

I. 総括研究報告

植物性自然毒による食中毒対策の
基盤整備のための研究

登田美桜

令和元年度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

植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究

総括研究報告書

研究代表者	登田美桜	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部 第三室長
研究分担者	近藤一成	国立医薬品食品衛生研究所生化学部 部長
研究分担者	南谷臣昭	岐阜県保健環境研究所 食品安全検査センター 専門研究員

研究概要

厚生労働省に届出された食中毒事件において、全体の発生件数及び患者数に占める割合は数%と少ないが、重篤化しやすく死亡事例の主な原因とされるのが「自然毒」である。本厚生労働科学研究では、自然毒のうち「植物性自然毒」による食中毒に焦点をあて、その発生予防と、発生時の原因究明に役立つ研究成果を出すことを目的に、下記3つの研究課題について研究を行っている。

- ・ 研究課題 1. 植物性自然毒の多成分同時分析法の開発
- ・ 研究課題 2. 食中毒の病因植物種の遺伝子解析による同定法の開発及びデータベースの作製
- ・ 研究課題 3. 植物性自然毒による食中毒事件に関する情報研究

研究課題 1 及び 2 は、食中毒の発生時に植物性自然毒が原因として疑われた場合に、中毒残品に含まれる植物種/毒成分を迅速に同定するための分析法の開発に関する研究である。研究課題 1 では、全国の地方衛生研究所に設置されている LC-MS/MS を用いた多成分同時同定法の開発に取り組んでおり、今年度は、これまでに選定した有毒植物 44 成分、有毒キノコ 12 成分について調理済み食品への適用条件を検討した。研究課題 2 では遺伝子解析リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法や Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を応用した植物種の同定法の開発に取り組んでおり、今年度は有毒植物 5 種とそれと誤認しやすい植物の同定への LAMP 法の利用を検討した。さらに、これまでに開発した遺伝子検査法の情報を提供する新たな植物性自然毒データベース MushPlant を構築した。研究課題 3 では今後の食中毒の重点的な予防策の検討に資する情報研究に取り組んでおり、今年度は国と全国自治体が植物性自然毒についてどのような情報提供を行っているのか現状を調査した。

研究協力者

畝山智香子	国立医薬品食品衛生研究所
與那覇ひとみ	国立医薬品食品衛生研究所
坂田こずえ	国立医薬品食品衛生研究所
菅野陽平	北海道立衛生研究所
鈴木智宏	北海道立衛生研究所
青塚圭二	北海道立衛生研究所
谷口 賢	名古屋市衛生研究所
友澤潤子	滋賀県衛生科学センター

A. 研究目的

厚生労働省に届出された食中毒事件において、全体の発生件数及び患者数に占める割合が数%と少ないものの、症状が重篤化しやすく死亡者が報告されているのが「自然毒」を原因とする食中毒である。本研究では、自然毒のうち「植物性自然毒」に焦点をあて、それを原因とする食中毒事件の発生予防と原因究明に役立てることを目的として、次のような2つのアプローチで研究を計画した。

食中毒事件の発生時に植物性自然毒が疑われた場合には、当該地域の地方衛生研究所（以下、地研）が中毒残品の化学的分析と遺伝子解析により原因となった植物種/毒成分の同定を行う。しかし現状では分析・解析法が十分に整備されているとは言えない。そのようなことから、本研究では植物性自然毒による食中毒の迅速な原因

究明につなげるため、全国の地研に設置されている分析機器を考慮し、どこの地研でも利用可能な分析・解析法について化学的分析と遺伝子解析の両面から検討することにした。

研究課題1「植物性自然毒の多成分同時分析法の開発」では、化学的分析として、農薬のポジティブリスト制度の導入等を受けて全国地研で設置された液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いた、有毒植物とキノコの多成分同時分析法の確立を目的としている。

昨年度の研究では、過去の文献等と市販品の有無を参考に対象成分の候補として有毒植物44成分、有毒キノコ12成分を選定し、LC-MS/MSの分析条件の最適化と調理済み残品の分析可能な前処理法を検討した。今年度は、さまざまな食品による食中毒に利用できるようにするため、カレーや餃

子といった分析を妨害するマトリックスが多い調理済み残品への適用性を検証することにした。

研究課題 2「食中毒の病因植物種の遺伝子解析による同定法及びデータベースの作成」では、遺伝子解析リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法や Loop-Mediated Isothermal Amplification（LAMP）法を応用した植物種の同定法の開発を目的としている。

本課題ではこれまで、有毒植物の同定にリアルタイム PCR の応用が可能であることを確認するとともに、LAMP 法の利用により食中毒の原因となるキノコを野外で短時間に鑑別可能な方法を構築した。今年度は、有毒植物 5 種（スイセン、バイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオ、トリカブト）とそれと誤認しやすい食用可能な植物種を検出できる LAMP 法を用いた同定法の開発を目的とした。さらに、これまでに確立した同定法の利用拡大を目指し、それらのプロトコルやプライマー情報等の関連情報を紹介するデータベースを作製することも目的とした。

一方、**研究課題 3「植物性自然毒による食中毒事件に関する情報研究」**では、植物性自然毒を原因とする食中毒事件に関する既存情報を調査・集約して解析し、重点的に予防すべきことを

助言するとともに、今後の食中毒事件の調査方法や情報の共有、消費者への注意喚起のやり方について検討することを目的としている。

昨年度は、昭和 30 年～平成 30 年に国内で発生し厚生労働省に届出された有毒植物による食中毒事件について調査・収集し、原因植物の経時的な傾向、発生に至った経緯、原因施設ごとの傾向を解析した。その結果から、有毒植物による食中毒の発生予防には消費者への知識普及や注意喚起が必須であることが示唆された。しかし、実際に消費者へ広く周知するのは難しく十分にはできていないのが現状である。そのため今年度は、信頼性の高い情報源として国・地方自治体が有毒植物による食中毒について消費者に向けてどのような情報提供を行っているのかを調査し、課題を検討することを目的とした。さらに、全国自治体関係者の意見を聴取しつつ、将来的な活用に向けて、食中毒に関する情報の収集、蓄積及び提供の方法を探ることも目的とした。

B. 研究方法／結果及び考察

各研究課題の分担報告書から研究要旨を以下に抜粋する。詳しい研究方法及び結果、並びに考察については、それぞれの分担報告書を必ず確認し

ていただきたい。

研究課題1 「植物性自然毒の多成分同時分析法の開発」要旨より

食中毒事件発生時の検査を担当する地研が広く利用でき、調理済み中毒残品にも適用可能な方法として、LC-MS/MSを用いた簡易・迅速な手法の開発を行った。昨年度（平成30年度）の研究は、わが国において過去に発生した中毒事例から、発生頻度や症状の重篤度を考慮して分析対象化合物の毒成分として高等植物の44成分と毒キノコの12成分を選定し、LC-MS/MSの分析条件を最適化した。

令和元年度は、調理済み食品中の毒成分を定量するための前処理法として、抽出時にトリクロロ酢酸溶液を加えて除タンパク処理を行い、脂質除去機能を有する精製カートリッジを通液した後、希釈するという簡易な操作フローを構築した。高等植物の42成分を対象とし、内部標準物質としてカフェイン-d9、レセルピン-d9を測定時のシリジスパイク、ジゴキシン-d3をサロゲートとして用い、ハウレンソウ、ギョウザ、カレーの3種類の食品における1 μ g/gの添加回収試験を実施したところ、ジギトキシン、ジオスシン、ジオスゲニンを除く、39成分で真度が75～116%、併行精度（RSD%）が21%以内と概ね良好な結果となった。本法は高

等植物を原因とする調理済み中毒残品中の毒成分を同定、定量する試験法として有用であると考えられた。

研究課題2 「食中毒の病因植物種の遺伝子解析による同定法、およびデータベースの作製」要旨より

遺伝子配列に基づく特異的な検出同定法を、中毒事例が多いきのこ2種、植物5種について簡易法と確定法のそれぞれの検出法を確立してきた。これらの検出法を広く使用してもらうため、さらに、これを基本にして、新たな標的に対する試験法を自ら作成できるようにする目的で、試験法プロトコル、プライマー情報、関連する遺伝子配列情報、中毒統計情報をまとめて整理した自然毒データベース **MushPlant** を作製して公開した。

野外で実施可能な LAMP 法を用いた有毒植物 5 種に対する検査法の開発を行った。

各有毒植物特異的な LAMP 法用のプライマーを設計し、その性能確認をした。標的とする有毒植物で増幅を示したプライマーについて、さらに増幅反応時間の短縮と検出感度の向上のために追加ループプライマーを設計して検討した。また、多数の植物間での交差性を確認し、標的となる有毒植物と特異性の高いプライマーセットを選出した。スイセンを除く有毒植物 4 種について、食用植物

20 種とも交差反応しない検出系を確立できた。

研究課題 3 「植物性自然毒による食中毒事件に関する情報研究」要旨より

有毒植物による食中毒の発生予防と原因究明に役立つことを研究目的にしている。昨年度の研究で、過去の食中毒事件について原因施設ごとの発生原因をまとめた。その結果、飲食店や旅館が原因施設として報告された事件ではプロの料理人であるにもかかわらず有毒植物と気付かずに誤って調理・提供していた。これらの事例は、見た目が酷似している場合には、普段から食材を扱っている人でも疑うことがないという状況をよく示しており、農産物直売所に納入された農産品に有毒植物が混入した事件でも同様のことが考えられた。また家庭で起きた事件では、食用にできる植物と間違い易い有毒植物があることを知らなかったという報告もあった。そのようなことから、有毒植物による食中毒の発生予防には消費者への徹底した知識普及や注意喚起が必要であることが示唆されたことから、今後の情報提供の参考資料とするために、今年度は、国や都道府県、政令指定都市が有毒植物を原因とする食中毒についてどのような情報を提供しているのかを調査し

た。その結果、自治体によって提供する情報の質、量ともに大きく異なり、東日本に位置する自治体の方が充実していた。中には独自に注意喚起のためのリーフレット/パンフレットを制作している自治体もあった。それらは今後、自治体に関係なく広く利用できるリーフレット/パンフレットを作成する際に参考となる。さらに、有毒植物が原因と疑われる食中毒発生時の迅速な原因究明につなげるため、食中毒の原因特定の最前線に位置づけられる全国地研の研究者等の意見をもとに原因究明を行う上での現状と問題点について調査し、改善のための方策を検討している。

D. 結論

植物性自然毒による食中毒について、発生時の迅速な原因究明に役立つ病因植物種/毒成分の同定法の開発研究（研究課題 1、2）及び発生の予防策の検討に資する情報研究（研究課題 3）を昨年度に継続して実施した。

今年度は、化学的分析の課題では LC-MS/MS を用いた多成分同時同定法について調理済み食品への適用条件を検討した。有毒キノコの成分分析ではいくつ解決すべき課題が残されたが、有毒植物の成分分析については概ね良好な結果が得られた。今後、試験室間共同試験を実施して全国地研が広く導入できるような標準法にすることを目標

す。

遺伝子解析の課題では、LAMP 法を有毒植物 5 種とそれと誤認しやすい植物にも利用できるような同定法の開発に取り組み、特異的なプライマーの設計とその性能確認を行った。今年度に得られた解決すべき問題点についてはさらに検討し、改良する計画である。さらに、これまでに開発した遺伝子検査法の情報を提供する新たな植物性自然毒データベース MushPlant を構築した。今後、広く意見を聞きつつ掲載内容をより充実させていく。

化学的分析と遺伝子解析ともに、最終的に、地研で広く利用可能な病因植物種/毒成分をマルチに同定できる標準法が確立されれば、散発的に発生するため対応に混乱が生じやすい植物性自然毒による食中毒に対して、地研の検査技術を一定の水準に保つことができ、発生時の迅速な原因究明につながる事が期待される。

情報研究の課題では、国と全国自治体が植物性自然毒について消費者にどのような情報提供を行っているのか現状を調査した。その結果は、将来的に国や自治体関係者も広く利用可能な植物性自然毒に関する注意喚起や情報提供のリーフレット又はパンフレットを作成する際に良い参考となる。さらに、食中毒発生時の迅速な原因特定につなげるため、関係者の意

見を伺いつつ全国地研をつなぐネットワークのシステム構築の検討を開始した。

今年度は 3 年計画の 2 年目であるため本研究報告は途中段階での報告であるが、各課題で設定した目的に向かって着実に結果を出しつつある。次年度は最終年度となるため、各研究課題の完了を目指す。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 近藤一成、坂田こずえ、加藤怜子、菅野陽平、武内伸治、佐藤正幸：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. *食品衛生学衛誌*, **60**(5), 144-150, 2019
- 2) Narushima, J., Kimata, S., Soga, K., Sugano, Y., Kishine, M., Takabatake, R., Mano, J., Kitta, K., Kanamaru, S., Shirakawa, N., Kondo, K., Nakamura, K.: Rapid DNA template preparation directly from a rice sample without purification for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of rice genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **84**, 670-677, 2020

2. 学会発表

- 1) 成島純平、中村公亮、木俣真弥、曾我慶介、菅野陽平、岸根雅宏、高畠令王奈、真野潤一、橘田和美、金丸俊介、白川七海、近藤一成：コメ由来遺伝子の高精度検査を可能にする簡易法の開発. 日本食品衛生学会第 115 回学術講演会、

東京、2019年10月

- 2) 菅野陽平：LAMP法（ループ介在等温増幅法）による自然毒の遺伝子検査へのアプローチ．第56回全国衛生化学技術協議会年会 部門別研究会 食品部門、広島、2019年12月
 - 3) 坂田こずえ、加藤怜子、近藤一成：自然毒データベースの改定について．第56回全国衛生化学技術協議会年会、広島、2019年12月
 - 4) Kondo, K., Sakata, K., Kato, R, Noguch, A.: Identification of toxic plants that cause severe food poisoning using real-time PCR. Recent Advances in Food Analysis Prague, Czech Republic, Nov.5-8 (2019)
 - 5) 谷口賢、南谷臣昭、友澤潤子、登田美桜：植物性自然毒の多成分同時分析法の開発：高等植物、令和元年度地方衛生研究所全国協議会、広島市、2019年12月
 - 6) 友澤潤子、谷口賢、南谷臣昭、登田美桜：植物性自然毒の多成分同時分析法の開発：キノコ、令和元年度地方衛生研究所全国協議会、広島市、2019年12月
- 3) 登田美桜、「国内における有毒植物による食中毒について」令和元年度岐阜県食品衛生監視員研修会（2020.1）
 - 4) 登田美桜、「食中毒の原因となる自然毒について」令和元年度地方衛生研究所全国協議会衛生理化学分野研修会（2020.2）

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

3. 行政関係者向け説明会

- 1) 登田美桜：「自然毒に関する最近の話題」令和元年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会、2019年11月、地方衛生研究所全国協議会近畿支部
- 2) 登田美桜：「国内における最近の自然毒による食中毒関連情報について」令和元年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸ブロック会議（2019.12）