

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）
「国内侵入のおそれがある生物学的ハザードのリスクに関する研究」
分担研究報告書

植物毒の毒性評価と毒成分分析

分担研究者 紺野勝弘 富山大学和漢医薬学総合研究所
研究協力者 佐竹元吉 お茶の水女子大学生生活環境教育研究センター
研究協力者 篠崎淳一 昭和薬科大学天然物化学研究室

研究要旨

有毒植物の誤食による食中毒では、原因植物の迅速かつ正確な同定が求められる。しかし、通常の聞き取り調査や化学分析では、しばしば時間がかかりすぎることが問題となっている。そこで、PCR-RFLP法を利用した遺伝子鑑別による迅速・簡便な有毒植物同定法を開発し、その分析条件を確立した。本法では、特に高価な機器を必要とせず、簡便な操作および短時間で、容易に植物種を同定できる。また、調理済みの試料にも適用可能である。

A. 研究目的

有毒植物による食中毒が発生した場合、中毒原因植物の迅速かつ正確な同定は、初期対応・治療のためにも必要不可欠である。通常、患者や関係者への聞き取り調査、形態学的鑑定、および化学分析による有毒成分の同定によって行われているが、しばしば結論に至るまで時間がかかりすぎることが問題となっている。そこで、PCR-RFLP法を利用した遺伝子鑑別法を用いて、有毒植物の迅速・簡便な同定法の開発を検討する。

B. 研究方法

1. 食中毒事例の多い植物の PCR-RFLP 法を利用した鑑別法の開発

1) 試料

日本各地（東京、北海道、青森、福島）で採集あるいは購入した植物を以下の実験に供した。用いた植物は以下のとおり：

バイケイソウ（3 個体）

チョウセンアサガオ（1 個体）

トリカブト（4 個体）

スイセン（1 個体）

ギョウジャニンニク（2 個体）

ゴボウ（1 個体）

ニリンソウ（2 個体）

ニラ（1 個体）

2) DNA 抽出

試料（約 0.1g）は蒸留水でよく洗浄後、液体窒素下、乳棒・乳棒を用いてホモジナイズし、1.5 mL チューブに移した。その後の操作は DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、プロトコールに従いゲノム DNA（100 μ L, 8~90 μ g/mL）を抽出した。

3) PCR 条件

PCR 用反応液は 50 μ L として調製した。DNA 抽出液約 50 ng を鋳型として Ex Taq HS を用い標準的な条件にて PCR 反応を行っ

た(プライマーは表1参照)、PCR産物(5 µL)は1%アガロースゲル電気泳動し、UV照射下バンドを検出した。

4) 制限酵素処理

バイケイソウ・ギョウジャニンニクおよびチョウセンアサガオ・ゴボウ識別用として *Bgl*III、トリカブト・ニリンソウ識別用として *Eco*RV、スイセン・ニラ識別用として *Nco*I を用いた。制限酵素反応はPCR産物2 µLを用い全量50 µLとして行った。37°Cで5分反応後、反応液(10 µL)を3%アガロースゲル電気泳動し、UV照射下バンドを検出した。

2. 模擬調理サンプルからの direct PCR

バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセンを10分間煮沸した後、約5 mm²を1.5 mLチューブに移した。そこに、Lysis Buffer (TaKaRa) 100 µLを加え、ペレットミキサーで組織を破碎し、Proteinase K 1 µLを加えた。この破碎液を65°Cで5分反応後、98°Cで2分加熱し酵素を失活させた上清をPCR反応の鋳型とした。

PCR用反応液は50 µLとして調製した。上清2.5 µLを鋳型として、Tks Gflex DNA Polymerase を用いた標準的な条件にてPCR反応を行った。PCR産物(5 µL)は1%アガロースゲル電気泳動し、UV照射下バンドを検出した。

3. *trnH-psbA* intergenic spacer 領域の塩基配列長の比較による食中毒原因植物の推定

平成元年～22年に日本で食中毒原因植物と同定された植物を比較した。比較領域はプライマー対 *trnH*(GUG)および *psbA*(Vijayan and Tsou, *Curr. Sci.*, vol. 99, 1530–1541, 2010)で増幅される領域を比較した。対象塩基配列はDNAデータベースを検索し、塩基配列長を確認した。当該領域の塩基配列がデータベースに登録されていない植物については、入手可能な植物から順次PCRで増幅後、塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1. 食中毒事例の多い植物の PCR-RFLP 法を利用した鑑別法の開発

