

る恐れがあるが、移動相にイオンペア剤を使った HPLC を行えば、十分に保持され、キノコ試料中の定量試験が容易であった。これにより、国内押収及び海外販売の幻覚性キノコ、並びに培養キットから生育させ採取した乾燥キノコ中の psilocybin を定量した結果、0.07~1.13% の値を示した。

D. 結論

1. 幻覚性キノコ系統分類にはリボソーム *its-1* 及び *its-2* 領域のプライマーが適していることを明らかにし、これによる PCR 増幅を 15 試料に適用したところ、量が少なく且つ古い試料の 4 株を除いて本法が適用可能であることが判った。今後多種の幻覚性キノコについても同様に実施し、分子系統学的特徴抽出を行う予定である。

2. 幻覚性キノコ分布に関する調査の一環として、23 種のキノコで分布データベースを作成した。代表的な乱用キノコ 2 種を例に挙げると、*Psilocybe cubensis* は、馬糞や牛糞上に発生するきのこであり、現在は熱帯から亜熱帯にかけて広く分布するが、インド付近が原産地で、牛の放牧などに伴って拡散したと想像されている。また、*Copelandia cyanescens* は、熱帯地域に広く分布し栽培もされているので、栽培種・野生種の両方が利用されているものと想像される。両者とも現在では我が国沖縄本島以南に分布している。このように本データベースに基づいて解析すれば、キノコ原産地がある程度正確に特定できると考えられる。将来は画像も整備し、更に利用し易いものになりたい。

3. 食用キノコ中の麻薬成分については、平成 13 年度研究報告書において、一般食

料品店で発売されていたシイタケ等 14 品目を分析し、検出されなかったことを報告した。今回は引き続き、我が国で食用として供されるキノコ 40 種における幻覚性麻薬物質の有無を検討し、全ての試料からこれら成分は検出されなかった。今後引き続き他の食用キノコや野生キノコについても同様の試験を実施し、確認をする予定である。

4. 幻覚性キノコの成分であるサイロシピンは、逆相 HPLC 分析において、イオンペア法により良好な分離が得られ、キノコ中のサイロシピン定量法として有効であった。

分担研究報告書

遺伝子を指標とした幻覚性キノコの系統分類 —DNA 増幅用プライマーの選択—

分担研究者 那須 正夫 大阪大学大学院薬学研究科 教授
研究協力者 小川 倫洋 日本学術振興会 リサーチアソシエイト

研究要旨 マジックマッシュルームと呼ばれる幻覚性キノコが、快楽追求を目的として世界各国で乱用されている。これらキノコの迅速かつ簡便な分類を遺伝子レベルで行うにあたり、既知の幻覚性キノコの遺伝子配列を用いて本目的に最も適した領域を探索した。その結果、リボソームの intergenic transcribed spacer 配列が本目的に適していることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、マジックマッシュルームと呼ばれるキノコを快楽追求のために乱用することが問題となっている。幻覚性キノコにはサイロシン、サイロシビンの2種類の麻薬成分を含み、系統学的には *Psilocybe* 属、*Panaeolus* 属、*Copelandia* 属をはじめとする多数の属に分布することが知られている。現状ではこれら真菌の分類は子実体や胞子の顕微鏡観察による形態学的特徴に依存しており、同定に時間を要する点が問題である。そのため迅速にこれらを分類同定する必要があり、分子生物学的手法を用いた幻覚性キノコの簡便な同定法の開発が急務である。そこで本研究では、分子生物学的手法を用いて遺伝子レベルで幻覚性キノコを分類するにあたり、本目的に最も適したプライマー領域について検討を行った。

B. 研究方法

1. 遺伝子配列

本研究では、生物の分類に広く用いられているリボソーム DNA 配列のうち、

幻覚性キノコの分類に最も適した領域を探索した。既に決定され Genbank に公開されている幻覚性キノコの 105 本のリボソーム DNA 配列を取得し、解析に用いた。

2. 系統樹の構築

Genbank より取得した配列の 18S rDNA (18S)、intergenic transcribed spacer 1 (its-1)、intergenic transcribed spacer 2 (its-2)、28S rDNA (28S)の各部位をソフトウェアで切り出し、系統樹の構築に用いた。なお、切り出されたそれぞれの部位ごとの配列数は、18S、its-1、its-2、28S につき、2、20、23、82 である。なお、Genbank で取得した配列それぞれには、単数ないし複数の部位が含まれるため、切り出された部位の合計はもとの配列数とは一致しない。これら配列は CLUSTAL W (Thomson ら, *Nucl. Acids Res.*, 1994)でマルチプルアラインメントし、分子系統樹は Neighbor-Joining 法(Saitou と Nei, *Mol. Biol. Evol.*, 1987)で構築した。

C. 研究結果

1. 系統樹の構築

幻覚性キノコのリボソーム intergenic transcribed spacer 1 (its-1)、intergenic transcribed spacer 2 (its-2)、28S rDNA (28S) の各部位につき作成した分子系統樹を図1に示した。なお、18S rDNA については配列数が少ない(2種)ため、図示しなかった。28S rDNA については Moncalvo ら

(*Mol. Phyl. Evol.* 2002)により多数(877種)の配列を用いた詳細な系統樹が報告されている。しかしながら、its-1、its-2 両領域のほうが28S rDNA 領域に比較して近縁な種属の分解能が高く、したがって幻覚性キノコの分類にあたっては、これら部位を用いるほうが適切と考える。

