

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：82505

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2018～2021

課題番号：17K15886

研究課題名(和文) DNA解析を用いた混合試料に含まれる有毒植物の網羅的検出法の開発

研究課題名(英文) Identification of toxic plants from mixed samples by Next Generation Sequencing

研究代表者

吉川 ひとみ (Hitomi, Kikkawa)

科学警察研究所・法科学第三部・主任研究官

研究者番号：20392269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：有毒植物を山菜と誤認することによる中毒事故は毎年多く発生している。そこで山菜のオオバギボウシと、形態が類似している有毒植物(バイケイソウ及びイヌサフラン)をモデルとし、葉緑体上のtrnL領域及びrbcL領域を解析して混合された状態の有毒植物を検出する手法を開発した。バイケイソウまたはイヌサフランとオオバギボウシを混合した試料を解析したところ、rbcL領域のイヌサフラン以外全て検出された。調理残渣を解析したところ、全ての種、領域で混合に用いた種を確認することができた。模擬胃内容物では、全ての種で一度は確認された。混合物、調理残渣や胃内容物でも、中毒原因の植物種を特定できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有毒植物を山菜と誤認することによる中毒事故は毎年多く発生している。その際、食用山菜との混合物中から未知の有毒植物を検出すること、消化の影響を受けている場合でも原因の植物を同定すること等が求められる。本研究では、混合された状態からの有毒植物のDNAによる検出法を開発した。その結果、形態では判別できない混合物であっても、また調理残渣や模擬胃内容物でも、中毒原因の植物種を特定できると考えられた。本手法は植物種を問わず、汎用的に使用できることから、中毒事案の原因究明に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Some plants are toxic and show strong morphological similarities to edible plants. Therefore, poisoning is frequently caused by accidental ingestion of them by mistake. In this study, we developed a species identification method for mixed samples by next-generation sequencing (NGS). We developed and optimized a sequencing method of specific loci for plant species identification, known as DNA barcoding regions (trnL and rbcL). We analyzed mixed samples, cooked materials and simulated gastric contents. At first, mixed samples were assessed. All species were detected except rbcL region of one species. Next, cooked materials and simulated gastric contents were prepared and examined. All tested species could be detected at least one region. These results indicated that NGS utilizing DNA barcoding region are useful for forensic analysis of plant materials.

研究分野：分子生物学、法科学

キーワード：有毒植物 次世代シーケンス 食中毒 DNAバーコーディング 混合試料 DNA解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

野生の有毒植物を類似した形態の山菜と誤認して食することによる中毒事案は毎年起っている。これら中毒事案の際、原因究明は形態や機器分析による検査により行われている。しかし、咀嚼による破碎や調理等の加工によって形態学的な特徴が失われている場合も多く、また、何が入っているか全く情報がない試料に含まれる毒性成分を同定することが難しい場合もある。

近年、DNA を用いた植物種の同定方法として、種のレベルで保存されている領域の配列を決定する方法 (DNA バーコーディング) がめざましい進歩を遂げている。この領域の配列を利用することにより、未知の有毒植物であっても正確に種を同定することが期待できる。実際の中毒事案では、食用山菜との混合物中から未知の有毒植物を検出すること、調理や消化の影響を受けている場合でも原因の植物を同定すること等が求められる。しかし、これまでの研究では、混合物中にどれだけ有毒植物が含有されていれば検出できるのか不明であり、さらに、調理された状態や、胃内容物の試料を検出する方法について開発されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、食用山菜と混合された状態からの有毒植物を検出するために、葉緑体上の比較的短い2つの DNA バーコーディング領域 (rbcL、trnL) について、次世代シーケンサーを用いて、植物種汎用的に DNA 配列を解析できる手法を開発することにした。さらに開発した手法を用いて、模擬調理物、模擬胃内容物を詳細に解析し、中毒事案の試料に対して適応可能とすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料

山菜のオオバギボウシと、形態が類似しているため誤食の原因となる2種の有毒植物、すなわち発生件数が多いバイケイソウ及び死亡報告が多いイヌサフランをモデルとして使用した。バイケイソウ、イヌサフランおよびオオバギボウシは、大学の植物園より入手した。また、これらの模擬調理残渣 (茹でた試料) および模擬胃内容物も作製した。それぞれ試料から DNA を抽出した後、得られた DNA の濃度を測定した。

