺伝子検査法の検出限界および増幅効率評価

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

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

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

C-4-2-1-5. ゲノム熱分解による検出性能への影響

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

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

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

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

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

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

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

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

C-4-2-2-3. イボテングタケ 2 個体のゲノムアセンブリ

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

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

C-4-2-2-3-1. rpb2 領域の塩基配列による種推定

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

C-4-2-2-3-2. 全ゲノムシーケンス

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

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

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

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

C-4-2-2-3-4. リードフィルタリングとゲノムアセンブリ

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

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

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

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

高い相同性を示した (図 C-4-6 C, C-4-6 E)。

C-4-2-2-3-6 イボテングタケのゲノムアセンブリの総括

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

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

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

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

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

D. 結論

D-1. 雑種ふぐの発生状況及びふぐの流通状況の把握

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

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

D-2. 国際動向を踏まえた麻痺性貝毒の機器分析法の確立

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

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

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

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

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

D-4. 汎用性の高い植物性自然毒（きのこ）の分析法・同定法の確立

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

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

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

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

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

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

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

2. 学会発表

- 1) 2025 年度日本魚類学会年会、2025 年 11 月 22 日 (土)、東京海洋大学、演題：日本産サバフグ属魚類 *Lagocephalus* 全 7 種およびそれらの雑種を迅速に判別できる新たな SNP マーカーセット、講演者：高橋 洋・安松篤紀・沖村未和子・柿岡 諒
- 2) 2025 年度日本魚類学会年会、2025 年 11 月 22 日 (土)、東京海洋大学、演題：自然下でのトラフグ属 2 種ペア間の交雑ダイナミクスに関するゲノム分析、講演者：熊谷英紀・沖村未和子・武藤 望生・永野 惇・柿岡 諒・高橋 洋
- 3) 2026 年度水産海洋シンポジウム「水産資源解析×ゲノミクス=ゲノム水産資源解析：現代的統合と今後の展開」、2026 年 3 月 21 日 (土)、東京海洋大学、演題：自然種間交雑現象×集団ゲノミクス：トラフグ属魚類 2 種ペア間の交雑ダイナミクス、講演者：高橋 洋・熊谷英紀・沖村未和子・武藤 望生・永野 惇・柿岡 諒
- 4) 令和 8 年度日本水産学会春季大会、2026 年 3 月 26 日 (木)、東京海洋大学、演題：トラフグとマフグの雑種における部位別テトロドトキシン含量、講演者：辰野竜平・宮田祐実・福田 翼・古下 学・沼野 聡・渡邊龍一・鈴木敏之・高橋 洋
- 5) 漁場環境保全関係研究開発推進会議 赤潮貝毒部会 東日本貝毒分科会 (2025、仙台)、演題：我が国沿岸の二枚貝における麻痺性貝毒 C3 および C4 の蓄積について、講演者：沼野 聡、稲葉 彩、渡邊龍一、西村朋宏、毛利文香、宮村和良、加賀新之助、渡邊志穂、内田 肇、小澤真由、松嶋良次
- 6) 第 11 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2025、埼玉)、演題：LC-MS/MS を用いた麻痺性貝毒分析に関する研究、講演者：沼野 聡、内田 肇、小澤真由、松嶋良次、渡邊龍一
- 7) マリンバイオテクノロジー学会 (2025、広島) (優秀演題)、演題：二枚貝の rDNA の PCR 増幅を特異的に抑制する PNA clamp の開発、講演者：飯島巧望、山口晴生、大西浩平、夏池真史、渡邊龍一、小澤真由、内田 肇、沼野 聡、松嶋良次、鈴木敏之、足立真佐雄
- 8) 第 31 回 日本食品化学会 総会・学術大会 (2025、滋賀)、演題：LC-MS/MS を用いた毒化ホタテガイ中の麻痺性貝毒組成の解析、講演者：沼野 聡、渡邊龍一、内田 肇、小澤真由、松嶋良次、鈴木敏之
- 9) 第 121 回 食品衛生学会 学術講演会 (2025、東京)、演題：アサリにおける麻痺性貝毒代謝物 (M1) の精製法と毒性評価、講演者：土方悠希、長谷川晶子、沼野 聡、渡邊龍一、小澤真由、内田 肇、松嶋良次、鈴木敏之、安井善宏
- 10) 第 62 回 全国衛生化学技術協議会 年会

