

形態的観察, PCR法及びLC/MS分析による 育成牛シキミ中毒の診断

河津理子^{1)†} 福田昌治¹⁾ 土門尚貴²⁾ 茂木 守³⁾ 門田裕一⁴⁾

- 1) 埼玉県中央家畜保健衛生所 (〒331-0821 さいたま市北区别所町107-1)
- 2) 埼玉県川越家畜保健衛生所 (〒350-0837 川越市石田152)
- 3) 埼玉県環境科学国際センター (〒347-0115 加須市上種足914)
- 4) 国立科学博物館植物研究部 (〒305-0005 つくば市天久保4-1-1)

(2010年10月4日受付・2011年3月31日受理)

要 約

平成21年9月, 埼玉県内の酪農場で育成牛2頭(ホルスタイン種, 雌, 約18カ月齢)が起立不能及び痙攣を呈し, うち1頭は死亡した。畜主は, その2日前に放牧場周辺の生垣を剪定し, その枝葉を敷料に使用していた。生垣から採取した葉及び死亡牛の第一胃内容中の葉片は形態的観察, PCR-RFLP法及び分子系統解析によりシキミと同定した。また, 死亡牛の第一胃内容と血液を液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)で分析し, シキミの有毒成分であるアニサチンを検出した。これらの成績から, 本症例をシキミ中毒と診断した。形態的観察, 遺伝子検査及び化学分析を組み合わせることで, よりの確な植物中毒診断が可能となった。——キーワード: シキミ, LC/MS, PCR-RFLP.

----- 日獣会誌 64, 791~796 (2011)

シキミ (*Illicium anisatum* L.) は仏事や公園の植栽に利用される比較的馴染みのある常緑樹だが, 全草に神経伝達物質 γ -アミノ酪酸(GABA)と拮抗し, 痙攣等の神経症状を誘発するアニサチンを有しており [1], その実は植物で唯一劇物に指定されている。シキミの実は中華料理に使用される八角(トウシキミ (*Illicium verum* Hook. f.) の実)によく似ており, 人の誤食による中毒事例が報告されている [1-3]。一方, 家畜のシキミ中毒は黒毛和種の報告 [4] のみである。今回, ホルスタイン種育成牛のシキミ中毒について, 形態的観察, PCR-RFLP法, リボソームRNA遺伝子内部転写スペーサー (Internal Transcribed Spacer: ITS) 領域を用いた分子系統解析及びLC/MSを用いたアニサチン測定により多角的に診断したので報告する。

発 生 概 要

埼玉県内の酪農場(ホルスタイン種の成牛25頭と育成牛10頭を飼養)において, 平成21年9月23日午後3時ごろ, 放牧場にいた育成牛4頭のうち1頭が起立不能となり, 一時的に四肢の強直性間代性痙攣を起こした。

午後7時ごろには起立をしたが, 翌24日午前8時に死亡が発見された。また, 別の1頭が24日午前8時に起立不能となったが, 同日午前10時に糖・電解質補液, 強肝剤及びビタミン剤による治療をしたところ, 約5時間後には起立し, 回復した。畜主は, 22日に放牧場周辺の生垣の樹木を剪定し, その枝葉を放牧場の敷料に使用していた。24日午後に死亡牛を病理解剖し, 検査材料を得た。

材 料 及 び 方 法

死亡牛, 生垣に用いられていた樹木の葉(生垣の葉), 給与飼料のチモシー乾草(輸入)及び牛の飲用水の井戸水を検査に用いた。

死亡牛の主要臓器は, 定法に従い病理組織検査を行った。細菌分離は, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺及び中枢神経系について5%羊血液加寒天培地(CO₂培養)とDHL寒天培地(好気培養)により実施した。ウイルス分離は, 肺, 脾臓及び血清について牛腎臓由来株化(MDBK)細胞を用いて実施した。チモシー乾草と井戸水は, 高速液体クロマトグラフィー法により硝酸態窒素

† 連絡責任者: 河津理子(埼玉県中央家畜保健衛生所)