(2) 次世代シーケンサーによる DNA 解析法の構築及び解析

試料の DNA は、葉緑上の trnL、rbcL の一部領域の配列を、タグ配列を付加したプライマーにより1回目の PCR を行い増幅した。次に、サンプルごとのインデックスを1st PCR のタグ配列の外側に付加したのち、次世代シーケンサーにより配列解析した。PCR プライマー、PCR 条件など実験の条件はこの研究のために新たに開発し、予備検討を行い最適化した。

最初に、バイケイソウ、イヌサフラン及びオオバギボウシ単独の DNA を解析した。次に、バイケイソウまたはイヌサフラン DNA : オオバギボウシ DNA を 1 : 1、1 : 9、1 : 24 と混合したものをそれぞれ作製し、配列解析を行った。最後に、模擬調理残渣および模擬胃内容物についても、バイケイソウまたはイヌサフラン DNA : オオバギボウシ DNA を 1 : 1 で混合し、解析した。配列の解析は各試料2回ずつ行った。

得られた配列は、得られたリードをトリミングした後にリファレンス配列にマッピングすることにより評価した。

4. 研究成果

(1) 閾値の決定

最初に、一つの種のみを用いて NGS で配列解析を行い、ターゲット3種の配列に対しマッピングした。その結果、配列の前処理の条件を変更しても、他の種にマッピングされる配列が認められた。そこで、マッピングに供した配列数のうち、ある割合以上の配列がマッピングされた場合に当該種が検出できたと判断する、閾値を設定することにした。5%に設定した場合、双方の領域、全ての試料で当該種のみ検出できたことから、閾値は5%にするのが望ましいと考えられた。

(2) 混合試料の検出

次に、バイケイソウまたはイヌサフラン DNA : オオバギボウシ DNA を 1 : 1、1 : 9、1 : 24 と混合したものを解析した。バイケイソウまたはイヌサフランとオオバギボウシを混合した試料を解析したところ、1 : 1 で混合した試料については、trnL 領域では全ての試料で混合した種の DNA 配列が検出されたが、rbcL 領域ではイヌサフランが検出できなかった。

今回の手法の検出限界は、50 pg であった。これまでに研究代表者が発表した real-time PCR 法や loop-mediated isothermal amplification 法によるバイケイソウの検出では、検出限界はそれぞれ

1 pg、80 pg であったことから、これまでの手法と同等以上の感度であると考えられ、本法は実試料への応用が可能な感度をもつと考えられる。ただし、ターゲット特異的な検出法では 25 倍量の食用山菜の DNA が含まれた場合でもバイケイソウの DNA を検出することが可能であったが、本手法では 9 倍量多く含まれていた場合でも検出が難しく、他の夾雑 DNA が多く含まれている場合には注意を要すると考えられた。

(3) 調理残渣及び模擬胃内容物の解析

最後に、実際の中毒事案を想定した試料、すなわち調理残渣及び模擬胃内容物を解析した。その結果、trnL 領域は、全ての条件で混合に用いた種が確認され、trnL 領域より長い rbcL 領域は、胃内容物のバイケイソウを除いて混合に用いた種が確認された。よって、調理残渣、胃内容物でも、混合物中の有毒植物の同定が可能であることが示された。また、trnL 領域が検出に用いる領域としてより安定して使用できると考えられた。

(4) 結語

本研究では、種を問わず汎用的に有毒植物を同定できる手法を開発した。また、混合物や調理残渣、模擬胃内容物であっても問題なく検出を行うことが可能であることから、中毒事案の試料の解析に対して有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kikkawa Hitomi S., Aragane Masako, Tsuge Kouichiro	4. 巻 online first
2. 論文標題 Species identification of white false hellebore (<i>Veratrum album</i> subsp. <i>oxysepalum</i>) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 pp. 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11419-018-00461-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 吉川 ひとみ	4. 巻 12
2. 論文標題 科学警察研究所における植物資料に対するDNA鑑定の取り組み	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA鑑定	6. 最初と最後の頁 3-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉川ひとみ、柘 浩一郎	4. 巻 30
2. 論文標題 次世代シーケンサーによるによる食用山菜との混合物中の有毒植物の検出手法の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川 ひとみ
2. 発表標題 科学警察研究所における植物資料のDNAを用いた鑑定の取り組み
3. 学会等名 DNA鑑定学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川ひとみ 荒金眞佐子
2. 発表標題 バイケイソウのLAMP法による識別法の改良
3. 学会等名 日本法医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川ひとみ 柘 浩一郎
2. 発表標題 次世代シーケンサーによるによる食用山菜との混合物中の有毒植物の検出手法の開発
3. 学会等名 DNA多型学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------