

有毒植物の関与する食中毒事例における 遺伝子検査による鑑別法導入の検討

Study on Gene Testing Method Introduction in the Food Poisoning Cases
of Participate of the Poisonous Plants

平島 洸基 武内 伸治 高橋 正幸

Koki HIRASHIMA, Shinji TAKEUCHI and Masayuki TAKAHASHI

Key words : *Colchicum autumnale* (イヌサフラン) ; *Narcissus* (スイセン属) ; *Aconitum*
(トリカブト属) ; plant toxin (植物毒) ; food poisoning (食中毒)

緒 言

北海道では、有毒植物による食中毒事例が毎年のように発生している¹⁾。有毒植物を誤食する原因は多様であるが、山菜と有毒植物の取り違いによるケースが多い。道内で誤食事例の多い有毒植物としてはイヌサフラン、スイセン、トリカブト等がある。特にイヌサフランは山菜のギョウジャニンニクと葉の外観が似ていることから誤食件数が多く、含有成分のコルヒチン、デメコルシン等の高い毒性による重篤化例や死亡例が散見される¹⁻³⁾。

当所では、有毒植物が原因と疑われる食中毒が発生した場合、原因究明のため植物や調理品の残品等について形態学的及びLC-MS等による理化学的鑑別(毒性成分の検出)を行ってきた²⁻⁶⁾。しかしながら、検体や毒性成分が微量である場合、鑑別が困難なケースがあった。近年、有毒植物のDNAをPCRで検出する手法^{7,8)}や、またPCR産物を制限酵素処置することで有毒植物と山菜を区別するPCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism)法⁹⁾が報告されている。これらPCRを活用したDNA検出法は、検体が微量の場合においても、DNAを採取できれば実施可能であることから、形態学的・理化学的鑑別法に加えて実施することで検査体制をより強固なものにできると期待される。

本稿では、令和4~5年度に北海道内で発生したイヌサフラン、スイセン、トリカブトの誤食が疑われた食中毒検体を用いて、植物DNAの検出による鑑別を行ったので報告する。

方 法

1. 試料

試料は、当所に食中毒疑いの検体として搬入された植物

体や調理残品、コンポスト廃棄品及び患者の吐しゃ物である(図1-3)。

植物の標準試料として、当所薬用植物園植栽のイヌサフラン、ギョウジャニンニク、スイセン、ニラ、エゾトリカブト、ニリンソウの葉を採取して用いた。

2. 試料からの植物DNAの抽出

試料からのDNA抽出は、既報⁹⁾を参考に次のとおり行った。

1) 植物体試料

検体に土汚れがある場合は蒸留水で洗浄し、キムワイブ(日本製紙クレシア(株)製)で水気を除いた。植物体10~50 mgを量り取り、DNeasy Plant Mini Kit((株)キアゲン製)を用いて、プロトコルに準じてDNAを抽出した。

2) 調理残品試料

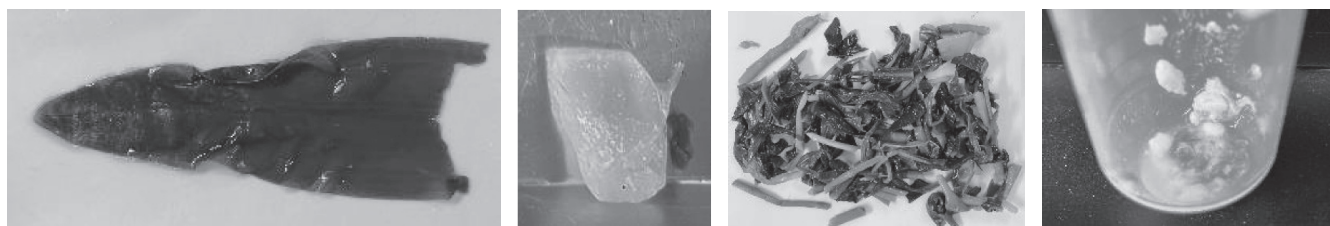
油汚れがある場合はキムワイブで挟み込むように拭き取った。検体約50 mgを量り取り、Lysis Buffer(タカラバイオ(株)製)100 µLを加え、バイオマッシャーII((株)ニッピ製)を用いて破碎した。Proteinase K(タカラバイオ(株)製、20 mg/mL)1 µLを加えて65℃で10分間反応後、98℃で3分間加熱した。放冷後、遠心上清を粗DNA液とした。

