

平成26年度

学位論文 (博士)

幻覚性植物の同定法に関する研究

平成26年12月5日提出

東京都薬用植物園

(東京都福祉保健局 健康安全研究センター

薬事環境科学部医薬品研究科 薬用植物園)

荒金 眞佐子

目 次

緒 論	1
1 法律で規制される植物と幻覚性植物	1
2 園芸植物と誤認した規制植物の不正栽培	3
2-1 ケシ	
2-2 アツミゲシ	
2-3 ハカマオニゲシ	
3 植物種の同定と分子生物学的手法	5
3-1 PCR-RFLP 法	
3-2 LAMP 法	
3-3 フローサイトメトリー	
4 幻覚性植物の同定法	6
第 1 章 ハカマオニゲシ <i>Papaver bracteatum</i> のフローサイトメトリーを使用した	
迅速同定法	13
第 1 節 研究の目的と背景	13
第 2 節 実験材料および方法	15
2-1 実験材料	
2-2 外部形態観察	
2-3 PS-ID 塩基配列の解析	

2-4	テバイン，イソテバインの成分分析	
2-5	相対的核 DNA 含量の測定	
第 3 節	実験結果	20
3-1	形態による植物学的分類	
3-2	PS-ID 塩基配列の解析	
3-3	テバイン，イソテバインの有無	
3-4	フローサイトメトリーによる <i>Oxytona</i> 節植物の同定	
第 4 節	結論および考察	28
第 2 章	ウバタマ <i>Lophophora williamsii</i> の形態，	
	メスカリン含有量および <i>trnL/trnF</i> 領域の DNA 配列による同定法	29
第 1 節	研究の目的と背景	29
第 2 節	実験材料および方法	31
2-1	実験材料	
2-2	形態観察	
2-3	メスカリンの定量	
2-4	<i>trnL/trnF</i> 領域の DNA 配列の解析	
2-5	PCR-RFLP 法	
2-6	LAMP 法	
第 3 節	実験結果	38
3-1	ロフォフォラ属植物の形態による同定	

3-2	メスカリンの定量	
3-3	<i>trnL/trnF</i> 領域の DNA 配列の解析	
3-4	PCR-RFLP 法	
3-5	LAMP 法	
第 4 節	結論および考察	49
第 3 章	ハルマラ <i>Peganum Harmala</i> の同定と ハルマリンおよび ハルミン	
	含有量について	51
第 1 節	研究の目的と背景	51
第 2 節	実験材料および方法	52
2-1	実験材料	
2-2	形態観察	
2-3	ハルマリンおよび ハルミンの定量	
第 3 節	実験結果	55
3-1	種子の形態	
3-2	植物体の形態観察による同定	
3-3	ハルマリンおよび ハルミンの定量	
第 4 節	結論および考察	64
総 括		65
引用文献		68

謝 辭	75
英文要旨	78

緒 論

1 法律で規制される植物と幻覚性植物

植物には、薬物規制関連法により栽培や所持、販売等が規制されているものがある。国内の植物を規制する主な薬物規制関連法としては、「あへん法」、「麻薬及び向精神薬取締法」、「大麻取締法」および「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（旧薬事法）」があり、それぞれの対象について取締りが行われている。また、国際的な乱用を防止するための主な規範としては、麻薬、あへん、大麻などを包括的に対象物とした「麻薬に関する単一条約 Single Convention on Narcotic Drugs, 単一条約, 1961 年」と、幻覚剤、覚醒剤、鎮痛剤、精神安定剤などを対象物質にした「向精神薬に関する条約 Convention on Psychotropic Substances, 向精神薬条約, 1971 年」、麻薬原料物質を対象物質とした「麻薬及び向精神薬の不正取引の防止に関する国際連合条約 United Nations Convention against Illicit Traffic Narcotic Drugs and Psychotropic Substances, 麻薬新条約, 1988 年」がある。日本はこのいずれの条約についても批准している [1,2]。

麻薬成分や幻覚成分を含んでいるため、日本の薬物規制関連法で規制されている植物は、以下の 8 種である(図 1, 図 2)。

- ・あへん法（1954 年制定）

ケシ *Papaver somniferum*, アツミゲシ *Papaver setigerum*（モルヒネ等を含有）

- ・麻薬及び向精神薬取締法（麻薬原料植物）(1953 年制定)

※ 平成 2 年 8 月 25 日、「麻薬取締法」から題名改正

ハカマオニゲシ *Papaver bracteatum*（テバインを含有）

コカ *Erythroxylon coca*（コカインを含有）

ジャワコカ *Erythroxylon novogranatense*（コカインを含有）

サイロシビン・サイロシン及びその塩類を含むきのこ類

（マジックマッシュルーム：幻覚作用を起こすきのこの俗称）

- ・大麻取締法 (1948 年制定)

大麻草 (アサ) *Cannabis sativa* (テトラヒドロカンナビノール(THC)を含有)

- ・医薬品, 医療機器等の品質, 有効性及び安全性の確保等に関する法律 (指定薬物)
(1960 年制定) ※ 平成 26 年 11 月 25 日, 「薬事法」から題名改正

サルビア・ディビノラム *Salvia divinorum* (サルビノリン A を含有)

マジックマッシュルーム以外は, 各法律の条文に植物種が規定されているため, 取締りや行政処分のための科学的根拠として植物種の同定が重要である. しかし, これらは規制されていない同じ仲間の植物とよく似ているため, 植物の特徴を詳しく調査して, 正しく見分ける必要がある.

向精神作用を有する幻覚性植物は, 古来より様々な目的で用いられてきた. それらに含まれる催幻覚物質は, 脳内のレセプターを活性化し, そこから放出される内因性物質が CB1 受容体に作用し, 神経伝達物質の放出が抑制されるという逆行性シナプス伝達調節メカニズムが明らかにされている. また, 精神依存性や神経細胞毒性を有するという報告がある[3]. 精神刺激薬は中枢神経系を活性化させる薬物の総称で, コカイン, ニコチン, カフェインが知られている. 心拍や呼吸が増加し, 慢性的な使用により統合失調症様の精神病を呈する. 抑制薬は中枢神経系を抑制する作用を持ち, ヘロイン, あへん, モルヒネといったオピオイド系薬物や大麻が知られている. 鎮痛作用が強いが, 抗不安作用も生じ易く, 過量服薬すると呼吸中枢を抑制し, 死亡することがある.

比較的よく知られている幻覚性植物には, 麻薬であるメスカリンを含有するペヨーテと呼ばれる球形サボテンがある (図 3). 本植物はウバタマ *Lophophora williamsii* であり, 米国, メキシコでは, 民族儀式に用いる以外, 栽培, 販売, 使用, 所持が禁じられている規制植物であり, 催幻覚薬物として欧米の多くの国が何らかの形で規制している [4]. しかし, 日本国内での植物規制は未だなく, 類似した球形サボテンも含めて流通しているのが現状である. 国内に「危険ドラッグ」のような幻覚作用を求める薬物乱用者も増えてきたことから, その規制を考慮すると, 分類学上の根拠が必要で, 同時に同定, 鑑別法も必要となる.

また, 民族薬として用いられる植物のなかには, 幻覚性植物もあるが, 多くの植物は日本国内では規制されていない. これまで, ある特殊な地域, 国, 民族での使用に限定され

ており、国内では周知されていない植物であっても、インターネット等で海外の薬物情報が簡単に入手できるようになった現在、個人輸入等で国内に流入する可能性は十分あるものである。その代表的なものが、ハルマラ *Peganum harmala*、カート *Catha edulis*、モーニンググローリー *Ipomoea tricolor*、サンペドロ *Echinopsis (Trichocereus) pachanoi* などである(図3)。これらの幻覚性植物の中でも、ハルマラについては、催幻覚物質としてハルマリン等がすでに明らかにされている。しかしその一方で、ハルマラはこれまで国内に導入された経緯がないことから、形態その他の植物の詳細についての報告がなく、薬物規制関連法で規制する場合に大きな障害となっている。

2 園芸植物と誤認した規制植物の不正栽培

法律で規制されている植物とよく似ていて、間違いやすい植物の中には、園芸植物として広く流通しているものが多く、誤認される可能性が高いため、特に注意が必要である。園芸愛好家などが、国内で栽培してはいけない植物であるという知識がないため、不正栽培をしてしまうケースが多い。中でもケシは、モルヒネ等の麻薬を含み、国内で栽培等が規制されているが、海外では規制が緩やかなため、多くの観賞用の園芸品種が改良され(図4)、海外で流通している。また、アツミゲシについては、ケシと同様にモルヒネ等の麻薬を含むため、あへん法で栽培等が規制されているが、繁殖力が強く、空き地などに野生化していて、しばしば取締りの対象になっている(図4)。また、花が美しいため、種子を採って自宅の庭で栽培した例や、種子を近所に配った事例があった。平成23年から25年までのケシ、アツミゲシ、ハカマオニゲシの発見除去数の内訳は表1のとおりである。

表1. 東京都におけるケシ・アツミゲシ・ハカマオニゲシの発見除去数

	本数(本)			
	ケシ	アツミゲシ	ハカマオニゲシ	ケシ類合計
平成23年	37	20,999	31	21,067
平成24年	1,419	21,231	0	22,650
平成25年	172	15,358	1	15,531
合 計	1,628	57,588	32	59,248

2-1 ケシ

ケシ（ソムニフェルム種）*Papaver somniferum* (図 1) は、医薬品原料として重要な薬用植物である。インドから小アジアにかけての西アジア原産とされる 1 年草 [5,6] で、ヨーロッパ等で品種改良されたケシの園芸品種には、花の色がより鮮やかなものや、八重咲きなど様々な品種がある (図 4)。観賞用のケシについては、園芸愛好家が海外からケシの種子を購入し、規制されているケシとは知らずに、自宅等で栽培したという不正栽培が後を絶たない (図 4)。また、栽培農家や種苗業者の中にも、規制されているとは知らずに、生産・販売をしたというケースがある。

2-2 アツミゲシ

アツミゲシ（セティゲルム種）*Papaver setigerum* (図 1) の和名は、1964 年に愛知県渥美半島の沿岸部において、日本への帰化が発見されたことに由来している。南ヨーロッパや東ヨーロッパ、北アフリカなどの地中海沿岸域原産の 1 年草で [5,6]、世界各地に帰化している。日本の市街地にも帰化しており (図 4)、河原や荒地、畑などに大量に自生して、しばしば取締りの対象となっている。平成 25 年には、東京都内で約 15,000 本のアツミゲシが発見され、東京都の麻薬取締員や警察官が抜去処分を行っている (表 1)。園芸愛好家の多い日本であるが、国内での栽培禁止はそれほど周知されておらず、自生していた花が美しかったので栽培していたという事例も多い。

2-3 ハカマオニゲシ

欧米ではハカマオニゲシはケシと同様、観賞用としてガーデニングに用いられる植物であり、国内の園芸愛好家が海外から種子を購入している可能性は十分考えられる。しかし表 1 に示すように、その除去数は極めて少ない。

ハカマオニゲシ *Papaver bracteatum* (図 1) は、全草（特にさく果・根）に麻薬成分のテバインを含有し、「麻薬及び向精神薬取締法」によって、栽培が禁止されている。草丈 70～100 cm になる多年草で、花は大きな深紅色、通常花の下部に苞葉を持つ [5,6]。一方、オニゲシ *Papaver orientale* および *P. pseudo-orientale* (仮称ニセオニゲシ、以下ニセオニゲシ) は、観賞用として広く栽培される多年草である。オニゲシの基本種は花色が橙色であるが、近年、オリエンタルポピーと呼ばれる園芸品種が多数出回っており、それらの花の色は、赤色、橙色、桃色、白色など様々である。中にはハカマオニゲシのように花の下部に

苞葉をつけるものもあり，ハカマオニゲシと区別が困難になっている．

平成 23 年 5 月に，オリエンタルポピーと称して，ハカマオニゲシの苗が東京都内および国内各地の量販店やインターネットを通じて販売され，全国的に流通した事例があった．これらは，種苗会社が海外から輸入した種子を育成して販売したものであるが，幼苗期の形態ではハカマオニゲシとオニゲシの区別が困難であったため，誤認されて流通したものであった．

この事例により取締りのための鑑別が急務となり，本研究においてハカマオニゲシの同定法についての検討を行った．

3 植物種の同定と分子生物学的手法

20 世紀後半から，植物分類学の研究のために分子 (DNA) 情報が頻繁に利用されるようになった．核のリボゾーム RNA あるいは葉緑体 DNA のような特定の DNA 領域の塩基配列は，系統発生および種の決定に使用されている [7-9]．分子生物学的手法としては，RAPD 法，ARMS 法，PCR-RFLP 法，AFLP 法，LAMP 法，フローサイトメトリーなどがある．

3-1 PCR-RFLP 法

制限酵素切断断片長多型法 (restriction fragment length polymorphism ; RFLP) は，DNA 塩基配列の違いを，制限酵素処理によって生じる断片の長さの違いに基づいて検出する方法である [10-12]．制限酵素は 2 本鎖 DNA の特定の塩基配列を認識し，特定の位置で切断する．そこに，たとえ一つの塩基でも違っていたり，変異したりすれば，同じ制限酵素で切断されなくなり，異なった長さの DNA 断片が生じる．RFLP を用いた分析は，DNA 断片の遺伝分析の様々な場合に応用が可能である．

本研究では，第 2 章のウバタマの同定において，*trnL/trnF* 領域の塩基配列から，制限酵素による PCR-RFLP 法を用いた同定を行った．

3-2 LAMP 法

LAMP 法 (loop-mediated isothermal amplification) は，迅速，簡易，精確な遺伝子増幅法で，標的遺伝子の配列から，6 個の領域を選んで，組み合わせた 4 種類のプライマーを用いて，鎖置換反応を利用して遺伝子を増幅させることによる検出法である [13-15]．プライマーの設計によって，最初の増幅産物のプライマー結合部位にループ構造を生じるようにする

ことにより、鎖置換活性の高い特殊な DNA 合成酵素は、進行方向にある 2 本鎖 DNA を解離しながら自らの伸長反応を進めていき、最終的には元の標的配列の約整数倍の長さの増幅産物が約 1 時間の 65°C の反応で蓄積する。増幅効率が高いことから DNA を 15 分～1 時間で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍に増幅することができる。極めて高い特異性から、増幅産物の有無で目的とする標的遺伝子配列の有無を判定することができるため、マイコプラズマ感染症の検査として実用化されているが、植物での応用例は少ない [16]。

本研究では、第 2 章のウバタマの同定において、*trnL/trnF* 領域の塩基配列から設計したプライマーを用いた LAMP 法による検出法を検討した。

3-3 フローサイトメトリー

フローサイトメトリー (flow cytometry) は、分子生物学をはじめ病理学、免疫学、海洋生物学などで用いられている。植物による適用においては、標識した DNA 量を測定することにより倍数性の特定が可能である [17]。1983 年、Galbraith らによって、植物組織を染色液中でカミソリを使って細かく切断(chopping) するという簡便な方法 [18] が紹介されてからは、植物の DNA 含量を比較・測定する手段として、植物育種などの応用分野で広く受け入れられるようになった。従来の根端による染色体数の測定に代わる方法として、植物育種における倍数体や半数体、さらには異数体の作出などにきわめて有効な手段となり得る手法である。また、雌雄異株植物において、X、Y 染色体のサイズの違い、すなわち DNA 含量の差に基づくピーク位置の微妙な違いにより、雌雄性の判別が可能であるという報告もある [19]。

本研究では、第 1 章のハカマオニゲシの同定に際して、園芸植物のオニゲシとの染色体数の差異に着目し、フローサイトメトリーによる同定法を検討した。

4 幻覚性植物の同定法

近年、「合法ハーブ」「合法ドラッグ」などと称して販売されている薬物が社会問題となっている (図 5)。それらの危険な薬物を規制するために、「薬事法」の改正により、平成 26 年 4 月から法で規定する「指定薬物」は、麻薬や覚醒剤と同様に、製造・販売だけでなく、個人の所持・使用も「違法」となり、処罰の対象となった。

東京都では「東京都薬物の濫用防止に関する条例」の改正により、条例で規定する「知

事指定薬物」についても、麻薬や覚醒剤と同様に「違法」となり、処罰の対象となった。他の自治体でも同様の条例の制定を行っているところがある。

平成 26 年 7 月 22 日に、厚生労働省および警察庁がこれらの薬物を「危険ドラッグ」と改称して、国民に広く呼びかけ、規制を強化している。それに伴い、行政機関では「危険ドラッグ」などに結びつく規制物や有毒植物等の種の同定が求められている。そのなかでも、麻薬原料植物や幻覚性植物の同定、鑑別には科学的根拠を持って、より正確・迅速にできていかななくてはならない (図 5)。そこで従来の同定方法である個体の形態的・生態的特徴に加えて、実体顕微鏡および走査型電子顕微鏡 (以下, SEM) 等を用いて微細な外部形態を観察するとともに、麻薬成分等の含有成分について分析し、合わせて DNA 情報による植物同定法についての研究が必要となっている。

本研究では、規制植物や幻覚性植物について、同定法に関する研究を行った。種の同定法については、植物形態観察および SEM を用いた微細構造観察による形態学的同定法、フローサイトメトリーを応用した相対的核 DNA 含量による同定法および *trnL/trnF* 領域の DNA 塩基配列による分子生物学的同定法、含有成分の成分分析について検討した。これらの同定法により、これまで開花株等の生殖成長期の植物でしか行えなかった植物種の同定が、葉片や花の無い栄養成長期の植物でも可能となった。

研究を行うに当たり、植物はハカマオニゲシ *Papaver bracteatum* とその関連植物、ウバタマ *Lophophora williamsii* とその関連植物、ハルマラ *Peganum harmala* を用いた。

ハカマオニゲシは、「麻薬及び向精神薬取締法」により、その所持や栽培等が規制されているが、園芸植物として広く普及しているオニゲシ類との判別が困難である。また、ウバタマは麻薬成分であるメスカリンを含有するが、日本国内では栽培についての規制がなく、これまで正確な分類に基づいた同定法の報告がなかった。ハルマラは植物系ドラッグに用いられた植物種子で、原料植物はハルマラ *Peganum harmala* と言われているが、ハルマラはこれまで国内に導入された経緯がなく、植物の詳細についての報告がなかったため、海外から導入したハルマラの種子を育成し、形態による同定を行い、成分分析を実施した。

それぞれに最も適した同定法を開発するために、DNA 解析、形態観察、成分分析を組み合わせた同定法を検討した。その結果、3 種の幻覚性植物の成熟した植物体のみならず、幼植物や葉片、種子等でも同定が可能となり、薬物指導取締行政に貢献することが可能となった。



図 1. 国内薬物規制関連法で規制される植物 I

A: ケシ (一貫種) *Papaver somniferum*, B: アツミゲシ *Papaver setigerum*, C :
ハカマオニゲシ *Papaver bracteatum*, D : 大麻草 (アサ) *Cannabis sativa*