〒331-0821 さいたま市北区别所町107-1

☎048-663-3071 FAX 048-666-8731

E-mail: kawazu.satoko@pref.saitama.lg.jp

表1 アニサチン分析用試料の種類と調製法

No.	試料の種類	調製法
1	第一胃内容	10 ml 試験管に試料 1 g を入れる アセトニトリル 3 ml を加える 超音波処理 遠心処理 (2,800 g, 10分) 遠心上清 1 ml に水 4 ml を加える 0.2 μm フィルターでろ過
2	第一胃液	遠心処理 (2,800 g, 10分) 遠心上清をろ紙ろ過 0.2 μm フィルターでろ過 限外ろ過処理
3	胃内容の葉片	10 ml 試験管に試料 0.5 g を入れる アセトニトリル 3 ml を加える (以下, No. 1 と同じ)
4	血液	限外ろ過処理
5	生垣の葉 (生, 1 mm 細切)	10 ml 試験管に試料 0.5 g を入れる アセトニトリル 3 ml を加える (以下, No. 1 と同じ)
6	生垣の葉 (乾燥, 粉碎)	10 ml 試験管に試料 0.1 g を入れる アセトニトリル 3 ml を加える (以下, No. 1 と同じ)

濃度を測定した。生垣の葉は、80℃で24時間乾燥させ、水分含量を測定した。

生垣の葉と死亡牛の第一胃内容（胃内容）から検出された葉片（胃内容の葉片）について、形態的観察及びシキミ属リボソームRNA遺伝子ITS領域を標的としたPCR法 [5] を実施した。DNA抽出は植物DNA抽出キット ISOPLANT II（株ニッポンジーン、東京）により行った。なお、試料の粉碎は、2ml チューブに試料0.2g、ジルコニアビーズ1.5g及びWash Buffer（ISOPLANT IIに添付、0.5% 2-Mercaptoethanolを含む）1mlを入れ、ホモジナイザー（Fast Prep FP120、出力6.5、90秒）で行った。PCRはPCRキット（AmpliQ Gold PCR Master Mix、アプライドバイオシステムジャパン株、東京）を用いて実施した。プライマーはシキミ属ITS領域を増幅するIli-ITS-F0及びIli-ITS-R1 [5] を用いた。PCR混合液（AmpliQ Gold PCR Master Mix 25 μl, Primer (100pmol/μl) 0.25 μl, H₂O 22.5 μl, DNA 2 μl）を94℃10分で熱変性後、94℃30秒、52℃30秒、72℃60秒のサイクルで35回繰り返し、最後に72℃10分の伸長反応を行った。PCR産物は種の同定のため、制限酵素Pst IによるRFLP法 [5] に供し、遺伝子型別を実施するとともに、外部検査機関（北海道システムサイエンス株、北海道）に委託して塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、米国生物工学情報センターのBLASTサーチにて相同性検索を行い、遺伝子データベース（GenBank）に登録されているシキミ属（*Illicium* spp.）の塩基配列及び既報 [5] のシキミ（*I.*

表2 LC/MS測定条件

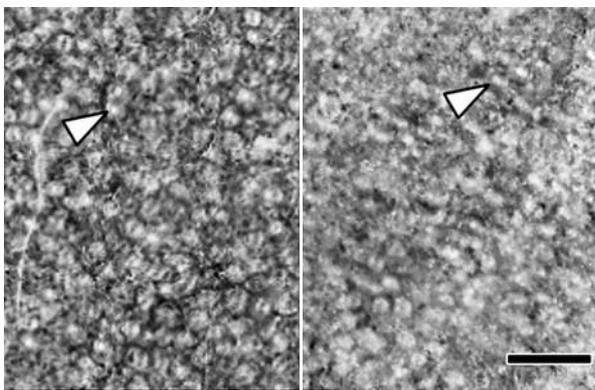
【LC条件】	
機器	Alliance 2695 (Waters)
分離カラム	Atlantis dC18 (Waters) 内径2.1 × 150 mm, 3 μm
移動相	A：蒸留水 (LC/MS用) B：アセトニトリル (LC/MS用)
グラジエント	0分(10%B) - 2分(10%B) - 12分(15%B) - 14分(25%B) - 20分(90%B) - 21分(100%B) - 26分(10%B) - 35分(10%B)
流速	0.3 ml/min
カラム温度	30℃
注入量	20 μl
【MS条件】	
機器	ZMD2000 (Micromass)
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化
モード	negative
脱溶媒ガス量	750 l/h
脱溶媒温度	350℃
コーンガス量	100 l/h
イオン源温度	130℃
キャピラリー電圧	- 2.7 kV
コーン電圧	- 30 V
測定イオン(scan)	m/z 100 ~ 450
測定イオン(SIR)	m/z 327, m/z 127

