

# 【事例】イヌサフランによる食中毒事例について

茂木修一 関慎太郎 坪井公志\* 見城信子 砂長千晶 山口貴史

## はじめに

イヌサフランはユリ科の球根植物で園芸植物として広く植えられており、葉はギョウジャニンニクやギボウシ、鱗茎はジャガイモやタマネギと間違えられることがある。イヌサフランはコルヒチン及びデメコルシンを含んでおり、これらを摂取すると嘔吐、下痢、皮膚の知覚減退、呼吸困難などの症状を引き起こし、重症の場合は死亡することもある<sup>1,2)</sup>。過去10年間

(2010～2019)に全国でイヌサフランによる食中毒が15件発生しており、患者22人中10人が死亡している<sup>3)</sup>。

平成31年4月、群馬県内で初めてイヌサフランの誤食による食中毒が発生し、喫食者2名中2名が嘔吐・下痢等を発症、うち1名が死亡した。調査の中で、当センターではイヌサフラン中のコルヒチンを分析し、後日デメコルシンの分析及びPCRによるイヌサフランの鑑別を実施したので報告する。

## 経緯

平成31年4月18日(木)、医療機関から「ギョウジャニンニクとイヌサフランを間違えて喫食した可能性のある患者2名が受診している」旨の通報が保健所にあった。同保健所が調査したところ、患者は4月15日(月)に知人宅に自生していた野草を譲り受け、同野草をギョウジャニンニクと認識して、4月17日(水)昼に自宅で炒め物にして喫食していたことが判明した。喫食残品がなかったため、4月19日(金)に採取場所に自生していた2種類の野草のコルヒチン検査の依頼があり、検体(イヌサフラン様植物及びギョウジャニンニク様植物)が当センターに搬入された(図1、2)。



図1 検体：イヌサフラン様植物



図2 検体：ギョウジャニンニク様植物

## 検査方法の検討及び標準品の入手

イヌサフランを同定する方法は、含有するコルヒチンを分析するHPLC法及びLC-MS/MS法、イヌサフランのDNAを抽出しPCRを行う方法が報告されている<sup>4~8)</sup>。今回は、当センターで迅速に行え、定性能力も高いLC/MS/MS法を用いることとした。しかし、当センターでは標準品を所有しておらず、東京都健康安全研究センターにコルヒチン標準品の分与を緊急に依頼し、4月20日(土)に標準品を入手することができた。

なお、デメコルシンについては、後日追加

\* 現 前橋市保健所

検査を実施した。

さらに、DNA を抽出し PCR による鑑別が可能かどうか検討を行った。

## 試料と方法

### 1 コルヒチン及びデメコルシンの分析

#### (1) 試料

保健所から搬入されたイヌサフラン様植物 2 検体の葉及び根、ギョウジャニンニク様植物 2 検体の葉及び根

#### (2) 試薬

コルヒチン：和光純薬工業（株）製 1 級

デメコルシン：Sigma-Aldrich 製 HPLC 用

メタノール：関東化学（株）製 HPLC 用

ギ酸アンモニウム溶液：関東化学（株）製 HPLC 用

アセトニトリル：関東化学（株）製 LC/MS 用

ギ酸：富士フイルム和光純薬（株）製 LC/MS 用

#### (3) 標準溶液の調製

コルヒチン及びデメコルシンをそれぞれメタノールで希釈して検量線用標準液（25ng/mL～500ng/mL）とした。

#### (4) 装置及び測定条件

装置：Waters ACQUITY UPLC/Quattro Premier XE

移動相：10mmol/L ギ酸アンモニウム・0.1v/v% ギ酸含有アセトニトリル（75：25）

カラム：XBridge C18（Waters 社製）

2.1mm×150mm 3.5µm

カラム温度：40°C 注入量：1µL

流速：0.3mL/min

イオン化モード：ESI positive

分析モード：MRM ソース温度：120°C

脱溶媒ガス温度：400°C

脱溶媒ガス流量：800L/hr

コーンガス流量：50L/hr

トランジションの条件は表 1 とした。

#### (5) 試験溶液の調製

細切した試料 1g を採取し乳鉢ですりつぶし、メタノール 30mL を用いてホモジナイザーカップに移し、2 分間ホモジナイズした。これを 50mL 遠沈管に移し、メタノールを加えて

