

リアルタイムPCRによるニガクリタケ及びクリタケの判別法

門間 公夫^{a,b}, 牛山 博文^b, 永山 敏廣^{c,d}

ニガクリタケ及びクリタケを迅速に判別するため、リアルタイムPCR法を開発した。新規に設計したプライマー及びプローブを用い、Threshold lineを0.200に設定し、Ct値が35以下での増幅の観察を行うことにより、これらを判別できた。さらに、開発したリアルタイムPCR法の特異性を確認するために14種のキノコ（エリンギ、マイタケ、ブナシメジ、ブナシメジ（ブナピー®）、シイタケ、エノキタケ、ナメコ、ツクリタケ（ブラウン種）、ツクリタケ（ホワイト種）、ムキタケ、ツキヨタケ、チャナメツムタケ、ヌメリスギタケ、ムラサキシメジ）ならびに14種の農作物（ニンジン、ダイコン、カイワレ、ネギ、シュンギク、ハクサイ、ミツバ、ミズナ、ジャガイモ、タマネギ、アスパラガス、ナス、ゴーヤ、キャベツ）について、本法で試験を行った結果、これらキノコ及び農作物では非特異的な増幅は見られなかった。これらの結果により、本法はニガクリタケ及びクリタケを判別するための有用な試験法になりえるものと考えられた。

キーワード：ニガクリタケ、クリタケ、リアルタイムPCR、判別

はじめに

モエギダケ科のクリタケ(*Hypholoma sublateritium*)

(Photo 1A.)は日本全域に分布する傘径が3~8 cm程度の栗色から茶色のキノコで、ミズナラ、ナラ、クリ、ブナ等の木に発生し、食用可能とされている。一方、クリタケと同じモエギダケ科に属するニガクリタケ(*Hypholoma fasciculare*) (Photo 1B.)は傘径が2~5 cm程度のレモン色から茶色のキノコで、有毒成分のファシキユロール、ファシキユリン酸、ムスカリンを含有し、摂食すると嘔気、嘔吐、下痢等の症状を起し、重篤な場合は死亡のおそれもある¹⁻³。



Photo 1. Target Mushrooms Used in This Study

A: Kuritake (*Hypholoma sublateritium*), Sample No. 1
B: Nigakuritake (*Hypholoma fasciculare*), Sample No. 5

ニガクリタケは食用のクリタケに形態が類似するため、キノコ狩りでクリタケと誤って採取して摂食し、食中毒を起こした事例やイベントや食料品店で誤販売された事例が散発している³⁻⁷。

ニガクリタケに起因すると考えられる食中毒が発生した場合には、原因を特定するため専門家による判別が行われる。しかし、キノコは発生場所、発生段階、発生時期等によって色や形態が異なることもあるため、専門家でも判別が困難な場合もある。また、判別に用いられる残品が少量で形態が保持されていない場合は、外部形態からの判別は困難である。我々はこれまで外部形態保持されていない有毒植物や魚種を少量の試料からでも判別する目的でPCR法の開発を行ってきた⁸⁻¹²。本法では、少量の試料から精度良くニガクリタケとクリタケの判別を行うためリアルタイムPCRを用いた検査法の検討を行ったので以下、報告する。

実験方法

1. 試料

陽性試料としてニガクリタケ2検体、クリタケ4検体、特異性確認用試料としてエリンギ、マイタケ、ブナシメジ、ブナシメジ（ブナピー®）、シイタケ、エノキタケ、ナメコ、ツクリタケ（ブラウン種）、ツクリタケ（ホワイト種）、ムキタケ、ツキヨタケ、チャナメツムタケ、ヌメリスギタケ及びムラサキシメジならびに農作物14種を用いた（Table 1, Table 2）。また、実用性の確認には野外で採

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 当時：東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科

