

クワズイモによる食中毒発生時における検査方法の検討

高山清子 前田智子¹⁾ 西村幸江²⁾ 上原直美
鈴木郷 木下和昭 竹原瑛梨奈 野口辰美³⁾

Study of Inspection Methods at the Time of Food Poisoning by *Kuwazuimo* (*Alocasia odora*)

Takayama Kiyoko, Maeda Tomoko, Nishimura Yukie, Uehara Naomi,
Suzuki Go, Kishita Kazuaki, Takehara Erina and Noguchi Tatsumi

要旨

食用のはすがらと外見上類似したクワズイモの誤食による食中毒が時々発生する。本県において、2019年度にクワズイモ疑いの食中毒が発生した際、PCR法により食中毒検体がクワズイモであることを確認した。また、別の鑑別法として、イオンクロマトグラフィー及びICP発光分光分析法によるシュウ酸カルシウムの定量と光学顕微鏡観察による細胞の形態観察について検討したところ、クワズイモ及びはすがらのシュウ酸カルシウム濃度に差はないが、シュウ酸カルシウム結晶の形状に差がみられた。したがって、クワズイモ食中毒発生時は、PCR法によるクワズイモに特異的な遺伝子の検出と光学顕微鏡によるシュウ酸カルシウム結晶形状の観察が有用であることを確認した。

キーワード：クワズイモ，PCR，シュウ酸カルシウム，東晶細胞

はじめに

クワズイモ (*Alocasia odora*) は、暖帯から亜熱帯に分布するサトイモ科クワズイモ属植物であり、食用であるサトイモ科サトイモ属のサトイモ (*Colocasia esculenta*) の塊茎やハスイモ (*Colocasia gigantea*) の葉柄 (はすがら) に外観が類似しているため、誤食による食中毒が全国で2009年度から2018年度に13件、本県においては、この間3件、2019年度にも1件発生している。クワズイモによる食中毒の毒性成分は、不溶性シュウ酸カルシウムの針状結晶であり、光学顕微鏡による針状結晶の観察やHPLC分析が紹介されている¹⁾。当研究所においては、小坂らが、1998年に、イオンクロマトグラフィーによる各部位のシュウ酸カルシウム分析と顕微鏡観察の結果について報告している²⁾。また、森岡らは、2008年にキャピラリー電気泳動装置を使用した迅速なシュウ酸分析と顕微鏡観察結果について報告している³⁾。また、サトイモ科植物のシュウ酸カルシウム結晶細胞は、形状によって東晶細胞と集

晶細胞に区別され、針状結晶が結束した東晶細胞は物理的的刺激により細胞外に針状結晶が放出される^{4,5)}。田中らは、サトイモ品種群の間で東晶細胞の密度に差異が認められたこと⁴⁾、サトイモ葉柄品種におけるシュウ酸カルシウム結晶の形成過程⁵⁾について報告している。村上らは、サトイモの東晶細胞は葉柄でみられ、球茎ではほとんどみられないことを報告している⁶⁾。

本県において2019年度にクワズイモ疑いの食中毒が発生した際、微量の検体で迅速に精度の高い検査方法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法により食中毒検体の鑑別を実施した。また、クワズイモ及びはすがらに含まれるシュウ酸カルシウム濃度の定量及びシュウ酸カルシウム結晶の光学顕微鏡観察を実施し、判別に関する知見が得られたので併せて報告する。

衛生化学部 ¹⁾ 元衛生環境研究所 ²⁾ 現日南保健所 ³⁾ 現環境管理課

方法

1 対象

令和元年 8 月に高鍋保健所より依頼があった 2 検体 (①喫食味噌汁の残り, ②味噌汁具に使用した茎の残り), クワズイモ (葉柄), はすがら (葉柄) 及びサトイモ (塊茎) を試料とした。

2 PCR 法によるクワズイモの鑑別

1) 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)

2) プライマー

クワズイモの鑑別には, 萩野らのクワズイモのリボソーム DNA の ITS1 領域の一部を特異的に増幅するプライマー対 (KUWAZU-Fb, KUWAZU-Ra) ⁷⁾ 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, Phire Plant Direct PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) の葉緑体検出用プライマーを用いた。

3) 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°C5 分間の後, 98°C5 秒間, 62°C5 秒間, 72°C20 秒間を 1 サイクルとして 35 サイクル行い, 72°C1 分間とした。

4) 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。

3 シュウ酸カルシウム結晶の光学顕微鏡観察

田中ら ⁴⁾, 村上ら ⁶⁾ は, サトイモ組織中のシュウ酸カルシウム結晶は, 多数の針状結晶が束になった束晶細胞と, 板状の結晶が集合し金平糖状に

なった束晶細胞が観察されると報告している。彼らの方法を参考に, クワズイモ及びはすがらの束晶細胞数と集晶細胞数を計測した。クワズイモ及びはすがらの横断切片は, カミソリの刃を用いて約 5 mm×5 mm の大きさと厚さ約 0.5 mm で 5 枚ずつ作成した。格子線 1 mm ピッチ付きスライドガラス (S6300, 松浪硝子工業) を用いて光学顕微鏡 (ECRIPSE E200, ニコン) 倍率 100 倍で 1 切片あたり 5 か所の視野の各細胞数を計測し, 葉柄組織 1 mm³あたりの数を求めた。また, 田中ら ⁵⁾ の方法を参考に, 葉柄横断切片を光学顕微鏡で観察した。

4 クワズイモ, はすがら及びサトイモに含まれるシュウ酸カルシウムの定量

小坂ら ²⁾, 森岡ら ³⁾ の報告を参考に, 試料に塩酸を加え加熱抽出することで総シュウ酸濃度を, 試料に水を加え加熱抽出することにより可溶性シュウ酸濃度を求め, その差を不溶性シュウ酸濃度とした。

1) シュウ酸イオンの定量

試料 1 g を 50 mL 遠心チューブに秤量し, 総シュウ酸用には 10%塩酸を, 可溶性シュウ酸用には超純水を 10 mL 添加した。セラミックホモジナイザーを用いて 5 分間ホモジナイズを行い (CUTE MIXER CM-1000, 東京理化工業), ヒートブロック (Dry Thermo Unit DTU-2BN, TAITEC) を用いて 100°C で 30 分間加熱後, 再度 5 分間ホモジナイズした。10%塩酸を添加した総シュウ酸濃度試験では, 10%水酸化ナトリウム水溶液で pH2 から pH4 に調製した。超純水を用いて 50 mL に定容後, 濾紙ろ過 (5A, ADVANTEC), 0.45 µm フィルターろ過したものをイオンクロマトグラフィーの分析試料とした。イオンクロマトグラフィーの条件を表 1 に示す。

2) カルシウムイオンの定量

試料 0.1 g に硝酸 (1.38, 有害金属測定用, 富士フィルム和光純薬) 5 mL, 過酸化水素水 (30%, 原子吸光分析用, 富士フィルム和光純薬) 1 mL を加え, マイクロ波試料前処理装置 (MILESTONE START D, マイルストーンゼネラル) で分解後 50 mL に定容し, ICP 発光分光分析法 (ICPE-9800, 島津製作所) にてカルシウムイオンを定量した。

表 1 イオンクロマトグラフィーの装置及び測定条件

装置	DIONEX DX-120
カラム	IonPac AS14A (4×250 mm)
溶離液	8 mmol/L 炭酸ナトリウム水溶液 1 mmol/L 炭酸水素ナトリウム水溶液
流量	1 mL/min
検出	紫外吸光度検出
注入量	25.0 μL

結果

1 PCR 法によるクワズイモの鑑別

高鍋保健所より依頼があった 2 検体(①喫食味噌汁の残り, ②味噌汁具材に使用した茎の残り), クワズイモ(葉柄), はすがら(葉柄), サトイモ(塊茎)の PCR 結果を図 1 に示す. クワズイモ検出用プライマーの PCR において, 食中毒検体及びクワズイモで 219 bp に特異的なバンドがみられたことから, 検体はクワズイモであると鑑別した (Lane 2, 4, 6). 葉緑体検出用プライマーの PCR において, 全ての試料で 254 bp のバンドが得られたことから, DNA が抽出されていることを確認した (Lane 3, 5, 7, 9, 11).

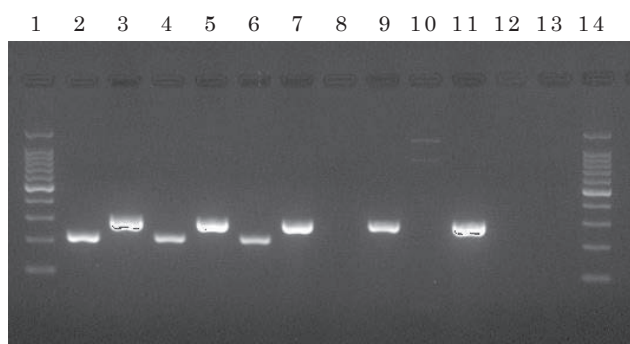


図 1. PCR 産物のアガロースゲル電気泳動

Lane1, 14 : 100 bp ladder marker

DNA : 喫食味噌汁 (Lane 2, 3), 味噌汁具材に使用した茎 (Lane 4, 5), クワズイモ (Lane 6, 7), はすがら (Lane 8, 9), サトイモ (Lane 10, 11), 滅菌水 (Lane 12, 13)
プライマー : クワズイモ検出用プライマー (Lane 2, 4, 6, 8, 10, 12), 葉緑体検出用プライマー (Lane 3, 5, 7, 9, 11, 13)

2 シュウ酸カルシウム結晶の光学顕微鏡観察

クワズイモ及びはすがらの束晶細胞数, 集晶細胞数を表 2 に示す. クワズイモははすがらに比べ約 9 倍束晶細胞が多く, はすがらはクワズイモの約 2 倍集晶細胞が多く観察された. また, クワズイモの横断切片を光学顕微鏡 (倍率 40 倍) で観察したところ, 束晶細胞は柔組織から通気組織へ突出した形で多数存在していた (図 2).