50mL に定容した。遠心分離（4°C、1,900×g 10 分間）、上清をメタノールで 10 倍～200 倍希釈して、メンブランフィルター（PTFE、0.45µm）ろ過したものを試験溶液とし、LC-MS/MS で分析した。

表 1 コルヒチン及びデメコルシンの MS/MS 分析条件

化合物名	プリカーサーイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	プロダクトイオン (m/z)	コリジョン電圧 (eV)
コルヒチン	400	42	310	26
			326	24
			152	90
デメコルシン	372	32	165	82
			341	18
			282	24
			165	70
			267	36

### 2 PCRによる鑑別

#### (1) 試料

保健所から搬入され、検査でイヌサフランと確認された植物の葉及び検査でギョウジャニンニクと確認された植物の葉

#### (2) 試薬

DNA 抽出：QIAGEN 製 DNeasy Plant Mini Kit、富士フイルム和光純薬株式会社製分子生物学用エタノール、株式会社ニッポンジーン製 TE 緩衝液

PCR：ライフテクノロジーズジャパン製

AmplitaqGold & PCR Buffer II / MgCl<sub>2</sub> with

dNTPs、QIAGEN 製 Nuclease-Free Water、イヌ

サフラン検出用プライマー（グライナージャパン社の合成品）、植物異物同定用プライマー

（株式会社ファスマック社製）

電気泳動：Agilent technologies 製 Agilent

DNA1000 試薬キット

PCR 産物の精製：株式会社ニッポンジーン製

ISOSPIN PCR Product

DNA シーケンス：ライフテクノロジーズジャ

パン製 BigDye™ Terminator v3.1 Cycle

Sequencing Kit、GE Healthcare 製 Autoseq G-50

(3) 装置

分光光度計：日立 U-3900H

サーマルサイクラー：Applied Biosystems 社製

GeneAmp PCR System 9700

電気泳動装置：Agilent 2100 バイオアナライザー

DNA シーケンサー：Applied Biosystems 3500

Genetic Analyzer

#### (4) DNA 抽出

DNeasy Plant Mini Kit の説明書に従い実施した。DNA 抽出液は吸光度を測定し、260nm の吸光度を 320nm の吸光度をバックグラウンド値として減算し、DNA 濃度を算出した。DNA 抽出液は TE 緩衝液を用いて 20ng/μL に調製し、DNA 試料液とした。DNA 濃度が 20 ng/μL 以下の DNA 抽出液はそのまま DNA 試料液とした。

#### (5) PCR

##### 1) イヌサフラン検出 PCR

PCR 反応液は、1×PCR Buffer II、0.2mM dNTP、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2μM TINU プライマー、0.625 units DNA Taq polymerase となるように混合し、DNA 試料液 2.5μL を加え、全量を 25μL とした。反応条件は 95°C10 分間保持で反応を開始させた後、95°C15 秒間、60°C30 秒間、72°C1 分間を 1 サイクルとして、35 サイクルの PCR 増幅を行った。終了反応として 72°C5 分間保持後、4°C で保存した。

##### 2) 植物異物同定 PCR

植物異物同定用プライマーに付属する説明書に従い実施した。

#### (6) 電気泳動

PCR 産物を Agilent DNA1000 試薬キットを用いてバイオアナライザーで電気泳動し、増幅断片長の確認を行った。

#### (7) 塩基配列解析

ISOSPIN PCR Product を用いて各 PCR 産物を精製した。BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 及び各プライマーを用いて蛍光ラベル化した。未反応の蛍光色素を Autoseq G-50 により除去後、DNA シーケンサーにより塩基配列を得た。プライマー配列を除き得られた塩基配列について DNA Data Bank of Japan の BLAST 検索（相同性検索）を行った。

