調査・資料

PCR法によるクワズイモの同定

(平成28年7月20日受理)

萩野 賀世^{1,*} 中野 久子¹ 清水 本武¹ 寺井 朗子¹
大貝 真実¹ 荒金 眞佐子¹ 阿部 朋弘² 笹本 剛生¹

Identification of *Alocasia odora* (Kuwazuimo in Japanese) Using PCR Method

Kayo HAGINO^{1,*}, Hisako NAKANO¹, Motomu SHIMIZU¹, Akiko TERAJ¹,
Mami OGAI¹, Masako ARAGANE¹, Tomohiro ABE² and Takeo SASAMOTO¹

¹ Tokyo Metropolitan Institute of Public Health: 3-24-1 Hyakunin-cho,
Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan;

² Health and Safety Division, Bureau of Social Welfare and Public Health, Tokyo
Metropolitan Government: 2-8-1 Nishi-Shinjuku,
Shinjuku-ku, Tokyo 163-8001, Japan;

*Corresponding author

Kuwazuimo (*Alocasia odora*) and shimakuwazuimo (*Alocasia cucullata*) are evergreen perennial plants that originated in East Asia. Although inedible, they are occasionally eaten by mistake because they resemble satoimo (*Colocasia esculenta*), and this has caused food poisoning in Japan. It is not easy to determine the cause of a food poisoning outbreak from the shape or chemical composition when the available sample is small. Therefore, we developed a new primer pair for PCR to identify kuwazuimo and shimakuwazuimo in small samples, based on the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA. Using PCR with the developed primer pair, we detected all samples of kuwazuimo obtained from the market, while excluding 17 other kinds of crops. The samples were identified as shimakuwazuimo by DNA sequencing of the PCR products. The present PCR method showed high specificity and was confirmed to be applicable to the identification of kuwazuimo and shimakuwazuimo from various crops.

(Received July 20, 2016)

Key words: 食中毒 food poisoning; クワズイモ *Alocasia odora*; シマクワズイモ *Alocasia cucullata*; PCR法 PCR method; プライマー primer; 同定 identification; リボソーム DNA ribosomal DNA; ITS領域 internal transcribed spacer region

緒 言

クワズイモ (*Alocasia odora*) は東アジア原産のサトイモ科クワズイモ属の常緑性多年草で、食用であるサトイモ (*Colocasia esculenta*) に外観が類似しており (Fig. 1), 誤認による摂食のため、食中毒を引き起こすことが報告されている^{1)~3)}。クワズイモ属は、20℃以上の高温を好み、多くは温室観葉植物として栽培されている。植物組織中に水に難溶性のシュウ酸カルシウム (CaC₂O₄) を含有し、誤って摂食すると、針状結晶による物理的な刺激により、唇のしびれ、口腔内のはれ、胃痛を起こすことが知られている^{2),3)}。日本では、クワズイモは四国南部、九州南部以

南に、シマクワズイモ (*Alocasia cucullata*) は琉球列島、小笠原諸島に、ヤエヤマクワズイモ (*Alocasia atropurpurea*) は西表島に自生しており⁴⁾、このうちクワズイモおよびシマクワズイモの耐寒性は比較的高い⁵⁾。

クワズイモの摂食が原因と疑われる食中毒が発生した場合、原因特定のため、クワズイモの同定が必要である。摂食した食品の残量が十分ある場合は、茎、根等の形態の比較、顕微鏡によるシュウ酸カルシウムの針状結晶の確認が可能であるが、残量が少ない場合や、調理加工品の場合は、これらの方法による同定が困難なことがある。一方、PCR等の分子生物学的手法が遺伝子組換え食品の検査等で用いられている。近年では、リボソームDNAのinternal transcribed spacer (ITS) 領域における塩基配列が近縁種間でも異なることを利用したPCR法が開発され、植物の鑑別に利用されている^{6),7)}。また植物だけでなく、キノコ類の鑑別に用いた報告もある⁸⁾。そこで、クワズイモ

* 連絡先 Kayo_Hagino@member.metro.tokyo.jp

¹ 東京都健康安全研究センター：〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

² 東京都福祉保健局健康安全部：〒163-8001 東京都新宿区西新宿2-8-1

Fig. 1. Photographs of the leaves of (A) *Alocasia odora* (kuwazuimo) and (B) *Colocasia esculenta* (satoimo)

