

スイセンによる食中毒疑い事例発生時の遺伝子による鑑別法

近藤芳和子・宮崎悦子

福岡市保健環境研究所保健科学課

Method for Detection of *Narcissus* as a Food Poisoning Plant by Real-time PCR

Kanako KONDOU and Etsuko MIYAZAKI

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

福岡市内におけるスイセンによる食中毒疑い事例発生に備えて、原因植物の迅速な特定に有用なリアルタイム PCR を用いた遺伝子によるスイセンの鑑別法の導入を検討した。まず、2つのキットによる DNA 抽出法の検討を行い、50 mg のスイセンから PCR の鋳型として十分な純度と収量の DNA 抽出が可能となった。次に、リアルタイム PCR の試薬等の検討を行い、Standard mode よりも短時間で増幅ができる Fast mode を用いた増幅が可能となった。続いて、実際の食中毒事例を参考に、ニラ DNA にスイセン DNA を混入させ、スイセン DNA の割合を 0, 0.01, 0.1, 1, 10 及び 100% と変化させたときのスイセン遺伝子の検出を確認した。その結果、スイセン DNA 0.01% から 100% まで検出可能であった。また、沸騰水中でニラ及びスイセンを 10 分間加熱した試料を用いて、同様にスイセン DNA の割合を変化させ検討を行った結果、スイセン DNA 0.01% から 100% まで検出可能であった。

Key Words : スイセン *narcissus*, 食中毒 food poisoning, リアルタイム PCR real-time PCR (qPCR), 鑑別法 method for detection

1 はじめに

スイセンはリコリン等のアルカロイドを有毒成分として含んだヒガンバナ科の植物であり、誤食すると、嘔吐、下痢、発汗、頭痛、昏睡等の症状が出る事が知られている。スイセンの葉はニラと、鱗茎はタマネギと似ており、毎年全国で誤食による食中毒事例が報告されている。厚生労働省の食中毒統計（平成 24 年から令和 3 年）

(https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/yuudoku/index.html) によると過去 10 年間の有毒植物による食中毒の発生件数は 201 件であり、そのうち約 3 割にあたる 62 件がスイセンによる食中毒であった。福岡市では、平成 22 年度に発生して以来、スイセンによる食中毒の発生事例はないが、スイセンなどの園芸植物による食中毒事例は増加傾向¹⁾ にあり、今後も発生するおそれは十分にある。これまで福岡市保健環境研究所では、スイセン誤食による食中毒疑い事例が発生した場合は、LC-MS/MS などの機器を用いてスイセンの有毒成分であるリコリン等を分析していたが、リコリン等

のアルカロイドはスイセン以外のヒガンバナ科の植物も有しているため、リコリン等が検出されても原因植物の特定には至らないおそれがあった。スイセンの判別法については国立医薬品食品衛生研究所の「有毒の高等植物 5 種の判別法」²⁾ (以下、「参考法」とする。) があり、PCR-RFLP 法^{2, 3)} 及びリアルタイム PCR (以下、「qPCR」とする。) 法が報告されている。

そこで、qPCR を用いたスイセンの遺伝子による鑑別を行うために、参考法を改良し、少量の試料から PCR 反応に十分な収量及び純度の鋳型 DNA を抽出することができる抽出法並びに Standard mode よりも短時間で増幅ができる Fast mode を用いた qPCR 法の検討を行った。

2 実験方法

2.1 試料

当所の敷地内で栽培したスイセンの葉及び市販のニラを使用した。各々、使用するまで -20°C で保管し、2 mm

程度に細切したものを試料とした。また、各々の試料を 0.6 g 量り、超純水 50 mL 中でそれぞれ 10 分間沸騰状態で加熱したものを加熱試料とした。

2.2 試薬及び装置

2.2.1 試薬

DNA 抽出キット：(株)キアゲン製 DNeasy Plant Mini Kit (以下、「シリカゲル膜タイプキット」とする。), タカラバイオ(株)製 Plant DNA Isolation Reagent (以下、「塩化ベンジル法キット」とする。)

