

PCRによるバイケイソウ、オオバギボウシ及びギョウジャニンニクの判別法

門間 公夫^{a,b}, 田端 節子^{b,d}, 牛山 博文^c

バイケイソウ、オオバギボウシ及びギョウジャニンニクを判別するため、PCR法を開発した。新規に設計したプライマーを用いPCRを行うことにより、これら植物の判別を行うことができた。また、開発したPCR法の特異性を確認するため9種の野菜（タマネギ、ネギ、ニンジン、シュンギク、ハクサイ、アスパラガス、ナス、ゴーヤ及びキャベツ）について、本法で試験を行ったところ、これらの野菜では非特異的な増幅は見られなかった。これらの結果より、開発したPCR法はバイケイソウ、オオバギボウシ及びギョウジャニンニクを判別するための有用な試験法になるものと考えられた。

キーワード：バイケイソウ、オオバギボウシ、ギョウジャニンニク、PCR、判別

はじめに

シュロソウ科のバイケイソウ(*Veratrum album* L. subsp. *oxypetalum*)は北海道から九州の日本各地に分布し、山地から高山の湿った場所に生える多年草で、葉には柄が無く、茎の高は1.5 mに達する。また、バイケイソウよりやや小型のコバイケイソウ(*Veratrum stamineum*) は中部地方以北、北海道の深山や亜高山の湿った草原に分布する。これらは、全草に有毒成分のプロトベラトリン、ジェルビン、ベラトラミン等のアルカロイドを含み、誤って喫食すると嘔吐、下痢、手足のしびれ、めまい等の症状を呈し、重篤な場合は死亡することもある¹⁻³⁾。

キジカクシ科のオオバギボウシ(*Hosta sieboldiana*)は北海

道、本州、四国、九州までの広い地域に分布している多年草で茎の高さは1 mになり、山地の草原や林縁に見られる。早春の若葉は山菜のウルイとして食用にされる⁴⁾。

ヒガンバナ科のギョウジャニンニク(*Allium victorialis* subsp. *platyphyllum*)は北海道から奈良県にかけて分布する多年草で葉は長さ20-30 cm、幅3-10 cmになる⁴⁾。アリシンを豊富に含んでおり、抗菌作用やビタミンB1活性を持続させる効果があり、血小板凝集阻害活性のあるチオエーテル類も含むため、血圧の安定、視力の衰えを抑制する効果があり、古くから食用にされてきた。また、有用成分を利用した健康食品も販売されている⁵⁾。

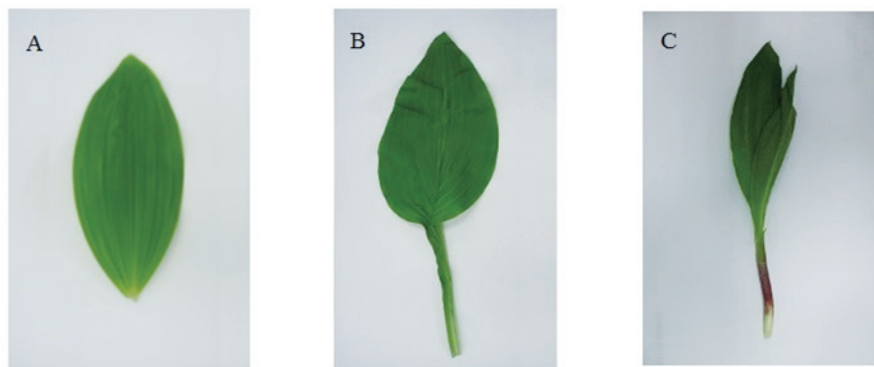


Photo 1. Plant Samples Used in this study

A: Baikeisou (*Veratrum album* L. subsp. *oxypetalum*), No. 1
B: Ohbagiboshi (*Hosta sieboldiana*), No. 3
C: Gyoujyaninniku (*Allium victorialis* subsp. *platyphyllum*), No. 5

^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：国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部食品添加物指定等相談センター
154-0015 東京都世田谷区桜新町 2-31-5

