

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2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、食中毒データベースの改訂および簡易試験法としての有毒植物 LAMP 法の開発
- ・ 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)を用いた有毒植物及び有毒キノコの成分に関する多成分同時同定法の開発に取り組んでいる。今年度研究では、これまでの研究で開発した有毒植物28群の44成分を対象とする多成分同時同定法について、3種類の食品(ホウレンソウ、ギョウザ、カレー)への添加試料を用いた試験室間妥当性評価により標準法としての適用性を評価した。また、実際の有毒植物6種を試料とした場合への適用性も評価し、いずれの評価でも良好な結果が得られた。有毒キノコの成分分析では、中毒事例や死亡事例が多い5キノコ群、9成分を対象として、逆相クロマトグラフィー(RPLC)によるLC-MS/MS分析条件を検討した。本研究で最適化された測定条件を用いることにより、代表的な有毒キノコの鑑別法として適用可能であると考えられた。

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いる。今年度研究では、有毒植物 5 種とそれと誤認しやすい植物の同定に LAMP 法が利用可能であるか検討した。その結果、実際の食中毒を想定した加熱・消化処理した植物試料も標的有毒植物のみで増幅を示し、また試料調製から 2 時間程度で結果判定が可能であったことから、有毒植物が疑われる食中毒の迅速かつ簡便な原因特定に有用と考えられた。さらに、本研究課題では昨年度に、植物性自然毒の食中毒統計情報から掲載検査法分析スキーム、分析法開発スキーム、配列情報のほか、分類のための分子系統樹解析例をまとめた植物性自然毒データベース「MushPlant」を構築しており、今年度は、本データベースをより活用しやすくすることを目的として改良、更新作業を行った。

研究課題 3 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している。今年度研究では、近年の食中毒事件で原因になることの多い有毒植物 8 種について、それらを原因とする食中毒事件で報告された症状等を原因植物ごとにまとめて傾向を解析した。さらに、有毒植物による食中毒の症状が多様なことから食中毒調査時に的確な症状の聞き取りができていないという問題点の解決を目指して、食中毒調査の経験者と医師の助言をもとに「食中毒症状調査票（植物性自然毒）」を作成した。また、食中毒の主な発生原因である食用植物と有毒植物の誤認について市民に注意を呼び掛けるパンフレット及びポスターを作成し、誰でもダウンロードして利用出来るようウェブ上に公開した。

研究協力者

坂田こずえ	国立医薬品食品衛生研究所
田口 千恵	国立医薬品食品衛生研究所
畝山智香子	国立医薬品食品衛生研究所
井上 依子	国立医薬品食品衛生研究所
酒井英二	岐阜薬科大学薬草園研究室
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

太田康介	山形県衛生研究所
高橋正幸	北海道立衛生研究所
木村圭介	東京都健康安全研究センター
吉岡直樹	兵庫県立健康科学研究所
野村千枝	大阪健康安全基盤研究所
山口瑞香	大阪健康安全基盤研究所
竹内 浩	三重県保健環境研究所
吉村英基	三重県保健環境研究所
神藤正則	堺市衛生研究所

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に研究を計画した。

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、広く利用可能な分析・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、植物性自然毒の中毒事例において病因植物種を網羅的に同定するために、地研が広く利用でき、調理済み中毒残品にも適用可能な標準的的化学分析手法の確立を目指した。分析機器は、農薬のポジティブ制度導入により地研において汎用されている液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いることとした。

有毒植物についてはこれまでに、我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、分析対象とすべき 28 植物群の 44 成分を選定し、調理済み食品中でも定量可能な LC-MS/MS による簡

易、迅速な一斉試験法を確立した。令和2年度（以下、今年度）研究は、本法が複数の機関で実施可能な試験法であることを検証するために、食品の添加試料を用いた試験室間の妥当性確認を行うことを目的とした。また、標準添加法により毒成分の含有量を推定した代表的な植物試料について、本法による定量分析を行い、実際の有毒植物への適用性の確認を行うこととした。

一方、有毒キノコについては、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）のLC-MS/MSによる毒成分の同時分析法を検討していたが、毒成分の極性の違いが影響し、正確な同定・定量は困難であった。そこで今年度研究では、対象となるキノコの毒成分や指標成分を化学的な性質により分類した上で、まずは中毒事例や死亡事例が多いキノコ群の9成分を対象とした逆相クロマトグラフィー（RPLC）によるLC-MS/MS測定条件の検討を目的とした。

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の開発、食中毒データベースの改訂および簡易試験法としての有毒植物LAMP法の開発」では、食中毒事例が多い植物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）を対象にした植物種の同定法とし

て、遺伝子解析リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法とLoop-Mediated Isothermal Amplification（LAMP）法を応用した、食中毒発生時に簡便迅速に利用できる簡易検査法と、より確実に同定可能な確定検査法の両法の確立を目指している。

