

## 高等植物による食中毒低減のための検査法開発

研究分担者	近藤一成	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	野口秋雄	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	坂田こずえ	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

自然毒分野においては、喫食前検査での中毒防止、および中毒発生時の原因特定のために微量の食品残渣から分析鑑別法が検査の現場から強く求められている。

有毒植物による食中毒は、形態の似ている食用植物との誤食が主な原因である。食中毒時における原因植物の迅速かつ簡便な特定を目的として、スイセン、バイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオ、トリカブトをターゲットとしたリアルタイム PCR 法を用いた有毒植物同定法を開発を行った。リアルタイム PCR の反応系を開発するにあたり、まず各植物のバーコーディング領域 *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* をデータベースおよびシーケンス解析により収集した。有毒植物とそれと誤食しやすい食用植物の配列アライメント解析から *matK* において適度に変異箇所が見られたため、*matK* に対するプライマー・プローブの設計を行った。各反応系は有毒植物と誤認しやすい食用植物や代表的な食用植物には反応性を示さず、有毒植物に対し高い特異性を示し、十分な感度を有していた。本方法により、有毒植物の食中毒発生時に迅速かつ簡便な有毒植物の同定が可能になると考えられる。

### A. 研究目的

日本国内では、有毒植物を食用植物と誤認して摂取することによる食中毒事例が毎年発生している。特に、バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセンは発生件数が多く、有毒植物による食中毒事例全体の約 7 割を占める<sup>1),2)</sup>。さらに、イヌサフランは近年複数の死亡事例が報告されている<sup>3)</sup>。有毒植物による食中毒事例の発生場所は、「家庭」が 7 割以上を占めて

おり、その原因は山菜採りや家庭菜園で自ら採取したり、採取した植物を知人から譲りうけたり、道の駅などで誤って販売されたりしている場合が多い<sup>1),2)</sup>。

「家庭」での発生が多い有毒植物による食中毒事例において、原因植物の特定はその後の治療法を決定する上で大変重要である。しかし、現在行われているような伝統的な植物形態学による鑑定では、その鑑定能力には大きな個人差があること、形態を

とどめていない細分化されたものや調理された場合、さらには、摂取後吐瀉物の場合には同定不可能になる。また、有毒成分を液体クロマトグラフィー等で分析することも鑑定は可能であるが、微量試料からの検出や前処理が困難な場合がある。一方、塩基配列解析による植物種の同定は、検出感度が高いため微量試料からでも検出が可能であるが、同定に9時間以上要し、調理や消化によってDNAが断片化された場合、同定は困難である。DNAを指標にした同定法として、PCR-RFLP法は塩基配列解析に比べて同定までの時間が短く、ある程度断片化されたDNAにも有効であるが、操作が煩雑であり、コンタミネーションの危険性を伴う。以上のことから、簡便で迅速な有毒植物の同定法が求められている。

そこで、本研究では食中毒事例が多いスイセン、バイケイソウ、チョウセンアサガオ、および死亡事例のあるイヌサフラン、トリカブトをターゲットとしてリアルタイムPCR法を用いた有毒植物同定法の開発を行った。

## B. 研究方法

### B-1. 試料

オオバギボウシ葉(苗)、ゴボウ根、ニリンソウ根はインターネットまたはスーパーマーケットから購入した。イヌサフラン葉は岐阜県保健環境研究所から分与してもらった。ニラ、スイセン、バイケイソウ、ギョウジャニンニク、チョウセンアサガオ、ヤマトリカブトのDNA溶液は昭和薬科大学 篠崎淳一先生から分与してもらった。

### B-2. DNA抽出

オオバギボウシ葉、ゴボウ根、ニリンソ

ウ根およびイヌサフラン葉 100 mg とメタルコーン (MC-0316, 安井器械) を粉碎用チューブ (ST-0350F-O, 安井器械) に入れて蓋をし、粉碎机専用ラック (TR-348FPP, 安井器械) にのせ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で20分間冷却した。冷却後、粉碎机 (MULTI-BEADS SHOCKER® MB701, 安井器械) にて2,500 rpm, 30秒間粉碎した。その後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で20分間冷却し、再度粉碎机にて2,500 rpm, 30秒間粉碎した。DNA抽出はDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い、キットのプロトコールに従って行った。

### B-3. バーコーディング領域のシーケンス解析

表1に示すプライマー<sup>(4)-10)</sup>を参照した)を用いて、バーコーディング領域 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase L-subunit (*rbcL*), maturase K (*matK*), histidine tRNA (*trnH*) - photosystem II protein D1 (*psbA*) 間の遺伝子間領域 (*trnH-psbA*) をPCR増幅させた。反応液組成は以下の通りである。2 × KOD Fx Neo Buffer 25  $\mu\text{L}$ , 2 mM each dNTP Mixture 10  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{M}$  FW primer 0.5  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{M}$  RV primer 0.5  $\mu\text{L}$ , 1 U/ $\mu\text{L}$  KOD Fx Neo 1  $\mu\text{L}$  を混合し、各植物DNA溶液 (1 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$  を添加し、蒸留水で全量 50  $\mu\text{L}$  に調製した。プライマーは500 bp以上の増幅断片が生成するようなFW primer とRV primerの全ての組み合わせで試験した。反応はGeneAmp® PCR System 9700を用い、 $94^{\circ}\text{C}$  で2分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、 $98^{\circ}\text{C}$ , 10秒,  $50^{\circ}\text{C}$  (*matK*) または  $55^{\circ}\text{C}$  (*rbcL* および *trnH-psbA*), 30秒,  $68^{\circ}\text{C}$ , 1分を1サイクルとして、35サイクルの増幅反応を行った。増幅産物を1%アガロースゲル電気泳動に供し、検出さ