Table 1. List of Samples Used in This Study

No.	Sample name	Scientific name	Remark
1	Baikeisou	<i>Veratrum album</i> L. subsp. <i>oxypetalum</i>	Collected in Tochigi, used for positive sample
2	Baikeisou	<i>Veratrum album</i> L. subsp. <i>oxypetalum</i>	Obtained from Tokyo Metropolitan Medical Plants Garden, used for positive sample
3	Ohbagiboshi	<i>Hosta sieboldiana</i>	Collected in Tochigi, used for positive sample
4	Ohbagibousi	<i>Hosta sieboldiana</i>	Obtained from Tokyo Metropolitan Medical Plants Garden, used for positive sample
5	Gyoujaninniku	<i>Allium victorialis</i> subsp. <i>platyphyllum</i>	Purchased in gardening shop, used for positive sample
6	Gyoujaninniku	<i>Allium victorialis</i> subsp. <i>platyphyllum</i>	Purchased in gardening shop, used for positive sample
7	Onion	<i>Allium cepa</i>	Purchased in supermarket, used for confirmation of specification
8	Green onion	<i>Allium fistulosum</i>	Purchased in supermarket, used for confirmation of specification
9	Carrot	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>Sativus</i>	Purchased in supermarket, used for confirmation of specification
10	Edible chrysanthemum	<i>Glebionis coronaria</i>	Purchased in supermarket, used for confirmation of specification
11	Napa cabbage	<i>Brassica rapa</i> var. <i>pekinensis</i>	Purchased in supermarket, used for confirmation of specification
12	Asparagus	<i>Asparagus officinalis</i>	Purchased in supermarket, used for confirmation of specification
13	Eggplant	<i>Solanum melongena</i>	Purchased in supermarket, used for confirmation of specification
14	Bitter melon	<i>Momordica charantia</i>	Purchased in supermarket, used for confirmation of specification
15	Cabbage	<i>Brassica oleracea</i>	Purchased in supermarket, used for confirmation of specification

有毒成分を含有するバイケイソウ (Photo 1. A) は無柄であるが、葉の形態が食用のオオバギボウシ (Photo 1.B) やギョウジャニンニク (Photo 1.C) と類似するため、春の山菜取りシーズンに誤って採取摂食され食中毒を引き起こす事例が多い。なお、バイケイソウによる食中毒は発生件数、患者数ともに高等植物に起因する食中毒原因の上位を占めている⁶⁻⁸⁾。

これまで筆者らは有毒植物のイヌサフランやトリカブトを判別するためPCR法の開発を行ってきた^{9,10)}。今回、バイケイソウの喫食が疑われる食中毒発生の際に、有毒のコバイケイソウ、ミヤマバイケイソウ (*Veratrum alpestre*) を含むバイケイソウ類ならびにバイケイソウと形態が類似する食用可能なオオバギボウシ、コバギボウシ (*Hosta sieboldii*) を含むギボウシ類及びギョウジャニンニクの判別を微量の試料から迅速かつ経済的に行うためPCR法の検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

陽性試料としてバイケイソウ、オオバギボウシ及びギョウジャニンニクを各2試料、特異性確認用試料としてタマネギ、ネギ、ニンジン、シュンギク、ハクサイ、アスパラガス、ナス、ゴーヤ及びキャベツ各1試料を実験に供した (Table 1)。これらの試料は、精製水で洗浄し水切り後、実験を開始するまで-80℃冷凍庫で保存した。

2. 試薬

1) プライマー

バイケイソウ類、ギボウシ類及びギョウジャニンニクを判別するためNCBIに登録されているDNA配列データから、バイケイソウ類についてはリボソームDNAの18S rRNAとITS1をコードする領域、ギョウジャニンニクについては18S rRNA領域、ギボウシ類については葉緑体のmatK遺伝子領域に、それぞれを判別できるプライマー対の設計をマ

