

資料

コルヒチンによる食中毒事例について

A Study of the Food Poisoning Case by Colchicine

茶屋真弓¹ 原田卓也 山下清佳
前原香純 二石大介² 下島浩幸

1 はじめに

グロリオサは、燃える炎のような形をした赤や黄色などの花色を持つイヌサフラン科グロリオサ属の園芸植物で、最近では生花として利用されることも多く、園芸店でも塊茎部が販売されている(図1)。グロリオサは全草に有毒アルカロイドのコルヒチン含有しているが、全量の約94%は塊茎部分に存在し¹⁾、塊茎部分はヤマイモに似ている。2006年及び2007年に誤食による食中毒事例が報告^{1),2)}されており、いずれも患者は死亡している。

本県でも2020年2月にグロリオサを誤食したと考えられる患者1名が死亡したコルヒチンによる食中毒事例が発生し、原因究明のために、当センターにコルヒチン検査の依頼があった。

今回、LC-MS/MSによる植物性自然毒の迅速一斉分析法について既に報告した分析法³⁾(以下「既報」という。)を用いてコルヒチン濃度の測定を実施したので、その結果を報告する。

さらに、生体試料の検査について、植物性自然毒12種の妥当性評価結果等も実施したので併せて報告する。



図1 グロリオサの花と塊茎

2 経緯

2.1 食中毒の概要

患者は、2020年2月、自宅で観賞用として栽培したグロリオサの塊茎部(推定)を家庭菜園で栽培したヤマイモと誤認し喫食した。喫食後約3時間で腹痛、嘔吐、下痢等の症状を呈し、3日後に多臓器不全により死亡した。

2.2 保健所の調査結果概要

保健所が食中毒の情報を探知した時には既に患者は死亡していたが、患者家族の証言より、患者はヤマイモだと誤認したものをすり下ろして食べていたことがわかった。この残品は残っていなかった。

患者は、家庭菜園で様々な野菜とともに観賞用の植物も栽培していた。

残品がなかったため、参考に患者自宅で鉢植えされていたグロリオサの塊茎を当センターに搬入した。

3 方法

3.1 試料

- ・健常者の尿
- ・健常者の血清：健常者から血液を採取し、30分静置後遠心分離(3000rpm, 10分, 4℃)した上清
- ・食中毒患者の検体：尿及び血清
- ・グロリオサの塊茎部

1 大隅地域振興局保健福祉環境部
2 退職(2020年3月)

3. 2 分析対象化合物及び標準品 (全12物質)

- ①アコニチン (ACO)
- ②ジェサコニチン (JSC)
- ③メサコニチン (MSC)
- ④ヒパコニチン (HPC)
- ⑤ベラトラミン (VTM) : ベラトラミン (PhytoLab)
- ⑥プロトベラトラミン (PVTA)
: プロトベラトラミン (PhytoLab)
- ⑦アトロピン (ATPN)
: 硫酸アトロピン(和光純薬工業(株))
- ⑧スコポラミン (SCP)
: スコポラミン臭化水素 (Sigma-Aldrich)
- ⑨リコリン (LYC) : リコリン塩酸塩 (Sigma-Aldrich)
- ⑩ガランタミン (GLM) : ガランタミン (ChromaDex)
- ⑪コルヒチン (CHN) : コルヒチン (Sigma-Aldrich)
- ⑫デメコルシン (DCN)
: デメコルシン(和光純薬工業(株))

ブンジエステル
アルカロイド混合標準物質
(和光純薬工業(株))

