

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究
研究分担報告書

「食中毒の病因植物種の遺伝子解析による同定法の開発」
—有毒植物のリアルタイム PCR 法を用いた検出法開発と妥当性確認—
研究分担者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所生化学部

研究要旨

植物性自然毒においては、簡便な分析法での喫食前検査による中毒防止、および、中毒発生時の原因特定が重要である。原因植物種同定のための、微量食品残渣から分析可能な鑑別法が検査現場から強く求められている。平成 29 年度までに食中毒時における原因植物の迅速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、トリカブトに対して、植物バーコーディング領域 *rbcL*、*matK*、*psbA-trnH* 内の特異的配列を用いた特異性の高いリアルタイム PCR 法開発を行い、本検知法の妥当性確認が必要になっていた。そこで、本研究では、次の 2 つの研究項目について検討を行った。

(1) 有毒植物リアルタイム PCR 法の外部機関による妥当性確認試験

有毒植物リアルタイム PCR 法の妥当性確認は、外部機関として東京都健康安全研究センター、北海道立衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、兵庫県立健康科学研究所の 4 機関で、通常使用している方法・分析装置を用いて行った。その結果、予め求めた検出限界付近濃度の標準プラスミドおよび抽出 DNA 試料においてすべての機関で検出された。また、食中毒事例から回収された食品残渣（茹でもの—バイケイソウ、卵とじ—スイセン）は抽出操作から行い、いずれも全機関検出でき、良好な結果が得られたことから、本法は有毒植物同定に優れた方法として活用可能と考えられた。

(2) 簡便法としての、有毒植物 LAMP 法の開発

LAMP 法開発では、各有毒植物からゲノム配列解析用に DNA を抽出して植物バーコーディング領域周辺の塩基配列解析を検討した。今後は、各有毒植物特異的な LAMP 法用のプライマーを設計していく。

研究協力者

坂田こずえ 国立医薬品食品衛生研究所生化学部

菅野陽平 北海道立衛生研究所

鈴木智宏 北海道立衛生研究所

青塚圭二 北海道立衛生研究所

A. 研究目的

有毒植物による食中毒事例はスイセン、バイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオ、トリカブトで多く発生し、食中毒事例全体の約7割を占める。特に、イヌサフランでは死亡事例も報告されている。山菜採り、家庭菜園での採取や採取した植物の譲渡などによる「家庭」での中毒発症が多くを占めており、簡便迅速な有毒植物の同定法が求められてきた。これまでに簡便法としての PCR- RFLP 法を開発してきた。一方で、中毒原因植物種の同定に用いる確定検査法の整備も不可欠であることから、昨年度（H29年度）確定検査としてリアルタイム PCR 法を開発して報告したが、その妥当性は確認されていなかった。本研究では、食中毒事例が多い5種の有毒植物の *matK* 領域を標的としたリアルタイム PCR 検査法の妥当性確認を外部4機関で行ったので報告する。

また、LAMP法について、プライマー設計が重要であることから植物DNAバーコード領域 ITS 領域、*rbcL*、*matK* および *psbA-trnH* 領域を詳細に解析することが必要である。特異性の高いプライマーを用いた簡便 LAMP 法が確立できれば、野外での検査も可能と考えられるため検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 有毒植物リアルタイム PCR 法の外部機関による妥当性確認試験

(1) 試料

イヌサフラン葉は岐阜県保健環境研究所から分与された。残りの対象4種の有毒植物は採集した。

(2) DNA抽出法

試料とメタルコーン（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、粉碎器専用ラック（TR-348FPP、安井器械）にのせ、-80°Cで20分間冷却した。冷却後、粉碎機（MULTI-BEADS SHOCKER® MB701、安井器械）を用いて2,500 rpm 30秒間粉碎した。その後、-80°Cで20分間冷却し、再度粉碎機にて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。

(3) リアルタイム PCR 条件

昨年度（H29年度）開発したスイセン、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のアライメント解析から変異箇所が多い領域で設計された有毒植物を検出するプライマー・プローブ対を使用した。即ちスイセン検知系として、

Narcissus_matK-F1 :

CTTTTGGAACCTTTTCTTGAACGAACA

C、*Narcissus_matK*-R1 :

GAAAGGATCTTTGAAGAACCAGGAG

、*Narcissus_matK*-P1 : FAM-

TCCTATGAAAATCGTTACGA-MGB、

バイケイソウ検知系として、

Veratrum_matK-F1 :

