

Fig. 7 ドッキングを行った 69 種類の CB1 受容体リガンド。

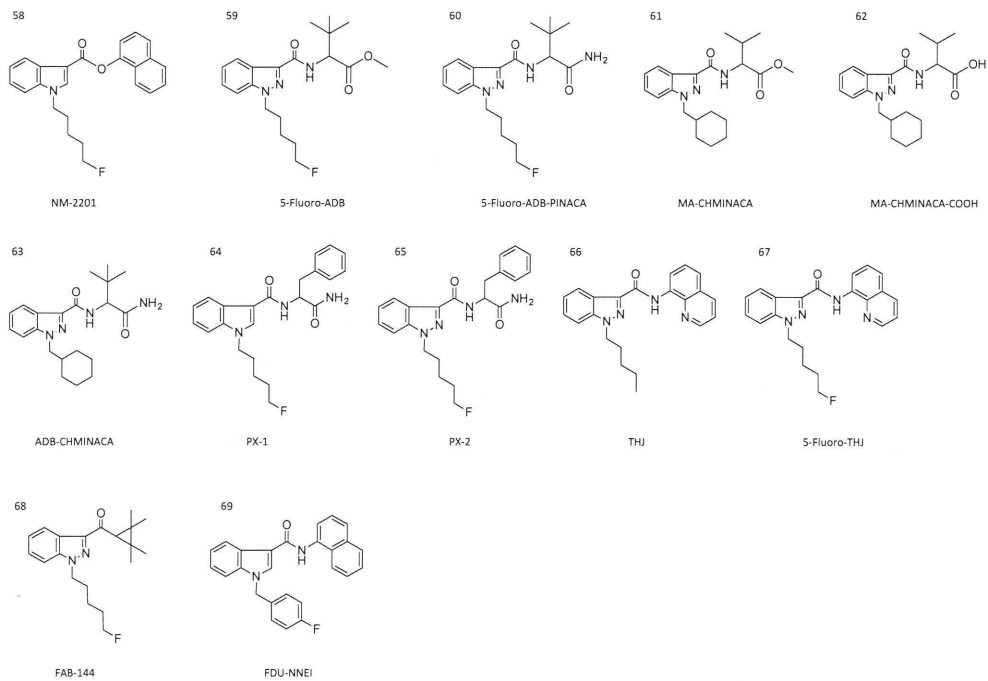
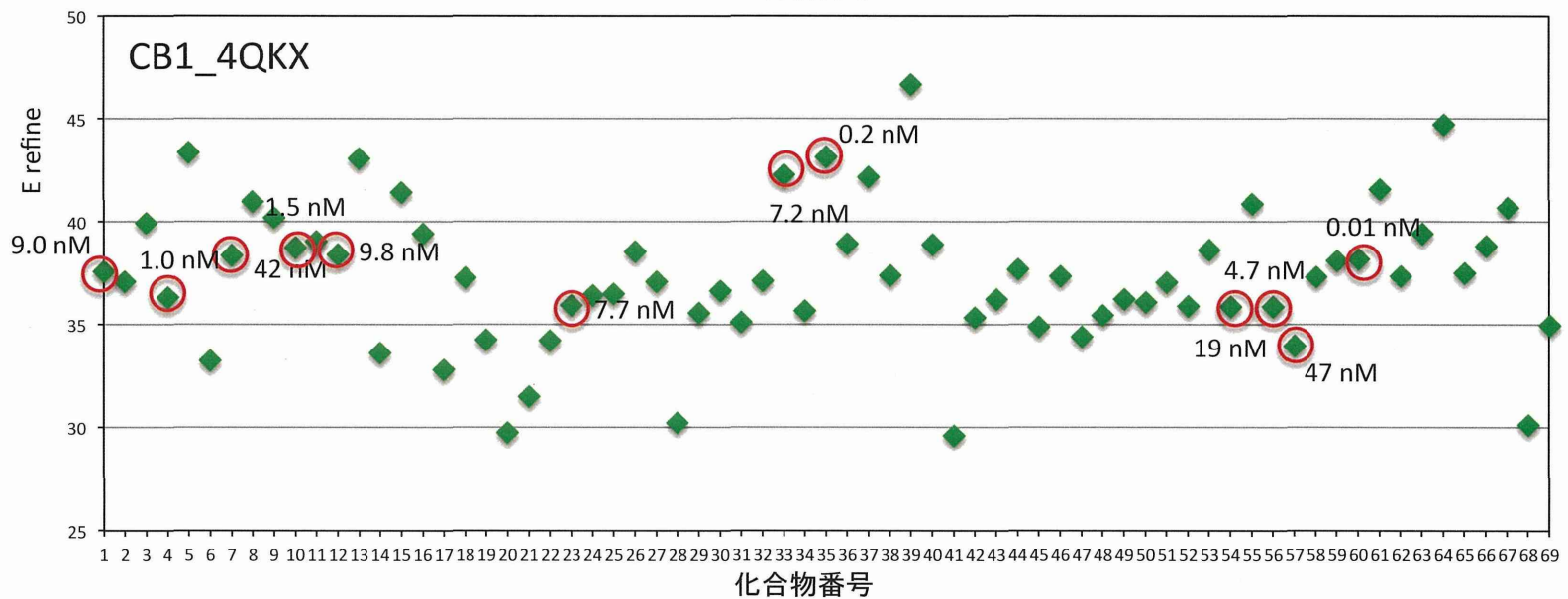
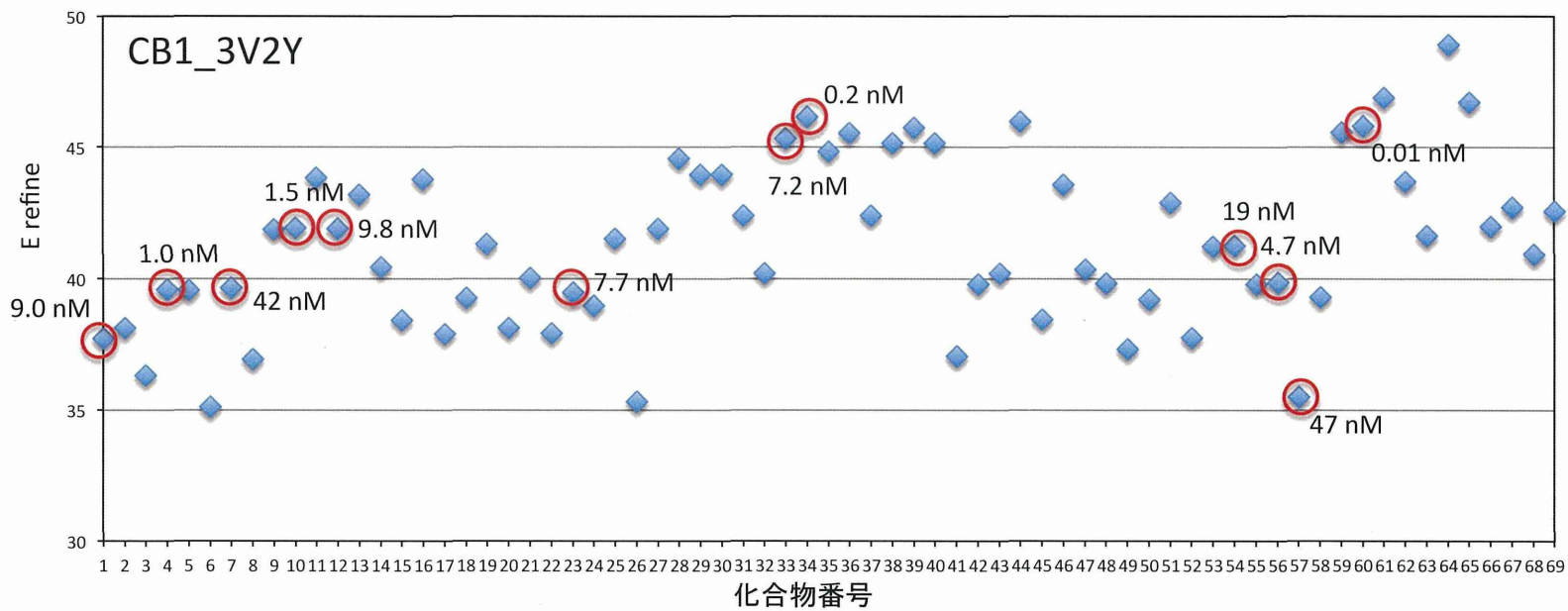
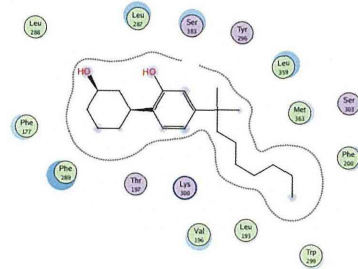
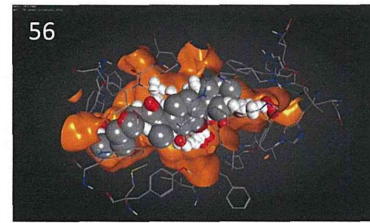
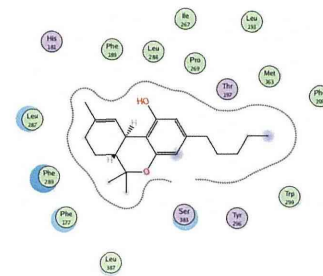
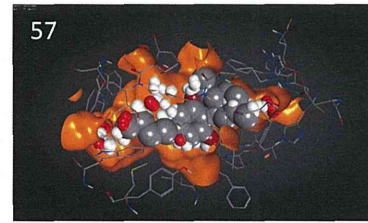
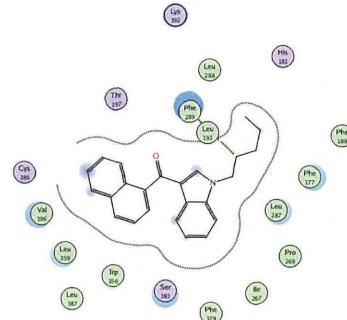
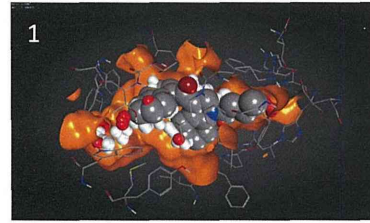
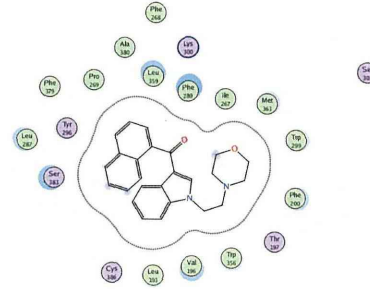
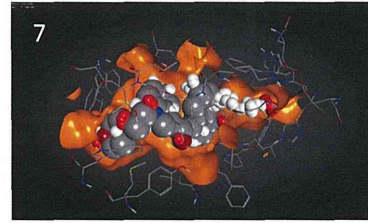
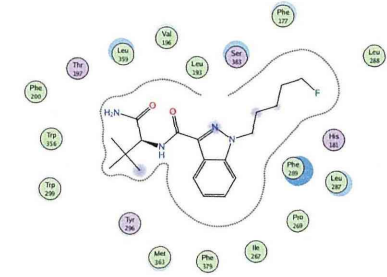
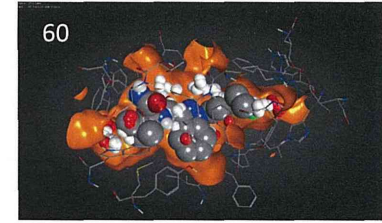


