

## 2. 生物発光を利用したツキヨタケ簡易判別法の開発

○佐藤 昌宏、篠原 秀幸、長岡 由香（山形県衛生研究所）

### 【研究目的】

ツキヨタケが有する特徴として、子実体のヒダの微弱な生物発光が挙げられるが、肉眼では確認が難しい。一方、暗所でカメラを用いた露光撮影により発光を可視化することができる。そこで、ツキヨタケの発光性を利用した簡易判別方法の開発を目的に、採取したキノコをデジタルカメラで撮影し、発光の有無を確認することで、ツキヨタケと食用キノコを判別する手法を検討する。

### 【研究の必要性】

ツキヨタケは全国に広く分布する有毒キノコで、毒性成分としてイルジン S を含有し、摂食後数時間で嘔吐、下痢などの消化器症状を引き起こす。過去 10 年間に山形県内で発生した有毒キノコ食中毒では、原因の約 7 割がツキヨタケであり、食用のムキタケやヒラタケ、シイタケと外観が類似していることから、食用キノコと誤認し、喫食する事例が後を絶たない。一般的にこれらのキノコは形態学的に判別されているが、正確に判別することは熟練した採取者でも困難な場合がある。一方、開発を目指す方法は鑑別知識に乏しい者も利用できる、非破壊的であることから反応陰性であったキノコを食用に供することができるため、出荷前検査にも利用できる可能性がある。このように簡易判別方法が確立できれば、山形県におけるツキヨタケ食中毒の発生予防に貢献すると考える。

### 【研究計画】

#### （1）発光性を利用したツキヨタケと食用キノコの判別法確立

採取地でも発光を簡易的に撮影できるように暗室を作製し、デジタルカメラを用いてツキヨタケの生物発光を撮影、撮影条件等の最適化を検討する。まず採取当日のツキヨタケの発光を撮影し、発光の有無を確認する。次に、採取したツキヨタケを種々の条件で保存、複数の露出条件で経時的に撮影し、保存状態の違いによる発光の持続性を調査する。撮影画像の輝度を、画像解析ソフトを用いて定量化する。このとき、食用キノコ等を用いて同様に輝度を定量化し、判別基準となる閾値を設定する。

#### （2）ツキヨタケの人工栽培

天然のキノコは生育環境などの違いにより発光強度や持続性にばらつきがある可能性がある。そこで、ツキヨタケの発光特性の把握を目的に、菌床を用いてツキヨタケを人工栽培する。市販の菌株を寒天培地で培養した後、おがくず等を原料とした菌床に接種、異なる条件で子実体の発生を試みる。発生した子実体の生育段階や大きさ等で発光強度を比較する。

#### （3）発光強度と毒性成分イルジン S の相関

ツキヨタケの発光を撮影後、イルジン S の含有量を算出し、発光強度との相関を確認する。

## 【実施内容・結果】

### (1-1) 検体および画像解析方法

検体には、山形県内の山林で採取したツキヨタケの子実体（以下、天然体）、菌床で栽培したツキヨタケの子実体（以下、栽培体）を用いた。比較対象としてムキタケおよびヒラタケを購入し用いた。



図1 撮影 Box（蓋が開いた状態）

デジタルカメラ（OLYMPUS、PEN Lite E-PL6）で撮影した画像を ImageJ Fiji (<https://fiji.sc/>) を用いて解析した。解析では発光領域が特定され、その領域内のピクセル当たりの平均輝度が画像毎に自動的に算出される。なお、画像の解析条件として Threshold を大津法により自動設定し、発光領域の最小面積は 100 mm<sup>2</sup> とした。

検体の発光強度が同じでも、画像解析で算出される平均輝度は露出条件、すなわち ISO 感度（以下、ISO）、露光時間（以下、ET）、F 値によって変化するため、ある露出条件における平均輝度を発光強度（以下、LI）と定義する。本研究では F 値を 1.8 とした。