CGCAATGTTTTGAAAAGATTAGGTTC
GA、Veratrum_matK-R1 :
GATCCATGTAAAGTAAAAGGAAAAAG
GGT、Veratrum_matK-P1 : FAM-
TTGATCTTCGCGCAAACA-MGB、
イヌサフラン検知系として、
Colchicum_matK-F2 :
CAGGATCCATATCAACCAATTAACCA
ACC、Colchicum_matK-R2 :
CATTTTGTGTTTTGACCGCCAAGGG、
Colchicum_matK-P2 : FAM-
TCCTTTGGGGGGATATTT-MGB、
チョウセンアサガオ検知系として、
Datura_matK-F6 :
GAGGGATTTCCATTTATTTTGAAATG
、Datura_matK-R6-2 :
GGAAATGTTGAATGAATTGATCGGAA
G、Datura_matK-P6 : FAM-
TATCTTCTTTCGAAGGC-MGB、
トリカブト検知系として、
Aconitum_matK-F1 :
ATCACTGGCTAAATCGAAATTTTGTA
、Aconitum_matK-R1 :
ACCAAATCTATCGATAATATCAGAATC
G、Aconitum_matK-P1 : FAM-
CCATCAGTAAGCCGACTTGGGCCG-
BHQ1 を用いた。(表 1)

リアルタイム PCR 機器には
LightCycler® 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
μL、50 μM F primer 0.25 μL、50 μM R
primer 0.25 μL、10 μM probe 0.5 μL を
混合し、DNA 溶液またはブランク試料液

(蒸留水) 2.5 μL を添加し、滅菌水で全
量 25 μL 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 溶液あたり 2 ウ
ェル併行して行った。

(4) 陽性コントロールプラスミド構築
pEX-K4J1 vector (2,391bp) 骨格に、
対象 5 種の有毒植物の matK 領域を含む
PCR 増幅領域に前後数 10 bp を連結し
た配列 (681 bp) を挿入して、陽性コン
トロールプラスミドとした (3,072 bp)。
(図 1)

構築したプラスミドの各有毒植物検知
系への反応特異性解析を行った。即ち、
プラスミド溶液の希釈系列 (6.4~20,000
copies/ well) を用いて 11 ウェル併行で
リアルタイム PCR を行い、コピー数の
対数値と Cq 値をプロットして得られた
傾きから PCR 効率を算出した。またプ
ラスミド溶液の希釈系列 (10~100
copies/ well) について 12 ウェル併行で
検出限界を算出した。

(5) 外部機関による妥当性確認試験の実
施

各有毒植物検知プライマー、プローブ
対および 6 種のブラインドサンプル、そ
して抽出操作から試行してもらう試料 2
種を一式として参加機関に送付して妥当
性確認試験を実施した。参加機関の使用
するリアルタイム PCR 機器は

LightCycler® 96 (Roche Applied Science) 1 機関、ABI 7900HT (Thermo Fisher Scientific) 2 機関、ABI 7500 (Thermo Fisher Scientific) 1 機関であった。ブラインドサンプルの内訳は、希釈 2 濃度の有毒植物抽出 DNA 溶液 (1 pg/μL、10 pg/μL)、希釈 2 濃度の陽性コントロールプラスミド溶液 (100 copies/μL、1,000 copies/μL)、陰性コントロールとしてトウモロコシ DNA 抽出液と水であった。ブラインドサンプル濃度はあらかじめ求めた検出限界から設定した。抽出試料は中毒事例から回収した食品残渣検体 (調理残品、スイセン; 卵とじ、バイケイソウ; 茹で) で抽出方法は指定しなかった。各機関に各サンプル 2 ウェル併行、2 試行分のデータファイルを返送してもらい国立衛研にて解析を行った。

B-2. 有毒植物 LAMP 法の開発

(1) 試料

本研究で用いた有毒植物 (トリカブト 4 種、イヌサフラン、スズラン 2 種、バイケイソウ、スイセン、チョウセンアサガオ 3 種) および誤認されやすい食用植物 (ニリンソウ、ギョウジャニンニク、ギボウシ 2 種、ニラ) は北海道立衛生研究所の薬用植物園で採取したものを使用した。その他の誤認されやすい食用植物 (モロヘイヤ、オクラ、ゴボウ) は国内産 (北海道、沖縄県、群馬県) の市販品を試料として用いた。

