

3. 福島県の植物性自然毒による食中毒事例の解析及び 園芸植物の遺伝子検査法の開発

○千葉 一樹、山田 浩子、河野 裕子（福島県衛生研究所）

【研究目的】

植物性自然毒による食中毒の国内年間報告数は、細菌やウイルスによる食中毒と比べ少ないが、喫食量が少量であっても症状が重篤化しやすく致死的になる場合もある。そのため、食品安全上のリスク管理を必要とする優先度は高いと考えられる。また、近年は、高等植物を原因とする事例が年々増加し、特に、スイセンやイヌサフラン、グロリオサ等の園芸植物による家庭での食中毒事例が目立つようになった¹⁾。

本研究では、福島県の植物性自然毒による食中毒事例を遡及調査し、リスク管理に役立つ情報の収集及び園芸植物を鑑別する PCR 法の開発を目的とする。

【研究の必要性】

福島県で発生した植物性自然毒による食中毒は、2011年に発生した東日本大震災・東京電力福島第一原子力発電所事故を契機に減少した。これは放射能汚染への懸念により野生きのこや山菜等に出荷制限が指示され、有毒植物が誤って市場へと流通する機会がなくなったり、きのこ狩りや山菜採りの機会が減ったことが一因として考えられる。しかし、原発事故から十数年が経過し、徐々に出荷制限が解除されるなかで、再び県内で植物性自然毒による食中毒が増加することが危惧される。また、近年増加傾向にあるスイセン等の園芸植物による食中毒も数例発生している。

植物性自然毒による食中毒の検査法のひとつとして PCR 検査法がある。PCR 検査法は、鑑別に用いる残品が微量な場合や調理加工品で本来の形態が保持されていない場合など、形態判別や有毒成分の分析が困難な場合でも有効であることが多い。

このことから、福島県における植物性自然毒による食中毒対策の一環として、エビデンスに基づく注意喚起情報の発信及び植物性自然毒食中毒の PCR 検査法の整備が必要と考え、本研究を実施した。

【研究計画】

1 福島県の植物性自然毒による食中毒事例の解析

2000年～2022年の厚生労働省「食中毒統計資料」²⁾に記載された福島県で発生した植物性自然毒による食中毒事例を収集し、発生件数及び患者数の経年変化、季節的特徴等の解析を行った。

2 スイセン、イヌサフラン及びグロリオサの鑑別 PCR 法の開発

生試料(植物そのもの)に加え、食中毒事例対応時の検査材料を想定し、調理試料及び人工胃液処理試料から簡易的な方法で粗 DNA 試料液を抽出し、スイセン、イヌサフラン及びグロリオサを鑑別する PCR 法を検討した。

【実施内容・結果】

1 福島県の植物性自然毒による食中毒事例の解析

調査期間における発生件数は計 108 件、患者数は計 323 人であり、死亡例はなかった。病因物質別の発生件数は、高等植物によるものが 17 件、きのこ類によるものが 83 件であり、本県の植物性自然毒による食中毒は、主にきのこ類を原因とするものであった。また、近年、増加傾向にある園芸植物による食中毒事例が本県でも発生しており、チョウセンアサガオ及びスイセンを原因とする食中毒がそれぞれ 2 件発生した (Table 1)。次に、発生件数及び患者数の経年変化を Fig.1 に示した。2010 年は発生件数、患者数ともに最多であった。また、本県の植物性自然毒による食中毒は、2011 年以降減少し、年平均発生件数は 2000 年～2010 年が 7.4 件に対し、2011 年～2022 年は 2.3 件となり、1/3 以下となった。月別発生状況は Fig.2 のとおり 4 月、10 月をピークとした二峰性を示した。原因施設別発生状況は Fig.3 のとおり家庭が全体の 90% を占めた。

Table 1 福島県の植物性自然毒による食中毒事例の病因物質、発生件数、患者数及び死者数

病因物質	発生件数 (件)	患者数 (人)	死者数 (人)
<高等植物による事例>			
バイケイソウ	10	18	0
チョウセンアサガオ	2	8	0
スイセン	2	5	0
ウルシ	1	2	0
ジギタリス	1	1	0
高等植物	1	2	0
計	17	36	0
<きのこ類による事例>			
ツキヨタケ	8	25	0
クサウラベニタケ	7	19	0
カキシメジ	4	13	0
ハイロシメジ	1	5	0
イッポンシメジ	1	1	0
きのこ類	62	202	0
計	83	265	0
記載なし	8	22	0
総計	108	323	0

