

# トリカブトに含まれるアコニチン系アルカロイドの定量 及び PCR を用いたトリカブトの鑑別

高山清子 上原直美 寺山晃司<sup>1)</sup> 西村幸江  
鈴木郷 野口翔<sup>2)</sup> 竹原瑛梨奈 野口辰美

## Quantification of Aconitine Alkaloids in *Aconitum* Plant and Identification of *Aconitum* Plant by PCR Method

Kiyoko TAKAYAMA, Naomi UEHARA, Koji TERAYAMA, Yukie NISHIMURA,  
Go SUZUKI, Sho NOGUCHI, Erina TAKEHARA and Tatsumi NOGUCHI

### 要旨

トリカブトの有毒成分であるアコニチン系アルカロイド（アコニチン（AC）、メサコニチン（MC）、ヒバコニチン（HC））について LC/MS/MS を用いた一斉分析法を検討した。本県内に自生するトリカブト 3 検体を採取しアコニチン系アルカロイド（AC 類）を定量したところ、検体、部位ごとに各成分濃度は異なっており、根の濃度が高かった。誤食事例が多い葉を塩や酸の存在下で加熱処理をしたところ、AC 類の物質変化及び水溶液への溶出は少なく、葉に残存することを確認した。また、トリカブトに特異的なプライマーを用いた PCR により県内に自生するトリカブト属植物を鑑別でき、LC/MS/MS 分析の前処理で生成する抽出後の沈殿物を PCR に利用できることを確認した。

キーワード：トリカブト、アコニチン系アルカロイド、LC/MS/MS、PCR

### はじめに

当研究所においては、地方衛生研究所全国協議会九州ブロックにおいて実施される健康危機に係る模擬訓練に参加しており、2018 年は、ハチミツにトリカブトの有毒成分が混入した想定での訓練であった。当研究所においては当該成分の分析実績がなかったため、LC/MS/MS を用いた分析法を検討し、AC 類の定量を行うことができた。一方、トリカブトによる中毒は重篤になりやすいことから、厚生労働省は「自然毒のリスクプロファイル」をインターネットで公開し、国民全般に毒草中毒に対する注意喚起を行っている。数馬らは 2012 年 4 月に北海道で 2 名が死亡したトリカブト中毒事故の詳細を明らかにするため、トリカブト試料に含まれる AC 類の濃度を LC/MS で定量し、トリカブト乾燥重量 1 g 当たり、AC が 0.43 mg、MC が 0.55 mg、HC が 0.04 mg であったと報告している<sup>1)</sup>。岡田らはトリカブトの根における成分特性の年次内、衛生化学部<sup>1)</sup> 元 衛生環境研究所<sup>2)</sup> 現 環境省

年次間変化について調査し、AC 類が収穫時期や年次により変化することを報告している<sup>2)</sup>。また、西日本においてはタンナトリカブト (*Aconitum japonicum* Thunb. subsp. *Napiforme*) が分布する中、門田らは本県北部の山頂部で絶滅危惧植物のコウライブシ (*Aconitum jaluense* Kom. subsp. *Jaluense*) の群落を発見したと報告している<sup>3)</sup>。今回、これまでに分析実績がない県内に自生するトリカブトを 3 検体を採取し AC 類の分析を行った。さらに、近年、食中毒の科学的検証法の一つとして利用されている植物種や属に固有の塩基配列を指標とした PCR による鑑別法を検討したので併せて報告する。

### 方法

- 1 LC/MS/MS を用いた AC 類の分析
- 1) 試料

野生のトリカブトは、2018年11月に都城市で採取し冷凍保存したもの、2010年10月に都城市及び高城町で採取し冷凍保存をしたものを用いた。いずれのトリカブトも形態の特徴によりタンナトリカブトと判別されたものを使用した。

## 2) 試薬

標準溶液及び標準試薬は、アコニチン標準液 100 mg/L (富士フィルム和光純薬)、メサコニチン標準液 500 mg/L (林純薬工業)、ヒパコニチン (purity  $\geq$  99%, 三和生薬) を用いた。