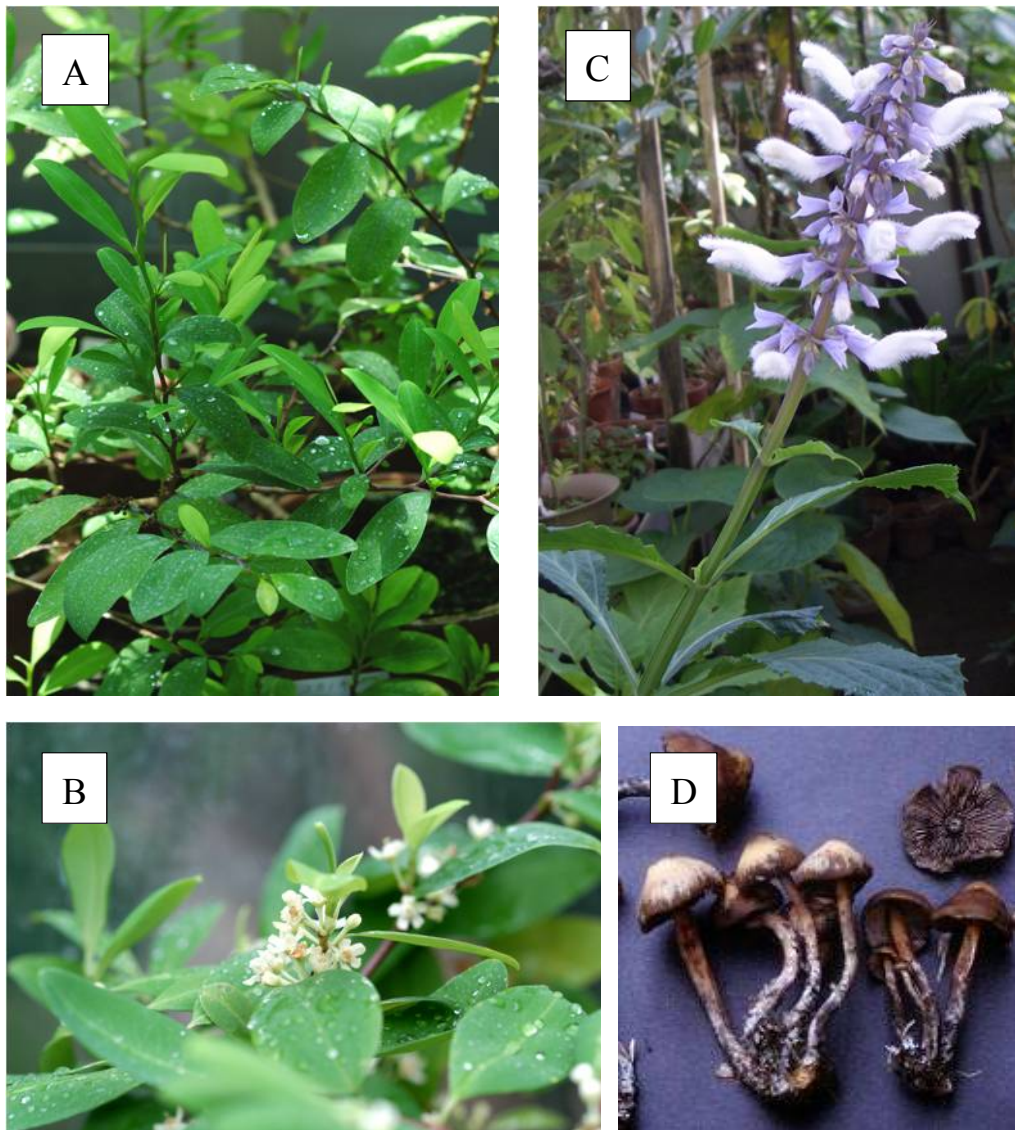


図 2. 国内薬物規制関連法で規制される植物 II

A : コカ *Erythroxylon coca*, B : ジャワコカ *Erythroxylon novogranatense*, C :
サルビア・ディビノラム *Salvia divinorum*, D : マジックマッシュルームの一
種 (アイゾメヒカゲタケ *Copelandia cyanescens*)

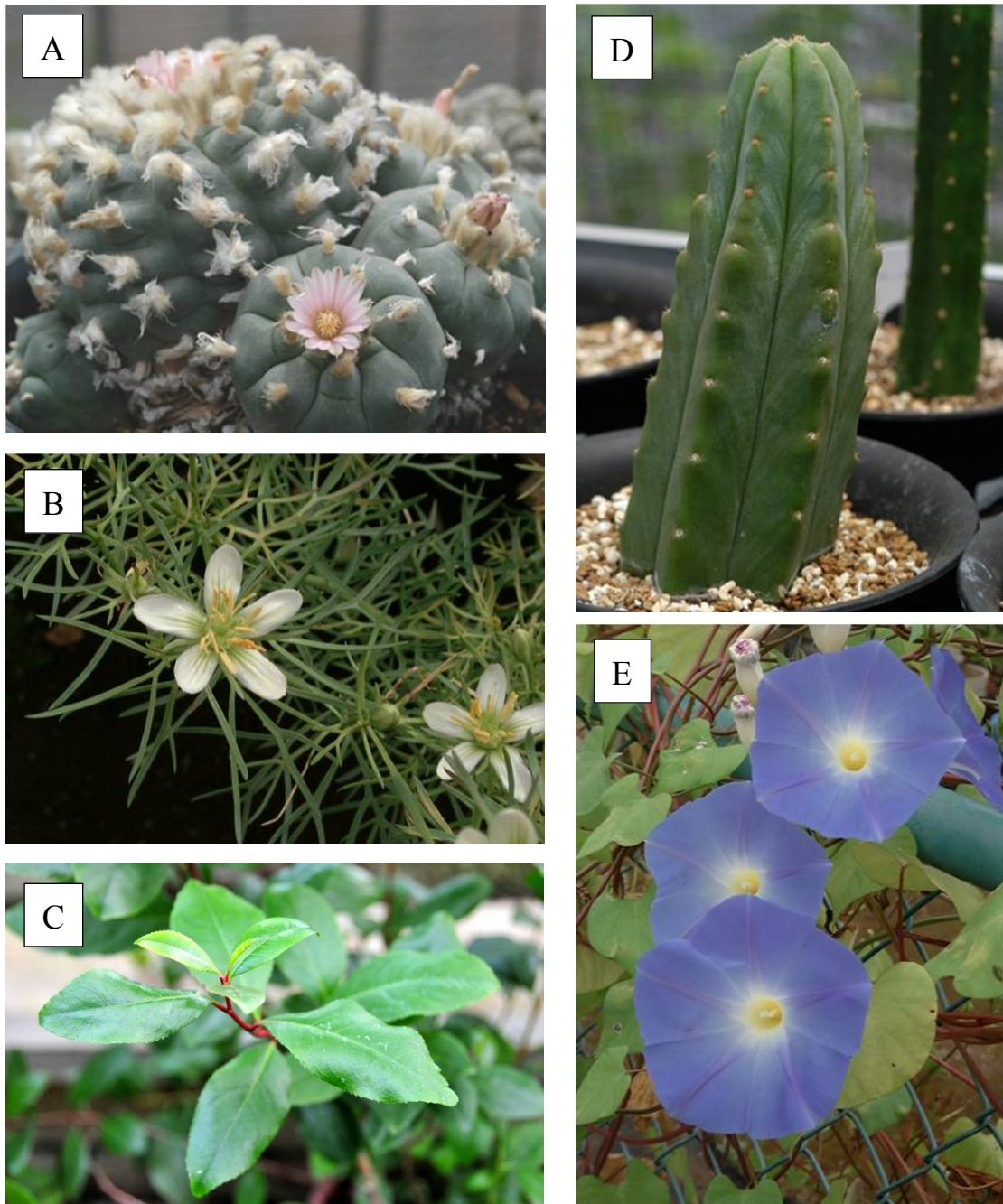


図 3. 東京都薬用植物園で植栽している幻覚性植物

A : ウバタマ *Lophophora williamsii*, B : ハルマラ *Peganum harmala*, C : カート *Catha edulis*, D : サンペドロ *Echinopsis pachanoi* (旧名 *Trichocereus pachanoi*) , E : モーニンググローリー *Ipomoea tricolor* cv. *Heavenly Blue*



図 4. ケシ園芸品種およびアツミゲシの不正栽培

A：東京都薬用植物園で植栽しているケシ園芸品種 *Papaver somniferum*，B：ケシ園芸品種 *P. somniferum* の東京都内における不正栽培，C：アツミゲシ *P. setigerum* の東京都内における発見事例，D：ケシ園芸品種 *P. somniferum* の不正栽培事例．

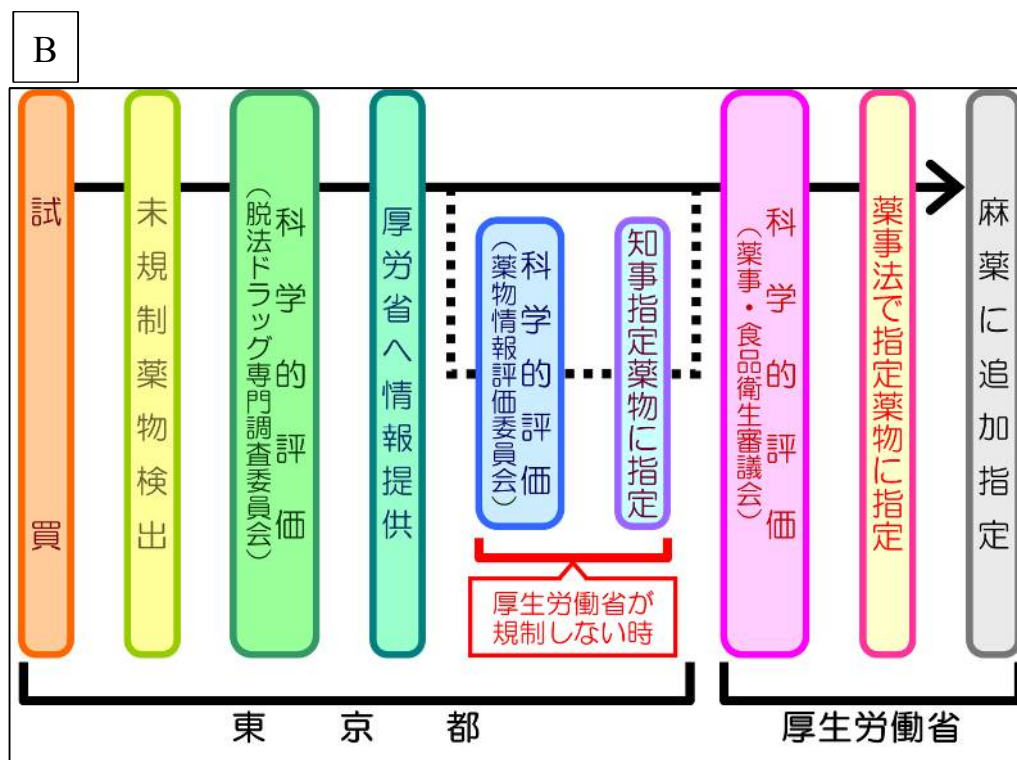


図 5. 東京都内で販売された危険ドラッグと薬物乱用対策

A：東京都内で販売された危険ドラッグ，B：東京都と厚生労働省の未規制薬物発見から規制までの流れ

第1章 ハカマオニゲシ *Papaver bracteatum* の

フローサイトメトリーを使用した迅速同定法

第1節 研究の目的と背景

ハカマオニゲシ *P. bracteatum* Lindl. は、多くの国で観賞用植物として栽培されている。しかし、日本国内では麻薬成分のテバイン thebaine を含むため、平成2年6月19日付けの「麻薬及び向精神薬取締法」の改正に伴い麻薬原料植物に指定され、許可のない栽培・所持等が禁止されている [1]。

植物学的には、ハカマオニゲシはパパヴェル *Papaver* 属 オキシトーナ *Oxytona* 節に属している。オキシトーナ節は、麻薬原料植物であるハカマオニゲシ ($2n=2x=14$) と、規制されていないオニゲシ *P. orientale* L. ($2n=2x=28$) および *P. pseudo-orientale* (Fedde) Medw. ($2n=2x=42$) (仮称ニセオニゲシ、以下ニセオニゲシ) の3種である [2, 3]。オニゲシとニセオニゲシの2種については栽培等の規制がないため、国内で流通・栽培されており、不栽培を取り締まる上でハカマオニゲシを識別する必要がある。しかし、オキシトーナ節植物の3種は、それぞれの形態的性状が酷似しているため、識別が難しく、特に開花をしていない栄養成長期の植物体の同定は非常に困難で、規制植物を誤認する懸念がある。

以上のことから、ハカマオニゲシと他2種とを、明らかに同定する方法を開発することが急務となった。

法律改正 [1] から3年後の平成5年に、窪田らが、園芸用に植栽されたオキシトーナ節植物の調査を行い、一般家庭にハカマオニゲシが植栽されていたことを明らかにした [4]。近年になり、平成23年5月にオリエンタルポピーと称して、規制植物であるハカマオニゲシに形態が酷似した未開花の幼植物を含む苗が、東京都内および国内各地の量販店やオンラインショップを通じて多数販売された。これらの植物の一部は開花株であったため、形態的な特徴によりハカマオニゲシであることが確認されたが、その多くは未開花株であったため同定が困難であった。

そのため、本研究では、根生葉のみの栄養成長期のハカマオニゲシの迅速な同定法を開発す

ることを目的として、オキシトーナ節植物 3 種の染色体数の差異に着目し、フローサイトメトリー（以下 FCM）による「相対的核 DNA 含量」の測定を行った。FCM の結果を、植物体の外部形態調査、葉緑体 DNA *Plaastid subtype identity*（以下 PS-ID）の解析、およびテバイン *thebaine*、イソテバイン *isothebaine* の有無と比較した結果、FCM がハカマオニゲシの同定方法として有効であることが確認された。PS-ID は、葉緑体 DNA の *rpl16* 遺伝子のストップコドンから *rpl14* 遺伝子の開始コドン直前までのリンカー配列で、植物の種の同定や原材料の鑑定などに用いられており、多くの高等植物の PSID 配列は、100 塩基余りである [5]。

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料

(1) Pa-1～-12：平成23年5月に都内で流通した12個体を供試した (Table 1- I , Fig. 1-1) .

これらはいずれもオリエントアルポピーとして販売され, Pa-1～-10はオリエントアルポピー ‘ビューティーオブリバーメア’, (*P. orientale* ‘Beauty of Livermere’) と表示されて流通した. Pa-11はオリエントアルポピー ‘ロイヤルウェディング’, (*P. orientale* ‘Royal Wedding’) と表示され, Pa-12はオリエントアルポピー ‘ビクトリアルイーズ’, (*P. orientale* ‘Prinzessin Victoria Louise’) と表示されて流通した. 研究を開始した平成23年5月の時点で, Pa-3, -4, -5, -6, -8, -11, -12は未開花の根生葉のみの幼植物であったため, 開花時まで育成した. 育成時の培養土は, 赤玉土, 腐葉土, 軽石を6:3:1の割合で混合して用い, プランターまたはプラスチック鉢にて育成した. 研究開始時に Pa-1, -2, -7は開花株であった.

(2) Pa-13：(独) 医薬基盤研究所筑波薬用植物研究センターより, 平成17年4月に譲渡を受けたハカマオニゲシの系統保存株を供試した (Table 1- I , Fig. 1-1) . 平成23年5月の時点で開花株であった.

(3) Pa-14：(独) 医薬基盤研究所北海道薬用植物研究センターより, 平成23年8月に譲渡を受けたオニゲシを供試した (Table 1- I , Fig. 1-1) . 平成24年5月の時点で開花を確認した.

(4) Pa-15: Oxford Botanic Garden より, 平成14年5月に *P. orientale* として種子を導入し, 育成した系統保存株を供試した (Table 1- I , Fig. 1-1) . 平成23年5月の時点で開花株であった.

平成23年7月に枯死した Pa-7, -9を除く実験材料は, 全て東京都薬用植物園に保存されている.

2-2 外部形態観察

Pa-1～-15について, 花卉の色, 苞葉の数, 萼片の毛と蕾の形状等の外部形態観察を行い, 走査型電子顕微鏡 (日立 TM3000 以下 SEM) 下で, 萼の毛状突起および根生葉の表皮および気孔の形態を観察した. 個々の植物についてそれぞれ20個の気孔長を調査し, 平均値を求めた.

Table 1- I Plant materials used in the experiment

Plant number	Plant name at introduction	Collection time	Means of acquisition
Pa-1	Oriental poppy 'Beauty of Livermere'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-2	Oriental poppy 'Beauty of Livermere'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-3	Oriental poppy 'Beauty of Livermere'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-4	Oriental poppy 'Beauty of Livermere'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-5	Oriental poppy 'Beauty of Livermere'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-6	Oriental poppy 'Beauty of Livermere'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-7	Oriental poppy 'Beauty of Livermere'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-8	Oriental poppy 'Beauty of Livermere'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-9	Oriental poppy 'Beauty of Livermere'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-10	Oriental poppy 'Beauty of Livermere'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-11	Oriental poppy 'Royal Wedding'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-12	Oriental poppy 'Prinzessin Victoria Louise'	May, 2011	Market in the Tokyo Metropolitan area
Pa-13	<i>P. bracteatum</i>	April, 2005	RCMPR ^{a)}
Pa-14	<i>P. orientale</i>	August, 2011	RCMPR ^{b)}
Pa-15	<i>P. orientale</i>	May, 2002	UOBG ^{c)}

^{a)}Transferred from Tsukuba Division, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation.

^{b)}Transferred from Hokkaido Division, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation.

^{c)}Introduced by seed exchange from the University of Oxford Botanic Garden.

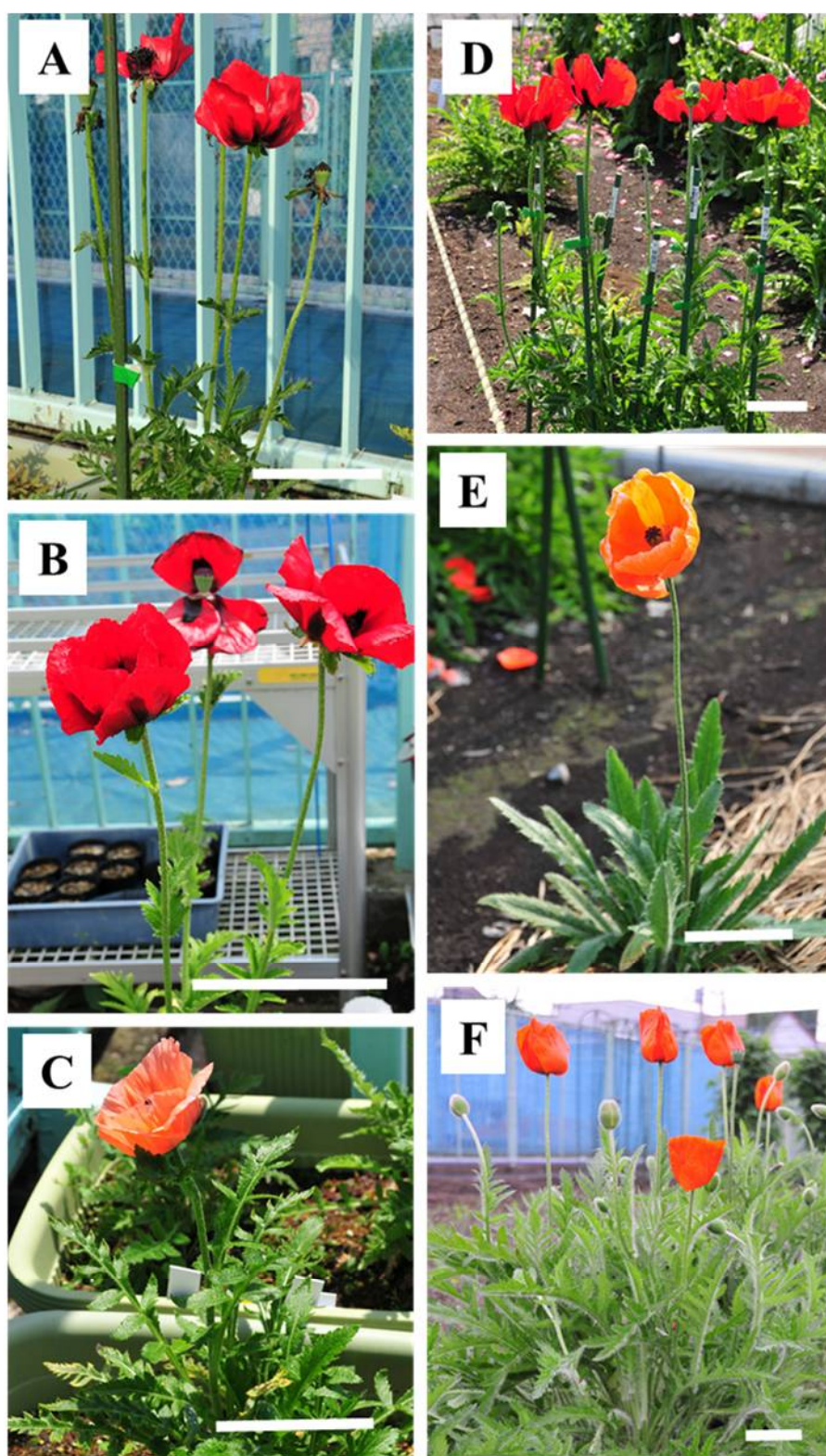


Fig. 1-1. Plant materials.