れた主要バンドを切り出し、精製した。精製後、PCR に用いたプライマーに連結した M13f プライマーおよび M13r プライマーを用いてシーケンス解析した (表 1)。

#### B-4. リアルタイム PCR

スイセン、バイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオ、ヤマトリカブトとそれと誤認しやすい食用植物の各バーコーディング領域をアライメント解析し、変異箇所が多い領域で有毒植物を検出するプライマー・プローブを設計した (表 2)。リアルタイム PCR 機器には LightCycler<sup>®</sup> 96 (Roche Applied Science) を用いた。PCR 用反応液の組成は以下の通りである。FastStart Universal Probe Master (Roche) 12.5  $\mu$ L, 50  $\mu$ M F primer 0.25  $\mu$ L, 50  $\mu$ M R primer 0.25  $\mu$ L, 10  $\mu$ M probe 0.5  $\mu$ L を混合し、DNA 抽出液またはブランク試料液 (蒸留水) 2.5  $\mu$ L を添加し、滅菌水で全量 25  $\mu$ L に調製した。反応条件は以下の通りである。95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C, 15 秒, 60°C, 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った。反応は、各 DNA 抽出液あたり 2 ウェル併行して行った。

#### B-5. 反応特異性解析

リアルタイム PCR の反応特異性解析には、各有毒植物、各食用植物、イネ、コムギ、トウモロコシ、ダイズ、インゲン、エンドウ、ジャガイモ、ナス、トマト、ピーマン、コマツナ、ニンジン、ニラ、ゴボウの DNA 抽出液を用い、各食用植物では 12.5 ng/well, その他では 1 ng/well を反応液に添加した。

#### B-6. PCR 効率の算出

各有毒植物の DNA 抽出液の希釈系列を用いて、3 ウェル併行でリアルタイム PCR

を行い、DNA 量の対数値と  $C_q$  値をプロットして得られた傾きから PCR 効率を算出した。

#### B-7. 検出限界の算出

各有毒植物の DNA 抽出液を 0.01 ~ 0.2 pg/well になるように反応液に添加し、21 ウェル併行でリアルタイム PCR を行い、95% 以上の陽性率を示した DNA 量を検出限界とした。

#### B-8. 誤食事故品への適用可否について

誤食事故品 (スイセン、バイケイソウ、イヌサフラン) を対象に、構築したリアルタイム PCR の検知適応について検討した。事故品は、調理残品 (スイセン; 卵とじ、バイケイソウ及びイヌサフラン; 茹で) であった。DNA 抽出は DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) および PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用い、キットのプロトコールに従って行った。

### **C. 研究結果**

#### C-1. バーコーディング領域のアライメント解析

データベース (NCBI) から入手できなかったニラ *matK*, オオバギボウシ *rbcL*, オオバギボウシ *matK*, オオバギボウシ *trnH-psbA*, ギョウジャニンニク *trnH-psbA*, チョウセンアサガオ *rbcL*, チョウセンアサガオ *matK*, ニリンソウ *rbcL*, ヤマトリカブト *rbcL*, ヤマトリカブト *matK*, ヤマトリカブト *trnH-psbA* について、表 1 に示すプライマーを用いて PCR を行い、得られた増幅産物についてシーケンス解析を行った。データベース (NCBI) およびシーケンス解析によって収集した各有毒植物とそれと誤認しやすい食

用植物の *rbcL*, *matK* および *trnH-psbA* の配列のアライメント解析を行った (表 3). その結果, 全ての有毒植物において, 適度に変異箇所が見られた *matK* に対して, リアルタイム PCR に用いるプライマー・プローブの設計を行った (図 1, 表 2).

#### C-2. 反応特異性解析

C-1 にて設計したプライマー・プローブを用いてリアルタイム PCR の反応特異性の解析を行った. その結果, すべての反応系において有毒植物と誤認しやすい食用植物には反応性を示さず, 有毒植物に対し反応性を示した (図 2-6). さらに, 代表的な食用植物に対しても反応性は示さなかった

(図 2-6). また, バイケイソウ, イヌサフラン, オオバギボウシ, ギョウジャニンニクは芽生え時の形態が互いによく似ているため, これらの間での反応特異性を検討した. その結果, バイケイソウ *matK* 反応系はオオバギボウシ, ギョウジャニンニクおよびイヌサフランに反応性を示さず (図 3), イヌサフラン *matK* 反応系はオオバギボウシ, ギョウジャニンニクおよびバイケイソウに反応性を示さなかった (図 4). チョウセンアサガオについては, 同じナス科のジャガイモ, ナス, トマト, ピーマンに対して 12.5 ng/well の DNA 量でも反応性は示さなかった (図 5).

#### C-3. PCR 効率の算出

DNA 量の対数値と  $C_q$  値をプロットした結果, 全ての反応系で良好な直線性が得られた ( $R^2 = 0.9915-0.9998$ , 図 7). 各反応系の PCR 効率は, 87.5% (スイセン), 92.6% (バイケイソウ), 73.4% (イヌサフラン), 74.9% (チョウセンアサガオ), 93.7 (トリカブト) であった (図 7).

