

# 遺伝子検査を用いた自然毒分析法の検討

廣田 梓<sup>\*1</sup>、溝腰 朗人<sup>\*2</sup>、森永 由加里

## Development of PCR methods for natural toxins causing food poisoning

Azusa Hirota, Akito Mizokoshi, Yukari Morinaga

Key word : 毒キノコpoisonous mushroom、ツキヨタケOmphalotus guepiniformis、PCR

### 要旨

2022年度の調査研究において、LC-MS/MSを用いたキノコ毒成分の機器分析体制を構築した。しかし、LC-MS/MSでは、検出困難な毒キノコがあることが分かったため、本県で食中毒事例の多いツキヨタケをはじめ、県内で採取された6種類の毒キノコについて、PCR法による遺伝子検査体制を確立した。

### はじめに

毒キノコの誤食による食中毒は、全国的に毎年発生している。大分県でも過去10年で4件の食中毒事例が確認されているが、いずれも原因はツキヨタケであった。食中毒発生時は、専門家によるキノコ残品の形態学的観察により原因を推定しているが、専門家不足により鑑別が難しくなっているうえ、キノコそのものが残っていない事例では原因の推定も出来ないという問題がある。このため、2022年度にはLC-MS/MSを用いたキノコ毒成分の機器分析体制を構築した<sup>1)</sup>。しかし、LC-MS/MSでは、検出困難な毒キノコがあることが分かったため、遺伝子検査(PCR法)を用いて同定できる体制が必要と考え、本研究に取り組んだ。

### 材料及び方法

#### 1 材料

##### 1.1 試料及び試薬・標準品等

ツキヨタケは、西部保健所から搬入されたもの(祖母山及び男池で採取されたもの)を用いた。

添加回収用試料は、市販のシイタケを用いた。ツキヨタケ以外の毒キノコ(ドクツルタケ、テングタケ、クサウラベニタケ、カキシメジ)は、大分きのこ会会長村上康明氏(理学博士)の協力のもと採取したもの及び同氏より提供を受けたものを用いた。

調理残品用のおでんは、市販のおでんの素を使用した。

ペプシンは、生化学用、ブタ胃粘膜由来(富士フィルム和光純薬株式会社製)を用いた。

DNAテンプレートの調製は、キレックス樹脂(Chelex 100 Resin 200-400 Mesh Sodium Form (BioRad社製))又はQIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製)を用いた。

また、TE (pH8.0) 及び滅菌蒸留水はニッポンジーン社製、×10Ex Taq Buffer、dNTPmix及びEX-TaqHSはタカラバイオ社製、2%アガロースゲルはThermo Fisher Scientific社製のプレキャストゲルを用いた。

#### 1.2 プライマー

表1のとおり<sup>2-4)</sup>。

表1 プライマー

対象種	プライマー名	配列 (5' - 3')	PCR産物 (bp)
ツキヨタケ	OJSP-F	GTGCACGTTTCCTTTCAAT	107
	OJSP-R	AGAATCATCAACAGAGCTGC	
ドクツルタケ	AVSP-F	GCTCTCCTTGAATGTATTAGTGG	103
	AVSP-R	GGTTAGACAGCAGAGAGAACTAAC	
オオシロカラカサタケ	42F	CCACCTGTGCACCACTTGTA	116
	18R	ATGGCCAGGTAGAAGAGAGC	
カキシメジ	11F	GTAGGGACCTCTGTGCTTAG	99
	10R	AGGAGACGGTTAGAAAGCAGT	
テングタケ	APSP-F	CACTGTCTCTTCTCTTGCTTG	87
	APSP-R	CATAGACAACCTGAACAATGCC	
クサウラベニタケ	ERSP-F	TTTGAGAAGTCTGTGAAAATC	110
	ERSP-R	GGCACAAAGTCCCTATATGTTTA	
キノコユニバーサル (ユニバーサルITS)	ITS1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	800
	ITS4B	TCCTCGCCTATTGATATGC	

#### 1.3 装置

遠心分離機はhimac CT13R (日立工機)、サーマルサイクラーはBiometra TRIO 48 (Analytik Jena)、電気泳動装置はGel Doc GO Imaging System (BioRad Laboratories)を用いた。

\* 1 大分県地域農業振興課

\* 2 大分県南部保健所

## 2 方法

### 2.1 試料の前処理

他のキノコ類の汚染のない使い捨てのカミソリ等を用いてキノコを細断、キノコ片を調製し、DNAテンプレート調製用の試料とした。模擬調理品は、ツキヨタケ1個を4等分し、うち3つを市販のおでんの素に入れ、10分間加熱して作製した。また、模擬調理品中のツキヨタケについて、人工胃液（塩化ナトリウム、塩酸にペプシンを加えたもの）中に37°Cで0分、30分、1時間、2時間、3時間浸した後、水酸化ナトリウムで中和した物を模擬吐物とした。