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

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

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

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

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

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

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

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

開発、講演者：成島純平、杉野御祐、吉場聡子、曾我慶介、柴田識人

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

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

3. 行政関係者向け説明会

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

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

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 B-4-1. 参照した NCBI genome assembly 情報

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

表 C-4-1. イボテングタケ③のリードフィルタリング結果

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

表 C-4-2. イボテングタケ④のリードフィルタリング結果

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

表 C-4-3. フィルタリング前後におけるゲノムアセンブリ結果

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

* : raw リードをリードフィルタリングなしでアセンブルしたもの

** : リードフィルタリングを施した後にアセンブルしたもの

表 C-4-4. イボテングタケ①のドラフトゲノム評価結果 (評価②**)

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

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

表 C-4-5. イボテングタケ②のドラフトゲノム評価結果 (評価②**)

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

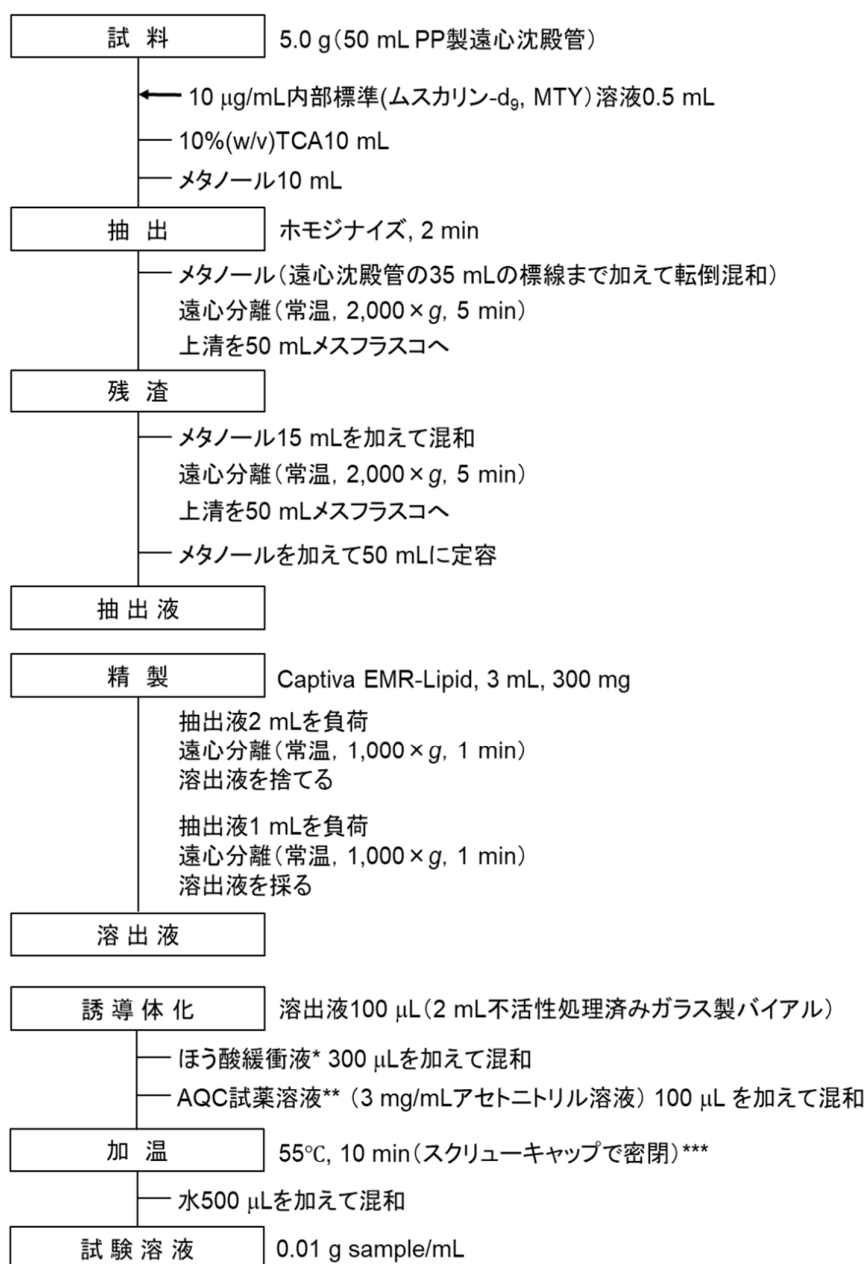
** : リードフィルタリングを施した後にアセンブルして BUSCO 評価したもの

