

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

研究分担課題 薬物の分析と同定に関する研究
研究分担者 花尻 瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

違法ドラッグ製品から検出された大麻成分及び合成カンナビノイド等の分析
研究協力者 菊地 博之 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究助手
研究協力者 内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨 大麻様の作用を標榜して販売されていた違法ドラッグ 1 製品から、実際に大麻 (*Cannabis sativa L.*) に由来すると考えられる 3 種の化合物 (Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabidiol, cannabinol), 及び平成 21 年度に新規に指定薬物に指定された合成カンナビノイド (cannabicyclohexanol) など 9 種の向精神活性を有する化合物が検出された。本研究では、検出されたこれらの化学成分について、製品中での含有量を調査するために、LC-MS による定量分析を行った。

A. 研究目的

昨今、主にインターネット等を介した違法ドラッグの流通拡大、及びそれらの乱用が深刻化している。これら蔓延する違法ドラッグに対応するため、興奮等の作用を有する蓋然性が高く、保健衛生上の危機が発生する恐れがある薬物や植物を厚生労働大臣が指定薬物として指定する指定薬物制度が平成 19 年 4 月から施行された。これに伴い、違法ドラッグ市場における指定薬物の流通は大幅に減少した。一方で、現行の法制度では規制対象とならない幻覚性、麻薬性を標榜する植物の樹脂や乾燥物、粉碎物などを用いた、いわゆる植物系違法ドラッグ製品の流通拡大が認められている。

我々は、これら製品の流通実態調査を行うため、毎年、市場流通品について買い上げを行い、LC-MS, GC-MS などを用いて含有成分のスクリーニング調査を行っている。本研究では、試験を行った製品のうち、大麻取締法において規制対象である大麻 (*Cannabis sativa L.*) に由来すると考えられる 3

種の化合物 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN) 及び平成 21 年 11 月より指定薬物として規制された合成カンナビノイド (Cannabicyclohexanol) など Fig. 1 に示した 9 種類の向精神活性を有する化合物が検出された 1 製品に着目し、製品中での含有量を明確にするため成分の定量分析を行った。なお、本製品より検出した化学成分の定性的な検知、同定については花尻らの報告書¹⁾に、含有植物の遺伝子解析の詳細については緒方らの報告書²⁾に示した。本報告書では、主にこれら成分の定量分析について記述する。

B. 研究方法

1. 試料

本製品の入手法等の詳細については、花尻らの報告書¹⁾に記載した。

2. 試薬

Normacromerine, macromerine, mescaline hydrochloride, harmaline, harmine は、菊地ら

の報告³⁾と同様のものを使用した。Cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN) はSIGMA社製を用いた。Cannabicyclohexanol (CCH) は内山らの報告⁴⁾に記載のものを用いた。 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) は, Cerilliant社製のものを用いた。内部標準物質として用いた lidocaine は, SIGMA社製を使用した。CCH以外は, 1 mg/mLに調製したメタノール溶液を標準溶液として用いた。その他試薬はHPLCグレードまたは試薬特級に準じたものを用いた。また, 膜ろ過フィルターは, UltraFree-MC (0.45 μ m, Millipore社製)を用いた。

3. 成分の定量分析

各化合物を, Table 1に示す濃度範囲にメタノールで段階希釈したものをキャリブレーションスタンダードとした。また, 内部標準物質としては, lidocaine (0.5 mg/mL, final conc.)を使用した。定量値は, 各濃度に調製した分析対象化合物と内部標準物質の擬分子イオンピーク $[M+H]^+$ のピーク面積比から検量線を作成した。なお, 各化合物の擬分子イオンピークは以下の通りである。normacromerine; m/z 212, macromerine; m/z 226, mescaline; m/z 212, harmaline; m/z 215, harmine; m/z 213, cannabidiol (CBD); m/z 315, cannabinol (CBN); m/z 311, cannabicyclohexanol (CCH); m/z 333, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC); m/z 315, lidocaine; m/z 235

4. 試料抽出方法

試料 20 mg を測りとり, 内部標準物質 (lidocaine, 0.5 mg/mL) を含有するメタノール (1 mL) を加え, 10 分間超音波抽出を行った ($n=5$)。得られた抽出液をフィルターろ過したものを LC-MS 用試料とした。

5. LC-MS 測定条件

[LC 条件]

装置: Waters UPLC-SQD

カラム: Atlantis HSS T3 (2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m, Waters 社製)

移動相: A = 0.1% ギ酸水溶液, B = 0.1% ギ酸 (メタノール: アセトニトリル = 1:1)

グラジエント条件: A/B 95/5 (0 min)-liner gradient- 80/20 (15 min)-liner gradient-20/80 (50 min)

流速: 0.3 mL/min

注入量: 1 μ L

カラム恒温相温度: 40 $^{\circ}$ C

検出: ダイオードアレイ検出器

[MS 条件]

イオン化法: ESI 法, ポジティブモード

Capillary: 3 kV, Cone voltage: 20 V, Source temp.: 120 $^{\circ}$ C, Desolvation temp.: 400 $^{\circ}$ C, Cone gas flow: 50 L/hr, Desolvation Gas Flow: 800L/hr, Scan mode mass range: m/z 50-500

C. 研究結果

1. 成分の定量分析

試料のメタノール抽出物について LC-MS 分析を行った結果, トータルイオンクロマトグラム上, normacromerine (1), macromerine (2), mescaline (3), harmaline (4), harmine (5), CBD (6), CBN (7), CCH (8), Δ^9 -THC (9)に由来する擬分子イオンピーク $[M+H]^+$ が認められた。これらは, 各々の標品と UV スペクトル, 保持時間, 及びマススペクトルを比較することにより同定した (Fig. 2)。各化合物について, 前述した分析条件において検量線を作成した。その結果, Table 1に示すように, 各分析対象化合物の直線式は, 当該濃度範囲において良好な直線性 ($R^2>0.990$)を示した。得られた検量線から算出した試料中の成分含量は, それぞれ, 0.16, 0.04, 0.02, 0.33, 0.13, 0.02, 0.03, 0.54, 0.13 mg/g product であった。

D. 考察

本製品の LC-MS 分析の結果、9 種の化合物が検出された。特に、大麻の主活性成分である 3 種のカンナビノイド (6, 7, 9) が検出されており、本製品には大麻、またはその加工品が混入することが強く示唆された。また、合成カンナビノイドである 8 は、近年、主に“スパイス”という名称で流通する植物系違法ドラッグ製品及びその関連製品において検出例が増大したため、平成 21 年 11 月より指定薬物制度において規制対象となった化合物である。さらに、フェネチルアミン化合物である、1, 2 は、幻覚性サボテンとして知られている *Coryphantha macromeris* (サボテン科) の含有成分であることが知られている。近年、他の違法ドラッグ製品からも、本サボテンが検出された事例が報告されている³⁾。化合物 4, 5 は、違法ドラッグ市場において汎用される植物であるハルマラ (*Peganum harmala*) 等の含有成分として知られており、モノアミンオキシダーゼの阻害作用をもつため、1, 2, 3 との同時摂取により幻覚作用が高まる可能性がある。なお、定量分析の結果、各分析対象化合物は、合成カンナビノイド 8 が 0.54 mg/g と最も高い値を示したが、その他成分は製品 1g 中 0.5 mg 未満であり、大麻主活性成分 9 の含有量は 0.01% 程度であった。

E. 結論

本製品から、大麻またはその加工品に由来すると考えられる CBD (6), CBN (7), Δ^9 -THC (9) が検出された。更に、幻覚性サボテン (*C. macromeris*)、違法ドラッグ市場において汎用される植物 (*P. harmala*) に由来すると考えられる化学成分が検出された。これら天然物に由来すると考えられる成分に加え、合成カンナビノイドである CCH (8) が検出された。以上のように、本製品は、多種多様な植物及び合成化合物の混合物と

して流通しており、違法ドラッグ市場において、このような製品の増加が危惧される。今後、更に大麻成分を含む製品が検出される可能性が考えられるため、継続して監視を強化していく必要がある。

F. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究費補助金、医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 21 年度研究分担報告「植物系違法ドラッグ製品から大麻成分が検出された事例について」(花尻瑠理)。
- 2) 厚生労働科学研究費補助金、医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 21 年度研究分担報告「植物系違法ドラッグ製品いわゆる“ブレンドハーブ”の基原植物について」(緒方潤)。
- 3) Kikuchi, H., Uchiyama, N., Ogata, J., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., *Forensic Toxicol.* Submitted.
- 4) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., Haishima, Y., Goda, Y., *Chem. Pharm. Bull.* 57, 439 - 441 (2009).