### 2.2 DNAテンプレートの調製

以下のいずれかの方法で調製した。

#### 2.2.1 キレックス樹脂を用いた方法

試料20~50mgとキレックス樹脂を5% (w/v) の割合でTE (pH8.0) に懸濁した溶液200μLを混和した後、99°Cで10分間加熱し、12,000rpmで5分間遠心分離を行い、その上清をDNAテンプレートとした。

#### 2.2.2 QIAGEN DNeasy Plant Mini Kitを用いた方法

製品マニュアルに沿ってDNAテンプレートを調製した。なお、試料は20~50mgとし、最終のDNA抽出溶液は100μLのAE緩衝液を用いた。

### 2.3 PCR法による遺伝子検査

2.2で調製したDNAテンプレート溶液を用いて表2の組成でPCR反応液を作製した。

PCR反応条件は、各種毒キノコを検出する種特異的プライマーによるPCR反応の場合、95°Cに3分間保ち反応を開始させた後、94°C30秒間、60°C1分間、72°C1分間を1サイクルとして、35サイクルのPCR増幅を行った後、4°Cで保存した。また、キノコユニバーサルプライマーの場合は、95°Cに3分間保ち反応を開始させた後、95°C30秒間、55°C1分間、72°C1分間を1サイクルとして、40サイクルのPCR増幅を行った後、4°Cで保存した。増幅後の反応液は2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、PCR産物の増幅の有無を確認した。

表2 PCR反応液の組成

	(μL)	
	種特異的 プライマー	キノコユニバーサル プライマー
滅菌蒸留水	14.24	18.55
×10Ex Taq Buffer	2	2.5
dNTP mix	1.6	2
プライマー1(20 μM)	0.5	0.625
プライマー2(20 μM)	0.5	0.625
EX-Taq HS (5U/μL)	0.16	0.2
テンプレート	1	0.5
計	20	25

## 結果

### 1 PCR法によるツキヨタケの遺伝子検査

ツキヨタケからQIAGEN DNeasy Plant Mini Kit及びキレックス樹脂を用いて調製したDNAテンプレートによるPCRを行った結果、どちらの調製方法においても図1のとおり予想されるサイズである100 bp付近に特異的な増幅を確認した。

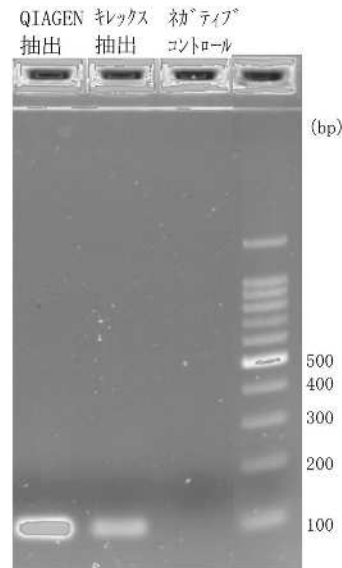


図1 ツキヨタケの種特異的プライマーによるPCR結果

### 2 PCR法によるツキヨタケの模擬調理品及び模擬吐物の遺伝子検査

模擬調理品（具材のダイコン、牛すじ、おでん汁及びツキヨタケ）及び模擬吐物について、QIAGEN DNeasy Plant Mini Kitで調製したDNAテンプレートによるPCRを行った結果、ツキヨタケに特異的な増幅を確認した。（図2、3）