Fig. 7 ドッキングを行った 69 種類の CB1 受容体リガンド (続).

Fig. 8 各 CB1 リガンドの結合エネルギー (上段: CB1\_3V2Y, 下段: CB1\_4QKX).

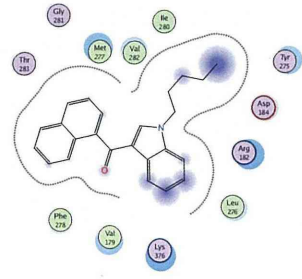
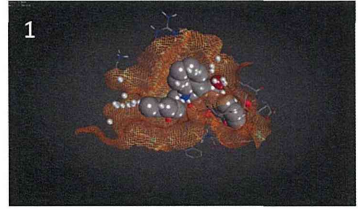
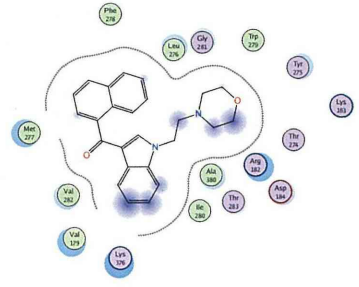
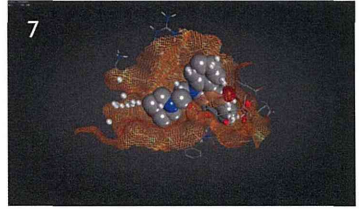
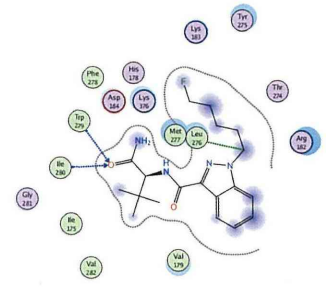
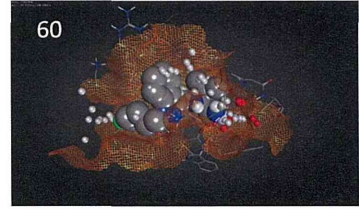




- |             |                      |                     |                 |
|-------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| ● polar     | → sidechain acceptor | ○ solvent residue   | ⊗ arene-arene   |
| ● acidic    | ← sidechain donor    | ⊙ metal complex     | ⊗H arene-H      |
| ● basic     | → backbone acceptor  | ⊙ solvent contact   | ⊗+ arene-cation |
| ● greasy    | ← backbone donor     | ⊙ metal/ion contact |                 |
| ○ proximity | ● ligand             | ○ receptor exposure |                 |
| ○ contour   | ● exposure           |                     |                 |

CB1\_3V2Y

Fig. 9 各リガンドの最安定構造とCB1受容体に対する結合様式.