3) 吐しゃ物試料、コンポスト廃棄物試料

検体約100 mgに蒸留水1 mLを加え、沸騰湯浴中で5分間加熱した。検体の水気を拭き取った後、湿重量50 mgを量り取り、以下2)調理残品試料と同様に操作を行った。

3. PCRによる検出

PCR装置はGeneAmp PCR System 9700(Life Technologies社製)、PCR酵素はTks Gflex DNA Polymerase(タカラバイオ(株)製)を用いた。PCR用プライマーについては表1に示したものを、プライマー合成は北海道システ



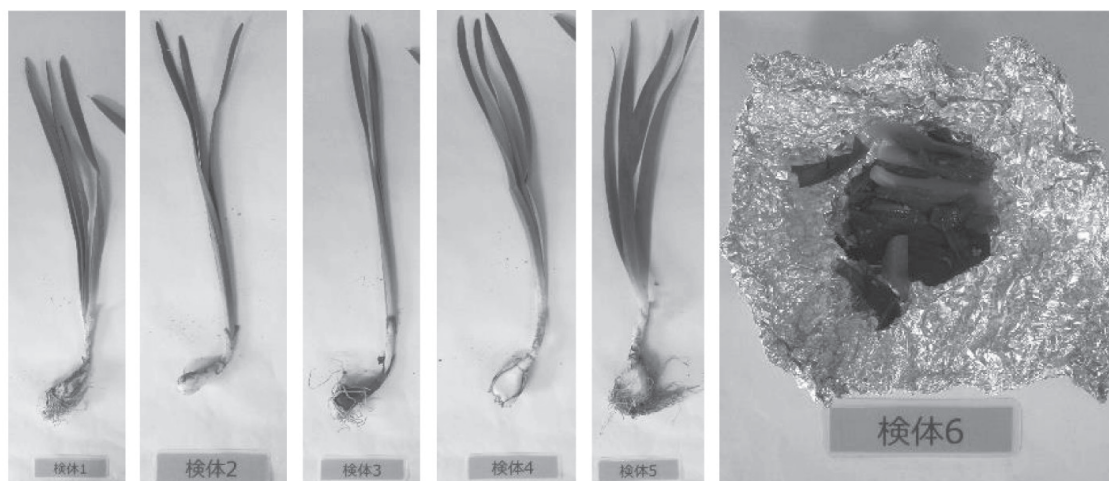
No.1

No.2

No.3(醤油漬け)

No.4(吐しゃ物)

図1 イヌサフランの疑いがある4検体



No.1

No.2

No.3

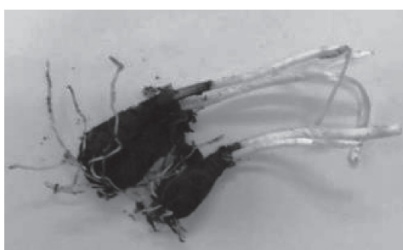
No.4

No.5

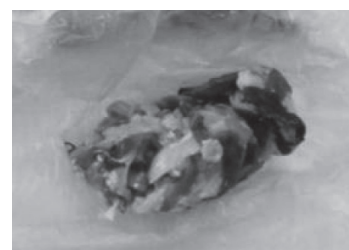
No.6(おひたし)



No.7

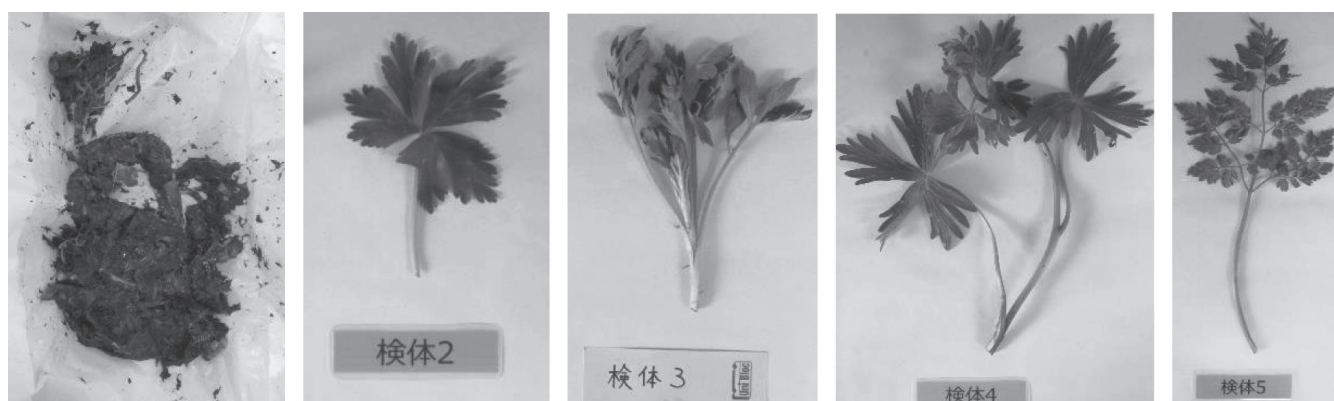


No.8(左)、No.9(右)