溶液とした。

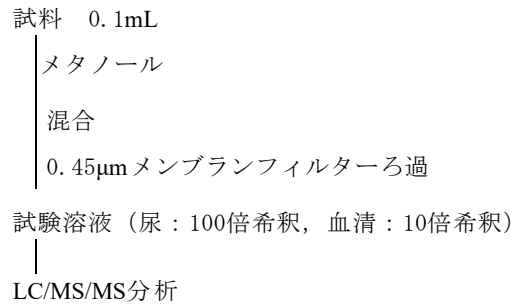


図2 試験フロー

3. 3 装置及びLC/MS/MS測定条件

装置は既報のとおり。測定条件は表1に示すとおり。

表1 LC/MS/MSの測定条件

LC条件 (株)島津製作所製Prominenceシリーズ	
分析カラム	: Imtakt社製 Scherzo SM-C18 (内径2.0mm, 長さ150mm, 粒径3µm)
流 速	: 0.2mL/min
注 入 量	: 5µL
カラム温度	: 40°C
移 動 相	: A) 10mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 : B) メタノール
グラジェント条件	: 1% (0min) →1% (2min) →99% (8min) (B%) →99% (20min) →1% (25min) →1% (30min)
MS/MS条件 AB sciex社製4000QTRAP	
イオン化法	: エレクトロスプレーイオン化 (ESI・positive)
イオンスプレー電圧	: 5.5kV
イオンソース温度	: 400°C
測定モード	: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

3. 4 試験溶液の調製

図2のとおり操作した。尿については、既報では試料1.0mLをメタノールで希釈し遠心分離したが、今回は、試料0.1mLをメタノールで10mLに定容し、0.45µmメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

血清については、試料0.1mLをメタノールで1.0mLに定容し0.45µmメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

グロリオサの塊茎は、既報のとおりメタノールで抽出後、遠心分離したものを1000倍となるよう希釈し、試験

3. 5 血清試料のマトリックス効果の検証

既報で実施した尿の添加回収試験においては、100ng/mLの低濃度で真度が120%を超過するマトリックス効果が複数の化合物で見られたことから、血清についても各自然毒をブランク試料で100ng/mLに調製したマトリックス混合標準液と、メタノール溶媒混合標準液の100ng/mLとのピーク面積の比を算出し、マトリックス効果を検証した。

3. 6 妥当性評価

尿については0.1µg/mL、血清については0.01µg/mLとなるように混合標準液を添加した。添加後は、遠心分離を行わない図2の試験フローの操作手順と、既報のとおりメタノール希釈後に、遠心分離 (3000rpm, 5分) を行う操作手順により抽出を行った。

n=5で併行試験を実施し、選択性、定量限界、真度と併行精度を評価した。評価目標値については、選択性はブランク試料から定量するピークに妨害がないこと、定量限界は当該標準液のピークがS/N比≥10であること、真度は70~120%、併行精度は10%未満とした。

3. 7 生体試料の凍結及び前処理による濃度変化

食中毒患者の尿及び血清を-30°Cで6週間保管し、コルヒチン濃度の変化を調査した。また、食中毒患者の尿を既報のとおりメタノールで希釈後に遠心分離したものと、図2のとおり遠心分離しない方法とを比較した。

4 結果及び考察

4. 1 食中毒事例のコルヒチンの検査結果

患者自宅に鉢植えされていたグロリオサの塊茎 (2検体) については、既報のとおり調製し、患者の尿及び血清については、3日間冷蔵保管されていたものを図2のとおり調製した。

検査した結果は表2のとおり。

尿と血清からコルヒチンが検出されたので、死因はコルヒチン中毒によるものと断定された。

ヒトのコルヒチンの最小致死量は体重50kgの場合約4.3mg^dとされ、今回分析した塊茎は、わずか3gで最小致死量を超過することになる。

表2 検体のコルヒチン濃度

検体種類	濃度
尿	970 ng/mL
血清	8.6 ng/mL
グロリオサの塊茎①	1.6 g/kg
グロリオサの塊茎②	2.2 g/kg

4. 2 生体試料の検査結果

既報では、尿について添加回収試験は実施していたが、血清については検証していなかったため、尿も含めて再度検証した。

4. 2. 1 血清試料のマトリックス効果

図2に従って調製した血清のブランク試料で調製したマトリックス標準液は、PVTA以外は正のマトリックス効果を受けた(表3)。

4. 2. 2 検量線の直線性

尿及び血清のブランク試料で希釈したマトリックス混合標準液を0.5~100ng/mLの範囲(7点)で調製し、検量線を作成したところ、いずれも良好な直線性(相関係

数0.999以上)が得られた。

4. 2. 3 妥当性評価結果

(1) 定量限界

検量線の最低濃度である0.5ng/mLの標準液のピークがS/N比 ≥ 10 であることを確認し、定量限界値を、尿中濃度で0.05 μ g/mL、血清中濃度で0.005 μ g/mLとした。