#### C-4. 検出限界の算出

各反応系の検出限界は, 0.2 pg/well (スイセン), 0.05 pg/well (バイケイソウ), 0.05 pg/well (イヌサフラン), 0.1 pg/well (チョウセンアサガオ), 0.1 pg/well (トリカブト) であった.

#### C-5. 誤食事故品への適用可否について

二通りの抽出法による DNA 試料液を調製してリアルタイム PCR で測定した. その結果, スイセン (A), バイケイソウ (B), イヌサフラン (C) と考えられた中毒事故品よりそれぞれスイセン, バイケイソウ, イヌサフランの検出が確認された (図 8). 本法は調理された検体にも適用可能と考えられた.

#### D. 考察

リアルタイム PCR による検査法は PCR-RFLP 法のように煩雑な電気泳動操作が必要ないため, 迅速かつ簡便に実施できる. また, 陽性かどうかの判定を目視ではなく装置で行うため, 判定に個人差が出ない. そこで, 有毒植物の同定法としてリアルタイム PCR を用いた方法の開発を試みた. リアルタイム PCR の反応系を開発するにあたり, まず各植物のバーコーディング領域 *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* をデータベース (NCBI) およびシーケンス解析により収集した. 有毒植物と食用植物の配列アライメント解析から *matK* において適度に變異箇所が見られたため, *matK* に対するプライマー・プローブの設計を行った. 各反応系は有毒植物と誤認しやすい食用植物や代表的な食用植物には反応性を示さず, 有毒植物に対し高い特異性を示した. 各反応系の PCR 効率は, スイセン, バイケイソ

ウ、トリカブトでは良好であったが、イヌサフラン、チョウセンアサガオでは低かった。一方、各反応系の検出限界は 0.05~0.2 pg/wel であり、十分な感度を有していた。以上の結果から、本方法は有毒植物の食中毒発生時に迅速かつ簡便に有毒植物を同定できると考えられる。

調理や消化によって DNA が断片化された試料からの検出については、松山らの報告<sup>11)</sup>では検出限界が 1~10 pg/well, 増幅断片長が 72~234 bp の反応系で消化処理試料からの検出が可能であったことが報告されている。本研究で開発した反応系は増幅断片長が 97~125 bp であることから (表 2), DNA が断片化された試料からの検出が可能であると推察される。実際に調理処理や消化処理を行った試料および DNA 精製を省略した粗抽出液試料からの検出について検証する必要があることから、誤食事故品について二通りの抽出法による DNA 試料液を供したところ、提供された事故品のすべてにおいて検知可能であった。

## E. 結論

食中毒事例の多い、あるいは死亡事例のある有毒植物をターゲットとしたリアルタイム PCR 法を用いた有毒植物同定法を開発した。本方法は、標的の有毒植物に高い特異性を示し、十分な感度を有していることから、有毒植物の食中毒発生時に迅速かつ簡便に有毒植物を同定できると考えられる。

### 【参考文献】

- 1) Toda, M. et al., *Food Hyg. Saf. Sci.*, 53, 105-120 (2012).
- 2) Toda, M. et al., *Food Hyg. Saf. Sci.*, 55,

55-63 (2014).

- 3) 塩見ら：自然毒のリスクプロファイル。  
[http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryoku/shokuhin/syokuchu/poison/index.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/poison/index.html)
- 4) Kress, W. J. et al., *PLoS ONE*, 2, e508 (2007).
- 5) Fay, M. F. et al., *Kew Bull.*, 52, 111-120 (1997).
- 6) Fay, M. F. et al., *Taxon*, 47, 43-50 (1998).
- 7) Johnson L.A. et al., *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 82, 149-175 (1995).
- 8) Hamilton, M. B. et al., *Mol. Ecol.*, 8, 513-525 (1999).
- 9) Tate, J. A. et al., *Syst. Bot.*, 28, 723-737 (2003).
- 10) Sang, T. et al., *Am. J. Bot.*, 84, 1120-1136 (1997).
- 11) Matsuyama, S. et al., *Int. J. Legal Med.*, 125, 211-217 (2011).

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kazunari Kondo, Kosuke Nakamura, Takumi Ishigaki, Kozue Sakata, Saemi Obitsu, Akio Noguchi, Nozomi Fukuda, Eiji Nagasawa, Reiko Teshima Tomoko Nishimaki-Mogami: Molecular phylogenetic analysis of new *Entoloma rhodopolium*-related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP. *SCIENTIFIC REPORTS* 7: 14942, DOI: 10.1038/s41598-017-14466-x, 2017

## 2. 学会発表

- 1) 坂田こずえ、野口秋雄、加藤怜子、篠崎淳一、紺野勝弘、近藤一成：有毒植物のリアルタイム PCR を用いた検知法について. 第回 日本食品衛生学会学術講演会（東京）2017年11月
- 2) 坂田こずえ、野口秋雄、加藤怜子、篠崎淳一、紺野勝弘、近藤一成：リアルタイムPCR法による有毒植物の検出法開発. 第回 全国衛生化学技術協議会年会（奈良）2017年11月
3. その他  
国立保健医療科学院平成29年度短期