### (1-2) 暗室作製

配線などで野外に設置されるプラスチックボックス（幅 30×奥行 19×高さ 30 cm）を加工し、撮影 Box を作製した（図 1）。撮影 Box の上部にデジタルカメラを置き、内部に検体を入れ、蓋を閉じて撮影する。天然体（ $n=3$ ）を、暗室、自然光下の室内、蛍光灯下の室内で撮影 Box を用いて、露出条件を変えて撮影した。その結果、いずれでも画像に発光を確認でき、撮影 Box 内は十分な暗さがあると考えられた。しかし、LI は暗室、自然光下、蛍光灯下の室内の順に大きく、撮影 Box 内は周囲の光の影響を受けると考えられた。そこで、以降では周囲の光の影響を排除するために、すべて暗室で撮影を行った。

### (1-3) ノイズによる平均輝度

デジタルカメラでの撮影では露出が上がる、すなわち高 ISO、長 ET、低 F 値ほど明るい画像を撮影できる。そのためツキヨタケの発光が微弱であっても、発光を撮影しやすくなる。しかし、露出撮影では画像に斑点や微小な明点（ノイズ）が入り、平均輝度が算出され、食用キノコをツキヨタケと判別する恐れがある。食用キノコまたは空の状態を撮影、画像を解析し、ノイズの有無を確認した。ISO200、800 ではノイズはほとんど確認されず、高 ISO になるとノイズが確認されやすくなった。必ずしも長 ET でノイズが入りやすいわけではなく、ISO25600 では長 ET でノイズが減少した。確認されたノイズによる平均輝度は、高 ISO、長 ET ほど高かった。ノイズの平均輝度の平均値から標準偏差の 3 倍を減じた値を、ノイズの確認数が 2 以下では平均値を判別の閾値とした。

### (1-4) 採取当日における発光の有無

検体を採取後 12 時間以内に、露出条件（ISO 1600、ET60 秒）で撮影・画像解析をした。その結果、171 中 169 検体で発光を視認できた。発光を視認できなかった 2 検体では LI を算出できなかったが、視認できたすべての画像で LI を算出できた。なお、算出した LI は判

別閾値 (3.3) より大きかった。

### (1-5) 保管温度条件と発光の持続性

検体を採取後、4℃の冷蔵庫、20℃の空調室、30℃の恒温機で保管し、経時的に画像を撮影した (ISO25600、ET5 秒)。撮影前に検体を室温に戻すため 30 分以上暗室内に放置した。なお、乾燥防止のため、検体を PE 製のチャック付き袋にいれ、4℃、20℃保管では密閉、30℃保管では密閉せず、加湿器で湿度を調整した。

4℃、20℃保管では、LI は減少する傾向がみられた (図 2)。一方、30℃保管では LI は一度増加し、その後減少に転じた。発光の有無を確認したところ、4℃保管の 7 日目以前ではいずれの検体でも発光を視認できた。20℃保管では、発光を視認できた検体の割合は 5 日目に約 70%、6 日目以降は 20% 未満に減少した。30℃保管では、3 日目まではいずれも発光を視認でき、それ以降、視認できる割合は 20% に減少した。以上より、保管温度が低いほどツキヨタケの発光は持続した。

### (1-6) 露出を下げた撮影での判別性

(1-5) と同じ検体を複数の条件で撮影し、LI を算出できた数を全数 (判別可不可を判断できた総数) で除して判別率を算出した。ただし、LI が判別閾値より低いまたは判定領域がノイズのみの場合は、判別不可とした。なお、露出を下げても判別可能であれば、それより上の露出条件では撮影せずとも判別可能とした。

ISO200 の判別率は 80% 台も多く、高い判別率ではなかった (図 3)。20℃、30℃保管で LI が減少した時 (図 2) に判別率が低下しており、発光が弱まったことが要因と言える。なお、4℃、ET30 秒で判別できない主な要因は発光が弱いことであった。一方、ISO1600 では、ほとんどの条件で判別率が高く、発光がある程度弱くとも、判別可能であった。一部判別できない要因は、保存によって発光が微弱になったことに加え、発光を視認できても発光領域が特定されないことであった。

