

## マルチプレックスPCRによるトリカブト、ニリンソウ及びモミジガサの鑑別

門間 公夫<sup>a</sup>, 大石 充男<sup>b</sup>

迅速で経済的にトリカブト、ニリンソウ及びモミジガサを鑑別するためにマルチプレックスPCR法を開発した。新規に設計したトリカブト、ニリンソウ及びモミジガサ用のプライマー対を使用することによって、これら3種植物を鑑別することができた。開発したマルチプレックスPCR法について試料を加熱することによる影響を調べたところ、沸騰水中で30分間加熱処理を行った試料からも3種植物を検出することができた。また、10倍希釈系列で調整したDNAを鋳型にして検出感度を調べたところ10の6乗倍まで希釈した鋳型(2.5 fg)からも特異的なPCR増幅産物が検出された。収集したトリカブト、ニリンソウ及びモミジガサ試料について我々が開発したマルチプレックスPCR法を用いて調査したところトリカブトのDNAはトリカブト11試料から検出された。一方、ニリンソウ5試料、モミジガサ4試料、テバコモミジガサ1試料及び13種の野菜からは検出されなかった。同様に、ニリンソウのDNAはニリンソウ5試料のみから検出された。また、モミジガサのDNAはモミジガサ4試料とテバコモミジガサ1試料のみで検出された。これらの結果は開発したマルチプレックスPCR法がトリカブト、ニリンソウ及びモミジガサを鑑別するための有用なツールになり得ることを示している。

**キーワード:** トリカブト, ニリンソウ, モミジガサ, 鑑別, マルチプレックスPCR

### はじめに

わが国では北海道、本州、四国、九州に分布し、主に湿潤な山地の林床や周辺部に生育するキンポウゲ科イチリンソウ属のニリンソウ (*Anemone flaccida*)<sup>1)</sup> 及び同様の環境に生育するキク科コウモリソウ属のモミジガサ

(*Parasenecio delphinifolius*)<sup>2)</sup>は、若葉が山菜として食用にされる。一方、キンポウゲ科のトリカブト (*Aconitum* sp.)<sup>3)</sup>は本州中部以北から北海道にかけての山地の湿り気のある樹林の林床、林縁に自生し、有毒成分のアコニチンやメサコニチンを含有し、摂食すると嘔吐、呼吸困難、臓器不全などの症状を呈し、死亡する場合もある<sup>3-5)</sup>。

トリカブトはニリンソウやモミジガサと生育地域が重複し、かつ形態が類似するため、山菜取りでニリンソウやモミジガサと誤って採取し摂食され、食中毒を起こした事例が毎年の様に報告されている<sup>6-10)</sup>。トリカブトが原因と思われる食中毒が発生した場合、原因を特定するために有毒植物に詳しい専門家による形態での鑑別やGC-MS<sup>9)</sup>、LC-MS<sup>9,11)</sup>、LC-MS/MS<sup>12,13)</sup>等の分析機器を用いた有毒成分の検出が行われる。さらに、近年DNAバーコーディング<sup>14)</sup>やリアルタイムPCR法<sup>15)</sup>による有毒植物の鑑別法も報告されている。鑑別に用いる残品が微量で形態が保持されていない場合は外部形態による鑑別や有毒成分の機器分析による原因植物の特定は困難な場合がある。また、DNAバーコーディングやリアルタイムPCR法による方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等の短所がある。

有毒植物に起因する食中毒の場合、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を迅速に鑑別する必要がある。

そこで、微量の試料からでもニリンソウ及びモミジガサとトリカブトの鑑別を短時間で経済的に行う目的でマルチプレックスPCRによる鑑別法の開発を行ったので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 試料

ハナトリカブト2検体、オオサワトリカブト2検体、ヤマトリカブト4検体、タンナトリカブト1検体、エゾトリカブト1検体、ダイセツトリカブト1検体、ニリンソウ5検体、モミジガサ4検体及びテバコモミジガサ1検体を用いた