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし。
2. 学会発表
1) 緒方 潤, 内山奈穂子, 菊地博之, 徳本廣子, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広: 植物系違法ドラッグ製品いわゆる“ブレンドハーブ”の基原植物について, 日本薬学会第 130 年会, 発表予定。

H. 知的所有権の取得状況

特になし。

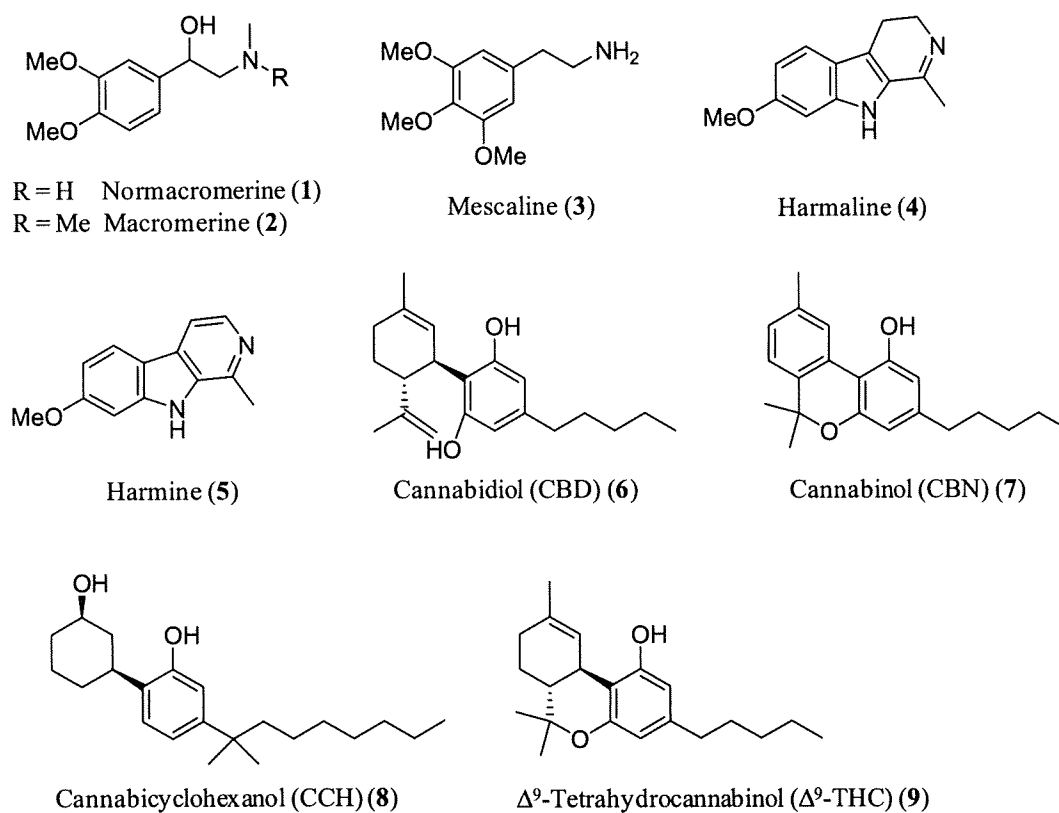


Fig. 1 Chemical structures of compounds detected in the herbal product

Table 1 Parameters of the calibration curves and the contents of the nine targeted compounds in the product

Compound	Range ($\mu\text{g/ml}$)	Equation	Correlation coefficient (r^2)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	Contents (mg/g product)
Normacromerine (1)	0.05 - 10	$y = 0.0256x - 0.0017$	0.998	0.5	1.0	0.16
Macromerine (2)	0.05 - 10	$y = 0.0724x + 0.0037$	0.991	0.5	1.0	0.04
Mescaline (3)	0.05 - 10	$y = 0.2847x - 0.0017$	0.995	0.1	0.1	0.02
Harmaline (4)	0.05 - 10	$y = 0.5838x + 0.0258$	0.997	0.05	0.1	0.33
Harmine (5)	0.05 - 5	$y = 1.2613x + 0.0234$	0.998	0.05	0.05	0.13
CBD (6)	0.05 - 10	$y = 0.1005x + 0.0347$	0.994	0.05	0.1	0.02
CBN (7)	0.05 - 5	$y = 0.0975x + 0.0145$	0.990	0.25	0.5	0.03
CCH (8)	0.5 - 50	$y = 0.0030x - 0.029$	0.991	10	25	0.54
Δ^9 -THC (9)	0.05 - 10	$y = 0.1263x + 0.0069$	0.998	0.25	0.1	0.13

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) correspond to concentrations giving signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively

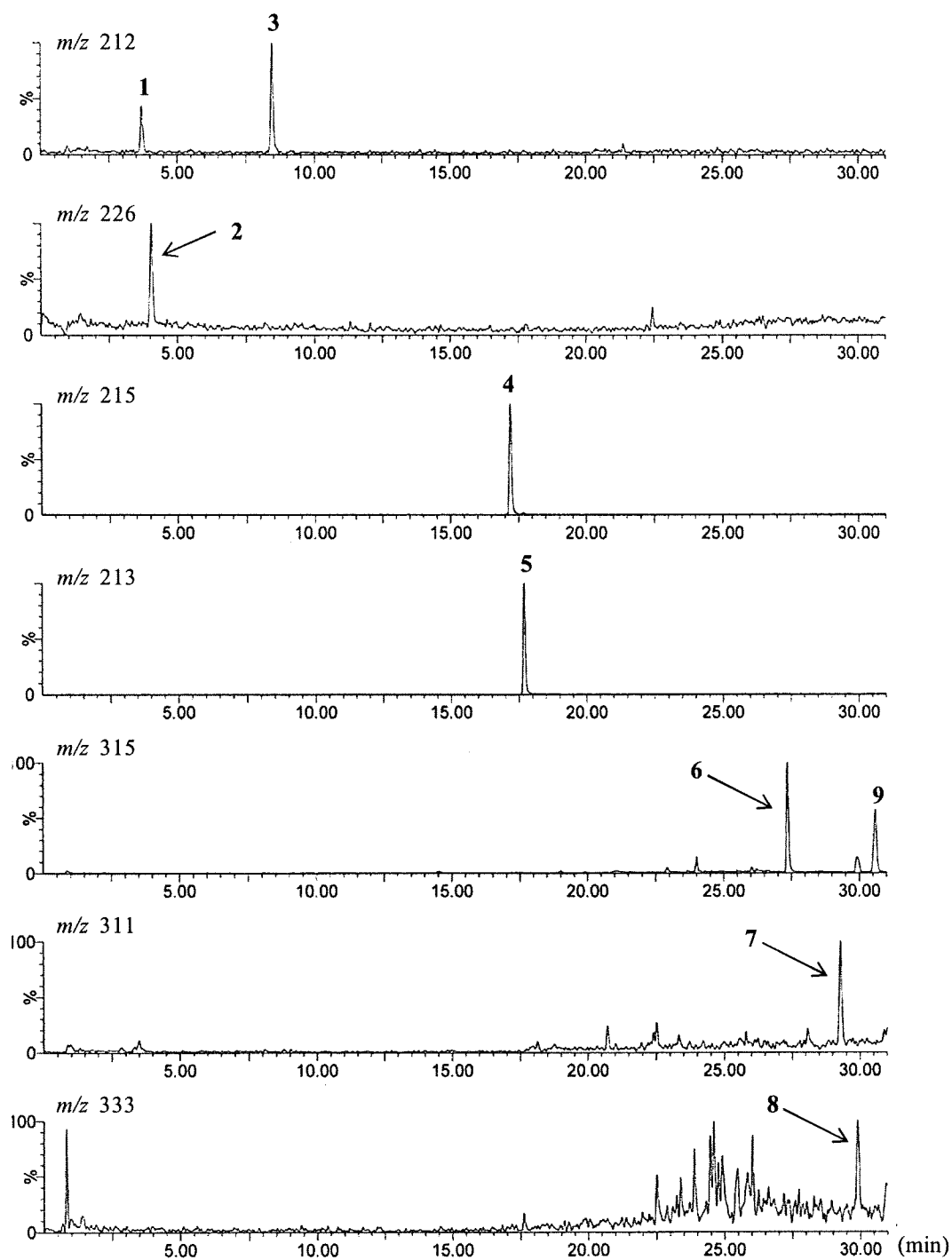


Fig. 2 Selected ion monitoring (SIM) chromatograms of the methanol extract from the sample.

The numbered peaks were identified as the $[M+H]^+$ ions of macromerine (1), normacromerine (2), mescaline (3), harmaline (4), harmine (5), CBD (6), CBN (7), CCH (8) and Δ^9 -THC (9), respectively.

分担研究課題 薬物の分析と同定に関する研究

研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長
研究協力者 緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

ケシ属植物種子の発芽能力鑑定法の確立

研究要旨 昨年度、大麻種子の発芽試験に代わる簡便で迅速な発芽能力鑑別法としてテトラゾリウム塩（2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride：TTC）を用いた呈色反応による判別法の確立した。そこでケシ属植物種子にも応用可能か検討した。各種テトラゾリウム塩類試薬の中でもTTCがケシ属植物種子においても誤判定の危険性が少なく、判定できるものと考えられた。

研究協力者

花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部
室長

川原信夫（独）医薬基盤研究所薬用植物資源
研究センター センター長

淵野裕之（独）医薬基盤研究所薬用植物資源
研究センター筑波研究部栽培研究室室長

（ケシの実）が含まれ、また、「あんぱん」の中央部に付いている小さな種はケシの種子である¹⁾。ただし、種子が発芽すればその時点から取り締まりの対象になる。しかし、一般に流通しているケシの種子は加熱処理が施されており発芽することはない。このように一部のケシ属植物の種子は大麻種子と同様の措置が取られている。昨年度、大麻種子の迅速発芽能力鑑別法として、一般市販試薬（テトラゾリウム塩類）を用いた判別法の確立を行った²⁾。そこで、今年度はケシ種子にも同様の手法が可能か検討し、検定法の確立を試みた。

A. 研究目的

ケシ (*Papaver*) 属植物は、春から夏にかけて色あざやかで美しい大きな花を咲かせるものが多く、ガーデニングや切り花用の植物として人気がある。一方、ケシ属植物の中には、モルヒネ、コデイン、テバインと言った麻薬（原料）成分が含まれていることから栽培が規制されている種もある。本属植物中のケシ (*Papaver somniferum*) およびアツミゲシ (*P. setigerum*) の2種は「あへん法」により、ハカマオニゲシ (*P. bracteatum*) は「麻薬及び向精神薬取締法」で対象植物として栽培、所持等が禁止されている。一方で、種子の所持は取り締まりの対象にはなっていない。身近なところでは、「七味唐辛子」にもケシの種子

B. 研究方法

1. 試料

発芽能力（発芽防止未処理）を有するケシ種子として、（独）医薬基盤研究所・薬用植物資源研究センター・筑波研究部において栽培、収穫された、一貫種、フランクフルト、ローマ3号-2、トルコ2-1、イラン1、インド6、（以上、ソムニフェルム種）および、セチゲルム種（朱）の7（品）種を用いた（図1）。対

照区（コントロール）は、発芽防止処理として、各種子をオートクレーブにて 120℃、30 分間加熱し、実験に供試した。

2. 発芽試験

試料である各種子は流水にて十分に洗浄後、実験シャーレに MilliQ 水を十分に含ませた脱脂綿をひいたものに播種し、25℃にて放置した。培養時のカビの繁殖を防止するため極力、無菌的に操作した。

3. 呈色反応

テトラゾリウム塩類として 2,3,5-Triphenyl-2*H*-tetrazolium chloride (TTC) は和光純薬工業より、3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide (MTT), 3,3'-[3,3'-Dimethoxy-(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl]-bis[2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2*H*-tetrazolium chloride] (Nitro-TB) および Cell Counting Kit-8 (WST-8) は同仁化学よりそれぞれ購入した (図 2)。WST-8 (液体) を除く各テトラゾリウム塩試薬は MilliQ 水に溶解し用いた。実験に使用する際の種子は、予め 45℃の MilliQ 水中で 30 分間加温し、胚を露出させるためにミクロスパーテルで押し切り (つぶし) 用いた。これらを直接、テトラゾリウム塩水溶液に入れ、45℃にて放置した。反応後は目視により発色 (発芽) 能力の有無を検討した。

反応 pH の測定には反応温度 45℃、反応時間 40 分とし、酢酸-酢酸 Na 緩衝液 (4, 5)、リン酸 K 緩衝液 (6, 7)、Tris-HCl 緩衝液 (8, 9)、終濃度 0.1M とし測定を行った (カッコ内は使用 pH を示す)。これらすべての条件検討では、各種子 10 粒を 1 試験区とし、反応容量 100 μ l とし 1.5 ml チューブ内で反応を行った。反応終了後、軽く遠心後、上清 (反応溶液) を除去後、酢酸エチル 100 μ l を添加し、超音波洗浄機中で組織からの色素 (ホル

マザン) の抽出を行った。抽出後、MilliQ 水を等量加え遠心した。

C. 研究結果

1. 発芽試験

本研究で用いた各種ケシ属種子試料は、通常の発芽試験を行い、発芽能力の有無を確認した。各種子 10 粒の 3 回の検定を、温度 25℃で行った。その結果、発芽能力に大きな差が見られることが分かった (表 1)。図 3 に播種後 1 週間の結果を示す。発芽する、しない、という発芽率に差があること、さらには発芽後の成長の早さにも違いが見られた。特に後者は着色の濃淡と関連することが考えられる。

2. 呈色反応

TTC^{3, 4, 5)}, MTT, Nitro-TB, WST-8 よる呈色試験を行った。本法の原理は、種子胚 (芽) 中の呼吸系酵素活性によって試薬中のテトラゾリウムが還元されホルマザン (有色物質) に変換し、結果として着色することで生死を判定するものである。図 4 に TTC の例を示す。これまで、TTC を用いた種子の生死判別法が報告されているが²⁻⁵⁾, MTT, Nitro-TB, WST-8 は報告されていない。上記 3 種は TTC 同様、テトラゾリウム塩類を用いた試薬で、感度が TTC に比べ高く、細菌や培養細胞の呈色反応に利用されている^{6, 7)}。今回、大麻種子に比べて、ケシ属種子は胚組織が小さく、酵素活性能力も低いことが考えられたため、高感度の 3 種のテトラゾリウム塩も実用可能か検討した。

WST-8 は水溶性のホルマザンを生成し、反応溶液中にホルマザンを放出することで、反応溶液の着色 (橙色) で反応を確認することができる。また、組織に傷をつけずに、非破壊での実験が可能である。

MTT は TTC の高感度改良型として販売されたもので、培養細胞の生死判定試薬としては

最も一般的な方法である (MTT assay) ^{6, 7)}.