anisatum L.) 塩基配列との多重配列解析を遺伝子解析ソフトMEGA4 [6] を用い、Clustal W法により行った。分子系統樹作成にはNeighbor-Joining法を用い、得られた系統樹の信頼性を検証するため、bootstrap解析を1,000回反復した。

死亡牛の胃内容、胃内容の葉片、生垣の葉、第一胃液及び剖検時に採取した血液について、シキミの有毒成分であるアニサチン（C₁₅H₂₀O₈：分子量328.315）の測定をLC/MSにより行った。LC/MS分析には、LC/MS用蒸留水（関東化学株、東京）及びLC/MS用アセトニトリル（関東化学株、東京）を用いた。ろ紙はJIS規格5A（アドバンテック東洋株、東京）、0.2 μmメンブランフィルターはDISMIC-13HP（アドバンテック東洋株、東京）を用いた。限外ろ過処理は分画分子量10,000のMicroconUltracelYM-10（MILLIPORE社、U.S.A.）により行った。超音波処理は130Wで連続30分とした。それぞれの試料は表1のとおり前処理を行い、測定試料とした。アニサチンの標準物質（長崎大学薬学部 河野功教授から分与）は、8mgを10mlのアセトニトリルに溶解し、これを水で1/10に希釈し、測定に供した。LC/MS測定条件はLedererら [7] の方法を参考にし



図1 第一胃内容に含まれていた葉片



生垣の生葉 胃内容の葉片
 図2 生葉及び葉片組織の比較. 矢印は油点を示す (Bar = 250 μm).

て、表2のとおり設定した。

成 績

病理解剖において肺に水腫がみられ、組織学的に肺のうっ血、肺胞壁の毛細血管の拡張、肺胞壁の水腫性肥厚及び肺胞腔への漿液の貯留が認められた。有意な細菌及びウイルスは分離されなかった。硝酸態窒素濃度は、チモシー乾物中で177mg/kg、井戸水で12.5mg/kgであった。また、畜主への聞き取りにより、農薬散布はなかったことを確認した。

生垣は、農場内の墓地に沿ってあり、小高木で、葉は厚くつやがあり、傷をつけると抹香のような香りがした。生垣の葉の水分含量は67%であった。

死亡牛の胃内容からは、給与飼料のチモシーとは肉眼的に明らかに形状の異なる葉片が見つかった。その葉片は胃内容100gあたり約0.6g(湿重量)含まれ、大きいもので長径約1.5cm、短径約1cmと細かくなっていた(図1)。