## 結果

### 1 コルヒチンの定量結果

定量の結果を表 2 に示す。イヌサフラン様植物からはコルヒチンが 0.81mg/g～1.58mg/g 検出された。葉より根の方がコルヒチンの濃度が高かった。一方、ギョウジャニンニク様植物からはコルヒチンは検出されなかった。

表 2 コルヒチンの定量結果

試料名	コルヒチン濃度 (mg/g)
イヌサフラン様植物① 葉	0.99
イヌサフラン様植物① 根	1.45
イヌサフラン様植物② 葉	0.81
イヌサフラン様植物② 根	1.58
ギョウジャニンニク様植物① 葉	検出限界値未満
ギョウジャニンニク様植物① 根	検出限界値未満
ギョウジャニンニク様植物② 葉	検出限界値未満
ギョウジャニンニク様植物② 根	検出限界値未満

### 2 デメコルシンの定量結果

定量の結果を表 3 に示す。イヌサフラン様植物からはデメコルシンが 0.046mg/g～0.23mg/g 検出された。葉より根の方がデメコルシンの濃度が高かった。一方、ギョウジャニンニク様植物からはデメコルシンは検出されなかった。

表 3 デメコルシンの定量結果

試料名	デメコルシン濃度 (mg/g)
イヌサフラン様植物① 葉	0.046
イヌサフラン様植物① 根	0.23
イヌサフラン様植物② 葉	0.055
イヌサフラン様植物② 根	0.23
ギョウジャニンニク様植物① 葉	検出限界値未満
ギョウジャニンニク様植物① 根	検出限界値未満
ギョウジャニンニク様植物② 葉	検出限界値未満
ギョウジャニンニク様植物② 根	検出限界値未満

### 3 PCR による鑑別結果

#### (1) PCR 反応結果

植物異物同定用プライマー及びイヌサフラン検出用プライマーを用いた PCR のマイクロチップ電気泳動の結果は図 3 のとおりとなった。

#### 1) 植物異物同定用プライマー

ギョウジャニンニクは単一の 408bp の PCR 増幅産物が確認された (レーン 1)。イヌサフランは 310bp と 328bp の複数の PCR 増幅産物が確認された (レーン 2)。

#### 2) イヌサフラン検出用プライマー (TINU-ITS)

ギョウジャニンニクは PCR 増幅産物が確認されなかった (レーン 6)。イヌサフランは目的産物である 157bp の PCR 増幅産物以外にも 107bp の PCR 増幅産物が確認された (レーン 7)。157bp の PCR 増幅産物と 107bp の PCR 増幅産物の濃度はそれぞれ 11.03ng/μL、0.93ng/μL であり、濃度差が大きいため、ISOSPIN PCR Product の精製とした。

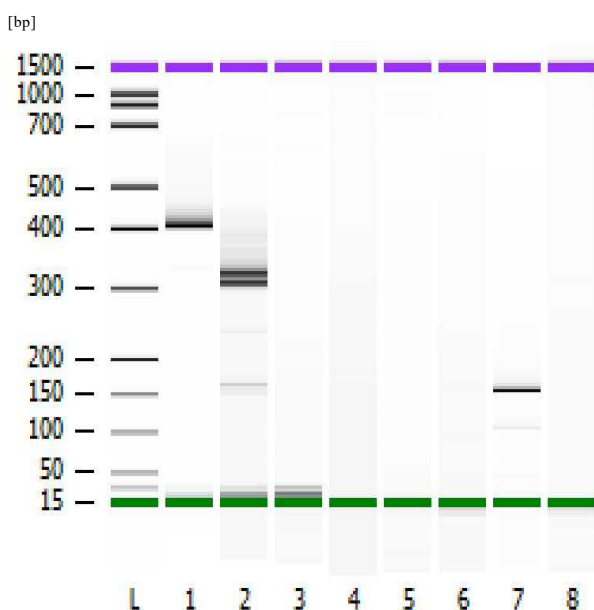


図 3 マイクロチップ電気泳動結果

L : ラダー

1 : ギョウジャニンニク (異物)

2 : イヌサフラン (異物)