(Table 1)。また、PCRの特異性を確認するための試料として都内の小売店で購入したタマネギ、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、キャベツ、ダイコン、ジャガイモ、ミツバ及びキョウナを用いた。これらの試料は水で洗浄しペーパータオルで水気を取り除き、マイクロチューブに秤量後、実験に供するまで-20℃以下で保存した。

#### 2. 装置

分光光度計はUltrospec 3300pro (アマシャムファルマシア社製)またはNanoDrop 2000C (サーモフィッシュアイエンティフィック社製)、サーマルサイクラーはGeneAmp®PCRシステム9700 (Applied Biosystems社製)、電気泳動装置はMupidミニゲル泳動装置 (アドバンス社製)、UV照射装置はNTM-15 (UVP社製)を用いた。

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</sup> 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

Table 1. List of Samples Used in This Study

No.	Japanese name	Species	Remark
1	Hanatorikabuto	<i>Aconitum chinense</i>	Obtained from Tokyo Metropolitan Medicinal Plants Garden, 1 May 2008
2	Hanatorikabuto	<i>Aconitum chinense</i>	Obtained from Tokyo Metropolitan Medicinal Plants Garden, 1 May 2008
3	Ohsawa torikabuto	<i>Aconitum isidzuka</i>	Purchased in gardening shop, 5 May 2008
4	Ohsawa torikabuto	<i>Aconitum isidzuka</i>	Purchased in gardening shop, 7 May 2008
5	Yamatorikabuto	<i>Aconitum japonicum</i>	Collected in Shiobara, Tochigi, 4 Apr. 2008
6	Yamatorikabuto	<i>Aconitum japonicum</i>	Collected in Shiobara, Tochigi, 4 Apr. 2008
7	Yamatorikabuto	<i>Aconitum japonicum</i>	Obtained from Tokyo Metropolitan Medicinal Plants Garden, 1 May 2008, Positive control
8	Yamatorikabuto	<i>Aconitum japonicum</i>	Purchased in gardening shop, 5 May 2008
9	Tannatorikabuto	<i>Aconitum napiforme</i>	Purchased in gardening shop, 7 May 2008
10	Ezotorikabuto	<i>Aconitum sachalinense</i>	Purchased in gardening shop, 5 May 2008
11	Daisetutorikabuto	<i>Aconitum yamazakii</i>	Purchased in gardening shop, 5 May 2008
12	Nirinsou	<i>Anemone flaccida</i>	Obtained from Tokyo Metropolitan Medicinal Plants Garden, 1 May 2008, Positive control
13	Nirinsou	<i>Anemone flaccida</i>	Collected in Koganei, Tokyo, 9 Apr. 2012
14	Nirinsou	<i>Anemone flaccida</i>	Collected in Yokoze, Saitama, 7 May 2011
15	Nirinsou	<i>Anemone flaccida</i>	Purchased in gardening shop, 12 Apr. 2012
16	Nirinsou	<i>Anemone flaccida</i>	Purchased in gardening shop, 5 May 2013
17	Momijigasa	<i>Parasenecio delphiniifolius</i>	Obtained from Tokyo Metropolitan Medicinal Plants Garden, 1 May 2008, Positive control
18	Momijigasa	<i>Parasenecio delphiniifolius</i>	Purchased at the grocery store in Shioya, Tochigi, 9 May 2011
19	Momijigasa	<i>Parasenecio delphiniifolius</i>	Purchased in gardening shop, 12 Apr. 2012
20	Momijigasa	<i>Parasenecio delphiniifolius</i>	Purchased in gardening shop, 5 May 2013
21	Tebakomomijigasa	<i>Parasenecio tebakaensis</i>	Obtained from Tokyo Metropolitan Medicinal Plants Garden, 1 May 2008