登田らの報告(食衛誌, 53, 105–120, 2012)によると、有毒植物の誤食による食中毒には以下の特徴がある;

- 1) 発生件数別の原因植物上位4種で全体の約80%を占める
- 2) 採取しようとした植物(食用)と誤認する食中毒原因植物との組合せがかなり固定されている。

このような傾向から、発生件数の多いバイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセンの迅速・簡便な鑑別法を構築することとした。

そこで、バイケイソウとギョウジャニンニク、チョウセンアサガオとゴボウ、トリカブトとニリンソウ、スイセンとニラとを識別するためのPCR-RFLP法を構築した(図1)。本法を適用するために選択したDNA領域は *rbcL* または *matK* の一部とした。両領域は中程度の識別能を有する領域として知られている。よって、同一種間の個体差による相違は検出されず、比較する植物とは明確に識別できることが期待される。

また、制限酵素にNew England Biolabs社のTime-Saver™品質の酵素を選択することにより、反応時間を短縮させる(通常1時間のところ5分で同等の結果が得られる)ことが可能であることを確認した。

2. 模擬調理サンプルからの direct PCR

食中毒事例の原因食品は調理されたものが想定される。そのため、調理された試料に対してもDNA分析を適用することが可能であるかを検討した。バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセンに対して模擬調理(10分間の煮沸)を行った後、DNAの粗抽出および増幅を試みた(図2)。その結果、模擬調理サンプルから抽出したDNAが、

新鮮材料を用いて抽出した DNA と遜色なく PCR の鋳型として適用可能であることを確認した。

3. *trnH-psbA* intergenic spacer 領域の塩基配列長の比較による食中毒原因植物の推定

調理済みの食中毒原因食品は植物の形態学的な特徴を欠くことが想定される。そのため、迅速な原因植物の推定が、適切な治療を早期に開始することにつながる。

葉緑体ゲノム上の *trnH-psbA* intergenic spacer 領域は種により塩基配列長の変化が顕著にあらわれる領域として知られている。そこで、平成元年～22年に日本で食中毒原因植物と同定された植物の当該領域を比較した。現時点で入手可能なデータに関しては、塩基配列長は 162 bp から 611 bp にわたっている。食中毒発生時期や地域などの情報と合わせて利用することにより、食中毒原因植物の推定をすることが可能になると思われる。

D. 考察

有毒植物の誤食による食中毒はウイルスや細菌の汚染による食中毒と比較して、発生件数や患者数は少ないものの致死率が高いため、医療現場における初期対応がより重要となる。食中毒原因植物の同定は患者などによる聞き取り調査や原因成分の化学分析が行われているが、結論に至るまでに時間がかかることが問題となっている。

そこで我々は、迅速・簡便な食中毒原因植物の同定法を開発することを目的に研究を行った。はじめに、誤食例の多い有毒植物 4 種の PCR-RFLP 法を利用した鑑別法を開発した。さらに、上記 4 種を含め過去に誤食例のあった有毒植物の推定においても PCR 法が適用可能であることを示した。

今回開発した鑑別法の特徴は、1) 必要な機器が比較的安価であること、2) 操作が簡便であるため高度な実験手技を必要としないこと、

3) 分析時間が短い (90 分以内) こと、4) 結果 (電気泳動像) の解釈が容易であることが挙げられる。よって、本分析法は保健所や医療機関などの現場において、食中毒患者への初期対応と平行して行えるものと考えている。

E. 結論

PCR-RFLP 法を利用した遺伝子鑑別法により、迅速・簡便な有毒植物鑑別法を確立した。本法は、高価な機器や高度な実験手技を必要とせず、簡便な操作および短時間で、容易に植物種を同定できるので、食中毒患者への初期対応にも有用と考えられる。また、調理済みサンプルにも適用可能なので、従来の形態学的鑑定や化学分析と比較して有用性が高いと思われる。

F. 研究発表

1. 数馬恒平, 佐竹元吉, 紺野勝弘: 重症トリカブト中毒事例とその食品衛生学的背景. 食品衛生学雑誌, 2013, 54 (6), 419-425.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

