

平成30年6月16日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21698

研究課題名(和文) 食用キノコと間違いやすい有毒キノコの迅速鑑別法の確立

研究課題名(英文) PCR-based method for the Detection of Toxic Mushrooms Causing Food-Poisoning Incidents

研究代表者

野村 千枝 (Chie, Nomura)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：50393260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：有毒キノコによる食中毒の原因究明のために行われる形態学的鑑別法は、キノコが原形を留めていない食中毒検体には適用が困難である。そこで、種の同定に有用なDNAバーコーディング法を応用したスクリーニング法を開発した。日本で食中毒事例のあるキノコのうち、5種類の種特異的なプライマーを製作した。本法は調理および人工胃液による処理の影響を受けず、約2時間半で検出可能であった。さらに、一例としてオオシロカラカサタケ特異的プライマーを用いたリアルタイムPCR法の開発を行った。実際の食中毒検体にも適用可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, species-specific identification of five toxic mushrooms, *Chlorophyllum molybdites*, *Gymnopilus junonius*, *Hypholoma fasciculare*, *Pleurocybella porrigens*, and *Tricholoma ustale*, which occur food-poisoning incidents in Japan, was investigated. The specific primer pairs targeting internal transcribed spacer (ITS) regions were designed for PCR detection. The specific amplicons were obtained from fresh, cooking, and simulated gastric fluid (SGF)-treated samples. No amplicons were detected from the mushrooms with similar morphology. Our method using the one-step extraction allows rapid detection of mushrooms within 2.5h. When the incident is happened, it could be utilized for rapid identification or screening of food-poisoning mushrooms.

研究分野：食品化学

キーワード：食中毒 スクリーニング PCR オオシロカラカサタケ カキシメジ オオワライタケ ニガクリタケ スギヒラタケ

1. 研究開始当初の背景

日本では毎年、有毒キノコの誤食による食中毒が数十件発生している。食中毒の原因究明のために行われるキノコの肉眼的・顕微鏡的観察による形態学的鑑別法は、キノコが原形を留めていない食中毒検体（喫食残品や患者吐物）には適用できない。また、毒成分の理化学分析法は、毒成分が不明である種には適用できない。そこで、患者が喫食したキノコ種を迅速に同定することが、中毒患者の治療に有効であると思われるため、本研究を計画した。

2. 研究の目的

患者が喫食したキノコ種を迅速に同定するため、遺伝学的検出法（DNA バーコーディング法および迅速鑑別法）を用いることとした。DNA バーコーディング法は、同定に有用とされたが、結果を得られるまで9時間以上を要する。迅速鑑別法は、ITS領域に認められる種特異的配列を用いてPCRを行い、その増幅産物を検出する方法であり、種特異的PCR法、PCR-RELF法、リアルタイムPCR法等があげられる。日本に食中毒事例のあるキノコは30種以上存在するが、現在、有毒キノコの迅速鑑別法の報告は4種（ツキヨタケ、クサウラベニタケ、ドクササコ、カキシメジ）にとどまる。また、食中毒検体に応じた例は少ない。そこで、有毒キノコの検出対象を拡大するために、DNA バーコーディング法を応用して、種特異的なプライマーを開発し、保健所および地方衛生研究所において食中毒検体に適用可能なスクリーニング法を開発した。また、食中毒現場の実態に合わせ、調理や消化による影響を検討した。また、検証現場の現状や迅速性を考え、PCR産物のゲル電気泳動法での識別、およびリアルタイムPCR法による検出法を検討した。本法は菌類の共通配列であるITS1領域の塩基配列解析による確認検査と同時に使用することで検査精度を担保するとともに、より迅速な食中毒対応に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

試料は大阪市立自然史博物館、和歌山県環境衛生研究センター、山形県衛生研究所等により鑑別されたものを用いた。

(1) 日本に食中毒事例のあるキノコの30種のうち、有毒キノコの迅速鑑別法の報告がない26種について、種特異的プライマーを試作した。有毒キノコのITS領域の塩基配列データはNCBIデータベースから株間の変異が少ない配列箇所を選び、ソフトウェアCLC Sequence Viewerを用いてアライメントを作成した。標的とする有毒キノコの核内ITS領域の塩基配列を、各有毒キノコに形態学的によく似た食用キノコの配列と比較し、違いが認められ、かつプライマー同士でハイブリダイズしない配列を選びプライマーを設計した。