^c 当時：東京都健康安全研究センター食品化学部

^d 現所属：明治薬科大学

204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1

Table 1. List of Mushroom Samples Used in This Study

No.	Sample name	Scientific name	Remark	No.	Sample name	Scientific name	Remark
1	Kuritake	<i>Hypholoma sublateritium</i>	PC ^{a)} , Y ^{b)}	11	Murasakisimeji	<i>Lepista nuda</i>	NC, OS, M
2	Kuritake	<i>Hypholoma sublateritium</i>	PC, Y	12	Nameko	<i>Pholiota microspora</i>	NC, OS, M
3	Kuritake	<i>Hypholoma sublateritium</i>	PC, Y	13	Eringi	<i>Pleurotus eryngii</i>	NC, SM ^{f)}
4	Kuritake	<i>Hypholoma sublateritium</i>	PC, OS ^{c)} ,	14	Maitake	<i>Grifola frondosa</i>	NC, SM
5	Nigakuritake	<i>Hypholoma fasciculare</i>	PC, Y	15	Bunashimeji	<i>Hypsizygus tessellatus</i>	NC, SM
6	Nigakuritake	<i>Hypholoma fasciculare</i>	PC, Y	16	Bunapi (Whight bunashimeji)	<i>Hypsizygus tessellatus</i>	NC, SM
7	Mukitake	<i>Sarcomyxa serotina</i>	NC ^{c)} , Y	17	Shiitake	<i>Lentinula edodes</i>	NC, SM
8	Tsukiyotake	<i>Omphalotus guepiniformis</i>	NC, Y	18	Enokitake	<i>Flammulina velutipes</i>	NC, SM
9	Chanametsumutake	<i>Pholiota lubrica</i>	NC, OS, M	19	Tsukuritake (Braun)	<i>Agaricus bisporus</i>	NC, SM
10	Numerisugitake	<i>Pholiota adiposa</i>	NC, OS, M	20	Tsukuritake (White)	<i>Agaricus bisporus</i>	NC, SM

a): Used for positive control, b): Hunted in Hokuto, Yamanashi, c): Purchased in online shopping, d): Hunted in Ohsaki, Miyagi, e): Used for confirmation of singularity, f): Purchased in supermarket

Table 2. List of Crops Used for Confirmation of Singularity in This Study

No.	Sample name	Scientific name	No.	Sample name	Scientific name
1	Carrot	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>Sativus</i>	8	Cabbage	<i>Brassica oleracea</i>
2	Green onion	<i>Allium fistulosum</i>	9	Onion	<i>Allium cepa</i>
3	Edible chrysanthemum	<i>Glebionis coronaria</i>	10	Kaiware ^{a)}	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>hortensis</i>
4	Napa cabbage	<i>Brassica rapa</i> var. <i>pekinensis</i>	11	Japanese honeysuckle	<i>Cryptotaenia canadensis</i> subsp. <i>japonica</i>
5	Asparagus	<i>Asparagus officinalis</i>	12	Potherb mustard	<i>Brassica rapa</i> var. <i>laciniifolia</i>
6	Eggplant	<i>Solanum melongena</i>	13	Potato	<i>Solanum tuberosum</i>
7	Bitter melon	<i>Momordica charantia</i>	14	Japanese radish	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>hortensis</i>

These crops were purchased in supermarket.

a): Japanese radish sprouts

取した外部形態がニガクリタケ及びクリタケ判別されたキノコ24検体を用いた。これらの試料は水洗水切り後、DNAの抽出を行うまで-80°Cの冷凍庫で保存した。

2. 試薬

1) プライマー及びプローブ

DDBJが公開しているマルチプルアライメントツールのClustalWを用いてニガクリタケとクリタケの塩基配列を比較し、5.8S rRNAから28S rRNAをコードする遺伝子領域に

これらキノコに特異的なプライマー対（ニガクリタケ用TNIKUR-F2/TNIKUR-R2、クリタケ用TKUR-F2/TKUR-R2）とMGBプローブ（ニガクリタケ用TNIKUR-P2、クリタケ用TKUR-P2）の設計を行った。Table 3に本研究に用いたプライマー及びプローブの塩基配列を示した。また、Fig.1にプライマー及びプローブ位置の模式図を示した。

2) その他の試薬

試薬特級品または分子生物学用を用いた。

Table 3. List of Primers and MGB Probes for Target Mushrooms Used in This Study

Primer name	Target	Sequence	Amplicon	Origin
TR03	Eukaryote	5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3'	137 bp	ref. 13
TR04		5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'		
TNIKUR-F2	<i>Hypholoma fasciculare</i>	5'-GAGTGTCATTAATTCTCAACCTTTAT-3'	141 bp	This study
TNIKUR-R2		5'-CGTAGATAATTATCACACCAATAGACAT-3'		
TNIKUR-P2		5'-(FAM)-CATGTTGGTTTCTTCAT-(NFQ)(MGB)-3'		
TKUR-F2	<i>Hypholoma sublateritium</i>	5'-GTCATTAATTCTCAACCTTTGC-3'	148 bp	This study
TKUR-R2		5'-TCACACCAATAGACAGGTTCA-3'		
TKUR-P2		5'-(FAM)-TATGCAGGTTTCTGTAA-(NFQ)(MGB)-3'		