## 3) LC/MS/MS 装置及び測定条件

LC/MS/MS の条件を表 1 に示す。

## 4) 試料溶液の調製

各トリカブトの葉、花、茎及び根を約 5 mm に細切し、笠原らの方法<sup>4)</sup>を参考に試料を調製した。すなわち、細切した試料 0.1 g をディスポーザブルホモジナイザー (バイオマッシャーII, ニッピ) に秤量し、1 mmol/L 塩酸を 0.5 mL 加えてホモジナイズすることで AC 類を抽出した。抽出液は遠心分離 (12,000 rpm, 1 分間) を行い (ユニバーサル冷却遠心機 5922, 久保田商事), 上清をあらかじめメタノール及び水でコンディショニングをした固相カートリッジ Oasis HLB (3 cc, 60 mg) に負荷した。遠心分離後の沈殿物に再度 1 mmol/L 塩酸を 0.5 mL 加えて洗浄したものも併せて負荷した。15%メタノール 1 mL で固相カラムを洗浄後、メタノール 1 mL で AC 類を溶出し、1 mL に定容後 0.20  $\mu$ m フィルターを通したものを分析試料とした。また、トリカブトの葉をおひたしや酢の物として調理した場合を想定し、2018年11月に都城市で採取したトリカブトの葉を細切後 0.1 g を秤量し、1%塩化ナトリウム水溶液、4%酢酸水溶液及び抽出溶液である 1 mmol/L 塩酸をそれぞれ 1 mL 添加し、100°C, 5 分間加熱処理を行い、塩濃度や酸、加熱による物質変化や水溶液への AC 類の溶出を確認した。

## 2 PCR によるトリカブトの鑑別

### 1) 試料

前述した野生のトリカブト 3 検体の葉を PCR の試料とした。また、LC/MS/MS の分析前処理で生成する AC 類抽出後の沈殿物から約 2 mm

表 1 LC/MS/MS 装置及び測定条件

装置	AB SCIEX 3200 QTRAP
HPLC 条件	
分析カラム	Inertsil ODS-3 3 $\mu$ m 粒子径, 2.1 $\phi$ ×150 mm
移動相 A 液	20 mM ギ酸アンモニウム水溶液
移動相 B 液	20 mM ギ酸アンモニウム 90%メタノール溶液
グラジエント条件 (B 液)	15% (1 min) $\rightarrow$ 40% (3.5 min) $\rightarrow$ 50% (6 min) $\rightarrow$ 55% (8 min) $\rightarrow$ 95% (30 min) $\rightarrow$ 15% (35 min)
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40°C
注入量	5 $\mu$ L
MS/MS 条件	
イオン化	ESI positive
Ion Spray Voltage	5500 V
MRM パラメータ	CUR : 10.00, CAD : 4.00, GS1 : 7.00, GS2 : 0.00, ihe : ON, DP : 90.00, EP : 8.00, CE : 85.00, CXP : 2.30
Precursor ions (m/z)	
AC	646.219
MC	632.210
HC	616.238
Product ions (m/z)	
AC	105.100
MC	105.086
HC	105.093

角を採取し、PCR の試料として利用できるかを検討した。PCR の特異性を確認するため、対照として若葉の形が類似したゲンノショウコの葉を用いて同様の試験を実施した。

### 2) 装置

一連の試験には、以下の装置を用いた。

サーマルサイクラー：Veriti (Applied Biosystems)，電気泳動装置：Mupid -2Plus (アドバンス)，ゲル撮影装置：Molecular Imager GelDoc™ XR+ Systems (Bio-Rad)

### 3) プライマー

トリカブトの鑑別には、門間らのトリカブトに特異的なプライマー<sup>5)</sup> (TTORI-DF1, TTORI-DR2) を用いた。また、各試料から DNA 抽出が確実にされているかを確認するため、真核生物検出用検出用プライマー<sup>6)</sup> (TR03, TR04) を用いて PCR を行った。

### 4) PCR

約 2 mm 角の組織片から Phire Plant Direct PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) を用いてダイレクト PCR を行った。PCR は 98°C 5 分間の後、98°C 5 秒間、62°C 5 秒間、72°C 20 秒間を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、72°C 1 分間とした。

### 5) 電気泳動

PCR 産物は、エチジウムブロマイド (和光純薬工業) を 0.5 µg/mL の濃度になるように添加した 3% アガロースゲル (Prime Gel Agarose PCR – Sieve, タカラバイオ) 及び 1×TAE (和光純薬工業) 緩衝液を用いて電気泳動後紫外線照射によりバンドを確認した。

## 結果

### 1 本県内に自生するトリカブトの AC 類

本県内に自生するトリカブトの葉、茎、花及び根に含まれる AC 類を LC/MS/MS で定量した結果を表 2~5 に示す。今回分析したトリカブト 3 検体の AC 類は、検体や部位により各成分の濃度は異なっており、MC 及び HC に比べ AC 濃度が低かった。また、各部位の AC 類の濃度は、根が最も高く、次いで花の濃度が高かった。