マスターミックス：サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)製 TaqMan Universal PCR Master Mix 及び TaqMan Fast Advanced Master Mix

2-プロパノール：富士フィルム和光純薬(株)製分子生物学用 2-プロパノール

エタノール：富士フィルム和光純薬(株)製分子生物学用エタノール (99.5)

TE buffer: (株)ニッポンジーン製遺伝子工学研究用 TE (pH8.0)

超純水：アドバンテック東洋(株)製 RFU666HA で製造した超純水を用いた。

2.2.2 装置

qPCR 装置：サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)製 QuantStudio5

冷却遠心機：久保田商事(株)製 6200, 久保田商事(株)製 3780, (株)トミー精工製 CAX-571

分光光度計：サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)製 NanoDrop One

超純水製造装置：アドバンテック東洋(株)製 RFU666HA

2.3 分析方法

2.3.1 DNA 抽出法の検討

1) シリカゲル膜タイプキットによる抽出

参考法に示された DNA 抽出精製法に従った。すなわち、1.5 mL チューブに試料を 100 mg 入れ、マッシャーで 2 分間すりつぶし、Buffer AP1 400 μ L 及び RNase A ストック溶液 (100 mg/mL) 4 μ L を加えボルテックスミキサーで混合し、3 分毎に攪拌を繰り返して 65°C で 10 分間静置した。Buffer P3 を 130 μ L 加え、混和後 5 分間水上で静置した。20,000 \times g で 5 分間遠心分離したのち、上清を 1.5 mL チューブ内の QIAshredder Mini Spin Column に入れ、20,000 \times g で 2 分間遠心分離した。Column 通過液に 1.5 倍量の Buffer AW1 を加えた混合液 650 μ L を 2 mL チューブ内の DNeasy Mini Spin Column に移し、6,000 \times g で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨て、混合液がなくなるまで繰り返した。DNeasy Mini Spin Column を新し

い 2 mL コレクションチューブに移し、Buffer AW2 を 500 μ L 添加し、6,000 \times g 以上で 1 分間遠心操作した。ろ液を捨て、更に 500 μ L の Buffer AW2 500 μ L を DNeasy Mini Spin Column に添加し、20,000 \times g で 2 分間遠心してメンブレンを乾燥した。DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 mL チューブに移し、Buffer AE を 40 μ L 添加し、室温で 5 分間インキュベートした後、6,000 \times g 以上で 1 分間遠心分離する作業を 2 回行い、DNA 溶液を 80 μ L 得た。

2) 塩化ベンジル法キットによる抽出

キット付属の説明書を参考に一部を改変し、抽出を行った。すなわち、1.5 mL チューブに試料を 50 mg 入れ、マッシャーで 2 分間すりつぶし、Extraction Solution 1 を 400 μ L 加え、ボルテックスミキサーで混合し、Extraction Solution 2 を 80 μ L 加え混合した。Extraction Solution 3 を 150 μ L 加え混合し、50°C で 15 分間静置した後、16,000 \times g, 4°C, 15 分間遠心分離した。上層を 1.5 mL チューブに移し、移した上層液と同量の 2-プロパノールを加え転倒混和後、16,000 \times g, 4°C, 10 分間遠心分離した。上清を除去し、エタノールを 1 mL 加え、16,000 \times g, 4°C, 3 分間遠心分離した。上清を除去後、沈殿を乾燥させ、TE Buffer を 80 μ L 加えて溶解させ、DNA 溶液を 80 μ L 得た。

2.3.2 純度、濃度の確認及び調製

分光光度計を用いて DNA 溶液の 260 nm の吸光度から DNA 濃度を、280 nm に対する 260 nm 吸光度の比 (以下、「A260/A280」とする。) から純度を確認し、滅菌超純水を用いて DNA 溶液の濃度が 20 ng/ μ L となるよう調製した。

2.3.3 プライマー対及びプローブ

DNA 抽出及び qPCR 反応が適切に行われていることを確認する陽性コントロールとして、植物に共通の配列⁴⁾を検出する植物検知用 qPCR 反応 (以下、「植物検知系」とする。) には、プライマー対