(2) 選択性

ブランク試料について定量を妨害するピークの有無を確認したところ、各ブランク試料からは妨害ピークは検出されなかった。

(3) 真度、併行精度及び前処理方法の比較

尿及び血清中の添加回収試験を実施し比較した。また、併せて遠心分離の有無について比較した。(表4、図3)。

尿では、いずれの前処理方法においても、真度は73.6~98.6%で良好な結果であり、大きな差はなかったが、併行精度では遠心分離有の方が全項目で10%未満ではあったものの、10%近い結果となる分析対象化合物もあった。

血清においても、真度については尿と同様に遠心分離の有無で大きな差はなく、73.3~98.7%で良好な結果となった。併行精度についても10%未満であったが、遠心分離有の方がばらつきが大きい分析対象化合物とその逆でばらつきが小さい分析対象化合物があった。

表3 血清試料のマトリックス結果

(単位: %)

ACO	JSC	MSC	HPC	VTM	PVTA	ATPN	SCP	LYC	GLM	CHN	DCN
107.9	110.2	119.0	119.5	157.3	65.8	145.0	114.6	132.1	107.1	105.0	104.3

表4 尿及び血清中の添加回収試験結果

		尿				血清			
		遠心分離(有)		遠心分離(無)		遠心分離(有)		遠心分離(無)	
		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
1	ACO	95.2	4.2	98.6	5.1	93.0	8.9	96.5	6.6
2	JSC	82.8	4.3	93.2	5.6	98.6	5.1	83.3	5.1
3	MSC	87.1	3.8	87.1	3.8	98.7	3.8	95.1	3.1
4	HPC	77.6	4.8	77.6	4.8	84.8	2.7	81.8	2.1
5	VTM	84.0	4.2	95.0	2.7	97.0	3.6	91.8	3.8
6	PVTA	87.1	9.5	83.5	2.1	90.0	9.6	90.9	7.1
7	ATPN	82.3	4.5	89.7	3.9	86.9	4.9	85.4	1.8
8	SCP	73.6	7.3	85.1	4.3	84.4	4.8	73.3	7.6
9	LYC	86.4	7.1	93.6	4.7	89.5	3.0	85.0	4.6
10	GLM	89.5	9.1	90.5	4.0	84.0	4.2	86.1	2.9
11	CHN	86.9	9.5	88.1	5.0	98.0	7.0	98.6	9.0
12	DCN	80.1	6.7	84.9	2.4	90.2	7.9	88.9	7.7