### 3. プライマー

トリカブト、ニリンソウ及びモミジガサの18S rRNA領域から26S rRNA領域をコードするDNA領域について比較を行い、マルチプレックスPCRでの検出を念頭にそれぞれの植物を特異的に増幅するプライマーを設計した (Fig. 1, Table 2). なお、プライマーはシグマアルドリッチジャパン社に合成委託したカートリッジ精製品を用いた。

### 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い、試料100 mgより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した。

### 5. PCR

単独にプライマー対を用いる場合のPCRの反応液は、10×PCR緩衝液を2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L each) を2.0 μL, EXTaqHS (タカラバイオ社製) を0.2 μL, 検出対象植物の20 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0.25 μL (終濃度0.2 μmol/L), 2.5 ng/μL

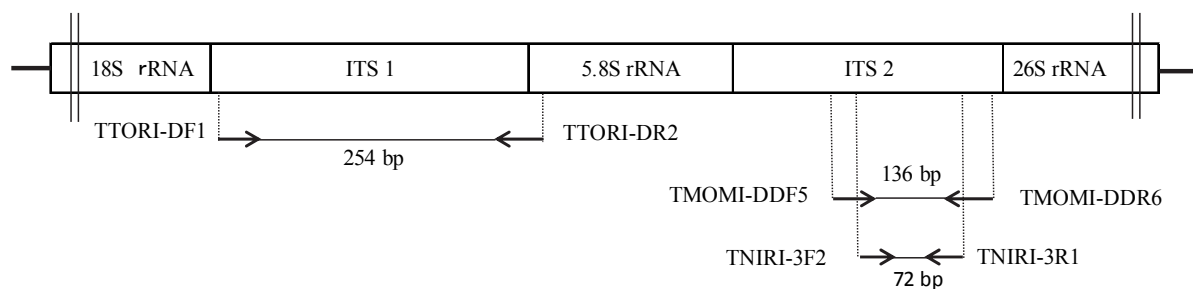


Fig. 1. Schematic Diagram of PCR Primer Pairs Designed for *Aconite* sp, *Anemone flaccida* and *Parasenecio delphiniifolius*

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

Primer name	Target	Sequence	Tm value <sup>a)</sup>	Amplicon
TTORI-DF1	<i>Aconitum</i> sp.	5'-AACCTGCCAGCAGAG-3'	60.1	254 bp
TTORI-DR2		5'-AGTCGTTTGAGTATCGGATTC-3'	59.6	
TMOMI-DDF5	<i>Parasenecio delphiniifolius</i>	5'-TGCGGTTGGCTAAAACAC-3'	62.3	136 bp
TMOMI-DDR6		5'-CATCGTCACAAGACGACG-3'	61.6	
TNIRI-3F2	<i>Anemone flaccida</i>	5'-CGAGCATTGCGGTCAA-3'	63.5	72 bp
TNIRI-3R1		5'-CGACCTACATGCAACGAGT-3'	61.4	

a): Tm values were calculated using the Nearest Neighbor Method.

の抽出DNAを1.0  $\mu$ L加えた後、水で25  $\mu$ Lになるように調製した。また、マルチプレックスPCRの反応液はトリカブト、ニリンソウ及びモミジガサ用の10  $\mu$ mol/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0.25  $\mu$ L (終濃度0.1  $\mu$ mol/L) 加えた他は単独プライマー対を用いるPCRと同一の組成に調整した。PCR反応はサーマルサイクラーで、98°C 10秒間、60°C 30秒間、72°C60秒間を1サイクルとして9600エミュレーションモードに設定し、40サイクル増幅反応を行った。

## 6. 電気泳動

PCR反応液5  $\mu$ Lをゲルローディング緩衝液2  $\mu$ Lと混合後、エチジウムブロマイドを0.5  $\mu$ g/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 (トリカブト254 bp, ニリンソウ72 bp, モミジガサ136 bp) のバンド検出の有無を観察した。