(2) DNA 抽出

各試料からの DNA 抽出は、DNeasy plant mini kit (QIAGEN)、DNA すいすい-P (リーズ)、PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific) の DNA 抽出キット、CTAB もしくは PVPP を用いた DNA 抽出法で行った。抽出した DNA 溶液の濃度は、超微量分光光度計 NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。また、得られた DNA 溶液を 0.7% SeaKem GTG Agarose ゲルで電気泳動し、その泳動パターンを確認した。

(3) 遺伝子解析

LAMP 法の標的遺伝子として、ITS 領域、*rbcL* 領域、*matK* 領域および *psbA-trnH* 領域のいずれかを用いるため、各試料の遺伝子解析を行った。塩基配列を解析するために、それぞれに対応したユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物をもとにシーケンス解析を行った。得られた塩基配列は、GENETYX Ver.13 (ゼネティックス) および BLAST を用いて解析した。

C. 研究結果及び考察

C-1. 有毒植物リアルタイム PCR 法の外部機関による妥当性確認試験

開発したプライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR における陽性コントロールプラスミドの反応特異性を解析した。作成した陽性コントロールプラスミドは、いずれの反応系においても特異的に増幅することが確認され、陽性コントロール

として使用可能であることが示された。

(図 2・1) 希釈系列による直線性は $R^2=0.893\sim 0.998$ であった。(図 2・2) 検出限界 (LOD) は、50 copies/ well (スイセン)、30 copies/ well (バイケイソウ)、100 copies/ well (イヌサフラン)、100 copies/ well (チョウセンアサガオ)、50 copies/ well (トリカブト) であった。(表 2) 妥当性確認試験においては 100 copies/well を低濃度試料、その 10 倍濃度を高濃度試料として用いた。

妥当性確認試験は配布可能な試料に限りがあることから、自然毒の分析経験がある外部 4 機関で行った (表 3)。

陰性試料として用いたトウモロコシ DNA 溶液はすべての機関で陰性であった。陽性プラスミドの高濃度試料では、すべての機関で陽性であり、低濃度試料 100 copies/ well でも一部を除きすべての参加機関で検出され良好な結果が得られた。機関 A では、スイセンおよびバイケイソウの低濃度プラスミド溶液において、2 ウェル並行の一方で検出できなかったが、リアルタイム PCR 装置の感度の問題かサンプルリング時の問題が考えられる。ほかの機関に比べてその他の試料 (プラスミド溶液および DNA 溶液) でも Ct 値が大きく出ている傾向があることから機器 (ABI7500) に依存したものと考えられた。食品残渣試料 (100 mg) では、必ずしも均一でない試料 (茹でもの及び卵とじ) を各機関で DNA 抽出から行ったが、調理加工されているものの植物を主に含む食品残渣であったためすべての機関で高濃度に検出された。DNeasy Plant Mini Kit を用いて抽出を

行うことで Cq 値にして 20 前後の値で特異的に検出され、極微量の試料でも検出可能と考えられた。一方で、食品残渣試料の DNA 溶液中のバイケイソウ及びスイセンの DNA 濃度が高いため、擬陽性もごく一部の機関で見られた。異なる種類の高濃度試料を扱う場合のコンタミ防止が重要と考えられた。

今回、妥当性確認には国立衛研で行った Roche 製 LightCycler96、ABI 社製 ABI-7500、ABI-7900HT の機種を用いて行ったが、いずれの機種でも同様の良好な結果が得られ、本法は有毒植物の確定検査法として有用と考えられた。

C-2 . 有毒植物 LAMP 法の開発

LAMP 法の標的植物は、有毒植物による食中毒で死亡事例もしくは発生事例の多い原因植物であるトリカブト、イヌサフラン、バイケイソウ、スイセン、チョウセンアサガオを選択した。LAMP 法を用いた検査法の構築のために、有毒植物および誤認されやすい食用植物を対象に標的遺伝子の塩基配列情報の解析が必要である。LAMP 法の標的とする遺伝子には、植物の DNA バーコード領域としてデータベースが整備されている ITS 領域、*rbcL* 領域、*matK* 領域および *psbA-trnH* 領域のいずれかを用いることにした。

遺伝子解析を行うにあたっては、その前処理として各試料から DNA を抽出する必要がある。そこで、5 種類の DNA 抽出法を実施し、どの方法が植物試料からの DNA 抽出に汎用性が高く、適しているか

を比較検討した。各試料から抽出した DNA 溶液の濃度値と電気泳動パターン (図 3) を検討した結果、CTAB もしくは PVPP を用いた抽出法と Plant mini kit 抽出で、分解の少ない高分子のゲノム DNA と思われるバンドが確認できた。DNA すいすいキット抽出では、サンプルによってバンドの位置が小さくなったものもあり、一部で分解が進んでいた可能性がある。また、DNA を一定量 (100 ng 以上/レーン) で泳動したが、電気泳動のバンドが薄かったため、分光光度計の定量値に対して影響を与える成分が残存していた可能性が考えられた。PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 抽出では、試薬の特性上、分光光度計による定量ができなかったため各レーンで 2 μ L ずつ泳動したがバンドが薄く、得られた DNA の濃度が低い結果となった。また、総体的にゲノム DNA のバンドサイズが他の抽出法に比べ小さくなっていったため、抽出工程 (100°C ボイル、10 分間) により DNA 分解が進行したと思われる。遺伝子解析の前処理としての DNA 抽出法は、得られた DNA の分解が少なく、抽出操作が容易であることが望ましいため、Plant mini kit 抽出を用いることにした。

そして、抽出後の DNA 溶液を用い、ITS 領域、*rbcL* 領域、*matK* 領域および *psbA-trnH* 領域それぞれのシーケンス解析を行った。得られた塩基配列情報とデータベース上の配列を比較検討し、有毒植物に特徴的な配列をターゲットに LAMP 法用プライマーの設計を行っている。なお、モロヘイヤやオクラでは、各 DNA 抽出行程で

粘度のある成分が DNA と同じ挙動をとり、最終的に得られた DNA 量が極端に低い結果になった。

D. 結論

有毒植物 5 種 (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) に対するリアルタイム PCR 検査法は、十分な感度、特異性、精度を持った方法で、中毒発生時確定法として有用である。

有毒および食用植物からの DNA 抽出では、CTAB、PVPP 抽出法と DNeasy Plant mini kit 抽出が分解の少ない DNA 溶液が得られた。遺伝子解析用 DNA 抽出法として、Plant mini kit 抽出が有用であった。ただし、LAMP 法実施の際には、200 bp 程度以下の短い DNA 断片領域を増幅することになるため、より短時間で DNA 抽出可能な PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 抽出も有用と考えられた。また、モロヘイヤやオクラなど粘度のある植物からの DNA 抽出は、一様に DNA 回収量が低い傾向があるため、さらなる検討の余地がある。今後は、設計したプライマーを使用して LAMP 法を実施し、検出感度や選択性を確認して実際の判別に有用なものを選出する。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takabatake, R., Kagiya, Y., Minegishi, Y., Futo, S., Soga, K., Nakamura, K., Kondo, K., Mano, J., Kitta, K. Rapid screening detection

of genetically modified crops by loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**, 7839-7845, 2018.

- 2) Soga, K., Nakamura, K., Kishine, M., Takashima, Y., Miyahara, T., Kimata, S., Mano, J., Takabatake, R., Ozeki, Y., Kitta, K., Kondo, K. Studies on the detection of maize genomic DNAs in cornflakes using real-time PCR. *Bulletin of National Institute of Health Sciences*, **136**, 31-39, 2018
邦文（リアルタイム PCR を用いたコーンフレーク中のトウモロコシゲノム DNA 検出について：曾我慶介、中村公亮、岸根雅宏、高嶋康晴、宮原平、木俣真弥、真野潤一、高畠令王奈、小関良宏、橘田和美、近藤一成）

2. 学会発表

- 1) Kondo, K., Kato, R., Sakata, K., Nakamura, K. Mitochondria-resident non-releasable AIF mutant may regulate gene expressions related to cell differentiation and proliferation, 2018 ASCB EMBO Meeting, San Diego, CA, USA, 2018 年 12 月
- 2) Nakamura, K., Kimata, S., Soga, K., Ohmori, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Kondo, K. Effect of food additives in processed foods on endogenous gene detection, 132nd AOAC Annual Meeting &

Exposition, Toronto, Canada, 2018 年 8 月

- 3) 曾我慶介、中村公亮、岸根雅宏、高嶋康晴、宮原平、木俣真弥、真野潤一、高畠令王奈、小関良宏、橘田和美、近藤一成：リアルタイム PCR を用いたコーンフレーク中のトウモロコシゲノム DNA 検出法の検討、第 54 回全国衛生化学技術協議会年会、神奈川、2018 年 11 月
- 4) 菅野陽平、青塚圭二、坂田こずえ、中村公亮、鈴木智宏、近藤一成：LAMP 法を用いた有毒キノコ迅速判別法の構築-ツキヨタケとクサウラベニタケの同時検出に関する検討-、日本食品化学学会 第 24 回 総会・学術大会、東京、2018 年 5 月
- 5) 木俣真弥、中村公亮、石垣拓実、曾我慶介、岸根雅宏、高畠令王奈、橘田和美、近藤一成：ダイズにおけるゲノム DNA の位置に依存した DNA 分解度の違い、日本食品化学学会 第 24 回 総会・学術大会、東京、2018 年 5 月
- 6) 坂田こずえ、木村圭介、後藤操、菅野陽平、野村千枝、加藤怜子、近藤一成：リアルタイム PCR を用いた有毒植物検査法の妥当性確認、日本食品衛生学会 第 114 回学術講演会、広島、2018 年 11 月
- 7) 加藤怜子、坂田こずえ、近藤一成：Apoptosis-inducing factor の L101/103G 変異体は細胞増殖と神経突起形成を阻害する、第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、2018 年 11 月

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表 1. 各有毒植物の *matK* 反応系プライマー・プローブの配列

Primers and Probe	sequence (5'-3')	amplicon size (bp)
<i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i> (スイセン検知系)		
Narcissus_ <i>matK</i> -F1	CTTTTGGAACTTTTCTTGAACGAACAC	125
Narcissus_ <i>matK</i> -R1	GAAAGGATCTTTGAAGAACCAGGAG	
Narcissus_ <i>matK</i> -P1	FAM-TCCTATGAAAATCGTTACGA-MGB	
<i>Veratrum album</i> subsp. <i>oxysepalum</i> (バイケイソウ検知系)		
Veratrum_ <i>matK</i> -F1	CGCAATGTTTTGAAAAGATTAGGTTCTGA	119
Veratrum_ <i>matK</i> -R1	GATCCATGTAAAGTAAAAGGAAAAAGGGT	
Veratrum_ <i>matK</i> -P1	FAM-TTGATCTTCGCGCAAACA-MGB	
<i>Colchicum autumnale</i> (イヌサフラン検知系)		
Colchicum_ <i>matK</i> -F2	CAGGATCCATATCAACCAATTA AAAAACC	97
Colchicum_ <i>matK</i> -R2	CATTTTGT TTTTGACCGCCAAGGG	
Colchicum_ <i>matK</i> -P2	FAM-TCCTTTTGGGGGATATTT-MGB	
<i>Datura metal</i> (チョウセンアサガオ検知系)		
Datura_ <i>matK</i> -F6	GAGGGATTTCCATTTATTITGGAAATG	122
Datura_ <i>matK</i> -R6-2	GGAAATGTTGAATGAATTGATCGGAAG	
Datura_ <i>matK</i> -P6	FAM-TATCTTCTTTTGAAGGC-MGB	
<i>Aconitum japonicum</i> ssp. <i>subcuneatum</i> (トリカブト検知系)		
Aconitum_ <i>matK</i> -F1	ATCACTGGCTAAATCGAAATTTTGTA	100
Aconitum_ <i>matK</i> -R1	ACCAAATCTATCGATAATATCAGAATCG	
Aconitum_ <i>matK</i> -P1	FAM-CCATCAGTAAGCCGACTTGGGCCG-BHQ1	

表 2. 陽性コントロールプラスミド検知限界

	(copies/well)	Cq Mean	Cq Error	TRUE
<i>Narcissus</i>	30	41.46	0.89	25%
	40	42.38	0.47	58%
	50	39.54	0.87	100%
	100	38.09	0.64	100%
<i>Veratrum</i>	30	37.16	1.54	100%
	40	36.25	1.10	100%
	50	37.40	1.44	100%
	100	35.79	1.10	100%
<i>Colchicum</i>	30	38.11	0.18	33%
	40	39.60	2.36	58%
	50	38.29	1.58	83%
	100	37.18	0.61	100%
<i>Datura</i>	30	39.2	2.24	33%
	40	39.82	0.54	58%
	50	38.31	1.51	58%
	100	37.66	0.81	100%
<i>Aconium</i>	30	38.62	1.19	83%
	40	38.05	0.69	83%
	50	38.22	1.02	100%
	100	35.12	7.84	100%

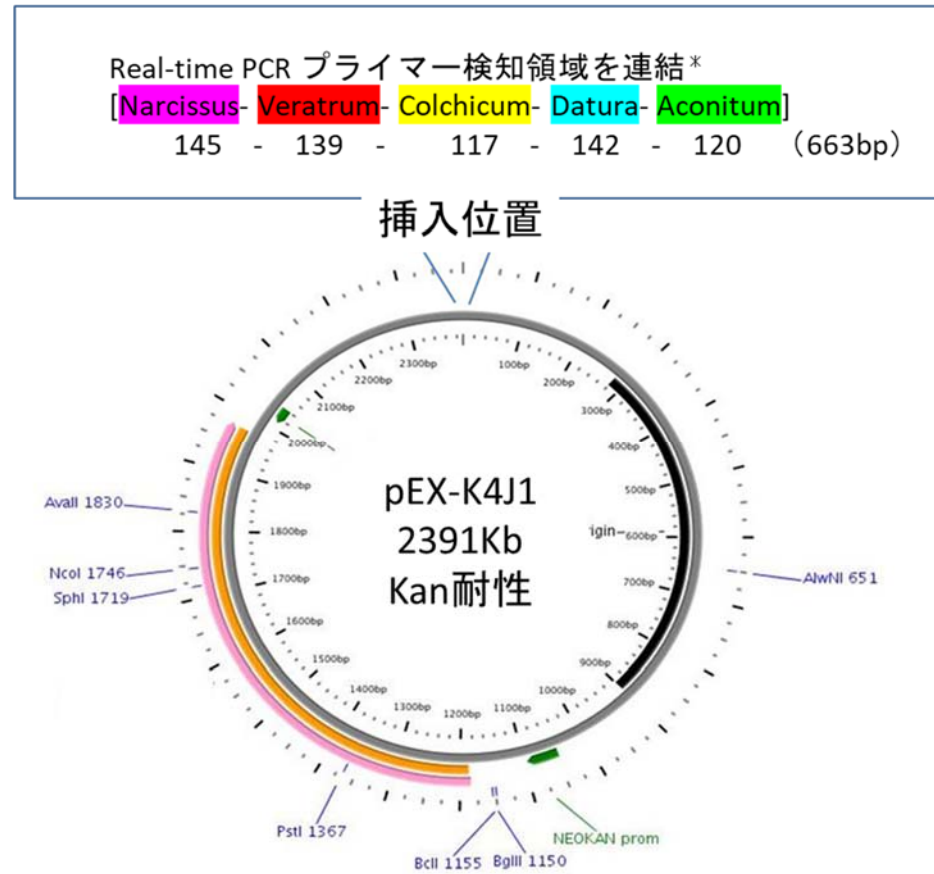
表 3. 妥当性確認試験結果の一覧

検出系	使用機種	2 回試行 (2wells x 2tests)	ブラインドサンプル/Ct 値または Cq 値						食品残渣抽出サンプル	
			DW (NTC)	maize DNA (Negative control)	Plasmid Low (100 copies/well)	Plasmid High (1000 copies/well)	gDNA Low (1 pg/well)	gDNA High (10 pg/well)	バイケイソウ (Veratrum)	スイセン (Narcissus)
スイセン	機関 A AB7500	1	ND	ND	41.1	37.7	34.7	39	/40.9	25.7
		2	ND	ND	ND/40	37.1	36	38.3	/39.7	25.5
		正答率	100%	100%	75%	100%	100%	100%	50%	100%
	機関 B AB7900	1	ND	ND	40.6	36.1	36.7	33.3	ND	18.1
		2	ND	ND	39.9	36.5	37.8	34.1	ND	18.4
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 C AB7900	1	ND	ND	41.9	35.5	35.9	32.5	ND	19.2
		2	ND	ND	40.4	37	38.5	34.9	ND	20.6
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 D LC96	1	ND	ND	38.1	35.4	37.4	34.2	ND	15.8
		2	ND	ND	39	35.8	37	34.1	ND	16.5
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
バイケイソウ	機関 A AB7500	1	ND	ND	ND/41.9	37.2	35.5	32.2	19.9	/40.3
		2	ND	ND	40	37.7	36.4	32.4	19.6	ND
		正答率	100%	100%	75%	100%	100%	100%	19.75	75%
	機関 B AB7900	1	ND	ND	39.1	35.1	34.1	30.3	17	ND
		2	ND	ND	37.4	35.1	34.4	31	17	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 C AB7900	1	ND	ND	39.2	36.6	35.1	31.3	17.4	ND
		2	ND	ND	40.46	35.1	34.4	30.9	16.6	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 D LC96	1	ND	ND	34.5	31.7	31.7	28.2	14.9	/36.2
		2	ND	ND	35.2	32	31.3	28.4	15	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	75%
イヌサフラン	機関 A AB7500	1	ND	ND	37.6	36.2	34.7	30.8	ND	ND
		2	ND	ND	38.2	35.1	35.3	31.6	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 B AB7900	1	ND	ND	37.7	33.6	32.8	28.9	ND	ND
		2	ND	ND	37.6	34.5	32.9	29.6	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

	機関 C AB7900	1	ND	ND	37.5	34.7	33.7	29.6	ND	ND
		2	ND	ND	39.1	33.3	31.9	27.6	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 D LC96	1	ND	ND	36.5	32.9	32.6	28.2	ND	ND
		2	ND	ND	35.7	32.5	32	27.6	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
チョウセンアサガオ	機関 A AB7500	1	ND	ND	38.3	36.3	33.3	29.7	ND	ND
		2	ND	ND	37.8	35	34	29.6	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 B AB7900	1	ND	ND	37.7	34.1	31.7	28.3	ND	ND
		2	ND	ND	37.3	33.5	31.3	27.9	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 C AB7900	1	ND	ND	39.5	35.6	34.9	31.5	ND	ND
		2	ND	ND	37.5	35.1	36	31.9	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 D LC96	1	ND	ND	37.2	34	32.6	28.2	ND	ND
		2	ND	ND	37.5	33.7	32.7	28.7	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
トリカブト	機関 A AB7500	1	ND	ND	40.3	35.6	35.8	27.6	ND	ND
		2	ND	ND	39.9	36.7	37.1	31.1	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 B AB7900	1	ND	ND	38.4	35	34.3	30.8	ND	ND
		2	ND	ND	38.4	34.3	34.7	31	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 C AB7900	1	ND	ND	39.5	35.6	34.9	31.5	ND	ND
		2	ND	ND	37.5	35.1	36	31.9	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	機関 D LC96	1	ND	ND	36.5	33.5	33.1	29.6	ND	ND
		2	ND	ND	37	32.8	33.4	29.5	ND	ND
		正答率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

ND:Not Detected

図 1. 陽性コントロールプラスミド概要



* GC含量調整のため追加 (681bp)

cgcCGATTAACATCTTTTGGAACTTTTCTTGAACGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAACATCTTCAAATAGAAAATTTTATAGTAATTTGTCGTAACGATTTTCATAGGACC
TCCTGGTTCTTCAAAGATCCTTTTCATGCATTATGccgAAGTACGGTACGCAATGTTTTGAAAAGATTAGGTTTCGAGATTATTAGAGGAATTCCTTACGGGAAGAAGATCAAGT
TATTTCTTGATCTTCGCGCAAACAACCTTTTCTTTTACTTTACATGGATCAGATAGAGAAccgAATGATCTAACATTTTGTGTTTGACCGCCAAGGGATTTATTAGTACAC
TTGAAAAATATCCCCAAAAGGAAGGAATGGTTTTTAATTGGTTGATATGGATCCTGTATGAGTAAGcggAATGATATCAGAGGGATTTCATTTATTGTGAAAATGCCG
TTTTCTACgATTAATATCTTCTTATCTTCTTTGAAAGGCAAAAAGATTTTAAAATCTCATAACTCCGATCAATTATTCAACATTTCTTTTTAGAGcggCTTTGATTGAA
TCACTGGCTAAATCGAAAATTTGTAACCTTATCAGGGCATCCCATCAGTAAGCCGACTTGGCCGATTCCGATTCTGATATTATCGATAGATTTGGTCGAATATGCAgcg

図 2-1 陽性コントロールプラスミド特異性

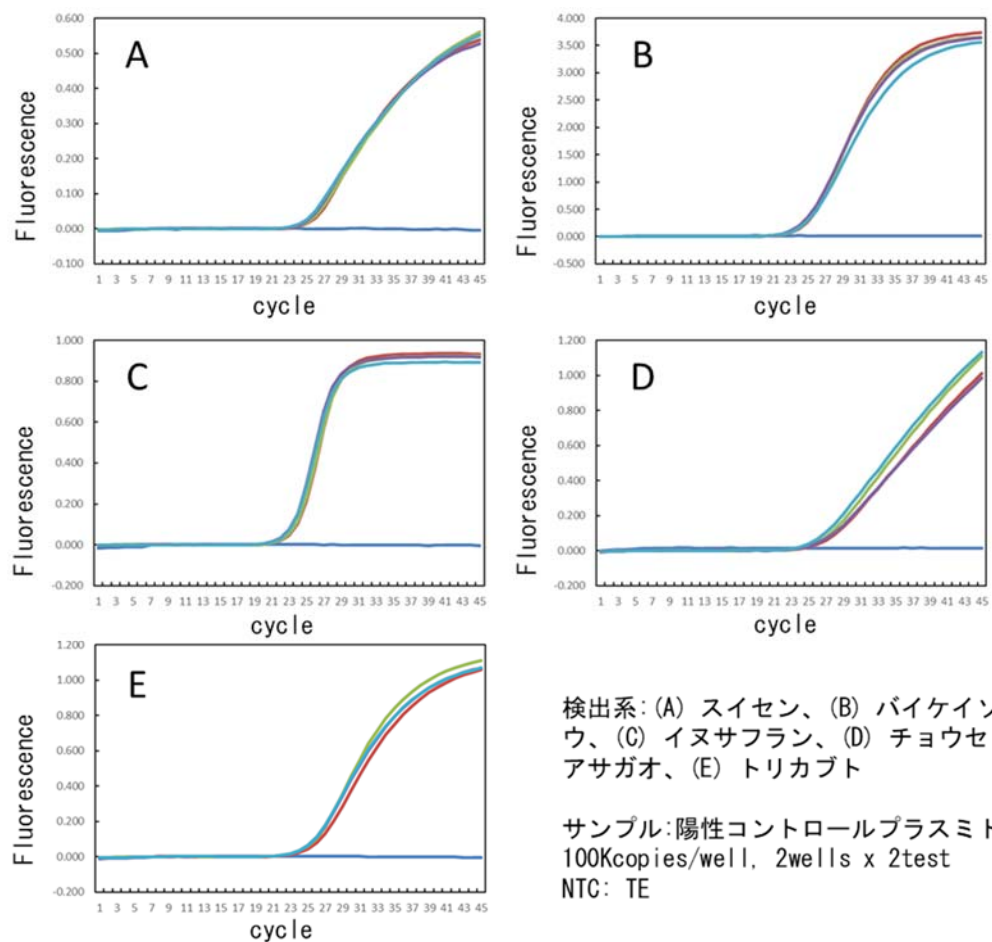


図 2-2 陽性コントロールプラスミド希釈直線

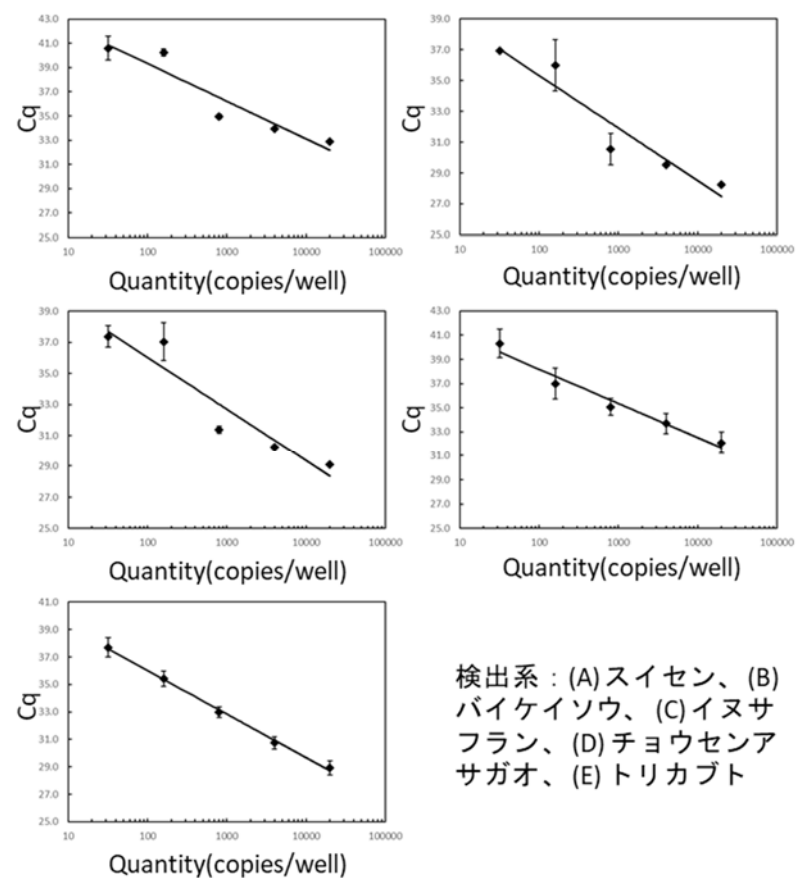


図 3. 有毒植物および食用植物から抽出したゲノム DNA のアガロース電気泳動