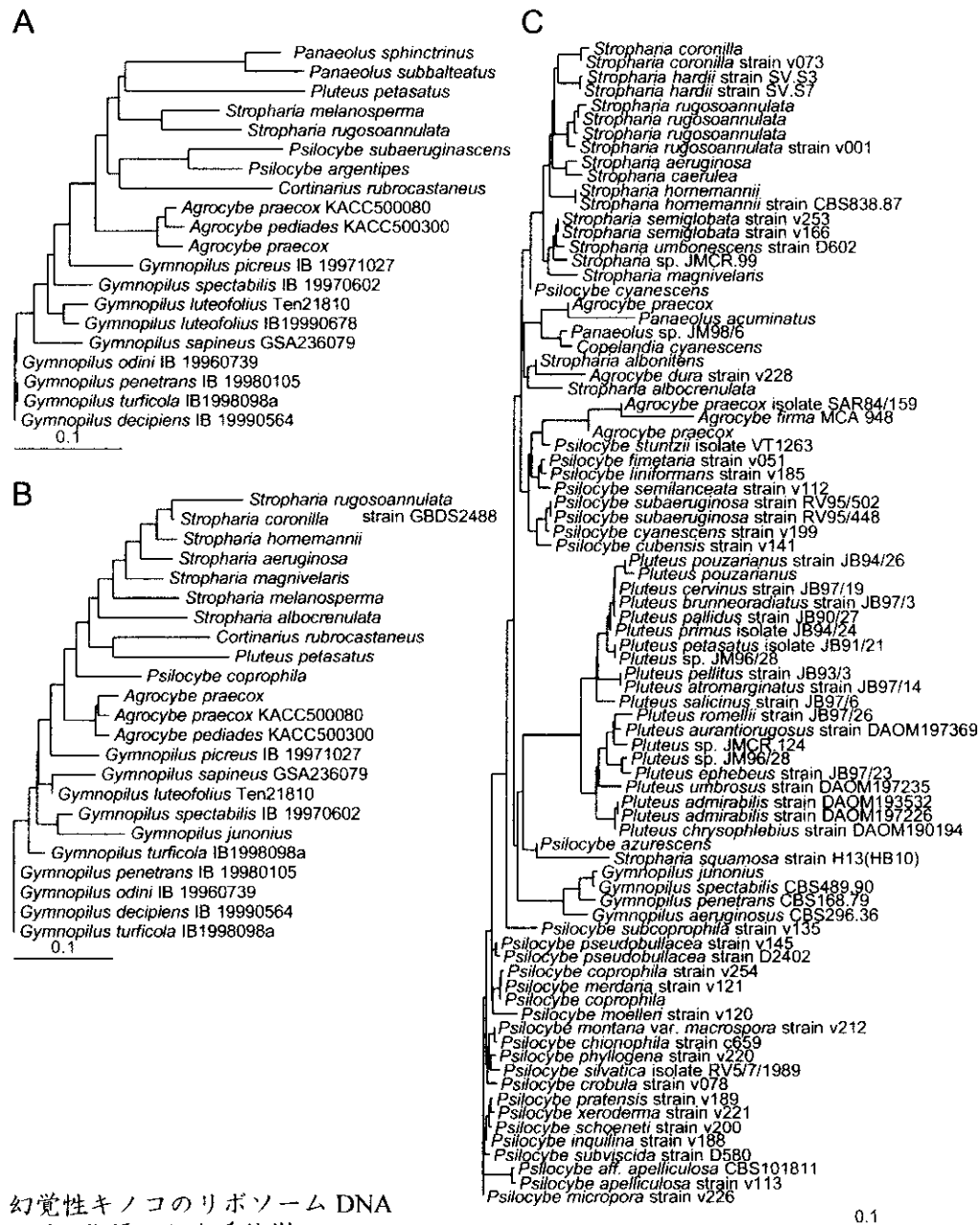


図 1. 幻覚性キノコのリボソーム DNA 配列を指標とした系統樹

A. its-1 領域の配列を指標とした系統樹

B. its-2 領域の配列を指標とした系統樹

C. 28S rDNA 領域の配列を指標とした系統樹

2. プライマーの選択

幻覚性キノコの遺伝子レベルにおける分類にあたっては、まずすべての種属のDNAをPCRで増幅したのちに塩基配列を決定するのが効果的である。そこで、DNAの増幅に当たっては、its-1の両隣に位置する18S rDNA、5.8S rDNA、またits-2の両隣に位置する5.8S rDNA、28S rDNAの各保存領域を対象としたプライマーを用いることとした。これら部位を標的としたプライマーは多数報告されているが、なかでもWhiteら(in PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, 1990)が設計したITS1とITS2、ITS3とITS4はキノコのits-1およびits-2領域の増幅において多数の実績があるため、本研究ではこれをits-1、its-2領域の増幅に用いることとした(表1)。

表1 幻覚性キノコのリボソームintergenic transcribed spacer配列の増幅に用いたプライマー

NAME	SEQUENCE	TARGET
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	its-1
ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	its-1
ITS3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'	its-2
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	its-2

D. 結論

以上のおり幻覚性キノコの系統分類にあたって用いるプライマーの選択を行った。今後は分担研究者の黒川と協力し、実際の試料の遺伝子を増幅して系統分類を行っていく予定である。

研究協力報告書

遺伝子を指標とした幻覚性キノコの系統分類 —遺伝子の増幅およびシーケンス決定—

研究協力者 黒川 顕 大阪大学遺伝情報実験センター 助手
研究協力者 小川 倫洋 日本学術振興会 リサーチアソシエイト

研究要旨 マジックマッシュルームと呼ばれる幻覚性キノコの乱用が近年問題となっており、昨年麻薬及び向精神薬取締法でこれらが麻薬原料植物として指定された。これらキノコの遺伝子配列を増幅し、塩基配列を決定して系統分類を行った。15種のキノコについて試験を行った結果、サンプルに問題があった4種を除いた11種について遺伝子の増幅を確認し、塩基配列を決定した。

A. 研究目的

マジックマッシュルームと呼ばれる幻覚性キノコの乱用が近年問題になっており、昨年麻薬及び向精神薬取締法でこれらキノコが麻薬原料植物として指定された。これらキノコの販売を規制するには、その流通経路等を明らかにする必要がある。そこで分子生物学的手法を用いて遺伝子レベルで幻覚性キノコを分類同定することを目的として、リボソームの intergenic transcribed spacer 領域の配列決定を試みた。

B. 研究方法

1. 実験材料

実験に用いたキノコは、下記に示した15株である。いずれも滋賀大学の横山和正教授より供給を受けたものである。以下KYは標本番号を示すものである。標本は滋賀大学に保管されている。

- 1) *Panaeolus shincrinus* (Fr.) Quél. KY7130
- 2) *Panaeolus subbalteatus* (Berk. et Br.) Sacc. KY4155
- 3) *Psilocybe argentipes* K. Yokoyama KY3237

- 4) *Psilocybe argentipes* K. Yokoyama KY7127
 - 5) *Psilocybe argentipes* K. Yokoyama KY3573
 - 6) *Psilocybe fasciata* Hongo KY7126
 - 7) *Psilocybe fasciata* Hongo KY1837
 - 8) *Psilocybe subaeruginascence* Höhnelt KY4097
 - 9) *Psilocybe tampanensis* Guzmán et Pollock KY7134
 - 10) *Amanita hemibapha* (Berk. et Br.) Sacc. KY7120
 - 11) *Amanita pantherina* (DC.: Fr.) Krombh. KY7119
 - 12) *Amanita pantherina* (DC.: Fr.) Krombh. KY5305
 - 13) *Lampteromyces japonicus* (Kawam.) Sing. KY3022
 - 14) *Lampteromyces japonicus* (Kawam.) Sing. KY7121
 - 15) *Psilocybe subcubensis* Guzmán KY7054
- なお、サンプルの番号は研究結果におけるアガロースゲルのレーン番号と対応する。
- ##### 2. ゲノム DNA の調製
- ゲノム DNA は、QIAGEN の DNeasy

Plant Maxi Kit を用いて塩野義製薬の堀真一郎氏が行った。回収した DNA はエタノール中に溶解し、室温にて保管した。

3. ゲノム DNA の増幅

ゲノム DNA のリボソーム intergenic transcribed spacer region 1 (its-1) および intergenic transcribed spacer region 2 (its-2) の 2 領域をそれぞれ PCR で増幅した。それぞれの領域の増幅に用いたプライマーは ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') と ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')、ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') と ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') である。なお、ITS1 と ITS2 は、its-1 領域を、ITS3 と ITS4 は its-2 領域を増幅するのに用いた。

4. PCR 条件

装置 Whatman T-Gradient

反応液組成

dNTP mix 2 mM

MgCl₂ 2.5 mM

KCl 50 mM

Tris/HCl [pH 8.3] 10 mM

Primer 2 mM each

Amplitaq Gold DNA polymerase 2.5 U

Sample 1 μL

増幅反応条件

95°C 9 分

↓

95°C 30 秒

50°C 30 秒

72°C 1 分

↓

72°C 3 分

5. シークエンス解析

シークエンス解析はドラゴンジェノミクスセンターが行った。

C. 研究結果

1. ゲノム DNA の増幅

本サンプルのアガロースゲル電気泳動結果を図 1 に示す。実験に用いた 15 品目のうち 11 品目で DNA の増幅が観察された(図 1)。一方、サンプル 6 及び 12 から 14 については、いずれのプライマーセットを用いても遺伝子の増幅が観察されなかった。

2. シークエンス解析

DNA の増幅が確認された 11 株についてシークエンス解析を行った。現時点では its-1 領域、its-2 領域についてそれぞれ 6 株、11 株の解析が完了している。これらキノコの分子系統樹を図 2 に示した。