3 : NTC (異物)

4 : NPC (ギョウジャニンニク)

5 : NPC (イヌサフラン)

6 : ギョウジャニンニク (TINU-ITS)

7 : イヌサフラン (TINU-ITS)

8 : NTC (TINU-ITS)

## (2) 塩基配列解析結果

### 1) イヌサフラン

イヌサフラン検出用プライマー及び植物異物同定用プライマーともに、*Colchicum autumnale* (イヌサフラン) との相同性が高く、DNA 塩基配列解析により同定が可能であることが確認できた。

### 2) ギョウジャニンニク

植物異物同定用プライマーにおいて、*Allium ochotense* (ギョウジャニンニク) との相同性が高く、DNA 塩基配列解析により同定が可能であることが確認できた。

## 考 察

ヒトの最小致死量は体重 50kg の場合、コルヒチンとして 4.3mg 程度とされている<sup>1)</sup>。今回コルヒチンを 0.99mg/g 検出した葉で換算すると、4.4g の摂取で最小致死量に達する。この検体の葉の部分の重さは 12g であったので、1 株分の葉で最小致死量以上のコルヒチンを摂取していた可能性がある。

デメコルシンについては、ヒトの最小中毒量は体重 50kg の場合、10mg 程度とされている<sup>7)</sup>。今回デメコルシンを 0.046mg/g 検出した葉で換算すると、218g 以上摂取しなければ中毒量に達しない。

今回の事案は、標準品の入手如何によっては対応できなかった可能性があったが、幸い東京都健康安全研究センターから標準品を分与していただくことで、迅速に対応することができた。保健所は 4 月 20 日 (土) に群馬県立自然史博物館に形態学的な植物の鑑定を依頼し、イヌサフラン及びギョウジャニンニクであることが確認された時点で、イヌサフランを原因とする食中毒と断定したが、並行して当センターでもコルヒチンの検査を実施し、中毒の原因がイヌサフランであることを裏付けるデータを得ることができた。当センターは、食品及び医薬品等の主に理化学検査が必要となる健康危機発生事案に対応することとしているが、事例が少ないこともあり標準品の準備等が十分でない。有毒植物による食中毒は全国の状況をみると毎年発生

しており、死亡率も高く、原因究明における検査機関の役割は重要である。検体が調理品のみであったり、形態がはっきりしない場合は検査結果が頼りになることから、日頃から発生事案に速やかに対応できるよう試験検査体制を整えておく必要がある。

当センターでは、今回の事案を受けて、発生頻度の高い自然毒の標準品を数種類用意し、今後検査可能な項目を増やしていく予定である。

さらに、DNA を用いた種の判別は有用であり、特に少量かつ調理等された試料への適用が期待される。

境研究所報、25、59-61、2017.

6) 寺井朗子ほか：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、174-182、2018.

7) 山元梨津子ほか：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、埼玉県衛生研究所報、52、61-65、2018.

8) 正村典也、菊池亮、永富靖章：ITS1 塩基配列による植物性異物同定方法の開発、分析化学、63(3)、245-253、2014.

## 謝 辞

標準品の分与及び LC-MS/MS 条件をご教示いただきました東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科の木村圭介氏に深謝致します。

また、DNA シーケンサーの使用に便宜を図ってくださった群馬県衛生環境研究所に感謝致します。

## 文 献

- 1) 厚生労働省「自然毒のリスクプロファイル：高等植物：イヌサフラン」  
<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000058791.html>
- 2) 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門：家畜中毒診断マニュアル：イヌサフラン  
[https://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease\\_poisoning/plants/a-crocus.html](https://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_poisoning/plants/a-crocus.html)
- 3) 厚生労働省「有毒植物による食中毒に注意しましょう」  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/youudoku/](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/youudoku/)
- 4) 山崎喜与子ほか：イヌサフラン食中毒事例での緊急検査について、静岡県環境衛生科学研究所報告、57、37-40、2014.
- 5) 南谷臣昭ほか：岐阜県内で誤販売されたイヌサフランによる食中毒事例、岐阜県保健環