表 2 トリカブトの葉に含まれる AC 類

試料	AC (µg/g)	MC (µg/g)	HC (µg/g)
2018 都城	0.0079	0.38	0.035
2010 都城 1	0.10	6.6	11
2010 都城 2	0.30	5.3	0.67

表 3 トリカブトの茎に含まれる AC 類

試料	AC (µg/g)	MC (µg/g)	HC (µg/g)
2018 都城	0.022	0.76	1.2
2010 都城 1	0.22	6.8	0.92
2010 都城 2	0.25	3.3	0.59

表 4 トリカブトの花に含まれる AC 類

試料	AC (µg/g)	MC (µg/g)	HC (µg/g)
2018 都城	0.54	12	2.6
2010 都城 1	0.95	36	0.97
2010 都城 2	5.5	73	6.5

表 5 トリカブトの根に含まれる AC 類

試料	AC (µg/g)	MC (µg/g)	HC (µg/g)
2010 都城 1	0.0050	0.38	160
2010 都城 2	16	120	2.2

### 2 塩化ナトリウム水溶液、酢酸水溶液下の加熱による AC 類への影響

2018 年 11 月に都城市で採取したトリカブトの葉を、調理を想定した条件として 1% 塩化ナトリウム水溶液、4% 酢酸水溶液及び 1 mmol/L 塩酸下、100°C で 5 分間加熱処理を行い、加熱後の葉及び水溶液中の AC 類を定量した (表 6)。その結果、水溶液中の AC 類の濃度は低く、AC 類は葉に残存していた。

表 6 調理を想定した加熱処理後の葉部及び水溶液中の AC 類

		AC (ng/g)	MC (ng/g)	HC (ng/g)
1%NaCl	葉	2.58	56.1	54.6
水溶液	水溶液	0.333	0.877	0.742
4%酢酸	葉	1.32	42.3	34.4
水溶液	水溶液	0.302	0.914	0.749
1 mmol/L 塩酸	葉	0.471	18.9	20.9
	水溶液	0.142	0.345	0.447

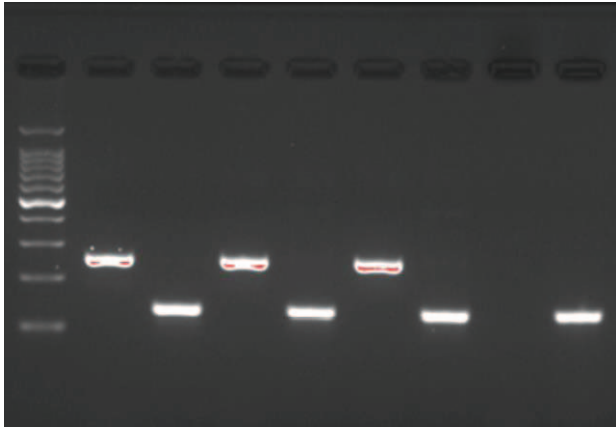


図1 県内に自生するトリカブトの鑑別

左より Lane 1 : 100 bp Ladder,  
トリカブト DNA : 2018 都城 (Lane 2,3) , 2010 都城 1 (Lane 4, 5) , 2010 都城 2 (Lane 6, 7) , ゲンノショウコ DNA (Lane 8, 9) , トリカブト用プライマー (Lane 2, 4, 6, 8) , 真核生物検出用プライマー (Lane 3, 5, 7, 9)

### 3 トリカブトの PCR による鑑別

本県内に自生するトリカブト 3 検体について、トリカブトに特異的なプライマーを用いた PCR を行った (図 1) . 真核生物検出用プライマーを用いた PCR では全ての検体で 159 bp のバンドが確認されたため、DNA 抽出に問題がないことが確認された。トリカブトに特異的なプライマーを用いた PCR の結果、対照植物のゲンノショウコではバンドが確認されなかったが、トリカブト 3 検体で 254 bp の特異的なバンドが確認された。

### 4 LC/MS/MS の前処理で生成する沈殿物を利用した PCR の検討

調理を想定し、塩や酸の存在下で加熱処理したトリカブトの葉を試料とし、LC/MS/MS の分析前処理を行った際生成する AC 類抽出後の沈殿物を用いて同様に PCR を行った (図 2) . その結果、全ての LC/MS/MS の前処理で生成する沈殿物からトリカブトのバンドが検出された。