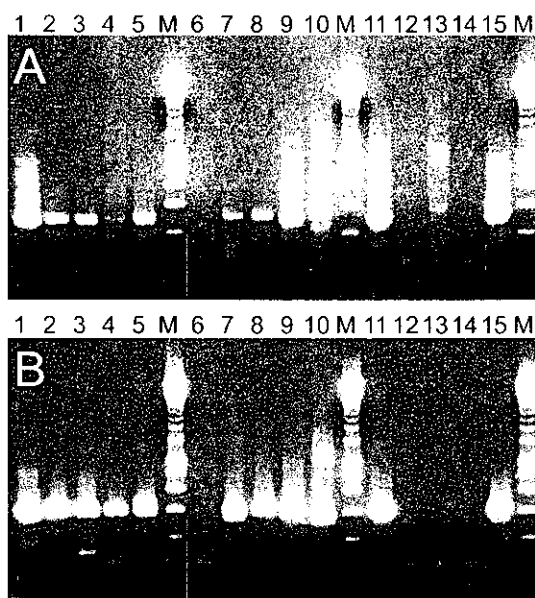
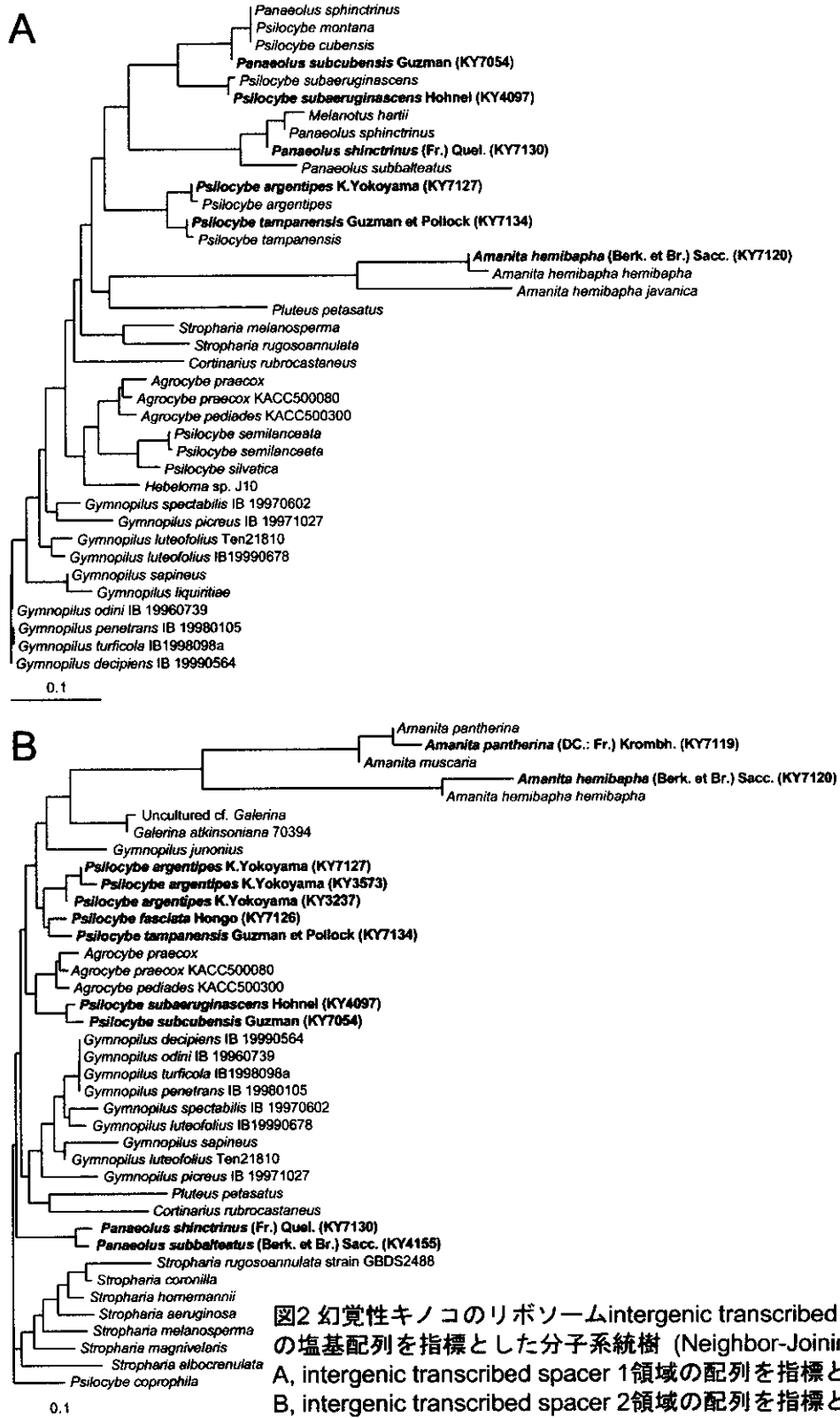


図1 15種のキノコのPCR産物のアガロース電気泳動結果
Aはits-1領域、Bはits-2領域についての結果。Mはマーカー、番号はそれぞれ本文中の番号と対応する。



D. 結論

リボソーム *its-1* および *its-2* 領域の PCR による増幅を試みたが、15 株中 4 株で増幅が確認できなかった。これはサンプルが古く(1976 年から 1988 年に採取)、かつ量が少なく、DNA 採取が極めて困難だったためと考えられる。また、シーケンス解析によりこれらキノコの分類学上の位置も再確認できた。今後は本研究では塩基配列未決定の株を含め、さらに多くの幻覚性キノコにつき同様の試験を行い、これら菌類の分子系統学的な特徴の抽出を試みていく予定である。

研究協力報告書

シビレタケ属を中心とする幻覚性きのこに関するデータベース作成
—主として日本産の野生、および市場のきのこの分布様式を中心に—

研究協力者 横山和正 滋賀大学教育学部生物学研究室 教授

研究要旨 日本に自生、または市場に見られたシビレタケ属、ヒカゲタケ属を中心とする幻覚性きのこの類の主として分布についてデータベースを作成した。それに基づき、日本の市場にみられた幻覚性きのこの輸入先を解析したところ、かなりの精度で原産地を特定できるようになった。

A. 研究目的

地球上の生物は地球の進化とともに、長い時間をかけて進化し、地球上に広がり、地球上のさまざまな環境に適応し、現在見るような多様性を示している。

きのこ類をはじめとする菌類も、他の生物群と同様、多数の種が主として生態系の分解を担いながら多様な分布を示している。

しかし、菌類の分類学的な調査はまだ日が浅く、特に熱帯圏の菌類は数パーセント程度しか記載されていないと推定され、今後の調査が待たれる(Hawksworth, 1991)。

わが国のきのこ調査は江戸時代にも各藩で行われてはいたようだが、近代的な分類学的手法を用いた調査は明治に入ってからである。しかし、わが国のように亜熱帯から寒帯にまたがる多様な生物圏をもち、世界で最も湿潤な気候においては菌類は多様性とみ、現在きのこの3分の1程度が記載されたにすぎないと推定されている。

滋賀大学教育学部生物学研究室では、1949年(昭和24)に大学が発足以来、日本の野生きのこの分類と生態学的研究を行

ってきた。野生のきのこは、他の生物と同様に、かなり広い生育圏が認められる。すなわち、夏の梅雨期には、シイやカシを主体とする照葉樹林では、ボルネオやシンガポールなどから報告された熱帯性のきのこが多数発生する(キクバナイグチ、オニテングタケなど)。また、秋から冬にかけては、北欧やユーラシア大陸北部の針葉樹林で認められるマツタケやエノキタケなど多数のきのこが発生する。また、北米の東部とわが国のきのこ共通なものが多いことも興味深い現象の一つである。

