

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」
平成 24～26 年度総合分担研究報告書

植物毒の毒性評価と毒成分分析

研究分担者 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

I. 我々は、植物毒による食中毒を未然に防ぐ事を目的に、「自然毒のリスクプロファイル」を作成し、厚労省ホームページに掲載して、啓蒙活動を進めている。今回、これまでに報告されていなかった植物種（スノーフレーク、ヒメザゼンソウ）による食中毒が発生したので、「自然毒のリスクプロファイル」に追加掲載し、注意喚起を図った。また、「自然毒のリスクプロファイル」は作成・掲載から約 5 年が経過したので、全面的に改訂した。

II. 中毒が発生した場合、現地に赴き関係者と接触することで、現地でしか得られない情報を得、事故の詳細を明らかにすることにより、今後の中毒防止対策の一助とするため、現地調査を行っている。その一環として、2012 年 4 月北海道函館市において発生したトリカブトによる食中毒について現地調査を行い、事故の詳細の調査、原因植物の入手、有毒成分の定量分析等を行った。

III. 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の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。

I. 「自然毒のリスクプロファイル」の改訂

A. 研究目的

「自然毒のリスクプロファイル」は、植物毒による食中毒に対する注意喚起を目的に、平成 21 年度（2009 年）に作成し、厚労省ホームページに掲載した。過去数年間に中毒事故が発生した 20 種を選び、植物の

特徴、間違いやすい類似種、毒成分の分析法などを、種毎にまとめたものである。以来、アクセス数は多いものでは数万回を数え、また各自治体からのリンクも貼られ、かなり活用されている。しかし、この 5 年間に一部データは古くなり、また新規に発生した中毒事例も出てきたので、ここで全

面的に改訂することにした。

B.研究方法・結果

国内の薬用植物・植物毒の専門家 23 名に呼びかけ「植物毒研究会」を組織し、改正点を検討した。その結果、以下の点を改正することになった。

- ・新項目として、「スノーフレーク」、「ヒメザゼンソウ」、「シャクナゲ」の 3 種を加える。
- ・「バイケイソウ」、「コバイケイソウ」は、一項目にまとめて、「バイケイソウ類」とする。
- ・「チョウセンアサガオ」は「チョウセンアサガオ類 1」に、「キダチチョウセンアサガオ」は、「チョウセンアサガオ類 2」に、それぞれ名称変更する。
- ・「患者数」の項には、最新のデータ（過去 5～10 年間 2004～2014 年）を掲載する。

C.考察と結論

「自然毒のリスクプロファイル」は、全国の自治体からのリンクも貼られ、かなり活用されている。特に、中毒が発生した場合には、「自然毒のリスクプロファイル」の情報が参考にされ、新聞・テレビのニュースに転用されることもある。したがって、内容をより充実し、改正していくことは、重要である。実際、毎年中毒は発生し、その中には、これまでに報告されていなかった植物種もある。今後も、数年毎に見直し、改訂版を掲載して最新の情報を提供し、継続的に有毒植物への注意喚起を図って行く必要がある。

D.健康危険情報

特になし

E.研究発表

特になし

F.知的財産権の出願・登録状況

特になし

II.トリカブト食中毒の現地調査

A.研究目的

中毒事故の発生した現地に赴き、関係者と接触することで現地でしか得られない情報を得、事故の詳細を明らかにすることにより、今後の中毒防止対策の一助とする。

B.研究方法・結果

1) 事故の経過

函館保健所の個別聞き取り調査資料及び新聞報道資料より事故の詳細な経過が明らかになった。2012年4月初旬、家族3名（A: 71歳、男性、B: 42歳、男性、C: 41歳、男性）が、Bがニリンソウとして採取してきた野草をおひたしにして、夕食のおかずとして食べた。食後、1.5～2時間後から、全員食中毒症状（吐き気、倦怠感、胸のもよもやなど）を呈した。3時間後、救急車で病院へ搬送。Bは、到着時に心肺停止状態、食後約5時間後に死亡を確認。Aは、5時間後に心肺停止、翌日死亡が確認された。Cは、応急処置の後入院、数日後回復して退院した。

2) 採取植物の同定

患者の死亡に際し、病院は道警（北海道警察）へ検視依頼している。道警は、検視のため遺体を引き取ると同時に、患者自宅への立ち入りと、残されていた野草の全量、

採取者Bが使っていた山菜図鑑,携帯電話などを収集した。採取された野草は,北海道衛生研究所によりトリカブトと鑑定された。救急隊員は,当初からトリカブト中毒を疑っていたという。道警が収集しトリカブトと鑑定された野草は,後に函館保健所に譲渡され同保健所内の冷蔵庫で保管されていた。我々はこの野草を譲り受け観察したところ,すべてトリカブトで,採集したとされるニリンソウやその他の植物種は全く入っていなかった。

3) 有毒アルカロイドの定量および患者のアルカロイド摂取量

トリカブトには,全草に猛毒のアルカロイド(アコニチン,ヒパコニチン,メサコニチン,ジェサコニチン)が含まれ,アコニチンアルカロイドまたはジエステルアルカロイドと総称される。これら4種のアルカロイドを,LC-MSを用いて定量分析した。

分析はESI-FT-MSを検出に用いたLC/MSシステム(ThermoFisher LTQ-Orbitrap XL)を用いて行った。HPLCは,逆相C18カラムを用いたグラジエント条件,観測質量範囲m/z 600-700,サンプルは各10 mLを注入した。アルカロイド標品は和光純薬市販品を用い,添付文書に基づき標準溶液を調整し検量線を作成した。