表 C-4-6. bacteria_odb12 を用いた BUSCO

BUSCO 解析対象	イボテンガタケ③		イボテンガタケ④		NIHS	NCBI	NCBI	NCBI
	コンティグ 評価①*	コンティグ 評価②**	コンティグ 評価①*	コンティグ 評価②**	テンガタケ	ベニテンガタケ	マツタケ	シイタケ
BUSCO データセット	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



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

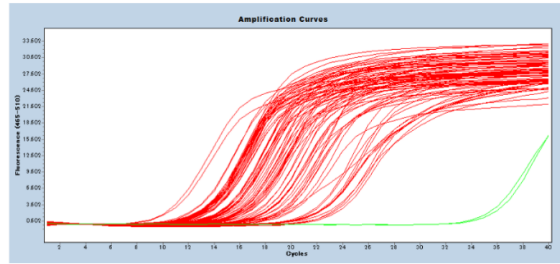
**AccQ•Tag™ Ultra Derivatization Kit (Waters, Part#. 186003836)を使用

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

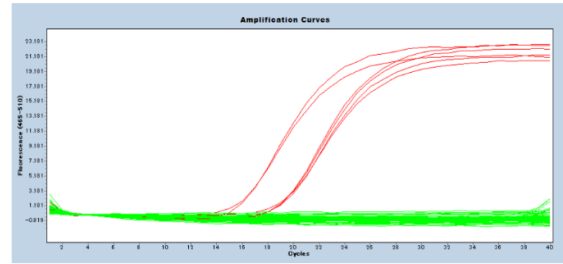
***バイアルをアルミブロックに入れて加熱

図 B-4-1 毒きのこの毒成分一斉分析法 2 前処理操作フロー

A



B

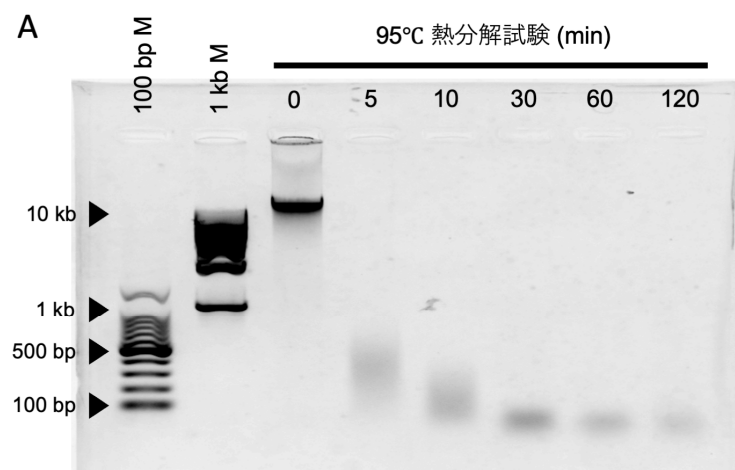


C

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

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

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



B

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

図 C-4-2. ドクツルタケ特異的検知法の熱分解試験

(A) 熱処理したドクツルタケゲノム DNA のアガロース電気泳動像。

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

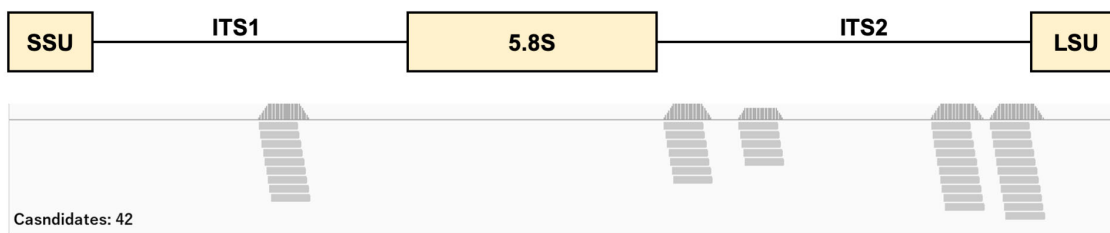
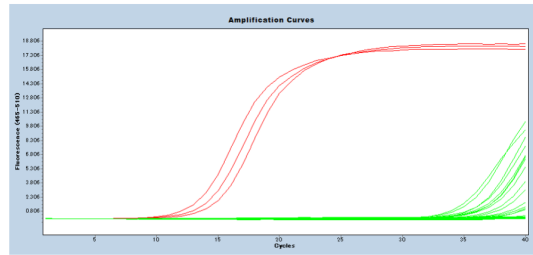