今回のケシ属植物の種子では、これら高感度のテトラゾリウム試薬ではコントロール (死細胞) が着色する、中性から塩基性の pH で着色するなどの結果が得られた (図 5). WST-8 による反応溶液の着色はデータのばらつきが見られた (図 6). データは示さないがコントロールにも着色が見られた. Nitro-TB は反応しなかった. MTT や WST-8 を用いた場合、誤判定の危険性が大きいことが予想された. また、この結果は試薬の濃度に影響しないこともわかった.

一方、TTC 試薬は、データのばらつきがなく、pH の影響を大きく受けないことがわかった. また、種子 1 粒からの判定が可能であることも誤判定を引き起こす危険性が軽減される. しかし、感度という点では劣るため、迅速化と、より明確な判定結果を得るために、大麻種子判定使用時 (0.1%) より高濃度の使用が望ましいことが考えられた (2%). また、コントロールとの比較による判定が必要と思われる (図 7).

3. 最適化条件の検討

昨年度の大麻種子の条件を踏まえ、最適化条件の検討を行ったが、大麻種子の条件と大きく異なるところはなかった.

ケシ属植物種子の TTC を用いた判定として、推奨される方法は、前処理として 45°C30 分の加温、種子を押しつぶし胚組織を露出させ、2% TTC 溶液 (pH8.0)、45°C、40 分の加温が有効と思われた.

D. 考察

種子の発芽能力を検討する方法としては、その種子が最低限、生きていのかどうかを確認することが必要となる. そこで細胞中に存在する呼吸系還元酵素の活性の有無を指標としたテトラゾリウム塩による判定をケシ属植

物種子にも応用した.

ケシ属植物種子は非常に小さく、ソムニフェルム種で 1 粒の重量が 0.2~0.5 mg、セチゲルム種では 0.1~0.2 mg である. 胚組織を効率よく取り出すことが困難であるため、組織を着色する呈色反応には基本的には不向きである. そこで、破碎して反応させることも試みたが、有色の種皮を有する種 (ローマ、セチゲルム) などには不向きであった. また、破碎すると着色しないという結果も得られた. ケシ属植物の種子は、ポピーシードオイルとしても販売されるほど、油脂分が多くそれらが夾雑物として影響しているとも考えられる. 今回、テトラゾリウム塩類を用いた判定において誤判定を招く危険性があることがわかった. TTC は感度が低い分、良好な判定結果が得にくい、一方で、誤判定を招きにくいというメリットがある. また、この解決策としては、発芽防止処理を施したコントロールとの比較判定が最も有効と思われた.

E. 参考文献

- 1) 伊藤美千穂, 北山隆 「生薬単」東京, NTS, 2007
- 2) Ogata J. et al. *YAKUGAKU ZASSHI*, **128**(11) 1707-1711 (2008)
- 3) Hatano K., *Journal of the Japanese Forestry Society*, **34** (2), 37-41 (1952).
- 4) Honjyo H., Nakagawa I., *Kajyu Shiho A*, **6**, 37-42 (1979).
- 5) Zehao H., Jinmao Z., Xijin M., Jinxing L., *Annals of Botany*, **93**, 295-301 (2004).
- 6) Liu Y. et al. *J. Neurochem.*, **69**, 581-593 (1997)
- 7) Tominaga H. et al. *Anal. Commun.*, **36**, 47-50 (1999)

F. 健康危険情報

なし.

G. 研究発表

論文発表

なし.

学会発表

なし.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.



図1. 使用したケシ属植物種子

左から、一貫種、フランクフルト、ローマ、トルコ、インド、セチゲルム種、イラン
右図はローマ種

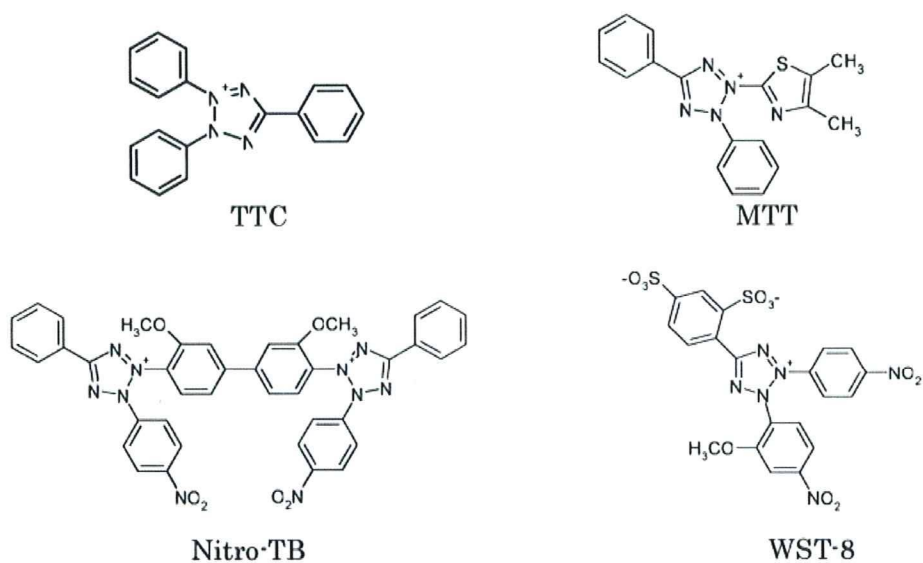


図2. 各種テトラゾリウム試薬

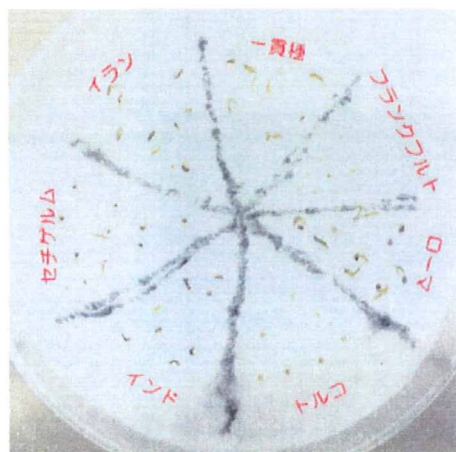


図3. 播種後1週間後の状況

表1 検供した種の発率

(品種)	発率 ※
一貫種	93%
フランクフルト	0%
ローマ	93%
トルコ	13%
インド	66%
イラン	86%
セチゲルム種	80%

※1週間後に測定結果

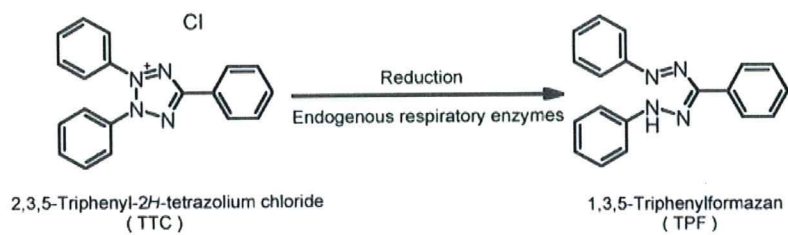


図 4. TTC におけるホルマザンの生成反応

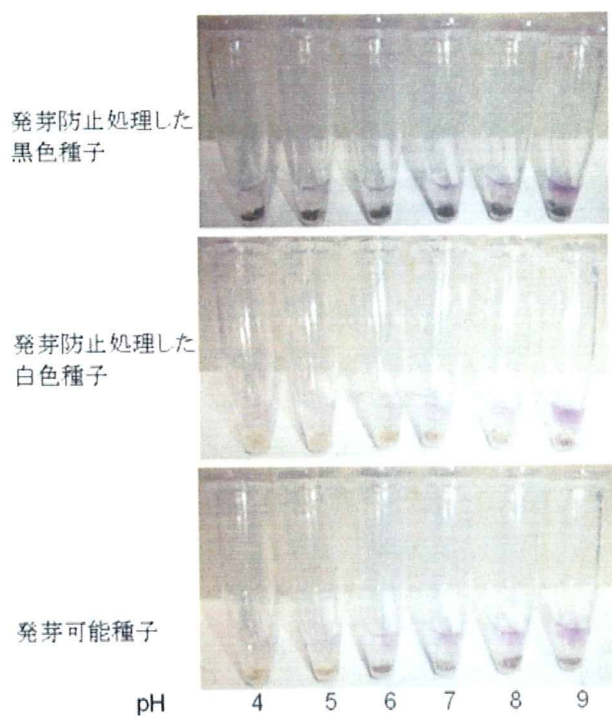


図 5. MTT 反応における pH の影響
各 10 粒, 0.005%MTT, 45°C, 30 分

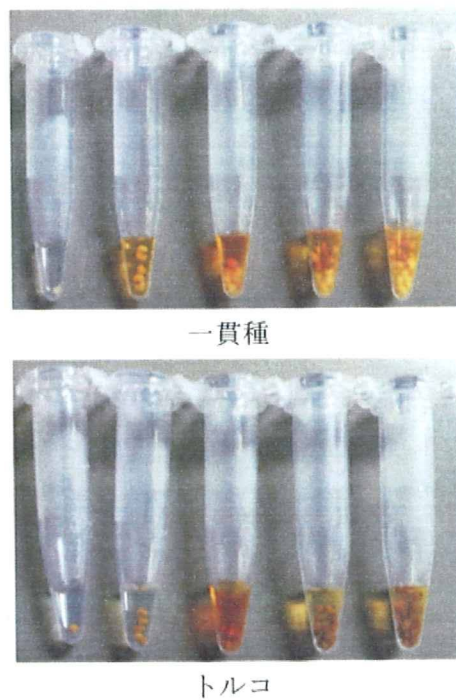


図 6. WST-8 による反応
左から, 1,5,10,20,30 粒
1/10 量 WST-8, 37°C, 48 時間



図 7. TTC による反応

左: 発芽防止処理済み (コントロール), 右: 発芽可能種子 (いずれも一貫種)
2%TTC, pH8.0, 45°C, 1 時間

分担研究課題 薬物の分析と同定に関する研究

研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長
研究協力者 緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

沖縄県自生きのこの基原種鑑別

研究要旨 沖縄県内に自生するきのこについて、DNA 塩基配列を基にした種鑑別を行った。塩基配列データベースに収載されているきのこの ITS1 および LS 領域の塩基配列との相同性から種を同定した。形態観察による同定とほぼ一致する結果が得られた。一方で、明確に同定できない種も存在したことから、幻覚性きのこなどの塩基配列データの整備、充実が必要であると考えられた。

研究協力者

佐久川さつき 沖縄県衛生環境研究所 主任研究員

花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部第三室室長

丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 第一室室長

A. 研究目的

きのこ(キノコ)とは菌類が形成する子実体(fruiting body)の中で、比較的大きく、肉眼で顕著に認識できる子実体(きのこ)を形成する菌類の総称であり、キノコと呼ばれるものの多くは、担子菌もしくは子囊菌に属する¹⁾。

幻覚性を有するきのこ、いわゆるマジックマッシュルームは麻薬成分であるサイロシン、サイロシピンを含有するきのこで、本成分を含有するきのこ類は平成14年6月より麻薬原料植物に指定している²⁾。これら化合物を含有するきのことしては、*Psilocybe*(シビレタケ属)および*Panaeolus*(ヒカゲタケ属)に属するきのこが該当するが、その数は50種以上と言われており、日本国内にも11種が自生する^{3, 4)}。また、沖縄県内にも自生していることから、これらの種による食中毒や、不法採取の報告がある⁵⁾。そこで、沖縄県内に生息するきのこの実態調査として、DNA 塩基配列データベースを基にした、きのこの種の鑑別を試みた。

B. 研究方法

1. 試料

沖縄県衛生環境研究所が平成21年3月に採

集した沖縄県内自生のきのこ6検体(21-1~6)(表1, 図1)を乾燥し、実験に用いた。

2. 実験方法

各乾燥試料約20mgを液体窒素で凍結させた後、MM-300(Qiagen)により粉碎した。粉碎した各試料よりDNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)を取扱説明書通り用いてgenomic DNAを抽出し、回収DNA溶液各100μL中の1μLをPCR反応に用いた。分析対象DNA領域はきのこの分類においてDDBJ/EMBL/GenBank DNAデータベース上に最も多く報告されている、核ribosomal RNAのInternal transcribed spacer 1(ITS1)およびLarge Subunit(LS)の2か所で検討した(図3)。各領域で保存性の高い配列を基にしたプライマー(ITS1 Forward primer: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', ITS1 Reverse primer: 5'-GCTCGTTCTTCATCGATGC-3' および LS Forward primer: 5'-TCGATGAAGAACGCAGCG-3', LS Reverse primer: 5'-ATCCTGAGGGAACTTCGGCA-3')^{3, 6)}を各々使い、反応溶液として、酵素にはEx Taq(Takara)0.1μL, PCR反応試薬にはAmpdirect Plus(Shimadzu)10μL, プライマー各0.5μL(10μM), DNA溶液1μLとし、全量20μLで以下のプログラムで反応を行った(95°C 3min; 94°C 30sec, 52°C 30sec, 72°C 40sec(LS領域は80sec), 35cycles; 72°C 10min)。PEG沈殿後、ダイレクトシーケンスによりPCR産物の塩基配列を決定した。Cycle Sequence反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用い、解析はABI

Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI) を使用した。シーケンス解析の結果、ピークの重なるサンプルに対しては Mighty-TA cloning Kit (Takara) を用いサブクローニング後、塩基配列の決定を行った。

各領域の塩基配列を決定後、DDBJ/EMBL/GenBank DNA データベースを用い、DNA 塩基配列相同性検索 (BLAST 検索) を行い種の同定を行った。

C. 研究結果

1. ITS1 領域の塩基配列解析

PCR を行った結果、全ての検体において 300bp 付近に 1 つの明瞭なバンドが確認された。

21-1 の ITS1 領域の相同性検索の結果、*Panaeolus sphinctrinus* (ヒカゲタケ属・ヒカゲタケ) (Acc. No. DQ182503, AY152728) と最も相同性が高く、4 塩基 (259/263) の違いが見られた。

21-2 の ITS1 領域の相同性検索の結果、*Panaeolus cambodginiensis* (AB158633) と最も相同性が高く、1 塩基 (267/268) の違いのみであった。

21-3 の ITS1 領域の相同性検索の結果、*Panaeolus uliginosus* (AY129363) と最も相同性が高いが、10 塩基 (256/266) の違いがみられた。

21-4, -5, -6 の各 ITS1 領域は 100% 一致し、相同性検索の結果、*Psilocybe cubensis* (シビレタケ属・ミナミシビレタケ) (AY129342) と 100% (296/296) 一致した。得られた塩基配列を図 4 に示す。また、21-5 は 2 塩基異なる 2 種類の塩基配列が得られた (21-5a-ITS1 および 21-5b-ITS1)。

2. LS 領域の塩基配列解析

PCR を行った結果、全ての検体において 1, 400bp 付近に 1 つの明瞭なバンドが確認された。今回、使用した LS Forward primer は、5.8S rRNA 5' 端近傍に作成したプライマーで、PCR 増幅において 5.8S rRNA および ITS2 両領域をカバーするプライマーであるが (図 3 参照)、きのこの LS 領域の塩基配列情報がデータベース上に多数であることから、今回は LS 領域について比較検討した。得られた LS 領域の配列は図 5 に示す。

21-1 の LS 領域の相同性検索の結果、*Panaeolus sphinctrinus* ヒカゲタケ属・ヒカゲタケ (DQ40817, AY104646) と 100% 一致した (967/967, 970/970)。ITS1 領域の結果も同様の種と相同性が高いことから、21-1 はヒカゲタ

ケであることが強く示唆された。

21-2 の LS 領域の相同性検索の結果、100% 一致する種が 3 種存在した。*Panaeolus cambodginiensis* 和名なし (AB158633) (970/970)、*Psilocybe cyanescens* シビレタケ属・ヒカゲシビレタケ (EU029946) (991/991)、*Copelandia (Panaeolus) cyanescens* アオゾメヒカゲタケ属・アイゾメヒカゲタケ (AF261526) (945/945) である。さらに、5.8S-ITS2 領域間 (図 3 参照) の塩基配列解析を行った結果、*Panaeolus cambodginiensis* と 1 塩基の違い、*Psilocybe cyanescens* とは 8 塩基の違いであった。*Copelandia (Panaeolus) cyanescens* の塩基配列情報はデータベース上に LS 領域のみしか報告が存在しないが、ITS1, LS および 5.8S-ITS2 の全ての領域で高い相同性を示すことから、21-2 は *Panaeolus cambodginiensis* であると考えられるが、アイゾメヒカゲタケであることも否定はできない。

21-3 の LS 領域の相同性検索の結果、*Psilocybe cyanescens* シビレタケ属・ヒカゲシビレタケ (EU029946) (981/991) と最も相同性が高いが、10 塩基 (981/991) の違いがみられた。また、5.8S-ITS2 領域では *Panaeolus sphinctrinus* ヒカゲタケ (FJ755227) と最も相同性が高いが 15 塩基の違いが見られた。全ての領域において、一致、あるいは、ほぼ一致を示す種は存在しなかった。

21-4, 5, 6 の LS 領域での相同性検索の結果は、いずれも *Psilocybe cubensis* シビレタケ属・ミナミシビレタケ (AB104651) と最も相同性が高く、それぞれ 1 塩基 (966/967), 2 塩基 (965/967), 1 塩基 (965/967) の違いであった。また、ITS1 領域とは異なり LS 領域においては 21-5 も 1 種の配列のみ得られた。ITS1 および LS 両領域の結果から 21-4, -5, -6 はいずれもミナミシビレタケであると示唆された。

D. 考察

DNA 塩基配列を基にした沖縄県内自生きのこの種鑑別を行った。概ね、採取者の形態観察による同定と一致したが、データベースに報告されていない種 (ツヤマグソタケ (*Anellaria antillarum*): 21-3 を形態観察から本種と同定) に関しては、明確な判定を示すことができなかった。また、21-2 の LS 領域の結果のように、同一配列が 3 種で報告されている点や、1 箇所の配列領域のみを報告している種など、まだ、データベースに不十分な点が多くみられた。今後、きのこの塩基配列による種鑑別を行う際は、データベースの更なる充実が必須であろう

と考えられた。

一方で、今回の結果は、塩基配列に基づくきのこの種鑑別が明確なツールになることも示した。21-4 および5 は同一群落に自生していたきのこであるが、1つ（種）は、そのアルビノと考えられるが、形態的には異種と判断する可能性がある（図1の21-4 および5、図2右：丸印の中が21-5）が、塩基配列からは同一種と判断が可能であった。一方、21-5 は2種類（21-5a, 21-5b）の ITS1 が検出されたため、サブクローニングを行い、塩基配列を決定した。通常、きのこの子実体（きのこ）は2nであり、この結果は、このきのこが交雑種であると考えられるが、配列解析において、CTCTCT のマイクロサテライト様の繰り返し反復配列（161-168bp）の違いが見られているのみであることから、異種交雑である可能性は低いと考えられた（図3）。

E. 参考文献

- 1) 今関六也, 本郷次雄 「原色日本菌類図鑑」, 大阪, 保育社, 1965
- 2) 政令第169号(2002) “麻薬, 向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令の一

部を改正する政令” 平成14年5月7日

- 3) Maruyama, T. *et al.* *Shyokuhin Eiseigaku Zasshi* **44**(1) 44-48 (2003)
- 4) Stament, P “*Psylocybin Mushrooms of the World*”, Berkeley CA USA, Ten Speed Press, 1996. (ISBN 0-89815-839-7)
- 5) 玉那覇康二ら, 沖縄県衛生環境研究所報, **41**, 77-83 (2007)
- 6) Kimberly, G. *et al.* *Forensic Science International* **140** 147-157 (2004)

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

なし。

学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1. DNA 塩基配列解析検体

番号	採取年月日	採取地	検体とした部位	形態からの同定	DNA からの同定 (本実験)
21-1	2009/3/9	与那国町	傘	ヒカゲタケ※	ヒカゲタケ
21-2	2009/3/23	竹富町黒島	柄	アイゾメヒカゲタケ※	<i>P. cambodginiensis</i> ?
21-3	2009/3/24	石垣市	柄	ツヤマグソタケ※	一致する配列情報なし
21-4	2009/3/24	石垣市	柄	ミナミシビレタケ※	ミナミシビレタケ
21-5	2009/3/24	石垣市	柄	ミナミシビレタケ※	ミナミシビレタケ
21-6	2009/3/24	石垣市	柄	ミナミシビレタケ	ミナミシビレタケ

*元滋賀大学 横山和正先生の写真判定による

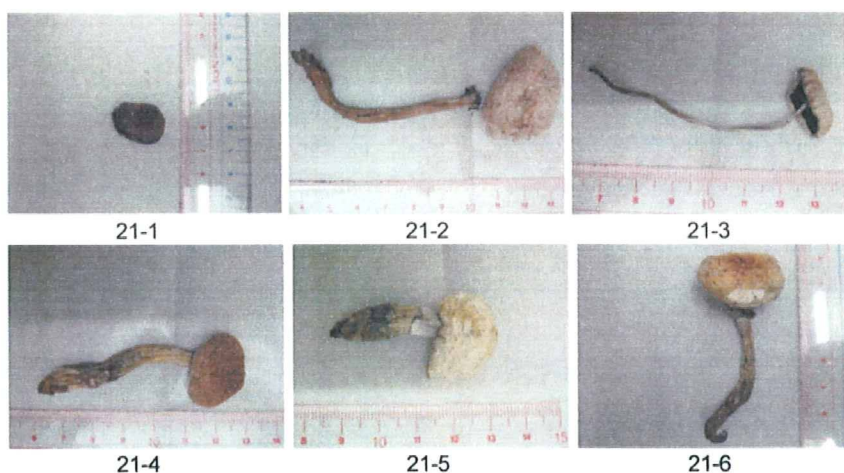


図1. 実験に用いたきのこ検体写真



図2. 実際に沖縄県内に自生しているきのこ
丸枠内は21-5

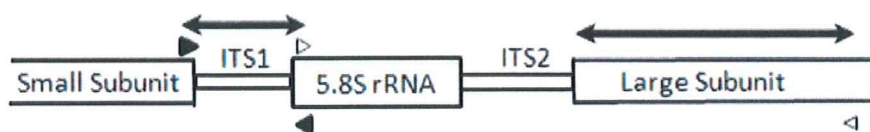


図3. 本実験で用いたDNA分析領域

21-1-ITS1	1:	TTTCCG	TAGG	TGAACCT	GCG	GAAGGAT	CAT	TATCGAATAA	ACTAGGTGGG	50
21-2-ITS1	1:A.A	50
21-3-ITS1	1:	50
21-4-ITS1	1:T.....TT.GC.T	49
21-5a-ITS1	1:T.....TT.GC.T	49
21-5b-ITS1	1:T.....TT.GC.T	49
21-6-ITS1	1:T.....TT.GC.T	49
21-1-ITS1	51:	T--TGTTGCT	GTCCTCTCG	GGGGAA--CT	GTGCACGCCT	-TACCTTTTT				95
21-2-ITS1	51:	.GC.....ACT.	T	C.G.....			100
21-3-ITS1	51:	--.....T--T					95
21-4-ITS1	50:	GGT...A...	.G.....--CA.T...C	--GT.A.C..				94
21-5a-ITS1	50:	GGT...A...	.G.....--CA.T...C	--GT.A.C..				94
21-5b-ITS1	50:	GGT...A...	.G.....--CA.T...C	--GT.A.C..				94
21-6-ITS1	50:	GGT...A...	.G.....--CA.T...C	--GT.A.C..				94
21-1-ITS1	96:	TGTTTTCCA	CCTGTGAACA	CACTGTAGGT	C-----TGGG	G-----GGA				134
21-2-ITS1	101:A.....C.....	-----	.AAGTCT..T				145
21-3-ITS1	96:C.....	-----	A				134
21-4-ITS1	95:	.A.A.....C..T	TTT.....A.	.ATTGT.TTT	.GAAGCT...				144
21-5a-ITS1	95:	.A.A.....C..T	TTT.....A.	.ATTGT.TTT	.GAAGCT...				144
21-5b-ITS1	95:	.A.A.....C..T	TTT.....A.	.ATTGT.TTT	.GAAGCT...				144
21-6-ITS1	95:	.A.A.....C..T	TTT.....A.	.ATTGT.TTT	.GAAGCT...				144
21-1-ITS1	135:	A-G-----GG	AAGCAATTCC	CT--GA----	-----CGT	T-C-AGGTCC				163
21-2-ITS1	146:	.A.-----	.G.T..C..TACGG	CTTCATT.AA	.C.C.....				188
21-3-ITS1	135:	.A.-----	.G...C...	---A----	-----	T.-.....				165
21-4-ITS1	145:	TT.AAGTCA.	.GATT.C..TTGAA	TTGAAGG.T	.CTC.ATGAT				192
21-5a-ITS1	145:	TT.AAGTCA.	.GATT.C..TTGAA	TTGAAGG.T	.CTC.ATGAT				192
21-5b-ITS1	145:	TT.AAGTCA.	.GATT.C..TCT.TGAA	TTGAAGG.T	.CTC.ATGAT				194
21-6-ITS1	145:	TT.AAGTCA.	.GATT.C..TTGAA	TTGAAGG.T	.CTC.ATGAT				192
21-1-ITS1	164:	TATGC-TTAT	-ACATATACA	CTATTGAAAG	TAACAGAACC	AATCAATG-G				210
21-2-ITS1	189:TA..T	T.....A.....-				237
21-3-ITS1	166:T-.T	T...C.....GA.....C.....-				213
21-4-ITS1	193:	GG.CTACGT.	TT.....T	.C.A...T.T	T...T..AT.				242
21-5a-ITS1	193:	GG.CTACGT.	TT.....T	.C.A...T.T	T...T..AT.				242
21-5b-ITS1	193:	GG.CTACGT.	TT.....T	.C.A...T.T	T...T..AT.				244
21-6-ITS1	193:	GG.CTACGT.	TT.....T	.C.A...T.T	T...T..AT.				242
21-1-ITS1	211:	GCTCTAAGCC	TATAAA-CTA	TATACAACCT	TCAGCAACGG	ATCTCTTGGC				259
21-2-ITS1	238:	..AT.-....-				285
21-3-ITS1	214:	...T.G....-	A.....				262
21-4-ITS1	243:	..CT.GT...A.A.				292
21-5a-ITS1	243:	..CT.GT...A.A.				292
21-5b-ITS1	243:	..CT.GT...A.A.				294
21-6-ITS1	243:	..CT.GT...A.A.				292
21-1-ITS1	260:	TCTC								263
21-2-ITS1	286:								289
21-3-ITS1	263:								266
21-4-ITS1	293:								296
21-5a-ITS1	293:								296
21-5b-ITS1	295:								298
21-6-ITS1	293:								296

図 4. きのこ 6 検体から得られた ITS1 領域の塩基配列比較

21-1-LS	1:	GACCTCAAAT	CAGGTAGGAC	TACCCGCTGA	ACTTAAGCAT	ATCAATAAGC	GGAGGAAAAG	AACTAACAA	70
21-2-LS	1:	70
21-3-LS	1:	70
21-4-LS	1:	70
21-5-LS	1:	70
21-6-LS	1:	70
21-1-LS	71:	GGATTCCCTT	AGTAACTGCG	AGTGAAGCGG	GAAAAGCTCA	AATTTAAAT	CTGGCAGTCT	TCGATTGTCC	140
21-2-LS	71:	CT.....	140
21-3-LS	71:T.....	140
21-4-LS	71:G.....T.GCC.....	140
21-5-LS	71:G.....T.GCC.....	140
21-6-LS	71:G.....T.GCC.....	140
21-1-LS	141:	GAGTTGTAAT	CTAGAGAAGC	ATTATCCGGG	CTGGACCGTG	TACAAGTCTC	CTGGAATGGA	GCGTCATAGA	210
21-2-LS	141:	210
21-3-LS	141:	210
21-4-LS	141:TG.....	210
21-5-LS	141:TG.....	210
21-6-LS	141:TG.....	210
21-1-LS	211:	GGGTGAGAA	TCCCTCTTTG	ACACGGACTG	CCAGGGCTTT	GTGATGTGCT	CTCAAAGAGT	CGAGTTGTTT	280
21-2-LS	211:	280
21-3-LS	211:C	280
21-4-LS	211:C	280
21-5-LS	211:C	280
21-6-LS	211:C	280
21-1-LS	281:	GGGAATGCAG	CTCAAAATGG	GTGGTAAAT	CCATCTAAAG	CTAAATAATTG	GCGAGAGACC	GATAGCGAAC	350
21-2-LS	281:	350
21-3-LS	281:	350
21-4-LS	281:	350
21-5-LS	281:G	350
21-6-LS	281:G	350
21-1-LS	351:	AAGTACCGTG	AGGGAAAGAT	GAAAAGAAC	TTGAAAGAG	AGTTAACAG	TACGTGAAAT	TGCTGAAAGG	420
21-2-LS	351:	420
21-3-LS	351:G	420
21-4-LS	351:	420
21-5-LS	351:	420
21-6-LS	351:G	420
21-1-LS	421:	GAAACGCTTG	AAGTCAGTCG	CGTTGTCCGG	GAATCAACCT	TGCTTTTGCT	GGGCGTACTT	CCTGGTCAAC	490
21-2-LS	421:G	490
21-3-LS	421:GT	490
21-4-LS	421:GT.C...TG	490
21-5-LS	421:GT.C...TG	490
21-6-LS	421:GT.C...TG	490
21-1-LS	491:	GGGTCAGCAT	CAATTTTGAC	CGTTGGATAA	AGTTGCTGGG	AATGTGGCAT	CTTCGGATGT	GTTATAGCCC	560
21-2-LS	491:TT	560
21-3-LS	491:GTT	560
21-4-LS	491:AGCTGATGA	560
21-5-LS	491:AGCTGATGA	560
21-6-LS	491:AGCTGATGA	560

図 5. き の こ 6 検体から得られた LS 領域の塩基配列比較 (その 1)

21-1-LS	561:	AGTTTCGCAT	ACAACGGTTG	GGATTGAGGA	ACTCAGCACG	CCGCAAGGCC	GGGTT-TTTA	ACCACGTTCG	629
21-2-LS	561:	.A....T..	629
21-3-LS	561:	.A.....	629
21-4-LS	561:	TTGG.....AC..GT	630
21-5-LS	561:	TTGG.....AC..GT	630
21-6-LS	561:	TTGG.....AC..GT	630
21-1-LS	630:	TGCTTAGGAT	GCTGGCATAA	TGGCTTTAAT	CGACCCGTCT	TGAAACACGG	ACCAAGGAGT	CTAACATGCC	699
21-2-LS	630:	699
21-3-LS	630:	699
21-4-LS	631:T.....	700
21-5-LS	631:T.....	700
21-6-LS	631:T.....	700
21-1-LS	700:	TGCGAGTGTT	TGGGTGGA	ACCCGAGCGC	GTAATGAAAG	TGAAAGTTGA	GATCCCTGTC	GTGGGGAGCA	769
21-2-LS	700:	769
21-3-LS	700:	769
21-4-LS	701:	770
21-5-LS	701:	770
21-6-LS	701:	770
21-1-LS	770:	TCGACGCCCG	GACTTGA	TCTGTGACGG	ATCCGCGGTA	GAGCATGTAT	GTTGGGACCC	GAAAGATGGT	839
21-2-LS	770:	839
21-3-LS	770:T.....	839
21-4-LS	771:CA..	.T..G..	840
21-5-LS	771:CA..	.T..G..	840
21-6-LS	771:CA..	.T..G..	840
21-1-LS	840:	GAACTATGCC	TGAATAGGGT	GAAGCCAGAG	GAAACTCTGG	TGGAGGCTCG	TAGCGATTCT	GACGTGCAAA	909
21-2-LS	840:	909
21-3-LS	840:	909
21-4-LS	841:	910
21-5-LS	841:T.....	910
21-6-LS	841:	910
21-1-LS	910:	TCGATCGTCA	AATTTGGGTA	TAGGGGCGAA	AGACTAATCG	AACCATCTAG	TAGCTGGTTC	CTGCCGAAGT	979
21-2-LS	910:	979
21-3-LS	910:	979
21-4-LS	911:C..	980
21-5-LS	911:	980
21-6-LS	911:	980
21-1-LS	980:	TTCCCTCAGG	AT	991
21-2-LS	980:	991
21-3-LS	980:	991
21-4-LS	981:	992
21-5-LS	981:	992
21-6-LS	981:	992

図 5. き の こ 6 検体から得られた LS 領域の塩基配列比較 (その 2)

分担研究課題 薬物の分析と同定に関する研究

研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

協力研究者 丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 室長

幻覚性サボテンの基原種について

研究要旨 園芸市場に流通する *Lophophora* 属植物について、核 DNA, GBSSI 領域の塩基配列を行い、本遺伝子領域の幻覚性サボテンの鑑別に対する有用性を評価した。その結果、調査を行った試料の多くで、複数の遺伝子型が検出された。また、得られた塩基配列の一部を用いて分子系統解析を行ったところ、葉緑体 DNA, trnL-F 領域の塩基配列から判断された基原植物との相関性は見られず、GBSSI 領域の塩基配列は、種の鑑別の目的には不向きであると考えられた。しかしながら、単一個体の塩基配列が、多数の遺伝子型で構成されていることから、その遺伝子型の構成を調査することで、薬物事犯の際の事故品のトレーサビリティ（追跡可能性）の向上に寄与しうると思われる。

協力研究者 飯田 修 医薬基盤研究所・薬用植物資源研究センター 種子島研究部 リーダー

協力研究者 杉村 康司 医薬基盤研究所・薬用植物資源研究センター 種子島研究部 研究員

よく分かっていない。

昨年度、星薬科大学の佐々木らは、15 検体の *Lophophora* 属植物 (*L. williamsii* 11 検体, *L. diffusa* 4 検体) の葉緑体 DNA, trnL (UAA) intron 領域の塩基配列を調べ、この領域の塩基配列が、*Lophophora* 属植物の鑑別に有用であることを報告している¹⁾。

A. 研究目的

Mescaline (1; 図 1) は、経口服用により、LSD 様の幻覚症状を引き起こすことから、麻薬に指定されている化合物である。サボテン科の植物の中には、ウバタマ (*Lophophora williamsii*)、サンペドロ (*Trichocereus pachanoi*) を始め、1 を含有するものがあることが、よく知られているが、形態学的な特徴が乏しい上に、非常に多くの園芸品種が開発されていることから、1 を含有する植物種の範囲は、

昨年度の本研究においても同様の結果を得ているが、上記の塩基配列は単性（母系）遺伝である葉緑体 DNA のものであるため、交配が繰り返されていると予想される園芸品種の鑑別においては、不十分である可能性もある。実際、昨年度の本研究では上記の塩基配列から *L. williamsii* と判断された個体の一つからは、1 が検出されないという結果を得ており、両性遺伝である核ゲノム上の塩基配列からのより詳細な解析も必要であると考えられる²⁾。

そこで今年度は、昨年度までに *trnL* intron 領域の塩基配列解析及び 1 の定性分析が終了した *Lophophora* 属植物に対して、核ゲノム上の遺伝子である granule-bound starch synthase (GBSSI; waxy) 遺伝子の塩基配列解析を行い、系統解析について考察を行った。GBSSI 領域は、近年、核ゲノム上の多コピー遺伝子である rDNA の ITS 領域に代わる low copy number 遺伝子として、分子系統解析に用いられ始めている遺伝子領域である^{3, 4)}。

B. 研究方法

1. 実験材料

昨年度、医薬基盤研究所、薬用植物資源研究センター種子島研究部が収集した *Lophophora* 属植物 27 個体より調製したゲノム DNA を使用した(表 1)。これらの個体は、いずれも、日本カクタス企画社より購入した園芸用途のものである。

2. 実験方法

既知の 4 種 (*Solanum tuberosum*, *Ipomoea batatas*, *Manihot esculenta*, *Pisum sativum*) の双子葉植物の *gbssi* 領域の塩基配列を基に作成したプライマーを用い、nested PCR 法により *gbssi* 領域の exon 4 から exon 7 までの部分配列を含む約 600 bp の DNA 断片を増幅した。PCR は、first PCR に、KOD fx DNA polymerase を、second PCR に、KOD DNA polymerase (いずれも Toyobo) を用い、以下の温度プログラムにより行われた。得られた PCR 産物を Montage-PCR (Millipore) により精製した後、ダイレクトシーケンスにより、塩基配列を決定した。また、サブクローニングは、Zero Blunt PCR Cloning Kit あるいは Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (いずれも

Invitrogen) を用いて行い、大腸菌からのプラスミド DNA の調製には、QIAprep Spin Mini Prep Kit (Qiagen) を用いた。シーケンスは、BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いて蛍光ラベル化を行い、その産物を ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI) を用いて解析した。得られた塩基配列の多重配列解析は、Clustal W プログラムにより行い、分子系統樹は、Kimura' s two parameter による遺伝距離を用いた NJ tree 法により作成した。

C. 研究結果

Lophophora 属植物より調製したゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、目的の *gbssi* 領域の部分配列を増幅し、ダイレクトシーケンスを行った。ダイレクトシーケンスの結果、ほとんどの個体が、indel を含む、複数の配列を有していたため、正確な塩基配列の決定が困難であった(図 2)。このため、ダイレクトシーケンスの結果を基に、各基原植物毎に塩基配列パターンの分類を行った(表 2)。その結果、*L. williamsii* は、2 つのタイプ、*L. williamsii* var. *decipiens* 及び *L. diffusa* は、4 つのタイプに分類された。各タイプの代表個体を選定し、その PCR 産物をサブクローニングし、各試料について、6 つのクローンの塩基配列解析を行った。

その結果、各クローンの塩基配列は、T-43 及び T-49 を除き、全て複数の遺伝子型から構成されていた。また、単一個体内に非常に多数の遺伝子型を含んでいた。

そこで、本報告書ではデータを単純化するため、最も変異に富んでいた intron 4 のみについて、各試料から見いだされた遺伝子型を図 3 にまとめ、また、各遺伝子型の塩基配列を基に