(2) 食中毒に対応するため、従来のDNA抽出法のキアゲン社G-Tip、DNeasy plant等キットをはじめとして迅速で簡便なDNA抽出法について検討した。

(3) 検証現場の現状や迅速性を考えPCR産物の検出には、ゲル電気泳動法での識別を用いた。

(4) 食中毒現場の実態に合わせ、調理による影響を検討した。調理法は、焼き、炒め、揚げ、ゆで、佃煮、鍋について検討した。ゆで、については加熱時間を30分間～3時間まで検討した。

(5) 次に消化による影響を検討した。鍋調理（食材と市販の鍋用調味料を用いて調理し、得られたろ液でキノコを100℃30分間～2時間）後に人工胃液で反応（37℃30分間～3時間）反応させた。

(6) 種特異的プライマーとは別に、各試料からDNA抽出が確実にされているかを確認するために、キノコを含む菌類共通のDNA配列を検出するプライマー（以下、菌類検出用プライマー）のITS1/ITS2をPCRに用いた。2 ウェル併行で菌類共通検出用プライマー（ITS1/ITS2）と、種特異的プライマー（例えば、オオシロカラカサタケ検出用プライマー（42F/18R））を用いたPCRを同時に行い、両方とも検出された場合はオオシロカラカサタケ陽性と判定した。一方、菌類検出用プライマー（ITS1/ITS2）において検出され、オオシロカラカサタケ検出用プライマー（42F/18R）において不検出の場合をオオシロカラカサタケ陰性と判定した(図1)。

図1 判定例

ITS1/ITS2	42F/18R	判定
+	+	陽性
+	-	陰性

(7) 本法はITS1領域の塩基配列解析による確認検査と同時に使用することで検査精度を担保するとともに、より迅速な食中毒対応に寄与することを目的とした。つまり、スクリーニング法と同時に、菌類の共通配列であるITS1領域の塩基配列解析による確認検査を行った。遺伝子塩基配列の解析による菌種の確認には、菌類検出用プライマー(ITS4/ITS5)を用いた。

(8) さらにオオシロカラカサタケについては、過去に大阪府内で食中毒事例があることから、より迅速簡便化を目指し、リアルタイムPCR法による検出法を検討した。

(9) 2016年、実際に大阪府内でオオシロカラカサタケによる食中毒事例が発生したこと

から、当該検体（喫食残品および吐物）に適用した。

4. 研究成果

(1) プライマーの特異性は、有毒キノコと誤食しやすい食用キノコと判別できることを評価基準とした。食用キノコは、それぞれの有毒キノコについて、食中毒事例および形態学的特徴から選定した。(例 オオワライタケと誤食しやすいキノコはエノキタケ、ショウゲンジ、コガネタケ、チャツムタケ、ナラタケ、シイタケの6種とした等)。作成したプライマーおよび既存のプライマー(ツキヨタケ、シイタケ)の合計8種のプライマーを評価した結果、有毒キノコ(オオシロカラカサタケ、オオワライタケ、ニガクリタケ、スギヒラタケ、カキシメジ、ツキヨタケ)7種の種特異的プライマーが適用可能であった。シイタケは本試験のコントロールとして用いた(図2)。

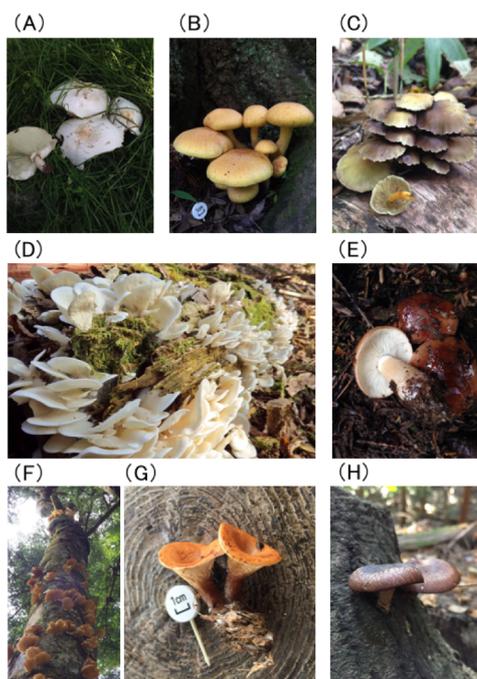


図2 Eight mushrooms for designing the specific primers in this study.