## 7. 加温処理

トリカブト、ニリンソウ及びモミジガサ試料に5倍量の精製水を加え、沸騰水中で15分間及び30分間加温処理を行った後、DNAを抽出し実験に供した。

## 結果及び考察

### 1. 新規設計プライマーによるPCR

新規に設計したトリカブト用のプライマー対 (TTORI-DF1/TTORI-DR2)、ニリンソウ用のプライマー対 (TNIRI-3F2/TNIRI-3R1) 及びモミジガサ用のプライマー対 (TMOMI-DDF5/TMOMI-DDR6) をそれぞれ単独に用いて、ヤマトリカブト (No.7)、ニリンソウ (No.12) 及びモミジガサ (No.17) から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、トリカブト用プライマーを使用したPCRでは、鋳型にトリカブトから抽出したDNAを用いた場合に想定される増幅長254 bpのバンドが検出されたが、ニリンソウ及びモミジガサから抽出したDNAを鋳型にした場合、バンドは検出されなかった。また、ニリンソウ用プライマ

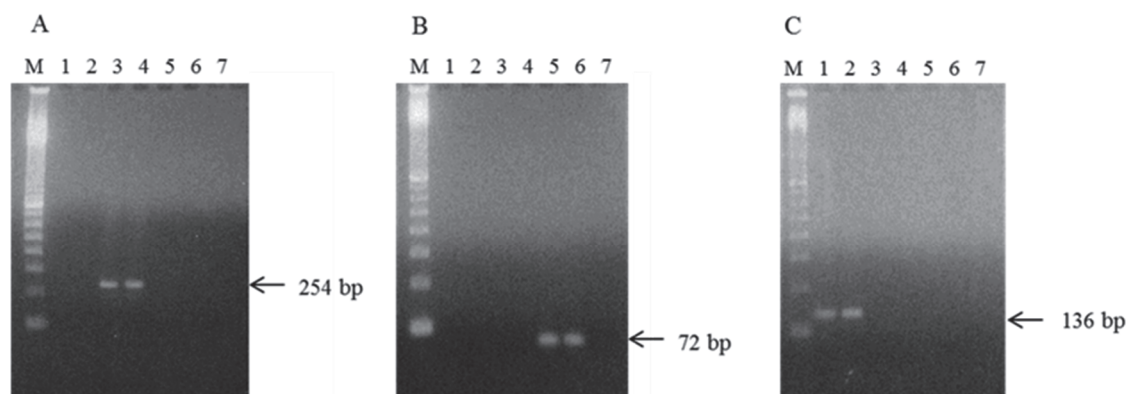


Fig. 2. Agarose Gel Electrophoresis of PCR Amplified Products with Newly Developed Primer Pairs for Aconite, Windflower and Momijigasa

A: PCR was carried out with primer sets (TTORI-DF1/TTORI-R2) for aconite

B: PCR was carried out with primer sets (TNIRI-3F2/TNIRI-3R1) for windflower

C: PCR was carried out with primer sets (TMOMI-DDF5/TMOMI-DDR6) for momijigasa

M: 100 bp Ladder, Lane 1,2: Momijigasa (No.17), Lane 3,4: Aconite (No.7), Lane 5,6: Windflower (No.12), Lane 7: Negative control (no DNA)

一対を用いたPCRでは、銑型にニンソウから抽出したDNAを用いた場合に想定される増幅長72 bpのバンドが検出されたが、トリカブトとモミジガサから抽出したDNAを銑型にした場合はバンドは検出されなかった。さらに、モミジガサ用プライマー対を用いたPCRでは、銑型にモミジガサより抽出したDNAを用いた場合に想定される増幅長136 bpのバンドが検出されたが、トリカブトとニンソウから抽出したDNAを銑型にした場合はバンドは検出されなかった。これらの結果よりトリカブト用のプライマー対 (TTORI-DF1/TTORI-DR2)、ニンソウ用のプライマー対 (TNIRI-3F2/TNIRI-3R1) 及びモミジガサ用のプライマー対 (TMOMI-DDF5/TMOMI-DDR6) を用いてPCRを行なうことにより、それぞれの植物を判別できる可能性が示唆された (Fig. 2)。