【資料】

表 1. PCR-RFLP 用プライマー

対象植物	Primer	Sequence (5' 3')
バイケイソウ	BG-rF1	GTCTTGATCGTTACAAAGGACG
ギョウジャニンニク	BG-rR2	CATTACGATAGGAACTCCCAATTC
チョウセンアサガオ	CG-rF12	AGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCC
ゴボウ	CG-rR13	CATTCATAAACAGCTCTACCGTAG
トリカブト	TN-mF3	CCTATCCATCTGGAACCTATTGGTTC
ニリンソウ	TN-mR4	TGAATTTTCTAACATTTGACTCCTTAC
スイセン	SN-rF5	ACTGTGTGGACTGATGGACTTACCA
ニラ	SN-rR6	GCTCTACCGTAGTTTTTTTGCGGATA

表 2. 食中毒原因植物の *trnH-psbA* intergenic spacer 領域の塩基配列長

食中毒原因植物	塩基配列長 (bp)
ニホンスイセン	611 (GQ923940)
タマスダレ	604 (KC704256)
クワズイモ	590
ヨウシュヤマゴボウ	516 (DQ006209)
タバコ	510 (NC_001879)
チョウセンアサガオ	497
イヌサフラン	477 (JF934069)
アジサイ	394 (HE983395)
ジギタリス	393
オクトリカブト	346
コバイケイソウ	281 (JF807783)
バイケイソウ	266 (JF807759)
ドクニンジン	243 (DQ006135)
ヒョウタン	162 (GQ248323)

塩基数の後のカッコは accession number。

Accession number のないデータは今回決定した。

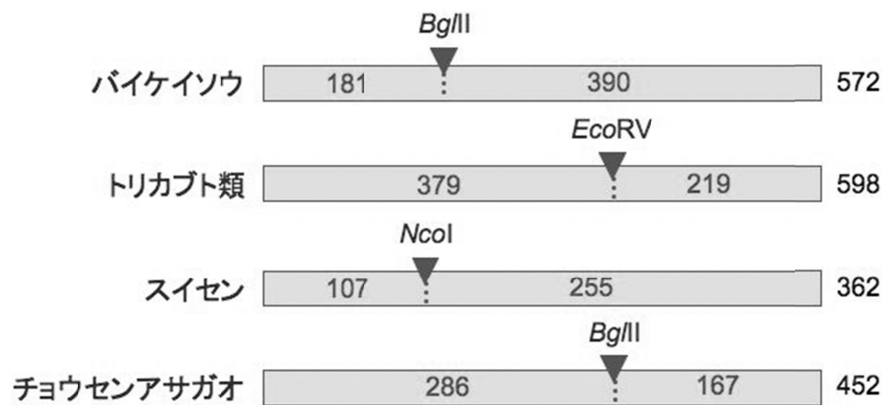
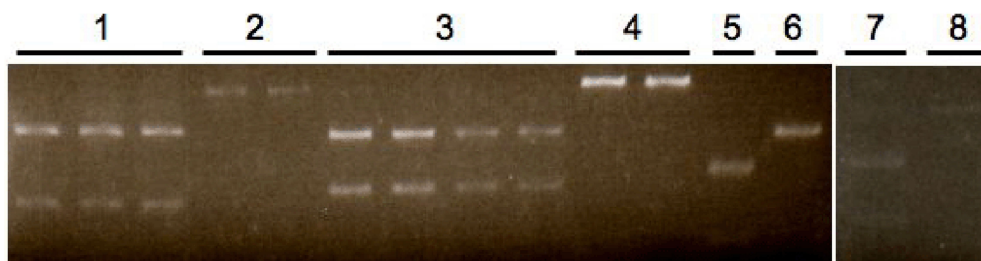


図 1. PCR-RFLP 分析のアガロースゲル電気泳動像.

有毒植物 (1、3、5、7) は制限酵素処理により DNA が切断される。1: バイケイソウ、2: ギョウジャニンニク、3: トリカブト、4: ニリンソウ、5: スイセン、6: ニラ、7: チョウセンアサガオ、8: ゴボウ

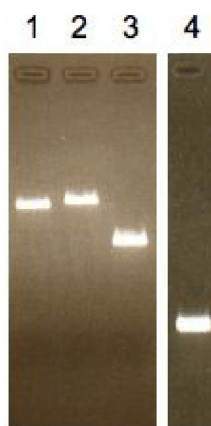


図 2. 模擬調理サンプルからの direct PCR.

レーン 1~3 は 3%アガロースゲル、レーン 4 は 1%アガロースゲルで電気泳動を行った。1: バイケイソウ、2: トリカブト、3: スイセン、4: チョウセンアサガオ