- polar
- acidic
- basic
- greasy
- proximity
- contour
- sidechain acceptor
- ← sidechain donor
- backbone acceptor
- ← backbone donor
- ligand exposure
- solvent residue
- metal complex
- solvent contact
- metal/ion contact
- receptor exposure
- ⊙⊙ arene-arene
- ⊙H arene-H
- ⊙+ arene-cation

CB1\_4QKX

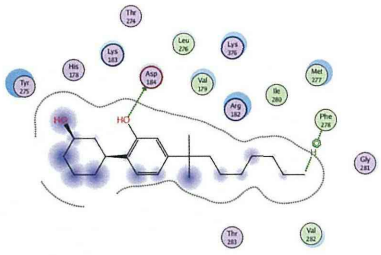
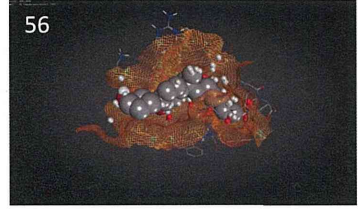
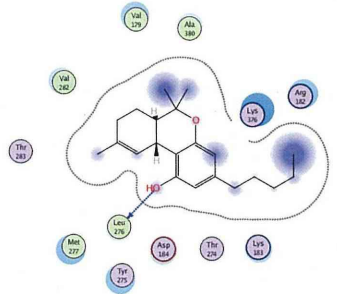
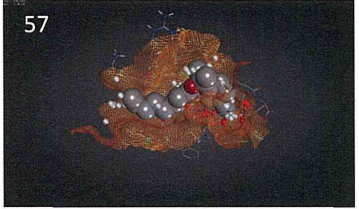


Fig. 9 各リガンドの最安定構造とCB1 受容体に対する結合様式 (続).

分担研究課題:DNAを用いた法規制植物の識別法に関する研究

研究分担者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—違法ドラッグ製品“菌床”の基原種同定—

研究要旨:違法ドラッグ製品“菌床”の菌の同定を目的として、DNAの抽出およびDNA塩基配列を指標とした菌種の同定を行った。核rDNA上のITS領域および近傍のLarge subunit領域を分析した結果、サイロシン、サイロシビンを含むいわゆるマジックマッシュルームであるモエギタケ科シビレタケ属 *Psilocybe cubensis* “ミナシビレタケ”であることが強く示唆された。

A. 研究目的

危険・違法ドラッグ市場では、2008年頃から「Spice」をはじめとして植物の乾燥物、粉碎物に、合成化合物等を添加した“いわゆる脱法ハーブ”が社会問題化し、ニュースや事件として連日報道されている。本研究機関ではこれまで危険ドラッグ対策を目的として、継続的に化学的<sup>1,4)</sup>、分子生物学的<sup>5)</sup>手法を用いた製品分析を行っている。今回は、違法ドラッグ製品として流通した菌床(穀物などの培地にカビなどの菌糸が覆ったもの)2種からDNAの塩基配列を指標とし、菌糸の同定を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 実験材料

菌床2製品(プラスチック製密封容器に充填された菌床2製品を無菌的にビニール袋に小分けしたもの(1),(2))(図1)から2mLエッペンドルフチューブに培地をスパーテルでとりわけ滅菌水を加え、ボルテックスを行った。懸濁液をピペットマンで吸い出し、これを2回行った。懸濁液2回分を合わせて、15,000rpmで5分間遠心し上清をできるだけ取り除き、沈殿物(菌糸)を得。これを分析試料とした(n=2)(図2)。

2. 実験方法

白い沈殿物(菌糸)を含む2mLエッペンドルフチューブに5mmジルコニアビーズを入れ、液体窒素で凍結させた後、MM-300(Qiagen)により粉碎した。粉碎した各試料はMaxwell 16 Tissue DNA purification kit(Promega)内の溶出液に溶解し、Maxwell 16(Promega)を用いDNAを抽出・精製した。回収DNA溶液、各200μL中の1μLをPCR反応に用いた。

各回収DNA溶液を鋳型として核ゲノム上のITS領域および近傍のLarge subunit(LSU)領域を、各領域で菌類において保存性の高い配列を基にして作成されたユニバーサルプライマーを用い<sup>6,7)</sup>、Ex Taq(Takara)およびAmpdirect plus(Shimadzu)を使用しPCR増幅を以下のプログラムで行った(95°C 180sec; 94°C 30sec, 54°C 30sec, 72°C 120sec, 35cycle; 72°C, 300sec)。1%アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認後、ダイレクトシーケンスを行った。Cycle Sequence反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用い、解析はABI Prism 3130-Avant Genetic Analyzer(ABI)を使用した。用いたプライマーを以下に示す。

ITS+LSU領域

Forward primer;

ATCCTGAGGGAAACTTCGGCA

Reverse primer;  
TCCGTAGGTGAACCTGCGG

### C. 研究結果

菌類の鑑別・同定に用いられる ITS 領域を増幅後、各増幅産物の塩基配列を決定し、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に登録されている配列と比較した。各試料ともに DNA は良好に抽出・精製された。

供試した 4 検体で増幅産物が確認された。塩基配列を確認した結果、4 検体の塩基配列はすべて一致した (解析塩基数 1551)。また、配列比較の結果 *Psilocybe cubensis* (HM035074) とも 100% 一致した (1551/1551) (データ未掲載)。

### D. 考察

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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>。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<sup>8,10)</sup>。

今回分析した試料は、子実体、いわゆるきのこではなく、穀物等培地に繁殖した菌糸・菌糸体であったが DNA の調製は特に問題はみられなかった。きのこ栽培用として無菌的に保管されている製品であり、他の菌などの混入がないことが結果的に DNA の調製を容易にしたとも考えられる。2 製品は培地の色、形状などが異なることから同一品ではないと考えられた (図 1, 2)。本菌糸はサイロシン、サイロシピンを含有するいわゆるマジックマッシュルームである担子菌門モエキタケ科シビレタ