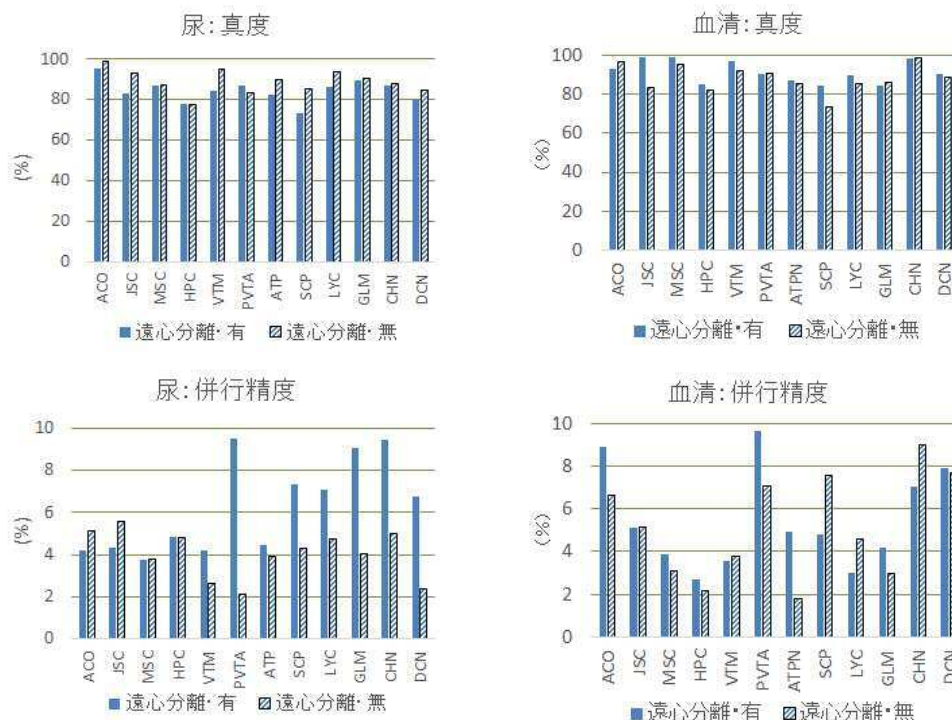


図3 尿及び血清中の添加回収試験結果

4. 2. 4 生体試料の凍結及び前処理による濃度変化

6週間凍結した患者の生体試料を解凍後にコルヒチンを再定量したところ、定量値は表5のとおりであった。

尿の遠心分離有で凍結後に増加していたが、これは4.2.3の結果から、尿の試料が遠心分離することではばつきが大きくなる傾向があったことに原因があると推測された。遠心分離無の場合、尿及び血清中のコルヒチン濃度は、凍結保管することで若干の濃度減少は見られたが、6週間程度では、濃度への大きな影響はないと考えられた。

また、コルヒチンは尿の添加回収試験の結果では遠心分離の有無による真度に大きな差はなかったが、実際の患者尿を定量した検査結果では遠心分離無の方が遠心分離有より定量値が高くなった(表5)。

尿のブランク試料を用いた添加回収試験と実際の生体試料で異なる結果となったことは、コルヒチンが生体内では細胞内の微小管と選択的に結合する³⁾ため、コルヒチンが生体内でタンパク質と結合し尿中に排泄されたことで遠心分離時にタンパク質と共沈し、除去されたことが原因であると推測された。

今回、実際の患者血清を使用した遠心分離の有無については比較していないが、尿中と同様にタンパク質との共沈が推測されるため、尿及び血清の前処理には遠心分離を行わないこととした。

表5 患者生体試料中のコルヒチン濃度

	遠心分離の有無	①凍結前 (ng/mL)	②凍結後 (ng/mL)	②/①×100 (%)
尿	有	717	816	113.8
	無	970	901	92.9
血清	無	8.6	8.2	95.3

5 まとめ

今回の食中毒事例は、家庭菜園で野菜と観賞植物と一緒に植えることの危険性を再認識した事例であった。

検査については、検体受領後速やかに検査を実施し、検査開始当日には概算ではあったが定量値を速報として報告することができた。

今回、貴重な生体試料が確保できたため、様々なことについて検証でき、今後の食中毒原因追及のために非常に役立つ知見を集めることができた。

自然毒の場合は、患者が急変し生死に関わることも多いため、迅速に原因物質を特定することが重要であることから、今後も引き続き緊急時の検査体制整備に努めていく。

参考文献

1) 宅間範雄, 荒尾真砂, 他 ; グロリオサによる食中毒事

- 例-LC/MS/MSによるコルヒチンの分析-，高知県衛生研究所報告，**54**，41～45（2008）
- 2）国立保健医療科学院H-CRISISデータベース；
No. 1423 グロリオサによる食中毒，静岡県環境衛生科学研究所
- 3）茶屋真弓，原田卓也，他；LC/MS/MSによる植物性自毒の迅速一斉分析法の検討，本誌，**19**，67～71（2018）
- 4）厚生労働省；自然毒のリスクプロファイル（高等植物，イヌサフラン），
<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000058791.html>（2020/6/30アクセス）
- 5）松吉健夫，佐々木庸郎，他；コルヒチンの過量服用により急速な経過で死亡した1例，中毒研究，**49**，371～373（2015）