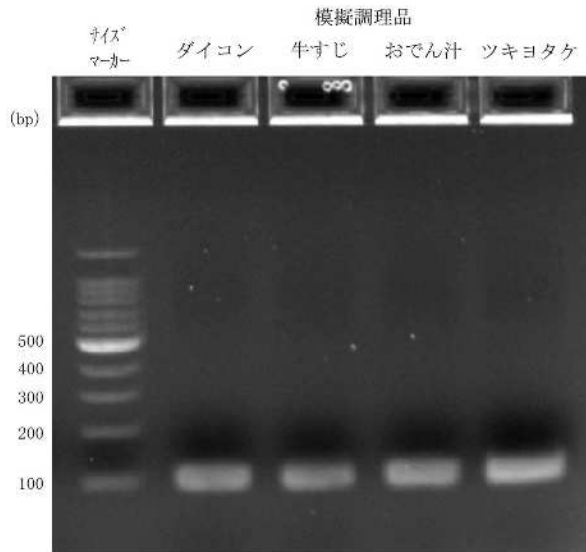


図2 ツキヨタケ模擬調理品の種特異的プライマーによるPCR結果

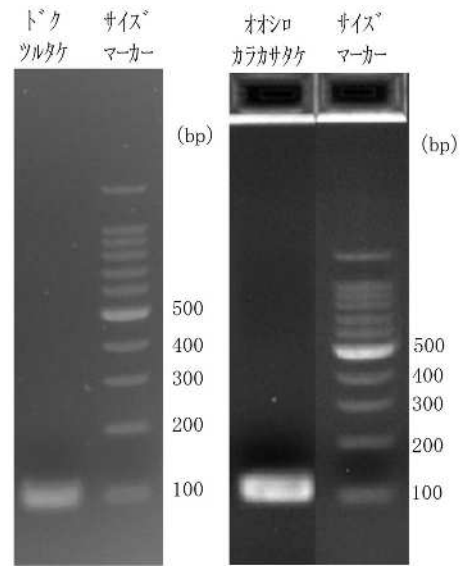


図4 ドクツルタケ及びオシロカラカサタケの種特異的プライマーによるPCR結果

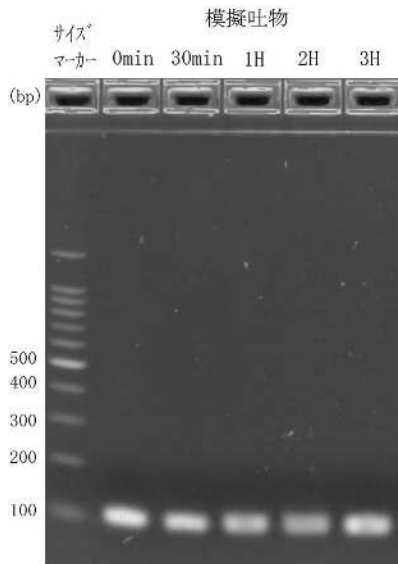


図3 ツキヨタケ模擬吐物の種特異的プライマーによるPCR結果

### 3 PCR法によるその他の毒キノコの遺伝子検査

#### 3.1 ドクツルタケ、オシロカラカサタケ

LC-MS/MSでは毒成分の検出が困難であった<sup>1)</sup>が、PCR法では、図4のとおり、いずれも予想されるサイズである100bp付近に増幅が確認された。なお、DNAテンプレートはQIAGEN DNeasy Plant Mini Kitにより調製した。

#### 3.2 カキシメジ、テングタケ

キレックス樹脂によりDNAテンプレートを調製し、種特異的プライマーによるPCR反応を行ったが、増幅を確認することができなかった。キノコユニバーサルプライマーを用いたPCRでも増幅が確認されなかったことから、試料由来のPCR反応の阻害物質の存在が疑われた。

DNAテンプレートをTE緩衝液で30倍に希釈したところ、キノコユニバーサルプライマー及び種特異的プライマーで明瞭な増幅が確認された。(図5、6)

