

氏 名	松 山 修 二
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 (論) 第 3 8 6 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 4 年 9 月 1 2 日
学 位 論 文 題 目	Genus identification of toxic plant by real-time PCR (リアルタイム PCR 法による有毒植物の属同定)
審 査 委 員	主 査 教 授 前 川 聡 副 査 教 授 田 中 俊 宏 副 査 教 授 岡 部 英 俊

## 論文内容要旨

*整理番号	390	(ふりがな) 氏名	松山 修三
学位論文題目	Genus identification of toxic plant by real-time PCR (リアルタイム PCR 法による有毒植物の属同定)		
<p>【研究の目的】</p> <p>例年、有毒植物の誤食による食中毒が発生している。特に食用のものと形態が類似しているトリカブト及びシキミあるいはハシリドコロなどは強い毒性を持ち、身近な問題となっている。さらに、強い毒性を持つトウゴマやトリカブトは、自殺や殺人に使用されるとの報告もある。これまで、有毒植物の同定方法は、伝統的な植物の形態学による識別や成分分析による方法が行われてきたが、従来の方法は、微量のサンプルからの同定が難しく、手技が難しい等の問題点を抱えている。本研究は、リアルタイム PCR 法による簡便で迅速な有毒植物の同定方法の開発を目的とした。</p> <p>【方法】</p> <p>本研究の標的植物は、トリカブト亜属、シキミ属、トウゴマ属、ハシリドコロ属とした。標的植物のシーケンスを行い、アメリカ国立図書館(NCBI)のシーケンスデータとの比較することで、標的植物の亜属または属に特異的なプライマーを設計した。各プライマーの特異性を検討するため、標的植物と近縁の植物及び各種食用植物から抽出した DNA またはヒト DNA を鋳型として、増幅の有無をアガロースゲルの電気泳動により確認した。また、リアルタイム PCR 法による各プライマーの特異性と検出感度の検討を行った。さらに、法医学分野での応用を想定し、粉砕した標的植物を人工胃液により 37℃で 4 時間処理し、リアルタイム PCR 法により検出可能かどうか検討した。</p> <p>【結果】</p> <p>各プライマーは、亜属または属の標的植物を増幅したが、標的植物と近縁の植物、各種食用植物及びヒト DNA の増幅を認めず、亜属、または属特異性が示された。また、リアルタイム PCR 法でも各標的植物は特異的に検出でき、その検出感度は、トリカブト亜属、トウゴマ属及びハシリドコロ属が、10 pg まで、シキミ属が 1 pg まで検出可能であった。法医学的模擬試料の検討では、標的植物の DNA は消化により分解されていたが、各プライマーセットを用いたリアルタイム PCR 法により増幅が確認された。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

## 【考察】

法医学分野において植物の同定は、頻繁に利用される検査方法ではないが、中毒の原因となる植物を同定する場合には不可欠である。現在の DNA による植物同定方法には、ユニバーサルプライマーを用いて規定のマルチローカスをシークエンスし、既知のデータベース配列と比較する DNA バーコード法が注目されている。ただし、この DNA バーコード法は、単一の植物を同定できても、様々な植物が混じった胃内容物を試料とした法医学の検査には不向きである。そのため有毒植物を特異的に検出する新しい方法が必要となる。本研究は属レベルの系統分類に一般的に使用される内部転写スペーサー領域(ITS)をプライマーのターゲットとし、亜属または属に特異的な検出を可能とした。

種の同定が困難な植物として知られているトリカブト亜属は約 300 種から成り、亜属レベルの同定は植物の識別に効果的であると考えられる。一方でトウゴマ属は1つの種から成るため、種レベルの同定を必要としない。シキミ属には毒性を持つ *Illicium anisatum* と、香辛料等で使用される毒性を持たない *Illicium verum* が存在している。本検査方法は属同定であるため、毒性の有無の判別はつかないが、シキミ属のスクリーニング法として有効である。シキミ属と同定された場合は、既に報告されている制限酵素断片長多型を利用した *I. anisatum* と *I. verum* の識別法を本法に引き続き使用することで種の同定可能である。また、ハシリドコロ属は 12 種から成り、本研究で検討に用いた種は日本に自生している *Scopolia japonica* の 1 種のみである。NCBI のデータベースによると、*S. japonica* は他のハシリドコロ属と比較して ITS 領域に違いがあり、葉緑体の DNA においても異なった系統樹となることが報告されている。そのため本研究のハシリドコロ属のプライマーセットは *S. japonica* を特異的に検出できる可能性が考えられ、今後検討する予定である。

本研究では日本に自生するなど 4 種類の有毒植物の同定について検討を行ったが、今後はさらに全世界に分布する有毒植物について新たなプライマーを検討していく必要がある。また、ダイレクト PCR 法の導入による検査時間の短縮や内部標準物質を用いた混合試料からの正確な定量法の確立といった検討課題が考えられた。

## 【結論】

本研究で設計された各プライマーは、トリカブト、シキミ、トウゴマ、ハシリドコロの有毒植物を亜属または属特異的にリアルタイム PCR 法により高感度に検出した。人工胃液で消化された微量な植物からも検出可能であり、実際の法医学の検査においても有用性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	390	氏名	松山修二
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>食用と形態が類似しているトリカブト、シキミ、ハシリドコロなどの有毒植物は強い毒性を持ち、誤食による食中毒が発生している。さらに、トウゴマやトリカブトは自殺や殺人に使用されることがある。これまでの有毒植物の同定は、植物の形態学による識別や成分分析による方法で、微量のサンプルからの同定が難しく、また手技が煩雑などの問題点を抱えている。</p> <p>そこで、本研究は、リアルタイムPCR法を用いた高感度で簡便な有毒植物の同定方法の確立について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 有毒植物であるトリカブト、シキミ、トウゴマ、ハシリドコロのITS領域に対する特異的なプライマーを用いて、リアルタイムPCR法による高感度な有毒植物の同定が可能であった。</li> <li>2. 上記のプライマーを用いた場合、近縁植物やヒトDNAでは増幅産物を認めず、対象の有毒植物を特異的に増幅した。</li> <li>3. 法医学学分野での応用を想定し、人工胃液により分解した微量な有毒植物のDNAからも検出可能であった。</li> </ol> <p>本論文は、種々の有毒植物に対して特異的なプライマーを設計し、リアルタイムPCR法を用いた高感度で簡便な同定方法を開発したものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 540字)</p> <p style="text-align: right;">(平成24年9月6日)</p>			