研修「きのこの食中毒」、食品衛生危機管理研修, 平成29年10月18日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表 1 バーコーディング領域のシーケンス解析に使用したプライマー

primer name	sequence (5'-3') <sup>a</sup>	direction	reference
rbcL			
rbcLa_F+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGTATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC</u>	FW	4)
rbcL-627F+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGTCATTTATGCGCTGGAGAGACCG</u>	FW	this study
rbcL-724R+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACTTCGCATGTACCTGCAGTAGC</u>	RV	5)
rbcL-1291R+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACTAGCAAGATCACGTCCTTCATTACG</u>	RV	this study
rbcL-1460R+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACTTCCTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG</u>	RV	6)
matK			
trnK-710F+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGTGTATCGCACTATGTWTCATTTGA</u>	FW	7)
matK-1f+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGTATGGAAGAATTACAAGGATATTGA</u>	FW	this study
matK-1412F+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGTATATAATTCTTATGTATGTGAAT</u>	FW	7)
matK-1506R+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACTTTCCATAGAAATATATTCG</u>	RV	7)
matK-1513r+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACTATAATATCCAAATACCAAATACG</u>	RV	this study
trnK-2R+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACTAACTAGTCGGATGGAGTAG</u>	RV	7)
trnH-psbA			
trnH(GUG)+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGTACTGCCTTGATCCACTTGGC</u>	FW	8)
trnH2+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGTCGCGCATGGTGGATTACAAATCC</u>	FW	9)
psbA+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACTCGAAGCTCCATCTACCAATGG</u>	RV	8)
psbAF+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACTGTTATGCATGAACGTAATGCTC</u>	RV	10)

<sup>a</sup>下線はプライマーに連結した M13f および M13r プライマーの相補配列を示す。

表 2 リアルタイム PCR に用いたプライマー・プローブ

primer name	sequence (5'-3')	amplicon size (bp)
Narcissus		
Narcissus_matK-F1	CTTTTGGAAC TTTTCTTGAACGAACAC	125
Narcissus_matK-R1	GAAAGGATCTTTGAAGAACCAGGAG	
Narcissus_matK-P1	FAM-TCCTATGAAAATCGTTACGA-MGB	
Veratrum		
Veratrum_matK-F1	CGCAATGTTTTGAAAAGATTAGGTTCTGA	119
Veratrum_matK-R1	GATCCATGTAAAGTAAAAGGAAAAAGGGT	
Veratrum_matK-P1	FAM-TTGATCTTCGCGCAAACA-MGB	
Colchicum		
Colchicum_matK-F2	CAGGATCCATATCAACCAATTA AAAAACC	97
Colchicum_matK-R2	CATTTTGTTTTGACCGCCAAGGG	
Colchicum_matK-P2	FAM-TCCTTTTGGGGGGATATTT-MGB	
Datura		
Datura_matK-F6	GAGGGATTTCCATTTATTI <sup>a</sup> TGGAAATG	122
Datura_matK-R6-2	GGAAATGTTGAATGAATTGATCGGAAG	
Datura_matK-P6	FAM-TATCTTCTTTTTCGAAGGC-MGB	
Aconitum		
Aconitum_matK-F1	ATCACTGGCTAAATCGAAATTTTGTA	100
Aconitum_matK-R1	ACCAAATCTATCGATAATATCAGAATCG	
Aconitum_matK-P1	FAM-CCATCAGTAAGCCGACTTGGGCCG-BHQ1	

<sup>a</sup>I はデオキシイノシンを示す。

表3 本研究で収集した有毒植物と食用植物の rbcL, matK および trnH-psbA の配列

和名	学名	rbcL		matK		trnH-psbA	
		length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.
食 ニラ	<i>Allium tuberosum</i>	1,434	JN969266	1,552	this study	577	GQ434888
毒 ニホンズイセン	<i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i>	1,334	HM640487	1,563	HM640601	644	GQ923940
毒 スイセン	<i>Narcissus tazetta</i>	703	GQ436660	1,565	HM011047	558	GQ435346
毒 スイセン属	<i>Narcissus elegans</i>	1,341	AF116972	882	KU127381	-	-
食 オオバギボウシ(ウルイ)	<i>Hosta sieboldiana</i>	1,469	this study	1,604	this study	686	this study
食 タマノカンザシ	<i>Hosta plantaginea</i>	1,334	HM640480	1,566	HM640594	656	KC704294
食 タチギボウシ	<i>Hosta rectifolia</i>	1,327	L10253	-	-	-	-
毒 バイケイソウ	<i>Veratrum album</i> subsp. <i>oxysepalum</i>	1,225	JN417478	1,536	JF807719	314	JF807759
毒 コバイケイソウ変種	<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>stamineum</i>	-	-	1,536	JF807731	301	JF807783
毒 ミカワバイケイソウ	<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>micranthum</i>	-	-	1,536	JF807729	289	KT254787
毒 コバイケイソウ	<i>Veratrum stamineum</i>	1,384	KM242996	1,555	AB040184	-	-
毒 シュロソウ属	<i>Veratrum album</i>	1,390	D28168	1,537	JF807687	294	KJ395078
毒 シュロソウ属	<i>Veratrum maackii</i>	1,390	AB018849	1,556	AB040183	309	JF807786
毒 シュロソウ属	<i>Veratrum parviflorum</i>	1,365	AJ235813	-	-	-	-
毒 シュロソウ属	<i>Veratrum virginicum</i>	1,371	AJ276348	1,509	KM242777	-	-
食 ギョウジャニンニク	<i>Allium victorialis</i> var. <i>Platyphyllum</i>	1,334	HM640483	1,563	HM640597	697	this study
食 ギョウジャニンニク種	<i>Allium victorialis</i>	703	KC704768	854	KC704498	578	HQ690620
毒 イヌサフラン	<i>Colchicum autumnale</i>	1,440	NC_030064	1,551	NC_030064	477	JF934069
毒 イヌサフラン属	<i>Colchicum agrippinum</i>	642	KC899465	423	KC899635	-	-
毒 イヌサフラン属	<i>Colchicum speciosum</i>	1,399	L12673	1,553	AB040181	439	JF934163
毒 イヌサフラン属	<i>Colchicum montanum</i>	1,334	KC796873	1,532	JN417407	439	JF934134
毒 イヌサフラン属	<i>Colchicum bornmuelleri</i>	1,356	KC796865	1,532	JN417406	439	JF934161
食 ゴボウ	<i>Arctium lappa</i>	1,400	KM360645	1,490	AY013520 + JN895220	478	AB727572
毒 チョウセンアサガオ	<i>Datura metel</i>	1,513	this study	1,824	this study	468	JX467620
毒 ケチョウセンアサガオ	<i>Datura innoxia</i>	1,264	JX996059	932	EF438895	517	KC146630
毒 シロバナヨウシュチョウセンアサガオ	<i>Datura stramonium</i>	1,408	DSU08611	1,527	KP756825	514	KC146637
食 ニリンソウ	<i>Anemone flaccida</i>	1,477	this study	1,533	AB110530	480	AB117604
食 イチリンソウ属	<i>Anemone nemorosa</i>	1,408	KM360632	869	JN895407	-	-
食 イチリンソウ属	<i>Anemone americana</i>	1,428	EU053901	1,161	AF542590	375	KP643346
食 シュウメイギク	<i>Anemone hupehensis</i>	1,395	FJ626577	1,212	FJ626488	-	-
毒 ヨウシュトリカブト	<i>Aconitum napellus</i>	1,424	EU053898	863	JN895413	222	ZPLPP033-13
毒 オクトリカブト	<i>Aconitum japonicum</i> ssp. <i>Subcuneatum</i>	666	LC036440	1,224	LC036452	211	LC152848
毒 ヤマトリカブト	<i>Aconitum japonicum</i>	1,480	this study	1,816	this study	324	this study
毒 ウゼントリカブト	<i>Aconitum okuyamae</i>	666	LC036442	1,224	LC036456	211	LC152849
毒 カワチブシ	<i>Aconitum grossedentatum</i>	665	LC152818	1,243	LC152826	204	LC152853
毒 センウズモドキ	<i>Aconitum jaluense</i> subsp. <i>iwatekense</i>	666	LC036441	1,224	LC036454	211	LC036489
毒 レイジンソウ	<i>Aconitum loczyanum</i>	665	LC152819	1,243	LC152828	212	LC152855
毒 エゾトリカブト	<i>Aconitum sachalinense</i>	666	LC036445	1,224	LC036459	211	LC036496

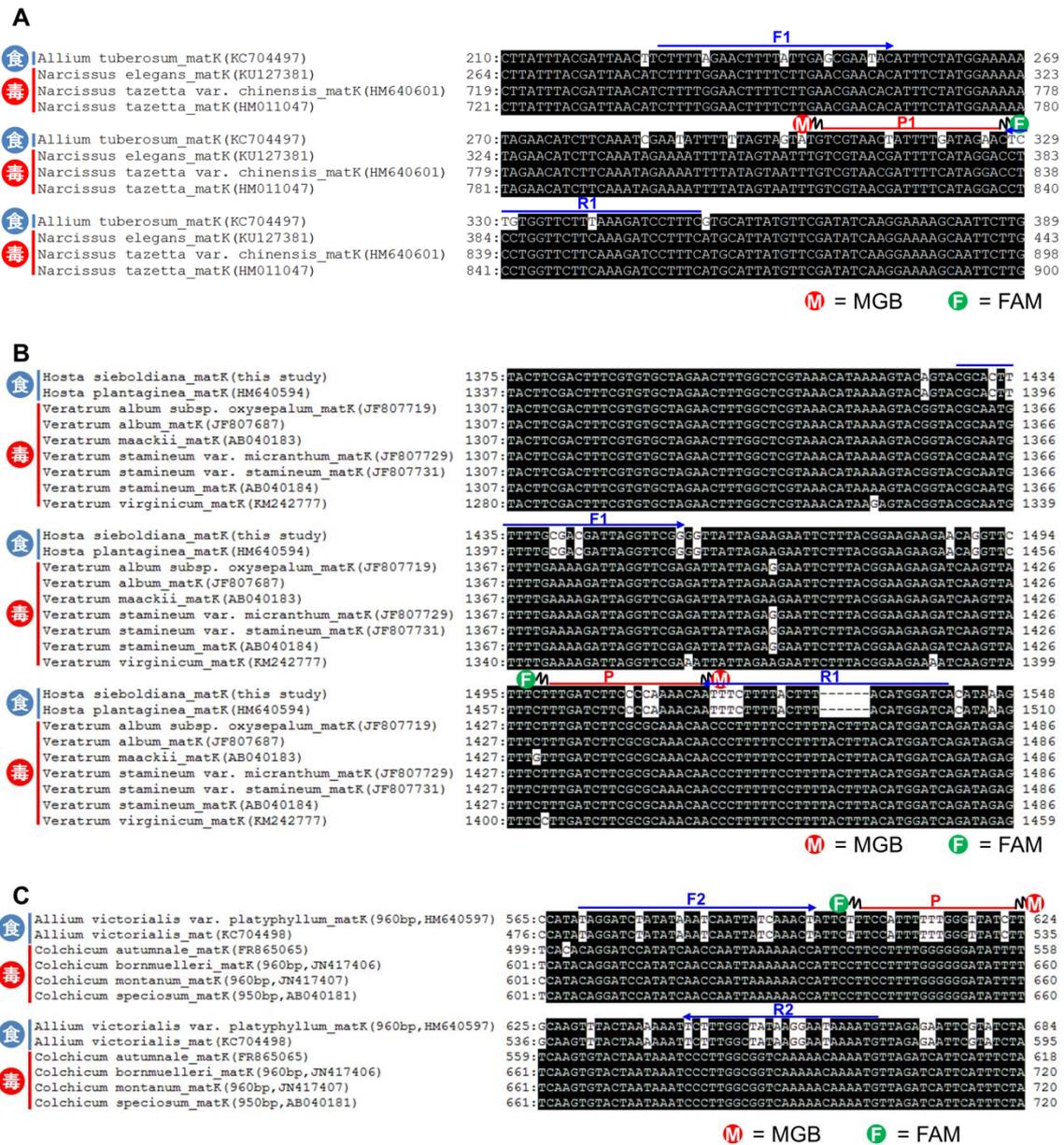


図1 各有毒植物とそれと誤認しやすい食用植物の matK の配列アライメント解析

(A) ニラとスイセン matK の配列アライメント解析結果. (B) ギボウシとバイケイソウ matK の配列アライメント解析結果. (C) ギョウジャニンニクとイヌサフラン matK の配列アライメント解析結果. 青字矢印, リアルタイム PCR に用いたプライマー配列. 赤線, リアルタイム PCR に用いたプローブ配列.



図1 各有毒植物とそれと誤認しやすい食用植物の matK の配列アライメント解析(続き)

(D) ゴボウとチョウセンアサガオ matK の配列アライメント解析結果. (E) ニリソウとトリカブト matK の配列アライメント解析結果. 青字矢印, リアルタイム PCR に用いたプライマー配列. 赤線, リアルタイム PCR に用いたプローブ配列.

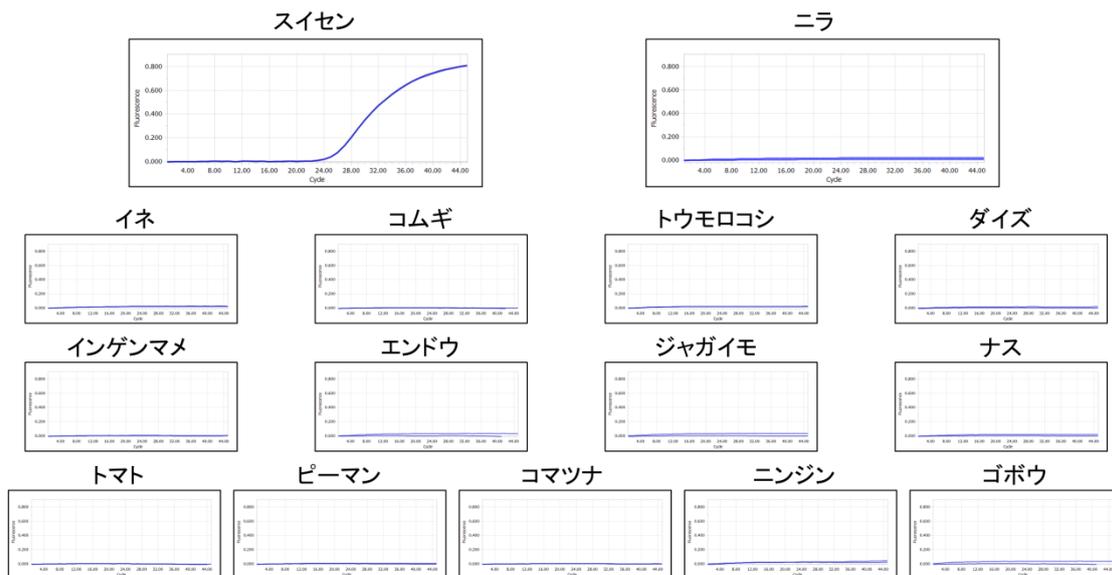


図2 スイセン matK 反応系の反応特異性

各植物 DNA に対するリアルタイム PCR の増幅曲線を示した。ニラは 12.5 ng/well, その他の植物は 1 ng/well の DNA 量にて反応を行った。