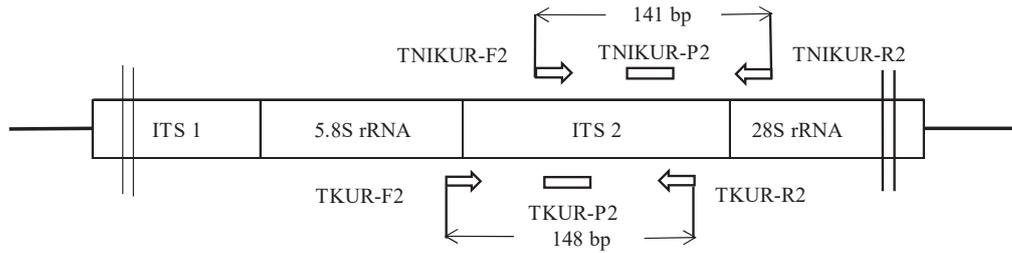


Fig. 1. Schematic Diagram of Primers and MGB Probes Designed for Nigakuritake (*Hypholoma fasciculare*) and Kuritake (*Hypholoma sublateritium*)

3. 装置

遠心機：ラボ用冷却遠心機3617型（久保田商事製），分光光度計：Ultrospec 3300 pro（アマシャムファルマシアバイオテク社製），サーマルサイクラー：GeneAmp PCR System 9700（アプライドバイオシステムズ社製），リアルタイムPCR装置：ABI PRISM™ 7900HT（アプライドバイオシステムズ社製），電気泳動装置：Mupid-2Plus（アドバンス社製），UV照射装置 NTM-15（UVP社製），ポラロイドカメラ DL-300L（フナコシ製）。

4. DNAの抽出

植物からのDNA抽出に広く使用されているDNeasy plant mini Kit（キアゲン社製）を用いて，キット添付の操作手順書に従ってDNAの抽出を行った。抽出したDNAは波長260 nmの吸光度を分光光度計で測定し濃度を算出後に実験に供した。

5. PCR

1) 単一PCR条件

PCR反応液は，最終濃度が1×PCR緩衝液（2 mmol/L MgCl₂含有），0.2 mmol/L dNTPs，0.5 μmol/Lのフォワードプライマー，リバースプライマーならびに反応液25 μL当たり1.0 unitsのDNAポリメラーゼ（Takara EX Taq）と鋳型のDNA1.6 ngを加え調製した。PCRは，熱変性（98°C 10秒

間），アニーリング（60°C 30秒間），伸長反応（72°C 1分間）を1サイクルとして40サイクルの増幅反応を行った。

2) リアルタイムPCR条件

PCR反応液は1wellあたり，TaqMan Universal PCR Master Mix 12.5 μL，50 μmol/Lのフォワードプライマー及びリバースプライマーをそれぞれ0.14 μL，10 μmol/LのTaqMan MGBプローブ0.5 μL，2.5 ngの抽出DNAを加えた後，水で25 μLになるように調製した。PCRは，50°C 2分間保持，95°C 10分間加温後，95°C 30秒，60°C 1分間を1サイクルとして9600エミュレーションモードで45サイクルの増幅反応を行った。データ解析の際はThreshold lineを0.20に設定した^{10,14,15}。

結果及び考察

1. 鋳型DNA量の検討

通常，我々はPCRにおいて，1反応当たり25 μLの系では，5 ng/μLに調製した抽出DNA溶液2.5 μL（DNAとして12.5 ng）を鋳型にし，PCRを行い良好な結果を得ている。