(Chloroplast-F:5'-AAGATAGAGTCCCCTTCTACATGTC AAT-3'及び

Chloroplast-R:5'-TTTTAAGTCGACGGATTTTCTCTTA -3') 及びプローブ

(Chloroplast-T:5'-FAM-CTGGCAACAATGA AATT-NFQ-MGB-3') を用いた。

参考法²⁾に従い、スイセン検知用 qPCR 反応 (以下、「スイセン検知系」とする。) にはスイセンの遺伝子を検出するプライマー対 (Narcissus-matK-F1 :

5'-CTTTTGGAACTTTTCTTGAACGAACAC-3'及び

Narcissus-matK-R1 :

5'-GAAAGGATCTTTGAAGAACCAGGAG-3') 及びプローブ

(Narcissus-matK-P1 : 5'-FAM-TCCTATGAAAAT CGTTACGA-MGB-3') を用いた。

プライマー対はいずれもサーモフィッシャーサイエン

ティフィック (株) に合成を依頼した。

2.3.4 qPCR

1) Standard mode

qPCR に供する試薬は、TaqMan Universal PCR Master Mix 12.5 μ L に 50 μ mol/L のプライマー対溶液を各 0.25 μ L, 10 μ mol/L のプローブ溶液を 0.5 μ L, 20 ng/ μ L の DNA 溶液を 2.5 μ L 加え、滅菌超純水で全量が 25 μ L となるように調製した。植物検知系及びスイセン検知系は、同一の 96 穴プレート上で行い、95°C 10 分間保持した後、95°C 15 秒間及び 60°C 1 分間を 1 サイクルとして 45 サイクル繰り返した。

2) Fast mode

qPCR に供する試薬は、TaqMan Fast Advanced Master Mix 12.5 μ L に 50 μ mol/L のプライマー対溶液を各 0.25 μ L, 10 μ mol/L のプローブ溶液を 0.5 μ L, 20 ng/ μ L の DNA 溶液を 2.5 μ L 加え、滅菌超純水で全量が 25 μ L となるように調製した。植物検知系及びスイセン検知系は、同一の 96 穴プレート上で行い、50°C 2 分間、95°C 20 秒間保持した後、95°C 1 秒間及び 60°C 20 秒間を 1 サイクルとして 45 サイクル繰り返した。

3) 判定方法

qPCR の増幅曲線の Threshold line を 0.2, baseline を 3 から 15 と設定⁵⁾ したときの Ct 値が 40 未満となったときを増幅とした。植物検知系での増幅を確認した後、対応する DNA 溶液のスイセン検知系での増幅を認めた場合にスイセン遺伝子を検出と判定した。

2.4 DNA 混合試験

2.4.1 混合 DNA 溶液の調製

ニラ及びスイセン試料並びに各々の加熱試料について、2.3.1 の 2) に従って DNA を抽出し、20 ng/ μ L となるように調製したものを、各々 DNA 溶液、加熱試料 DNA 溶液とした。

ニラ DNA 溶液にスイセン DNA 溶液を表 1 の割合で混合し、混合 DNA 溶液を調製した。ニラ及びスイセンの加熱試料 DNA 溶液についても同様に混合し、加熱試料混合 DNA 溶液を調製した。

表 1 ニラ及びスイセン DNA 溶液の混合割合

DNA溶液	混合割合 (%)					
	100	99.99	99.9	99	90	0
ニラ	100	99.99	99.9	99	90	0
スイセン	0	0.01	0.1	1	10	100