Hongo and Yokoyama(1978)は日本産の野生きのこの分布を次の9つのパターンに分けた。すなわち、

1. 汎布種(Cosmopolitan)
2. 北半球(Northern Hemisphere)
3. ユーラシア(Eurasian)
4. 北米と東アジア(North America and Eastern Asia)
 - a)北米西部と東アジア(Western North America and Eastern Asia)
 - b)北米東部と東アジア(Eastern North America and Eastern Asia)
5. 極東(Far Eastern)

6. 東南アジア(Southeast Asiatic)
7. 熱帯・亜熱帯(Tropical and Sub-tropical)
8. 極地・高山(Arctic or Alpine)
9. 固有種(Endemic)

今回、日本の市場に見られる幻覚性きのこを加えると、上記の9パターンでは不十分なので、更に以下の4つのカテゴリーを導入し、計13の分布様式としてまとめた。

10. 南北アメリカ(North and South America)
11. 両半球温帯(Temperate)
12. 南アジア(South Asia)
13. 欧米温帯(Temperate Europe and America)

幻覚性きのこに限定し、現在の時点では、上記の13の地域を想定し、その区分から日本に侵入、または輸入された場合に、問題とされる幻覚性きのこの原産地(自然分布)を特定できるのではないかと考え、データベースを作成することにした。

B. 研究方法

データベース用のソフトとして、ファイルメーカーPro Ver.4を用いた。現在までの分布に関するデータは、Guzmán(1983)、Gerhardt(1996)などを参考にし、入力した。また、横山自身の採取標本のデータも参考にした。

C. 研究結果と考察

1. 日本に自生するきのこの分布様式

東アジアの亜熱帯から温帯、亜寒帯に位置し、アジアのモンスーンの影響を受けて日本の生物は非常に多様性に富んでいる。日本の植物相は沖縄から北海道ま

で、約4500種(維管束植物4022種、しだ植物約500種)が知られている。調査が3割程度しか進んでいない菌類においては、高等菌類とよばれるきのこ類が、5000種以上、カビを含めると1万種以上の種類、わが国に生育しているのではないかと推定されている。

今回はマジックマッシュルーム(MM)に関する調査の一環として、MMを中心に23種を取り扱った。そのうち、わが国に自生するもの18種(うち、幻覚性13種、非幻覚性5種)、自生しないもの5種である。

その分布様式は表1に示すとおり、コスモポリタン種5種、固有種4種、熱帯・亜熱帯種3種、北半球種3種、東南アジア、温帯、南アジアと共通の種が各1種となっている。

このことは、日本のきのこ相が、非常に多様なオリジン(起源)を持つことが推定される。

2. 日本に自生しない幻覚性きのこの分布様式

次に、今回取り扱った23種のうち自生する18種をのぞいた残り5種は、海外から持ち込まれたものと考えられる(表2)。

すなわち、*Psilocybe tampanensis* はアメリカ合衆国のフロリダ半島が原産地であるから、この地域で分離、培養され、世界に流通し、日本にも持ち込まれたものと考えられる。

Psilocybe cubensis は、馬糞や牛糞上に発生するきのこであり、原産地がはっきりしない。現在は熱帯から亜熱帯にかけて広く分布し、わが国においても沖縄本島以南に分布が知られている。インド付近が原産地で、牛の放牧などに伴って、世界中の熱帯圏から亜熱帯圏に拡散した

表1 日本に自生する幻覚性きのこの分布様式（分布パターン別）

学名	分布	分布パターン
<i>Panaeolus papilionaceus</i> (Bull.: Fr.) Quéf.	世界（全世界），日本に自生	0 1
<i>Anellaria semiovata</i> (Sow.: Fr.) Pearson et Denni.	世界（全世界），日本に自生	0 1
<i>Panaeolus shinctrinus</i> (Fr.) Quéf.	世界（全世界），日本に自生	0 1
<i>Psilocybe merdaria</i> (Fr.) Ricken	世界（全世界），日本に自生	0 1
<i>Psilocybe coprophila</i> (Bull.: Fr.) Kummer	世界（全世界），日本に自生	0 1
<i>Amanita muscaria</i> (L.: Fr.) Pers.	日本（市場），日本に自生：本州（岐阜県以	0 2
<i>Gymnopilus spectabilis</i> (Fr.) Sing.	世界（北半球温帯～寒帯），日本に自生	0 2
<i>Panaeolus subbalteatus</i> (Berk. et Br.) Sacc.	世界（温帯），日本に自生	0 2
<i>Psilocybe lonchophorus</i> (Berk. et Br.) Horak et	セイロン，日本に自生（京都，滋賀）	0 6
<i>Psilocybe cubensis</i> (Earle) Sing.	日本（市場），日本に自生，世界（熱帯～亜	0 7
<i>Copelandia cyanescens</i> (Berk. et Br.) Sing.	日本（市場），日本に自生，世界（熱帯～亜	0 7
<i>Panaeolus antillarum</i> (Fr.) Dennis	世界（熱帯～亜熱帯），日本に自生	0 7
<i>Psilocybe argentipes</i> K. Yokoyama	日本に自生（日本のみ）	0 9
<i>Psilocybe fasciata</i> Hongo	日本に自生（日本のみ）	0 9
<i>Psilocybe subcaerulipes</i> Hongo	日本に自生（日本のみ）	0 9
<i>Psilocybe venenata</i> (Imai) Imazeki et Hongo	日本に自生（日本のみ）	0 9
<i>Psilocybe montana</i> (Pers.: Fr.) Kummer	日本に自生（新潟，滋賀），世界（ヨーロッパ	1 1
<i>Psilocybe subaeruginascens</i> Hoehnel	日本に自生（本州・北海道），インドネシア	1 2

表2 日本等の市場の幻覚性きのこの分布様式（分布パターン別）

学名	分布	分布パターン
<i>Amanita muscaria</i> (L.: Fr.) Pers.	日本（市場），日本に自生：本州（岐阜県以	0 2
<i>Psilocybe cubensis</i> (Earle) Sing.	日本（市場），日本に自生，世界（熱帯～亜	0 7
<i>Copelandia cyanescens</i> (Berk. et Br.) Sing.	日本（市場），日本に自生，世界（熱帯～亜	0 7
<i>Psilocybe subcubensis</i> Guzmán	日本（市場），世界：メキシコ，コロンビ	0 7
<i>Psilocybe tampanensis</i> Guzmán et Pollock	日本（市場？），フロリダ半島，	0 9
<i>Psilocybe semilanceata</i> (Fr.: Secr.) Kumm.	日本（市場），世界（ヨーロッパ，北米，南	1 3

のではないかと想像されている。
わが国のものも放牧に伴なって侵入して
きた可能性が強い。

Psilocybe subcubensis はコロンビアか
らカリブ海の島々、メキシコ、USA 南部
(サンフランシスコ郊外)、オーストラリ
アに分布する。市場に出回っていた菌株
は、おそらく培養設備の整った USA(西
部)で分離培養されたものではないかと

推測できる。

Psilocybe semilanceata と *Psilocybe*
caerulescens はアメリカ大陸が原産地
であるから、そこから渡来した可能性が考
えられる。また、*Psilocybe mexicana* はメ
キシコ原産で、現地のインディアンが宗
教儀式に使用しているきのこの1種であ
る。メキシコから渡来したと思われるが、
その経路の詳細は不明である。

Amanita muscaria は北半球温帯以北に分布する。わが国でも長野県菅平付近では、古くから乾燥してお正月の雑煮などの味付けに利用されてきた。市場のものは、外国から来たものか、わが国のものかは特定できない。

Copelandia cyanescens は、わが国にも自生するが、熱帯地域に広く分布し、栽培もされているので、わが国の市場のものは、栽培されたものと、野生の両方が利用されていたのではないかと想像される。