A, Pa-1; B, Pa-5; C, Pa-12; D, Pa-13; E, Pa-14; F, Pa-15. Bar = 10 cm.

Pa-3, -4, -5, -6, -8, -11, -12 は、研究開始時には未開花株であったため、薬用植物園内で育成し、平成 24 年 5 月に開花を確認した後、再度形態観察を行なった。

2-3 PS-ID 塩基配列の解析

平成 16 年に細川らがパパヴェル属植物の PS-ID 塩基配列を明らかにした実験方法 [5] に従い、Pa-1, -3, -7, -10, -11, -12, -13, -14, -15 について、PS-ID の塩基配列を解析した。

全 DNA は、新鮮葉から改変 CTAB 法により抽出し、PCR 法による PS-ID 塩基配列の増幅は以下の条件で行なった [6]。プライマー PSID5P2 及び PSIDiz3P の配列は、PSID5P2: 5'-GTAGCCGTTGTAAACCAGGTCGAATACT TTATGAAAT-3', PSIDiz3P: 5'-ACAGCAACAATAACGTC ACCAATATGAGCATATCG-3'(Fig. 2), 反応は Thermal Cycler (TP2000; TaKaRa Co.) を使用し、94℃ (1 分), 51℃ (1 分), 72℃ (2 分) を 32 サイクル後、72℃ (10 分) で行なった。9 個の植物材料の配列解析は、Genetyx Mac 遺伝情報処理ソフトウェア ver. 15.0.5 (Genetyx Corp., Tokyo) により行った。



Fig. 1-2. Primer pairs used for the determination of PSID5P2 and PSIDiz3P.

2-4 テバイン、イソテバインの成分分析

Pa-1～-15 についてテバイン、イソテバインの含有の有無を、フォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフ(LC/PDA) 及び質量分析機付高速クロマトグラフ (LC/MS) により分析した。標準品: テバインは三共(株)製, イソテバインは Apin Chemicals Ltd.製を用いた。

試料溶液の調製: 大貫らの報告 [7] に準じて調製した。200mg の生葉の重さをはかり、75%-EtOH (V/V) 8 mL を入れた乳鉢で十分すりつぶし、これを遠沈管に移し、同液 4 mL で 2 回洗いこんだ。強アンモニア水 1 mL を入れ、溶液の pH をリトマス試験紙で十分アルカリ性であることを確認した。これを 30 分間し振とうした後、遠心分離し、上澄液を 25 mL のメスフラスコに移した。残渣に同液約 5mL を加え、同じ操作をして、上澄液を合わせた。同液に

て全量 25mL とし、この一部を 0.45 μ m のフィルターに通し試験溶液とした。

LC/PDA 条件: 装置 Alliance 2696/996 (Waters 製), カラム; *L*-column 4.6 mmI.D \times 150 mm (化学物質評価研究機構製) 40 $^{\circ}$ C , 注入量; 10 μ L. 溶離液; A: H₂O : MeCN : H₃PO₄: SDS = (900 mL : 100 mL : 1 mL : 2.8 g), B: 同 (100 mL : 900 mL : 1 mL : 2.8 g), A/B= 60/40 混液, 流速; 1.0 mL/min.

PDA (200-400), UV 210 nm で解析し, 保持時間及び UV スペクトルによる定性分析を実施した。

LC/MS 条件: 装置 Acquity UPLC/TQD (Waters 製), カラム CAPCELL PAK C18 IF2, 2.1-50 mm (資生堂製), カラム温度 40 $^{\circ}$ C, 移動相及びグラジエント条件 A ギ酸で pH 3.0 とした 5 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液/アセトニトリル(19:1, V/V)混液, B 0.1%ギ酸含有アセトニトリル(LC/MS 用, (株) 和光純薬工業製), 0 \sim 0.5 min. (A/B=100:0), 0.5 \sim 6.85 min. (A/B = 100/0 \rightarrow 10/90, リニアグラジエント), 6.85 \sim 7.50 min. (A/B=0:100), 流速 0.6 mL/min., 注入量 1 μ L, イオン化法 ESI+, ソース温度 150 $^{\circ}$ C, デゾルベーション温度 450 $^{\circ}$ C, コーン電圧 20V, マスレンジ (*m/z*) 50-500. [M+H]⁺*m/z*312, 2ng.

2-5 相対的核 DNA 含量の測定

Pa-1 \sim Pa-15 について chopping 法により, FCM を行った [8] . 標準植物としてシロツメクサ *Trifolium repens* L. を使用し, シロツメクサの核 DNA 含量を 1 とし, Pa-1 \sim 16 の相対的核 DNA 含量を測定した。

FCM は, プラスチックシャーレ上に約 25 mm² の Pa-1 \sim Pa-15 の新鮮な根生葉の葉片を載せ, 核の単離・染色兼用試薬を約 1ml 加えた後, 試薬中で組織をカミソリで細かく切断し, メッシュで残渣を取り除き試験溶液とした。サンプルチューブに核の懸濁液を移し, プロイディーマナライザーCyFlow PA 型 (Partec GmbH, Germany) を用いて, 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) 蛍光強度を測定した。

核の単離・染色兼用試薬は, 10mM Tris (hydroxymethyl aminomethane), 50mM trisodium citrate dehydrate, 2mM MgCl₂ \cdot 6H₂O, 1% polyvinylpyrrolidone k-30, 0.10% Triton X-100, 2.5mg/L DAPI を混和後, pH7.5 に調整し, FCM に供試した。各々のサンプルについて, 少なくとも 5000 の核が測定され, ピークの位置は標準植物のシロツメクサと比較して表示された。

第3節 実験結果

3-1 形態による植物学的分類

オキシトーナ節植物の自生種は、苞葉の有無や花卉の色等から1～3のように分類される [2].

1. ハカマオニゲシ：花に苞葉がある．花卉は深い赤，苞葉は3～8枚，萼の剛毛は基部から広くて三角形で伏す．
2. オニゲシ：花に苞葉はない．茎上葉は3分の1より上にはない．蕾は下を向いて，花卉は普通斑紋がないか，薄い紫か白である．
3. ニセオニゲシ・タイプA：花に苞葉がある．花卉はオレンジ色，苞葉は1—4，萼の剛毛は貧弱で，やや開出する．

ニセオニゲシ・タイプB：花に苞葉はなく，茎上葉は3分の1より上にある．蕾は直立しているか下を向く．花卉は普通広い長方形の黒い斑紋を持つか，場合によっては無い．

Table 1-II に Pa-1～-15 の外部形態を示し，Table 1-III に1～3により鑑別した結果を示した．Pa-1～-10, -13 の花卉は深赤で，4～7枚の苞葉があり，蕾は直立し，萼の剛毛は基部から伏せていたため，1 のハカマオニゲシ形態と一致した．Pa-11, -12, -15 は苞葉がなく，茎上葉は3分の1よりも上にあり，Pa-11 の蕾は直立，Pa-12, -15 の蕾は下を向いていたため，3 のニセオニゲシ・タイプB の外部形態と一致した．Pa-11 の花卉は白色，Pa-12 は薄いオレンジ色，Pa-15 の花卉はオレンジ色であった．Pa-15 はオニゲシ *P. orientale* として種子を導入したが，茎上葉は3分の1よりも上にあったため，3 のニセオニゲシ・タイプB と判定した．Pa-14 は苞葉がなく，茎上葉は3分の1より上にはなく，蕾は下を向いて，花卉は斑紋がなく薄いオレンジであったため，2 のオニゲシの外部形態と一致した (Table 1-II, 1-III) ．

Fig. 1-3 に SEM による Pa-1, -13, -14, -15 の萼の毛状突起の形態を示した．Pa-1 および Pa-13 の毛状突起は三角形で伏せており (Fig. 1-3- A, B)，1 の形態と一致した．Pa-2～-10 の萼の毛状突起の形状は，Pa-13 と同様に三角形で伏せていたため，1 のハカマオニゲシの形態と一致した．Pa-14 は細く長く開出し (Fig. 1-3 - C)，Pa-15 は毛状突起の基部が膨らみ，開出し (Fig. 1-3 - D)．Pa-11, -12 は Pa-15 と同様に毛状突起が開出したため，3 のニセオニゲシの形態と一致した．

Fig. 1-4 に SEM による Pa-1, -13, -14, -15 の根生葉の表皮と気孔の形態を示した. Goldblatt によるとハカマオニゲシの気孔長は $20 - 32 \mu\text{m}$, オニゲシは $32 - 45 \mu\text{m}$, *P. ニセオニゲシ* は $43 - 60 \mu\text{m}$ とされている [2]. Pa-13 の気孔長は $28.7 \mu\text{m}$, Pa-1 は $31.3 \mu\text{m}$, Pa-2~-10 は平均 $32.0 \mu\text{m}$ であったため, ハカマオニゲシの気孔長と一致した. Pa-14 が $34.8 \mu\text{m}$ でオニゲシの気孔長と, Pa-15 が $48.7 \mu\text{m}$ でニセオニゲシの気孔長と一致した. Pa-11, -12 は, Pa-11 が $39.5 \mu\text{m}$, Pa-12 が $34.7 \mu\text{m}$ でオニゲシの気孔長と一致し, 外部形態での同定結果とは一致しなかった.

3-2 PS-ID 塩基配列の解析

Pa-1, -3, -7, -10, -11~-15 の 9 個の植物材料の PS-ID 配列について, 細川 ら [5] が明らかにしたハカマオニゲシ, オニゲシ, ニセオニゲシの塩基配列と比較した (Fig. 1-5.). その結果, Pa-1, -3, -7, -10, -13 の塩基配列は, ハカマオニゲシの塩基配列と一致し, Pa-14 は オニゲシの塩基配列と一致した. また, Pa-11, -12, -15 はニセオニゲシの塩基配列と一致した. この結果は, 外部形態による同定結果と同一であった (Table 1-III).

3-3 テバイン, イソテバインの有無

Table 1-III に Pa-1~-15 のテバイン, イソテバインの有無を示した. Milo ら [3] と Sariyar [9] によると, 主要なアルカロイドについては, ハカマオニゲシは テバイン, オニゲシはオリパビン, ニセオニゲシはイソテバインを含有しているとしている. 本研究では, テバインを検出したのは, Pa-1~-11, -13, -14 で, いずれもイソテバインは検出しなかった. Pa-12 はテバインを検出せず, イソテバインを検出した. Pa-11 は, 外部形態と PS-ID によりハカマオニゲシではなくニセオニゲシと同定されたが, イソテバインを検出せず, テバインを検出した.

3-4 FCM によるオキシトーナ節植物の同定

Pa-1, -5, -12, -13~-15 の FCM の結果を Fig. 6 に, 相対的核 DNA 含量を Table 1-III に示した. 外部形態, PS-ID によりハカマオニゲシと鑑別された Pa-13 の相対的核 DNA 含量は 2.12 であった. Pa-1~-10 の相対的核 DNA 含量は 2.10~2.19 で, この値は Pa-13 の 2.12 と近似していたため, ハカマオニゲシと判別された. 外部形態, PS-ID によりオニゲシと鑑定された Pa-14 は 3.62, ニセオニゲシと判定された Pa-15 は 5.72 であった. Pa-11 は 5.58, Pa-12 は 5.56 で, この値は Pa-15 の 5.72 と近似していたためニセオニゲシと判定された (Table 1-III). この結果は, 外部形態と PS-ID による同定結果と一致した.

Table 1-II Morphological characteristics of plant materials

Plant number	Color of Petals	Number of bracts	Bristles of calyx	Buds	Color of marks of petals	Color of pollen	Number of petals
Pa-1 ^{a)}	Dark red	5	Non erect	Erect	Dark purple	Dark purple	5
Pa-2 ^{a)}	Dark red	6	Non erect	Erect	Dark purple	Dark purple	6
Pa-3 ^{b)}	Dark red	6	Non erect	Erect	Dark purple	Dark purple	6
Pa-4 ^{b)}	Dark red	7	Non erect	Erect	Dark purple	Dark purple	6
Pa-5 ^{b)}	Dark red	5	Non erect	Erect	Dark purple	Dark purple	5
Pa-6 ^{b)}	Dark red	5	Non erect	Erect	Dark purple	Dark purple	5
Pa-7 ^{a)}	Dark red	4	Non erect	Erect	Dark purple	Dark purple	4
Pa-8 ^{b)}	Dark red	4	Non erect	Erect	Dark purple	Dark purple	5
Pa-9 ^{a)}	Dark red	5	Non erect	Erect	Dark purple	Dark purple	4
Pa-10 ^{a)}	Dark red	5	Non erect	Erect	Dark purple	Dark purple	6
Pa-11 ^{b)}	White	0	Subpatent	Erect	Unmarked	Dark purple	6
Pa-12 ^{b)}	Pale orange	0	Subpatent	Droop	Black	Dark purple	6
Pa-13 ^{a)}	Dark red	5	Non erect	Erect	Dark purple	Dark purple	5
Pa-14 ^{b)}	Pale orange	0	Subpatent	Droop	Unmarked	Gray	4
Pa-15 ^{a)}	Deep orange	0	Subpatent	Droop	Unmarked	Dark purple	4

^{a)}Confirmed flowering in May, 2011.

^{b)}Confirmed flowering in May, 2012.

Table 1-III Species identification of plant materials by morphology, PS-ID, thebaine and isothebaine content, and relative nuclear DNA

Plant number	Morphology	PS-ID	Thebaine	Isothebaine	Relative nuclear DNA content
Pa-1	<i>P. bracteatum</i>	<i>P. bracteatum</i>	+	-	2.10
Pa-2	<i>P. bracteatum</i>	-	+	-	2.17
Pa-3	<i>P. bracteatum</i>	<i>P. bracteatum</i>	+	-	2.17
Pa-4	<i>P. bracteatum</i>	-	+	-	2.16
Pa-5	<i>P. bracteatum</i>	-	+	-	2.13
Pa-6	<i>P. bracteatum</i>	-	+	-	2.19
Pa-7	<i>P. bracteatum</i>	<i>P. bracteatum</i>	+	-	2.17
Pa-8	<i>P. bracteatum</i>	-	+	-	2.15
Pa-9	<i>P. bracteatum</i>	-	+	-	2.13
Pa-10	<i>P. bracteatum</i>	<i>P. bracteatum</i>	+	-	2.16
Pa-11	<i>P. pseudo-orientale</i>	<i>P. pseudo-orientale</i>	+	-	5.58
Pa-12	<i>P. pseudo-orientale</i>	<i>P. pseudo-orientale</i>	-	+	5.56
Pa-13	<i>P. bracteatum</i>	<i>P. bracteatum</i>	+	-	2.12
Pa-14	<i>P. orientale</i>	<i>P. orientale</i>	+	-	3.62
Pa-15	<i>P. pseudo-orientale</i>	<i>P. pseudo-orientale</i>	-	+	5.72

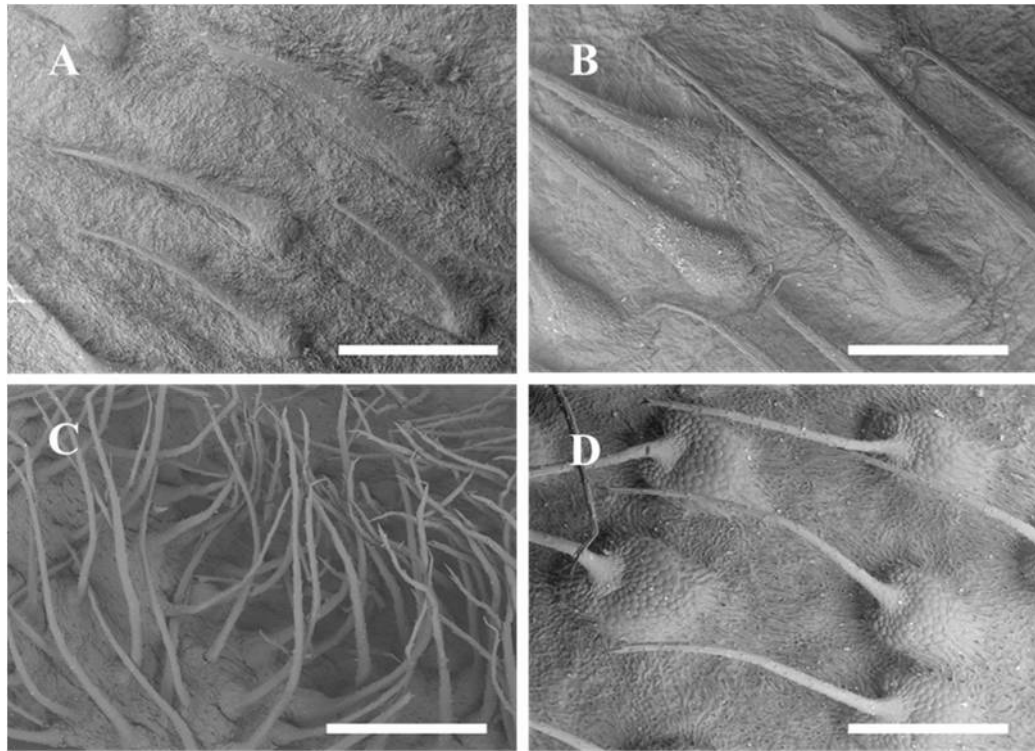


Fig. 1-3 Representative SEM photomicrographs of the bristles of a calyx.
A, Pa-1; B, Pa-13; C, Pa-14; D, Pa-15. Bar = 1 mm.

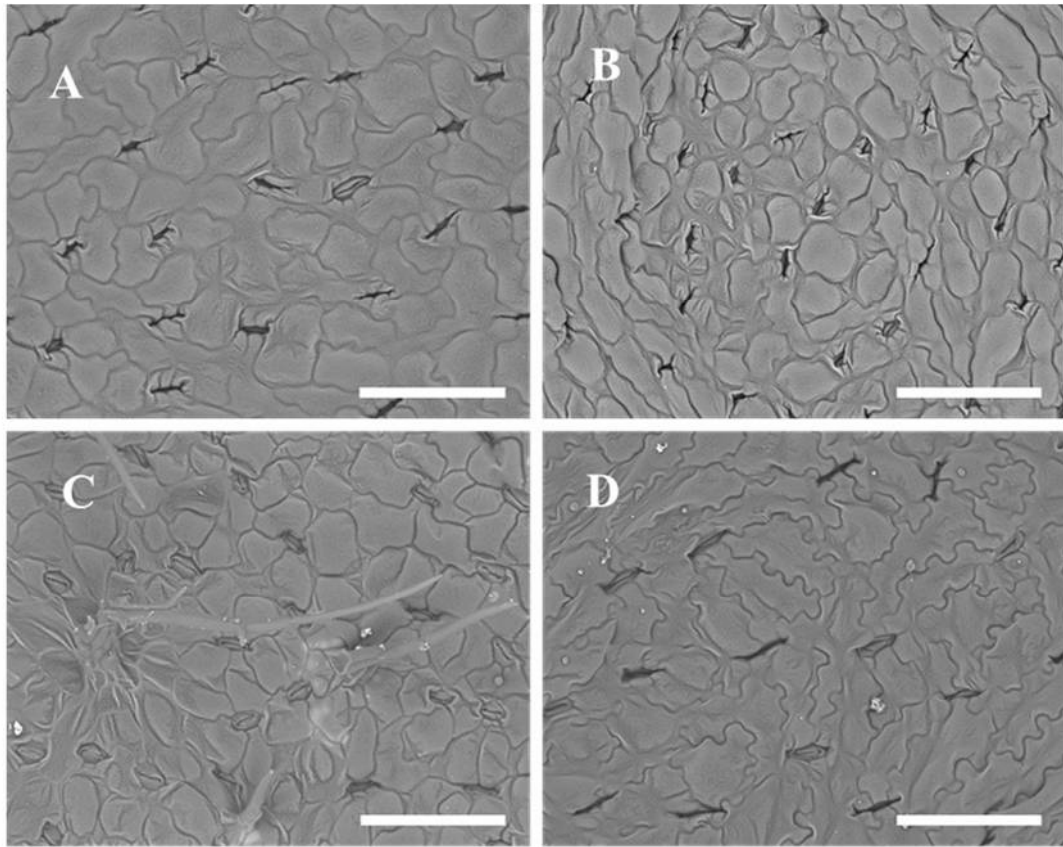


Fig. 1-4 Representative SEM photomicrographs of the stomata.
A, Pa-1; B, Pa-13; C, Pa-14; D, Pa-15. Bar = 150 μm .