生垣の葉及び胃内容の葉片は、全縁で鋸歯がなく肉質であること、中肋(中央の葉脈)以外の葉脈が不明瞭で

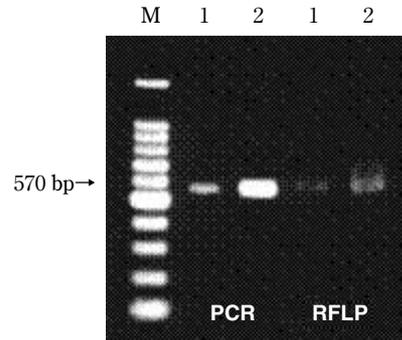


図3 シキミ属PCR産物及びPst IによるRFLPの電気泳動像. M 100bp ラダーマーカー, 1 胃内容の葉片, 2 生垣の葉

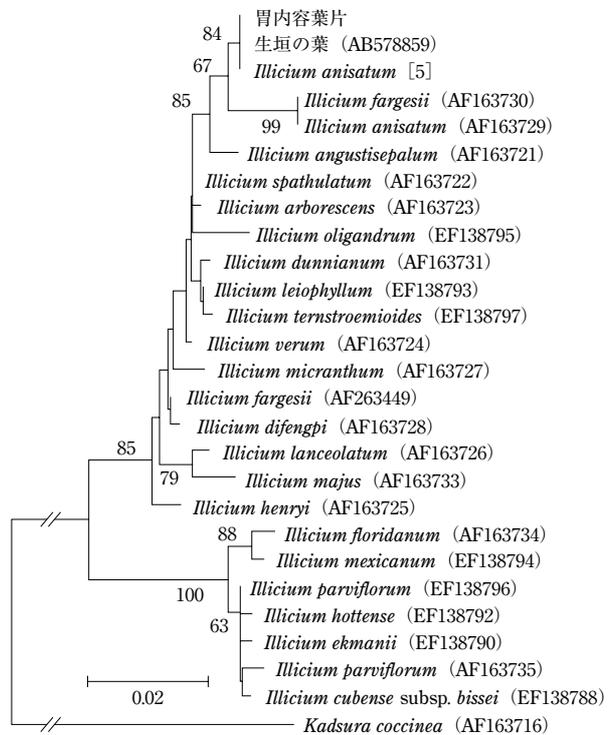


図4 シキミ属ITS領域の塩基配列に基づく分子系統樹

Kadsura coccinea (サネカズラ属)は系統樹解析における群外対照。

枝分岐点の数字はブーツストラップ値(%)を示す(1,000回反復)。

括弧内は遺伝子データベース(DDBJ/EMBL/GenBank)のAccession番号。

あること、さらに葉の表面に精油成分を含む油点が多数ある(図2)ことからシキミと同定した。また、PCR法では、生垣の葉及び胃内容の葉片ともにシキミ属ITS領域増幅産物と考えられる約570bp相当のバンドが検出された。これらのPCR産物は、RFLP法において、制限酵素Pst Iにより切断されず、既報[5]のシキミITS領域制限酵素切断パターンと一致した(図3)。また、生垣の葉と胃内容の葉片の塩基配列は100%一致した(図4)。いずれもTechenら[5]の報告したシキミITS領



図5 アニサチン定性試験 (SCANモード)



図6 アニサチン定性試験 (SIRモード)

域塩基配列と100%一致し、シキミであることが確認できた。今回、得られた塩基配列は日本DNAデータベース (DDBJ) に登録した (Accession No. AB578859)。

LC/MSによるアニサチン定性試験において、SCANモード (m/z 100~450) による測定の結果、標準品は7.3分にピークを検出し、ピーク検出時のおもなイオンは m/z 127と m/z 327であった。第一胃液 (試料No. 2) と生垣の葉 (試料No. 5, No. 6) は、標準品が検出された時間付近にピークが見られ、 m/z 127と m/z 327のイオンが顕著に検出され、アニサチンが含まれることが確認できた (図5)。胃内容 (試料No. 1)、胃内容の葉片 (試料No. 3) 及び血液 (試料No. 4) は、SCANモードでは標準品と同時間に明瞭なピークが検出されず、アニサチンの特徴イオンも微弱であったため、Selected ion recording (SIR) モードにより測定した。SIRモードでは、アニサチンの特徴イオンである m/z 127と m/z 327を選択した。SIRモードによる測定の結果、胃内容 (試料No. 1)、胃内容の葉片 (試料No. 3) 及び血液 (試料No. 4) でも標準品と同様な時間にアニサチンの特徴イオンである m/z 127と m/z 327のそれぞれ明確なピークが検出され、アニサチンが含まれることが確認できた (図6)。