の摂食が食中毒の原因と疑われる際に、食品残量が少ない試料でも、クワズイモであることを同定する目的でPCR法の検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

クワズイモは2013年1月から2016年1月にかけて、東京都薬用植物園から入手した1試料、東京都内および埼玉県内の小売店にて購入した鉢植え4試料を用いた。

PCR法の特異性を確認するため、サトイモ、ナス、ジャガイモ、ダイコン、コマツナ、ホウレンソウ、ニンジン、ゴボウ、タマネギ、ネギ、コメ、トウモロコシ、カボチャ、サツマイモ、ナガイモ、キクイモ、シイタケから抽出したDNAを用いて検討を行った。これらは農林水産省統計^{*1}を参考に出荷量の比較的多いもの、また名称の一部にイモが含まれる農作物から17種類を選び東京都内および埼玉県内の小売店で購入した。

加熱処理実験には、クワズイモの根茎の皮をむき、1.8 cm立方（約8 g）に切ったものを用いた。

2. 装置

高速冷却遠心機: Avanti[®] J-E (BECKMAN COULTER社製)、微量高速冷却遠心機: CF15RN (日立工機社製)、分光光度計: NanoDrop 2000c (サーモフィッシュサイエンス社製)、サーマルサイクラー: GeneAmp[®] PCR System 9700 (Life Technologies社製)、電気泳動装置: Mupid[®]-2plus (アドバンス社製)、ゲル撮影装置: プリントグラフ AE-6933FXES (アトー社製)、DNAシークエンサー: Applied Biosystems[®] 3130xl ジェネティックアナライザー (Life Technologies社製)、超純水製造装置: Milli-Q integral 5 system (メルク社製)を使用した。

3. プライマー

クワズイモおよびシマクワズイモを検出するためのプライマーを作製した。National Center for Biotechnology Information (NCBI) のGenBankに登録されているクワズイモ、シマクワズイモのDNAの塩基配列 (Acc. no.: AB429315, Acc. no.: AB429340) および両者と同じサトイモ科であるサトイモのDNAの塩基配列 (Acc. no.:

AY081000) を比較し、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: 5'-CTCTCTCCCGTC CCTCG-3' および KUWAZU-Ra: 5'-CGG GAGTCG TTCAGACTCG-3' 以下、クワズイモ検出用プライマー対) を作製した。このプライマー対を使用してPCRを行った場合、想定する増幅長はクワズイモでは219 bp、シマクワズイモでは215 bpである。作製したプライマー対の特異性をNCBI Blast検索にて、確認した。

また、各種農作物からのDNA抽出が確実にされているかを確認するために真核生物検出用プライマー対 (TR03: 5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3' および TR04: 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3') をPCRに用いた⁹⁾。プライマー合成はSIGMA-ALDRICH社に依頼した。

4. DNAの抽出

試料を約2 mm立方に細切し、DNA抽出にDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製) を用いる場合は0.1 g、または、DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN社製) の場合は1 gを採取しDNA抽出を行った。DNA抽出はキット付属の使用方法に従った。調製したDNA溶液は分光光度計で波長260 nmの吸光度を測定し、濃度を算出後に実験に供した。

5. PCR

PCRに供する溶液は、10×PCR緩衝液 (タカラバイオ社製) 2.5 μL, dNTPs (タカラバイオ社製, 2.5 mmol/L) 2 μL, EX Taq Hot Start Version (タカラバイオ社製) 0.2 μL, 6 μmol/Lのフォワードプライマーとリバースプライマー各2.5 μL、および、5 ng/μLに調製したDNA溶液を2.5 μL加えた後、脱イオン蒸留水 (ニッポンジーン社製、遺伝子工学研究用) で25 μLになるように調製した。PCRは、98℃ 10秒間、60℃ 30秒間、72℃ 60秒間を1サイクルとして30サイクルで行った。

6. 電気泳動

PCR産物は、エチジウムブロマイドを0.5 μg/mLの濃度になるように添加した2.5% アガロースゲルおよび1×TAE緩衝液を用いて電気泳動し、紫外線照射 (312 nm) によりバンドの有無を確認した。