ケ属 *Psilocybe cubensis* “ミナミシビレタケ” であることが強く示唆された。

### E. 参考文献

- 1) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., Haishima, Y., Goda, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 439–441 (2009).
- 2) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Ogata, J., Goda, Y., *Forensic Science International*, **198**, 31–38 (2010).
- 3) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Toxicol.*, **29**, 25–37 (2011).
- 4) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 21–32 (2013).
- 5) Ogata, J., Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 33–41 (2013).
- 6) Maruyama, T. *et al.* *Shyokuhin Eiseigaku Zasshi* 44(1), 44–48 (2003)
- 7) White, T. *et al.* In *PCR Protocols : A guide to Methods and Applications*, San Diego, U.S.A. Academic Press, 315–322 (1990)
- 8) 今関六也, 本郷次雄 「原色日本菌類図鑑」, 大阪, 保育社, 1965
- 9) 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
- 10) Stament, P “*Psilocybin Mushrooms of the World*”, Berkeley CA USA, Ten Speed Press (1996)

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

(学会発表)

緒方 潤, 花尻(木倉) 瑠理, 袴塚 高志,  
「DNA 情報を用いた幻覚性植物の鑑定事例」, 第 52 回 全国衛生化学技術協議会年  
会 (2015. 12)

(論文)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.





図 1. 分析試料

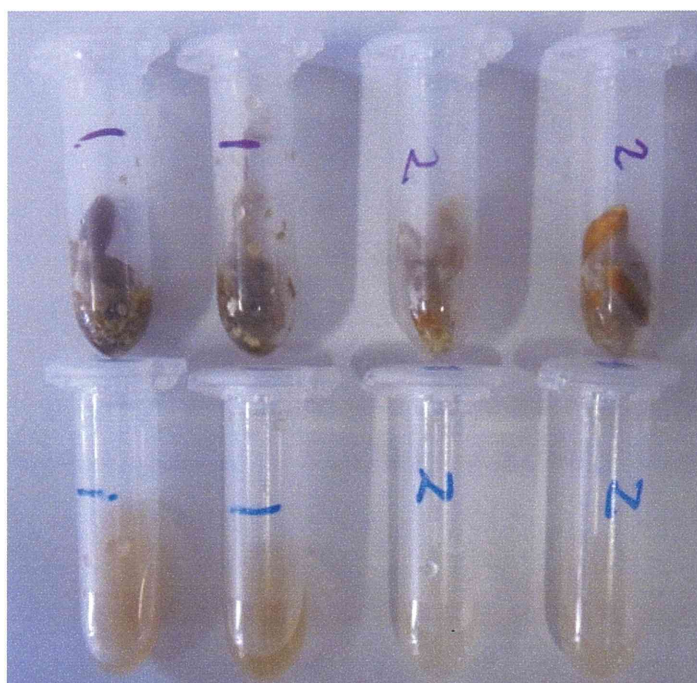


図 2. 分析試料からの菌糸の採集

分担研究課題:DNA を用いた法規制植物の識別法に関する研究

研究分担者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—“菌床”の培養と子実体の形成および Psilocybin, Psilocin の定量—

研究要旨:菌糸の DNA 分析により *Psilocybe cubensis* と同定された“菌床”を培養し、子実体を形成させ、キノコであることを明らかにするとともに、Psilocybin, Psilocin の定量を行った。製品の培養を継続することで子実体(キノコ)の形成を確認し、子実体から得られる DNA の分析結果からも本菌が *Psilocybe cubensis* であることを示した。さらに成分分析の結果から Psilocybin, Psilocin を含有することも確認した。以上の結果から、製品“菌床”は、麻薬原料植物である幻覚性キノコ “マジックマッシュルーム”であることが明らかとなった。

研究協力者

河村麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部

せ、菌糸がキノコであることを明らかにし、その同定および成分調査を行ったので報告する。

A. 研究目的

キノコ(きのこ)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、木の子)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<sup>1)</sup>。幻覚性を有するキノコ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キノコで、本成分を含有するキノコ類は平成 14 年 6 月より麻薬原料植物に指定されている<sup>2)</sup>。これら化合物を含有するキノコとしては、*Psilocybe* (シビレタケ属)および *Panaeolus* (ヒカゲタケ属)に属するキノコが該当するが、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<sup>1, 3)</sup>。

今回、違法ドラッグ製品として流通していた菌床から、モエギタケ科シビレタケ属 *Psilocybe cubensis* “ミナミシビレタケ”の DNA を検出した<sup>4)</sup>。そこで本研究では菌糸(体)から子実体を形成さ

B. 研究方法

1. 実験材料

違法ドラッグ製品“菌床”2 製品を試料とした(図 1)。本製品はいずれも菌糸からの DNA 分析の結果、*Psilocybe cubensis* の DNA が検出されたものである<sup>4)</sup>。培地は 3 種類を調製した。PDA (ポテト・デキストロース・寒天)培地<sup>5, 6)</sup>、PDYA (ポテト・デキストロース・イーストエキス・寒天)培地、子実体形成培地。

2. 実験方法

1) PDA および PDYA 培地の作成

市販の食用ジャガイモの皮をむき、厚さ 1cm 程度のスライス(300 g)にし、蒸留水約 500 mL を入れ 120°C、30min オートクレーブを行った。オートクレーブ終了後、ガーゼでろ過し、ろ液を得た。グルコース(Wako)20g、寒天(Wako)20g、PDYA の場合は Yeast Extract(Bacto)2g を添加し、1 L に蒸留水でメスアップし 120°C、20min オートクレーブを行い、シャーレに分注後、固体培地とした。

2) 植菌および培養

各製品(図 1)から無菌的に菌糸(体)を採取し、プレート培地中央に配置し、25°C、暗所培養を行った。

### 3) 子実体形成培地の作成

ペットショップや日用雑貨店で販売されている“鳥のエサ”を培地として用いた(図 2)。適当量の鳥の餌をビーカーに移し、鳥のエサの 2 倍量(v/v)の蒸留水を加え 120°C、60min オートクレーブを行った。オートクレーブ終了後、8cm 程度(ビーカーの高さ)に切断したパスツールピペット(ガラス管)を 200 mL ビーカー中央に立て、オートクレーブされた鳥のエサをビーカーの 200 mL の目盛りまで充填した後、アルミホイルでフタをし、再度 120°C、20min オートクレーブを行い子実体形成培地とした。

### 4) 子実体形成培地への植菌

PDA および PDYA 培地で良好に生育した菌糸(図 3)を寒天培地とともに小スパーテルで適当に裁断した。次に、子実体形成培地から無菌的にガラス管を抜き取り、その空洞の部分に裁断した菌糸を落とし込むように植菌した。アルミ箔でビーカー全体を完全に覆い、培地が完全に菌糸で覆われるまで 25°C で培養した。

### 5) 子実体形成(閉鎖系から開放系へ)

完全に菌糸で覆われた培地(図 4)は閉鎖系培養から開放系培養へ移行させた。アルミ箔を取り去るか、または、ビーカーから培地を抜き取り、透明プラスチック容器(またはビーカー)で全体にフタをし、容器内を高湿度に保ち、25 °C、明暗 12 時間で培養を行った。霧吹きで培地(菌糸体)に水分を与え、湿度を維持し、適度にフタを開け酸素を供給し、培養を継続した。

### 6) 子実体の同定

前報「違法ドラッグ製品 菌床の基原種の同定」と同様に塩基配列の解析を行った。DNA の調整は各子実体を乾燥させ、乾燥重 10 mg から DNA 抽出を行った。また、乾燥前の子実体は切断し切断面を確認した。

### 7) Psilocybin および Psilocin の分析

#### 7)-1. 試薬

Psilocybin および Psilocin は国立医薬品食品衛生研究所で所有しているものを使用した。両化合物は光や熱により分解しやすいため、メタノール溶液は用事調製とし、冷暗所に保管した。その他の試薬は、特級または HPLC グレードのものを使用した。遠心用膜フィルターは Ultrafree-MC (Durapore PVDF 0.45µm, Millipore 社製)を使用した。

#### 7)-2. 試料調製方法

菌床は約 50 mg、菌糸および子実体は約 10 mg を測りとり、1 mL MeOH を加えて 10 分間超音波抽出し、上清をフィルターろ過後、抽出液を適宜 MeOH で希釈して測定溶液とした。また、子実体試料を室温にて乾燥後約 2 mg 測りとり同様に抽出操作した後、測定を行った。

#### 7)-3. 測定方法

試料抽出液は LC-Q-TOF-MS を用いて分析を行い、化合物標準溶液との保持時間及び精密質量値の一致により検出を確認した。さらに、2 化合物のメタノール溶液を用いて LC-MS/MS MRM 分析により検量線を作成し、定量分析を行った。対象化合物の構造式、保持時間、および定量分析条件等を Table 1 に示した。

#### 7)-4. 分析機器条件

##### LC-Q-TOF-MS

##### ・装置

TripleTOF® 6600 LC/MS/MS system ( AB SCIEX 社製)

##### ・LC 条件

カラム: ACQUITY HSS T3 (2.1 mm i.d. x 100 mm, 1.8 µm, Waters), ガードカラム: Van Guard HSS T3 (2.1 mm i.d. x 5 mm, 1.8 µm, Waters), 移動相 A: 0.1% ギ酸水溶液, 移動相 B: 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液, グラジエント条件: A/B 95/5-5/95 (10 min, 2 min hold), 測定波長: 210-450 nm, 流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 1 µL, 検出: フォトダイオードアレイ検出器および質量検出器

・質量分析条件

Ionization : EI, positive, Source temperature, 550°C; gas, N<sub>2</sub>; ion source gas 1 ,50 psi; ion source gas 2 ,50 psi; curtain gas, 25 psi; ion spray voltage, 5500 V; declustering potential 80 V; mass spectral range, m/z 100–1000.

LC-MS/MS

・装置

Acquity I-class UPLC / Xevo-TQ-S (Waters 社製)

・LC 条件

Column : CORTECS C18 column, 2.7 μm, 2.1 mm×150 mm, CORETECS C18 Vanguard column, 2.7 μm, 2.1 mm×5 mm, Mobile phase : 0.1% Formic acid / CH<sub>3</sub>CN with 0.1% Formic acid, 95:5–50:50 (10 min, 2 min hold), Flow rate:0.3 mL, Column temp.:40°C, Injection volume:1 μL

・質量分析条件

Ionization:EI, positive, Capillary voltage :2.0 kV, Source temp.:150°C, Desolvation Temp.:500 °C, Cone Gas Flow:150 L/hr, Desolvation Gas Flow:1000 L/hr, Collision gas flow:Ar 0.15 mL/min

C. 研究結果

・製品からの再培養について

本研究では、製品＝生きた菌として、高栄養下寒天培地(PDA, PDYA)にて再培養を試みたが製品(2)は菌糸の伸長、成長が見られなかった。また、寒天培地に移植せず、そのままの状態でも製品の培養を継続したが、製品(2)は成長が見られなかった(図 5)。製品(1)に関しては菌糸の伸(成)長および子実体の形成が見られた。

・PDA および PDYA 培地への移植について

PDA, PDYA 培地ともに良好な成長が見られた。培養 3 日目で菌糸体の伸長が明確に確認された(図 6)。また、20 日後ではプレート一面を覆う菌糸の成長が見られた(図 7)。また、培地による成長速度に大きな差は見られなかった。

・子実体形成培地への移植について

子実体形成培地移植後も良好な菌糸の成長が見られた(図 8)。培地を完全に菌糸が覆った培地(3~5 週間)から順次、培養条件を変更し培養を継続した結果、開放系培養後 20 日目で子実体の形成が確認された(図 9)。子実体原基が形成された後の成長速度は速く、2, 3 日後にはカサが開くまでに成長した(図 10)。培養を続けることで継続的に子実体の形成が起こることが確認された(図 11)。本実験過程で得られた子実体で最も大きいものは 33.27g(湿重量)であった(データ未掲載)。更に、子実体形成培地に移行せず、PDA もしくは PDYA 培地で、開放系に培養条件を変更しても子実体の形成は確認されたが、その形状は非常に小さく、形態も異なるものであった(図 12)。

・子実体の同定

本実験で得られた子実体(図 12 を含む)より DNA を調製し、前報<sup>4)</sup>の方法で、核 rDNA 上の ITS 領域および近傍の Large subunit 領域を解析した結果、いずれの塩基配列も、モエキタケ科シビレタケ属 *Psilocybe cubensis* “ミナシビレタケ”の配列と一致した(データ未掲載)。また、収穫した子実体の切断面は青く変色することが認められた(図 13)。

・Psilocybin, Psilocin の分析

培養前の菌床、菌糸および子実体の各状態の試料から幻覚性キノコの活性成分である Psilocybin, Psilocin 検出が可能であるか LC-MS による分析を行った。化合物が検出された試料については簡易的な定量分析を行い、2 化合物の含有量(ng/mg, n=3)を測定した(Table 2)。

図 1 に示した培養前の菌床状態の試料(製品(1)および(2))においては Psilocybin, Psilocin が LC-MS/MS の MRM 分析での定量限界以下(TR)または検出限界以下(ND)となり、化合物の精密質量値および保持時間の一致は確認できなかった。続いて図 5 に示した製品(1)を 2 週間程度の培養を行った菌糸-1 からは、微量であるが Psilocybin, Psilocin の両化合物が確認できた(0.8 ng, 0.04 ng/mg)。さらに図 3 で示したように寒天培