しかし，真核生物検知用ユニバーサルプライマーのTR03/TR04のペアを用いて，実験に供したキノコ及び農作物試料から抽出したDNAを鋳型にPCRを実施し，アガロースゲル電気泳動を行った結果，ニガクリタケを除く試料からは予想されるバンドが観察されたものの，ニガクリタケではバンドが観察されなかった。これにより，ニガクリタケにはPCR増幅反応を阻害する物質を含有する可能性が示唆された。ニガクリタケについては検討されていないが日高ら¹⁶の報告によると，エノキタケとツクリタケにはPCR増幅反応を阻害する物質の存在の可能性が指摘されている。そこで，ニガクリタケから抽出したDNA溶液を5 ng/μLに調製後，2倍希釈系列で128倍まで希釈した8濃度のDNA溶液2.5 μL（0.1~12.5 ng）を鋳型にPCRを行った（Fig. 2）。

その結果，鋳型量が0.1~6.3 ngの範囲ではバンドが観察されたが，鋳型量が0.1 ngと6.3 ngではやや薄いバンドであった。鋳型量が多い12.5 ngでは，予想されるバンドは観察されず，PCR反応阻害物質の存在が確認された。鋳型量が0.1 ngの場合は鋳型量が少ないことによりバンドが薄くなったことが考えられた。一方，鋳型量が6.3 ngの場合は阻

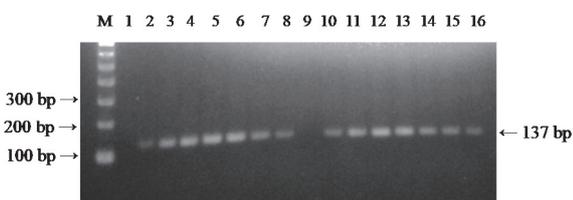


Fig.2 Agarose Gel Electrophoresis of PCR Amplified Products for Nigakuritake (*Hypholoma fasciculare*)

PCR was done with primer pair TR03 and TR04.
DNA template were used two-fold serial dilutions (12.5 - 0.1 ng) of extracted DNA from Nigakuritake No.5.
M: 100bp Ladder, Amount of template: Lane 1, 9 (12.5 ng), Lane 2, 10 (6.3 ng), Lane 3, 11 (3.1 ng), Lane 4, 12 (1.6 ng), Lane 5, 13 (0.8 ng), Lane 6, 14 (0.4 ng), Lane 7, 15 (0.2 ng), Lane 8, 16 (0.1 ng)