このように、データベースに基づいて解析していけば、きのこのこの原産地(天然分布地)がある程度の正確に特定できると考えられる。ただ、輸入経路の詳細に関しては、人為的なことが関係するので、この方法では限界がある。

なお、このデータベースは、将来は画像なども整備し、更に利用しやすいものをめざしている。

D. 引用文献

1. Gerhardt, E. Taxonomische Revision der Gattungen *Panaeolus* und *Panaeolina* (Fungi, Agaricales, Coprinaceae) *Bibliotheca Botanica* 147 pp.149. Stuttgart (1997)
2. Guzmán, G. The Genus *Psilocybe*. *Beih. Nova.Hedwigia* 74 pp.439, *J.Cramer, Vaduz* (1983)
3. Hawksworth, D.L. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. *Mycological Reserach* 95 pp.641-655(1991)
4. Hongo, T and Yokoyama, K. Mycofloristic ties of Japan to the continents. *Mem.Shiga Univ.* 28, pp.76-80 (1978)

研究協力報告書

食用キノコ類中のサイロシビン類のLC/MSによる測定

研究協力者 加藤 研治 塩野義製薬株式会社医薬研究開発本部 主管研究員

研究要旨 サイロシビンおよびサイロシンを含む幻覚性キノコが麻薬原料植物に指定されたため、一般に食用とされているキノコ類に麻薬成分が含まれていないことを確認するため、マツタケなどキノコ 40 種中の麻薬成分の微量定量を液体クロマトグラム質量分析器(LC/MS/MS)を用いておこなった。その結果いずれのキノコからも麻薬成分は検出されなかった。

A. 研究目的

幻覚作用を持つシロシビン(サイロシビン)またはシロシン(サイロシン)が麻薬物質に指定されたため、法をくぐる目的でこれら化合物を含有するモエギタケ科シビレタケ属の幻覚性キノコがインターネットや薬物ショップにおいて広く販売されてきた。その結果、わが国では平成16年6月にシロシビン(サイロシビン)またはシロシン(サイロシン)を含有する幻覚性キノコは麻薬原料植物に指定され、法律により所持等が禁止される規制対象となった。この規制を受けて、キノコ類全般におけるシロシビン、シロシンの分布状況を調査、なかでも日常的に利用する食用キノコ類における含量調査が急務となった。今回、野生種および人工栽培種における40種48検体の食用キノコを用いてシロシビンおよびシロシンの含量調査を行った。

B. 研究方法

1. 試料の入手

農林水産省林野庁から厚生労働省へ供与された食用キノコ40種47個体(表1)の凍結乾燥試料の一部(粉末:乾燥重量で

約1g)を使用した。キノコの和名、学名は「山溪カラー名鑑 日本きのこ、今関六也他、山と溪谷社、1998年、ISBN4-635-09020-5」を採用した。なお、粉末化しなかった試料の一部は滋賀大学横山和正教授のもとに送り、標本庫に収蔵した。

2. 定量試験

2-1. 抽出

凍結乾燥後乳鉢中で粉碎したキノコ粉末試料200mgを秤量し、50mLのポリプロピレン製遠心チューブ(イワキ)に入れ、5mLの90%メタノール(v/v)を加えて2日間抽出した。上清を分離後、再び2mLの90%メタノールを加え同様に抽出し、得られた上清を合わせた。上清は濃縮せず、その1mLを取り、クロマトディスク(孔径0.45 μ m、水系/非水系兼用13P、GLサイエンス社)を用いてろ過し、測定試料とした。試料はシリンジを用いて5 μ lをLC部に注入し、LC/MS測定を実施した。各試料とも2回反復測定をおこなった。

2-2. 分析機器

LC/MS(高速液体クロマトグラム質量分析機)装置はFinnigan社Thermoquest

表1. 農林水産省林野庁から供与された食用きのこ一覧

No	和名	学名	含量 ng/mg	採集地	採集年月日	同定者	新鮮重 量g	乾燥重 量g
1	トンビマイタケ	<i>Meripilus giganteus</i>	ND	秋田県河辺町	2002/8/5	菅原冬樹	—	—
2	ハタケシメジ	<i>Lyophyllum decastes</i>	ND	"	"	阿部 実	—	—
3	シロヌメリイグチ	<i>Suillus laricinus</i>	ND	長野県榑川村	2002/8/25	竹内嘉江	59.2	4.1
4	マスタケ	<i>Laetiprus sulphureus</i>	ND	"	"	"	21.7	5.4
5	タマゴタケ	<i>Amanita hemibapha</i>	ND	長野県松本市 中山	2002/9/4	"	67.1	6.9
6	エセオリミキ	<i>Collybia butyracea</i>	ND	"	2002/9/16	"	24.3	2
7	ホテイシメジ	<i>Chytcybe clavipes</i>	ND	"	"	"	45.5	3
8	ハナイグチ	<i>Suillus grevillei</i>	ND	"	"	"	79.1	5.5
9	マツタケ	<i>Tricholoma matsutake</i>	ND	"	2002/9/17	"	24.1	5.7
10	オオツガタケ	<i>Cortinarius claricolor</i>	ND	"	"	"	55	10.3
11	ハナヒラタケ	<i>Sparassia crispa</i>	ND	長野県塩尻市	2002/9/23	"	64	9.4
12	マスタケ	<i>Laetiprus sulphureus</i>	ND	福島県郡山市 熱海町	"	松崎 明	108.5	32.2
13	ウラベニホテイシメ	<i>Rhodophyllum crassipes</i>	ND	"	"	"	219.1	38.7
14	サクラシメジ	<i>Hygrophorus russula</i>	ND	長野県松本市	2002/9/25	竹内嘉江	72.6	6
15	クロカワ	<i>Boletopsis leucomelas</i>	ND	"	"	"	39.4	4.5
16	アミタケ	<i>Suillus bovinus</i>	ND	"	"	"	31.1	2.9
17	ショウゲンジ	<i>Rozites caperata</i>	ND	"	"	"	77.5	6.3
18	コガネタケ	<i>Paeolepiota aurea</i>	ND	"	2002/9/29	"	60.8	6.1
19	シャカシメジ	<i>Lyophyllum fumosum</i>	ND	"	"	"	31.8	3.5
20	ナラタケ	<i>Armillariella mellea</i>	ND	長野県塩尻市	2002/9/30	"	43.3	3.7
21	クリタケ	<i>Naematoloma sublateralitum</i>	ND	長野県松本市	2002/10/2	"	36.8	3.3
22	ウスヒラタケ	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	ND	"	"	"	27.2	2.2
23	ニセアブラシメジ	<i>Cortinarius tenuipes</i>	ND	"	"	"	57.1	5
24	シモフリシメジ	<i>Tricholoma portentosum</i>	ND	"	"	"	43.7	5.1
25	ハタケシメジ	<i>Lyophyllum decastes</i>	ND	"	"	"	35	2.3
26	ハツタケ	<i>Lactarius hatsudake</i>	ND	"	2002/10/3	"	27.2	3.8
27	ニオウシメジ	<i>Tricholoma giganteum</i>	ND	沖縄県那覇市	2002/10/7	新垣 隆	163.1	55.4
28	コウタケ	<i>Sarcodon aspratus</i>	ND	栃木県塩谷町	2002/10/6	福田廣一	45.1	8.7
29	ニセアブラシメジ	<i>Cortinarius tenuipes</i>	ND	栃木県茂木町	"	"	61.1	5.9
30	キシメジ	<i>Tricholoma flavovirens</i>	ND	長野県松本市	2002/10/7	竹内嘉江	21.8	2.8
31	シロハツ	<i>Russula delica</i>	ND	長野県明科町	2002/10/9	"	57.1	7.3
32	トキイロヒメタケ	<i>Pleurotus salmonaeostramineus</i>	ND	岐阜県各務原市 各務東町	2002/10/14	—	105.1	13.9
33	ホンシメジ	<i>Lyophyllum shimeji</i>	ND	長野県朝日町	2002/10/	竹内嘉江	60.6	8.4
34	ウスヒラタケ	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	ND	岐阜県金山町 岩瀬	2002/10/15	中島高久	115.5	18.2
35	コウタケ	<i>Sarcodon aspratus</i>	ND	長野県辰野町	2002/10/17	竹内嘉江	33.5	6.5
36	タモギタケ	<i>Pleurotus cornucopiae</i>	ND	岐阜県養老町 上之郷	2002/10/19	—	97.5	11.5
37	バカマツタケ	<i>Tricholoma bakamatsutake</i>	ND	千葉県君津市 豊英町	2002/10/10	寺嶋芳江	—	7.7*
38	ムキタケ	<i>Panellus serotinus</i>	ND	大分県九重町 黒岳	2002/10/21	—	292.3	56.5
39	アラゲキクラゲ	<i>Auricularia polytricha</i>	ND	鹿児島県蒲生 町	2002/	片野田逸郎	35.2	33.1
40	ウスヒラタケ	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	ND	長野県長野市 松代町	2002/11/23	伊藤将視	149.3	24.5**
41	ヒラタケ	<i>Pleurotus ostreatus</i>	ND	"	2002/11/26	"	146.7	18.6**
42	ウスヒラタケ	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	ND	沖縄県石川市	2002/11/28	新垣 隆	332.6	31.8**
43	キノガサタケ	<i>Dictyophora indusiata</i>	ND	栃木県那須町	2002/10/18	栃木県林業セ ンター研究部	33.7	5.8
44	ハタケシメジ	<i>Lyophyllum decastes</i>	ND	栃木県藤原町	2002/8/14	"	—	—
45	ハナヒラタケ	<i>Sparassia crispa</i>	ND	栃木県藤原町 三依地内	2002/8/11	"	—	—
46	チチタケ	<i>Lactarius volemus</i>	ND	栃木県宇都宮 市	—	"	—	—
47	タモギタケ	<i>Pleurotus crnucopiae</i>	ND	人工栽培	2002/8/26	"	—	—