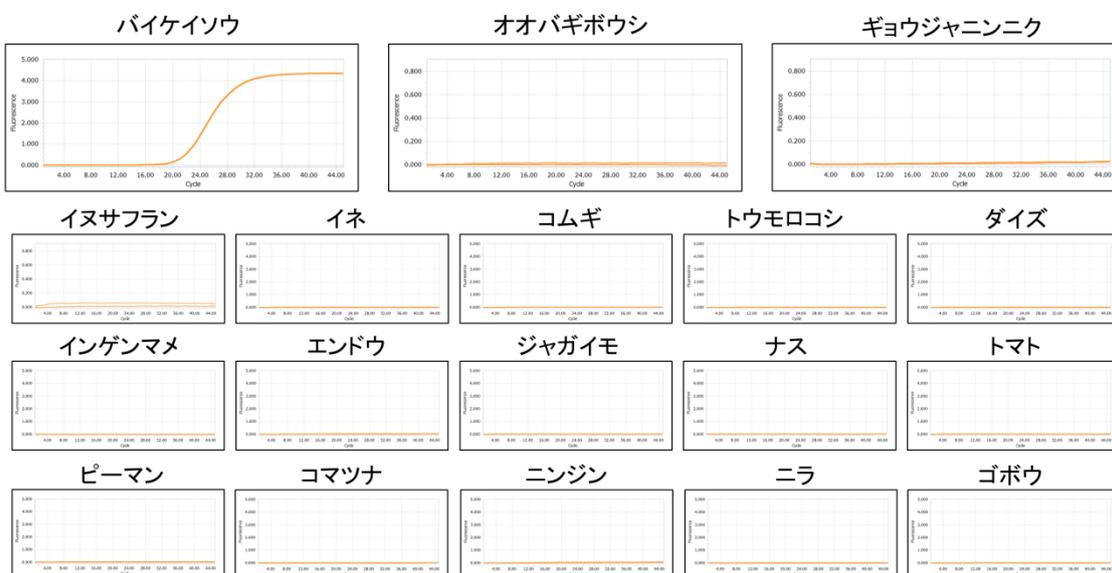


図3 バイケイソウ matK 反応系の反応特異性

各植物 DNA に対するリアルタイム PCR の増幅曲線を示した。オオバギボウシ, ギョウジャニンニク, イヌサフランは 12.5 ng/well, その他の植物は 1 ng/well の DNA 量にて反応を行った。



図4 イヌサフラン matK 反応系の反応特異性

各植物 DNA に対するリアルタイム PCR の増幅曲線を示した。ギョウジャニンニク，オオバギボウシ，バイケイソウは 12.5 ng/well，その他の植物は 1 ng/well の DNA 量にて反応を行った。

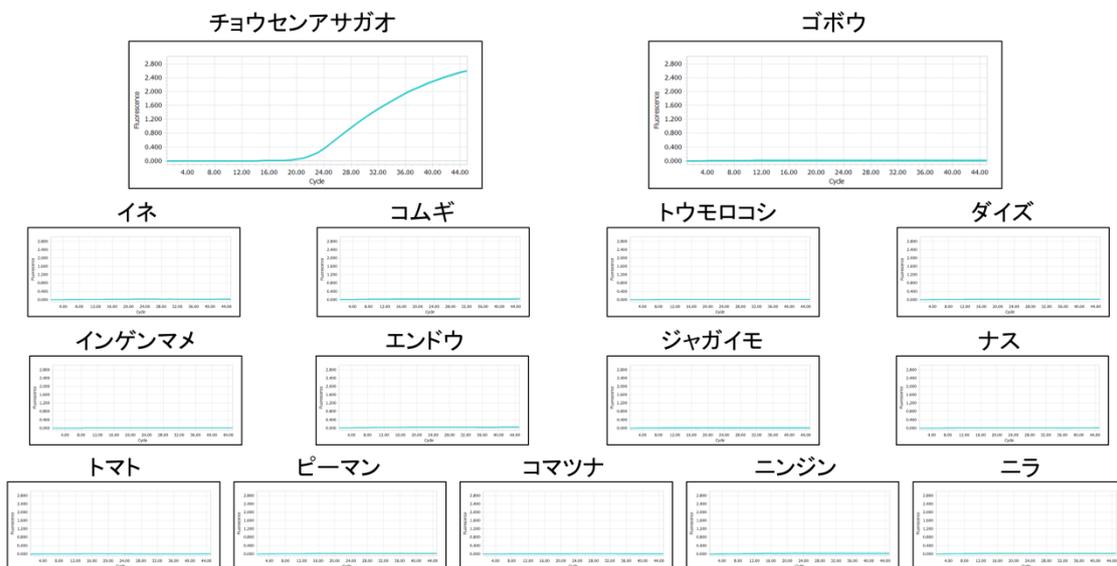


図5 チョウセンアサガオ matK 反応系の反応特異性

各植物 DNA に対するリアルタイム PCR の増幅曲線を示した。ゴボウ，ジャガイモ，ナス，トマト，ピーマンは 12.5 ng/well，その他の植物は 1 ng/well の DNA 量にて反応を行った。

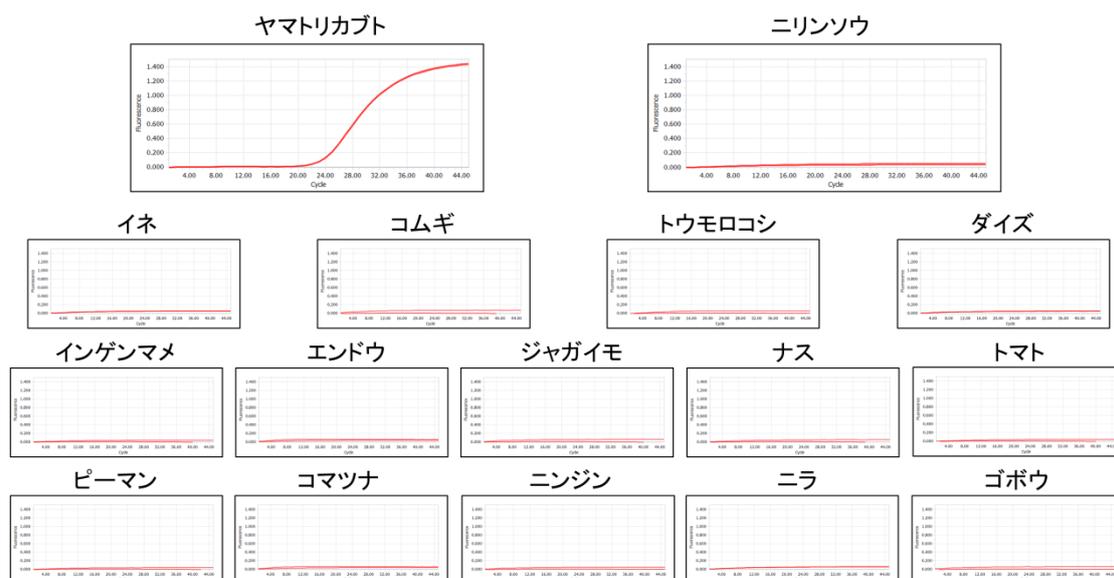


図6 トリカブト matK 反応系の反応特異性

各植物 DNA に対するリアルタイム PCR の増幅曲線を示した。ニリンソウは 12.5 ng/well, その他の植物は 1 ng/well の DNA 量にて反応を行った。