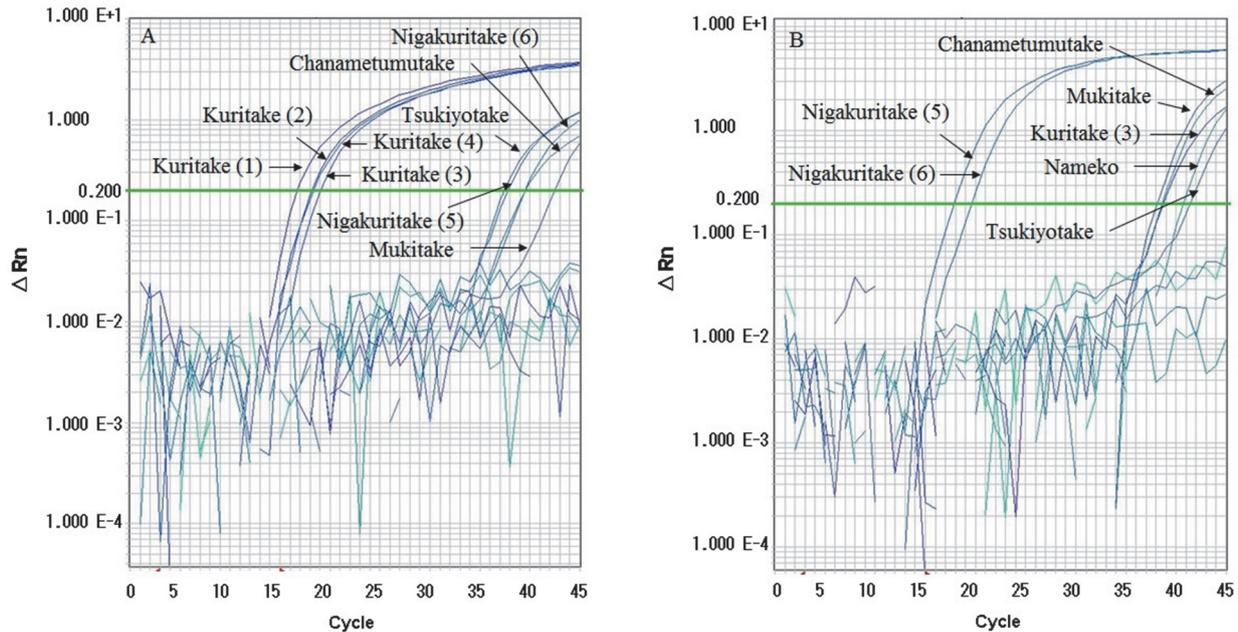


Fig. 3. Amplification Curves of Real-Time PCR Detection for Nigakuritake (*Hypholoma fasciculare*), Kuritake (*Hypholoma sublateritium*) and Various Mushroom Samples

A, Samples were tested with primer set (TKUR-F2/TKUR-R2) and probe (TKUR-P2) for Kuritake. B, Samples were tested with primer set (TNIKUR-F2/TNIKUR-R2) and probe (TNIKUR-P2) for Nigakuritake. The samples used for this experiment were shown in Table 1. The samples number of Kuritake and Nigakuritake were indicated in parentheses.

害物質の影響によりPCR反応が抑制されバンドが薄くなったものと考えられた。これらの結果より、ニガクリタケを対象とするPCRでは、抽出DNA溶液を希釈し、鋳型量を0.8~3.1 ngに調整することにより阻害物質の影響を除去できるものと考えられた。

2. リアルタイムPCRの特異性確認

プライマー対 (TKUR-F2/TKUR-R2) とプローブ (TKUR-P2) を用いたクリタケの検出系で、Table 1. に示したキノコ類についてリアルタイムPCRを実施した。その結果、クリタケでは4試料全てで16から18サイクルで明確な増幅曲線の立ち上がりが見られた。また、ニガクリタケ (No. 5) とツキヨタケでは37サイクル、ニガクリタケ (No. 6) とチャナメツムタケでは38サイクル、ムキタケでは41サイクルから増幅曲線の立ち上がりが見られ、サイクル数の増加とともに ΔRn 値は増加したが、実験に供したその他のキノコでは増幅曲線の立ち上がりは見られなかった。Threshold Lineが0.200におけるCt値は、クリタケNo. 1で16.70, No. 2で18.12, No. 3で18.29, No. 4で19.01, ニガクリタケNo. 5で37.76, No. 6で39.48, ツキヨタケで37.40, チャナメツムタケで39.53, ムキタケで42.43であった (Fig. 3. A)。クリタケのCt値が16.70から19.01であったのに対して増幅曲線の立ち上がりが見られたクリタケ以外キノコのCt値は37.4より大きく、クリタケと他のキノコを明

確に区別することができた。

また、プライマー対 (TNIKUR-F2/TNIKUR-R2) とプローブ (TNIKUR-P2) を用いたニガクリタケの検出系においては、ニガクリタケ (No. 5) では17サイクル、ニガクリタケ (No. 6) では18サイクル、クリタケ (No. 3)、チャナメツムタケ及びムキタケでは37サイクル、ツキヨタケとナメコでは40サイクルから増幅曲線の立ち上がりが見られたが、その他のキノコでは立ち上がりは見られなかった。Ct値はニガクリタケ (No. 5) で16.70, ニガクリタケ (No. 6) で19.56, ムキタケで38.14, チャナメツムタケで38.64, クリタケ (No. 3) で38.72, ナメコで40.75, ツキヨタケで41.42であった (Fig. 3. B)。ニガクリタケのCt値が16.70から19.56であるのに対して、ニガクリタケの以外のキノコのCt値は38.14より大きな値であり、明確に両者を区別することができた。

なお、本法の特異性を確認するため、食材に使用されるTable 2に示す農作物の調理における混入を想定して、これら農作物から抽出したDNAを鋳型に、クリタケ及びニガクリタケの検出系でリアルタイムPCRを実施した。その結果、いずれの農作物においても増幅曲線の立ち上がりは見られなかった (データ非掲載)。

これらの結果より、新規に開発したクリタケ及びニガクリタケ用のプライマー対ならびにプローブを用いた場合、クリタケの検出系ではCt値が35以下、ニガクリタケの検出

Table 4. Results of Real-time PCR for Mushrooms Identified as Kuritake or Nigakuritake by Shape Based Identification