Table 2. List of Primers for Target Plants Used in This Study

Primer name	Target	Sequence	Amplicon	Origin
TR03	Eukaryote	5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3'	137 bp	ref. 11
TR04		5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'		
TBIKE-F1	<i>Veratrum album</i> L. subsp. <i>oxypetalum</i>	5'-GTTGCGAGAAGTTCACCTGAA-3'	233 bp	This study
TBIKE-R2	<i>V. stamineum</i> , <i>V. alpestre</i>	5'-TTGTGCCGGAGTTTCGTTGG-3'		
TOHBA-DF1	<i>Hosta sieboldiana</i> , <i>H. sieboldii</i>	5'-TGAATTTTCTTAGTTTTTT-3'	158 bp	This study
TOHBA-2R2		5'-TCTTATAAAAAATAGTTAG-3'		
TGYOJU-F2	<i>Allium victorialis</i> subsp. <i>platyphyllum</i>	5'-CTTTGCTCGATGCCTTTGT-3'	155 bp	This study
TGYOJU-R1		5'-TCCGTCACCCGTCATT-3'		

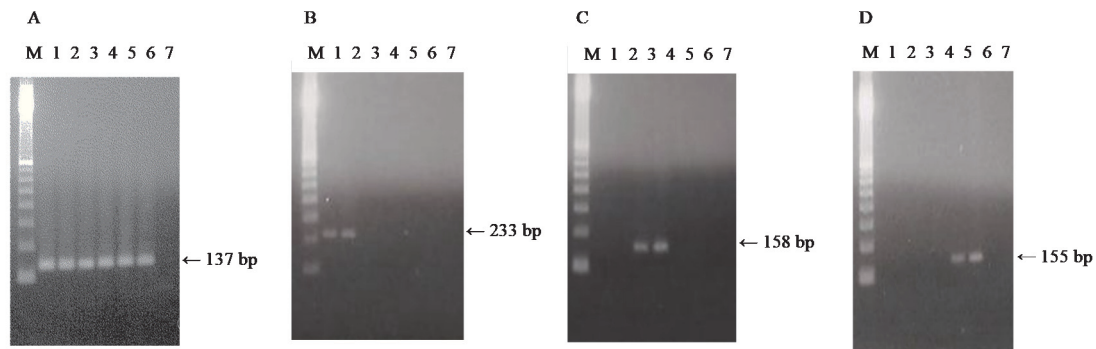


Fig. 1. Agarose Gel Electrophoreses of PCR Amplified Products with Primer Pairs for Baikisou, Ohbagiboshi, Gyoujaninniku and Eukaryote

A: PCR was carried out with primer sets (TR03/TR04) for Eukaryote, B: PCR was carried out with primer sets (TBIKE-F1/TBIKE-R2) for Baikisou, C: PCR was carried out with primer sets (TOHBA-DF1/TOHBA-2R2) for Ohbagiboshi, D: PCR was carried out with primer sets (TGYOJU-F2/TGYOJU-R1) for Gyoujaninniku
M: 100 bp Ladder, Lane 1: Baikisou (No. 1), Lane 2: Baikisou (No. 2), Lane 3: Ohbagiboshi (No. 3), Lane 4: Ohbagiboshi (No. 4), Lane 5: Gyoujaninniku (No. 5), Lane 6: Gyoujaninniku (No. 6), Lane 7: Negative control (no DNA)

ルチプルアライメントツールのMAFFTを用いて行った。

Table 2に本研究に用いたプライマーの塩基配列を示した。

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。

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ック社製），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），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

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試料100 mgよりDNAの抽出を行った。各試料から抽出したDNA溶液は波長260 nmの吸光度を分光光度計で測定後、濃度を算出し、1 ng/μLに調整して実験に用いた。

5. PCR

PCR反応液は1反応あたり、10×PCR緩衝液（2 mM MgCl₂含有）を2.5 μL, Takara EX Taq HS（5 U/μL）を0.2 μL, dNTPs（2 mM each）を2.0 μL, 20 μMのフォワードプライマー及びリバースプライマーを各0.25 μL, DNA溶液（1 ng/μL）2.5μLに滅菌精製水を加え25 μLにした。