No.10(卵とじ)

図2 スイセンの疑いがある10検体



No.1(コンポスト廃棄品)

No.2

No.3

No.4

No.5

図3 トリカブトの疑いがある5検体

表1 プライマー配列

プライマー名	鑑別対象	配列 (5'-3')	産物サイズ (bp)	参考文献
CA-rF16	イヌサフラン	TTGACTTATTATACTCCTGA	381	9)
CA-rR17		GAAAGTTTTTGAATAAGCAG		
SN-rF5	スイセン	ACTGTGTGGACTGATGGACTTACCA	362	9)
SN-rR6		GCTCTACCGTAGTTTTTTTGC GGATA		
TN-mF3	トリカブト	CCTATCCATCTGGAACATTTGGTTC	598	9)
TN-mR4		TGAATTTTCTAACATTTGACTCCTTAC		
Colchicum-matK-F2	イヌサフラン	CAGGATCCATATCAACCAATTAAAAAACC	97	10)
Colchicum-matK-R2		CATTTTGT TTTTGACCGCCAAGGG		
Aconitum-matK-F1	トリカブト	ATCACTGGCTAAATCGAAATTTTGTA	100	10)
Aconitum-matK-R1		ACCAAATCTATCGATAATATCAGAATCG		
TR-03	(真核生物)	TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTA	137	8)
TR-04		AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT		

PCR反応液の組成		PCR反応時間設定		
2×Gflex PCR Buffer	25 μ L	温度	時間	サイクル数
DW*	19 μ L	94°C	60 sec	×1
10 μ M Forward primer	1.5 μ L	98°C	10 sec	×34
10 μ M Reverse primer	1.5 μ L	55°C	30 sec	
Gflex polymerase	1 μ L	68°C	30 sec	
DNA溶液	2 μ L	68°C	120 sec	×1
Total	50 μ L	16°C	∞	

図4 PCR 反応液の組成と反応時間設定

* DW: Distilled water (Life Technologies 社製 UltraPure)

ム・サイエンス(株)に依頼した。PCR 反応液の組成及び PCR 反応時間を図4に示した。

4. 制限酵素反応

制限酵素は New England Biolabs (NEB) 社製のものをを用いた。イヌサフラン識別には *Pst* I、スイセン識別には *Nco* I、トリカブト識別には *Eco*RV を用いた。PCR 産物液 5 μ L、10 × CutSmart Buffer 4 μ L、Distilled Water 30 μ L、制限酵素 1 μ L の割合で混合し 37°C で 15 分間反応させた。

5. アガロースゲル電気泳動

PCR 反応液の 5 倍希釈液及び制限酵素反応液 10 μ L に 6 × Loading Dye (NEB 社製) を加えてゲル電気泳動を行い、トランスイルミネーター UVA-15 ((株)アステック製) を用いて UV (306 nm) 照射下で PCR 産物及び酵素反応産物のバンドを検出した。

結果と考察

1. イヌサフラン疑い検体

イヌサフランの疑いがある4検体について PCR-RFLP 法による鑑別を行った。本手法では、検体がイヌサフランの場合には PCR 産物が切断され2本のバンドが検出されるが、ギョウジャニンニク等のネギ属植物の場合には PCR 産物は切断されず1本のバンドが検出される系となっており⁹⁾、後述のスイセン、トリカブトについても同様の原理である。検出の結果、検体1は PCR 産物の切断が認められたためイヌサフランであると考えられた(図5)。一方で吐しゃ物である検体4は PCR による増幅が見られず、胃酸等による DNA の断片化が進行している可能性が考えられた。そこで別途イヌサフラン属特異的プライマー Colchicum-matK¹⁰⁾ を用いて検出を試みたところ、検体1に加えて検