No.	Shape based identification	Ct value		Judgment	Remark
		A ^{a)}	B ^{b)}		
1	Kuritake	22.35	36.76	K ^{d)}	Hunted in Minamisaku, Nagano
2	Kuritake	22.66	37.01	K	Hunted in Minamisaku, Nagano
3	Nigakuritake	UD ^{c)}	18.07	N ^{e)}	Hunted in Minamisaku, Nagano
4	Nigakuritake	UD	19.79	N	Hunted in Kai, Yamanashi
5	Nigakuritake	UD	18.48	N	Hunted in Kai, Yamanashi
6	Nigakuritake	UD	17.42	N	Hunted in Kai, Yamanashi
7	Nigakuritake	UD	17.21	N	Hunted in Kai, Yamanashi
8	Kuritake	16.39	UD	K	Hunted in Kai, Yamanashi
9	Nigakuritake	36.06	14.88	N	Hunted in Nakanojo, Gunma
10	Kuritake	17.77	43.11	K	Hunted in Nakanojo, Gunma
11	Kuritake	23.00	36.51	K	Hunted in Hokuto, Yamanashi
12	Kuritake	17.57	UD	K	Hunted in Hokuto, Yamanashi
13	Kuritake	17.27	42.00	K	Hunted in Hokuto, Yamanashi
14	Nigakuritake	36.23	19.82	N	Hunted in Nasu, Tochigi
15	Kuritake	16.00	41.33	K	Purchased in online shopping
16	Kuritake	19.66	UD	K	Purchased in online shopping
17	Nigakuritake	UD	20.01	N	Hunted in Hachioji, Tokyo

Threshold lines were set at 0.200. Detection of target was judged at Ct values less than 35.

a): Samples were tested with primer set (TKUR-F2/TKUR-R2) and probe (TKUR-P2) for Kuritake, b): Samples were tested with primer set (TNIKUR-F2/TNIKUR-R2) and probe (TNIKUR-P2) for Nigakuritake, c): undetermined, d): Kuritake, e): Nigakuritake

系ではCt値が37以下の場合に陽性と判定できたが、検出対象以外のキノコでの増幅曲線の立ち上がりを考慮して、クリタケ及びニガクリタケともにCt値が35以下の場合に陽性と判断することにした。

3. 実用性の確認

本法の実用性を確認するため、外観からクリタケ及びニガクリタケと判定された野外で採取した17試料についてリアルタイムPCRを実施し、その結果をTable 4に示した。

外観からクリタケと判別された9試料では、クリタケの検出系において、Ct値は16.00から23.00の範囲にあった。9試料全てで判断基準のCt値35以下であったことから、リアルタイムPCRにおいても、クリタケと判別された。なお、外観からニガクリタケと判別された2試料 (No. 9, No. 14) でも増幅曲線の立ち上がりが見られたが、Ct値は36.06及び36.23で、判定基準の35より大きな値であり、クリタケとは判別されなかった。

外観からニガクリタケと判別された8試料では、ニガクリタケの検出系において、Ct値は14.88から20.01の範囲にあった。8試料全てで判断基準のCt値35以下であったことから、リアルタイムPCRにおいても、ニガクリタケと判別された。なお、外観からクリタケと判別された6試料 (No. 1, No. 2, No. 10, No. 11, No. 13, No. 15) でも増幅曲線の立ち上がりが見られたが、Ct値は36.51から43.11で、判定基準

の35より大きな値であり、ニガクリタケとは判別されなかった。リアルタイムPCRによる判別結果は外観によるクリタケ及びニガクリタケの判別結果とすべて一致した。

これらの結果より、外部形態から判別が困難な試料においても、本研究で新規に設計したプライマー及びプローブを用いることにより特異性の高いクリタケ及びニガクリタケのリアルタイムPCRによる判別が行えるものと考えられた。

今後はさらに迅速、経済的にクリタケとニガクリタケの判別を実施するため、リアルタイムマルチプレックスPCR法等の検討を行う必要がある。

ま と め

ニガクリタケとクリタケの判別を行う目的でリアルタイムPCR法を開発した。新規に設計したプライマーとプローブを用い、Threshold lineを0.200に設定し、Ct値が35以下での増幅を観察することにより、これらを判別することができた。また、特異性を確認するため14農作物についてリアルタイムPCRを実施したところ、いずれの農作物においても増幅は見られず特異性の確認ができた。

謝 辞 本研究を行うにあたり、試料の提供及び鑑別等にご協力いただきました東京都健康安全センターの観公子氏、元東京都立健康安全センターの岩崎由美子氏に深謝い

たします。

文 献

- 1) 長沢栄史：増補改訂フィールドベスト図鑑 13 日本の毒きのこ，2009，学研，東京。
- 2) D.L.ラージェント，D.ジョンソン，R.ワトリング：図解 きのこ鑑別法 マクロとミクロによる属の見分け方，2010，西村書店，東京。
- 3) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル キノコニガクリタケ。
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000142698.html> (2021年7月1日現在。なお本URLは変更または消滅の可能性がある)
- 4) 食品安全委員会：毒キノコ（ニガクリタケ等）による食中毒防止について，平成22年10月4日。
https://www.fsc.go.jp/sonota/shokutyudoku/shokutyudoku_nigakuritake.pdf (2021年7月1日現在。なお本URLは変更または消滅の可能性がある)
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：食安監発1006第1号，植物性自然毒を原因とする食中毒防止の徹底について，平成22年10月6日。
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000142698.html> (2021年7月1日現在。なお本URLは変更または消滅の可能性がある)
- 6) 下井俊子，田口信夫，観公子，他：東京健安研七周年報，**62**, 205-208, 2011.
- 7) 山浦由郎：中毒研究，**26**, 39-43, 2013.
- 8) 門間公夫，大石充男：東京健安研七周年報，**68**, 109-115, 2017.
- 9) 寺井朗子，浅倉弘幸，大貝真美，他：食衛誌，**59**, 174-182, 2018.
- 10) 門間公夫，牛山博文，井部明広：東京健安研七周年報，**71**, 127-133, 2020.
- 11) 門間公夫，大石充男，牛山博文：東京健安研七周年報，**72**, 171-175, 2021.
- 12) 門間公夫，田端節子，牛山博文：東京健安研七周年報，**72**, 185-190, 2021.
- 13) Pietrzak, M., Shillito, R. D., Hoho, T., Potrykus, *et al.*, : *Nucleic Acids Res.*, **14**, 857-868, 1986.
- 14) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：食安発1116第3号，安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法について，平成24年11月16日。
- 15) 鶴田小百合，坂本智徳，赤木浩，他：食衛誌，**51**, 110-114, 2010.
- 16) 日高史典，李燕，霜村典宏，他：日本きのこ学会誌，**18**, 13-16, 2010.

Development of Real-time PCR for Discrimination of Nigakuritake (*Hypholoma fasciculare*) and Kuritake (*Hypholoma sublateritium*)

Kimio MONMA^a, Hirofumi USHIYAMA^b and Toshihiro NAGAYAMA^{b,c}

We developed a real-time PCR method to quickly discriminate between Nigakuritake (*Hypholoma fasciculare*) and Kuritake (*Hypholoma sublateritium*) in small amount of starting material. Nigakuritake and Kuritake were first discriminated by performing a real-time PCR using newly designed primer pairs and probes specific to each species. Then, a threshold line was set at 0.200. Amplification was observed at Ct values less than 35 for Nigakuritake and Kuritake. Next, we tested the specificity of our real-time PCR using 14 mushrooms [Mokitake, Tsukiyotake, Chanametumutake, Numerisugitake, Murasakisimeji, Nameko, Eringi, Maitake, Bunashimeji, Bunapi, Shiitake, Enokitake, Tsukuritake (Braun), Tsukuritake (White)] and 14 crops (carrot, green onion, edible chrysanthemum, Napa cabbage, asparagus, eggplant, bitter melon, cabbage, onion, Kaiware, Japanese honeywort, potherb mustard, potato, Japanese radish); we did not observed any amplification curves for these samples. Our initial data suggests that the developed real-time PCR method may be a useful tool for discriminating between Nigakuritake and Kuritake.

Keywords: Nigakuritake, *Hypholoma fasciculare*, Kuritake, *Hypholoma sublateritium*, real-time PCR, discrimination

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjyuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out

^c Present Address: Meiji Pharmaceutical University,
2-522-1, Noshio, Kiyose-shi Tokyo 204-8588, Japan