## 2. マルチプレックスPCRの検討

検査時間の短縮化や経済性を考慮するとトリカブト、ニンソウ及びモミジガサをそれぞれ個別に検出するPCRより、1つの反応系で行うマルチプレックスPCRが適応できることが望まれる。そこで新規に設計したトリカブト、ニンソウ及びモミジガサ用のプライマーを用いてマルチプレックスPCRを行った。なお、陽性対照には新規設計プライマーによるPCRで得られたこれら3種植物のPCR増幅産物をマイクロコンYM50 (メルクミリポア製) で精製したPCR増幅産物を各々0.25 ngを含有する銑型を用いPCRを行った。その結果、マルチプレックスPCRにおいてもヤマトリカブト (No.7)、ニンソウ (No.12) 及びモミジガサ (No.17) のそれぞれに対応する254 bp、72 bp及び136 bpのバンドが検出された。しかし、銑型を含まないブランクのPCR反応液の電気泳動において40~50 bp付近にシンプレックスPCRでは観察されなかったプライマーダイマーと考えられるうすい帯状のバンドが観察された。このバンド

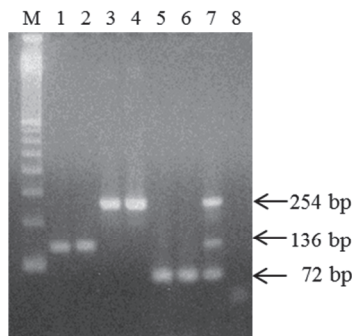


Fig. 3. Agarose Gel Electrophoresis of Multiplex PCR Amplified Products with Primers at Final Concentration of 0.1  $\mu\text{mol/L}$  Each

M: 100 bp ladder, Lane 1, 2: Momijigasa (No.17), Lane 3, 4: Aconite (No.7), Lane 5, 6: Windflower (No.12), Lane 7: Positive control, Lane 8: Negative control (no DNA)

はヤマトリカブト、ニンソウ及びモミジガサのバンドとは泳動位置が異なりこれら3種植物の鑑別には影響しないが、より明確な電気泳動像を得るため各プライマーの終濃度を0.1 $\mu\text{mol/L}$ になるようPCR反応液を調整しマルチプレックスPCRを実施した。その結果、ヤマトリカブト、ニンソウ及びモミジガサにおいては予想される254 bp、72 bp及び136 bpの明確なバンドが検出され、マルチプレックスPCRの実用の可能性が示唆された (Fig. 3)。

## 3. 特異性の確認

本研究で鑑別対象としたトリカブト、ニンソウ及びモミジガサを家庭等で調理した場合、料理に使用される野菜片がPCR試料の採取の際に混入する可能性も考えられる。そこで、マルチプレックスPCRの特異性を確認するため、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、キャベツ、ダイコン、ジャガイモ、ミツバ及びキョウナから抽出したDNAを銑型に用いPCRを行った。その結果、いずれの野菜においてもバンドは検出されずマルチプレックスPCRの特異性が確認された (Fig.4)。

## 4. マルチプレックスPCRの検出感度

マルチプレックスPCRの検出感度を検討するためトリカブト、ニンソウ及びモミジガサの抽出DNA溶液を1 ng/ $\mu\text{L}$ に調整した後、10倍希釈系列で10の7乗まで希釈したDNA溶液2.5  $\mu\text{L}$ を銑型にし、マルチプレックスPCRを行った。その結果、トリカブト、ニンソウ及びモミジガサのいずれの抽出DNA溶液においても、10の6乗倍に希釈した銑型 (2.5 fg) からバンドが検出された。トリカブトの抽出DNAを銑型に用いた場合のPCRの結果をFig.5に示した。