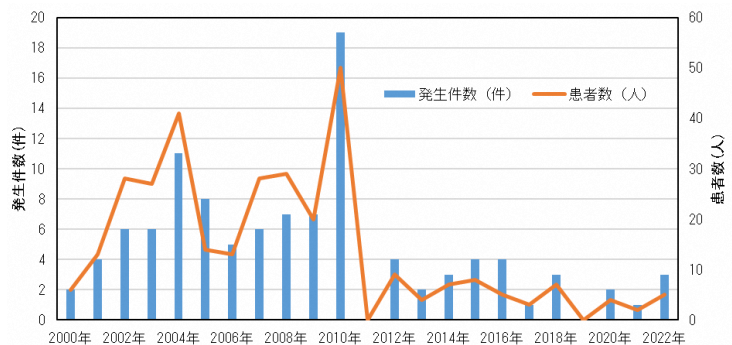


Fig.1 福島県における植物性自然毒による食中毒の発生件数及び患者数の経年変化

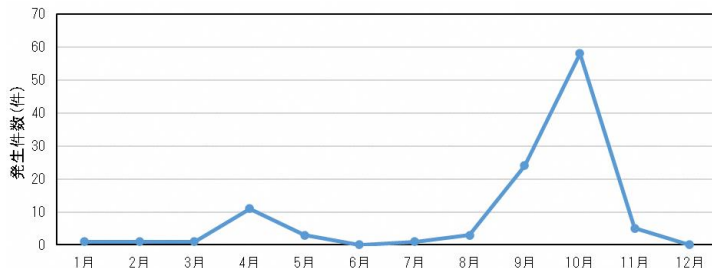


Fig.2 福島県における植物性自然毒による食中毒の月別発生状況

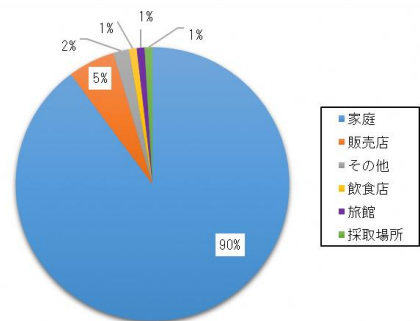


Fig.3 福島県における植物性自然毒による食中毒事例の原因施設

2 スイセン、イヌサフラン及びグロリオサの鑑別 PCR 法の開発

(1) PCR 法の特異性確認

各生試料 50mg (Table 2) をワンステップ法変法により DNA を抽出し (Fig. 4)、葉緑体遺伝子の *matK* 又は *rbcL* 上に設計した有毒植物検出プライマーと、18SrRNA 遺伝子上に設計した DNA 抽出確認プライマーによる有毒植物検出マルチプレックス PCR (Table 3, Fig. 5) を行い、PCR 産物を電気泳動にて確認した (Fig. 6)。DNA 抽出確認の PCR バンドは、すべての試料から検出された。一方、有毒植物に特異的な PCR バンドは、食用植物から検出されず、有毒植物のみから検出された。よって、本 PCR 法の特異性を確認した。

(2) 調理及び人工胃液処理による PCR への影響

有毒植物の各生試料について、葉は長さ約 4cm、球根は重量約 3g になるように切断し、小分けした。調理は、水煮 (沸騰水浴 5 分、10 分)、油炒め (1 分、3 分)、電子レンジ加熱 (500W 1 分、3 分) とした。また、人工胃液による処理は、容器に最長時間で各調理を行った試料と 0.1% ペプシン含有人工胃液を約 35mL 加え、攪拌しながら 37°C で 30 分、2 時間及び 4 時間加温した。これらにより得た試料を「(1) PCR 法の特異性確認」と同様の方法で DNA 抽出及び PCR を行った。調理後のすべての試料で、DNA 抽出確認の PCR バンド及び有毒植物に特異的な PCR バンドの双方が検出された。一方、人工胃液による処理を行うと、30 分消化であれば有毒植物に特異的な PCR バンドは、すべての試料で検出可能であったが、消化時間を延長するといくつかの試料では検出されなかった (Table 4)。