考 察

本症例は、①臨床症状、②胃内容からシキミの葉片が検出されたこと、③胃内容と血液からアニサチンが検出されたことからシキミ中毒と診断した。

有毒成分アニサチンはGABAレセプターにおける拮抗により、人の中毒では、嘔吐、めまい及び痙攣、とき

に呼吸困難を示し、痙攣と意識喪失は繰り返すとされる [8, 9]。本症例で死亡した個体は、起立不能となり、一時的な四肢の強直性間代性痙攣を示した。数時間後には一旦起立をしていたが、死亡しているのが発見されるまでの間には、起立不能及び痙攣を繰り返していたとも考えられた。

肉眼的及び組織学的にみられた肺の水腫性病変は、肺のうっ血により、肺胞壁と肺胞腔に漿液が滲出したと考えられたが、死後変化かアニサチンの毒性に起因した病変であるか、判断が困難であった。

敷料に使用した生垣の葉及び胃内容から検出された葉片の同定を形態的観察とPCR法によって行った。PCR法は家畜保健衛生所で日常的に行っている検査方法であり、植物用DNA抽出キットが市販されていることから、植物による家畜中毒診断の一手法として有用と考えられた。神吉ら [10] の報告でも、放牧牛などで生前の採食行動が不明なうえ、消化管内に未消化物が認められず、肉眼的な形状確認も困難である場合、消化管内容物のPCR法による原因植物採食の証明が植物中毒の補助診断法として有効であるとしている。

今回PCRの標的としたリボソームRNA遺伝子ITS領域の塩基配列は植物において種特異性が高く、最も一般的に分子系統解析に用いられている [11]。今回の遺伝子解析により得られたシキミITS領域塩基配列は、Techenら [5] の報告と100%一致し、Haoら [12] が登録している同領域塩基配列 (Accession No. AF163729) とは異なる配列であった。Techenら [5] はHaoら [12] の登録配列がシキミのものではない可能性を示唆しており、今回の成績はこれを支持するもの

と考えられた。今後、シキミ属遺伝子情報のさらなる蓄積と整理が必要と考えられた。

LC/MSによる分析では、シキミの毒成分であるアニサチンが胃内容と血液から検出され、シキミを採食した発症牛の血液中にアニサチンが移行したことが示唆された。今回は標準品の純度が未確定であったため定性分析としたことから、胃内容と血中の正確なアニサチン含有濃度は不明である。

シキミの葉のアニサチン濃度は、鶴飼 [9] の報告では種子 (0.12~0.14%) の1/9 (530~620mg/kg) とされ、小林ら [4] の報告では約500mg/kg (乾物重量) とされる。葉の水分率は67%であったので、生葉中のアニサチン濃度は約170mg/kgと推定された。

一方、胃内容100gあたりの葉片重量は約0.6gで、死亡牛の胃内容を50kgとすると、約300gの葉、つまり51mgのアニサチン (死亡牛の体重500kgとすると約0.1mg/kg) を摂取したことになる。これはマウスのLD50値1mg/kg [3] の1/10、犬の致死量1.2~2mg/kg [9] の1/20~1/12に相当する。今回、胃内容中から検出された葉の量は、小林ら [4] の報告に比べても少なかったが、消化の促進により肉眼的に判別できないまで細かく粉砕されていたことや消化され下部消化管に移行していたことも考えられた。また、第一胃液に溶出したアニサチン量も考慮する必要がある、牛の致死量については今後の検討課題として残った。

中毒の診断は系統的な手法がなく、原因ごとに診断法が異なることなどから、確定診断に至らず、発生実態が不明な場合も多いといわれている。診断の精度及び速度の向上のためには、個々の事例の情報を共有化していくことが重要と考えられる。

アニサチン標準品を分与していただいた長崎大学薬学部天然物化学研究室 河野 功教授、ご助言いただいた(株)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所安全性研究チーム 山中典子上席研究員に深謝する。