A	1	AAAATGCCCTATACGAACTCAATTCCTT	TTTGCAGAA	TAGGGATGTGCAACCAAGGAAAG	60
B	1	AAAATGCCCTATACGAACTCAATTCCTT	TATTGCAGAA	TAGGGATGTGCAACCAAGGAAAG	60
C	1	AAAATGCCCTATACGAACTCAATTCCTT	TATTGCAGAA	TAGGGATGTGCAACCAAGGAAAG	60
D	1	AAAATGCCCTATACGAACTCAATTCCTT	TTTGCAGAA	TAGGGATGTGCAACCAAGGAAAG	60
E	1	AAAATGCCCTATACGAACTCAATTCCTT	TATTGCAGAA	TAGGGATGTGCAACCAAGGAAAG	60
F	1	AAAATGCCCTATACGAACTCAATTCCTT	TATTGCAGAA	TAGGGATGTGCAACCAAGGAAAG	60
		*****	*****	*****	*****
A	61	GAGTCTTT	TTGATAAAAAACAAAAACCGAGGCCTT	-TTTCTGGACAAAAAATATT	119
B	61	GAGTCTTT	TGTGATAAAAAACAAAAACCGAGGCCTT	TGTTCTGGACAAAAAATATT	120
C	61	GAGTCTTT	TGTGATAAAAAACAAAAACCGAGGCCTT	-TTTCTGGACAAAAAATATT	119
D	61	GAGTCTTT	TTGATAAAAAACAAAAACCGAGGCCTT	-TTTCTGGACAAAAAATATT	119
E	61	GAGTCTTT	TGTGATAAAAAACAAAAACCGAGGCCTT	TGTTCTGGACAAAAAATATT	120
F	61	GAGTCTTT	TGTGATAAAAAACAAAAACCGAGGCCTT	-TTTCTGGACAAAAAATATT	119
		*****	*****	*****	*****
A	120	TCCTTCTTTTTTTTGCCCTTTCTTT	TGCAATGAAAGAAACGATAAAAAAATATGAT		174
B	121	TCCTTCTTTTTTTTGCCCTTTCTTT	TGCAATGAAAGAAACGATAAAAAA-TAATGAT		174
C	120	TCCTTCTTTTTTTTGCCCTTTCTTT	TGCAATGAAAGAAACGATAAAAAAATATGAT		174
D	120	TCCTTCTTTTTTTTGCCCTTTCTTT	TGCAATGAAAGAAACGATAAAAAAATATGAT		174
E	121	TCCTTCTTTTTTTTGCCCTTTCTTT	TGCAATGAAAGAAACGATAAAAAA-TAATGAT		174
F	120	TCCTTCTTTTTTTTGCCCTTTCTTT	TGCAATGAAAGAAACGATAAAAAAATATGAT		174
		*****	*****	*****	*****

Fig. 1-5 Alignments of PS-ID sequences for plants of section *Oxytona*.

A, *Pbracteatum*; B, *P. orientale*; C, *Ppseudo-orientale*; D, Pa-13; E, Pa-14; F, Pa-15.

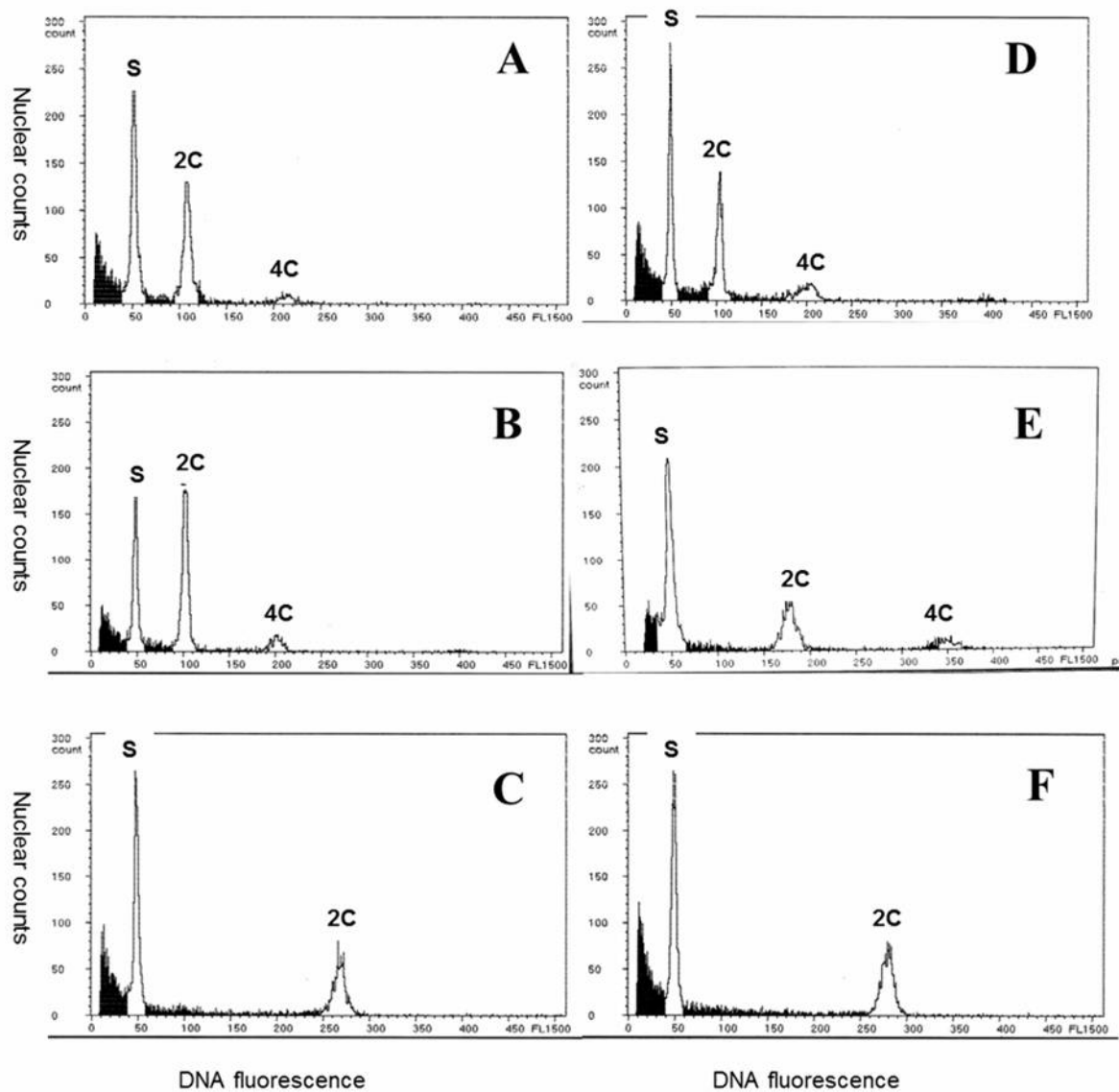


Fig. 1-6 Flow cytometric profiles showing relative nuclear DNA content. A, Pa-1; B, Pa-5; C, Pa-12; D, Pa-13; E, Pa-14; F, Pa-15. S, standard.

第4節 結論および考察

FCM 解析の結果, Pa-1~-10, -13 がハカマオニゲシ, Pa-14 がオニゲシ, Pa-11, -12, -15 がニセオニゲシと判定され, この結果は, 外部形態及び PS-ID の解析による同定結果と一致した (Table 1-III). このことにより, FCM は麻薬原料植物であるハカマオニゲシと他のオキシトナ節植物の同定法として有効であることが示唆された. 従って, 都内で流通したオキシトナ節植物のうち Pa-1~-10 はハカマオニゲシ, Pa-11, -12 はニセオニゲシであったことが明らかとなった.

Pa-11, -12 の気孔長については, 文献 [2] と一致しなかったため, 気孔長による鑑別が困難であることが明らかとなった. また, Pa-11 は, ニセオニゲシと判定されたが, テバインを検出した. 大貫らは, 園芸種として市販されていたオニゲシの中にテバインを含有する個体があることを報告している [7]. このことにより, テバイン含有の有無のみではハカマオニゲシの同定が難しいことが確認された.

以上により, FCM による同定法は, わずかな試料量でもハカマオニゲシを明確に識別する手法として優れているばかりでなく, 短時間かつ簡便に測定できる利点がある. また, 本法は, 従来同定が困難であった, 未開花で根生葉のみの栄養成長期の植物体についても鑑別できる迅速同定法として, 今後利用が可能と考えられる.

第2章 ウバタマ *Lophophora williamsii* の形態,

メスカリン含有量および *trnL/trnF* 領域の DNA 配列による同定法

第1節 研究の目的と背景

ロフォフォラ *Lophophora* 属植物は、偏球形～球形のサボテン科植物で、メキシコ中部高原から北米テキサス州南部に自生している [1]。本属植物は形態的に変異が多いため分類が難しく、ウバタマ *Lophophora williamsii* Coulter, デフューサ *L. diffusa* Bravo の2種と同様に、*L. fricii* Habermann が報告されている [2, 3]。

しかし、現在の分類では、ロフォフォラ属植物は2種、すなわちウバタマとデフューサとされており [3-7]，ワシントン条約の種の基準となる CITES Cactaceae Checklist [8] においても、この2種が記載されている。

ウバタマは、原産地ではペヨーテ *Peyote* と呼ばれ、古くから医療や呪術を用いた宗教行事などに用いられたことで有名である [3,9]。その成分としては麻薬成分のメスカリン *mescaline* の他、多くのアルカロイドが報告されている [3,10-13]。メスカリンおよびペヨーテは、アメリカ合衆国規制物質法において最も濫用の危険性が高いとされる Schedule I 薬物に指定され、その栽培、購入、所持、販売等が規制されている [3]。

日本においては、化学物質としてのメスカリンは麻薬として規制されているものの、ウバタマの所持等についての規制はない。そのため本属植物は日本国内において、栽培・鑑賞目的で一般に流通しており、入手が容易な状況にあり、麻薬として不正使用される懸念がある。このことにより、ウバタマを同定する必要があるにも関わらず、これまでは正確にウバタマを確認する方法がなく、すべてのウバタマがメスカリンを含むかどうか不明であったため、メスカリン含有量に基づいてウバタマを確認することも困難であった。

ウバタマとデフューサは形態的に類似するが、茎幹の色、茎幹のうね状の隆起と溝の有無、花色などにより区別されている [3]。すなわちウバタマの茎幹は青緑色、時には赤みがかった緑色で、茎幹にうね状の隆起と溝があり、花色は通常淡紅色である。一方 デフューサの形態は、茎幹は黄緑色で、通常茎幹にうね状の隆起がなく、花色は通常白色である。しかし、この

2 種の形態とメスカリン含有量の関係は、不明である。

そこで本研究では、その関連を明らかにするため、日本国内で流通するロフオフロ属植物について形態観察から種を同定し、顕微鏡による表皮等の観察、メスカリン含有量を測定するとともに、*trnL/trnF* 領域の DNA 配列を解析し比較した。

さらに、DNA 配列に基づく同定法を開発するために、PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法 [14] および loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を検討した。PCR-RFLP 法により、乾燥し粉砕されたロフオフロ属植物の同定が可能になる。また、LAMP 法は、特定 DNA 配列を増幅する方法の一種で、増幅効率および特異性が高いことから、微生物等の検出に実用化されている。LAMP 法は、DNA 配列が既知であれば、2 時間程度で反応及び検出が可能な簡便法であるが、植物への応用例の報告が少ない方法である [15-18] 。

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料

平成 17 年 1 月から 6 月に導入したロフトフォラ属植物 20 個体，すなわちウバタマ 16 個体 (Lo-1～-16)，デフューサ 4 個体 (Lo-17～-20) を育成し，実験に供試した (Table 2- I, Fig.2-1). 栽培は，春期～秋期 (4 月中旬～10 月中旬) は屋外のビニールハウス内で育成し，冬期は屋内で行った．同定は Anderson の分類法 [3] に従った．実験材料は全て東京都薬用植物園に保存されている．

2-2 形態観察

ロフトフォラ属植物 Lo-1～-20 について，茎幹数，中心茎幹径，茎幹のうね状の隆起数他を調査し，実体顕微鏡 (Nikon SMZ1000) 下で茎幹表面の外部形態及び断面を観察した．また，走査型電子顕微鏡 (日立製作所 S-800 型，以下 SEM) により，表皮の外部形態を観察した．SEM による観察は，茎幹部を台座に固定し，イオンスパッタ法により白金パラジウムを金属蒸着後，実施した．

2-3 メスカリンの定量

UPLC/PDA (ultra performance liquid chromatography - photodiode array detection) によりメスカリンの定量を行った．

定量分析用試料溶液の調製

生植物を凍結乾燥後，粉砕機 (サンプルミル TI-100 平工製作所製) を用いて粉末にした試料約 0.1 g に 0.1N- HCl 20 ml を加え，超音波抽出を 20 分間行い，遠心分離させた．上澄液を 50 ml のメスフラスコに移し，残留物に同一操作を行い，0.1N- HCl 20 ml で全量 50 ml とし，0.2 μ m のフィルターに通し試料溶液とした．

メスカリン含有量の算出

ウバタマから単離したメスカリンを標準品として用い，205 nm におけるピーク高さをを用いた検量線を 0.0007～0.0414 μ g の範囲で作成し，回帰方程式により mescaline の含有量を算出した．

Table 2-1 *Lophophora* Plants Used for Experiments

Voucher No.	Scientific name ^a	Commercial name	Collection Date	Means of Acquisition
Lo-1	<i>Lophophora williamsii</i>	Ubatama	Apr. 2005	Internet
Lo-2	<i>L. williamsii</i>	Ubatama	Apr. 2005	Internet
Lo-3	<i>L. williamsii</i>	Ubatama	Jan. 2005	Market (Mie Pref.)
Lo-4	<i>L. williamsii</i>	Ubatama	January, 2005	Market (Mie Pref.)
Lo-5	<i>L. williamsii</i>	Ubatama	January, 2005	Market (Mie Pref.)
Lo-6	<i>L. williamsii</i>	Ubatama	April, 2005	Internet
Lo-7	<i>L. williamsii</i>	Ubatama	April, 2005	Internet
Lo-8	<i>L. williamsii</i>	Ubatama	April, 2005	Internet
Lo-9	<i>L. williamsii</i>	Ubatama	April, 2005	Internet
Lo-10	<i>L. williamsii</i>	Ubatama	April, 2005	Internet
Lo-11	<i>L. williamsii</i>	Ougataubatama	April, 2005	Internet
Lo-12	<i>L. williamsii</i>	Kofukiubatama	May, 2005	Internet
Lo-13	<i>L. williamsii</i>	Ougataubatama	April, 2005	Internet
Lo-14	<i>L. williamsii</i>	Ginkangyoku	May, 2005	Internet
Lo-15	<i>L. williamsii</i>	Ginkangyoku	May, 2005	Internet
Lo-16	<i>L. williamsii</i>	Ginkangyoku	May, 2005	Internet
Lo-17	<i>L. diffusa</i>	Difyusa	January, 2005	Market (Mie Pref.)
Lo-18	<i>L. diffusa</i>	Difyusa	May, 2005	Internet
Lo-19	<i>L. diffusa</i>	Difyusa	May, 2005	Market (Mie Pref.)
Lo-20	<i>L. diffusa</i>	Difyusa	May, 2005	Internet

^a We identified above plants on the basis of morphology.



Fig. 2-1 Morphology of *Lophophora* Plants

A to G : *Lophophora williamsii* ; H: *L. diffusa* ,

A: Lo-2, B: Lo-3, C: Lo-9, D: Lo-11, E: Lo-12, F: Lo-13, G: Lo-14, H: Lo-18.

Bar = 5 c m

分析条件 試薬類：ギ酸アンモニウムは試薬特級（和光純薬工業製），その他の試薬は HPLC 用を用いた．

UPLC/PDA :Waters 製 Acquity, カラム：BEH C18 , 1.7 μ m, 2.1-50 mm , カラム温度：40 $^{\circ}$ C.
溶離液：5m M - ギ酸アンモニウム- 0.05%ギ酸を含有する水溶液／アセトニトリル混液（950 mL:50 ml）を 0.45 μ m のフィルターに通して使用した．流速：0.6 ml/min. 1cycle/10min., PDA（200-400）．保持時間及び UV スペクトルによる定性分析を実施した．注入量は試験溶液及び標準溶液いずれも 1 μ l とした．

2-4 *trnL/trnF* 領域の DNA 配列の解析

全 DNA の抽出および PCR 法による増幅

試料約 20mg から DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）を使用して全 DNA を抽出した．PCR 法による増幅は以下の条件で行った．反応液は各全 DNA を鋳型として，0.25 μ M 各プライマー（*trnL*-cF, *trnT*-fR）および GoTaq（Promega）を加え，50 μ l で行った．プライマーの配列は *trnT*-cF: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'および *trnF*-fR: 5'-TCGTGTCACCAGTTC-3'である．反応は Thermal Cycler（TaKaRa Dice）を使用し，94 $^{\circ}$ C のホットスタートの後，96 $^{\circ}$ C（1 分），52 $^{\circ}$ C（1 分），74 $^{\circ}$ C（1.5 分）を 45 サイクル行った．反応後，アガロース電気泳動法により増幅を確認した．

trnL/trnF 領域の DNA 配列の解析

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System（Promega）で精製した PCR 増幅産物を，Cycle Sequence 反応（ABI, BigDye Terminator v1.1）を行った後，*trnL/trnF* 領域の DNA 配列（ABI PRISM 377）を解析し，ソフトウェア（AutoAssembler Program v1.3.0）により配列間の比較解析を行った．

解析した配列は，国立遺伝学研究所日本 DNA データバンク（DDBJ）に登録した．Accession 番号は以下のとおりである．ウバタマ *L. williamsii*（Lo-1～-10, -12, -13），AB362488；ウバタマ *L. williamsii*（Lo-11），AB362489；ウバタマ *L. williamsii*（Lo-14～-16），AB362490；デフューサ *L. diffusa*（Lo-17～-20），AB362491．

2-5 PCR-RFLP 法

解析した DNA 配列を基に PCR-RFLP 法を検討した．解析した塩基配列を基に PCR 用プライマーを再設計した．プライマーの配列は次のとおりである．LpTL-5F: 5'-CCC GAA CCC ATA

CGT AAT CC-3', LpTL-3R: 5'-GGG AAA AGC ATT TTC GTC CG-3'. 反応条件は, 94°C (2 分) の後, 94°C (1 分), 52°C (1 分), 72°C (1 分) を 35 サイクル行った. 反応後, 1% アガロースゲル電気泳動法により増幅を確認した. 増幅が確認できた後, 制限酵素反応を行った. 制限酵素反応は全量 10 μ l 中, PCR 産物 5 μ l, 4 unit の *Mse*I (New England Biolabs), NEBuffer 及び BSA を添加した. その後, Thermal Cycler を使用し, 37°C (60 分) 及び 65°C (20 分) 反応し, 2% アガロースゲル電気泳動法により断片を確認した.