譲り受けたトリカブトについて乾燥重量1 g当りのジエステルアルカロイド類の含有量を定量したところ,アコニチン 0.43 mg,メサコニチンは 0.55 mg,ヒパコニチンは 0.04 mg,ジェサコニチン 0.89 mgで,これらの和(ブシジエステルアルカロイド量)は,1.9 mgであった。

この結果から推計すると,患者の摂取した総アルカロイド量は 14.4 mgと考えられ

る。すなわち,一人当たり5 mg程度摂取したことになる。アコニチンの致死量については,およそ3-6 mgという値が知られているので,この摂取量は,致死量を十分含んでいたことになる。なお,後日道警は,死亡した2名の血中からトリカブトに特徴的なアコニチンなどの3成分が検出されたと発表した(表 敏弘ら:重症トリカブト中毒の3名同時搬入例,中毒研究 25: 332, 2012)。

4) 採取地の植物相観察

誤認するに至った現場の植物相を検証するため,聞き取り調査で得られた情報をもとに,採取地と考えられる函館市郊外の山林の植物相を調査した。

トリカブトは林道基点近くの沢筋に小群落を1つ見つけたのみで,その近辺及び上流部には全く見つける事はできなかった。トリカブトのすぐ近くにはニリンソウがまばらに生えていた。ニリンソウは,林道の基点から終点まで林道沿いの林床に群生していたが,尾根筋となる林道終点以北には観察されなかった。その他,川沿いの植林された針葉樹の林床には,アキタブキ,マイヅルソウ,バイケイソウ,モミジガサ,チゴユリ,ミツバ,エゾニュウ,オニシモツケ,ドクニンジン,ウマノミツバ,広葉樹林の林床には,バイケイソウ,エンレイソウ,オニシモツケ,モミジガサ,オオウバユリ,タンポポなどが観察された。

C. 考察

今回の事故では,採取者が「ニリンソウを取ってきた」と家族に話していることから,ニリンソウとトリカブトの誤認と考えられる。残存していた植物の観察,および

その成分の化学分析からも、トリカブトであることが裏付けられた。最近20年余の日本国内における高等植物による食中毒事例の統計調査によれば、トリカブトによる食中毒に関して、誤認した植物としてはニリンソウが最多で、ついでモミジガサが多いと報告されている(登田ら, 食衛誌, 2012: 53, 105.)。野草を採取したとされる現地の植物相調査でも、トリカブトの周辺にニリンソウ, モミジガサが生育していた。以上のことから、トリカブト中毒を未然に防止するには、まず原植物の正確な鑑定、あるいは似た植物との適切な見分け方が如何に重要かがわかる。これに関して、北海道のアイヌの伝承に学ぶべきことが多々ある。かつてニリンソウは、アイヌにとって重要な食料のひとつであり、毎年春には大量のニリンソウを採取し、冬の保存食料としていた。採集に関するいくつかの資料には、若葉のうちトリカブトの葉によく似ているので、花が咲いてから採るのが良いとされている。ニリンソウの花が咲くころには、トリカブトは大きくなっており確実に区別できることが示されている。現在出版されている多くの山菜図鑑も、ニリンソウは花やつぼみのついているものを採るのが安全だと指摘している。

D. 結論

植物毒による食中毒は、細菌やきのこほど多くはないものの、毎年少なからず発生する。春の山菜の時期に特に多く、山菜とよく似た有毒植物を採取し、誤って食べて中毒する例が後を絶たない。ニリンソウなどと誤認してのトリカブト中毒は、死に至ることも多いので、特に注意が必要である。

今回のトリカブト中毒現地調査により、植物の誤認を防ぐことが如何に重要であるかが示された。個々の植物によって、特徴や見分け方が違うので、それぞれに応じたけきめ細かい注意喚起、啓蒙活動が必要と考えられる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

原著論文

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

III. 遺伝子鑑別による迅速・簡便な有毒植物同定法の開発

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もの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 mL，8~90 mg/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 mL）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 mL を用い全量 50 mL として行った。37°C で 5 分反応後、反応液（10 mL）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 mL を加え，ペレットミキサーで組織を破碎し，Proteinase K 1 mL 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 μ L として調製した。上清 2.5 mL 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 mL）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。この様な傾向から，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。

4. 原因植物の DNA 分析による同定

2014 年 5 月，青森県八戸市で発生したチョウセンアサガオの誤食による食中毒の現地調査を行い，原因植物と思われる植物サンプルを入手した。そこで，DNA 鑑別による植物種の同定法を適用し，本原因植物の種同定を試みた。

食中毒原因植物のゲノム DNA を鋳型として，*rbcL*（部分断片），*matK*（部分断片）および *trnH-psbA* intergenic spacer 領域

を PCR にて増幅後，DNA シークエンサーを用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列をクエリーとし，DNA データベース (BOLD Systems, GenBank/DDBJ/EMBL) の検索機能を用いてクエリーに最も近い配列を同定した。

塩基配列を決定した *rbcL* (670 bp) を BOLD System の BOLD Identification Systems にて植物種を推定したところ，食中毒原因植物はナス科植物 (ヨウシュチョウセンアサガオ) であると推定された。また，*matK* (848 bp)，*trnH-psbA* intergenic spacer 領域 (550 bp) の配列を GenBank の BLAST 検索を行ったところ，同様の結果が得られた。この結果により，本遺伝子鑑別法が，実際の中毒原因植物にも有効に適用できることが確認できた。

C. 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。

D. 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，治療のため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。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし