

植物性自然毒による食中毒原因究明への DNA 塩基配列解析の応用

山元梨津子 大坂郁恵 吉田栄充 石井里枝

The application of DNA base sequence analysis to the cause investigation of food poisoning by plant toxins

Ritsuko Yamamoto, Ikue Osaka, Terumitsu Yoshida, Rie Ishii

はじめに

植物性自然毒による食中毒の多くは、野草等の有毒植物を食用可能なものと誤認して喫食することにより発生している。健康志向や登山ブームを反映して、誤食による食中毒事例の報告数は増加傾向にある¹⁾。植物性自然毒による食中毒では重篤な症状を呈する場合があります、近年でもイヌサフラン、スイセン及びトリカブトによる食中毒では死亡事例が報告されている²⁾。このため、植物性自然毒による食中毒事例では、迅速な原因究明が求められる。

当所においても、ジャガイモ、ハシリドコロ及びバイケイソウ類等が原因植物と推定される植物性自然毒による食中毒事例が発生し、形態学的鑑別及びLC-MS/MSによる有毒成分の分析により原因究明を行ってきた。しかしながら、形態学的鑑別には専門的な知識及び経験が必要であり、野草残量が少ない、若しくは野草の形態が維持されておらず形態学的鑑別が困難である場合には有毒成分の推定も困難となり、LC-MS/MSによる分析に時間を費やし、原因植物種が同定できないといった問題があった。また、野草の残量が十分で形態も維持していたが、有毒成分が検出されないことにより植物種を同定できない事例も存在した。

最近、リボソームRNAの18S rRNA遺伝子と5.8S rRNA遺伝子に挟まれたInternal transcribed spacer 1(ITS1)領域における塩基配列が近縁種間でも異なることを利用したDNA塩基配列解析法が開発され³⁾、植物やキノコ類の鑑別に利用されている。そこで、有毒植物の誤食が原因と疑われる植物性自然毒による食中毒事例の際に、LC-MS/MSによる原因究明が困難な試料についても植物種を同定することを目的として、ITS1領域のDNA塩基配列解析による植物種の同定を試みたので報告する。

実験方法

1 試料

近年、本県で発生した植物性自然毒による食中毒疑いで検査を実施し「ハシリドコロ」と推定された野草(図1:野草(1))、食中毒疑いで検査を行ったが有毒成分が検出されず植物種不明となった野草(図1:野草(2))及び

当所職員が本検討に使用するため別途山岳地域で採取し検査により「バイケイソウ類」と推定された野草(図1:野草(3))の3試料を用いた。

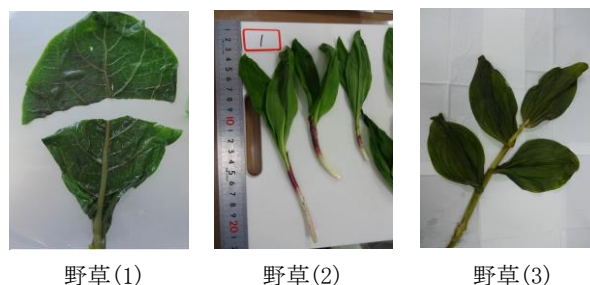


図1 検査対象の野草

野草(1):「ハシリドコロ」と推定される野草

野草(2):植物種不明の野草

野草(3):「バイケイソウ類」と推定される野草

2 機器等

1) DNA 抽出

ペンシルミキサーは Qiagen 社製 Tissue Ruptor, 遠心分離機は久保田製作所製テーブルトップ冷却遠心機 5500 を使用した。

2) PCR 反応

PCR反応用サーマルサイクラーはApplied Biosystems 社製 GeneAmp PCR System 9700, 分光光度計は島津製作所製 Biospec-nano, 電気泳動装置は BIO RAD 社製 Experion™ 自動電気泳動システムを使用した。

3) 塩基配列解析

シーケンス反応用サーマルサイクラーは Applied Biosystems 社製 GeneAmp PCR System 9700, 塩基配列解析装置は Applied Biosystems 社製 3500 Genetic Analyzer を使用した。

3 試薬等

1) DNA 抽出

DNA 抽出バッファーとして、ポリフェノールの多い植物組織からの DNA 抽出に適した、リーズ社製の DNA すいすい-P 及びその添加剤を使用した。フェノール:ク

ロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)はSIGMA社製, イソプロパノール沈殿時に使用する高分子キャリアーとしてニッポン・ジーン社製のエタチンメイト及び3M酢酸ナトリウム, イソプロパノール(特級)は和光純薬社製, DEPC処理水はニッポン・ジーン社製を使用した. 70%エタノールは, 和光純薬社製エタノール(分子生物学用)とDEPC処理水を混和して調製した.