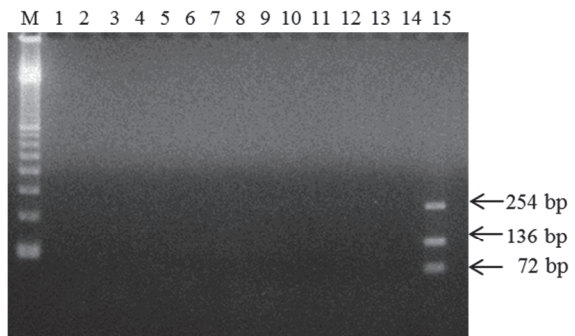


Fig. 4. Agarose Gel Electrophoresis of Multiplex PCR Products of Extracted DNA from Vegetables

M: 100 bp ladder, Lane 1: Onion, Lane 2: Leek, Lane 3: carrot, Lane 4: Garland chrysanthemum, Lane 5: chinese cabbage, Lane 6: asparagus, Lane 7: Eggplant, Lane 8: Bitter gourd, Lane 9: Cabbage, Lane 10: Japanese radish, Lane 11: Potato, Lane 12: Mitsuba, Lane 13: Kyona, Lane 14: Negative control (no DNA), Lane 15: Positive control.



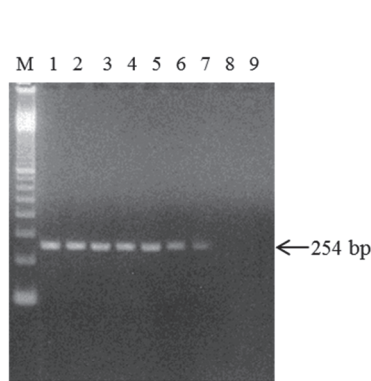


Fig. 5. Detection Limit of Multiplex PCR Using 10-Fold Serial Dilution of Aconite DNA (2.5 ng) as Template

M: 100 bp Ladder, Lane 1-9:  $\times 10^{-0}$ - $10^{-8}$

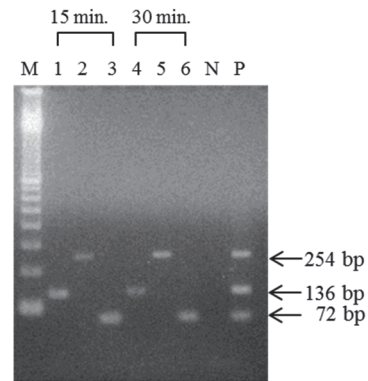


Fig. 6. Agarose Gel Electrophoresis of Multiplex PCR Products of Extracted DNA from Boiled Samples for 15 or 30 min.

M: 100 bp ladder, Lane 1, 4: Momijigasa (No.17), Lane 2, 5: Aconite (No.7), Lane 3, 6: Windflower (No.12), N: Negative control (no DNA), P: Positive control.

### 5. 加熱処理によるマルチプレックスPCRへの影響

トリカブトの喫食が原因と思われる食中毒が発生した場合は、おひたしや鍋にした残品など加熱調理後の試料について鑑別を行う場合も想定される。キノコによる食中毒を想定して加工調理の影響について検討した報告<sup>16,17)</sup>において、煮る、焼く、揚げるの一般的な調理法はPCRの結果への影響が少ないとされている。トリカブトについても調理によるPCRへの影響は少ないと考えられるが、確認のためヤマトリカブト (No.7), ニリンソウ (No.12) 及びモミジガサ (No.17) を沸騰水中で15分間及び30分間加熱処理後にDNAを抽出しPCRを行った。その結果、15分間及び30分間加熱後のいずれの試料からもそれぞれ想定される増幅長のバンドが観察され、本法は加熱調理後の試料についても適応できる可能性が高いことが確認された (Fig. 6)。