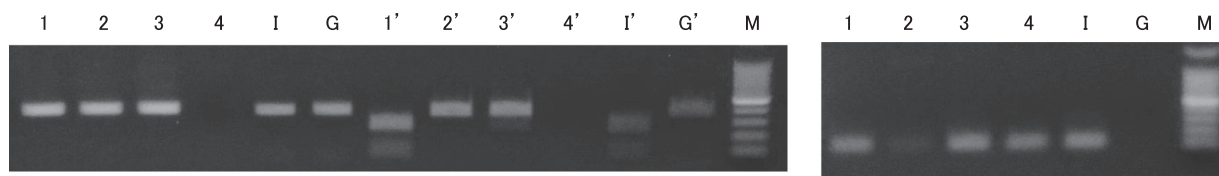


図5 イヌサフランの疑いがある検体の検出結果

左) CA プライマーによる増幅結果。レーン 1-4、I、G は順に検体 1-4、イヌサフラン、ギョウジャニンニクの PCR 産物。
レーン 1'-4'、I'、G' は PCR 産物をそれぞれ制限酵素処置したもの。M は分子量マーカー。
右) Colchicum-matK プライマーによる増幅結果。レーン 1-4、I、G は順に検体 1-4、イヌサフラン、ギョウジャニンニクの PCR 産物。
M は分子量マーカー。

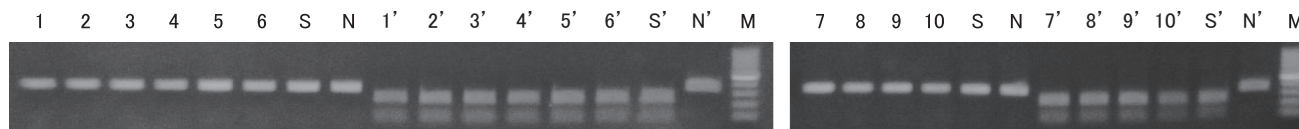


図6 スイセンの疑いがある検体の検出結果

SN プライマーによる増幅結果。M は分子量マーカー。
左) レーン 1-6、S、N はそれぞれ検体 1-6、スイセン、ニラの PCR 産物。レーン 1'-6'、S'、N' は制限酵素処置後の PCR 産物。
右) レーン 7-10、S、N はそれぞれ検体 7-10、スイセン、ニラの PCR 産物。レーン 7'-10'、S'、N' は制限酵素処置後の PCR 産物。

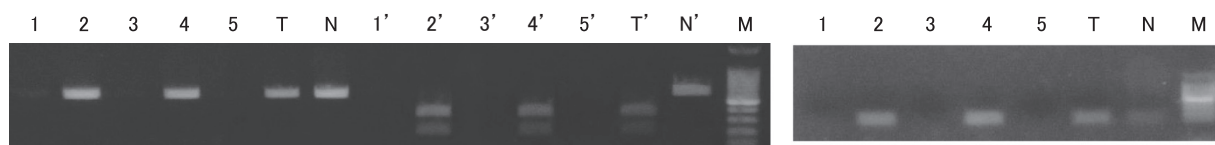


図7 トリカブトの疑いがある検体の検出結果

左) TN プライマーによる増幅結果。レーン 1-5、T、N は順に検体 1-5、トリカブト、ニリンソウの PCR 産物。
レーン 1'-5'、T'、N' は PCR 産物をそれぞれ制限酵素処置したもの。M は分子量マーカー。
右) Aconitum-matK プライマーによる増幅結果。レーン 1-5、T、N は順に検体 1-5、トリカブト、ニリンソウの PCR 産物。
M は分子量マーカー。

体 3、検体 4 でも PCR による増幅が見られ、計 3 検体にイヌサフランが含まれていたと考えられた (図 5)。また理化学的分析では検体 1、検体 3、検体 4 からコルヒチンが検出されており⁶⁾、遺伝子検査と理化学的分析の判定結果が一致した。検体 3 についてイヌサフラン特異的プライマーでのみ検出された理由は、多量のギョウジャニンニク等の中に少量のイヌサフランが含まれる検体構成だった可能性が考えられた。検体 4 については、DNA の断片化が進行していたものの、イヌサフラン特異的プライマーの検出する配列の長さが短かったことから検出に成功したと考えられた。なお検体 2 は PCR 産物が制限酵素反応で切断されなかったことからネギ属植物と考えられ、形態学的鑑別からタマネギであると考えられた。

2. スイセン疑い検体

スイセンの疑いがある 10 検体について PCR-RFLP 法による鑑別を行った。その結果、植物体 7 検体及び調理残品 3 検体のすべてについて、PCR 産物の切断が認められたため、スイセン (またはスイセン属) の植物体及びその調理品であると考えられた (図 6)。また、これら 10 検体について理化学的分析によりリコリンやガラントミンが検出さ