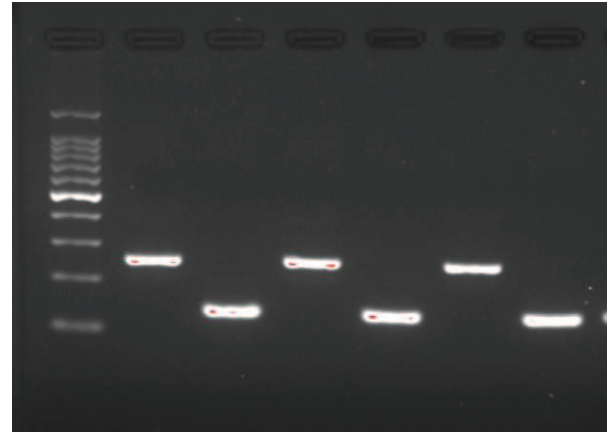


図2 沈殿物を用いたトリカブトの鑑別

左より Lane 1 : 100 bp Ladder,  
1 mmol/L HCl 処理 DNA (Lane 2,3) , 1%NaCl 水溶液処理 DNA (Lane 4, 5) , 4%酢酸水溶液処理 DNA (Lane 6, 7) , トリカブト用プライマー (Lane 2, 4, 6) , 真核生物検出用プライマー (Lane 3, 5, 7)

## 考察

今回、初めて本県内に自生するトリカブトの AC 類について分析を行い、検体や部位ごとに濃度が異なることを確認した。一般的にトリカブト中毒では AC 中毒を連想されるが、中田らは鑑賞用トリカブト中毒で MC の測定が有用であったことを報告している<sup>7)</sup>。今回の結果からもトリカブトの食中毒時における LC/MS/MS 分析では、AC 以外の MC や HC も同時に一斉分析する必要があると考えられた。また、トリカブトの葉を 1%塩化ナトリウム水溶液や 4%酢酸水溶液中で加熱処理後も葉の AC 類の濃度が高かったことから、加熱による物質の変化がほとんどないこと、水溶液中への溶出が少ないことを確認した。AC 類は水に溶けにくい物質であることから、食中毒発生時の分析ではトリカブトの固体部が必要であると考えられた。

また、LC/MS/MS 分析の前処理で生成する沈殿物を用いた PCR は、沈殿物の一部でトリカブトを鑑定することができた。両者を組み合わせた分析は、迅速なトリカブトの鑑定及び AC 類の定量に有効であると考えられた。今後は、その他の植物性自然毒について LC/MS/MS 及び

PCR を組み合わせた検査体制の確立に取り組みたい。

### まとめ

1 本県内に自生するトリカブト3検体のAC類の濃度は、検体、部位ごとに異なり、根の濃度が高かった。

2 トリカブトの誤食を想定し葉部を塩及び酸の存在下で加熱処理をしたトリカブトについて、AC類の物質変化がないこと、水溶液への溶出は少なく葉部に残存することを確認した。

3 トリカブトに特異的なプライマーを用いたPCRにより県内に自生するトリカブト属植物を判別できた。また、LC/MS/MSの前処理沈殿物を使用してPCRによるトリカブトの鑑別が可能であった。

### 謝辞

本研究を行うにあたり、トリカブト、ゲンノショウコ等の植物を提供いただいた総合農業試験場薬草・地域作物センター所長 井上 伸之 氏に感謝申し上げます。

### 参考文献

- 1) 数馬恒平, 佐竹元吉, 紺野勝弘 : 重症トリカブト中毒事例とその食品衛生学的背景, 食品衛生学雑誌, 54 (6), 419 - 425 (2013)
- 2) 岡田浩明, 川口数美 : トリカブトにおける成分特性の年次内と年次間変化, *Natural Medicines*, 59 (1), 36 - 41 (2005)
- 3) 門田裕一, 斉藤政美 : 宮崎県のコウライブシ, 植物研究雑誌, 85, 131 - 132 (2010)
- 4) 笠原義正, 伊藤健 : LC/MS/MSによるトリカブトおよび食中毒原因食品中のアコニチン系アルカロイドの一斉分析, 食品衛生学雑誌, 49 (2), 76 - 81 (2008)
- 5) 門間公夫, 大石充男 : マルチプレックスPCRによるトリカブト, ニリンソウ及びモミジガサの鑑別, *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, 68, 109 - 115 (2017)
- 6) 松岡猛, 栗原秀夫, 末藤晴子, 三浦裕仁, 日下部裕子, 穂山浩, 合田幸広, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛 : 遺伝子組換えトウモロコシCBH351 系統からの組換え遺伝子の検知法, 食品衛生学雑誌, 42 (3), 197 - 201 (2001)
- 7) 中田一之, 間藤卓, 山口充, 福島憲治, 澤野誠, 堤晴彦, 矢島敏行 : メサコニチン測定が有用であった鑑賞用トリカブト中毒の1例, 日救急医学会誌, 20, 31 - 36 (2009)