(A) *C. molybdites*, (B) *G. junonius*, (C) *H. fasciculare*, (D) *P. porrigens*, (E) *T. ustale*, (F) *O. japonicus*, (G) *P. acromelalga*, (H) *L. edodes*.

(2) DNA抽出法の検討の結果、DNA抽出法は、ワンステップ法を採用した。子実体片(湿試料100~300mg, 約5mm角)を15mL容のPP製遠沈管に入れ、溶解緩衝液(100mM Tris-HCl, pH9.5, 1M KCl, 10mM EDTA)5mLを加えた。常温で10秒間ホモジナイズし、30秒間かくはんした。95°Cで10分間加熱した後、5,000×g、4°Cで20分間遠心分離した。上清1mLをマイクロチューブに取り、10,000×g、4°Cで5分間遠心分離後、上清をDNA抽出液とした。操作時間は約40分間で

あり、従来のDNA抽出精製法は160分以上要したことから、1/4程度に迅速簡便化することができた。

(3) 調理による影響を検討した結果、焼き、炒め、揚げ、ゆで、佃煮については一般的な調理法で検出可能であった。鍋調理については100°C2時間まで検出可能であった。

(4) 消化による影響を検討した結果、鍋調理100°C2時間後さらに人工胃液で反応(37°C30分間~3時間)反応させた場合、30分間程度までは検出可能であることがわかった(図3)。

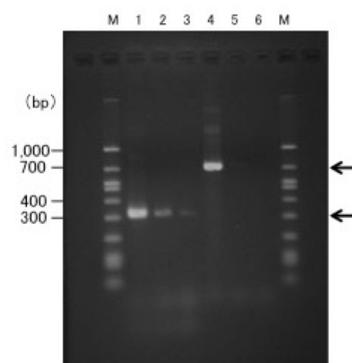


図3 PCR amplifications for the ITS regions of *H. fasciculare* with 2 primer pairs: ITS1/ITS2 (Lane 1-3) and ITS4/ITS5 (Lane 4-6). The arrows indicate the expected size of PCR products c.a. 350 bp (Lane 1-3) and c.a. 900 bp (Lane 4-6). Lanes 1, 4: raw (uncooked), lanes 2, 5: SGF-treated for 30 min, and, lanes 3, 6: SGF-treated for 60 min. Lane M shows a DNA marker (DNA fragments 50 to 1,000 bp in size).

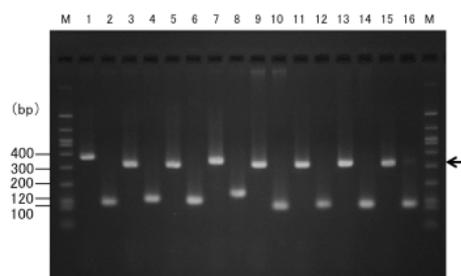


図4 Detection of PCR products obtained by using the primer pairs ITS1/ITS2 (Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15), and species-specific primers (Lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16) using genomic DNAs from SGF-treated for 30 min samples as a template. Lanes 1, 2: *C. molybdites*, 3, 4: *G. junonius*, 5, 6: *H. fasciculare*, 7, 8: *P. porrigens*, 9, 10: *T. ustale*, 11, 12: *O. japonicus*, 13, 14: *P. acromelalga*, 15, 16: *L. edodes*. Lane M shows a DNA marker (DNA fragments 50 to 1,000 bp in size). The arrows indicate the expected size of PCR products c.a. 350 bp.

(5) そこで、シイタケおよび有毒キノコ(オオシロカラカサタケ、オオワライタケ、ニガクリタケ、スギヒラタケ、カキシメジ、ツキヨ

タケ) 7 種、合計 8 種の種特異的プライマーについても、鍋調理 100℃2 時間後さらに人工胃液で反応 (37℃30 分間) 反応させたところ、検出可能であった (図 4)。

(6) 今回、開発した種特異的プライマーの 6 種のうち、一例として、より迅速簡便な方法を作成するため、オオシロカラカサタケについて、リアルタイム PCR 法による検出法を検討した結果、適用可能であった (投稿中) (図 5)。