今年度研究では、昨年度までに実施してきたLAMP法の開発において対象の植物5種類のうち課題として残されていたスイセンの検出を可能にした上で、実際の食中毒を想定し、加熱・消化処理した有毒植物の試料へのLAMP法の適用可能性を確認することを目的とした。さらに、陽性コントロールプラスミドを用いて検出限界を確認することにより、本LAMP法の有効性について検討を行うこととした。

また、昨年度に構築した植物性自然毒データベース「MushPlant」をより活用しやすくするための改良、更新作業を行うことを目的とした。

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」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指している。

今年度研究では、平成 30 年度に実施した研究に継続して、過去の有毒植物による食中毒事件で報告された症状等を原因植物ごとにまとめ、それぞれの傾向を示すことを目的にした。さらに、有毒植物による食中毒調査における問題点を検討し、その改善策を提案することを目指した。また、これまでの研究結果から、食中毒の主な発生原因が有毒植物と食用植物との誤認であること、そして食中毒患者が食用植物と外観がよく似た有毒植物があることを知らなかった場合が多いと示唆されたことから、市民向けの知識普及と注意喚起のためのパンフレット及びポスターを作成することを目的とした。

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方衛生研究所(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。

有毒植物 令和元年度までに 28 植物群の 44 成分を対象とする多成分同時分析法を確立した。令和 2 年度は、ホウレンソウ、ギョウザ、カレーの 3 種類の食品の添加試料を用いた試験室間妥当性評価により、標準法としての適用性を評価した。また、中毒事例や死亡事例が多い代表的な中毒原因植物であるバイケイソウ、スイセン、チョウセンアサガオ、トリカブト、ジャガイモ、イヌサフランの 6 試料に含まれる毒成分の濃度を、標準添加法により推定し、絶対検量線法により求めた定量値と比較することにより、実際の有毒植物への適用性も評価した。いずれの評価でも良好な結果が得られた。

有毒キノコ 中毒事例や死亡事例が多い 5 キノコ群(ツキヨタケ、ドクツルタケ、カエントケ、カキシメジ、ニセクロハツ)の 9 成分を対象として、RPLC による LC-MS/MS 分析条件を検討した。成分の分離度や感度を考慮して、分離条件と SRM 条件を最適化することにより、定量限界を 10 ng/mL 以下に設定することが可能であった。

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の開発、食中毒データベースの改訂および簡易試験法としての有毒植物 LAMP 法の開発」要旨より

I【自然毒データベース MushPlant について】

これまでに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 種について簡易検査法と確定検査法を確立してきた。これらの検出法を一般的に広く使用してもらい、さらに新たな植物種や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、分析スキーム、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。令和二年度は、これを改訂する作業を行った。

II【迅速試験法としての有毒植物 LAMP 法の開発】

これまで作成したバイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオ、トリカブト検出用 LAMP に加え、スイセン検出用 LAMP プライマーを新規に設計し、その性能について確認した。また、有毒植物が疑われる実際の食中毒を想定し、加熱・消化処理した植物試料を対象に各有毒植物検出用 LAMP を行い、各植物が検出可能か確認した。さらに、陽性コントロールプラスミドを用いて検出限界も確認し、本 LAMP 法の有効性について検討を行った。

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てるため、国内で発生した関連の食中毒事件に関する情報を調査した。対象は、厚生労働省監修（平成 10 年以前は厚生省監修）の「全国食中毒事件録（昭和 30 年～平成 11 年版）」及び厚生労働省ホームページの食中毒統計資料で公表された食中毒事件のうち、「有毒植物」を原因とする事件とした。今年度研究では、近年の食中毒事件の発生件数が多いスイセン、ジャガイモ、バイケイソウ類（バイケイソウ又はコバイケイソウ）、チョウセンアサガオ、ハシリドコロ、トリカブト、ヨウシュヤマゴボウ、イヌサフランについて、それらを原因とする食中毒事件で報告された症状等を原因植物ごとにまとめ、傾向を解析した。その結果から、食中毒調査における問題点の一つとして、有毒植物による食中毒の症状が多様であるために的確な症状の聞き取りができていない可能性が指摘された。そのため、有毒植物に特有の症状を把握して効率良く調査を実施することができ、解明されていない有毒成分の毒性量の導出に必要なデータも記録できるようにした「食中毒症状調査票（植物性自然毒）」を作成した。

また、これまでの研究で得られた知見によると、食中毒の発生予防には、

有毒植物に関する市民への徹底した正しい知識の普及と、特に食用植物との誤認を防ぐための注意喚起が何よりも必要で、効果があると考えられたことから、食中毒の主な発生原因である食用植物と有毒植物の誤認について市民に注意を呼び掛けるパンフレット及びポスターを作成した。全国自治体の中には独自にパンフレット等を作成しているところもあるが、自治体が異なると配布等がしにくいといった意見が聞かれたことから、ウェブサイト上に公開し、利用者の所属に関係なく誰でもダウンロードして利用出来るようにした。