地に移植して培養を行った菌糸-2からは、Psilocybin, Psilocin共に良好に検出した(95 ng, 5 ng/mg)。なお、培地から菌糸のみを採取することが困難であったため、定量値はあくまで推定値である。

最終的に形成された子実体試料 1-3 は柄とカサに分割して分析を行った。生試料は各培地から採取してすぐに一部分を切り取り抽出し、乾燥試料は残った部分を室内で乾燥後量り取り抽出を行った。その結果バラつきは大きかったが、各試料中から高濃度の Psilocybin (Raw: 410~1201 ng/mg, Dried: 2.2~6.8 µg/mg), Psilocin (Raw: 69~148 ng/mg, Dried: 0.14~3.4 µg/mg)を検出した。

#### D. 考察

今回の実験において、菌糸体から子実体(キノコ)を形成させることが可能であった。また、子実体から得られたDNAを解析した結果、*Psilocybe cubensis* “ミナシビレタケ”であることが示唆された。また、子実体の切断面は青く変色した。これはインドール骨格物質の酸化によるものと考えられているが、サイロシピンを含有するキノコの特徴のひとつであると言われている<sup>6,7)</sup>。また、培地上の菌糸体においても子実体の剥離や、水滴が長期間付着するなどの影響で青く変色する部分が見られた(図 11, 右下図)

本研究における実験スキームを図 14 に示す。本研究の手法で子実体の形成は確認できたが、製品(2)に関しては子実体の形成以前に菌糸の成長も確認されなかった(図 5)。製品培地中には菌糸状のものは確認できたが、培養開始までの時間や保存状態が製品(1)と異なり、菌自体が死滅していたとも考えられた。また、製品(2)を長期に渡って無菌的に培養を行ったが他の細菌等の増殖も見られなかった。しかしながら、製品(2)においてもDNAの解析の結果はミナシビレタケを支持するものであった。

子実体形成に関しては開放系への移行が菌糸

体から子実体形成への刺激(トリガー)となると言われており、水分、光、温度、酸素(二酸化炭素)濃度などがその刺激であると考えられている<sup>5,6)</sup>。開放系移行時期に一時的に冷蔵庫(4°C)保管や培地を水没させるなどの手法も書かれているが今回は特にそのようなことは行わなかったが、培地の下(底)面やピーカーとの接地面(水滴がたまる部分)からの子実体の発生が多く確認されたことから、培地に水分を十分に与えることは重要であるように考えられた(図 9, 11 上段図)。

本菌の含有成分を調査した結果、幻覚性成分である Psilocybin, Psilocin を検出した。本成分は、子実体(キノコ)本体のみならず、菌糸の状態でも検出されており、本菌の生命維持に必要な成分であることが考えられた。

現在、菌糸体は試験管内の PDA 培地にて培養後、流動パラフィン重層法<sup>8)</sup>および -80 °C 凍結保存法<sup>9)</sup>による長期保存実験を行っており、子実体形成可能かを確認する予定である。

#### 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) Stament, P. “Psilocybin Mushrooms of the World”, Berkeley CA USA, Ten Speed Press (1996)
- 4) 平成 27 年度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)総括・分担研究報告書「乱用薬物の鑑別法に関する研究」-違法ドラッグ製品“菌床”の基原種同定- 緒方潤
- 5) 中村克哉編, 「キノコの事典」, 東京, 朝倉書店(1982)
- 6) Gottlieb, A. “Psilocybin production”, Berkeley CA USA, Ronin Publishing (1997)
- 7) Allen, J., Merlin, M. *J Ethnopharmacol.* 35,

205-228 (1992)

8) 小林正, *林試研報*, 325, 141-147 (1984)

9) 藤原直哉, *森林応用研究*, 13, 75-76 (2004)

F. 健康危険情報

なし.

G. 研究発表

(学会発表)

緒方 潤, 花尻(木倉) 瑠理, 袴塚 高志,  
DNA 情報を用いた幻覚性植物の鑑定事例,  
第52回 全国衛生化学技術協議会年会 (平  
成27年12月)

(論文)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.



図 1. 本実験で用いた菌床 2 製品



図 2. 子実体形成培地として用いた市販“鳥のエサ”

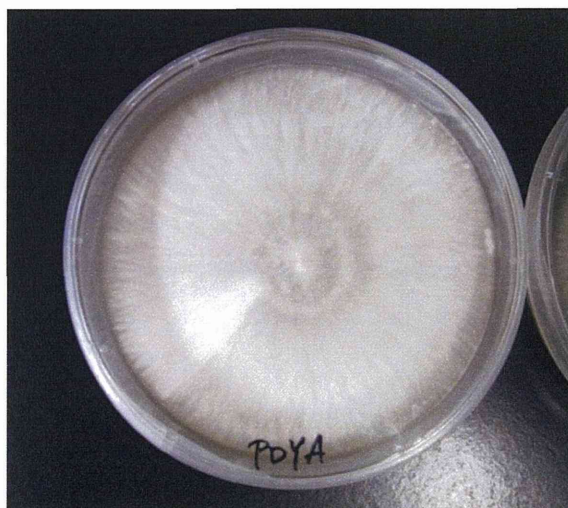


図 3. PDYA 培地に増殖した菌糸体  
(培養 15 日目)

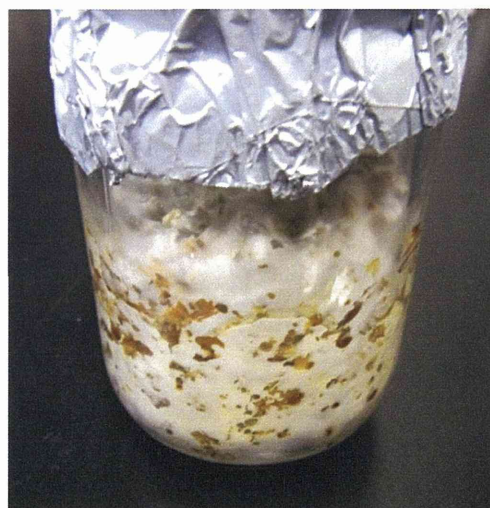


図 4. 子実体形成培地に増殖した菌糸体  
(培地移行後 30 日目)

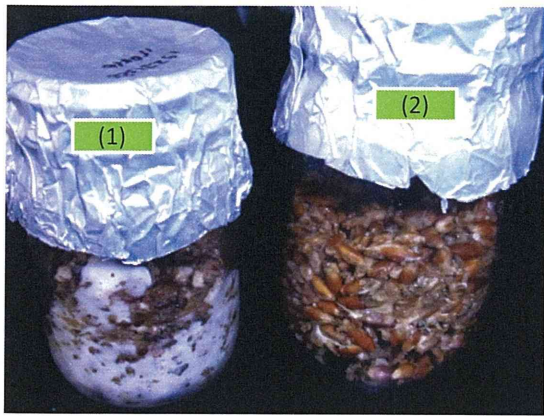


図 5. 菌糸体の成長が確認されなかった製品(2) (右), 左は製品(1), (培養 14 日目)

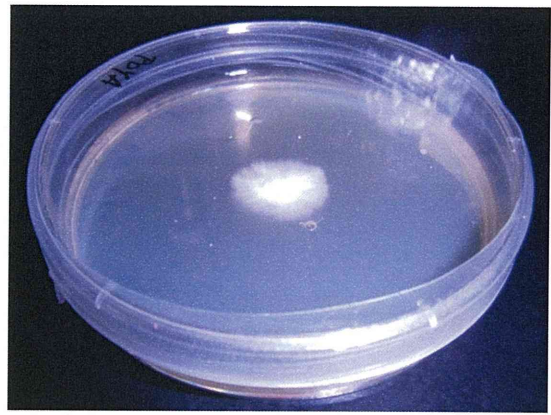


図 6. PDYA 培地(培養 3 日目)

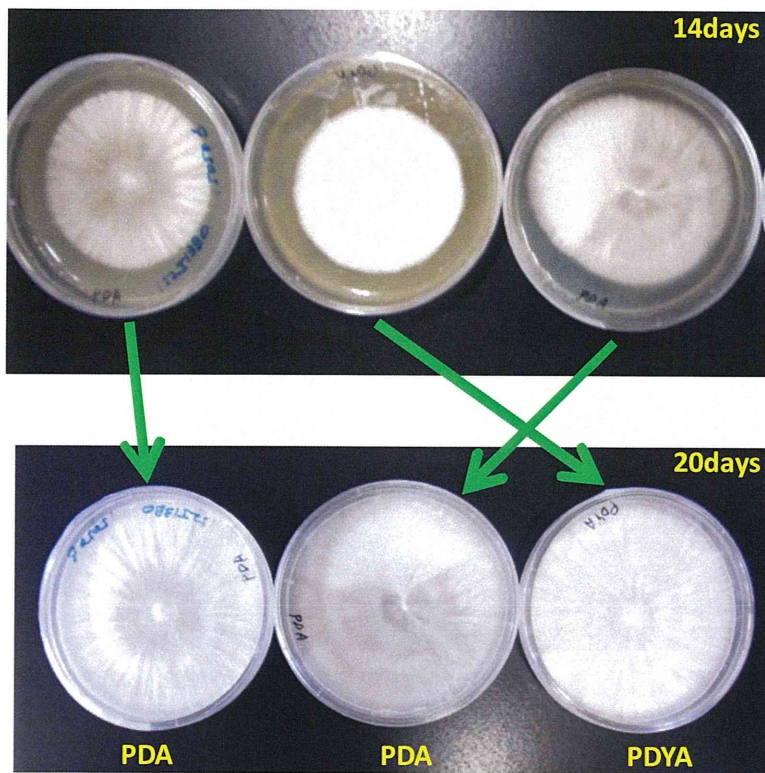


図 7. 培養 14 日目および 20 日目の PDA および PDYA 培地



図 8. 子実体形成培地移植後 10 日目





図 9. 開放系移行後 20 日目



図 10. 図 9 の 3 日後

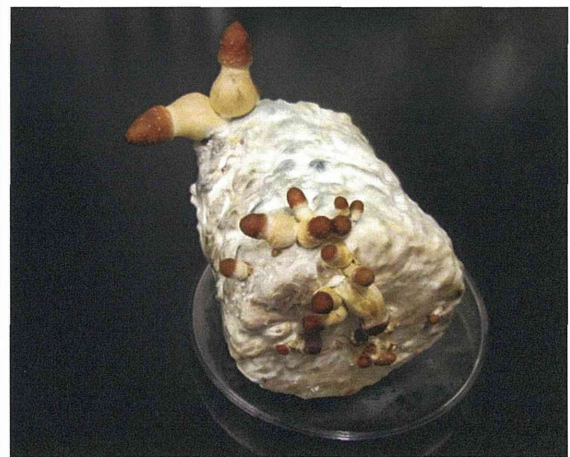


図 11. 本研究で確認された子実体

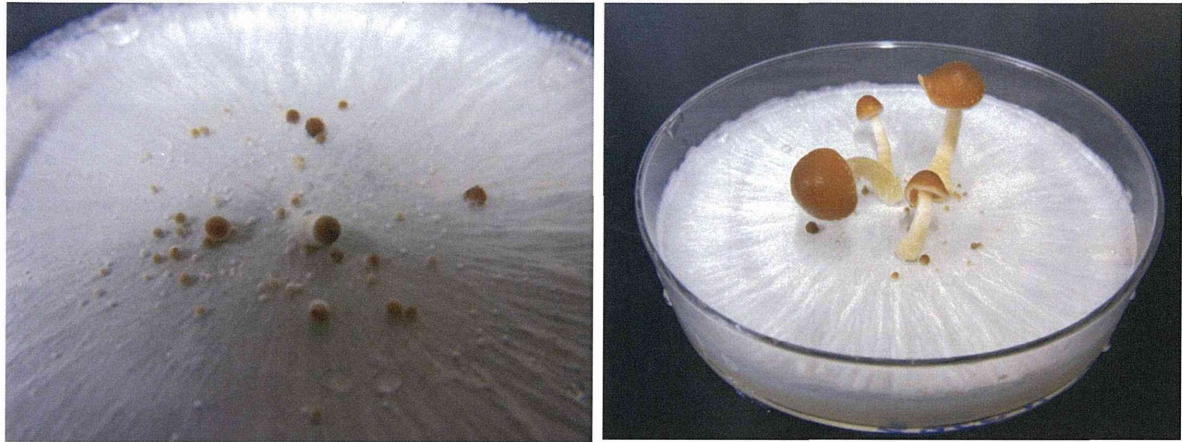


図 12. PDA 培地上で確認された子実体



図 13. 子実体柄の切断面

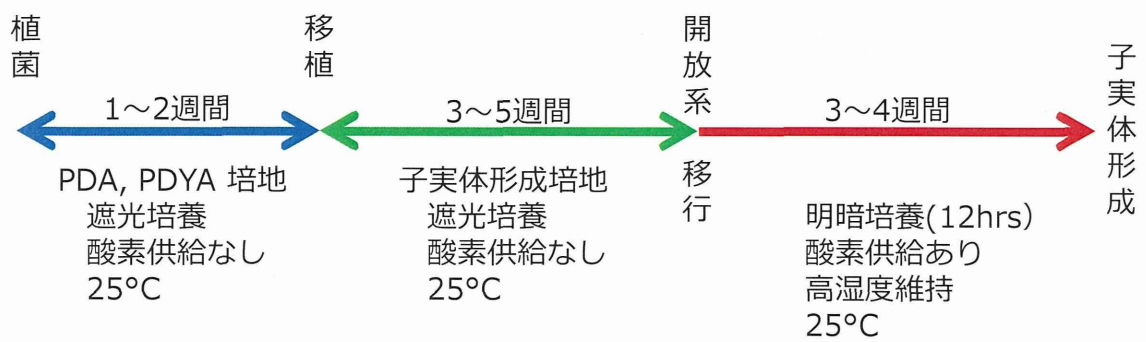
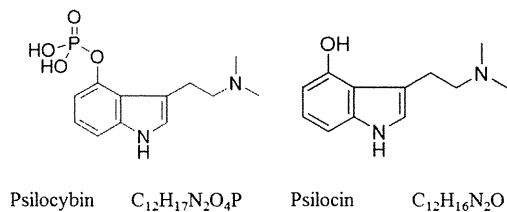