### 6. 実用性の確認

開発したマルチプレックスPCRの実用性を確認するため収集した試料についてPCRを行った。その結果、トリカブト属については実験に供したすべての試料 (ハナトリカブト, オーサワトリカブト, ヤマトリカブト, タンナトリカブト, エゾトリカブト及びダイセツトリカブト) から想定される254 bpのバンドが検出された (Fig. 7A)。ニリンソウについても実験に供したすべての試料から、想定される72 bpのバンドが検出された (Fig. 7B) また、モミジガサ及びモミジガサと区別されずに山菜として食されていると考えられるテコバモミジガサ<sup>18)</sup>においても136 bpのバンドが検出され実用性が確認された (Fig. 7C)。

これらの結果によりトリカブトが原因と思われる食中毒が発生した際には我々が設計したプライマーを用いてマル

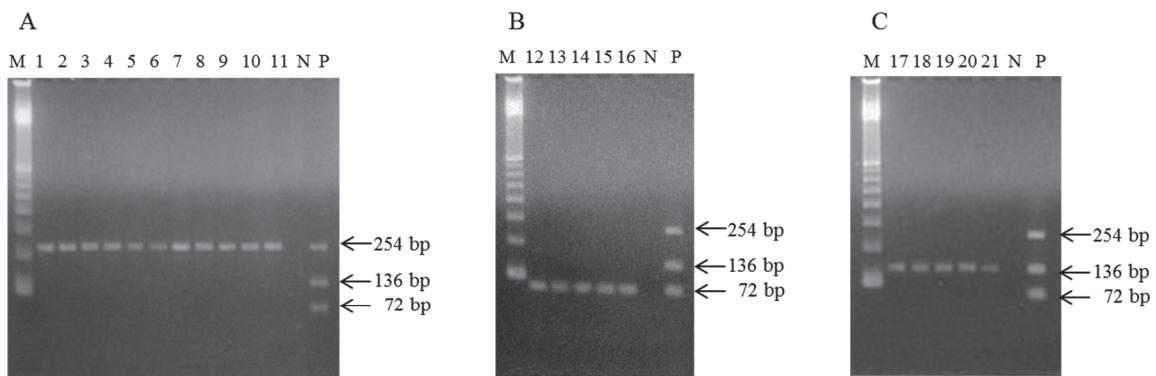


Fig. 7. Agarose Gel Electrophoresis of Multiplex PCR Products of Extracted DNA from Aconite, Windflower and Momijigasa Samples

M: 100 bp ladder, Lane 1-11: Aconite samples (No.1-No.11), Lane 12-16: Windflower samples (No.12-No.16), Lane 17-21: Momijigasa samples (No. 17-No. 21), N: Negative control (no DNA), P: Positive control.

チプレックスPCRを行なうことにより、残品が少なく形態からの鑑別が困難な試料においても、トリカブト、ニリンソウ及びモミジガサを鑑別できることが明らかとなった。今後は検査費用や高額な機器が必要になるが、より迅速な鑑別が可能になるリアルタイムPCRによる鑑別方法についても検討を行いたい。