図 C-4-3. BLAST_TSN 解析によるイボテングタケ特異的配列の同定

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

A



B

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

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

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

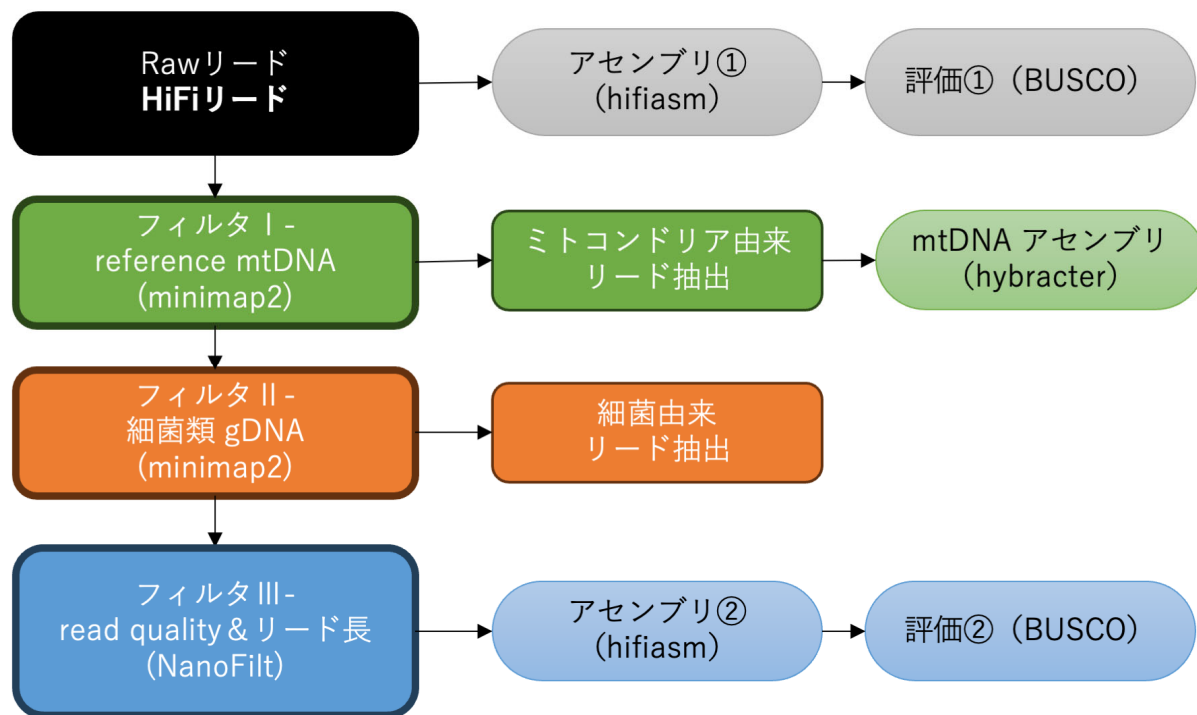


図 C-4-5. ゲノムアセンブリ検討スキーム

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

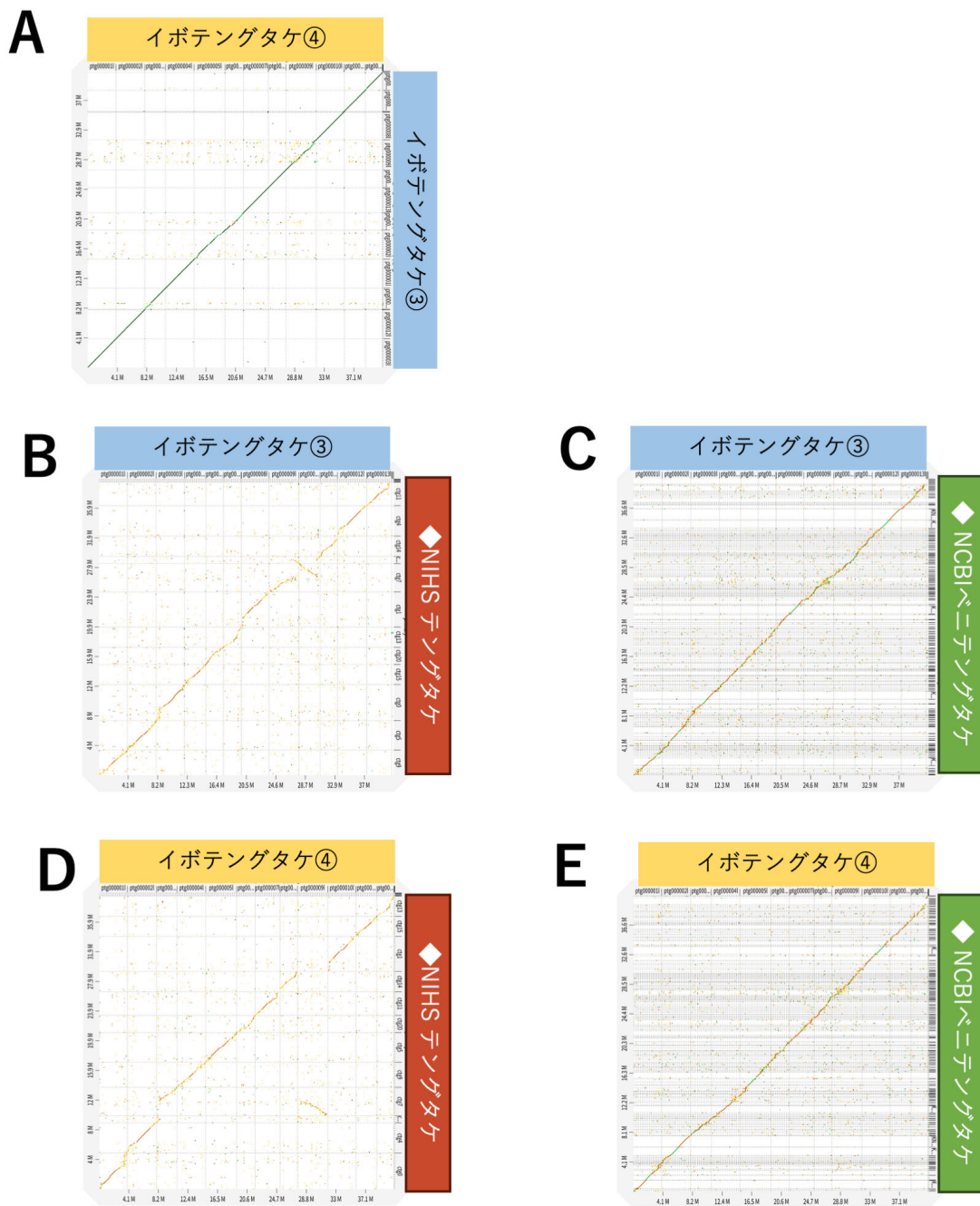


図 C-4-6. イボテングタケドラフトゲノムおよび近縁種ゲノムとの比較 (D-GENIES)

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