ND は測定限界(0.1ng/ml)以下

*50℃で通気乾燥 **50℃インキュベータで乾燥 その他は全て凍結乾燥

シャカシメジはセンボンシメジの異名を持つ

ニセアブラシメジはクリフウセンタケの異名を持つ

栃木県林業センター研究部提供品は人工栽培したもので、菌の採集地を表示

LCQ deca を用いた。HPLC 部分は Shodex Asahipak ES-502N 7C カラム、7.6 x 100 mm を装着した。移動相は 32% CH₃CN-0.1%AcOH-H₂O を用い、流速は 0.5 mL/min であった。MS 部分における試料のイオン化は ESI、Positive mode でおこなった。

2-3. 検量線

サイロシビンの検量線は LC/MS/MS

(MS²)によるフラグメントイオン m/z 240 および m/z 205 の面積の和で求め、サイロシンの検量線は MS²によるフラグメントイオン m/z 160 の面積を利用して求めた(図 1)。検量線の限界は 0.1ng/mL であった(図 2)。なお、検量線は 3 回測定した結果の平均値を示した。なお今回の測定において、キノコ中のサイロシビンおよびサイロシンの存在の可能性を否定し得

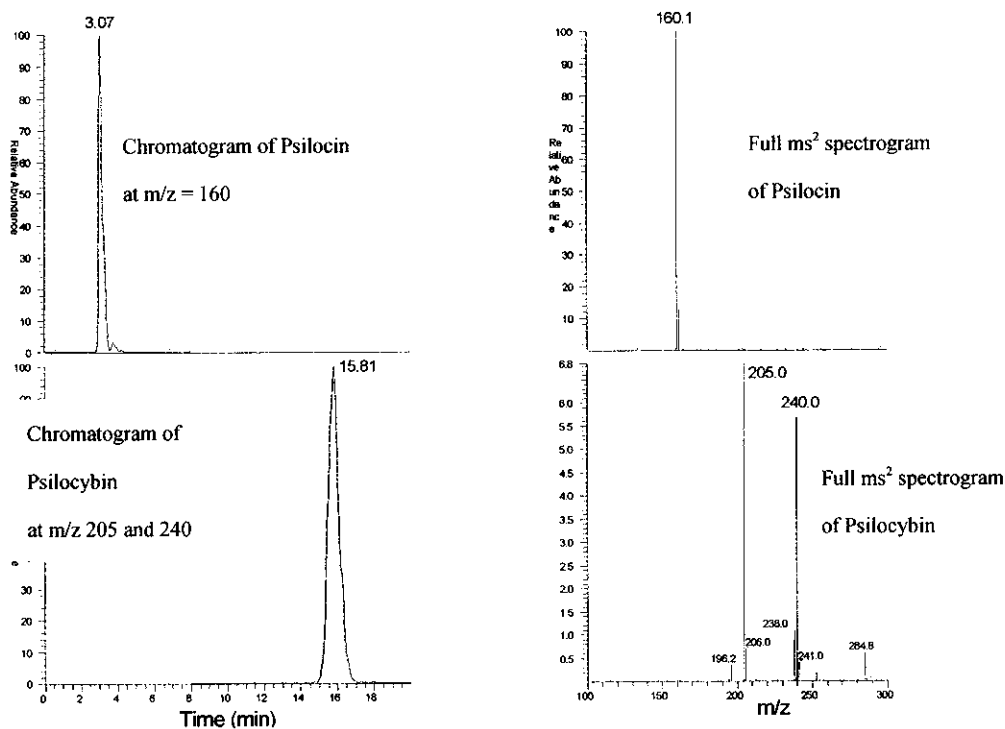


図 1 Psilocin および LC/MS² スペクトラム

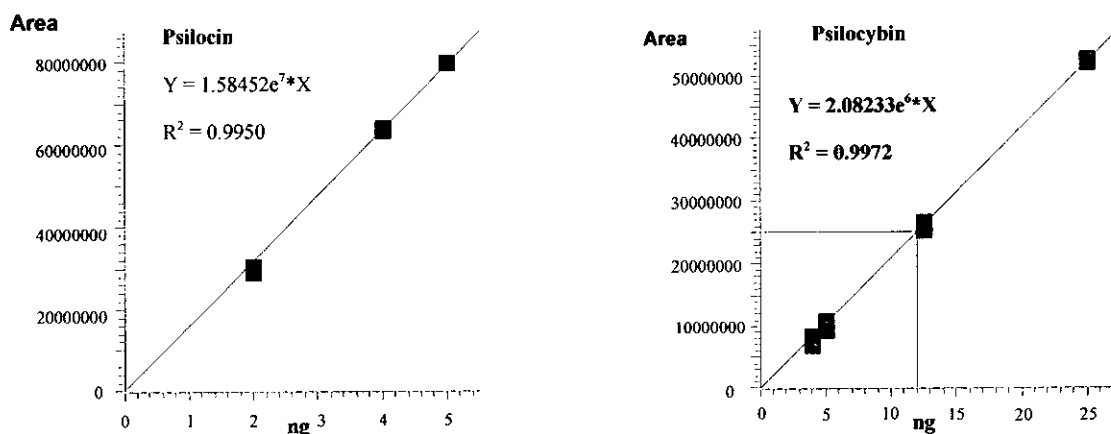


図 2 Psilocin および Psilocybin の検量線

ないため、ブランク試験には純水を用いた。

C. 研究結果

1. 日本国内産野生および栽培キノコにおける含量

試料は採集後直ちに凍結され、冷凍宅配便で近畿厚生局麻薬取締部木本鑑定官のもとに送られた。この試料40種48検体は凍結乾燥され、乳鉢で粉末化された後、約1gが密封ガラス容器に入れられて著者に送られてきた。試料は測定まで冷蔵保存し、2003年2月同時に全てを処理した(表1)。