れており (データ未提示)、遺伝子検査と理化学的分析の判定結果が一致した。

3. トリカブト疑い検体

トリカブトの疑いがある 5 検体について PCR-RFLP 法による鑑別を行った。その結果、検体 2 及び検体 4 は PCR 産物の切断が認められたためトリカブト属植物であると考えられた (図 7)。検体 3 及び検体 5 は PCR による増幅が認められなかったが、形態学的鑑別によりそれぞれヨモギ及びシャクであると考えられた。一方でコンポストに廃棄されていた検体 1 は PCR による増幅が認められなかったが、本検体の理化学的分析ではアコニチンが検出された⁵⁾ことから、検体中にトリカブトが含まれていた可能性が高い。別途トリカブト属特異的プライマーである Aconitum-matK¹⁰⁾を用いて検出を試みたところ、検体 2 及び検体 4 は PCR による増幅が認められたが検体 1 では認められなかった (図 7)。検体 1 については、コンポスト内での腐敗によってトリカブト DNA の断片化や分解が進行していた可能性が考えられた。

なお、各 PCR 検出にあたっては真核生物 DNA 検出用プライマー TR03 及び TR04 (表 1) を用いて、DNA が適

切に抽出されていることを確認した。

今回、有毒植物の疑いがある食中毒検体について PCR 及び PCR-RFLP を行い、コンポストに廃棄された 1 検体を除き有毒植物検体の鑑別に成功した。有毒植物が原因と疑われる食中毒が発生した場合、形態学的及び理化学的鑑別に加えて DNA 検出による鑑別を実施することは、食中毒の原因を究明する上で有用であると考えられる。北海道内においては、今回検討した有毒植物のほかにバイケイソウ、チョウセンアサガオ、ドクニンジン等による食中毒事例が発生していることから、これらの植物種についても DNA の検出による鑑別を行えるよう検討する必要があると考える。

最後に、食中毒事例に携わった北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課及び各保健所の関係者の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 北海道庁ホームページ：有毒植物による食中毒に注意しましょう！, <https://www.pref.hokkaido.lg.jp/hf/kse/sho/tyu/kus/103029.html> (確認：2024 年 5 月 29 日)
- 2) 高橋正幸, 藤本 啓, 佐藤正幸：イヌサフラン（コルチカム）誤食による中毒事例（第 4 報）. 道衛研所報, **66**, 99-100 (2016)
- 3) 高橋正幸, 藤本 啓, 武内伸治, 佐藤正幸, 小島弘幸：道

内における植物性自然毒による食中毒事例（平成 28 年）. 道衛研所報, **67**, 99-102 (2017)

- 4) 高橋正幸, 柿本洋一郎, 平島洸基, 武内伸治, 藤本 啓, 二瓶昌子：令和 3 年に道内で発生したイヌサフランの誤食による食中毒事例について. 北海道公衆衛生学雑誌, **35**(1, 特別付録), 22 (2021)
- 5) 高橋正幸, 佐藤正幸, 平島洸基, 武内伸治, 藤本 啓, 吉江秋彦, 橋本ひなた, 澤田（二瓶）昌子：令和 4 年に道内で発生したトリカブトの混入が疑われる食中毒事例について. 北海道公衆衛生学雑誌, **36**(1, 特別付録), 58 (2022)
- 6) 高橋正幸, 佐藤正幸, 平島洸基, 柿本洋一郎, 武内伸治, 藤本 啓：令和 5 年に道内で発生したイヌサフランの誤食による食中毒事例について. 北海道公衆衛生学雑誌, **37**(1, 特別付録), 43 (2023)
- 7) 寺井朗子, 萩野賀世, 浅倉弘幸, 大貝真実, 柳原 碧, 木村圭介, 田中智哉, 観 公子, 中村 耕, 荒金眞佐子, 中野久子, 門間公夫, 笹本剛生：イヌサフランの PCR による簡易迅速鑑別法. 食衛誌, **59**(4), 174-182 (2018)
- 8) 門間公夫, 田端節子, 牛山博文：PCR によるバイケイソウ, オオバギボウシ及びギョウジャニンニクの判別法. 東京健安研七年報, **72**, 185-190 (2021)
- 9) 篠崎淳一, 数馬恒平, 佐竹元吉, 近藤一成, 紺野勝弘：食中毒事例の多い有毒植物の PCR-RFLP 法による鑑別. 食衛誌, **59**(3), 134-140 (2018)
- 10) 国立医薬品食品衛生研究所生化学部 植物性自然毒データベース：有毒の高等植物 5 種の判別法, https://mushplant.go.jp/wp-content/uploads/2023/04/Top5_plants_methods.pdf (確認：2024 年 5 月 29 日)