7. 加熱処理

購入したクワズイモの根茎 (1.8 cm立方, 約8 g) を超純水10 mLに浸し水煮 (100℃ 15分間および30分間) を行った。超純水は超純水製造装置 (メルク社製, 電気抵抗率17 MΩ・cm以上) で製造したものを使用した。加熱後の試料からDNA抽出を行い、PCRを行った。

8. DNA塩基配列解析

PCR後の溶液から、余剰のプライマーおよびdNTPsをExoSAP-IT (Affymetrix社製) を用いて除去後、PCR産物をBig Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies社製) を用いて蛍光ラベル化した。未反応の試薬を除去するため、エタノール沈殿を行った。その

*1 農林水産省 農林水産統計 http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/index.html

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplification products obtained using the primer pair, KUWAZU-Fb and KUWAZU-Ra

DNA was extracted from kuwazuimo for PCR. Lane 1: 100 bp ladder marker; Lanes 2-6: kuwazuimo 1-5; and Lane 7: negative control (no template DNA).

後、脱イオン化ホルムアミド（Life Technologies社製）を加え95℃3分間変性した後、DNAシーケンサーにより塩基配列の解析を行った^{*2}。得られた塩基配列情報はNucleotide BLASTで検索し、種を判定した。

結果および考察

1. PCR法による特異性の確認

新規に作製したクワズイモ検出用プライマー対（KUWAZU-Fb/KUWAZU-Ra）を用いて、入手したクワズイモ5試料から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、クワズイモ検出用プライマー対を用いたPCRでは、鋳型にクワズイモから抽出したDNAを用いた場合に想定される増幅長のバンドを検出した（Fig. 2）。

PCR法の特異性を確認するため、サトイモ、ナス、ジャガイモ、ダイコン、コマツナ、ホウレンソウ、ニンジン、ゴボウ、タマネギ、ネギ、コメ、トウモロコシ、カボチャ、サツマイモ、ナガイモ、キクイモ、シイタケから抽出したDNAを鋳型として、クワズイモ検出用プライマー対を用いてPCRを行った。その結果、17種類の農作物について、バンドは検出されなかった（Fig. 3A）。またこれらの農作物からDNAが抽出されていることを確認するため、抽出したDNAを鋳型として、真核生物共通DNA配列を検出するプライマー対（TR03,TR04）を用いてPCRを行った。その結果、想定される増幅長（137 bp）のバンドが検出された（Fig. 3B）。以上の結果から、クワズイモ

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplification products for various crops using the primer pairs (A) KUWAZU-Fb and KUWAZU-Ra and (B) TR03 and TR04

DNA was extracted from various crops for PCR.

(A) Lane 1: 100 bp ladder marker; Lane 2: eggplant; Lane 3: potato; Lane 4: Japanese radish; Lane 5: komatsuna; Lane 6: spinach; Lane 7: carrot; Lane 8: burdock; Lane 9: onion; Lane 10: Welsh onion; Lane 11: rice; Lane 12: corn; Lane 13: pumpkin; Lane 14: sweet potato; Lane 15: Chinese yam; Lane 16: Jerusalem artichoke; Lane 17: satoimo; Lane 18: shiitake; Lane 19: kuwazuimo; and Lane 20: negative control (no template DNA). (B) Lanes 1-18 are the same as those of (A). Lane 19: negative control (no template DNA).

検出用プライマー対を用いたPCR法の特異性が確認された。

2. 加熱処理によるPCRへの影響

食中毒が疑われた場合、原因を特定するために分析する試料は、惣菜や煮物等調理された食品である場合が多い。そこで、加熱したクワズイモから抽出したDNAを用いてPCRによる検出が可能であるか検討した。クワズイモの根茎を水煮（100℃ 15分間および30分間）した後、DNA抽出およびクワズイモ検出用プライマー対を用いてPCRを行った。その結果、加熱したクワズイモからのDNA抽出およびPCRによる検出が可能であることが電気泳動により確認できた（Fig. 4）。本法は、クワズイモの摂食が原因と疑われる食中毒が発生した場合の同定法として、形態鑑別やシュウ酸カルシウムの検出が難しい微量の試料についても、適用が可能であり、加熱調理の影響を受けにくく

^{*2} 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知、輸入魚類加工品のフグ種鑑別検査法について、食安輪発0906第1号、平成23年9月6日。

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplification products of untreated and boiled kuwazuimo using the primer pair KUWAZU-Fb and KUWAZU-Ra

DNA was extracted from untreated and boiled kuwazuimo for PCR.