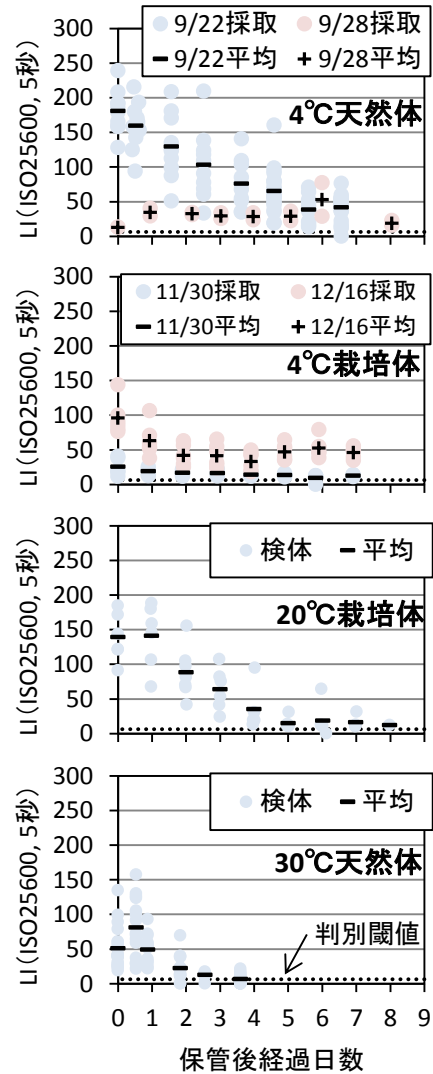


図 2 保管温度別の LI 経日変化

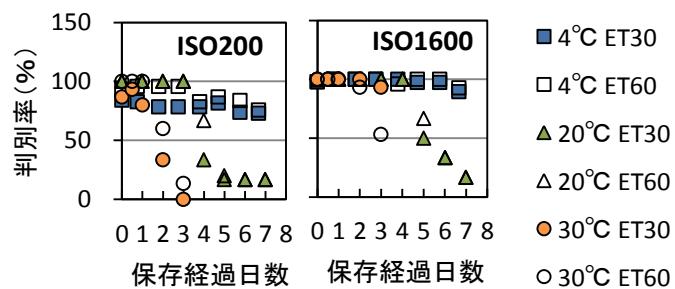


図 3 異なる露出条件での判別率

ISO200、ET30 秒で発光を視認できない、またはし難い画像のうち 61% (208 個中 120 個) で発光領域を特定できた。領域特定できた検体の LI (ISO25600、ET5 秒) は平均で 48、領域特定できなかった検体では 16 であった。この結果より、ある程度発光すれば、露出条件を下げても発光を視認できずとも、解析で発光を確認することは可能であると言える。

### (2-1) 子実体の栽培

菌糸をおが粉で培養し、菌床に移植し 42 日間、22°C で培養後、子実体を発生させる操作した。発生操作を①培養温度を 19°C に下げる、②温度低下に加えて菌床を水に一晩浸漬させる、③温度低下後、2 週間後に浸漬する、の 3 通りとした。なお、培養器内の相対湿度を加湿器とセンサーを用いて概ね 90% 以上に調整した。

温度低下のみと温度低下と浸漬では、それぞれ 1 菌床で 93、99 日後に子実体の傘の形成がみられた。また温度低下 2 週間後に、浸漬した菌床では、90 日程度で傘の形成がみられ、2 菌床で子実体が発生した。いずれの発生操作でも子実体は発生しており、発生操作の明確な影響は見られなかった。

### (2-2) 生育段階における発光強度

菌床に発生した子実体を菌床ごと、子実体の傘部が現れた時点を 0 日として経時的に撮影した (ISO25600、ET5 秒)。子実体を個別に撮影できなかったため、複数個が写った画像を解析し LI を算出した。LI は時間経過とともに増加し、撮影開始後 3~4 日で極大に達したのち減少した。子実体の傘は徐々に大きくなり、その後、生長はとまり次第に見た目がしぼみ、傷んでいった。LI 変化と子実体の傘の生長・劣化は連動しており、LI が極大のとき傘の生長はとまった。なお、同じ経過日数で子実体の大きさに個体差があったが、発光は同程度の見た目であった。