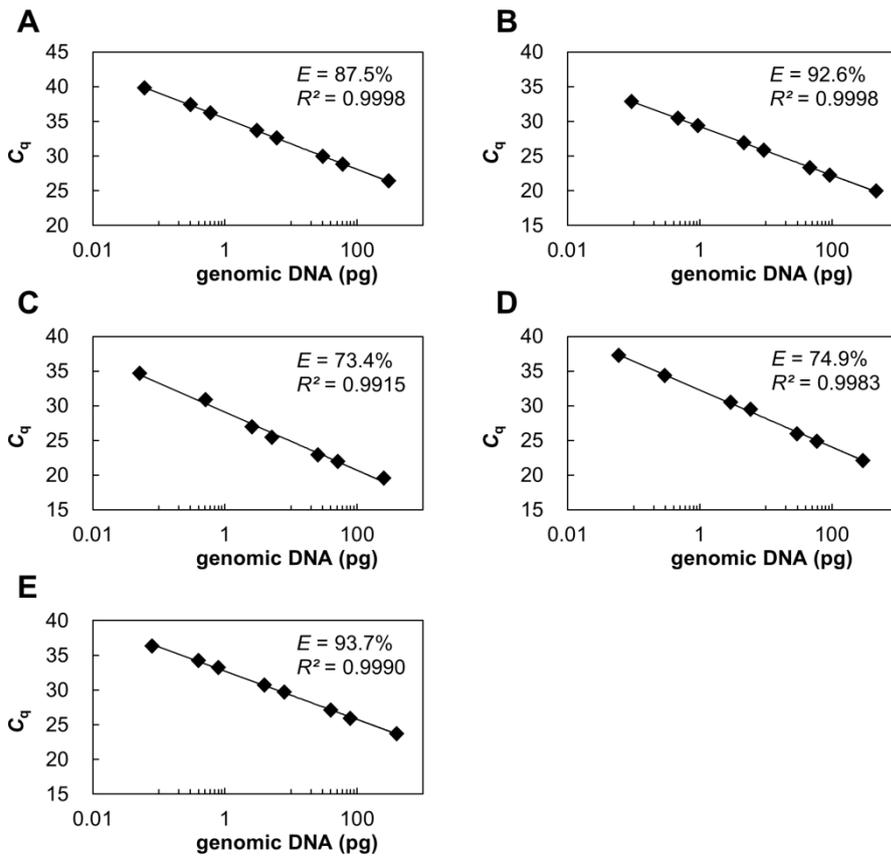


図7 各反応系のPCR効率

横軸に各有毒植物のDNA量の対数値、縦軸に $C_q$ 値をプロットした。(A) スイセン, (B) バイケイソウ, (C) イヌサフラン, (D) チョウセンアサガオ, (E) トリカブト matK 反応系のプロット図。E, PCR 効率。

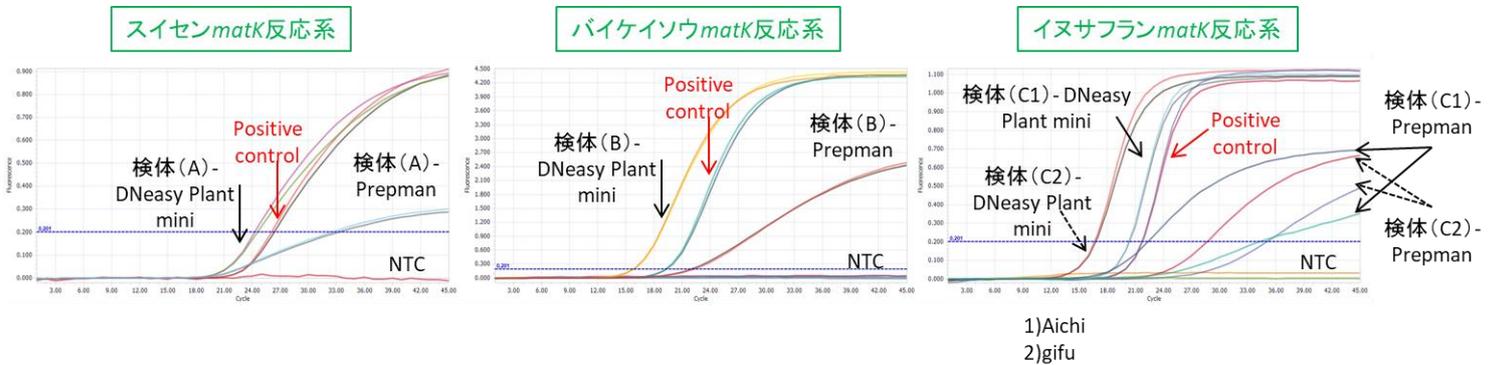


図8 誤食事故品への適用可否について