2.4.2 qPCR の Run mode 及びメソッド

2.3.4 の 2) に従い、植物検知系及びスイセン検知系を行った。

2.4.3 判定方法

2.3.4 の 3) のとおり判定を行った。

3 実験結果及び考察

3.1 DNA 抽出法の検討

一般的に、植物は細胞壁を持つため DNA を抽出することが難しい。そこで、植物からの DNA 抽出に使用実績のあるシリカゲル膜タイプキット及び塩化ベンジル法キットの 2 種類の DNA 抽出キットを検討した。2.3.1 の 1) 及び 2) に従って、ニラ及びスイセンから各々 3 併行 ($n = 3$) で抽出した。結果を表 2 に示す。試料採取量はシリカゲル膜タイプキット 100 mg, 塩化ベンジル法キット 50 mg とした。シリカゲル膜タイプキットでは、ニラ試料 100 mg から 0.2~0.3 μ g の DNA が抽出され、A260/A280 は 1.8~2.0 であった。スイセン試料 100 mg からは、0.2 μ g の DNA が抽出され、A260/A280 は 1.8~1.9 であった。一方、塩化ベンジル法キットでは、ニラ試料 50 mg から 7.0~7.8 μ g の DNA が抽出され、A260/A280 は 2.0 であった。スイセン試料 50 mg からは、4.7~6.4 μ g の DNA が抽出され、A260/A280 は 1.7~1.8 であった。シリカゲル膜タイプキット、塩化ベンジル法キットいずれもニラとスイセンの試料の違いによる DNA の収量及び純度に大きな差は認められなかった。しかし、シリカゲル膜タイプキットと塩化ベンジル法キットを比較すると、試料採取量の少ない塩化ベンジル法キットの方が DNA の収量が多かった。その理由として、塩化ベンジルは、セルロースなどの細胞壁成分の水酸基をベンジル化し細胞壁を破壊する⁶⁾ ため、鋳型 DNA に十分な量の DNA を抽出することができたと考えられた。よって、塩化ベンジル法キットを用いることとした。

表 2 2 種類のキットを使用してニラ及びスイセンから抽出した DNA の収量及び A260/A280 ($n = 3$)

キット	試料	試料採取量 (mg)	DNA収量 (μ g)	A260/A280
シリカゲル膜タイプキット	ニラ	100	0.2	1.8
			0.3	2.0
			0.3	1.9
	スイセン	100	0.2	1.9
			0.2	1.8
			0.2	1.8
塩化ベンジル法キット	ニラ	50	7.4	2.0
			7.0	2.0
			7.8	2.0
	スイセン	50	4.7	1.7
			6.4	1.8
			4.7	1.8

3.2 qPCR の検討

qPCR による増幅について、参考法で採用されている Standard mode と増幅時間が短い Fast mode を比較検討した。スイセンの DNA 溶液を 20, 2, 0.2, 0.02 及び 0.002 ng/μL となるように調製し、2.3.4 の 1)Standard mode 及び 2)Fast mode に供し、検量線の直線性及び増幅効率を比較した。図 1 に Standard mode を図 2 に Fast mode の結果を示す。スイセンの検量線の決定係数 (R^2) は Standard mode で 1.000, Fast mode で 0.998, 増幅率は Standard mode で 85.5%, Fast mode で 85.9%であった。20 ng/μL のスイセン DNA 溶液を各 Run mode で 6well ずつ qPCR に供したときの Ct 値を表 3 に示す。6well の平均 Ct 値は Standard mode では 21.9 で、Fast mode では 21.4 であった。増幅時間は Standard mode は約 90 分間、Fast mode は約 30 分間であった。

以上のことから、Fast mode は、Standard mode と比べて検量線の直線性、増幅率及び Ct 値で大きな差はなく迅速性に優れているため、食中毒疑い事例発生時の検査法として有用であると考えられた。よって、Fast mode を用いることとした。

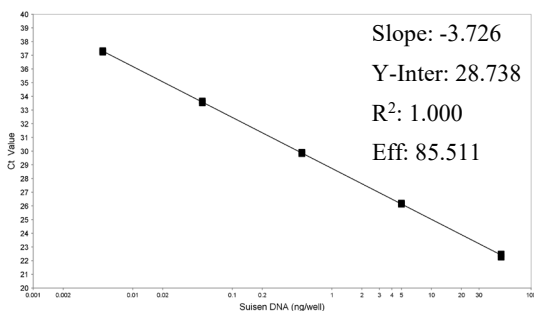


図 1 スイセンの検量線 (Standard mode)