Lane 1: 100 bp ladder marker; Lane 2: untreated kuwazuimo; Lane 3: kuwazuimo boiled for 15 min; Lane 4: kuwazuimo boiled for 30 min; and lane 5: negative control (no template DNA).

いことが明らかになった。

3. DNA塩基配列解析

DNAシーケンサーを用いて、クワズイモ5試料から得たPCR産物の塩基配列を解析した。その結果、薬用植物園のクワズイモNo. 1 (Fig. 2, lane 2) のPCR産物はNCBIのDNA塩基配列データベースに登録されているクワズイモが持つ標的塩基配列 (Acc. no.: AB429315) に一致した。一方、クワズイモとして購入した試料No. 2-5 (Fig. 2, lane 3-6) のPCR産物の塩基配列はクワズイモではなく、シマクワズイモが持つ標的塩基配列 (Acc.no.: AB429340) と一致した。なお、クワズイモとシマクワズイモの塩基配列の相同性は高く、PCR産物 (219 bp) 中の違いは4塩基のみである。シマクワズイモは、クワズイモより耐寒性が低い⁵⁾、小型であるため、観葉植物としてクワズイモと称し流通している可能性が高い。クワズイモ検出用プライマー対を用いることにより、食中毒の原因となるクワズイモおよびシマクワズイモを検出することが可能であった。

ま と め

クワズイモを同定するためのPCR法を検討した。今回、新規に作製したクワズイモ検出用プライマー対を用いたPCR法の特異性は高く、クワズイモおよびシマクワズイモの同定が可能であった。また、加熱試料に適用可能であることも確認されたことから、クワズイモの誤食が疑われる食中毒の原因特定において、特に少量かつ調理等された試料への適用が期待できる。

文 献

- 1) Toda, M., *et al.* Trends of plant toxin food poisonings during the past 50 years in Japan. *Shokuhin Eiseigaku Zassi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **55**, 55-63 (2014).
- 2) Shimoi, T., *et al.* Outbreaks of poisoning by chemical and naturally occurring toxicants in Tokyo, 2013. Tokyo-to Kenko Anzen Kenkyu Senta Kenkyu Nenpo (Annual Report of Tokyo Metropolitan Institute of Public Health), **65**, 167-172 (2014).
- 3) Kimura, K., *et al.* Outbreaks of poisoning due to chemicals and naturally occurring toxicants in Tokyo during 2014. Tokyo-to Kenko Anzen Kenkyu Senta Kenkyu Nenpo (Annual Report of Tokyo Metropolitan Institute of Public Health), **66**, 165-170 (2015).
- 4) 日本の野生植物草本第1巻単子葉類. 佐竹義輔, 他編. 東京, 平凡社, 1982, 137p. (ISBN 4-582-53500-6)
- 5) 堀田 満, 他. 世界有用植物辞典 (オンデマンド版). 堀田 満, 他編. 東京, 平凡社, 2002, 70p. (ISBN 4-582-91059-9)
- 6) Linder, C. R., *et al.* A universal molecular method for identifying underground plant parts to species. *Molecular Ecology*, **9**, 1549-1559 (2000).
- 7) 丸山卓郎, 他. 遺伝子解析技術を用いた薬用植物基原種の鑑別. *特産種苗*, **16**, 70-76 (2013).
- 8) Masayama, A., *et al.* Discrimination of mashrooms causing food-poisoning incidents by using DNA sequence analysis. *Shokuhin Eiseigaku Zassi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **53**, 237-242 (2012).
- 9) Matsuoka, T., *et al.* A detection method for recombinant DNA from genetically modified maize CBH351. *Shokuhin Eiseigaku Zassi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **42**, 197-201 (2001).