### (3) 発光強度とイルジン S 含有量の相関

天然体 ( $n=30$ ) を検体とし、採取日に ISO25600、ET5 秒で LI を測定、冷凍保存した。その後、既報<sup>1)</sup>に従い検体のイルジン S を定量した。子実体の湿潤重量当たりのイルジン S 含有量は 25~630  $\mu\text{g/g}$ 、LI は 26~180 であり、ばらつきが大きかった。イルジン S 含有量と LI の間に相関はなかった (相関係数 0.003)。

## 【考察と今後の課題】

### (1) 発光性を利用したツキヨタケと食用キノコの判別法確立

暗室を再現できる撮影 Box を用いて露光撮影し、発光の視認、画像解析によって発光強度を算出することでツキヨタケを判別する方法を確立した。本法で判別できるのは発光を確認できるツキヨタケのみであるが、採取して間もない場合、ほとんどのツキヨタケで発光を確認できた。また、冷蔵保存することで発光が維持されるため、採取・保存された子実体であれば販売前に、本法によって検査可能と考えられる。人工栽培の結果、傘の生長・劣化に伴って発光強度が変化した。また、子実体が暴露される温度によって発光の持続が異なった。さらに培地の栄養条件によって菌糸体の発光量が異なることが報告<sup>2)</sup>されている。これらの

ことから採取当日に発光が微弱であった理由として、生長が終わり発光強度の減少過程にあったこと、生育環境の違いが考えられる。このように発光が微弱な要因は様々で複合的であると考えられ、その特定は難しいと言える。そのため可能な限り露出条件を上げて撮影することが望ましく、少なくともF値1.8、ISO1600、ET60秒より上げる必要があると考えられる。

画像解析は、デジタルカメラの性能が低く、露出条件を上げられないときに有用と考えられる。画像解析する場合、ノイズが入ると食用キノコをツキヨタケと判別することになる。そのため、ノイズが入りにくい露出条件が望ましく、F値1.8、ISO1600、ET60秒が目安と考えられる。今回の結果では、目視で発光を確認できるにもかかわらず、発光領域を特定できない事例があり、今後、発光領域の最小面積やThresholdの設定法など解析条件を最適化する必要がある。

### (2) ツキヨタケの人工栽培

申請時には培養条件として温度等の検討を計画したが、発生条件の検討に変更した。本研究では試行回数が少なく、発生条件の明確な影響は見られなかったため、安定した子実体の発生を目指して、試行回数を増やし、菌糸培養条件や湿度を見直す必要がある。

### (3) 発光強度と毒性成分イルジンSの相関

発光強度とイルジンS含有量に相関があれば、本法によって毒量の迅速把握につながると期待したが、関係は見られなかった。ツキヨタケのイルジンS生合成機構が不明であるが、発光強度が独立して変化しているか、複数の要因で変動するため相関が得られなかったと考える。

### 【参考文献】

- 1) 大河原ら, 山形県衛生研究所報, No. 52, 1-7, 2019.
- 2) TERASHIMA, Y. *et al.*, Mushroom Science and Biotechnology, 27, 87-92, 2019.

### 【経費使途明細】

使 途	金 額
1. 外付けHDD (発光画像保管)	13,570 円
2. 撮影機材・材料 (ガスバッグ、クリップ)	17,358 円
3. 食用キノコ	600 円
4. ツキヨタケ菌株 (NITE バイオテクノロジーセンター)	7,810 円
5. 人工栽培培地機材 (UV ランプ、ボックスケース、栽培袋、三角フラスコ等)	116,746 円
6. 人工栽培培地材料 (ポテトデキストロース寒天培地)	15,356 円
7. 温湿度等管理機材 (湿度センサー、センサー用電気部品、加湿器)	49,071 円
8. 試薬、ガラス器具等消耗品 (メタノール、固相カートリッジ、測定用バイアル等)	99,489 円
合 計	320,000 円
大同生命厚生事業団助成金	320,000 円