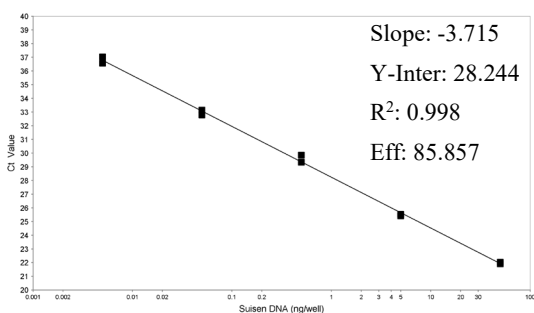


図 2 スイセンの検量線 (Fast mode)

表 3 Run mode とスイセン DNA 溶液の Ct 値

Run mode	スイセンDNA溶液(50ng/well)のCt値	平均Ct値
Standard mode	21.9 / 21.9 / 21.9 / 21.9 / 21.9 / 21.8	21.9
Fast mode	21.7 / 21.4 / 21.4 / 21.4 / 21.3 / 21.3	21.4

3.3 DNA 混合試験

3.3.1 混合 DNA 溶液

実際の食中毒事例を参考に、ニラにスイセンが混入している残品を想定し、ニラ DNA にスイセン DNA を混入させ、スイセン DNA の割合を 0, 0.01, 0.1, 1, 10 及び 100%と変化させたときのスイセン遺伝子の検出の有無を確認した。

2.4.1 に従って、混合 DNA 溶液を調製し、2.4.2 の植物検知系及びスイセン検知系をそれぞれの混合 DNA 溶液あたり 2well ($n = 2$) で測定した。その結果を表 4 に示す。スイセン検知系の Ct 値は、スイセン DNA 溶液で 21.9 及び 22.0 であり、0.01%のスイセン DNA を含む混合 DNA 溶液で 36.6 及び 37.0 であった。また、スイセン DNA を含まないニラ DNA 溶液では、想定したとおり、植物検知系の Ct 値は得られたがスイセン検知系の Ct 値は得られなかった。2.4.3 に従って判定し、0.01, 0.1, 1, 10 及び 100%のスイセン DNA を含む混合 DNA 溶液はスイセン遺伝子検出と判定した。

表 4 混合 DNA 溶液の Ct 値 ($n = 2$)

混合DNA溶液の 混合割合 (%)		Ct値	
ニラ	スイセン	植物検知系	スイセン検知系
100	0	25.9 / 26.2	no Ct / no Ct
99.99	0.01	25.9 / 25.6	36.6 / 37.0
99.9	0.1	26.0 / 26.0	33.1 / 32.8
99	1	26.3 / 25.9	29.3 / 29.8
90	10	26.4 / 26.2	25.5 / 25.4
0	100	26.3 / 26.1	21.9 / 22.0

3.3.2 加熱試料混合 DNA 溶液

実際の食中毒事例を参考に、おひたし、味噌汁等の加熱された残品を想定し、ニラ及びスイセンの加熱試料を用いて、3.3.1 と同様にスイセン DNA の割合を変化させたときのスイセン遺伝子の検出を確認した。

2.4.1 に従って、加熱試料混合 DNA 溶液を調製し、2.4.2 の植物検知系及びスイセン検知系をそれぞれの加熱試料混合 DNA 溶液あたり 2well ($n = 2$) で実施した。その結果を表 5 に示す。スイセン検知系の Ct 値は、加熱スイセン DNA 溶液で 2well とともに 22.1 であり、0.01%のスイセン DNA を含む加熱試料混合 DNA 溶液で 34.8 及び 34.0 であった。また、スイセン DNA を含まない加熱ニラ DNA 溶液では、想定したとおり、植物検知系の Ct 値は得られたがスイセン検知系の Ct 値は得られなかった。2.4.3 に従って判定し、0.01, 0.1, 1, 10 及び 100%のスイセン DNA を含む加熱試料混合 DNA 溶液はスイセン遺伝子検