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。

5. 電気泳動

PCR増幅反応液5 μLをゲルローディング緩衝液2 μLと混合後、エチジウムブロマイドを0.5 μg/mL含有する2.5%アガロースゲルに付加し、TAE緩衝液中100 Vの定電圧で電気泳動を行った。泳動後、UV照射装置上で予想される増幅長（バイケイソウ233 bp, オオバギボウシ158 bp, ギョウジャニンニク 155 bp）のバンド検出の有無を観察した。

結果及び考察

1. 抽出DNAの確認

実験に供した試料からDNAが的確に抽出されているか確認するため、真核生物に共通のDNA配列を検出するプライマー対（TR03及びTR04）を用いてPCRを行った。その結果、判別対象のバイケイソウ、オオバギボウシ、ギョウジャニンニク及び特異性確認用の野菜9種から抽出したDNAを鋳型にしたPCRにおいて、全ての試料からバンドが観察されDNAが的確に抽出されたことが確認された（Fig 1A, Fig 2A）。

2. 新規設計プライマーによるPCR

新規に設計したプライマー対、バイケイソウ類用（TBIKE-F1/TBIKE-R2），ギボウシ類用（TOHBA-DF1/TOHBA-2R2）及びギョウジャニンニク用（TGYOJU-F2/TGYOJU-R1）をそれぞれ用いてバイケイソウ、オオバギボウシ及びギョウジャニンニクから抽出したDNAを鋳型にPCRを行った。

その結果、バイケイソウ用のプライマー対を用いたPCRでは、バイケイソウから抽出したDNAを鋳型にした場合

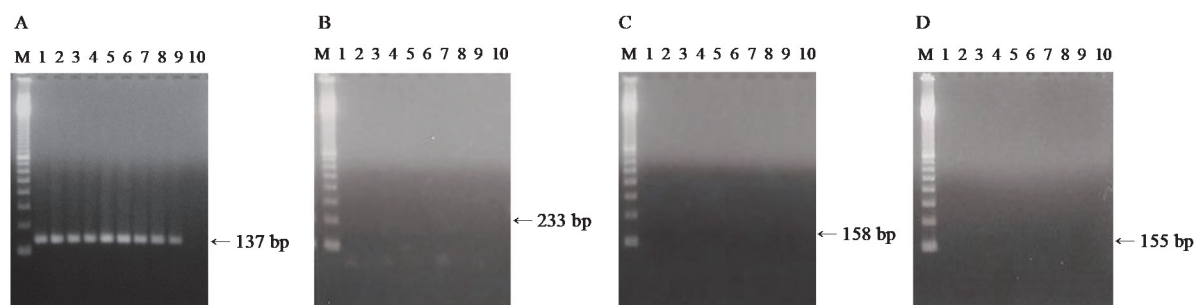


Fig. 2. Agarose Gel Electrophoresis of PCR Amplified Products from various crops using primer pairs (A) TR03/TR04, (B) TBIKE-F1/TBIKE-R2, (C) TOHBA-DF1/TOHBA-2R2 and (D) TGYOJU-F2/TGYOJU-R1

M: 100 bp Ladder, Lane 1: Onion (No. 7), Lane 2: Green onion (No. 8), Lane 3: Carrot (No. 9), Lane 4: Edible chrysanthemum (No. 10), Lane 5: Napa cabbage (No. 11), Lane 6: Asparagus (No. 12), Lane 7: Eggplant (No. 13), Lane 8: Bitter melon (No. 14), Lane 9: Cabbage (No. 15), Lane 10: Negative control (no DNA)

のみ予想された233 bpのバンドが検出されたが、オオバギボウシ及びギョウジャニンニクから抽出したDNAを鋳型にした場合にはバンドは検出されなかった (Fig. 1B)。なお、誤食による食中毒発生事例が報告されているコバイケイソウと食中毒発生の可能性考えられるミヤマバイケイソウについては試料が入手できなかったため確認していないがプライマー結合部位のDNA配列がバイケイソウとコバイケイソウ、ミヤマバイケイソウでは同一のためプライマーTBIKE-F1/TBIKE-R2を用いることにより、これらもバイケイソウと同様に検出できるものと予想される。