図 14. 本研究における実験スキーム

Table 1 対象化合物の構造式および LC-MS/MS MRM 分析条件



| Compounds  | Retention time (min) | MRM        | Detection limits (ng/mL) | Liner ranges |                | Precision (% , n=3) |     |             | Accuracy (% , n=3) |      |             |
|------------|----------------------|------------|--------------------------|--------------|----------------|---------------------|-----|-------------|--------------------|------|-------------|
|            |                      |            |                          | ng/mL        | r <sup>2</sup> | 1                   | 10  | 100 (ng/mL) | 1                  | 10   | 100 (ng/mL) |
| Psilocybin | 1.6                  | 285.1>58.0 | 0.05                     | 0.5-100      | 0.997          | 2.1                 | 8.6 | 2.5         | -16.0              | -8.8 | 3.7         |
| Psilocin   | 2.3                  | 205.0>58.0 | 0.01                     | 0.05-100     | 0.998          | 10.3                | 8.4 | 5.7         | -18.0              | -1.1 | 3.1         |

Table 2 試料中のサイロシン, サイロシビン分析結果 (n=3, ±SE)

| Samples         | Psilocybin (ng/mg) | Psilocin (ng/mg) | 乾燥試料               |                  |
|-----------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|
| Samples         | Psilocybin (ng/mg) | Psilocin (ng/mg) | Psilocybin (ng/mg) | Psilocin (ng/mg) |
| 菌床-1 (fig 1)    | TR                 | ND               |                    |                  |
| 菌床-2 (fig 1)    | TR                 | TR               |                    |                  |
| 菌糸体-1 (fig 5-1) | 0.81 ± 0.26        | 0.04 ± 0.02      |                    |                  |
| 菌糸体-2 (fig 3)   | 95.31 ± 11.04      | 5.1 ± 0.5        |                    |                  |
| 子実体-1 (柄)       | 1201.5 ± 489.0     | 147.8 ± 56.0     | 6881.6 ± 329.4     | 141.1 ± 14.0     |
| 子実体-1 (カサ)      | 409.9 ± 10.0       | 68.8 ± 4.0       | 4474.0 ± 100.7     | 284.2 ± 55.4     |
| 子実体-2 (柄)       | 731.5 ± 124.0      | 99.9 ± 19.0      | 5009.5 ± 638.8     | 227.3 ± 48.3     |
| 子実体-2 (カサ)      | 445.5 ± 5.4        | 101.0 ± 3.7      | 3837.2 ± 25.9      | 3440.8 ± 318.1   |
| 子実体-3 (柄)       | -                  | -                | 2247.9 ± 310.5     | 156.9 ± 24.9     |
| 子実体-3 (カサ)      | -                  | -                | 3785.8 ± 57.2      | 2283.0 ± 225.9   |

分担研究課題:DNAを用いた法規制植物の識別法に関する研究  
研究分担者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—*Psilocybe cubensis* の LAMP 法を用いた簡易検出法の検討—

研究要旨:幻覚性キノコの簡易スクリーニング法のひとつとして、麻薬原料植物である *Psilocybe cubensis* 由来 DNA の Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)を用いた目視判定法を検討した。本実験系では電気泳動やシークエンサーなどの機器を使用せず、全工程 3 時間程度で検出が可能であることが示唆された。また、子実体(キノコ)のみならず菌糸(体)の形態であっても DNA さえ抽出可能であれば分析できる点は、分析法のひとつとして有効であると考えられた。

#### A. 研究目的

植物種特異的プライマーを用いた DNA による植物種同定法<sup>1)</sup>は、DNA の「抽出」、標的 DNA の「増幅」、その「検出」、の大きく 3 つに分類される。一般的な手法として、「増幅」には PCR 法<sup>2)</sup>、「検出」には電気泳動法があるが、いずれも装置そのものの準備や設置場所の確保、試験全体の工程の多さ、煩雑さ、というものがある。

そこで、本研究ではプライマー 4 種(PCR 法は通常 2 種)を設計し、等温(PCR 法は温度変化が必要)での標的 DNA の「増幅」が可能である Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法<sup>3)</sup>を用い、「検出」は反応溶液中の Hydroxynaphthol Blue (HNB)を用いた比色検出法<sup>4)</sup>を採用し、今回は麻薬原料植物に指定<sup>5)</sup>されているミナミシビレタケ *Psilocybe cubensis* に適用し、簡易分析法を検討したので報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 実験材料

前報<sup>6,7)</sup>で報告した *Psilocybe cubensis* 乾燥子実体および市販の“食用きのこ”シイタケ *Lentinula edodes*、ブナシメジ *Hypsizygus marmoreus*、エリン

ギ *Pleurotus eryngii*、エノキタケ *Flammulina velutipes*、マイタケ *Grifola frondosa* を使用した。

##### 2. 実験方法

###### 2-1. DNA の抽出

1. 実験材料 に示した各試料(すべて子実体乾燥物)①シイタケ 10 mg, ②ブナシメジ 10 mg, ③エリンギ 10 mg, ④エノキタケ 10 mg, ⑤マイタケ 10 mg, および⑥ミナミシビレタケ 20 mg, ⑦ミナミシビレタケ 10 mg, ⑧ミナミシビレタケ 5 mg を液体窒素で凍結させた後、MM-300 (Qiagen)により粉砕した。粉砕後、Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega)内の溶出液に溶解し、Maxwell 16 (Promega)を用い DNA を抽出・精製した。各 200  $\mu$ L を回収 DNA 溶液とした。

###### 2-2. LAMP プライマーの作成

ミナミシビレタケ *Psilocybe cubensis* の Translation elongation factor 1-alpha (*EF1-alpha*) gene (KF586480), ITS-1 (KP780435), ITS-2 (KP780435) の 3 か所を標的 DNA とし、各々 4 種類のプライマーを設計した。

PrimerExplorer V4

(<https://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>)を用い検討した。