2-6 LAMP 法

解析した DNA 配列を基に LAMP 法を検討した. ロフオフロ属植物 2 種の配列を基に, 2 組のプライマーセットを設計した (Fig.2- II). ウバタマのプライマーセットは LPw-F3, LPw-B3, LPw-FIP, LPw-BIP, LP-LF, LPw-LB の 6 種, デフューサのプライマーセットは LPd-F3, LPd-B3, LPd-FIP, LPd-BIP, LP-LF, LPd-LB の 6 種である (Table 2- II).

LAMP 法は, DNA amplification kit (Eiken Chemical Co., Ltd.) を使用して反応液を調製した. Genomic DNA 濃度は予め DU640 分光測光器 (Beckman) により測定した. 反応は全量 25 μ L 中, genomic DNA 1.0 μ L, 2x Reaction Mix 12.5 μ L, 8 unit の *Bst* DNA polymerase, Fluorescent Detection Reagent 0.5 μ L, 10pmol の LPwF3(LPd-F3)及び LPw-B3 (LPdB3), 80 pmol の LPw-FIP (LPdFIP) および LPw-BIP (LPd-BIP), 40 pmol の LP-LF および LPw-LB (LPd-LB) で行った. 90 または 120 分間 60°C (デフューサのプライマーセットは 58°C) で反応し, その後 5 分間 80°C で加熱した. リアルタイムの混濁は Realoop-30 (Moritex Co., Ltd., Tokyo) により観察した. 反応後, チューブを UV ランプ (254nm) 下で照らし, 蛍光を観察した. また, 反応混合物 5 μ L を用いて, GelRed (Biotium) を含む 2% アガロースゲル電気泳動法により断片を確認した. なお, 制限酵素 *Mse*I により処理後, 電気泳動法を実施し, LAMP 反応後の増幅産物の目的領域の増幅を確認した.

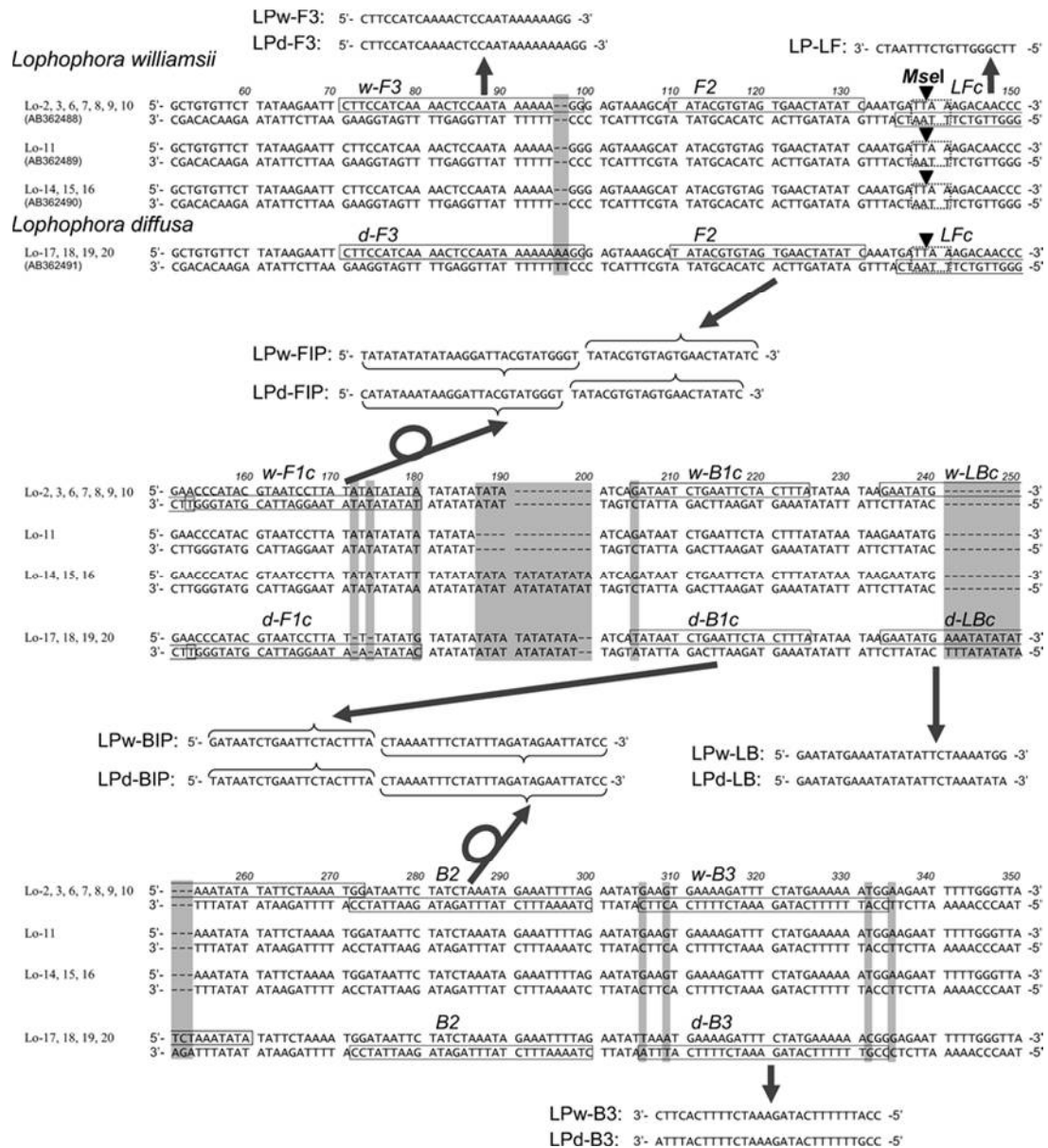


Fig. 2-2. Nucleotide Differences between *L. williamsii* and *L. diffusa* in Part of the *trnL* Intron Region and Locations of Primers Designed for LAMP

Double-stranded DNA sequences from nucleotide position 51 to 350 of the *trnL* intron region are shown. Dotted boxes indicated recognition site of *MseI* restriction enzyme. Numbers in italics above the sequences indicate aligned nucleotide positions. The shaded regions indicate nucleotide differences. Hyphens () denote alignment gaps. Boxed sequences indicate the primer sequences regions for primers.

Table 2-II Primers Used in LAMP

Name ^{a)}	Sequence (5'→3')
LPw-F3	CTT CCA TCA AAA CTC CAA TAA AAA AGG
LPd-F3	CTT CCA TCA AAA CTC CAA TAA AAA AAA GG
LPw-B3	CCA TTT TTT CAT AGA AAT CTT TTC ACT TC
LPd-B3	CCG TTT TTT CAT AGA AAT CTT TTC ATT TA
LPw-FIP	TAT ATA TAT ATA AGG ATT ACG TAT GGG TTA TAC GTG TAG TGA ACT ATA TC
LPd-FIP	CAT ATA AAT AAG GAT TAC GTA TGG GTT ATA CGT GTA GTG AAC TAT ATC
LPw-BIP	GAT AAT CTG AAT TCT ACT TTA CTA AAA TTT CTA TTT AGA TAG AAT TAT CC
LPd-BIP	TAT AAT CTG AAT TCT ACT TTA CTA AAA TTT CTA TTT AGA TAG AAT TAT CC
LP-LF	TTC GGG TTG TCT TTA ATC
LPw-LB	GAA TAT GAA ATA TAT ATT CTA AAA TGG
LPd-LB	GAA TAT GAA ATA TAT ATT CTA AAT ATA

a) Names beginning with the letters “LPw” are primers that anneal to the sequence of *L. williamsii*; “LPd” indicates annealing to *L. diffusa*, and “LP” indicates annealing to both species.

第3節 実験結果

3-1 ロフォフォラ属植物の形態による同定

Lo-1～-20 の地上部はいずれも扁球～球形で、茎幹の色調は個体により若干の差異があり、茎幹は単幹又は群生幹であった (Fig.2-1, Table 2-III). Lo-12 は未開花であったため花卉の色を確認できなかったが、それ以外の形態からウバタマと同定した. Lo-13 の茎幹の色は黄緑色であり、Lo-14～-16 は灰色を帯びた緑色または黄緑色であったが、茎幹のうね状のはっきりした隆起と溝、淡紅色から紅色の花弁からウバタマと同定した. 一方、Lo-20 は茎幹が緑色であったが、茎幹のうね状の隆起と溝がなく、白色の花弁からデフューサと同定した. ウバタマの Lo-1～-16 の茎幹には、本種のみ認められるうね状の隆起が 4～13 認められ、デフューサの Lo-17～-20 にはうね状隆起は認められなかったが (Table 2-III), 表面が平坦な個体 (Lo-17, -20) といぼ状の凹凸がある個体 (Lo-18, -19) を確認した.

実体顕微鏡下で茎幹の表面および断面を観察した結果、茎幹表面は緑色、淡緑色、淡褐色、白色等の混在したマーブル模様を呈し (Fig. 2-3-a, -d, -g), 表面は半透明の表皮で覆われていた (Fig. 2-3-b, -e, -h).

SEM による表皮の外部形態観察の結果、全個体とも表皮は微細な乳頭状の突起に覆われ、その形態により 3 タイプに分けられた (Fig.2-3). Lo-3 (Fig. 2-3-c) は、緩やかな隆起上に小型の突起(直径 $12.5\sim 16.7\mu\text{m}$) が散在しており、Lo-1, -2, -4～-13 はこれに類似した. Lo-16 (Fig. 2-3-f) は大型の突起 (直径 $62.5\sim 66.7\mu\text{m}$) が高密度に分布し、Lo-3 よりも Lo-18 (Fig. 2-3-i) に類似し、Lo-14, -15 はこれに類するものであった. Lo-18 は Lo-16 よりもやや小型な突起(直径 $33.3\sim 37.5\mu\text{m}$) が高密度に分布し、Lo-17, -19, -20 はこれに類似した.

以上の結果、ウバタマの Lo-1～-13 と Lo-14～-16 ではその形態のタイプが異なり、Lo-14～-16 は、デフューサの Lo-17～-20 の形態に類似した.

3-2 メスカリンの定量

Lo-1～-20 のメスカリンを定量した結果、ウバタマの Lo-1～-13 は $12.7\sim 48.26\text{ mg/g}$ のメスカリンを含有したが、Lo-14～-16 はメスカリンを検出しなかった. デフューサの Lo-17～-20 もメスカリンを検出しなかった (Table 2-III).

Table 2-III Morphology, Mescaline Content, and Genetic Type of *Lophophora* Plants

Voucher No.	Scientific name	Color of flower (Inner perianth segments)	Epidermis of stem		Number of stems	Diameter of center stem (mm)	Number of ribs over center stem	Mescaline content (mg/g)	Genetic type ^a
			Color	Protuberance (SEM image)					
Lo-1	<i>L. williamsii</i> (Group 1)	pale pink	blue-green	small	5	96.5	13	37.2	A
Lo-2		pale pink	blue-green	small	21	62.0	11	48.3	A
Lo-3		pale pink	blue-green	small	5	59.3	8	22.2	A
Lo-4		pale pink	blue-green	small	5	63.7	10	42.7	A
Lo-5		pale pink	blue-green	small	1	83.0	13	38.5	A
Lo-6		pale pink	blue-green	small	11	48.0	8	26.6	A
Lo-7		pale pink	blue-green	small	8	81.0	13	38.2	A
Lo-8		pale pink	blue-green	small	7	70.2	13	24.6	A
Lo-9		pale pink	blue-green	small	11	63.5	11	29.4	A
Lo-10		pale pink	blue-green	small	8	86.2	13	30.7	A
Lo-11		pale pink	blue-green	small	3	123.7	12	35.4	B
Lo-12		^a ^b	blue-green	small	8	10.6	4	25.0	A
Lo-13	<i>L. williamsii</i> (Group 2)	pale pink	yellow-green	small	7	90.5	8	12.7	A
Lo-14		deep pink	gray-yellow-green	large	12	51.7	13	N.D.	C
Lo-15		pink	gray-green	large	21	52.7	12	N.D.	C
Lo-16		deep pink	gray-yellow-green	large	21	55.6	10	N.D.	C
Lo-17	<i>L. diffusa</i>	white	yellow-green	medium	1	40.9	–	N.D.	D
Lo-18		white	yellow-green	medium	13	87.5	–	N.D.	D
Lo-19		white	yellow-green	medium	1	90.8	–	N.D.	D
Lo-20		white	green	medium	10	70.1	–	N.D.	D

^a We registered the sequence analyzed in the DNA databank of Japan at the National Institute of Genetics (DDBJ).

The accession numbers are as follows: AB362488 for genotype A, AB362489 for genotype B, AB362490 for genotype C, and AB362491 for genotype D.

^b No flowers grew during the observation period.

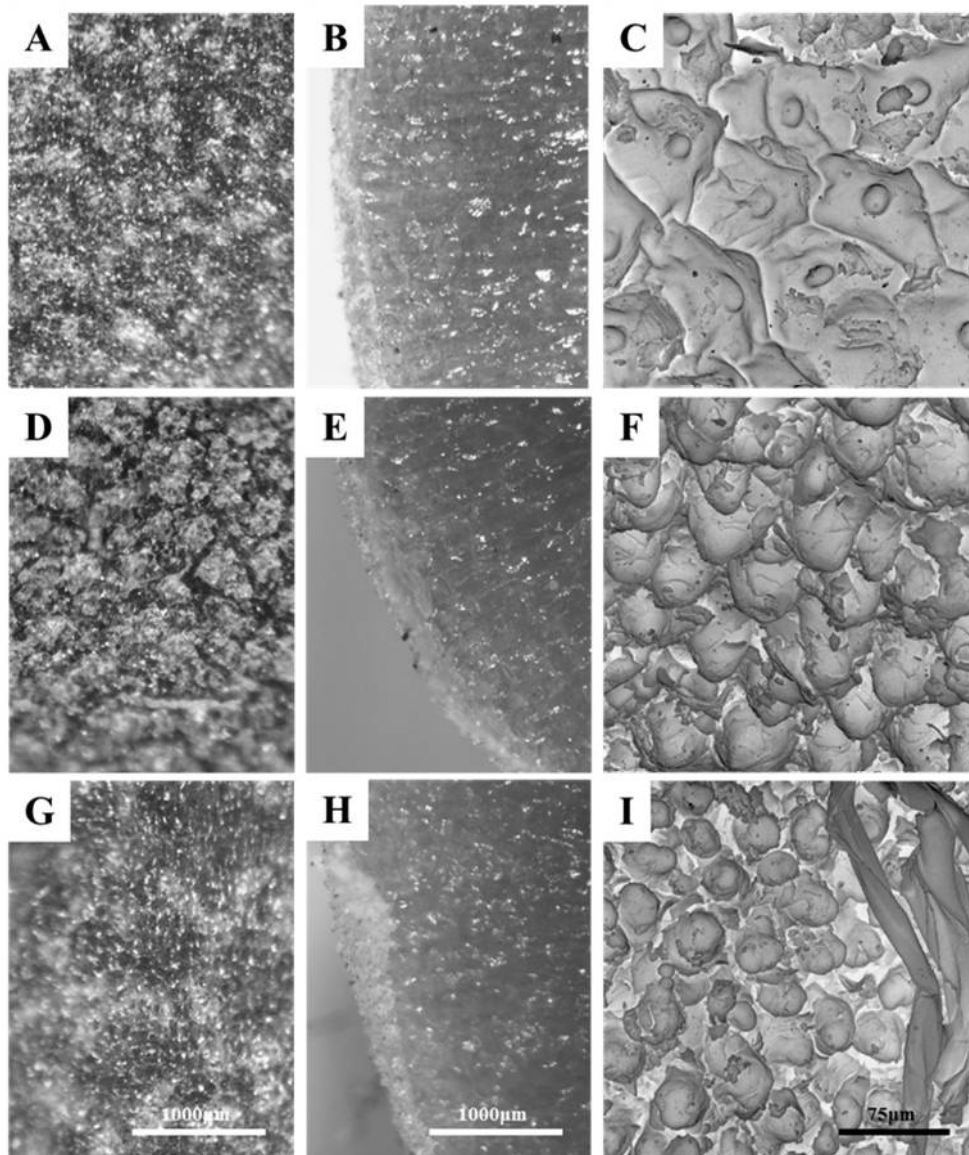


Fig. 2-3. Epidermal Morphology of *Lophophora* Plants by Microscopy and SEM

A through F: *Lophophora williamsii*, G through I: *L. diffusa*

A and B: Lo-9, C: Lo-3, D and E: Lo-14, F: Lo-16, G through I: Lo-18.

A, D, and G: Epidermis; B, E, and H: Cross section of stem; C, F, and I: Nipple-like protuberance on epidermis

3-3 *trnL/trnF* 領域の DNA 配列の解析

ロフトオウ属植物の *trnL/trnF* 領域の DNA 配列の解析の結果、877 塩基対から 903 塩基対までの 4 種の配列が確認された。遺伝子型 A は 881 塩基対、遺伝子型 B は 877 塩基対、遺伝子型 C は 893 塩基対、遺伝子型 D は 903 塩基対であった (Fig. 2-4)。

ウバタマの遺伝子型は A～C の 3 種で、遺伝子型 A は Lo-1～-10, -12, -13 であった (Table 2-III)。遺伝子型 B (Lo-11) は、配列 187～190 での 4bp の塩基欠失を除いて遺伝子型 A と同一であった。遺伝子型 C (Lo-14～-16) は、配列 180, 591 及び 876, 191～200 に 10bp の挿入と、628～629 までの 2bp の挿入及び 3 個の塩基置換において遺伝子型 A と異なっていた (Fig. 2-4 , Table 2-III)。デフューサの遺伝子型 D は、配列 96～97 に 2bp の挿入、241～253 の 13bp の挿入、628, 172, 174, 199-200 の欠損、180, 306, 309, 332, 335, 517, 591, 876 の塩基置換において、遺伝子型 A と異なっていた (Fig. 2-4)。

3-4 PCR-RFLP 法

再設計したプライマーセット Lptl-5F 及び Lptl-3R を用いた PCR-RFLP 法を計画した。Lptl-5F 及び Lptl-3R を用いた PCR 法により、ウバタマの遺伝子型 A は 506 塩基対、遺伝子型 B は 502 塩基対、遺伝子型 C は 518 塩基対、デフューサ (遺伝子型 D) は 526 塩基対の増幅産物が得られることが予測された (Fig. 2-5)。制限酵素 *MseI* による切断箇所は、遺伝子型 A と B は 1 箇所認められ、遺伝子 A からは 256 及び 250 塩基、遺伝子型 B からは 252 及び 250 塩基のいずれも 2 断片の生成が予測された。また、同様に遺伝子型 C は 2 箇所の切断箇所があり 266, 164, 88 塩基の 3 個の断片、*L. diffusa* (遺伝子型 D) は 4 箇所の切断箇所があり 152, 123, 89, 75, 87 塩基の 5 個の断片に切断されることが予測された (Fig. 2-5)。この反応溶液に対し電気泳動を行なったところ、Fig. 2-5 に示されるような予測された切断パターンが得られ、実際に反応を行った結果、計画したとおりに反応が進行した (Fig. 2-6)。遺伝子型 A,B (Fig. 2-6 レーン 1～13) の 1 個の断片は、遺伝子型 C (Fig. 2-6 レーン 14～16) の 3 個の断片の中の 1 個の断片の長さと類似していた。遺伝子型 D (Fig. 2-6 レーン 17～20) は、89, 75, 87bp の約 3 個の断片が得られた。

この切断パターンの違いから、ウバタマおよびデフューサの 2 種とそれらの遺伝子型を明確に判断することが可能であった。このことにより、ウバタマを 2 つのグループに分割できる可能性を明らかにした。

3-5 LAMP 法

LAMP 法の濁度によるウバタマ の検出を行った結果、ウバタマ増幅用プライマーセットを使用することで、ウバタマを選択的に検出することができた (Fig.2-7-A)。また、増幅しなかったデフューサにも間違いなく DNA が含まれていることを確認している (Fig.2-7-B)。