Table 2 試料

有毒植物 (部位別) 【5試料】	PCR特異性確認のための食用植物 【23試料】	
	有毒植物と誤食の可能性があるもの	調理食材として想定されるもの
スイセン (葉、球根)	ニラ、ノビル、タマネギ	ジャガイモ、ハクサイ、チンゲンサイ、キャベツ、ブロッコリー、ピーマン、ニンジン、バナシメジ、シイタケ、レンコン、ダイコン、ナス、トマト、ホウレンソウ、ショウガ
イヌサフラン (葉、球根)	オオバギボウシ、ギョウジャニンニク、ミョウガ、ニンニク	
グロリオサ (球根)	ヤマイモ	

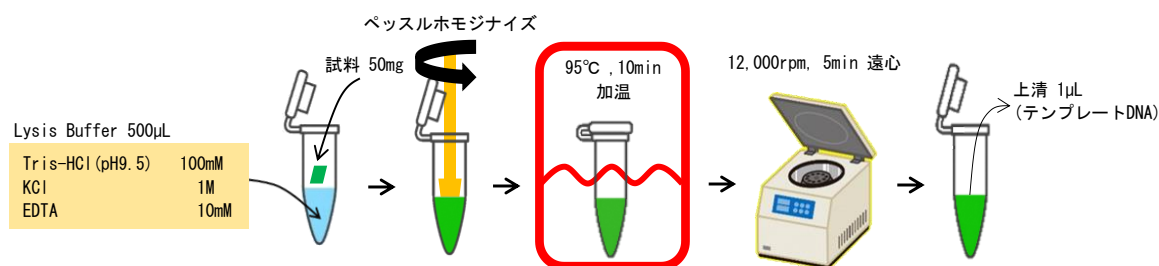


Fig. 4 DNA抽出 - ワンステップ法変法

Table 3 PCRプライマー

	対象	標的遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5' → 3')	Tm値 (°C)	増幅長 (bp)	文献
有毒植物検出プライマー	スイセン	<i>matK</i>	NM-F	GGAAGAGTCTTCTCATTACTCAG	56.9	260	3)
			NM-R	CCAGGAGGTCCTATGAAAATCG	58.6		
	イヌサフラン	<i>rbcL</i>	COL-rbcL-F1	CCACAAACAGAGACTAAAGCAAGTGC	60.5	395	This study
			COL-rbcL-R1	CGTAGAGCTCGTAAGGCTTAAAACCG	62.0		
	グロリオサ	<i>rbcL</i>	GLO-rbcL-F1	CCAAGATTGGGTCTCTATGCCAGGCG	65.2	321	This study
			GLO-rbcL-R1	ACCGGTTGGAAGCTCGAATTTGATCGCC	63.5		
DNA抽出確認プライマー	真核生物	18SrRNA	TR-03	TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTA	58.8	137	4)
			TR-04	AATTTGCGCGCTGCTGCCTTCCTT	63.8		

	[添加量]	[終濃度]	スイセン		イヌサフラン、グロリオサ	
脱イオン滅菌蒸留水	8.5 μ L		98°C	10sec	98°C	10sec
KOD One PCR Master Mix -Blue- (2 \times)	12.5 μ L	1 \times	48°C	5sec	68°C	15sec
有毒植物検出用 Forward Primer (10 μ M)	0.75 μ L	0.3 μ M	} 30cycles		} 25cycles	
Reverse Primer (10 μ M)	0.75 μ L	0.3 μ M				
DNA抽出確認用 Forward Primer (10 μ M)	0.75 μ L	0.3 μ M	68°C	10sec	} 4°C HOLD	
Reverse Primer (10 μ M)	0.75 μ L	0.3 μ M	} 4°C HOLD			
テンプレートDNA	1 μ L					
計	25 μ L					