### 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元東京都薬用植物園の鈴木幸子氏、東京都立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) 牧野富太郎：原色牧野植物大図鑑 離弁花・単子葉植物編，2003，北隆館，東京
- 2) 牧野富太郎：改訂版原色牧野植物大図鑑 合弁花・離弁花編，1996，北隆館，東京
- 3) 山本正和，杉本立甫：トリカブト 有毒植物，救急医学，**12** (10)，1561-1564，1988.
- 4) 松崎 茂：五苓散エキス投与を試みたトリカブト中毒の一救命例，日本東洋医学雑誌，**50**(1)，67-72，1989.
- 5) 水柿道直，鈴木康男：トリカブト中毒，中毒研究，**2**(3)，225-228，1989.
- 6) 笠原義正：有毒植物による食中毒の最近の動向と今後の話題，食衛誌，**51**(6)，311-318，2010.
- 7) 佐藤元昭：有毒な山野草，食衛誌，**53**(2)，87-99，2011.
- 8) 登田美桜，畝山智香子，豊福 肇，森川 馨：わが国における自然毒における食中毒事例の傾向（平成元年～22年），食衛誌，**53**(2)，105-120，2012.
- 9) 数馬恒平，佐竹元吉，紺野勝弘：重症トリカブト中毒事例とその食品衛生学的背景，食衛誌，**54**(6)，419-425，2013.
- 10) 登田美桜，畝山智香子，春日文子：過去50年間のわが国の高等植物による食中毒事例の傾向，食衛誌，**55**(1)，55-63，2014.
- 11) 笠原義正，久間木國男，片桐 進：トリカブト食中毒の原因物質の同定・定量及びマウスに対する毒性，食衛誌，**37**(4)，202-209，1996.
- 12) 笠原義正，伊藤 健：LC/MS/MSによるトリカブトおよび食中毒原因食品中のアコニチン系アルカロイドの一斉分析，食衛誌，**49**(2)，75-81，2008.
- 13) 笠原義正，伊藤 健，沼澤聡明，他：野生のトリカブト属植物に含まれるアコニチン類含有量とマウス毒性および加熱による含有量の減少，食衛誌，**54**(5)，364-369，2013.
- 14) Bruni I, De Mattia F, Galimberti A, *et al*: Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach. *Int J Legal Med*, **124**(6), 595-603, 2010.
- 15) Matsuyama S., Nishi K. : Genus identification of toxic plant by real-time PCR. *Int. J Legal Med*. **125**(2), 211-217, 2011.
- 16) Maeta, K., Ochi, T., Tokimoto, K., *et al*: Rapid species identification of cooked poisonous mushrooms by using real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*. **74**(10), 3306-3309, 2008.
- 17) Tsuruda, S., Akaki, K., Hiwaki, H., *et al*: Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Omphalotus guepiniformis* and *Lentinula edodes*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **76**(7), 1343-1349, 2012.
- 18) 東京都薬用植物園：山菜と間違えやすい有毒植物の見分け方。  
[http://www.tokyo-eiken.go.jp/lb\\_iryaku/plant/momijigasa/](http://www.tokyo-eiken.go.jp/lb_iryaku/plant/momijigasa/)（2017年7月1日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）

**Development of multiplex PCR for discrimination of aconite (*Aconitum* sp.), soft windflower (*Anemone flaccida*) and momijigasa (*Parasenecio delphiniifolius*)**

Kimio MONMA<sup>a</sup> and Mitsuo OISHI<sup>b</sup>

Here, we developed a multiplex polymerase chain reaction (PCR) to discriminate aconite (*Aconitum* sp.), soft windflower (*Anemone flaccida*), and momijigasa (*Parasenecio delphiniifolius*) both quickly and economically. The three plant species were first discriminated by performing a multiplex PCR using newly designed primer pairs specific to each species. Next, we tested for the presence of DNA in samples of aconite, windflower, and momijigasa by applying our PCR method. The expected bands were detected from samples soaked in boiling water for 30 minutes. Furthermore, detection limit of our PCR method was assessed by using 10-fold serial dilution of samples DNA. Results showed that specific band was even detected in diluted templates (2.5 fg) of ten to the power of six. Next, we tested the utility of the developed multiplex PCR by applying the technique to collected samples. Results showed that aconite DNA was detected in 11 different aconite samples. However, aconite DNA was not detected in five soft windflower samples, four momijigasa samples, one tebakomomijigasa (*Parasenecio tebakaensis*) sample, and 13 vegetables. Similarly, soft windflower DNA was detected only in five soft windflower samples, whereas momijigasa DNA was detected only in four momijigasa samples and one tebakomomijigasa sample. These initial data suggest that the developed multiplex PCR may be a useful tool for discriminating among these three plant species.

**Keywords:** aconitum, soft windflower (*Anemone flaccida*), momijigasa (*Parasenecio delphiniifolius*), discrimination, PCR

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

<sup>b</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out