LAMP 法反応後の検出について Fig.2-8 に示した。ウバタマ増幅用プライマーセットを使用した LAMP 法の結果、Lo-2～Lo-16 は紫外線照射下で蛍光を発光することを確認し (Fig.2-8-A1)，電気泳動法により DNA が増幅していることを確認した (Fig.2-8-A2)。なお，制限酵素 *MseI* により，短い断片に切断された (Fig.2-8-A3)ことから，LAMP の増幅産物は目的の領域が増幅した。

検出限界について Fig.2-9 に示した。ウバタマ増幅用プライマーセットを使用した LAMP 法は，0.5ng/tube の濃度まで検出が可能であった。PCR 法による増幅は一般的に 10ng/tube 程度の濃度を必要とすることから，LAMP 法が高感度であることが明らかになった。

ウバタマ増幅用プライマーセットを使用した LAMP 反応は，ウバタマの Lo-2～-11 は 65 分以内，Lo-14～-16 は 70～90 分に選択的に検出することが可能であった。すなわち LAMP 法は，65 分で反応を停止した場合，Lo-2～-11 と Lo-14～-16 を鑑別することも可能である。Lo-14～-16 はウバタマの変種とされる場合がある検体である。

このプライマーセットは特異的であるため，デフューサを検出しなかった。LAMP 反応後の溶液は，電気泳動法及び制限酵素反応から目的の領域を増幅していることが確認された。ウバタマ用プライマーセットを使用した LAMP 反応は，高感度であり，0.5ng/tube でも増幅可能であった。

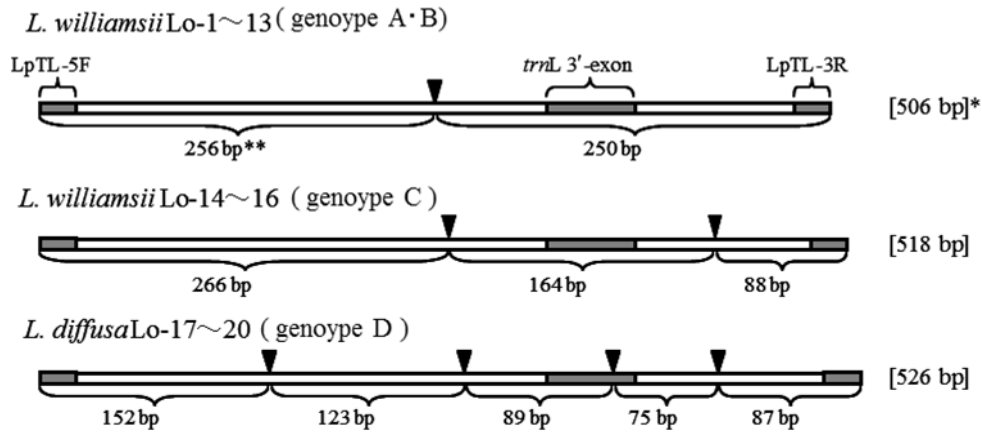


Fig. 2-5. Diagrams of Restriction Sites Using the Restriction Enzyme *MseI* on *trnL/trnF* Region

PCR products, amplified using DNAs from *Lophophora* plants as template and primers (LpTL-5F and LpTL-3R), were digested with *MseI*. Numbers on the right side in brackets indicate lengths of PCR products, and numbers under each diagram indicate lengths of digested fragments. Closed inverted triangles indicate restriction sites. *502 bp in Lo-11, **252 bp in Lo-11.

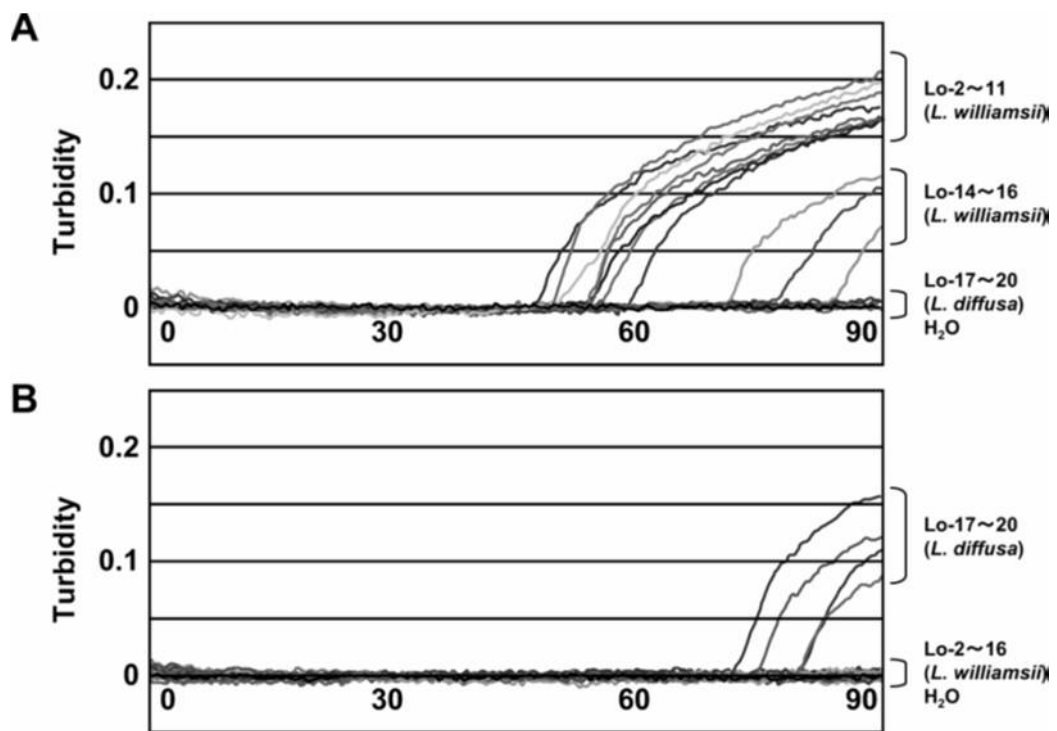


Fig.2-7. Real-time Monitoring of LAMP by Turbidity Measurement in *Lophophora* Plants

LAMP using a set of primers for *L. williamsii* (A) and *L. diffusa* (B).

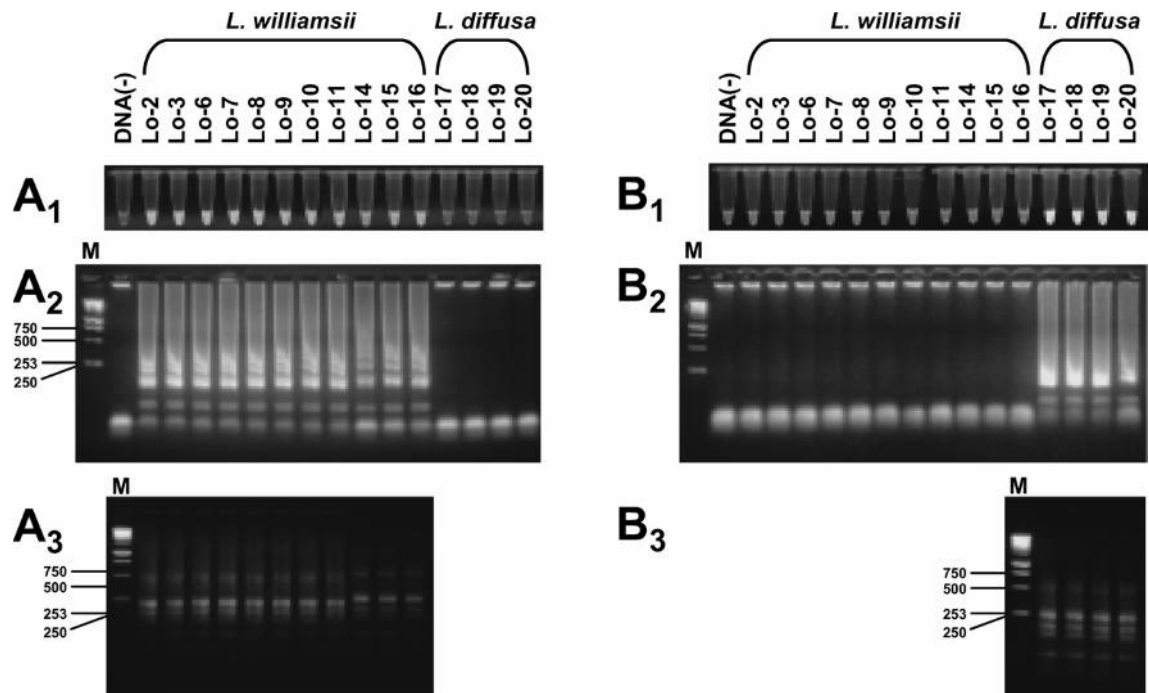


Fig. 2-8. Visual Inspection (A₁, B₁) and Agarose Gel Electrophoresis Profiles (A₂, B₂) of LAMP Products, and Electrophoresis Profiles (A₃, B₃) after *Mse*I Digestions

Images using primers specific for *L. williamsii* (A) and for *L. diffusa* (B); visual inspection was conducted under a UV lamp (254 nm). Lane M indicates 1 kb DNA ladder (Promega).

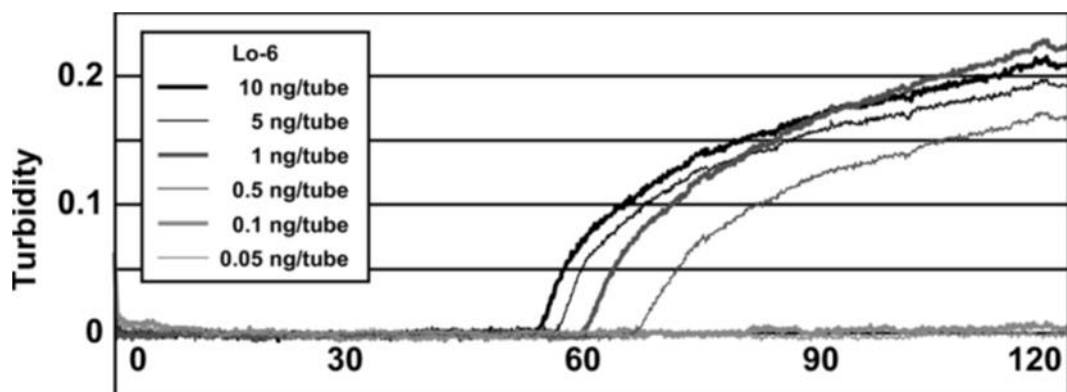


Fig. 2-9. Real-Time Monitoring of LAMP Using Turbidity Measurements at Different DNA Concentrations

LAMP using a set of *L. williamsii*-specific primers and genomic DNA of Lo-6 as template. Concentrations of template DNA were 10.0 ng, 5.0 ng, 1.0 ng, 0.5 ng, 0.1 ng, and 0.05 ng per tube.

第4節 結論および考察

本研究により、ウバタマは Lo-1～-13 と Lo-14～-16 の2つのグループに分けられた。前者のグループ1は、茎幹が青緑色を呈し、SEMによる観察で表皮上の突起が小型であった。グループ1は、すべてメスカリンを含有し、Lo-11のみ *trnL/trnF* 領域のDNA配列は遺伝子型Bであったが、それ以外は遺伝子型Aであった。後者のグループ2は、茎幹が灰色を帯びた緑～黄緑色を呈し、表皮上の突起は大型であった。グループ2は、メスカリンは含有せず、*trnL/trnF* 領域の配列は遺伝子型Cであった。デフューサは茎幹が緑～黄緑色を呈し、表皮上の突起が中型であった。また、デフューサはメスカリンを含有せず、*trnL/trnF* 領域のDNA配列はウバタマの遺伝子型A～Cとは異なる配列（遺伝子型D）であった。

Bruhn と Todd は、ウバタマがメスカリンを含有し、デフューサがメスカリンを含有しないことを報告している [15,16]。しかし、この報告ではメスカリンを含有するウバタマの中に *L.fricii* が含まれていたかどうかは不明であった。

本研究では、ウバタマについて、メスカリンを含むグループと含まないグループとの2つにグループ化し、さらにデフューサがメスカリンを含有しないことを初めて明確にした。なお、ロフォフォラ属植物のDNA配列について、Charles はウバタマおよびデフューサの葉緑体 *rpl16* 領域のDNA配列について報告している [17]。しかし、この報告ではウバタマおよびデフューサは1個体のみが用いられ、それらの個体の形態に関する情報がなかったため、2種の形態は不明であった。本研究では、実験によりPCRによる *rpl16* 領域の増幅が困難であったため、新たに葉緑体 *trnL/trnF* 領域のDNA配列を解析することとした。その結果、非常に興味深いことに、*trnL/trnF* 領域の4つの遺伝子型は、形態とメスカリン含有の有無との関連があり、遺伝子型A及びBは、ウバタマのグループ1と、遺伝子型Cはグループ2と一致し、遺伝子型Dはデフューサに相当した。

ロフォフォラ属植物の *trnL/trnF* 領域の遺伝子型を分析し、メスカリンを含有する（遺伝子型A及びB）か、メスカリンを含有しない（遺伝子型CおよびD）かを確認することにより、ウバタマ（遺伝子型A、B及びC）、デフューサ（遺伝子型D）を識別し、ロフォフォラ属植物を鑑別することは可能となった。その結果、ロフォフォラ属植物の形態とメスカリンの有無及び *trnL/trnF* 領域の塩基配列について、ウバタマおよびデフューサの間の違いが明確となった。

さらに、これらの *trnL/trnF* 領域の塩基配列の違いに基づいた PCR-RFLP 法を適用することにより、*trnL/trnF* 領域の DNA 配列を分析することなく、より短時間でウバタマとデフューサを同定し、ウバタマのメスカリンの含有の有無についても鑑別することが可能となった。メスカリンが法律上規制された物質であることから、それを含む植物種を識別することは非常に重要である。PCR-RFLP 法は、乾燥して粉砕された原植物の形態がわからないロフトォラ属植物にさえ適用が可能である。また、LAMP 法により、PCR-RFLP 法よりもさらに短時間かつ高感度にウバタマを検出することが可能となった。

第3章 ハルマラ *Peganum Harmala* の同定と

ハルマリンおよびハルミン 含有量について

第1節 研究の目的と背景

近年、乱用薬物の1つとして植物系ドラッグ・ハルマラ *Harmala* が、輸入雑貨店やアダルトショップあるいはインターネット上で販売されている。ハルマラは植物種子で、原植物はハルマラ *Peganum harmala* L.とされているが、ハルマラ *P. harmala* はこれまで国内では薬用または園芸植物などで導入された経緯がなく、植物の詳細についての報告がない。

ハルマラ *P. harmala* は、北アフリカ、中東、地中海沿岸から東アジアの乾燥地に生育するハマビシ科(Zygophyllaceae)の植物で [1-5]，古くから医療や呪術を用いた宗教行事などに用いられている [6-8]。種子や根には幻覚成分であるハルマリン *harmaline* やハルミン *harmine* など多数の β -carboline を含み [9-14]，モノアミンオキシダーゼ（MAO）の阻害活性や、脳の中枢神経への作用が報告され [15-18]，人による中毒事故の他、ハルマラの自生地ではラクダ等の家畜による中毒例が報告されている [19]。薬物として乱用されるこの種子が、他の植物種子と鑑別あるいは鑑定が可能か否かは明白ではない。

そこでドラッグとして市販されている種子と、種子交換で海外から導入したハルマラの種子を同じ条件で播種・育成し、その形態を比較して同定作業を進める一方、本種子の鑑別方法について考察した。さらに本植物による中毒事例も海外から報告されることから、種子をはじめ葉や根などのハルマリンおよびハルミンの分析を行い、その有害性について検討した。

第 2 節 実験材料および方法

2-1 実験材料

ドラッグとして販売されていたハルマラ H-1～4 は, 2003 年から 2005 年にかけて都内の輸入雑貨店等で購入した (Table 3- I) . ハルマラ *P. harmala* の種子 S-1～6 はいずれも 2004 年に, 海外の植物園などから種子交換で導入した (Table 3- II) .

Table 3- I . *Harmala* sold as an abuse drug and used for experiments

Sample	Locality	Year	Sales place
H-1	Shibuya 渋谷	2003	Specialty store
H-2	Shimokitazawa 下北沢	2004	Specialty store
H-3	Shinjyuku 新宿	2004	Roadside stand
H-4	Shibuya 渋谷	2005	Specialty store

Table 3- II . *Peganum harmala* used for experiments

Sample	Acquisition place	Year
S-1	Bonn, Germany	2004
S-2	Kiev, Ukraine	2004
S-3	Padova, Italia	2004
S-4	Lyon, France	2004
S-5	Zagreb, Croatia	2004
S-6	Leipzig, Germany	2004

2-2 形態観察

H-1～4 及び S-1～6 の種子の形態観察を実体顕微鏡で行った. 表面構造については走査型電子顕微鏡 (日立製作所 S-800 型, 以下 SEM) で観察した. 試料は乾燥種子をイオンスパッタ法により白金パラジウムで金属蒸着した.

種子重量 (20 粒重) の計測は, 各材料につき 2～5 反復, 大きさ (長径×短径) の計測は 10 反復行った. また, 植物の形態観察には, H-1～4 及び S-1～6 の種子を, 園芸用土壌を充

填した 1/2,000 a ワグネルポットに播種し、発芽後各成長段階での形態を観察した。播種は各試料 3 ポットで行った。

2-3 ハルマリンおよび ハルミン の定量

標準品：ハルマリンは harmaline 塩酸塩二水和物 $C_{13}H_{14}N_2O \cdot HCl \cdot 2H_2O$ （和光純薬工業製，化学用），ハルミンは harmine 塩酸塩 $C_{13}H_{12}N_2O \cdot HCl$ （和光純薬工業製，化学用）を用いた（Fig. 3-1）。

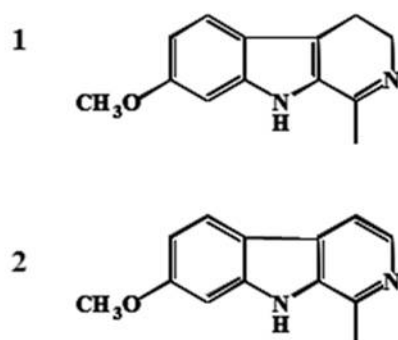


Fig. 3-1. Chemical structures of Harmaline (1) and Harmine (2)

試料粉末の作製：H-1～4 および S-1, S-4, S-6 の種子を粉末にした。1 年生株の根，茎及び葉は 2003 年 6 月に 3 株掘り上げ，水洗後凍結乾燥し，全量を粉末にした。枯死した茎および葉は 2004 年 1 月に採取し，天日乾燥後粉末とした。2 年生株の根，茎および葉は 2004 年 6 月に 3 株掘り上げ，水洗後凍結乾燥し全量を粉末にした。種子は同年 9 月に播種し，天日乾燥後粉末にした。

定性分析用試料溶液の調製：各試料 500mg をメタノール 100ml で 15 分間超音波抽出した。抽出液を減圧下濃縮し得られたエキスを 0.1N 塩酸水溶液 30ml 及びクロロホルム 30ml に溶かし，液-液分配を行なった。次に水層を分取し，1N アンモニア水でアルカリ性とした後，クロロホルム 30ml を加え再度分配した。クロロホルム層は少量の水で洗浄した後，無水硫酸ナトリウムで脱水した。硫酸ナトリウムをろ過し，そのろ液を減圧留去し TLC 用試料とした。

TLC による確認試験：薄層版は Kieselgel 60 F₂₅₄ pre-coated, 10cm×20cm, 0.25mm (メルク社製), 展開溶媒はクロロホルム：メタノール：アンモニア水=50：5：1. 検出は暗所下 UV365nm 及び 254nm で観察後, ドラージェンドルフ試薬を噴霧し, 陽性スポットを調べた.

定量分析用試料溶液の調製：試料 50mg を移動相 (メタノール：水：SDS・リン酸混合液) 45ml で 30 分間超音波抽出を行ない, 冷後正確に 50ml とした. そしてその一部を 0.45 μ m のフッ素樹脂メンブランフィルターに通し, 定量用試料とした.