2) PCR反応

DNAポリメラーゼはThermo Fisher Scientific社製Amplitaq Gold 360 Master Mix, プライマーはFASMAC社製植物異物同定用プライマー(Cat#. F111-1K)を使用した.

3) 塩基配列解析

PCR産物の精製にQiagen社製QIAquick PCR Purification Kit, シーケンス反応にThermo Fisher Scientific社製BigDye™ Therminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit, 未反応蛍光色素の除去にThermo Fisher Scientific社製Centri-Sep™ Spin columnsを使用した.

4 DNA抽出法

各野草を細切し50mgを2mLマイクロチューブに量りとり, DNAすいすい-P 360 µLと添加剤40 µLを加え, ペンシルミキサーでホモジナイズした. そこにフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を400 µL加え混和し, 室温で15,000 rpm, 10分遠心分離した. 上清200 µLを新たな2 mLマイクロチューブにとり, 3M酢酸ナトリウム6.6 µL, エタチンメイト2 µL, イソプロパノール200 µLを加え混和し, 15,000 rpm, 10分遠心分離した. 上清を捨て70%エタノールを800 µL加え, 4°Cで15,000 rpm, 10分遠心分離した. さらに上清を捨て, 2 mLマイクロチューブにパラフィルムを巻き針で数ヶ所穴をあけ, 真空デシケーターで15分程度乾燥させ, DEPC処理水50 µLを加えDNAを溶解し, DNA溶液とした.

分光光度計で波長260, 280及び320 nmの吸光度(OD260, OD280及びOD320)を測定することによりDNA濃度及び純度を確認し, DNA濃度が20 ng/µLとなるようDEPC処理水で希釈した.

5 PCR反応

本検討に用いた植物異物同定用プライマーは, 植物全般に保存されている18S rRNA遺伝子及び5.8S rRNA遺伝子内のできるだけITS1領域に近い部分に設計され, カビ・酵母と大きく配列が異なっており, 植物種の同定に適している³⁾. 当該植物異物同定用プライマーとAmplitaq Gold 360 Master Mixを表1のとおり調製し, サーマルサイクラーを用いて遺伝子増幅を行った. PCR条件は, 文献^{4, 5)}を参考に94°C 9分の後, 96°C 1分(変性), 58°C 1分(アニーリング), 72°C 1分(伸長)を

35回繰り返す, 最後に72°C 5分伸長反応を行い, 4°Cでホールドした.

増幅したPCR産物は, Experion™ DNA 1K用分析キットによる電気泳動により増幅断片長の確認を行った. なお, Template DNAの代わりにDEPC処理水を加えたものを陰性コントロールとした.

表1 PCR反応液組成

試薬	最終濃度	添加量(µL)
DEPC処理水	—	9.0
Amplitaq Gold 360 Master Mix	1×	12.5
F-Primer (25 µM)	0.5 µM	0.5
R-Primer (25 µM)	0.5 µM	0.5
Template DNA (20 ng/µL)	2.0 ng/µL	2.5
計		25.0

6 塩基配列解析

QIAquick PCR Purification Kitを用いて各PCR産物を精製した. BigDye™ Therminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit及び植物異物同定用プライマーを用いてシーケンス反応を行った後, 未反応蛍光色素をCentri-Sep™ Spin columnsにより除去した. その後, 塩基配列解析装置により塩基配列を決定し, 得られた塩基配列(プライマー配列は除去)についてDNAデータベースであるDNA Data Bank of Japan (DDBJ)のBLAST検索(相同性検索)を行った.

結果及び考察

1 DNA抽出

分光光度計で260, 280及び320 nmの吸光度を測定し, DNA濃度((OD260-OD320)×50 ng/µL)及び純度(OD260/280)を確認した結果は表2のとおりであった. OD260/280は1.70~2.00となり, 純度は良好であると考えられた.

表2 各野草のDNA濃度及び純度

試料	DNA濃度(ng/µL)	DNA純度
(1)「ハシドコ」 ¹⁾ と推定される野草	249.58	1.70
(2)植物種不明の野草	473.81	2.00
(3)「ハクイノ類」 ²⁾ と推定される野草	250.27	1.78

2 PCR反応

PCR反応の結果, いずれも当該植物異物同定用プライマー使用時に得られるとされる約350~400 bp³⁾に近い大きさの増幅断片長が得られた.

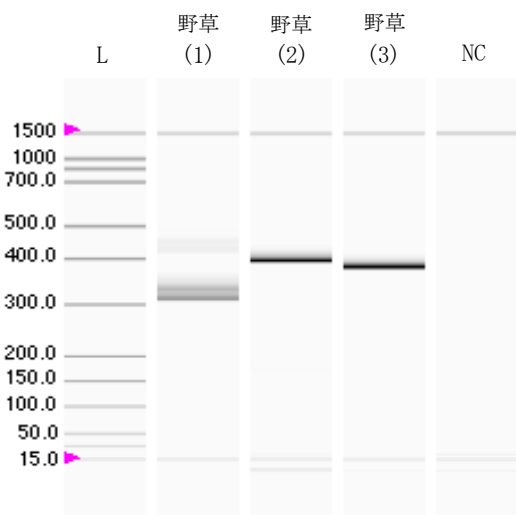


図2 電気泳動結果

L : DNA 分子量マーカー
 野草(1) : 「ハシリドコロ」と推定される野草
 野草(2) : 植物種不明の野草
 野草(3) : 「バイケイソウ類」と推定される野草
 NC : 陰性コントロール

3 塩基配列解析

(1) 「ハシリドコロ」と推定される野草

得られたPCR産物のDNA塩基配列解析の結果、*Scopolia japonica*(ハシリドコロ)と相同性が高かった(表3)。

食中毒発生時、野草残品の形態学的鑑別から喫食可能な野草であるフキノトウに類似した有毒植物であるハシリドコロの誤食による食中毒を疑い、ハシリドコロの有毒成分であるアトロピン及びスコポラミン⁶⁾についてLC-MS/MSによる分析を試みたところ、アトロピン76 ppm及びスコポラミン21 ppmが検出され、当該野草はハシリドコロであると推定された⁷⁾。今回、LC-MS/MSによる分析から推定された植物種とDNA塩基配列解析から推定された植物種が一致したことから、DNA塩基配列解析により植物種の同定が可能であることが確認できた。

(2) 植物種不明の野草

得られたPCR産物のDNA塩基配列解析の結果、*Allium ochotense*(ギョウジャニンニク)と相同性が高かった(表4)。

食中毒発生時、患者が実際に喫食した調理品は残っていなかったが、形態を維持した状態の調理前の野草残品が十分量あったため、それらについて形態学的鑑別を行った。その結果、喫食可能な野草であるギョウジャニンニクと類似した有毒植物であるイヌサフラン又はバイケイソウ類を誤食したことによる食中毒を疑い、イヌサフランの有毒成分であるコルヒチン⁸⁾、バイケイソウ類の有毒成分であるジェルビン及びベラトラミン⁹⁾についてLC-MS/MSによる分析を試みた。しかし、いずれの有毒成分も不検出となり、野草残品の植物種は不明となった。

今回、DNA塩基配列解析により野草の残品は有毒成分を含まない野草であるギョウジャニンニクであると同定でき、これはLC-MS/MSで有毒成分が不検出であった結果と一致した。よって、野草残品に有毒植物は含まれていなかったことが推察された。このように、対象試料が有毒成分を含まない植物種である場合にも、DNA塩基配列解析は有用であると考えられた。

(3) 「バイケイソウ類」と推定される野草

得られたPCR産物のDNA塩基配列解析の結果、*Veratrum stamineum*(コバイケイソウ)と相同性が高かった(表5)。

当該野草を採取後、バイケイソウ類の有毒成分であるジェルビン及びベラトラミン⁹⁾についてLC-MS/MSによる分析を試みたところ、ジェルビン122 ppm及びベラトラミン7 ppmが検出され、当該野草はバイケイソウ類と推定された。しかし、バイケイソウ類にはバイケイソウとコバイケイソウがあり、コバイケイソウはバイケイソウに比べ標高が高いところに多い⁹⁾等の違いはあるものの、両種は形態が類似しており含まれる有毒成分も共通していることから、形態学的鑑別やLC-MS/MSによる分析により両種を区別することは困難である。このように、形態学的に類似し共通の有毒成分を含む野草が複数ある中で詳細に植物種を同定する場合にも、DNA塩基配列解析は有用であると考えられた。

DNA塩基配列解析による植物種同定は他自治体の衛生研究所でも活用されており、東京都ではDNAデータベースに登録されている塩基配列を基に新規に設計したプライマーを用いて植物種の同定を行ったことが報告されている¹⁰⁾。本検討で使用した植物異物同定用プライマーは市販品であり、山口県において自然薯と誤ってヨウシュヤマゴボウと推定される有毒植物を誤食したことによる食中毒の原因究明にも用いられている⁴⁾。LC-MS/MSによる有毒成分の分析が困難な場合を想定し、迅速にDNA塩基配列解析による植物種同定法を確立するため、当該植物異物同定用プライマーを用いて検討したところ、3試料のいずれも植物種の同定が可能であった。また同定に要した試料採取量は50 mgと微量であることから、野草残量が少ない場合にも適用できると考えられた。

今回は3試料について植物種の同定が可能であったが、食中毒の原因となり得る有毒植物は数多く、様々な植物性自然毒による食中毒に対応できるよう、3試料の植物種以外の植物種への適用拡大や、茹でる・焼く・揚げる等の調理行為が本法に与える影響の検討が今後の課題である。

また、DNAデータベースを用いた植物種同定において信頼性の高い同定結果を得るためには、多種の植物についてそれぞれDNA塩基配列が登録されており、かつその登録数が多いことが重要であるため、DNAデータベースの更なる充実が望まれる。

表3 (1)「ハシリドコロ」と推定される野草のBLAST検索結果(上位5位まで)

No.	Accession No.	Sequence Entry	Score (Bits)	E Value	Identities
1	AY478399	<i>Scopolia japonica</i>	305	2e-79	(160/162)98%
2	AY478398	<i>Scopolia japonica</i>	289	1e-74	(152/154)98%
3	JX862656	<i>Olea paniculata</i>	174	6e-40	(103/108)95%
4	JX862625	<i>Fraxinus americana</i>	174	6e-40	(105/108)97%
5	HQ142619	<i>Solidago houghtonii</i>	172	2e-39	(97/99)97%

表4 (2)植物種不明の野草のBLAST検索結果(上位5位まで)

No.	Accession No.	Sequence Entry	Score (Bits)	E Value	Identities
1	KF419374	<i>Allium ochotense</i>	615	e-172	(310/310)100%
2	MF599188	<i>Allium ochotense</i>	605	e-169	(305/305)100%
3	MF599183	<i>Allium ochotense</i>	605	e-169	(305/305)100%
4	MF599178	<i>Allium ochotense</i>	605	e-169	(305/305)100%
5	MF599176	<i>Allium ochotense</i>	605	e-169	(305/305)100%

表5 (3)「バイケイソウ類」と推定される野草のBLAST検索結果(上位5位まで)

No.	Accession No.	Sequence Entry	Score (Bits)	E Value	Identities
1	JF807679	<i>Veratrum stamineum</i>	692	0.0	(349/349)100%
2	JF807677	<i>Veratrum stamineum</i>	684	0.0	(347/349)99%
3	JF807678	<i>Veratrum stamineum</i>	676	0.0	(347/349)99%
4	AF303705	<i>Veratrum fimbriatum</i>	652	0.0	(344/349)98%
5	KY218779	<i>Veratrum oxysepalum</i>	644	0.0	(343/349)98%

まとめ

植物性自然毒による食中毒では死亡や症状が重篤化するリスクもあり、県民に注意喚起をするためにも、早急な原因究明が必要である。当所では従来、形態学的鑑別や LC-MS/MS による有毒成分の分析により原因究明してきた。しかし残品が少量で分析に必要な量を確保できない場合や、検体の形態が維持されておらず有毒成分を推定できない場合などでは、原因究明が困難となる問題があった。

今回検討した ITS1 領域の塩基配列解析では、いずれの試料についても植物種を同定することが可能であり、その植物種は形態学的鑑別や LC-MS/MS での有毒成分の分析結果から推定される植物種と一致した。よって、本法は今後の植物性自然毒による食中毒の原因究明の一助となると考えられた。

文献

1) 登田美桜, 畝山智香子, 春日文子: 過去50年間のわが国の高等植物による食中毒事例の傾向. 日本食品衛生学会誌, February 2014, 55-63
 2) 厚生労働省ホームページ: 食中毒統計資料: 過去の食中毒事件一覧: 平成28年(2016年)食中毒発生事例 <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya>

/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html (2018年7月8日アクセス)

3) 正村典也, 菊池亮, 永富靖章: ITS1 塩基配列解析による植物性異物同定法の開発. BUNSEKI KAGAKU Vol. 63, No. 3, PP. 245-253 (2014) ©2014 The Japan Society for Analytical Chemistry
 4) 立野幸治, 尾上史一, 村田祥子, 他: ITS1 領域塩基配列解析による植物種同定の一事例. 山口県環境保健センター所報, 57, 51-54, 2014
 5) 「植物異物同定用プライマーセット」技術資料集: 株式会社ファスマック遺伝子検査事業部 http://www.fasmac.co.jp/GM/kit/pdf/others/primer_tech_140227.pdf (2018年7月18日アクセス)
 6) 厚生労働省ホームページ: 自然毒のプロファイル: 高等植物: ハシリドコロ. <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000079840.html> (2018年7月8日アクセス)
 7) 今井浩一, 石井里枝, 高野真理子: 食品苦情の理化学検査の状況について. 第17回埼玉県健康福祉研究発表会, 154-155, 2016
 8) 厚生労働省ホームページ: 自然毒のプロファイル: 高等植物: イヌサフラン. <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000058791.html> (2018年7月8日アクセス)
 9) 厚生労働省ホームページ: 自然毒のプロファイル: 高

等植物：バイケイソウ類.

<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000079821.html> (2018年7月8日アクセス)

- 10) 田端節子, 小林千種, 羽石奈穂子, 他: 食品に含まれる化学物質による健康危害防止に関する研究. 東京健康安全研究センター年報, 66, 23-34, 2015