引用文献

- [1] 宮崎 茂, 宮本 亨, 和田正美, 藤澤敏夫, 濱岡隆文, 久保正法, 播谷 亮, 徳久秀一, 門田裕一: シキミ, 写真でみる家畜の有毒植物と中毒, 23, (株)畜産技術協会, 東京 (2000)
- [2] 新谷 茂, 石沢淳子, 辻川明子, 黒本由美子, 遠藤容子, 磯村千鶴, 島津恵子, 盛智恵子, 窪田愛恵: 神戸シキミ集団中毒, 中毒研究, 5, 95-99 (1992)
- [3] 河野信助: 檜の有毒成分, 化学, 13, 54-60 (1958)
- [4] 小林弘明, 久保田泰徳, 山田博道, 保本朋宏, 沖田美紀, 平田晴美, 金森久幸, 豊田安基江: 黒毛和種繁殖牛におけるシキミ中毒, 日獣会誌, 56, 15-20 (2003)
- [5] Techen N, Pan Z, Scheffler BE, Khan IA: Detection of *Illicium anisatum* as adulterant of *Illicium verum*, *Planta Med*, 75, 392-395 (2009)
- [6] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0., *Mol Bio Evol*, 24, 1596-1599 (2007)
- [7] Lederer I, Schulzki G, Gross J, Steffen JP: Combination of TLC and HPLC-MS/MS methods. Approach to a rational quality control of Chinese Star Anise, *J Agric Food Chem*, 54, 1970-1974 (2006)
- [8] 新谷 茂: シキミ, 中毒研究, 6, 627 (1993)
- [9] 鶴飼 卓: シキミ, 急性中毒処置の手引, (財)日本中毒情報センター編, 第三版, 568-569, (株)じほう, 東京 (1999)
- [10] 神吉 武, 小桜利恵, 岡部知恵, 坪川 正: PCR法を用いた消化管内容物からのワラビ遺伝子の検出, 日獣会誌, 62, 457-459 (2009)
- [11] Alvarez I, Wendel JF: Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference, *Mol Phylogenet Evol*, 29, 417-434 (2003)
- [12] Hao G, Saunders RMK, Chye ML: A phylogenetic analysis of the Illiciaceae based on sequences of internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA, *Plant Syst Evol*, 223, 81-90 (2000)

Diagnosis of Japanese Star Anise (*Illicium anisatum* L.) Poisoning in a Holstein Heifer by Morphological Observation, PCR Method and LC/MS Analysis

Satoko KAWAZU^{*†}, Masaharu FUKUDA, Naoki DOMON, Mamoru MOTEGI
and Yuichi KADOTA

** Saitama Prefectural Chuo Livestock Hygiene Service Center, 107-1 Besshocho, Kita-ku, Saitama-shi, 331-0821, Japan*

SUMMARY

In September 2009, two of four Holstein heifers in a farm in Saitama Prefecture showed astasia and convulsions, and one died. Two days earlier, the owner of the farm had provided new bedding for the heifers by cutting branches from trees near the paddock. Partially digested leaves were found in the rumen of the dead heifer, and were identified as Japanese star anise (*Illicium anisatum* L.) by morphological observation, the PCR-RFLP method, and phylogenetic analysis. Anisatin, the toxic compound naturally occurring in Japanese star anise, was also detected in the ruminal content and serum by liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). On the basis of these findings, the death of the heifer was determined to be a result of Japanese star anise poisoning. A combination of morphological, genetic, and chemical methods is available for diagnosis of plant poisoning. — Key words : *Illicium anisatum* L., LC/MS, PCR-RFLP.

† Correspondence to : Satoko KAWAZU (Saitama Prefectural Chuo Livestock Hygiene Service Center)

107-1 Besshocho, Kita-ku, Saitama-shi, 331-0821, Japan

TEL 048-663-3071 FAX 048-666-8731 E-mail : kawazu.satoko@pref.saitama.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 791 ~ 796 (2011) —