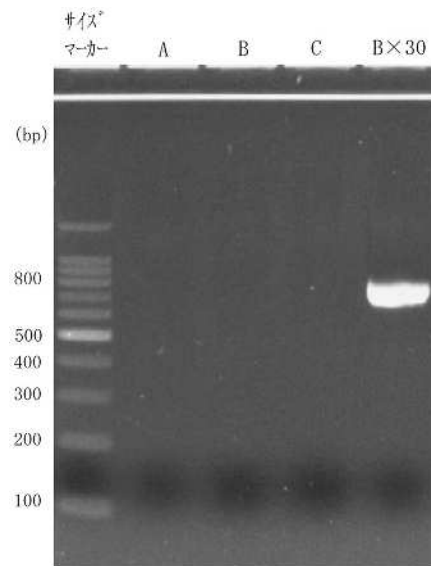


図5 カキシメジのキノコユニバーサルプライマーによるPCR結果

A : 2022年10月24日採取  
B : 2022年10月19日採取  
C : 2022年10月29日採取

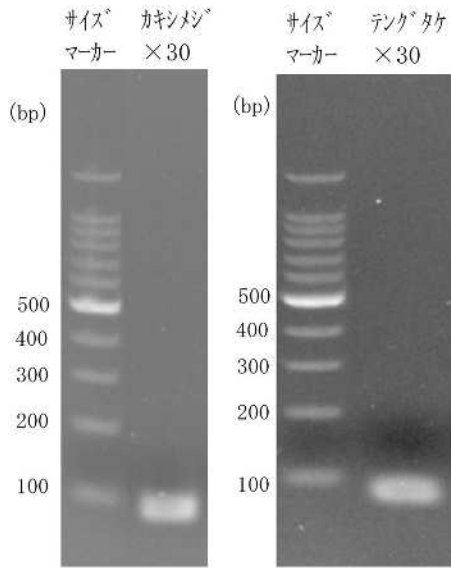


図6 カキシメジ及びテングダケの種特異的プライマーによるPCR結果

### 3.3 クサウラベニタケ

LC-MS/MSでは毒成分の検出が困難であった<sup>1)</sup>が、採取日が異なる6個体について検査したところ、1個体(個体E)で予想されるサイズである100bp付近の位置に明瞭な増幅が確認された(図7)。

また、別の2個体(個体A及びF)については、非常に薄いが予想される位置にPCR産物の増幅が確認された。一方で、残り3個体(個体B、C及びD)から調製したDNAテンプレートでは、増幅が確認されなかった。なお、DNAテンプレートはQIAGEN DNeasy Plant Mini Kitにより調製しており、キノコユニバーサルプライマーを用いたPCRでは、全ての個体で明瞭な増幅を確認している。

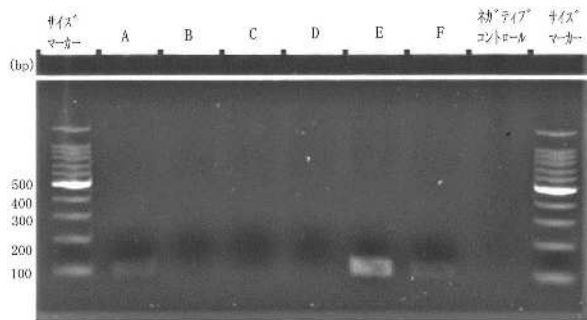


図7 クサウラベニタケの種特異的プライマーによるPCR結果

- A : 2022年 9 月27日採取
- B : 2022年 9 月28日採取
- C : 2022年10月11日採取
- D : 2022年10月 8 日採取
- E : 2022年10月24日採取
- F : 2022年 9 月20日採取

### 考察

PCR法により、ツキヨタケの種の同定を行うことができる体制が構築できた。また、ツキヨタケを含んだ模擬調理品や模擬吐物についても、PCR法によりツキヨタケの種の同定が行えることを確認できた。

また、県内に生育しLC-MS/MSでの検出が困難であったドクツルタケ、オオシロカラカサタケ及びクサウラベニタケの種の同定もPCR法により行うことができ、より幅広い危機管理体制が整備されたと考えられる。

一方で、クサウラベニタケについては、PCR法で検出可能な個体とそうでない個体が確認された。国内でクサウラベニタケと称されてきたキノコには少なくとも3つの新種のクサウラベニタケ近縁種(コガタクサウラベニタケ、クサウラベニタケモドキ、ニセクサウラベニタケ)が混ざっており、外見では当該3種を判別できない<sup>5)6)</sup>ことが近年明らかとなっていることから、県内で採取されたクサウラベニタケについても、これらの近縁種が採取された可能性が考えられる。

### 謝辞

毒キノコの採取及びその形態学的分類に深くご協力いただきました大分県きのこ协会会长 村上康明氏(理学博士)並びに大分県農林水産研究センター林業研究部きのこグループ山下和久主幹研究員(チームリーダー)(現企画指導担当上席主幹研究員(総括))に感謝いたします。

### 参考文献

- 1) 廣田 梓 他: LC-MS/MSを用いた自然毒(キノコ毒)の分析法, 大分県衛生環境研究センター年報, 50, 89-92 (2022)
- 2) 管野陽平 他: PCR-RFLPによるツキヨタケの迅速判別法, 北海道立衛生研究所報文
- 3) 野田拓史: 毒キノコによる食中毒の検査体制の構築(第3報), 福井県衛生環境研究センター年報, 19, 36-41 (2020)
- 4) 野村干枝 他: 食中毒を引き起こす有毒キノコの種特異的プライマーによるスクリーニング法の開発, 食衛誌Vol.58, No.3
- 5) 近藤一成 他: 有毒クサウラベニタケ近縁種のリアルタイムPCR法による同定, 食衛誌 Vol. 60, No. 5

- 6) Kondo, K et al. Molecular phylogenetic analysis of new *Entoloma rhodopolium*-related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP. *Sci.Rep.*, 7, 14942, doi : 10.1038/s41598-017-14466-x (2017).