表 2 クワズイモ及びはすがらの束晶細胞数と集晶細胞数

試料	束晶細胞数* (個/mm ³)	集晶細胞数* (個/mm ³)
クワズイモ	33 ± 16	73 ± 44
はすがら	3.6 ± 2.2	150 ± 45

※ 平均値±標準偏差

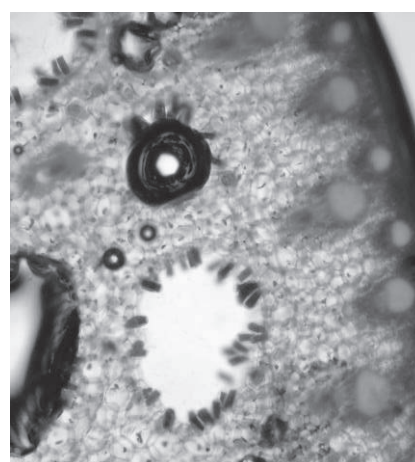


図 2. クワズイモ組織の光学顕微鏡写真

3 クワズイモ, はすがら及びサトイモに含まれるシュウ酸カルシウムの定量

シュウ酸カルシウム濃度を表 3 に示す. クワズイモ及びはすがらの不溶性シュウ酸及びカルシウム濃度が高かったことから, 不溶性シュウ酸カルシウムとして存在すると考えられた. また, クワズイモ及びはすがらともにシュウ酸濃度が高く, 判別することは困難であった.

表3 クワズイモ、はすがら及びサトイモに含まれるシュウ酸カルシウム濃度

試料	総シュウ酸 ($\mu\text{mol/g}$)	可溶性シュウ酸 ($\mu\text{mol/g}$)	不溶性シュウ酸 ($\mu\text{mol/g}$)	カルシウム ($\mu\text{mol/g}$)	シュウ酸カルシウム ($\mu\text{g/g}$)
クワズイモ	3.7×10	1.1×10	2.6×10	3.9×10	3.3×10^3
はすがら	3.1×10	8.2	2.2×10	3.5×10	2.9×10^3
サトイモ	7.2	7.0	1.5×10^{-1}	4.4	1.9×10

一方、サトイモは、総シュウ酸のほとんどが可溶性シュウ酸であった。

考察

PCR法は、微量の試料で検体搬入から2時間程度でクワズイモの鑑別ができるため、食中毒発生時に有用であることを確認した。一方、イオンクロマトグラフィーによる不溶性シュウ酸の定量は、原因物質の特定はできるが、クワズイモとははすがらのシュウ酸カルシウム濃度に大きな差が無く、両者を判別することは困難であった。しかしながら、光学顕微鏡観察において、クワズイモははすがらに比べ約9倍束晶細胞が多く、はすがらはクワズイモの約2倍集晶細胞が多く観察されたため、細胞の形状により両者を判別することは可能であった。したがって、クワズイモ食中毒発生時は、PCR法によるクワズイモに特異的な遺伝子の検出と光学顕微鏡観察によるシュウ酸カルシウム結晶の形状観察が有用であると考えられた。

まとめ

- クワズイモ検出用プライマーを用いたPCRを行い、食中毒検体を鑑別した。
- クワズイモははすがらに比べシュウ酸カルシウムの針状結晶が束になった束晶細胞が多かった。また、束晶細胞は柔組織から通気組織へ突出した形で多数存在していた。

- クワズイモ及びはすがらの不溶性シュウ酸及びカルシウム濃度は高く、判別することは困難であった。

参考文献

- 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル、<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000075832.html>
- 小坂妙子, 山本雄三, 小野和則, 武田攻：クワズイモによる食中毒事例について, 宮崎県衛生環境研究所年報, **11**, 77-80 (1999)
- 森岡浩文, 樺山恭子, 小玉義和：キャピラリー電気泳動によるクワズイモ中のシュウ酸分析, 宮崎県衛生環境研究所年報, **20**, 91-93 (2008)
- 田中政信, 中島寿亀, 森欣也：サトイモ葉柄内のシュウ酸カルシウム結晶細胞の密度および大きさの差異, 園学雑, **72 (6)**, 551-556 (2003)
- 田中政信, 中島寿亀, 森欣也：サトイモ組織内におけるシュウ酸カルシウム結晶の形成及びその分布, 園学雑, **72 (2)**, 162-168 (2003)
- 村上賢治, 植田京子：サトイモ (*Colocasia esculenta* Schott) の組織中シュウ酸カルシウム結晶密度における品種間差異, 岡山大学農学部学術報告, **96**, 25-28 (2007)
- 萩野賀世, 中野久子, 清水本武, 寺井朗子, 大貝真実, 荒金眞佐子, 阿部朋弘, 笹本剛生：PCR法によるクワズイモの同定, 食衛誌, **58**, 32-35 (2017)