HPLC による定量：ODS カラムを使用した HPLC で, ハルマリンおよびハルミンをピーク高さ法で定量した.

HPLC condition : Column ; TSK gel ODS-80T_S 5 μ m 4.6×250 mm, Column temp. ; 40°C, Solvent ; MeOH : H₂O : SDS : H₃PO₄ (770 ml : 230 ml : 6 g : 1 ml), Flow ; 1.0 ml/min, Det. ; PDA (340 nm).

第3節 実験結果

3-1 種子の形態

市販ドラッグ H-1～4 は、いずれもビニール袋に入った植物の種子で、わずかに茎と果皮が混入していた。種子の形状は、褐色から黒褐色で三稜形を呈し (Fig. 3-2-A, Fig. 3-3) , 実体顕微鏡および走査型電子顕微鏡(以下 SEM)で表面を観察したところ、いずれも細かい凹状構造を示した (Fig. 3-2-A) 。各試料の 20 粒重は $63.1 \pm 1.9\text{mg}$ から $65.9 \pm 2.3\text{mg}$ で、大きさは長径が $3.4 \pm 0.2\text{mm}$ から $3.5 \pm 0.2\text{mm}$, 短径は $1.7 \pm 0.1\text{mm}$ から $1.8 \pm 0.1\text{mm}$ であった (Table 3-III) 。

海外から導入したハルマラ *P. harmala* の種子 S-1～6 も同様の形態を示し(Fig. 3), その表面もいずれも細かい凹状構造を示した。各試料の 20 粒重は $53.7 \pm 2.9\text{mg}$ から $59.0 \pm 2.3\text{mg}$ で、形状は長径が $3.2 \pm 0.1\text{mm}$ から $3.9 \pm 0.3\text{mm}$, 短径は $1.7 \pm 0.2\text{mm}$ から $1.9 \pm 0.2\text{mm}$ であり、市販ドラッグよりやや軽量であったが、大きさはほぼ同等であった (Table 3-IV) 。

Table 3- III . Size and 20-grain weight of *Peganum harmala*

Sample	Long Length (mm)	Short Length (mm)	20-grain weight(mg)
S-1	3.2 ± 0.1	1.7 ± 0.2	53.7 ± 2.9
S-2	3.9 ± 0.3	1.9 ± 0.2	55.3 ± 2.9
S-3	3.4 ± 0.1	1.8 ± 0.1	53.9 ± 2.3
S-5	3.4 ± 0.2	1.9 ± 0.2	59.0 ± 2.3

Table 3-IV . Size and 20-grain weight of Harmala sold as an abuse drug

Sample	Length	Breadth	20grain weight
H-1	3.4 ± 0.3	1.7 ± 0.2	60.8 ± 4.1
H-2	3.4 ± 0.2	1.8 ± 0.1	65.7 ± 3.6
H-3	3.5 ± 0.2	1.8 ± 0.1	65.9 ± 2.3
H-4	3.5 ± 0.2	1.7 ± 0.1	63.1 ± 1.9

3-2 植物体の形態観察による同定

H-1 の種子は播種後 1 週間から 2 週間で発芽し(Fig. 2c), さらに, 1 週間程度で本葉を展開した. 茎は直立し, 高さ 30~60cm になり, 基部から四方に分枝し (Fig. 3-2-D), 断面は円形で稜があり, 植物体は無毛でもむと異臭を発した. 葉は互生し (Fig. 3-2-E), 線形または披針状線形で 3~5 裂に全裂し(Fig. 2f), 裂片長は 1~3.5mm, 裂片幅は 1.5~3mm であった. 花は単生し, 白色から淡黄緑色で到卵状楕円形の花弁を 5 枚付けた (Fig. 3-2-G). 花期は 6 月~7 月上旬, 7 月下旬には 7~10mm の果実を形成し (Fig.3-2-H), 8 月には種子が成熟した. その他の H-2~4 についても同様に栽培したところ, H-1 と同様の形態を示した. また, S-1~6 も生育や, 草姿, 草丈, 茎, 葉などは, H-1 と変わらず, また, 開花した S-4 の花の形態も同一であった.

ハルマラ *P. harmala* の形態は, 中国植物誌 [1] および中国高等植物 [2] には, 植物体は無毛, 葉は線形または披針状線形で 3~5 裂に全裂し, 裂片長は 1~3.5mm, 裂片幅は 1.5~3mm と記載される. 同属植物である *P. nigellastrum* は, やや小さく, 草丈 10~25cm, 短く硬い毛で被われ, 葉は 2~3 回線形に深裂し, 裂片長は 0.7~10mm で幅は 1mm に満たなく, ハルマラ *P. harmala* と明らかに異なる. またかつてハルマラ *P. harmala* の亜種とされた *P. harmala* L. var. *multisecta* Maxim.は, 現在 *P. multisectum* と称されるが, 幼植物期に毛で被われる特徴があり, 茎は倒伏し, 葉は 2~3 回線形に深裂し, 裂片基部と葉軸が直角に交わると記述される. 裂片長も 6~12mm, 幅も 1~1.5mm で細長く, *P. harmala* とは明らかに識別可能な形態である.

以上の形態観察から, これらの市販ドラッグ H-1~4 および導入した植物 S-1~6 は, いずれもハルマラ *P. harmala* と同定した.

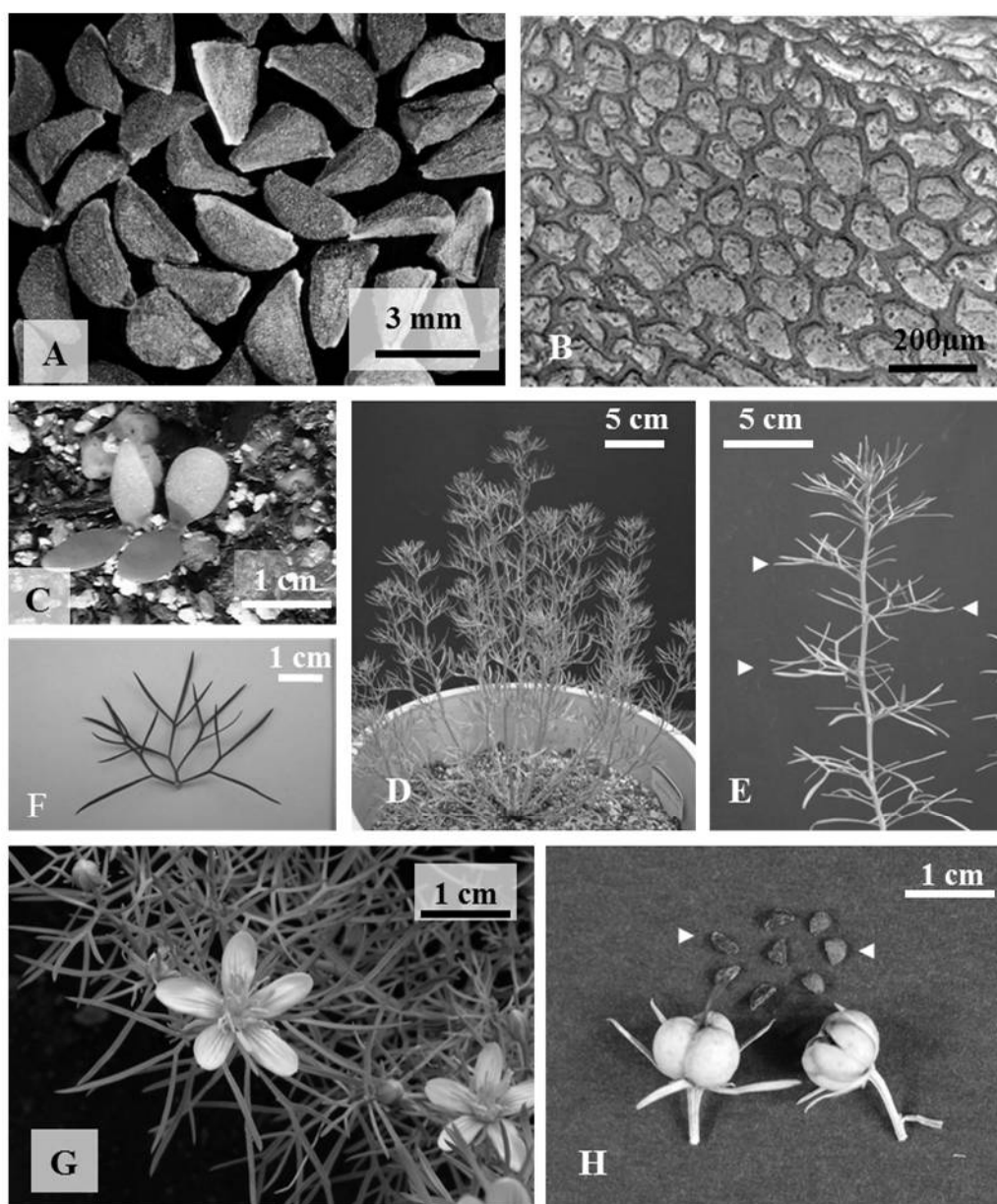


Fig. 3-2. Morphological characteristics of Harmala used as an abuse drug (H-1) and plant body of *Peganum harmala* cultivated from H-1

A: Angular brownish seeds, **B:** Alveolate structure on surface of seeds, **C:** Seedlings, **D:** Erect, glabrous, perennial herbaceous and terete below, angled above, much-branched stems, **E:** Leaves alternate (arrows), **F:** Deeply and irregularly pinnatisect leaves, **G:** Flower (from June to early July), **H:** Capsules and seeds (arrows)

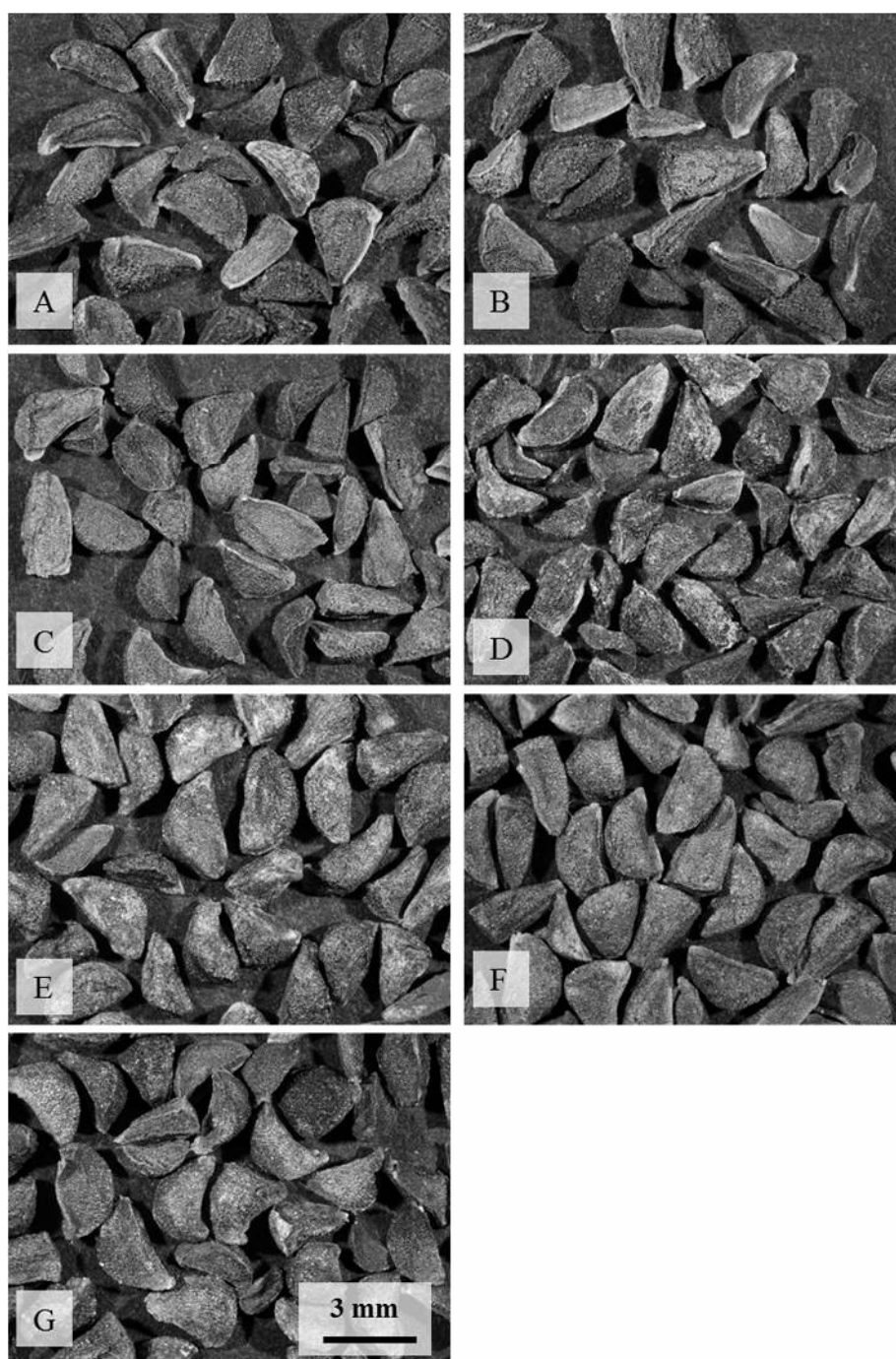


Fig. 3-3. Seeds of Harmala used as an abuse drug and *Peganum harmala*

A: H-2, B: H-3, C: H-4, D: S-1, E: S-2, F: S-3, G: S-5

3-3 ハルマリンおよびハルミンの定量

ハルマリンおよびハルミンの確認

H-1 について、種子、葉、茎および根のアルカロイド成分を TLC で検討した。種子からは、Rf 値 0.5 に暗所で、UV 365 nm を照射すると青白色の蛍光を発するハルマリンのスポット、Rf 値 0.6 に、UV 365 nm を照射すると青色の蛍光を発し、UV 254 nm を照射すると青紫色を示すハルミンのスポットを検出した (Fig.3-4)。また、両スポットは、ドラージェンドルフ試薬を噴霧するといずれも朱色を呈した。根は種子と同様に 2 成分が検出されたが、茎はハルミンのみでハルマリンは検出されなかった。葉については、6 月に採取した 1 年生株、2 年生株からは 2 成分とも検出されなかったが、1 月に採取した枯死した株からはハルミンを検出した。

HPLC 分析でも種子及び根には Rt 12.1 min, 12.6 min に、ハルマリンとハルミンのピークが検出され (Fig.3-5), PDA から得られた UV スペクトルはそれぞれ標準品の UV スペクトルと一致した。しかし茎からはハルミンのみであり、ハルマリンは検出されなかった。また生育株の葉からは 2 成分とも検出されないが、枯死した株の葉からは茎と同様にハルミンのみを検出した。

ハルマリンおよびハルミンの定量

harmaline 塩酸塩二水和物 0.0041~0.52 μ g を HPLC に注入し、ピーク高さ法により 4 点検量線を作成したところ $y = 107.8x + 230.0$ $r = 0.999$ の直線性が得られた。harmine 塩酸塩の 0.041~0.51 μ g を HPLC に注入し、ピーク高さ法により 4 点検量線を作成したところ $y = 223.5x + 356.4$ $r = 0.9999$ の直線性が得られた。

以上のことから、ハルマリンおよびハルミンの定量分析は可能と判断し、市販ドラッグ (H-1, 2, 3, 4) およびハルマラ *P. harmala* (S-1, 2, 3) の種子、さらに H-1 を栽培し得られた 1 年生株の葉、茎、根、2 年生株の種子、葉、茎、根に含まれるハルマリンおよびハルミンの定量分析を行った。

その結果、都内で購入した市販ドラッグと種子交換で導入したハルマラ *P. harmala* の種子のハルマリンおよびハルミン含量は、前者はハルマリン含量が 55.8mg から 83.1mg、平均 67.6 mg、ハルミン含量が 27.2mg から 70.9mg、平均 45.0 mg であった。後者はハルマリン含量が 87.0mg から 119.2mg 平均 105.0mg で、ハルミン含量が 39.7mg から 105.9mg 平均 65.8 mg であり、市販ドラッグの含量がいずれも低い値を示した (Table 3-V)。

市販ドラッグH-1を発芽させ、成長させた植物の各器官のハルマリンおよびハルミン含量は、根では1年生株のハルマリン含量が $0.4 \pm 0.4\text{mg}$ で、2年生株が $0.5 \pm 0.4\text{mg}$ であった。ハルミン含量は1年生株が $27.5 \pm 2.6\text{mg}$ で、2年生株が $34.4 \pm 5.4\text{mg}$ で根には両成分が含まれていた。根においては、ハルマリンよりハルミンが高含量であった（Table 3-VI）。

茎ではハルミン含量が、1年生株 $1.0 \pm 0.2\text{mg}$ であり、枯死した株では 0.93mg であった。2年生株の茎では $0.2 \pm 0.4\text{mg}$ であり、いずれも低含量であった。また、ハルマリンは茎では検出されなかった。葉については1年生株、2年生株でハルマリンおよびハルミン共に検出されなかったが、枯死した葉からはハルミンが僅かに検出された。

種子は2年目の9月に収穫したが、その分析結果はハルマリンが $95.7 \pm 5.6\text{mg}$ 、ハルミンが $55.7 \pm 7.4\text{mg}$ で共に高含量であった（Table 3-VI）。

Table 3-V. Contents of Harmine and harmaline in Harmala (H-1 ~H-4) sold as abuse drugs and the seeds of *Peganum harmala* (S-1, S-4, S-6)

Sample	No.	Contents of (mg/g)	
		Harmaline	Harmine
H-1~H-4	9	67.6 ± 11.1*	45.0 ± 18.8*
S-1, S-4, S-6	3	105.0 ± 16.4*	65.8 ± 35.2*

*Average ± SD

Table 3-VI. Contents of harmaline and harmine of each organ of *Peganum harmala* cultivated from H-1

	Organ	Date of collection	Contents of (mg/g)*	
			Harmaline	Harmine
One year old plant	Leaf	Jun. 2003	N.D.	N.D.
	Stem	Jun. 2003	N.D.	1.0 ± 0.2
	Root	Jun. 2003	0.4 ± 0.4	27.5 ± 2.6
	Dead leaf	Jan. 2004	N.D.	0.97
	Dead stem	Jan. 2004	N.D.	0.93
Two years old plant	Seed	Sep 2004	95.7 ± 5.6	55.7 ± 7.4
	Leaf	Jun. 2004	N.D.	N.D.
	Stem	Jun. 2004	N.D.	0.2 ± 0.4
	Root	Jun. 2004	0.5 ± 0.4	34.4 ± 5.4

*Average ± SD of 3 individuals

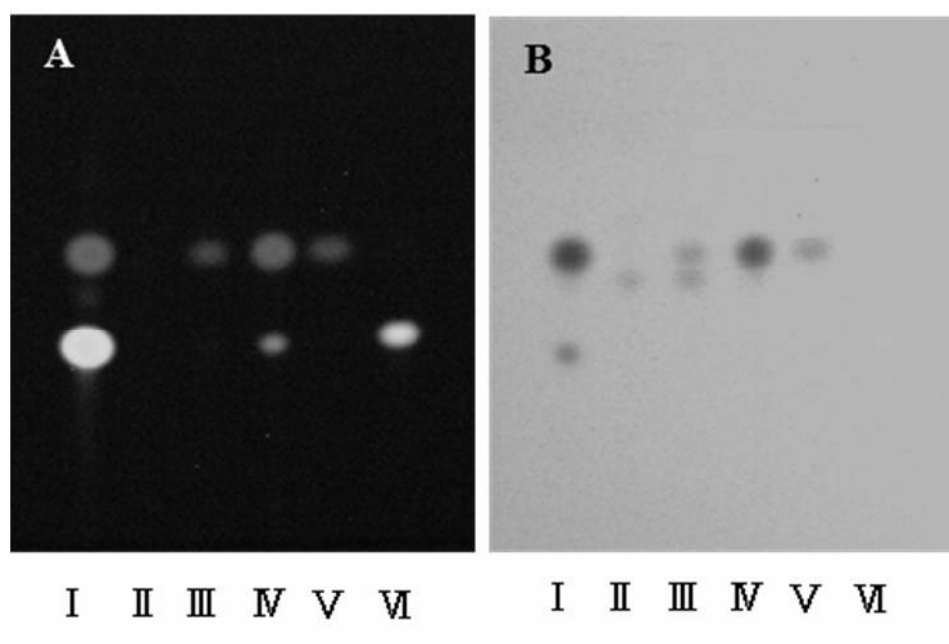


Fig. 3-4. TLC patterns of various organ of H-1

Development: CHCl_3 -MeOH-28% NH_4OH , 50:50:1,

Detection : A, UV 365 nm; B, UV 254 nm.