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 28 植物群の 44 成分を対象とする多成分同時同定法について、3 種類の食品の添加試料を用いた試験室間の妥当性確認により標準法としての適用性を評価し、一部の成分を除き概ね良好な結果が得られた。また、実際の有毒植物を試料とした場合への適用性も評価し、いずれの評価でも良好な結果が得られた。一方、有毒キノコの

成分分析では、中毒事例や死亡事例が多い 5 キノコ群、9 成分を対象として、RPLC による LC-MS/MS 分析条件を検討した。これに有毒植物の前処理操作フローを一部改変して組み合わせることにより、簡易、迅速な試験法の開発が期待される。

遺伝子解析の課題で新たに構築した自然毒データベース「MushPlant」は、食中毒統計情報から、検査法の分析手順、新たな分析法開発スキーム、遺伝子配列情報のほか、分類を行うための分子系統樹解析例をまとめたものである。今年度は、より本データベースを活用しやすくすることを目的として改良、更新作業を行った。これらの情報を活用することで各試験機関は既法の遺伝子検査法の実行や改良を行えるだけでなく、新たな標的に対する試験法の開発が可能となる。さらに、LAMP 法を応用した植物の簡易検査法の開発については、これまでに作成したバイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオ、トリカブト検出用プライマーセットに新規作成したスイセン検出用プライマーセットを加え、合計 5 種類の有毒植物が検出可能となった。5 種類の有毒植物検出用 LAMP 法は、有毒植物が疑われる実際の食中毒を想定した加熱・消化処理した植物試料も標的有毒植物のみで増幅を示し、また試料調製から 2 時間程度で結果判定が可能であ

ることから、有毒植物が疑われる食中毒の迅速かつ簡便な原因特定に有用と考えられる。

化学的分析と遺伝子解析ともに、全国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たことにより、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、発生時の迅速な原因究明につながることを期待される。特に遺伝子解析での検査法はウェブ上に公開したことで、全国地研がいつでも検査法の情報を容易に入手し、利用できる体制が構築された。

情報研究の課題で今年度に作成した「食中毒症状調査票(植物性自然毒)」は、過去に発生した有毒植物による食中毒事件の傾向解析で判明した食中毒調査における問題点を解決し、従来の調査票と合わせて利用することで、今後の有毒植物による食中毒の調査をより効率よく効果的にするものである。また、食中毒の主な発生原因である食用植物と有毒植物の誤認について市民向けの注意喚起を目的に作成したパンフレット及びポスターは、ウェブ上で公開することで広く利用可能となり、知識普及と食中毒の発生予防の一助になると期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

- 1) 菅野 陽平、青塚 圭二、坂田 こずえ、中村 公亮、鈴木 智宏、近藤 一成：LAMP法を用いた有毒植物の迅速判別法の構築、日本食品化学学会 第26回 総会・学術大会、誌上発表、2020年5月
- 2) 近藤 一成、坂田 こずえ、曾我 慶介、菅野 陽平、佐藤 正幸、福多 賢太郎、豊田 敦、野口 英樹：猛毒 *Amanita virosa* のゲノム解析と遺伝子アノテーション、第43回日本分子生物学会年会 2020年12月
- 3) 曾我慶介、吉田光範、坂田こずえ、近藤一成：ナノポアシーケンス技術を用いた致死性有毒キノコ *Amanita virosa* のゲノムアセンブリの検討、第43回日本分子生物学会年会 2020年12月
- 4) 菅野陽平、青塚圭二、上野健一、鈴木智宏：ウェスタンブロット法によるアレルギー物質検査の判定に関する画像解析、第57回全国衛生化学技術協議会年会、誌上発表、2020年11月
- 5) 南谷臣昭、谷口賢、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(第2報)、令和2年度地方衛生研究所全国協議会、紙上・Web開催、2020年11月

3. 行政関係者向け説明会

- 1) 南谷臣昭：植物性自然毒の多成分同時分析について、令和2年度地域保健総合推進事業地方衛生研究所東海北陸ブロック専門家会議、2020年10月
- 2) 登田美桜：「有毒植物による食中毒の最近の傾向」令和2年度地方衛

生研究所全国協議会九州ブロック
専門家会議、2020年11月

- 3) 登田美桜：「植物性自然毒による食中毒の最近の傾向」農林水産省令和2年度食品安全にかかると科学セミナー、2020年8月、農林水産省消費・安全局

4. 市民向け発表会

- 1) 南谷臣昭：「野草や山菜などの自然毒について」、令和3年3月食品安全セミナーWeb、2021年3月東海農政局消費・安全部消費生活課

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし