

201235009A

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

法規制薬物の分析と鑑別に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

(H22-医薬-一般-016)

研究代表者 合田 幸広

平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
法規制薬物の分析と鑑別に関する研究 合田 幸広	1
II. 分担研究報告書	
1. 法規制薬物（植物を含む）の分析と鑑別に関する研究 合田 幸広	
大麻種子 1 粒を用いた産地特定のための ISSR-PCR 法による検討 緒方 潤	13
2. 法規制薬物の分析と鑑別に関する研究 合田 幸広・花尻 瑠理	
携行型ラマン分光光度計を用いる不正錠剤中薬物の識別 近藤 勝	25
日本国内で押収された錠剤型麻薬に含有される薬物の分析 津村 ゆかり	37
3. 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究 花尻 瑠理	
いわゆる「脱法ハーブ」使用者生体試料からの薬物分析 花尻 瑠理	49
4. 法規制薬物の分析・鑑別に資する化合物の合成とメタボロミクス研究 福原 潔	
合成カンナビノイド類の簡易検出法の検討 福原 潔	67
5. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の鑑別に関する研究 河野 徳昭	75
6. 法規制薬物の分析に関する研究 代田 修	
免疫化学的手法による幻覚性サルビアならびにチャット鑑別法の開発 代田 修	95
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	101

法規制薬物の分析と鑑別に関する研究

研究代表者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

本研究では、法規制薬物の内、麻薬・向精神薬取締法及びあへん法など関連 4 法で厳しく規制される薬物及び、今後これらの法律により規制される可能性の高い薬物を対象とし、同薬物の分析と鑑別に関する研究を行う。

分析的な面で考えると、麻薬や覚せい剤の場合、使用罪が問われるため、生体による代謝物を事前に明らかにして、これらの化合物についての的確に分析できることが重要となる。また、法規制薬物の場合、現場では様々な使用形態があるため、それぞれの使用形態に対応した分析法が重要となる。また、ケシ属植物では、法規制される植物が種により決められている一方、マジックマッシュルームの場合、麻薬成分を含む種の範囲が現段階では不明確である。さらに、大麻では、栽培品種により含有成分が大きく異なることが知られている。従って、各植物において、種や栽培品種の簡便で、厳密な鑑別法の確立が有効な規制を行うために重要な課題となっている。一般的には、植物の鑑定は開花時でないとなし難い。そのため、種子の段階での鑑別法ができず、種を間違えて観賞用に法規制植物であるアツミゲシ (*Papaver setigerum*) が大量に栽培された例(小貝川フラワーフェスティバル)は記憶に新しい。

本研究は、このような厳しく規制される法規制薬物(植物を含む)において、現在の分析上の隘路となっている代謝物の問題と植物鑑別の問題を解決するため行われる。本年度は、いわゆる脱法ハーブが関与したと考えられる死亡 1 事例において、生体試料中薬物の検討を行った。また、合成カンナビノイド類(JWH-018:麻薬,等)の呈色による簡易検出法の検討を行うと共に、今後麻薬に指定される可能性のある 1-(1H-インドール-5-イル)プロパン-2-アミン(5-IT)の標品の合成を実施した。さらに、日本で押収された錠剤型麻薬に含有される薬物分析を行った。また、薬物犯罪の捜索現場で発見された物件が違法薬物であるか否かを迅速に判定する方法として、携行型ラマン分光光度計の有効性を検討した。植物関連では、大麻種子 1 粒を用いた産地特定のための ISSR-PCR 法による検討を行い、7 種類の識別マーカーを作成した。それらを併用することで大麻 16 種中 14 種の大麻の相互識別が可能となった。また、ケシについては、昨年度までに開発したケシ *P. somniferum* (Ps)、アツミゲシ *P. setigerum* (Pseti) 及びヒナゲシ *P. rhoeas* (Pr) 間の鑑別が可能でライマーを用い、種子を検体とした植物種鑑別法、並びに核酸調製・保存資材(FTA カード)

を用いた植物種鑑別法について検討し、ケシ属植物種子 1 粒を検体とした植物種の鑑別、並びに FTA カードで調製・保管した核酸試料を検体とした植物種の鑑別にそれぞれ成功した。また、幻覚性サルビアの幻覚成分であるサルビノリン A (SalA) に対する抗 SalA MAb の高機能化を目的に、抗 SalA MAb 産生ハイブリドーマを用いて組換え抗体の作成を試みた。さらに、昨年度に作製したカートに含有される麻薬成分であるカチノンに対する抗 CA MAb を用いた ELISA についてより詳細な検討を行った。

分担研究者

花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長

代田 修 徳島文理大学香川薬学部準教授

福原 潔 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部室長

河野徳昭 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部研究員

A. 研究目的

研究代表者らは、従来より、法規制薬物の代謝物に関する研究を行い、直近では、麻薬化合物レボメトルファンと光学異性体の医薬品では、毛髪中の代謝物が異なることを明らかにし、注目を浴びている。また、植物の鑑別に関する研究では、大麻種子の発芽能力の迅速鑑別法を確立し、鑑定官に対し研修指導を行うなど、取締まりの現場に直接貢献する研究を行っている。このように本研究は、現在厳しく法規制されている薬物及び今後同様に法規制される可能性の高い薬物について、監視・指導麻薬対策課、地方厚生局麻薬取締部等と連絡をとりながら現場の諸問題に対応できるように、実態に即した研究を行う点に特徴があり、日本の法規制薬物行政に直接的に貢献することを目的としている。

麻薬・向精神薬取締法等で厳しく規制される薬物は現在 250 種以上ある。一方で、この分野では法規制を逃れるため、常に新規に合成され

た類縁体や植物等が出回ることが続き、結果として、毎年新規な化合物が麻薬指定されることになる。他方、このような化合物は、国民の健康被害や社会的弊害をなくす観点から、精神毒性・依存性・乱用のおそれ等の有害性が明らかになった段階で緊急に麻薬指定されるため、生体での代謝や代謝物について明確でない段階で指定される場合が多い。本研究では、このような薬物のうち、合成カンナビノイドについて、使用罪に対応するため代謝物について検討するとともに合成し、分析と鑑別方法等について検討を行う。また、ケシの様に天然物を種として法規制するには、植物や菌類の鑑別法が重要となる。他方、植物（菌類）の場合、分類学的に形態で鑑別を行うには、経験が必要となる。従って、植物鑑定未経験者でも、より客観性の高い鑑別が行えるように遺伝子情報を利用した鑑別法の確立が重要となる。本研究では、特に具体的な問題事例が存在した、けし属植物及び大麻について種子での鑑別法を確立すると共に、今後より厳しい法規制の可能性のあるサルビノリン A やカートの簡便な検出法の確立をはかる。さらに、薬物犯罪の捜索現場で発見された物件が違法薬物であるか否かを迅速に判定する手法の検討、錠剤系麻薬の形態観察と薬物含有量調査など、取締まりの現場で直接貢献できる研究を行う。

B. 研究方法

B. 1. いわゆる「脱法ハーブ」使用者生体試料からの薬物分析

いわゆる脱法ハーブを吸煙し、嘔吐・意識不明となり救急搬送され、その後死亡が確認された男性について、聖マリアンナ大学法医学教室より生体試料及び死亡時所持していた脱法ハーブ製品を得た。UPLC-MS/MS は、Waters Aquity-Quattro Premier XE, UPLC-QTOF は、Waters Xevo QToF MS を使用し、両者とも ESI でイオン化を行った。

B. 2. 合成カンナビノイド類の簡易検出法の検討及び 5-IT の合成

麻薬である JWH-018 を用い、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン、アセトニルアセトン、2,5-ジメトキシテトラヒドロフラン、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド、ガルビノキシラジカルとの反応(加温下)について、検討した。なお、アセトニルアセトン、2,5-ジメトキシテトラヒドロフラン、4-ジメチルアミノベンズアルデヒドについては、室温条件の反応性も検討した。

5-IT の合成は、以下の様に実施した。インドール 5-カルボキシアルデヒドを 2-ニトロエタンに溶解後、酢酸アンモニウムを加えて 80°C で加熱攪拌した。3 時間後、過剰の 2-ニトロエタンを減圧留去した後、析出した黄色固体を冷水で洗浄し風乾させた。さらに固形物を冷却したメタノールで洗浄した後、減圧乾燥させて 2-ニトロプロペニル誘導体を得た。次いで、2-ニトロプロペニル誘導体 dry THF に溶解させた溶液を、アルゴン気流下、 LiAlH_4 を懸濁させた dry THF 溶液中に滴下し、反応溶液を 4 時間、加熱還流させた後、室温に冷却し、過剰の LiAlH_4 を分解させ、次いで、室温で攪拌した後、析出した不溶物をセライトで濾過し、THF と酢酸エチルで洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾

燥、溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/n-ヘキサンで再結晶を行い、5-IT を収率 78 % で得た。

B. 3. 押収錠剤型麻薬に含有される薬物分析

錠剤型不正麻薬としては、これまでと同じ 100 検体 (2009 年から 2010 年に札幌、東京、横浜、名古屋、大阪、神戸、福岡の各地方検察庁から国庫帰属品として厚生労働大臣に引き継がれたもの) を使用した。本年度は、昨年度までに確立した HPLC 条件を利用して、錠剤中の麻薬・覚せい剤成分の定量を行い、結果を解析した。

B. 4. 携行型ラマン分光光度計を用いる不正錠剤中薬物の識別

d-メタンフェタミン塩酸塩は大日本製薬(株)、コカイン塩酸塩は武田薬品工業(株)のものを、大麻は裁判終了後に国庫に帰属され、研究用に交付を受けたものを使用した。次の化合物は国立衛研で保持しているものを使用した。メチロン、MDMA の各塩酸塩、 γ -ヒドロキシ酪酸ナトリウム塩 (GHB)。

ラマン分光光度計は、リガク Xantus-1 785 nm レーザー搭載機を使用、レーザー出力は 400 mW (標準試料)、100 mW (錠剤等)、積分時間 1000 ms (ただしこの条件でスペクトルが飽和したのものについては、500 ms, 250 ms)、ラマンシフトの測定波数範囲 $180\sim 2150\text{ cm}^{-1}$ で測定を行った。

B. 5. 大麻種子 1 粒を用いた産地特定のための ISSR-PCR 法による検討

関東信越厚生局麻薬取締部より分与された大麻種子海外市場製品 (オランダ)、基盤研・薬植セ・筑波にて系統保存されているメキシコ産系統種子およびトチギシロ種子を用いた。

B. 6. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の識別法

本研究においては、昨年度までに、ケシ *P. somniferum*, アツミゲシ *P. setigerum* 及びヒナゲシ *P. rhoeas* 間の植物種鑑別が可能なプライマーの開発に成功しているが、本年度は、ケシ属植物の種子を検体とした植物種鑑別法、並びに核酸調製・保存資材 (FTA カード) を用いた植物種鑑別法について検討した。

本研究で遺伝子解析等に供したケシ属植物は下記のとおり。ケシ: *P. somniferum* L. 「一貫種」。アツミゲシ: *P. setigerum* DC. 「27 セチゲルムピンク」 (27seti pink 1992)

ヒナゲシ: *P. rhoeas* L. 「京都」。ナガミヒナゲシ: *P. dubium* L. (筑波圃場)。

ゲノム DNA 調製には、(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圃場で栽培したものを材料とした。また、ケシ属植物の種子の供試系統は下記のとおり。ケシ: *P. somniferum* L. 「一貫種」 (H13 年優良株)。

ヒナゲシ: *P. rhoeas* L. 「サカタシャーレーポピー」 (317654)。アツミゲシ: *P. setigerum* DC. (27seti pink 1992)。

B. 7. 免疫化学的手法による幻覚性サルビア鑑別法の開発

本年度は、既に作製している抗 SalA monoclonal antibody (anti-SalA MAb) 産生ハイブリドーマを材料として、より安価に調製可能で、高機能化が可能な組換え抗体の作製を試みた。まず SalA を認識する Fab を作製するために、既に作製している抗 SalA モノクローナル抗体 (MAb) 産生ハイブリドーマから mRNA を得、続いて cDNA の調製を行った。続いて、VH-CH1, 軽鎖をコードする遺伝子を増幅し、増幅した遺伝子の配列が正しいことを確認した。得られた遺伝子について配列の解析を行い、抗体の可変部をコードしていることを見極めた。次いで、各種抗体遺伝子を発現用ベクター

pET28a(+) に導入したのち、大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。形質転換体を培養し、IPTG を添加することで組換えタンパク質の発現誘導を行った。次に、封入体に発現した各々の組換え抗体をニッケルキレートクロマトグラフィーにより VH-CH1, 軽鎖を精製した。精製した VH-CH1, 軽鎖を同濃度で混和したのち、透析法による巻き戻しを行った。続いて、抗 SalA MAb との比較を行うことで、調製した Fab の反応性、特異性について、その有用性を調べた。B. 8. 免疫化学的手法によるチャット鑑別法の開発

ノルエフェドリンからアミノ基の保護、ベンジル位ヒドロキシ基の酸化、そして脱保護により CA を得た後、リンカーとしてスクシニル基をアミノ基に導入しハプテンを合成した。続いて、カルボジイミド法により牛血清アルブミン (BSA) とハプテンを結合することで CA-BSA コンジュゲートを合成した。本タンパク複合体を抗原として、マウスに免疫感作を行い、十分な血中抗体価が得られた段階で、脾臓を摘出し、脾細胞を調製した後、ミエローマ細胞との細胞融合を行い、続いて、アミノプテリンを含んだ培地で融合細胞を培養することで、選択的にハイブリドーマを得た後、CA 並びに関連化合物を認識する抗体を産生するハイブリドーマのみを選抜した。その後、クローニングによりクローン細胞を得た後に、大量培養を行い、続いて、大量培養した後の培養上清をプロテイン G カラムに付すことで純度の高いモノクローナル抗体を調製した。次いで、各種濃度の CA 溶液に水溶性カルボジイミドと *N*-ヒドロキシコハク酸イミドを加え活性化し、さらに BSA と反応させることで CA-BSA コンジュゲートを合成した。反応溶液をイムノプレートに分注し、CA-BSA を固相化した後、抗 CA MAb と反応させ

た。続いて、二次抗体による抗原-抗体複合体の酵素標識を行い、最後に基質を加えて発色させ、ELISA を構築した。

＜倫理面への配慮＞いわゆる「脱法ハーブ」使用者生体試料からの薬物分析は、国立医薬品食品衛生研究所及び聖マリアンナ大学研究倫理審査委員会の承認を経て、各委員会の定める規定に則り、遵守すべき規準に従って実施した。

動物実験は、実施研究者の所属する組織の動物実験委員会等による倫理審査の承認を経て、動物福祉・愛護の精神に基づいて、適切な実験計画及び適正な実験手技のもとで実施した。

C. 結果と考察

C.1. いわゆる「脱法ハーブ」使用者生体試料からの薬物分析

被害者が死亡時所持していた脱法ハーブ 3 製品（乾燥植物細片）いずれからも MAM-2201 (73.5-81.7 mg/g) が検出され、さらに 1 製品からは MAM-2201 とともに JWH-122 *N*-(4-pentenyl) analog (6.1 mg/g) 及び JWH-122 *N*-5OH (6.4 mg/g) が検出された。生体試料においては、上記 3 化合物に加えて、MAM-2201 の推定 3 代謝物 (MAM-2201 *N*-4OH, JWH-122 *N*-5OH, JWH-122 *N*-pentatonic acid), 処方薬 sulpiride, brotizolam, ethyl loflazepate を分析対象とし、LC-MS/MS MRM モードで定量分析を行った。その結果、頭髪洗浄液からは MAM-2201 (0.39 ng/mg), JWH-122 *N*-5OH (0.08 ng/mg) 及び sulpiride (1.1 ng/mg) が、頭髪アルカリ可溶化抽出物からは MAM-2201 (0.15 ng/mg) が検出された。救急搬送時等の薬物スクリーニング分析において、喫煙で摂取した場合、頭髪洗浄液は直前の使用薬物を推測するのに有用な試料と考えられた。また、搬送時及び解剖時の血液と血清試料からは、処方量が多い

sulpiride が高濃度検出され、次いで濃度順に JWH-122 *N*-5OH, MAM-2201, brotizolam, JWH-122 pentatonic acid が検出された。解剖時尿試料からは、濃度順に sulpiride, JWH-122 *N*-5OH, MAM-2201, JWH-122 pentatonic acid が検出された。本研究においては、生体試料中から未変化体 MAM-2201 は検出されたが、その特異的代謝物である MAM-2201 *N*-4OH は検出されなかった。*N*-Alkyl 側鎖末端がハロゲンに置換された化合物においては、 ω 1-酸化が進みにくいことが予想される。これらの結果を考慮すると、すでに麻薬として規制されている JWH-122 と MAM-2201 の摂取識別においては、主代謝物 ω -酸化体 JWH-122 *N*-5OH 及び JWH-122 pentatonic acid が同一であるため、未変化体もしくは JWH-122 摂取においては主代謝物のひとつと推測される ω 1-酸化体 JWH-122 *N*-(4-hydroxy)metabolite を検出する必要があると考えられた。その他薬物について LC-QTOF によりスクリーニング分析を行った結果、頭髪のアルカリ可溶化抽出物から zolpidem が検出された。

今回の分析において生体試料から検出された MAM-2201 及びその代謝物濃度を考慮すると、本化合物が直接の死亡原因と結論することは困難であるが、MAM-2201 は麻薬である JWH-018 や JWH-122 よりもカンナビノイド CB₁ 受容体に対し強い結合性を有する。また、naphthoyl-indole 構造を有する合成カンナビノイドは脂溶性が高く、水酸化代謝物も強い活性を維持していることが報告されており、薬物が長時間活性を維持したまま体内に貯留している可能性も考えられる。使用者の健康状況、他の薬物使用状況などによっては、大きな健康被害を与える可能性があると考えられた。なお、MAM-2201 は 2013 年 10 月 17 日 (11 月 16 日施行) に指

定薬物に、さらに現在（2013年2月27日～3月28日まで）、麻薬指定のためのパブリックコメントが募集されている。

C.2. 合成カンナビノイド類の簡易検出法の検討及び5-ITの合成

平成24年6月29日に麻薬に指定されたJWH-018をはじめとして、昨今流通が確認されている(1H-インドール-3-イル)(ナフタレン-1-イル)メタノン骨格を持つ違法薬物について簡易検出法の開発を目的として、JWH-018に対して特異的に呈色反応を示す試薬の検討を行った。まず、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの反応を試みたが、反応は全く進行しなかった。インドール骨格に対してはトリプトファンの呈色試薬である1,4-ジケトン類およびジメチルアミノベンズアルデヒドとの反応を試みたが、どちらも予想される反応物は生成せず、色の変化はみられなかった。一方、インドール骨格を酸化分解させた後、生成するケトンに対しての呈色反応を試みたところ、色の変化はみられたが複数の化合物が生成していることがわかった。インドール構造とカルボニルの同時検出法としては、アミノアセトアルデヒドジメチルアセタールとの反応による5H-pyrido[4,3-b]indole骨格の形成反応を現在検討中である。

また、Knoevenagel縮合反応を利用してインドール5-カルボキシアレドより、2-ニトロプロペニル誘導体を合成、さらにリチウムアルミニウムヒドリドで還元反応を行い、ヨーロッパで死亡例がいくつか報告されており、我が国では平成24年12月17日に指定薬物に指定され、今後麻薬指定の可能性がある1-(1H-インドール-5-イル)プロパン-2-アミン(5-IT)について合成を行った。

C.3. 押収錠剤型麻薬に含有される薬物分析

日本国内で押収された不正麻薬錠剤100検体について、高速液体クロマトグラフィーによる成分定量を行った。検出された麻薬及び覚せい剤12化合物(BZP, メチロン, アンフェタミン, MDA, メタンフェタミン, MDMA, MDEA, ケタミン, 3CPP, 2C-B, 2C-I, TFMP)並びに指定薬物ブチロンについて含有量及び組み合わせを解析した。含有される検体数が最も多かった薬物はMDMA(64検体)であり、含有量の範囲は1.4~178mg(塩酸塩として、以下同じ)、平均値は96.1mg、中央値は104mgであった。MDMAのみを含むものは51検体、他の薬物も含むものは13検体で、最も検体数が多かったのは含有量120~140mgの錠剤であった。ただし最頻値付近に分布が集中しているとは言えず、含有量20mg以下から180mgまで20mg刻みの階層のいずれにも複数検体が含まれていた。他の薬物が共存する場合だけでなく、MDMA単独の錠剤であっても、含有量20mg以下のものがあつた。最も含有量が高かつた検体は重量254.2mgと平均的なサイズであるが70.1%の濃度でMDMAを含有しており、1錠中に178mg含まれていた。

メタンフェタミンは14検体から検出された。うち13検体において含有量は20mg未満であり、1検体(5-4)のみ214mgと極めて大量に含まれていた。「メタンフェタミンが医療用として使用される場合の標準量は約3mg、乱用される場合の1回使用量は20~30mg」との文献があり、214mgもの含有量の錠剤は、服用した場合の健康影響が懸念される。

TFMPは8検体から検出され、今回調査した成分の中では最も含有量のばらつきが小さかつた(CV 34.1%)。その範囲は36.9~105mg、平均値は72.1mgであった。ただしBZPまたは3CPPが共存しているものが6検体あり、TFMP

のみ含有のものは2検体であった。

TFMPPは8検体から検出され、今回調査した成分の中では最も含有量のばらつきが小さかった(CV 34.1%)。その範囲は36.9~105 mg、平均値は72.1 mgであった。ただしBZPまたは3CPPが共存しているものが6検体あり、TFMPPのみ含有のものは2検体であった。

その他の成分についても同様に解析を行い、所期の目的である各薬物の含有量把握を達成することができた。錠剤中含有量の情報は、捜査官からの問い合わせが多い1回使用量の目安として有用である。また、各錠剤中の薬物の多様性と共に、含有量のばらつきが大きい実態が明らかとなった。これは意図しない過量摂取につながるものであり、本研究で得られた知見は不正麻薬錠剤による健康被害の防止に資すると考えられる。

C.4. 携行型ラマン分光光度計を用いる不正錠剤中薬物の識別

薬物犯罪の捜索現場で発見された物件が違法薬物であるか否かを迅速に判定する方法として、携行型ラマン分光光度計の有効性を検討した。MDMA等を含む錠剤を測定するための条件を検討したところ、レーザー光により試料が焦げる場合があることが判明したため、光を弱めた条件を設定した。標準試料を測定してライブラリを構築し、不正麻薬錠剤(日本国内で押収されたもの)100検体、違法ドラッグ3検体、医薬品13検体について測定及び判定を行った。その結果、MDMAのみを含む錠剤51検体中、正しく「検出」と判定できたものは22検体であった。一方、MDMAを含まない52検体中2検体(いずれも違法ドラッグ含有)を誤って「検出」と判定した。従って、レーザー光の出力調製の必要性、繰り返し測定のばらつきの大きさも含めて、本装置は即座に捜索現場で

の実用化が可能とは結論づけられなかった。他方、メチロン及びTFMPPを含む錠剤については、比較的良好な結果が得られ、本装置が適する薬物もあると考えられた。複数成分を含む物質においては、ライブラリ検索の範囲が結果を大きく左右する。今回この点については詳細な検討を行っておらず、改良の余地があると考えられる。

C.5. 大麻種子1粒を用いた産地特定のためのISSR-PCR法による検討

ISSR-PCR法に有効なUBC(University of British Columbia)プライマー20種を用いPCRを行った。各プライマーを使用したPCR産物において、同一のバンドパターンを示す種が存在することが明らかとなったが、複数のプライマーの結果で比較することで、各サンプルは分別が可能であると考えられた。また、UBC-818, 876プライマーではすべてのサンプルからバンドが得られなかった。

次に、各種UBCプライマーによるPCRで得られた特異的バンドを切り出し、識別プライマーを作成した。UBC-835プライマーによるPCRの結果、1.4kbp付近にトチギシロ特異的バンドが安定的かつ明瞭に確認された。そこで得られたバンドについて、塩基配列の解析を行った。得られた塩基配列よりSTS(Sequence Tagged site)化プライマー(STS835-1)を作成しPCRを行った結果、トチギシロでのみ明瞭なバンドが確認された。また、得られるバンドがトチギシロ特異的であるかを明確にするために、新たにトチギシロ5粒よりDNAを調製しPCR反応を行ったところ、STS化プライマーよりバンドが確認された。さらに、同様の手法により各UBCプライマーから得られる種内間特異的なバンドを切り出し塩基配列を決定後、STS化プライマーを作成しPCRを行った。その結果、STS化

プライマーを用いることで、今回実験に用いた大麻種子 16 サンプルは 14 パターンに分離可能であった。

今回、我々は海外で喫煙用の栽培目的で売買がなされているオランダ産の大麻種子を用い実験を行った。栽培・育種地域も限定されており、近縁交配（雑）による高頻度の掛け合わせ（繰り返し）による栽培（喫煙目的用の人工栽培）が予想されたが、数種の UBC プライマーにおいては多くの DNA 多型が観察された一方で、トチギシロとそれ以外、メキシコ産とそれ以外では、多型に大きな差がみられると予想されたが、個々のサンプルと部分一致するバンドが数多くみられた。また、多型解析において *C. sativa* および *C. indica* といった 2 種類に大別可能な種間差はみられなかった。

今回、7 種類の識別プライマーを作成した。それらを併用することで 16 サンプル中 14 サンプルが分離可能であった。今後はこれら 7 種の識別プライマーが世界各地に分散する大麻に、どこまで汎用性があるかを検討する必要があると考えられる。

C. 6. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の識別法

ケシ（一貫種 H13 年優良株）種子 1 粒または 10 粒より調製したゲノム DNA を鋳型として PCR を行った結果、ケシ及びアツミゲシ特異的プライマーセット Pseti21S + Pseti21A で positive、ヒナゲシ特異的プライマーセット Pr21S + Pr21A では negative となり、鑑別が可能なことが確認された。

次いでケシ、アツミゲシ及びヒナゲシの 3 植物の種子 1 粒または 10 粒より調製したゲノム DNA について、特異的プライマーセットを用いた、各植物種の鑑別が可能か検討した。特異的プライマーセットを用い種々の PCR 条件を検

討した結果、Ampdirect Plus + NovaTaq を使用し、40 サイクルで PCR を行った場合に各植物種に特異的な明瞭なバンドが検出された。

次に、ケシ属種子混合物に対する検知実験を実施したところ、アツミゲシ特異的 134-10r-Srev2 + Arev プライマーセットを使用した場合、アツミゲシ 0% 以外は全て positive となり、良好に識別ができた。一方、ヒナゲシ特異的 Pr21S + Pr21A プライマーセットを使用したところ、アツミゲシでは特異的なバンドの位置に明瞭なバンドは確認されなかったが、非特異的増幅産物も検出されることが判明した。しかしながら、この非特異的増副産物は 10% 混合物以上では、観測されず、アツミゲシとヒナゲシの種子の混合物において、それぞれ 10% の混入を検知できることが示された。次に、食品のケシ種子（10 粒）を使用して、植物種の鑑別を行ったところ、ケシまたはアツミゲシを認識するプライマーでバンドが出現し、アツミゲシ特異的プライマーではバンドは出現しなかった。従って、食品に用いられている場合でも、種の鑑別ができることが明らかになった。

次に、ケシ属植物試料 FTA カードにサンプリングし、室温で約 8 ヶ月保存した FTA カードの約 1 mm 角切片を、PCR 反応液に添加し、植物種特異的プライマーセットを適用し PCR を行うことにより、植物種特異的に増幅産物が得られ、植物種の鑑別が可能か検討した。その結果、アツミゲシ特異的プライマーセットを適用した場合、アツミゲシを試料とした場合のみ特異的増幅産物のバンドを与え、アツミゲシ特異的な検知ができることが示された。ケシ・アツミゲシ共通プライマーセットでは、プライマー濃度を 0.125 mM に下げることによって、ケシ及

びアツミゲシを試料とした場合にのみ、特異的増幅産物のバンドが得られ、両植物種の特異的な検知ができることが示された。ヒナゲシについては、ヒナゲシ特異的プライマーセットを利用して種々の条件を検討したが、新鮮葉を試料とする場合は良好な結果が得られる物の、FTAカードで採集した試料では、ナガミヒナゲシにて増幅産物が認められ、現段階ではヒナゲシとナガミヒナゲシ両植物種間の鑑別ができないことが判明した。今後、PCR条件やPCR酵素などを最適化することにより、より正確性の高い植物種鑑別が可能になると考えられる。

C.7. 免疫化学的手法による幻覚性サルビア鑑別法の開発

抗SalA MAbの可変領域の遺伝子を解析した結果、目的とする抗体遺伝子のクローニングに成功したものと判断した。次に、各々の組換え抗体が抗原認識能を有することを確認するために、Fab遺伝子を大腸菌発現用ベクターpET28a(+)に組み込み、その後大量発現用大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、組換えタンパク質を得、精製することができた。不溶性画分に発現したタンパクは不活性な状態で発現するため、巻き戻しが必要となる。本実験では、様々な巻き戻し法の中から効率的な再生が期待できる透析法を採用した。Fabの巻き戻しについては、VH-CH1、軽鎖を等量混和した後、巻き戻しを実施した。巻き戻しの完了したFabについてSalA-HSA(ヒト血清アルブミン)を固相化抗原としたELISAを行ったが、固相化抗原に対する反応性を確認することができなかった。従って、現在、抗SalA組換え抗体の大量調製法の構築に成功しているものの、抗原認識能を確認することが出来ていない現状にある。今後、組換え抗体の巻き戻しについて詳細な解析を行う必要がある。特に、正しいジスルフィド結

合形成を促すために、巻き戻しの際に添加する還元剤、酸化剤の選定、濃度の調整は重要な検討課題といえる。

C.8. 免疫化学的手法によるチャット鑑別法の開発

作製したCA-Suc-BSAコンジュゲートをマウスに4度免疫感作した段階で血中抗体化を測定した結果、十分な血中抗体価を得ることができた。続いて、常法により細胞融合を実施し、融合後のハイブリドーマの選抜を行うことで、最終的にCA-Suc-BSAを認識するMAbを産生するハイブリドーマ1種を樹立した。次に、先に決定した最適濃度の一次抗体を用いて間接競合法によるCAの検出を試みた。その結果、CAを直接カルボジイミド法によりキャリアータンパクに結合した固相化抗原を用いた場合に、CAを検出可能な感度の高いELISAの開発に成功した。本研究成果により、簡便高感度なチャット(*Catha edulis*)鑑別法の構築が可能と考えられる。作製した抗CA MAbは遊離のCAに対する反応性を示さないことから、今後、抗体が反応性を有するCA誘導体を見出し、誘導体をターゲットとした間接競合法によるELISAを構築する予定である。

D. 結論

本研究は、厚生労働省の乱用薬物行政と乱用薬物取締りに直接貢献することを目的に遂行されている。麻薬指定される化合物は、本研究で事前に分析法が確立されることで、指定後の迅速な取締りが行われることになる。また、代謝物の合成と生体試料からの分析が遂行されることで、使用罪に対し始めて対応することが可能となる。さらに、今後対応が必要とされる植物系乱用薬物について、本研究で事前にその規制の範囲が検討され、分析、鑑定法が確立さ

れることで、適切な規制を行うことが出来る。また、大麻や麻薬含有植物では、栽培事犯が増加しているが、本研究の結果、簡便正確な鑑定法が確立することで、迅速な取締りが行われることになり、国民の危機リスクを低減させることになる。

特に、本年度の研究では、植物種が近縁であり、形態による識別が難しいケシ属植物の種子、1粒を検体としてケシ、アツミゲシ、そしてヒナゲシの各植物種の鑑別が可能な手法の開発に成功した。また、食品用途のケシ種子の植物種鑑別にも成功した。これらの手法は、実際に発芽させ植物の形態を確認することが困難なケシ属植物の、植物種鑑別に威力を発揮するものと期待される。また、フィールドでの簡便なDNA検体の採集、ならびに室温での検体の保管が可能で、FTAカードで採集した核酸試料を検体とした植物種鑑別法について検討した。その結果、8ヶ月を超える期間、室温で保存したFTAカードを検体として、規制対象植物である、アツミゲシ、ケシの特異的検知が可能であることが示された。本手法は、フィールドでの試料採取から保管まで、冷蔵施設等を必要とせず、実用性が非常に高いシステムと考えられる。また、押収錠剤型麻薬に含有される薬物の定量分析を実施し、捜査官からの問い合わせが多い1回使用量の目安となる、各薬物の含有量把握を達成するなど、本研究は、今後の乱用薬物取り締まり行政に直接的に貢献できるものと言える。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表等

論文発表等

1) Tsumura, Y., Aoki, R., Tokieda, Y.,

Akutsu, M., Kawase, Y., Kataoka, T., Takagi, T., Mizuno, T., Fukada, M., Fujii, H., Kurahashi, K., "A survey of the potency of Japanese illicit cannabis in fiscal year 2010", *Forensic Sci. Int.*, **221** 77-83 (2012).

- 2) 津村ゆかり, 絶え間なく出現する違法ドラッグを化学の力で識別する, *化学と教育.*, **60**(8) 348-349 (2012).
- 3) Kawano, N., Kiuchi, F., Kawahara, N., Yoshimatsu, K.: Genetic and phenotypic analyses of a *Papaver somniferum* T-DNA insertional mutant with altered alkaloid composition, *Pharmaceuticals* **2012**, 133-154.
- 4) Ohno, A., Kikura-Hanajiri, R., Fukuhara, K., Goda, Y., Kurihara, M, A metabolic study on the biochemical effects of Levomethorphan/Dextromethorphan in rats using ¹H-NMR spectroscopy. *Yakugaku Zasshi*, submitted.

学会発表等

- 1) Paudel, M. K., Shirota, O., Sekita, S., Tanaka, H., Morimoto, S., Development of an immunochemical differentiation method for *Salvia divinorum*, International Congress on Natural Products Research, Aug 2012, New York.
- 2) ポウデル マダン クマル, 田中宏幸, 田畑香織, 森元 聡, 代田 修, 関田節子, 免疫化学的手法によるチャット鑑別法の開発, 日本生薬学会第59回年会, 2012年9月, 千葉
- 3) 河野徳昭, 吉松嘉代, 川原信夫, 合田幸広, ケシ属植物の実用的遺伝子鑑別法の開発, 日本薬学会第133年会, 2013年3月, 横浜.
- 4) 緒方 潤, 花尻(木倉) 瑠理, 吉松嘉代, 川原信夫, 阿久津守, 合田幸広, 大麻種子1粒からの ISSR 法による系統識別, 日本薬学会第133年会, 2013年3月, 横浜.
- 5) 正田卓司, 花尻(木倉) 瑠理, 福原 潔, 奥田晴宏, 合田幸広, 栗原正明, 合成カンナビノイド代謝物の合成に関する研究, 日本薬学会第133年会, 2013年3月, 横浜.
- 6) 花尻(木倉) 瑠理, 河村麻衣子, 菅野さな枝, 永井智紀, 高田女里, 向井敏二, 合田幸広, いわゆる「脱法ハーブ」使用者生体試料からの薬物分析例, 日本薬学会第133年会, 2013年3

月，横浜.

新聞報道

読売新聞朝刊 平成24年12月31日「危険性を増
す大麻」

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

分担研究課題 法規制薬物(植物を含む)の分析と鑑別に関する研究

分担研究者 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

大麻種子1粒を用いた産地特定のための ISSR-PCR 法による検討

研究要旨 アサ科アサ属の大麻 *Cannabis sativa* L. は世界中に多様な変異系統の存在が認められている。このような種内変異を DNA 塩基配列情報を用い明かにすることは、摘発大麻の由来を解明する上で重要と考えられる。本研究では、ISSR-PCR 法を用いた大麻 DNA の多型解析を行うとともに識別技術の確立を試みた。本実験により ISSR-PCR で得られた複数のバンドの塩基配列をもとに 7 種類の識別マーカールを作成した。それらを併用することで大麻 16 種中 14 種の大麻の相互識別が可能となった。

研究協力者
阿久津守 関東信越厚生局麻薬取締部鑑定課 課長

A. 研究目的

アサ科アサ属アサ(以下、大麻) (*Cannabis sativa* L.)、大麻は大麻取締法において「大麻草およびその製品」と規定され、大麻種子そのものに規制はないが、大麻取扱者(大麻栽培および大麻研究の免許取得者)以外の栽培は法律によって規制されている。また、香辛料や鳥のエサなどの産業用の大麻種子は、加熱などによる発芽不能処理が義務付けられ輸入されており、発芽能力を有する大麻種子が一般に流通することがないよう管理されている。しかしながら、発芽能力を有する大麻種子がインターネ

ットを通じて売買されており、違法に発芽可能な大麻種子を国内に持ち込むケースも後を絶たず、国内の大麻栽培事犯検挙数は、ここ数年では平成 21 年の 312 件から減少傾向にあるものの平成 23 年 147 件という状況にある¹⁾。これら不正に国内に流通する大麻種子の来歴(産地、栽培(品)種)の特定が可能になることは、不正輸入品か否か等、新たな規制方法の確立につながる。そこで、大麻種子 1 粒からの DNA 多型に基づいた鑑別法の確立を目的として DNA 塩基配列の調査を行っている。昨年度までに、一般的な DNA を用いた鑑別法に数多く利用されている葉緑体 DNA 領域を含む 4 領域(*trnH-psbA*, *matK*, *trnL-trnF*, ITS)^{2, 3)} を検討した。それぞれの領域において配列に大きな違いが見られず、産地や系統分類などに有効な領域を見出すことは

できなかった。また昨年度は、上記の DNA 領域より進化速度が速く、変異に富むことが知られている ITS 近傍の 26S-18S rDNA⁴⁻⁷⁾のスペーサー領域の調査を行い3つの系統に分類できることを確認した。今年度は大麻 DNA のマイクロサテライト領域、特に ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)⁸⁻¹⁴⁾による大麻種内の多型 (DNA Fingerprinting) を調査し、PCR による簡便でより詳細な鑑別法の確立を試みた。

B. 研究方法

1. 試料

関東信越厚生局麻薬取締部より分与された大麻種子海外市場製品 (オランダ) (製品: No.1~14), 基盤研・薬植セ・筑波にて系統保存されているメキシコ産系統種子 (M) および日本国内繊維用栽培種トチギシロ (J) 種子, 計 16 種子を用いた。

2. 実験方法

各種子 1 粒を液体窒素で凍結させた後, MM-300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した各種子は Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega) 中の溶出液に溶解し, Maxwell 16 (Promega) を用い DNA を抽出・精製した。回収 DNA 溶液各 200 μ L 中の 1 μ L を PCR 反応に用いた。

各種プライマー^{3, 15-18)}は以下の通りである。*rbcL* (forward) primer: 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3', *rbcL* (reverse) primer: 5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3', ITS (forward) primer: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', ITS (reverse) primer:

5'-CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG-3', Cannabis specific (forward) primer: 5'-GAGTTGGCTGCGTTAATCCG-3', Cannabis specific (reverse) primer: 5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3', Cannabis male-specific (forward) primer: 5'-TCAAACAACAACAACCG-3', Cannabis male-specific (reverse) primer: 5'-GAGGCCGATAATTGACTG-3', THCAS drug-type (forward) primer: 5'-AATAACTCCCATATCCAAGCA-3', THCAS drug-type (reverse) primer: 5'-AGGACTCGCATGATTAGTTT-3'.

上記プライマーを用い, 反応溶液として, 酵素には Ex Taq Hot start version (Takara) 0.1 μ L, PCR 反応試薬には, Ampdirect plus (Shimadzu) 5 μ L, プライマー各 0.5 μ L (10 μ M), DNA 溶液 1 μ L とし, 全量 10 μ L で PCR 反応を行った (95°C 3min; 98°C 10sec, 52°C 20sec, 72°C 2min, 30cycles)。

ISSR-PCR は表 1 記載のプライマーを用い上記と同様に PCR 反応を行った。ただし, プライマーは forward, reverse 共通のため 1 μ L (10 μ M)とした。1%アガロースゲル電気泳動後, 多型解析に有効なバンドは切り出しを行い精製後 (QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)), pMD20-T Vector (Mighty TA cloning kit (Takara)) にライゲーション後, 塩基配列を決定した。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い, 解析は ABI Prism 3100-Avant Genetics Analyzer (ABI)を使用した。

C. 研究結果

1. 各種プライマーを用いた PCR 反応
植物種共通のプライマーにおける葉緑体ゲノム上の *rbcL* 領域および、核ゲノム上の ITS 領域の PCR 反応では、すべての大麻種子でほぼ同じサイズのバンドを確認した。このことから大麻種子 1 粒からの DNA の抽出・精製が PCR での分析に利用可能であることを示している (図 1)。また、葉緑体ゲノム上の *trnL-trnF* 領域における *Cannabis sativa* L. 特異的配列を基にした *Cannabis specific* プライマーにおいても、すべてのサンプル (1-14, J, M) からバンドを確認した。この結果、16 種すべてのサンプルが大麻であることを示している。大麻の Y 染色体 DNA 上由来の配列から作成された Male-specific プライマーによる PCR の結果から、サンプルナンバー 1, 2, 3, 6, 11 が雄花 (XY) を形成する種子、それ以外は雌花 (XX) を形成する種子であることが示唆された。高上馬ら¹⁸⁾による大麻における幻覚性成分の本体であるテトラヒドロカンナビノールの最終合成酵素である tetrahydrocannabinolic acid synthase 遺伝子 (*THCAS*) のタイプ分類 (drug 型, fiber 型) プライマーにおいて、トチギシロ (J) のみバンドが確認されなかった。この結果は、トチギシロが CBDA 種 (CBDA を多く含有する種で THCA をほとんど含まない。) である繊維型 (fiber 型) であり、それ以外は THCA を高含有する THCA 種 (drug 型) であることが示唆された。トチギシロでバンドが確認されないことはこれまでの結果¹⁸⁾と同一の結果であった (図 1)。

2. 各種 UBC プライマーを用いた PCR fingerprinting

ISSR-PCR 法に有効な UBC (University of British Columbia) プライマー 20 種を用い PCR を行った。実験に使用した各種 UBC プライマーは表 1 に示す。特徴的なバンドパターン (fingerprinting) を示す 5 種のプライマーの結果を図 2 に示す。図 2 から、各プライマーにおいては、同一のバンドパターンを示す種 (例えば、UBC-811 では、サンプル 7, 9, 11 など) が存在することが明らかとなったが、複数のプライマーを組み合わせる (複数のプライマーで比較する) ことで各サンプルは分離が可能であると考えられた。また、UBC-818, 876 プライマーではすべてのサンプルからバンドが得られなかった。

3. UBC プライマーより得られたバンドの STS 化プライマーの作成

各種 UBC プライマーによる PCR で得られた特異的バンドを切り出し、識別プライマーを作成した。図 2 に UBC-835 プライマーからの STS 化プライマーの作成を示す。UBC-835 プライマーによる PCR の結果、1.4kbp 付近にトチギシロ (J) 特異的バンドが安定的かつ明瞭に確認された (図 2-A)。そこで得られたバンドを切り出し、塩基配列の解析を行った (図 2-B)。得られた DNA は全長 1,352bp で通常 (nucleotide collection) の BLAST 検索では相同性を示す配列はヒットしなかった。そこで、Whole-genome shotgun contigs での相同性検索を行った結果、大麻ゲノムとの高い相同性を示した。得られた塩基配列より STS (Sequence Tagged site) 化プライマー (STS835-1) を作成し PCR を行った結果、トチギシロでのみ明瞭なバンドが確認された (図 2-C)。また、得られるバ

ンドがトチギシロ特異的であることを明確にするために、新たにトチギシロ 5 粒より DNA を調製し PCR 反応を行った (図 2-D). トチギシロ種子 5 粒すべてにおいて STS 化プライマーよりバンドが確認された。

さらに、同様の手法により各 UBC プライマーから得られる種内間特異的なバンド(全サンプルに共通に発現していないバンド。例えば、図 2 の最下段 UBC-866 プライマーの場合は、1.3kbp 付近の全てで発現しているバンドではなく、2.0kbp 付近のサンプル 1, 6, 8, 9, 11 で見られるバンド)を切り出し塩基配列を決定後、STS 化プライマーを作成し PCR を行った。得られた結果を図 3 に示す。また、新たに得られた STS 化プライマーの配列を表 2 に示す。表 2 に示したプライマーを用いることで、今回実験に用いた大麻種子 16 サンプルは 14 パターンに分離可能であった (2 と 8, 7 と 11 が不分離)。14 と J は図 2 (STS835-1) で分離可能。しかしながら、これらのプライマーを用いることで、大麻種子の産地、来歴、系統、異同等の分離・分析精度は向上したと考えられる。

D. 考察

DNA 塩基配列を基にした産地特定 (系統解析) のための大麻種子の DNA 鑑別を行った。

今回検討したマイクロサテライト領域は、STR (short tandem repeat), SSR (simple sequence repeat)^{8-14, 19)} などとも呼ばれる領域で、主にイントロンやスペースー領域に見られる配列である。今回

は、DNA (遺伝子) の明確な既知の領域 (*rbcl*, *trnL-trnF*, 18S spacer など)²⁻⁷⁾ を検討するのではなく、ゲノム上に散在する繰り返し配列近傍領域を、短い繰り返し配列のプライマーによる PCR によって取得する方法を用いた (ISSR-PCR 法)⁸⁻¹⁴⁾。本法は日本国内でも農作物の品種識別に利用されている²⁰⁻²²⁾。DNA 多型の視覚化⁸⁻¹⁴⁾ という点で簡便であるものの、結果の再現性や安定性が DNA の濃度や PCR 条件に影響を受けやすいため STS 化プライマーの作成が推奨されている²³⁾。

今回、我々は海外で喫煙用の栽培目的で売買がなされているオランダ産の大麻種子を用い実験を行った。栽培・育種地域も限定されており、近縁交配 (雑) による高頻度の掛け合わせ (繰り返し) による栽培 (喫煙目的用の人工栽培) が予想され、サンプル 1-14 においては DNA が画一化されていると予想されたが、数種の UBC プライマーにおいては多くの DNA 多型が観察された (図 2 サンプル 1-14)。一方で、トチギシロ (J) とそれ以外 (1-14, M)、メキシコ産 (M) とそれ以外 (1-14, J) では、多型に大きな差がみられると予想されたが、個々のサンプルと部分一致するバンドが数多くみられた。また、多型解析において *C. sativa* および *C. indica* といった 2 種類に大別可能な種間差はみられなかった。

本研究では特異性および検出効率を高めることを目的として STS 化プライマーの作成を行った。今回、UBC プライマーで得られたバンドの配列はすべて大麻ドラフトゲノム²⁴⁾ と高い相同性を示した (部分的)。一方で、得られた塩基配列全長と報告されているドラ

フトゲノムが完全一致するものに関しては DNA の変異がない (多様性が少ない) ものとしてプライマー作成から除外した。また, PCR 後, 新たに多型が生じるプライマーについても除外した。今回, 7 種類の識別プライマーを作成した。それらを併用することで 16 サンプル中 14 サンプルが分離可能であった。今後はこれら 7 種の識別プライマーが世界各地に分散する大麻に, どこまで汎用性があるかを検討する必要があると考えられる。

E. 参考文献

- 1) 警察庁組織犯罪対策部薬物銃器対策課, 平成 23 年中の薬物・銃器情勢, http://www.npa.go.jp/sosikihanzai/yakubutujyuki/yakujyuu/yakujyuu1/h23_yakujyuu_jousei.pdf
- 2) Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. E., Janzen, D. H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants *PNAS* **102**, 8369–8374 (2005)
- 3) CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants *PNAS* **106**, 12794–12797 (2009)
- 4) Joongku, L., Bruce, G. B., Gottlieb, L. D. Phylogeny of Stephanomeria and related genera (Compositae-Lactuceae) based on analysis of 18S-26S nuclear rDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany* **89**, 160–168 (2002)
- 5) Baldwin, B. G. and Markos, S. Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: Congruence of ETS and ITS trees of Calycandenia (Compositae). *Mol., Phyl., Evol.* **10**, 449-463 (1998)
- 6) Murakami, A. Structure differences in the intergenic spacer of 18S-26S rDNA and Molecular phylogeny using partial external transcribed spacer sequence in Hop, *Humulus lupulus*. *Breeding Science* **51**, 163-170 (2001)
- 7) Linder, C., R., Goertzen, L., R., Heuvel, B., V., Francisco-Ortega, J., Jansen, R., K. The complete external transcribed spacer of 18S-26S rDNA: amplification and phylogenetic utility at low taxonomic levels in asteraceae and closely allied families. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **14**, 285-303 (2000)
- 8) Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I. A., ElSohly, M. A. Assessment of the genetic stability of micropropagated plants of *Cannabis sativa* by ISSR markers *Planta Med* **76**, 97-100 (2010)
- 9) Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I. A., ElSohly, M. A. Molecular analysis of genetic fidelity in *Cannabis sativa* L. plants grown from synthetic (encapsulated) seeds following in vitro storage *Biotechnol Lett* **33**, 2503-2508 (2011)
- 10) Kayis, S. A., Hakki, E. E., Pinarkara, E. Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey *African Journal of Agricultural Research* **5**, 2925-2933 (2010)
- 11) Hakki, E. E., Kayis, S. A., Pinarkara, E., Sag, A. Inter simple sequence repeats separate efficiently hemp from marijuana (*Cannabis sativa* L.) *Electronic Journal of Biotechnology* **10**,

- 570-581 (2007)
- 12) Alghanim, H. J., Almirall, J. R. Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses. *Anal Bioanal Chem* **376**, 1225–1233 (2003)
- 13) Hsieh, H-M., Hou, R-J., Tsai, L-C., Wei, C-S., Liu, S-W., Huang, L-H., Kuo, Y-C., Linacre, A., Lee, J. C-I. A highly polymorphic STR locus in *Cannabis sativa* *Forensic Science International* **131**, 53-58 (2003)
- 14) Kojoma M., Iida, O., Makino, Y., Sekita, S., Satake, M. DNA fingerprinting of *Cannabis sativa* using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification *Planta Med* **68**, 60-63 (2002)
- 15) Stanford, A. M., Harden, R., Parks, C. R. Phylogeny and biogeography of *Juglans* (Juglandaceae) based on *matK* and ITS sequence data *American Journal of Botany* **87**, 872–882 (2000)
- 16) Muro, T., Imamura, S., Nakamura, H., Hasegawa, M., Yuasa, I. *Cannabis sativa* identification by analysis *trnL* region of chloroplast DNA *法科学技術* **15**, 143-149 (2010)
- 17) Törjek, O., Bucherna, N., Kiss, E., Homoki, H., Finta-Korpelova Z., Bocsa, I., Nagy, I., Heszky, L. E. Novel male-specific molecular markers (MADC5, MADC6) in hemp *Euphytica* **127**, 209-218 (2002)
- 18) Kojoma, M., Seki, H., Yoshida, S., Muranaka, T. DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in “drug-type” and “fiber-type” *Cannabis sativa* L. *Forensic Science International* **159**, 132–140 (2006)
- 19) Gilmore, S., Peakall, R., Robertson, J. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations *Forensic Science International* **131**, 65-74 (2003)
- 20) Katoh, Y., Suzuki, T., Kouguchi, H. Detection of inter-simple sequence repeat-T219 DNA fragment (ISSR-T219) in domestic and imported soybean grains *Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health* **57**, 105-108 (2007)
- 21) 矢野 博, 池田達哉 ISSR-PCR 法を用いたイグサ品種識別 *DNA 多型* **11**, 57-60 (2003)
- 22) 池上秀利, 野方 仁, 栗村光男, 平島敬太 DNA マーカーによるイチジク品種「とよみつひめ」の識別技術 *福岡農総試研報* **24**, 104-107 (2010)
- 23) DNA 品種識別技術検討会 農林水産省生産局種苗課 植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項-技術開発と利用のガイドライン-(2003)
- 24) van Bakel, H., Stout, J. M., Cote, G. A., Tallon, C. M., Sharpe, A. G., Hughes, T. R., Page, J. E. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa* *Genome Biology* **12**, R102 (2011)
- F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

論文発表

なし.

学会発表

緒方 潤, 吉松嘉代, 川原信夫, 阿久津守, 花尻 (木倉) 瑠理, 合田幸広, 大麻種子 1 粒からの ISSR 法による系統識別, 日本薬学会第 133 年会 (横浜 2013 年 3 月発表予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.