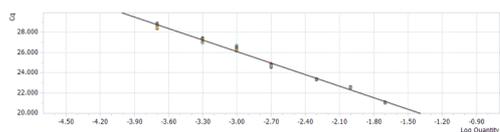


図 5 オオシロカラカサタケ検出用プライマー (42F/18R) による検量線
縦軸に DNA 量 (0.0002 ng-0.002 ng/well) の対数値、横軸に Ct 値をプロットした。
Efficiency 1.83、R² 値 0.99、Slope -3.8242、Error 0.24、Y-Intercept 14.61

(7) 実際に大阪府内で発生したオオシロカラカサタケによる食中毒事例の検体 (喫食残品および吐物) に適用した結果、吐物については検出困難であったが、喫食残品 (ゆで調理) には適用可能であった (図 6)。

食中毒事例における茹で調理された微量な調理残品からも同定が可能であることを示したが、吐物からの検出は困難であった。本事例では吐物中 DNA が高度に消化されていたと考えられ、吐物に対しては消化の程度により適用可能であることが推測された。

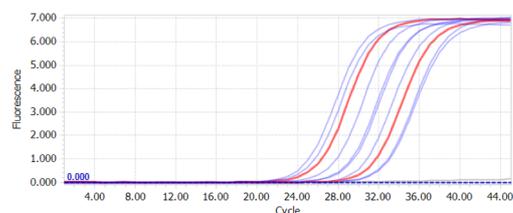


図 6 オオシロカラカサタケ検出用プライマー (42F/18R) によるリアルタイム PCR の増幅曲線
細線: 生のオオシロカラカサタケ (濃度範囲 0.0002-0.002 ng/well に調製した DNA 溶液)
太線: 喫食残品

(8) 塩基配列解析を伴う鑑別に要する時間は少なくとも 9 時間~10 時間半程度を要するため従来の専門家による形態観察と比較して迅速性にかける。そのため、検査法の改良は課題の一つであるが、本研究における種特異的なプライマーを用いれば、約 2 時間半でスクリーニング判定が可能である。リアルタイム PCR に適用すれば、さらに迅速簡便に検出できる。そこで、キノコによる食中毒疑いが発生したとき、菌類検出用プライマー (ITS1/ITS2) による PCR 反応と種特異的の

プライマーによる PCR 反応を同時に行い、両方にバンドが検出されたものについて、スクリーニング検査陽性と判定し、中毒対応に備える。その間に ITS1 領域 (約 350bp) の塩基配列解析によりキノコ種を再確認すれば、行政検査において迅速な食中毒対応が可能になると考える。

本スクリーニング法は特異的 PCR プライマーを用意した種の検出が可能であり、すべての中毒に対応できるわけではない。しかし、中毒症例の多発種は比較的限られており、今後ニセクロハツなど重要種を加えていくことで、現場に利用可能なキット化も可能だろう。また多くの野生キノコの中には本プライマーに交叉反応を示す種もあり得るが、迅速な分析で候補種をあげるという本検出法の目的からは重要な障害とならないと考える。本研究で示した種特異的プライマーによるキノコのスクリーニング検出法は、食中毒の原因究明や迅速な診断において従来の形態学的鑑別法を補強する新たな検査ツールの一つとして応用が可能である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1) 食中毒を引き起こす有毒きのこの種特異的プライマーによるスクリーニング法の開発、野村千枝、昌山敦、山口瑞香、佐久間大輔、梶村計志、食品衛生学雑誌、58、132-142、査読あり (2017)

[学会発表] (計 2 件)

1) Project “S” 市民科学者と協働した日本産 *Scutellinia* 属菌の分類学的研究に関する活動、細矢剛ら (省略 16 名、2 番目)、日本菌学会 61 回大会講演集、P-249、査読無し (2017)

2) 食中毒を引き起こす有毒きのこの迅速検出法の検討、野村千枝、昌山敦、山口瑞香、梶村計志、第 53 回全国衛生化学技術協議会年会 (青森県青森市) (2016)

3) オオシロカラカサタケによる食中毒への対応、野村千枝、昌山敦、山口瑞香、佐久間大輔、梶村計志、第 54 回全国衛生化学技術協議会年会 (奈良県奈良市) (2017)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] なし

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 千枝 (NOMURA, Chie)

地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
衛生化学部食品化学 1 課研究員

研究者番号: 50393260