測定結果の代表例としてマツタケ(*Tricholoma matsutake*)のシロシビンおよびシロシンを測定したスペクトラムを図

3に示す。シロシビンおよびシロシンを特徴づけるMS²のスペクトルは検出されなかった。試料中のシロシビンおよびシロシンの含量を表1に示すが、いずれも検出限界以下であった。

2. オオシロカラカサタケに含まれるシロシビン類の測定

昨年の報告書に野生のオオシロカラカサタケ(*Chlorophyllum molybdites*)から微量のシロシビン(0.0002%)を検出したと報告したが、昨年同様に木本鑑定官から淀川堤防上で採集した試料が上記検体と同様な形で送られてきた。しかし、本年度の試料からはシロシビンは検出されなかった。気象条件などの環境要因により、キノコにおける産生能が変動したものと考えられる。

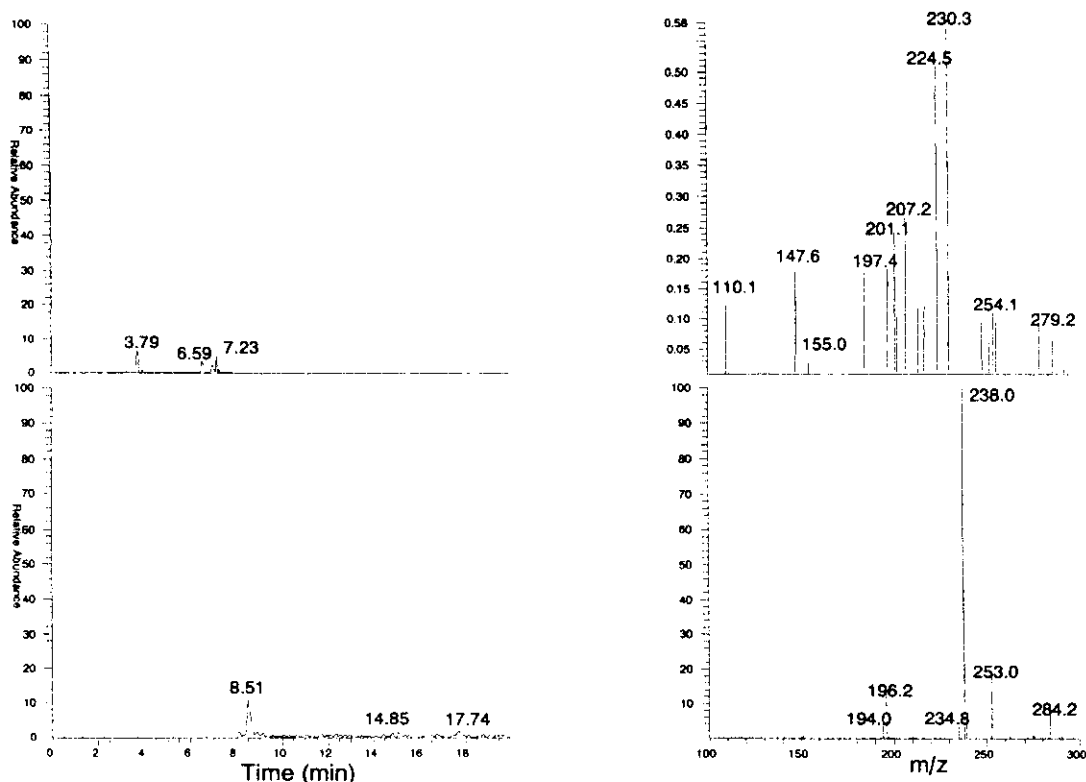


図3. マツタケ(*Tricholoma matsutake*)の測定例

D. 結論

平成 13 年度研究報告書において、食料品店で発売されていたシイタケ、マイタケ、ブナシメジ、ツクリタケ、ナメコ、エノキタケ、ヤマブシタケ、エリンギ、アガリクス茸、ボルチーニ茸、マンネンタケ、ヒラタケ、クロアワビタケ、キクラゲ中のシロシビンおよびシロシンの含量を測定し、全ての種において麻薬物質が検出されなかったことを報告した。今回は引き続き、林野庁から提供されたわが国における代表的な食用キノコ 40 種における幻覚性麻薬物質の有無を検討した。その結果、全ての試料からこれら成分は検出されなかった。今後引き続き他の食用キノコや野生キノコについても同様の試験を実施し、確認をする予定である。

E. 謝辞

本研究を行うにあたり各種キノコ試料を提供していただいた方々および林野庁の担当官各位に感謝します。

研究協力報告書

イオンペアーHPLCによる幻覚性キノコ中サイロシビンの定量分析

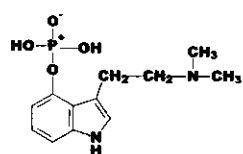
研究協力者 木本 茂 厚生労働省近畿厚生局麻薬取締部 鑑定官

研究要旨 幻覚性キノコにはサイロシビン及びサイロシンの2種類の麻薬成分が含まれ、これらのキノコが鑑定囑託された場合、鑑定試験はこの2化合物の検出を目的に行われる。しかしながら一般的に用いられる逆相液体クロマトグラフィー(HPLC)ではサイロシビンのカラム保持が弱く、キノコ常在他成分との分離が不十分である。そこで、イオンペアーHPLCの適用を検討した結果、移動相に5 mM di-n-hexylammonium acetate/methanol(70/30)を用いたときサイロシビンが十分保持され、幻覚性キノコ中のサイロシビン定量が可能であった。また検出器として分光蛍光検出器を用いた場合、ダイオードアレイ検出器より約20倍の高感度が得られ、微量定量に適することが明らかとなった。

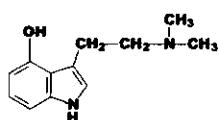
A. 研究目的

幻覚性キノコは、長い間世界各地で宗教儀式や快樂追求等の目的で使用されているが、我が国でもインターネットによる宣伝販売やスマートショップ等薬物愛好者が集まる店頭販売により流通経路が拡大し、最近特に巷に蔓延している。この乱用による危害防止のため、平成14年6月にサイロシビンまたはサイロシンを含有する幻覚性キノコは麻薬原料植物に追加指定され、規制対象になった。捜査活動により押収されたこれらのキノコが違反物件であると判定するためには、成分試験によりサイロシビンまたはサイロシンの含有を確認しなければならない。一般的にサイロシビンは、トリメチルシリル誘導体化後ガスクロマトグラフィー質

量分析(GCMS)を行うか、誘導体化せずに直接液体クロマトグラフィー(HPLC)または薄層クロマトグラフィー(TLC)を行う方法により検出確認されている。しかし、汎用される逆相HPLCでは分子内のリン酸基のためにカラム内固定相への保持力が弱められ、移動相の種類にかかわらず早く溶出される^{1)~3)}。したがって、キノコ常在成分との分離が不十分であり、定量試験が困難であった。本研究では、HPLCによる幻覚性キノコ中のサイロシビン定量試験法確立を目的として、移動相に四級アンモニウムイオンペアー剤を添加し、サイロシビンのリン酸基陰イオンとのイオン対を形成させ、固定相との親和力を高める方法について検討を行った。



psilocybin



psilocin

B. 研究方法

1. 実験材料キノコ

幻覚性キノコとして、最も多く乱用されている *Psilocybe cubensis* を選択し、日

本国内で販売されていた乾燥品(押収物)、オランダ王国アムステルダム市内で販売されていた乾燥品(購入)、及び日本国内で培養採取後乾燥させたもの(アムステルダムで購入の培養キットより)を用いた。対象試料としての一般キノコは、大阪府下の食料品店で販売のアガリクス茸を購入した。