出と判定した。

以上のことから、未加熱の試料の場合と同様に、10 分間沸騰水中で加熱された試料においても、0.01%以上のスイセン DNA を含んでいれば、スイセン遺伝子が検出できることを確認した。

表 5 加熱試料混合 DNA 溶液の Ct 値 ($n=2$)

加熱試料混合DNA溶液の混合割合 (%)		Ct値	
ニラ	スイセン	植物検知系	スイセン検知系
100	0	25.4 / 25.1	no Ct / no Ct
99.99	0.01	28.2 / 25.7	34.8 / 34.0
99.9	0.1	26.0 / 26.0	33.5 / 33.7
99	1	26.1 / 26.3	29.8 / 29.9
90	10	25.9 / 25.9	25.8 / 25.6
0	100	25.7 / 26.0	22.1 / 22.1

4 まとめ

福岡市内におけるスイセンによる食中毒発生に備えて、従来の LC-MS/MS 等を用いた機器分析によるリコリン等の有毒成分の検出に加え、原因植物の迅速な特定に有用なリアルタイム PCR を用いた遺伝子による鑑別法の導入を検討した。

抽出法の検討では、シリカゲル膜タイプキットと塩化ベンジル法キットを比較した。シリカゲル膜タイプキットでは 100 mg の試料から 0.2~0.3 μg の DNA が抽出されたのに対し、塩化ベンジル法キットは、50 mg の試料から 4.7~7.8 μg の DNA が抽出された。塩化ベンジル法キットを使用することで、少量の試料からでも十分な量の DNA 抽出が可能となり、残品にごくわずかなスイセンしか含まない場合であってもスイセン遺伝子を検出できる可能性が高くなると考えられた。

また、Fast mode を使用した qPCR 法の検討では、Standard mode 及び Fast mode の検量線の直線性及び増幅効率の比較及び同一 DNA 試料の Ct 値を比較したところ、大きな違いは認められなかった。そのため、迅速に

結果を得られる Fast mode の使用が食中毒疑い事例発生時の原因植物特定の際には適していると考えられた。

塩化ベンジル法キットを用いて DNA を抽出後、Fast mode を用いて qPCR 反応を行い、スイセン遺伝子を検出する方法を鑑別法とし、食中毒疑い事例に適用が可能かどうかを確認した。実際の食中毒事例を参考に、ニラにスイセンが混入している残品及び加熱調理されている残品を想定し、ニラ DNA 溶液にスイセン DNA 溶液の割合を変化させて混入する DNA 混合試験を行った。その結果、0.01, 0.1, 1, 10 及び 100%のスイセン DNA を含む混合 DNA 溶液において、スイセン遺伝子を検出した。また、加熱試料を用いた場合も同様に 0.01, 0.1, 1, 10 及び 100%のスイセン DNA を含む加熱試料混合 DNA 溶液において、スイセン遺伝子を検出した。

以上のことから、残品が数 g 程度と少量の場合、調理野菜にスイセンが混入している場合及び加熱調理されている場合であってもスイセン遺伝子の検出が可能であることが確認でき、鑑別法は食中毒疑い事例発生時の検査法として有用であると考えられた。

文献

- 1) 登田美桜, 他: 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, vol.55, No.1, 55~63, 2014
- 2) 国立医薬品食品衛生研究所: 有毒の高等植物 5 種の判別法
- 3) 篠崎淳一, 他: 食中毒事例の多い有毒植物の PCR-RFLP 法による鑑別, 食品衛生学雑誌, vol.59, No.3, 134~140, 2018
- 4) Etsuko Miyazaki *et al.*: Improvements in Method to Detect Wheat in Heat-processed Foods by Real-time PCR, Food Science and Technology Research, 26, 517~526, 2020
- 5) 消費者庁次長通知 消食表第 389 号: 「食品表示について」の一部改正について, 令和 3 年 9 月 15 日
- 6) Heng Zhu *et al.*: Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride, Nucleic Acids Research, 21(22), 5279~5280, 1993