Fig. 5 PCR反応液調製及びPCR条件

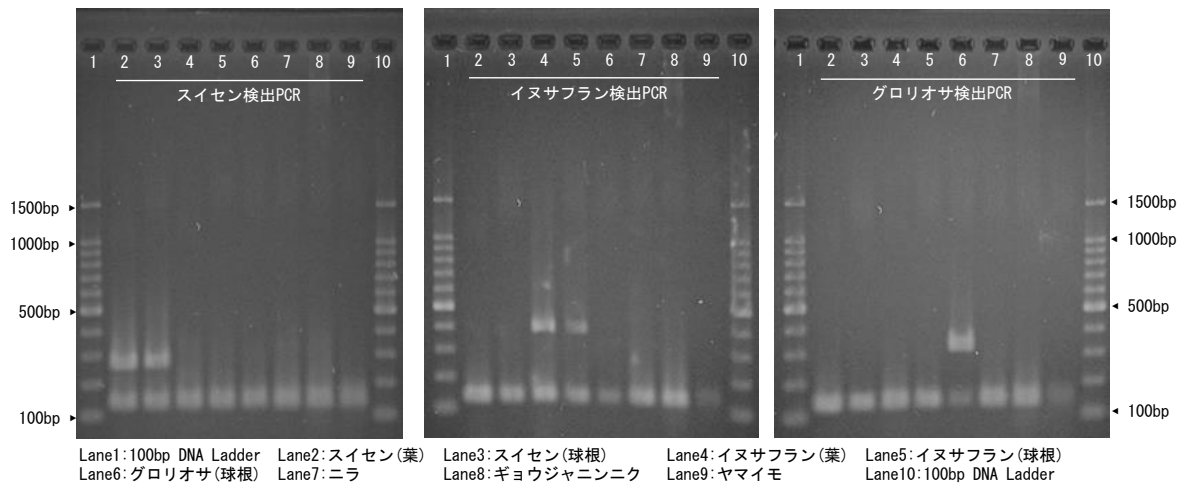


Fig. 6 有毒植物検出マルチプレックスPCRの電気泳動結果の一例

【考察と今後の課題】

1 福島県の植物性自然毒による食中毒事例の解析

統計資料に基づき本県の植物性自然毒による食中毒を調査し、発生件数、患者数の年次推移や季節的特徴等リスク管理に役立つ情報を得ることが可能であった。現時点では、本県の植物性自然毒による食中毒が増加傾向にあるとは言えないが、今後も発生動向を注視することが重要と考える。また、本調査結果を元に注意喚起情報の発信を行いたい。

2 スイセン、イヌサフラン及びグロリオサの鑑別 PCR 法の開発

本研究で検討した DNA 抽出方法は、試料をペッスルで数秒間粉碎し、抽出溶液で処理する迅速で簡易的な方法であった。実施したすべての試料で DNA の抽出が確実にできていたことを踏まえても、迅速な対応を要求される食中毒検査において有用であると考えられた。また、人工胃液処理の消化時間が延長するにつれて、一部の試料では有毒植物に特異的な PCR バンドが非検出となった。人工胃液処理により、DNA の断片化が起きて検出感度が低下することは知られているが⁵⁾、本研究でもその影響を受けていることが考えられた。さらに、当該試料はいずれも DNA 抽出確認の PCR バンドは検出されたことから、*matK* や *rbcL* は、18SrRNA と比較して DNA 断片化の影響を受けやすいことが示唆された。このことから、有毒植物検出プライマーについて、他の遺伝子領域における検討も必要と考えられた。

【参考文献】

- 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. 食品衛生学雑誌 2014;Vol. 55, No. 1:55-63.
- 2) 厚生労働省ホームページ, 食中毒統計資料. (2023 年 9 月 11 日現在閲覧)
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-3
- 3) 池野恵美, 松本裕子, 濟田清隆. PCR 法を用いたスイセンの DNA 鑑別と調理の影響. 第 57 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 82-85.
- 4) M. Pietrzak, R. D. Shillito, T. Hohn, I. Potrykus. Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. Nucleic Acids Research 1986;Vol. 14, No. 14: 5857-5868.
- 5) 寺井朗子, 荻野賀世, 浅倉弘幸 他. イヌサフランの PCR による簡易迅速鑑別法. 食品衛生学雑誌 Vol. 59, No. 4, 174-182.

【経費使途明細】

使 途	金 額
試薬費 (KOD One PCR Master Mix -Blue-, PCR プライマー ほか)	174,195 円
消耗品器材費 (バイオマッシャー II、マイクロピペットフィルターチップ ほか)	124,020 円
試料費 (ウルイ、ギョウジャニンニク、モロヘイヤ)	1,125 円
振込手数料	660 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円