2. 試薬

メタノールは和光純薬製のHPLC級、水は和光純薬製の蒸留水を用いた。イオンペアー剤は東京化成工業製の

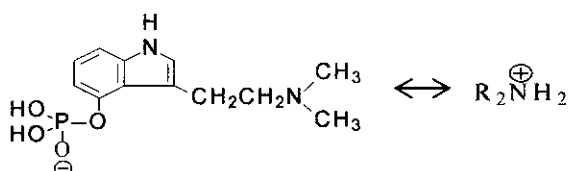
di-n-propylammonium acetate(DPAA)

di-n-butylammonium acetate(DBAA)

di-n-amylammonium acetate(DAAA)

di-n-hexylammonium acetate(DHAA)

の4種類で、それぞれLCMS級を用いた。各種イオンペアー剤の構造式は図1のとおりである。



イオンペアー剤

CH₃(CH₂)₂- DPAA

R= CH₃(CH₂)₃- DBAA

CH₃(CH₂)₄- DAAA

CH₃(CH₂)₅- DHAA

図1. 各種イオンペアー剤構造式

3. 装置及び分析条件

①HPLC : Agilent technologies社製

HP-1100 series

ポンプ : バイナリー G1315B

カラム: Symmetry C18 4.6×250mm

粒子径 5 μm (Waters 社製)

移動相 : 5mM DHAA水溶液/methanol

(70/30)

恒温槽温度 : 30℃

検出器 : ダイオードアレイ G 1315B

定量用波長 : 265 nm

②HPLC : 島津製作所製 LC10A

ポンプ : デュアル LC-10AT_{VP}

カラム、移動相及び恒温槽温度は上記と同じ

検出器 : 分光蛍光検出器 RF-10A_{XI}

励起波長 : 220nm 測定波長 : 315nm

4. キノコの前処理

キノコを乾燥させ、傘部、柄部を合わせて均一に粉碎細末化後、その約100 mgを正確に量り取り、10 mLの共栓付試験管に入れる。メタノール2 mLを添加し、密栓して2時間超音波処理(28kHz)し、1晩静置する。次に非水系用ディスクフィルター(DISMIC-13HP 0.20 μm)でろ過後、ろ液の5 μLをHPLCに注入する。

5. 最適移動相の検討

前記4種のイオンペアー剤を精製水に溶かして5 mM濃度とし、ポンプAの溶媒とする。ポンプBの溶媒はHPLC用メタノールとする。メタノールの比率が5対95~95対5の間で段階的になるようにポンプA、Bの流量を変化させながら、サイロシビン標準溶液(500 μg/ml メタノール)を5 μL注入し、各溶出時間を見た。

C. 研究結果及び考察

1. イオンペアー剤の比較検討

アルキル基の長さの異なる4種のイオンペアー剤5 mM水溶液とメタノールの混合液を移動相とし、イオンペアー剤水溶液比率を変化させたときのサイロシビン溶出時間は図2に示すグラフのとおりである。

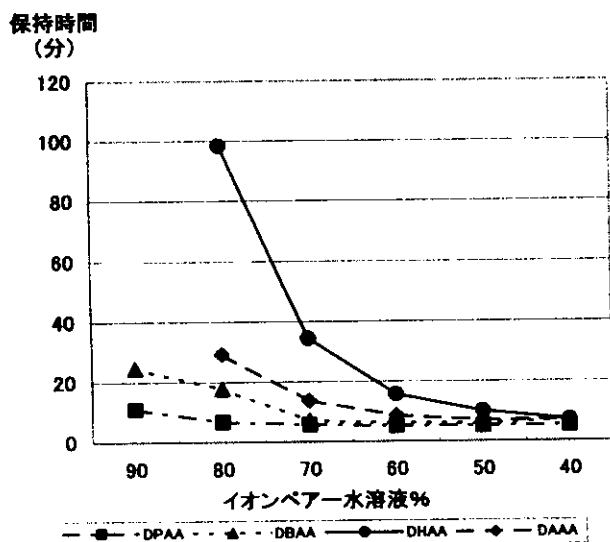


図 2. 各種イオンペアー剤比率を変えた時のサイロシビン溶出時間の変化

これにより、DHAAが最も強くサイロシビンをカラム内に保持させ、5 mM DHAA水溶液-メタノール比率を70対30にすればキノコ他成分との分離が十分得られることが明らかになった。この条件で幻覚性キノコ及び一般キノコから得られたHPLCクロマトグラムの一例は図3のとおりである。サイロシビンは約31分に溶出し、アガリスク茸を含む一般食用キノコにはその溶出位置にピークが出現しなかったことから、この条件でキノコ中サイロシビンの定量分析ができる。なお、サイロシンについては溶出時間が約10.3分で、一般キノコの成分ピークと重なり、これら2化合物の同時定量にはグラジェント法の検討が必要である。

2. 検量線の作製

サイロシビン標準品のメタノール溶液を500、100、50、20、10、5、2、1 $\mu\text{g/mL}$ の各濃度に調製し、研究方法の項に示した分析条件でそれぞれHPLCに5 μL 注入した。その結果、ダイオードアレイ検出器では20 $\mu\text{g/mL}$ (絶対注入量 100 ng)まで、また、分光蛍光検出器では1 $\mu\text{g/mL}$ (絶

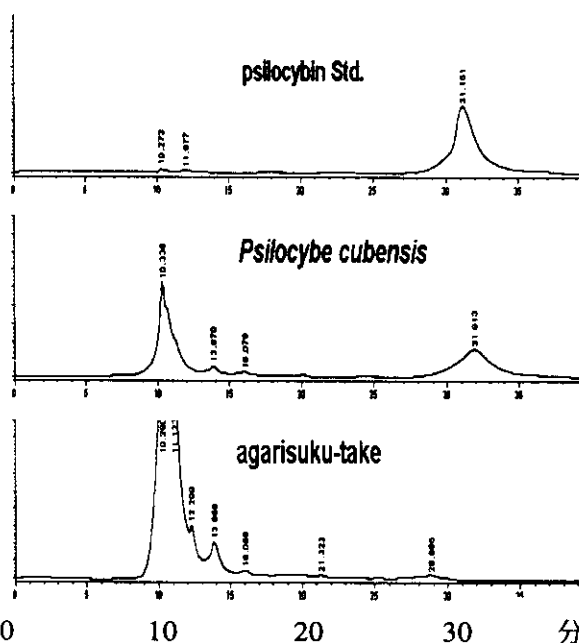


図3. キノコ抽出物のHPLCクロマトグラム(上段:サイロシビン標準品、中段:幻覚性キノコ、下段:アガリスク茸)

対注入量5 ng)まで、良好な直線性を示した。したがって、蛍光検出器の定量限界はダイオードアレイ検出器(265nm)の1/20濃度であり、サイロシビンの微量定量には、分光蛍光検出器の利用が望ましい。各検出器によって得られたサイロシビンの検量線を図4及び図5に示す。

3. 幻覚性キノコ中のサイロシビン定量

我が国で押収された真空パック入りの乾燥キノコ14検体、オランダのアムステルダム市内で販売されていたチャック付ポリ袋入りの乾燥キノコ4検体、また、国内販売のマジックマッシュルーム培養キットから生育させたキノコを乾燥させたもの2検体について、本分析法を適用し、ダイオードアレイ検出器によりサイロシビンの定量を行った。結果は図6のとおり、含有率の最も高いもので1.13%、最も低いもので0.07%の値を示し、キノコによって大きな含有量差があった。