また、ギボウシ用のプライマー対を用いたPCRでは、オオバギボウシから抽出したDNAを鋳型にした場合のみ予想される158 bpのバンドが検出されたが、バイケイソウ及びギョウジャニンニクから抽出したDNAを鋳型にした場合にはバンドは検出されなかった (Fig. 1C)。なお、オオバギボウシと同様に食する可能性が考えられるコバギボウシについても試料が入手できなかったため確認できなかったが、プライマー結合部位のDNA配列がオオバギボウシと同一のため、プライマーTOHBA-DF1/TOHBA-2R2を用いることにより検出できるものと予想される。

さらに、ギョウジャニンニク用のプライマー対を用いたPCRでは、ギョウジャニンニクから抽出したDNAを鋳型にした場合のみ予想される155 bpのバンドが検出されたが、バイケイソウ及びオオバギボウシから抽出したDNAを鋳型にした場合にはバンドは検出されなかった (Fig. 1D)。

これらの結果より、新規に設計したバイケイソウ、ギボウシ及びギョウジャニンニク用のプライマーを用いてPCRを行うことにより、それぞれを判別できる可能性が示唆された。

3. 特異性の確認

本研究で判別の対象としたバイケイソウ類、ギボウシ類及びギョウジャニンニクを家庭等で調理したケースを想定

すると試料への野菜片の混入の可能性が考えられる。そこで、タマネギ、ネギ、ニンジン、シュンギク、ハクサイ、アスパラガス、ナス、ゴーヤ及びキャベツから抽出したDNAを鋳型に用いてPCRを行った。

その結果、新規に設計したバイケイソウ類用のプライマー対 (TBIKE-F1/TBIKE-R2)、ギボウシ類用のプライマー対 (TOHBA-DF1/TOHBA-2R2) 及びギョウジャニンニク用のプライマー対 (TGYOJU-F2/TGYOJU-R1) をそれぞれ用いたPCRの系において、いずれの9種野菜からもバンドは検知されなかった (Fig. 2B, 2C, 2D)。

これらの結果より、新規に設計したプライマー対を用いることにより、バイケイソウ、ギボウシ及びギョウジャニンニクの迅速な判別が行えるものと考えられた。

なお、当所実際に搬入されたバイケイソウが原因と思われる食中毒試料 (植物片) について本法によりPCRを実施した。その結果、アガロースゲル電気泳動において、陽性対照のバイケイソウと同様に233 bpの位置にバンドが検出された。これにより、本食中毒はバイケイソウの喫食に起因するものと推察され、本法の実用性が実証された (データ未掲載)。

有毒植物が原因と考えられる食中毒発生の際には、原因特定のため専門家による形態鑑別やLC-MS/MS等の分析機器による有毒成分の検出が行われる^{2,12)}。しかし、食中毒の残品が少量で形態が保持されていない場合は、原因の特定が困難なことがある。

近年、少量の試料でも有毒植物の判別が可能で、遺伝子を利用したDNAバーコーディング¹³⁾、リアルタイムPCR法¹⁴⁾やPCR-RFLP法¹⁵⁾も報告されている。しかし、DNAバーコーディングやリアルタイムPCR法は高額な機器を必要とし操作が煩雑で検査費用が高額なこと、PCR-RFLP法は偽陰性の可能性を考慮する必要があることと操作がやや煩雑で検査費用がかかること等の短所がある。

有毒植物が原因と思われる食中毒が発生した場合、喫食

者が重篤で死に至ることもあるため適切な治療を早期に開始するためにも原因植物の特定を迅速に行う必要がある。

新規に設計したプライマー対を用いてPCRを用いてPCRを実施することにより、有毒植物のバイケイソウ類と食用のギボウシ類及びギョウジャニンニクを迅速に経済的に判別できるものと考えられた。

なお、本研究ではバイケイソウと同様の食中毒を起こすと考えられているコバイケイソウやミヤマバイケイソウ、及び食用可能なコバギボウシについては試料が入手できなかったため検討できなかった。今後はこれら植物での適応性の検証や、さらに効率的、経済的に判別を実施するため、マルチプレックスPCR法等の開発を行う必要がある。

ま と め

バイケイソウ、オオバギボウシおよびギョウジャニンニクの判別を行う目的でPCR法を開発した。新規に設計したプライマー対を用いることによりこれらを判別することが可能となった。また、特異性を確認するため9種野菜から抽出したDNAを鋳型としてPCRを実施したところ、増幅バンドは検出されず、本法の有用性が確認された。

謝 辞 本研究を行うにあたり試料の提供、技術的助言等をいただいた東京都立健康安全研究センターの観公子氏、元東京都立健康安全研究センターの岩崎由美子氏ならびに元東京都薬用植物園の鈴木幸子氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル 高等植物バイケイソウ類。

<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000079821.html> (2021年10月1日現在。なお本URLは変更または消滅の可能性がある)

- 2) 佐藤正幸, 姉帯正樹：道衛研所報, **62**, 49-54, 2012.
- 3) (財) 日本中毒情報センター：症例で学ぶ中毒事故とその対策, 1995, じほう, 東京.
- 4) 牧野富太郎：原色牧野植物図鑑 離弁花・単子葉植物編, 1997, 北隆館, 東京.
- 5) 西村弘行, ハニイ・ウィジャヤ, 渡部賢二, 他：北大・牧場研究報告, **13**, 139-147, 1987.
- 6) 笠原義正：食衛誌, **51**, 311-318, 2010.
- 7) 佐藤元昭：食衛誌, **52**, 87-99, 2011.
- 8) 登田美桜, 畝山智香子, 春日文字：食衛誌, **55**, 55-63, 2014.
- 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, 大石充男：東京健安研セ年報, **68**, 109-115, 2017.
- 11) Pietrzak M., Shillito R. D., Hohn T., *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **14**, 5857-5866, 1986.
- 12) 茶屋真弓, 原田卓也, 吉田純一：鹿児島県環境保健センター所報, **19**, 67-71, 2018.
- 13) Bruni I, De Mattia F, Galimberti A, *et al.*: *Int J Legal Med.*, **124**, 595-603, 2010.
- 14) Matsuyama S., Nishi K. : *Int. J Legal Med.*, **125**, 211-217, 2011.
- 15) 篠崎淳一, 数馬恒平, 佐竹元吉, 他：食衛誌, **59**, 134-140, 2018.

Development of PCR for Discrimination of Baikeisou (*Veratrum album* L. subsp. *oxypetalum*), Ohobagiboushi (*Hosta sieboldiana*), and Gyoujaninniku (*Allium victorialis* subsp. *platyphyllum*)

Kimio MONMA^a, Setsuko TABATA^{b,c} and Hirofumi USHIYAMA^b

We developed a polymerase chain reaction (PCR) method to both quickly and economically discriminate between Baikeisou (*Veratrum album* L. subsp. *oxypetalum*), Ohobagiboushi (*Hosta sieboldiana*), and Gyoujaninniku (*Allium victorialis* subsp. *platyphyllum*). Each two samples from three plant species were first discriminated via PCR using newly-designed primer pairs specific to each species. Next, we tested the singularity of our PCR method using 9 vegetable samples (onion, green onion, carrot, edible chrysanthemum, napa cabbage, asparagus, eggplant, bitter melon, and cabbage). As a result, amplification product for the three targeted plants were not detected in any vegetables. These initial data suggest that the developed PCR method may be a useful tool for discriminating between Baikeisou, Ohobagiboushi, and Gyoujaninniku.

Keywords: Baikeisou (*Veratrum album* L. subsp. *oxypetalum*), Ohobagiboushi (*Hosta sieboldiana*), Gyoujaninniku (*Allium victorialis* subsp. *platyphyllum*), discrimination, PCR

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

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

^c Present Address: National Institute of Health Sciences (Food Additive Designation Consultation Center),
2-31-5, Sakurashinmachi, Setagaya-ku, Tokyo 154-0015, Japan