I : Seed, II : Leaf, III : Stem, IV : Root,

V : Harmine , VI : Harmaline

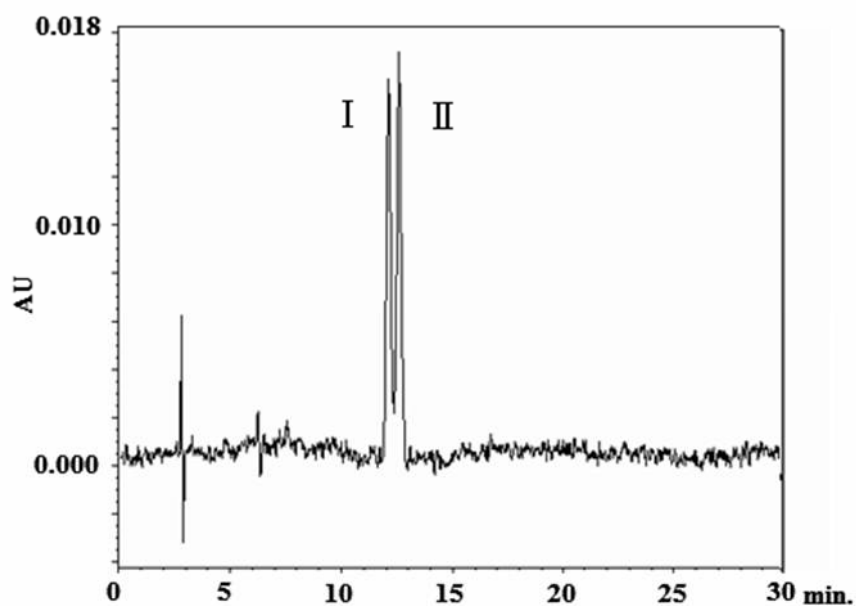


Fig.3-5. HPLC of harmine and harmaline extracted from H-1

HPLC condition : Column ; TSK gel ODS-80_{TS} 5 mm
 4.6×250 mm, Column temp. ; 40°C , Solvent ; MeOH :
 H_2O : SDS : H_3PO_4 (770 ml : 230 ml : 6 g : 1 ml),
 Flow ; 1.0 ml/min, Det. ; PDA (340 nm).

I : Harmaline, II : Harmine

第4節 結論および考察

乱用薬物ハルマラとして入手した植物種子は、いずれもハルマラ *P. harmala* が原植物であることを、今回種子を播種させ、生育にともなう形態観察から証明した。市販ドラッグおよび種子交換で入手したハルマラ *P. harmala* 種子はいずれも三稜形を呈し、文献記載[1,2]と一致するものである。中国に自生する他のペガヌム属植物である *P. multisectum* Bobr. および *P. nigellastrum* Bunge の種子は、前者が三角形、後者が紡錘形であり、ハルマラ *P. harmala* と明らかに異なると考察している。

ハルマラの同定法としては、以下3点の確認が必要である。

- ① 種子の大きさ、長径、短径、褐色～黒褐色の三稜形を確認する（Fig. 3-2-A, Fig. 3-3）。
- ② 種子表面を実体顕微鏡あるいはSEMで観察し、細かい凹状構造を確認する（Fig. 3-2-B）。
- ③ 高含量の薬物成分ハルマリンおよびハルミンを TLC および HPLC で分析し確認する。

特に TLC 分析は、Fig. 3-4 に示すようにハルマリンおよびハルミンが特異な蛍光スポットとして出現する優れた同定法と考える。

また、市販ドラッグおよび種子交換で入手した種子について、ハルマリンおよびハルミン含量を調べたところ、Table 5 に示すように市販ドラッグの方が低い値を示した。熟した果実はハルマリンおよびハルミン含量が高くなると、Degtyarev らは報告している [12]。これから類推すると、市販ドラッグにも、未熟な種子が含まれていた可能性は否定できない。

ハルマリン、ハルミンなどの β -carbolines は幻覚作用の他、脳の特定部位に蓄積し [20]、中枢神経系の海綿状変性や肝細胞のうっ血などを引き起こすと報告されている [21]。その一方で、 β -carbolines は MAO 阻害剤として DMT 等の薬物作用の増強を図ることが知られている [7, 15, 22 – 24]。Table 3-VI に示すように、他の植物器官に比べて種子には極めて高含量に存在するが、その含量変動は大きく、一定ではない。乱用薬物として興味本位に、ハルマリン、ハルミン含量の高い成熟した種子を服用すれば、予想もしない健康被害の発生が懸念される。

総 括

近年、危険ドラッグが関係している死亡事例、交通事故、救急搬送、不審行動等が社会問題となっており、薬物乱用防止の取締りが強化されている。

薬物乱用防止のための取締りに際して科学的根拠を提供するために、法律で規制される植物や、向精神作用を有する幻覚性植物について、植物種の同定は重要である。東京都では、健康被害の未然防止、犯罪の防止及び薬物乱用防止等の目的で、東京都内の危険ドラッグ専門店等で「危険ドラッグ」を購入し、東京都健康安全研究センターで試験検査を行ってきた。東京都薬用植物園では、麻薬原料植物等の規制植物や有毒植物等の混入を防止するために、ケシ・アサをはじめとする麻薬原料植物および危険ドラッグ等に使用される幻覚性植物を栽培し、行政機関から依頼される植物鑑別試験を行っている。

植物鑑別試験において、より精確・迅速・簡便に植物種の同定を行うために、従来の同定方法である個体の形態的・生態的特徴に加えて、実体顕微鏡および SEM 等を用いて微細な外部形態を観察するとともに、麻薬成分等の含有成分について分析し、合わせて DNA 情報による植物同定法についての研究を行っている。それぞれの植物種に応じた同定方法を確立する必要がある、幅広い知識と技術・経験が求められている。

本研究では、ハカマオニゲシ、ウバタマ、ハルマラの 3 種の幻覚性植物について、同定法に関する研究を行った。種の同定については、植物形態観察および SEM を用いた微細構造観察による形態学的同定法、フローサイトメトリーを応用した相対的核 DNA 含量による同定法および *trnL/trnF* 領域の DNA 配列による分子生物学的同定法、含有成分の成分分析について検討した。これらの同定法により、これまで開花株等の生殖成長期の植物体でしか行えなかった植物種の同定が、葉片や花の無い栄養成長期の植物体でも可能となった。

第 1 章のハカマオニゲシについては、これまで開花株の形態による同定以外は行われておらず、栄養成長期の植物体の同定は困難であった。平成 23 年にハカマオニゲシの幼苗が、規制されていないオニゲシ類と誤認されて、全国規模で大量に流通する事例があり、栄養成長期の植物体の迅速同定法の開発が急務となったため、フローサイトメトリーによる倍数性の違いによる同定法について検討した。その結果、染色体数の差異（ハカマオニゲシ（ $2n=2x=14$ ）：2 倍体、オニゲシ（ $2n=2x=28$ ）：4 倍体、ニセオニゲシ（ $2n=2x=42$ ）：6 倍体）により、フローサイトメトリー

を用いた迅速な同定が可能となった。このことにより、栄養成長期の植物体においても、ハカマオニゲシの同定が可能となり、その後の不正栽培の取締りに科学的根拠を提供することが可能となった。

また、第2章のウバタマは麻薬成分であるメスカリンを含有し、原産地ではペヨーテと呼ばれ、古くから医療や呪術を用いた宗教行事などに用いられたことで有名な幻覚性植物である。メスカリンおよびペヨーテは、アメリカ合衆国規制物質法において最も乱用の危険性が高いとされる Schedule I の薬物に指定され、栽培・所持が禁じられている。しかし、日本国内では栽培についての規制がなく、これまで正確な分類に基づいた同定法の報告がなかった。このことから、本研究では、日本国内で流通するウバタマとその関連植物について、形態観察から種を同定し、SEM による表皮等の観察、メスカリン含有量を測定するとともに、*trnL/trnF* 領域の DNA 配列を解析し比較して、それぞれの配列を明らかにした。さらに、迅速で簡便な同定方法を開発するために、PCR-RFLP 法および LAMP 法を検討した結果、PCR-RFLP 法により配列を確認しなくても同定が可能になり、LAMP 法により、PCR-RFLP 法よりもさらに短時間かつ高感度で、ウバタマを検出することが可能となった。

第3章のハルマラは、北アフリカ、中東、地中海沿岸から東アジアの乾燥地に生育し、古くから医療や呪術を用いた宗教行事などに用いられている幻覚性植物である。種子や根に幻覚成分を含み、モノアミンオキシダーゼ (MAO) の阻害活性や、脳の中樞神経への作用が報告されている。近年、国内で乱用薬物の1つとして植物系ドラッグに用いられたが、原料植物のハルマラはこれまで国内に導入された経緯がなく、植物の詳細について報告がなかった。そのため、本研究では、海外から導入したハルマラの種子を播種・育成し、形態による同定を行い、成分分析を実施した。その結果、乱用薬物ハルマラとして入手した植物種子は、いずれもハルマラ *P. harmala* が原植物であることを確認した。また、ハルマラの同定は、種子の形態観察、成分分析により可能であった。なお、市販ドラッグと種子交換で入手した種子について、ハルマリニンおよびハルミン含量を調べたところ、極めて高含量であることが明らかになった。ハルマリニン、ハルミンなどの β -carbolines は、LSD と同様の幻覚作用を示す他、脳の特定位に蓄積し、中樞神経系の海綿状変性や肝細胞のうっ血などを引き起こすと報告されている。そのため、ハルマラを乱用することにより、予想もしない健康被害が懸念される。

本研究により、ハカマオニゲシについては、幼苗期においても、フローサイトメトリーによる迅速な同定が可能になった。また、ウバタマについては、形態と麻薬成分の関係を明らかにし、PCR-RFLP 法および LAMP 法により、形態では同定できない粉碎物における同定法を開発

した。ハルマラについては、国内で初めて原料植物を導入し、その形態を明らかにするとともに、幻覚成分を定量し、その有害性を明らかにした。その結果、3種の幻覚性植物の成熟した植物体のみならず、未熟な幼植物や葉片、種子等でも同定が可能となり、薬物指導取締行政に貢献することとなった。

法律で栽培等が規制されている植物についての知識は、植物に携わる者には重要である。農学・薬学関係の研究者はもちろんのこと、農家や販売業者においても、知識がないばかりに規制植物を栽培して法律を犯してしまう危険や、規制植物を流通・販売してしまう危険がある。数年前にケシの園芸品種が都内に流通した事例や、ハカマオニゲシが国内全域に流通し、インターネット販売された事例があった。また、家庭や河川敷などで大量にアツミゲシを栽培してしまうという事例も散見される。そのような不正栽培は、社会に及ぼす影響が大きく、農家や販売・流通業者の金銭的損失も大きくなる。そのような事態を防止するため、規制植物を簡便に同定し、それらに似ている植物を識別できるようにすることは、非常に重要である。

また、近年の「危険ドラッグ」についても、「(脱法・合法) ハーブ」という名称により、あたかも危険のない自然なイメージを先行させている。このような、人体に深刻な健康被害を及ぼすような薬物の流通を許してはならない。薬物乱用についても、植物に携わる者として、正しい知識を持ち、危険な薬物が乱用されないように、周囲を指導・育成していく責務がある。

東京都薬用植物園では、実際に薬物乱用を取り締まる麻薬取締員や警察関係者、流通市場関係者、薬学生、医学生、看護学生、一般都民に対して、規制植物や危険ドラッグに関する研修を行っている。ぜひ、農学を学ぶ学生にも、これらの知識を身に付けてほしいと願っている。

本研究で得られた結果を踏まえ、今後もしまだに同定法の確立されていない規制植物や、乱用が懸念される幻覚性植物について、薬物乱用防止に役立てるための同定法に関する研究を行っていく所存である。

特に、「麻薬及び向精神薬取締法」で規制されているコカとジャワコカの同定法の確立が必要である。また、ウバタマと同様に麻薬成分のメスカリンを含有するサンペドロと呼ばれるサボテンについても、同定法が確立されていない。サンペドロはエキノプシス属のサボテンの一種であるが、エキノプシス属植物は現在 60 種類以上の種が報告されているため、種の同定が困難である。その他の幻覚性植物についても、同定法が確立されていない植物や、植物体が国内に導入されていない植物も多いため、今後とも海外から植物を導入し、同定法についての研究を行っていきたいと考えている。

引用文献

緒論

1 法律で規制される植物と幻覚性植物

1. The Journal of Toxicological Sciences, Vol.24, No.5, app. 147-158, 1999
2. 麻薬・覚醒剤行政の概況, 厚生労働省医薬品食品局監視指導・麻薬対策課, 2014
3. 船田正彦, 植物由来催幻覚成分の薬物依存性および細胞毒性の評価, 平成 16 年厚生労働省科学研究費補助金(厚生労働省科学特別研究事業)総括研究報告書
4. Anderson EF (1980) Peyote, The Divine Cactus, The University of Arizona Press, Arizona, pp 179-189 (1), pp 8-19 (2), pp 191-203 (3), pp 205-209 (4)
5. けし植物図譜, 厚生労働省薬務局麻薬課, 1988
6. Milo J, Levy A, Plavitch D (1998) An alternative raw – The cultivation and breeding of *Papaver bracteatum*. In: Bernáth J (ed) Poppy The Genus *Papaver*. Taylor and Francis Group, New York
7. Jun W., Elizabeth A. Z., Mol. Phylogenet. Evol., 6,167-177(1999)
8. Cao H., Sasaki Y., Fushimi H., Komatsu K., Biol. Pharm. Bull., 24, 1389-1394(2001)
9. Barkmann T. J., Lim S. H., Salleh K. M., Nais J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101,787-792(2004)
10. Sorscher E.J.,Huang Z., Lancet, 337, 1115-1118(1991)
11. C. Chang *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6856 (1988)
12. 米田好文ら, 組織培養, 18, 149 (1992)
13. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T., Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Nucleic Acids Res. 28 (12), e63 (2000)

14. Kuboki N., Inoue N., Sakurai T., Cello F. D., Grab D.J., Suzuki H., Sugimoto C., Igarashi I., J. Clin. Microbiol., 41,5517-5524(2003)
15. Annaka T., Kojima T., Ikedo M., Furuhashi K., J.Antibact. Antifung. Agents, 32, 195-201(2004)
16. Sasaki Y., Nagumo S., Biol. Pharm. Bull., 30, 2229-2230(2007)
17. 三柴啓一郎・三位正洋. 1998.フローサイトメトリー自由自在 植物研究への応用. 細胞工学. 17: 609-615.
18. Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science 220: 1049-1051
19. Dolezel J, Gohde W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. Cytometry 19: 103 - 106 (1995)

第1章 ハカマオニゲシ *Papaver bracteatum* Lindl. のフローサイトメトリーを使用した迅速同定法

1. Narcotics and Psychotropic Control Act of Japan. Act No. 14 of 1953, amended on 19 June 1990 (Act. No. 33 of 1990)
2. Goldblatt P (1974) Biosystematic studies in *Papaver* section *Oxytona*. Ann Mo Bot Gard 61:264-296
3. Milo J, Levy A, Plaevitch D (1998) An alternative raw – The cultivation and breeding of *Papaver bracteatum*. In: Bernáth J (ed) Poppy The Genus *Papaver*. Taylor and Francis Group, New York, pp 279-289
4. Kubota M, Arai K, Yorimitu A, Shimaoka M, Hoshino K, Hayashi K, Ida H, Minami N, Yamamoto H, Tanaka K, Takada M, Nishihara M, Fujitani K, Kohda H (1993) Studies of *Papaver* section *Oxytona* growing as garden plants on *Papaver bracteatum* Lindl. Yakugaku Zasshi 113:810-817 (in Japanese)

5. Hosokawa K, Shibata T, Nakamura I, Hishida A (2004) Discrimination among species of *Papaver* based on the plastid *rpl16* gene and the *rpl16-rpl14* spacer sequence. Forensic Sci Int 139:195-199
6. Ohta S, Osumi S, Katsuki T, Nakamura I, Yamamoto T, Sato Y (2006) Genetic characterization of flowering cherries (*Prunus* subgenus *Cerasus*) using *rpl16-rpl14* spacer sequence of chloroplast DNA. J Japan Soc Hort Sci 75:72-78
7. Ohnuki N, Terajima K, Mori K, Nakamura Y, Yokoyama T, Ito K, Yoshizawa M, Iwasaki Y, Ibuki N (2002) Research on the narcotic ingredient contained in horticulture kind ONIGESHI (I). Ann Rep Tokyo Metr Res Lab Pub Health 53:49-55 (in Japanese)
8. Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science 220: 1049-1051
9. Sariyar G (2002) Biodiversity in the alkaloids of Turkish *Papaver* species. Pure Appl Chem 74:557-574

第2章 ウバタマ *Lophophora williamsii* の形態、メスカリン含有量および *trnL/trnF* 領域の DNA 配列による同定法

1. Ishii Y and Inoue Y (1971) Encyclopedia of Horticulture, Volume 3, Seibundoshinkosha, Tokyo, pp 1073-1074
2. Habermann V (1975) Two red flowering species of *lophophora*. Cactus and Succulent Journal vol. XLV II :157-160
3. Anderson EF (1980) Peyote, The Divine Cactus, The University of Arizona Press, Arizona, pp 179-189 (1), pp 8-19 (2), pp 191-203 (3), pp 205-209 (4)
4. Sato T (1996) Cactus Handbook, Japan Cactus Planning Co. Press, Fukushima, pp 144-145
5. Hirao H, Kodama E (1999) Cactus and Succulent Plant, NHK Press, Tokyo, pp 93-94

6. Ito Y (1988) The Great Lexicon of Cactaceae, Mirai-sha, Tokyo, pp 577-578
7. Britton NI and Rose JN (1963) The Cactaceae, Volume III, Dover Publications, Inc., New York, pp 83-85
8. David H (1999) Cites Cactaceae Checklist, Second Edition, Royal Botanic Gardens Kew, London, pp 74
9. Christian R (2005) The Encyclopedia of Psychoactive Plants, Park Street Press, Vermont, pp 326-341
10. Kostoudi S, Mironidou-Tzouveleki M (2006) Hallucinogenic cacti: Complicated chemical factories. Rev Clin Pharmacol Pharmacokinet 20: 214-215
11. Jan GB and Catarina B (1973) Alkaloids and ethnobotany of Mexican peyote cacti and related species. Econ Bot 27: 241-251
12. Jan GB, Lindgren JE and Holmstedt B (1978) Peyote alkaloids: Identification in a prehistoric specimen of *Lophophora* from Coahuila, Mexico. Science 199: 1437-1438
13. McLaughlin JL and Paul AG (1966) The cactus alkaloids. I: Identification of N-methylated tyramine derivatives in *Lophophora williamsii*. Lloydia 29: 315-327
14. Sorscher E.J., Huang Z., Lancet, 337, 1115-1118(1991)
15. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T., Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Nucleic Acids Res. 28 (12), e63 (2000)
16. Kuboki N., Inoue N., Sakurai T., Cello F. D., Grab D.J., Suzuki H., Sugimoto C., Igarashi I., J. Clin. Microbiol., 41,5517-5524(2003)
17. Annaka T., Kojima T., Ikedo M., Furuhata K., J.Antibact. Antifung. Agents, 32, 195-201(2004)
18. Sasaki Y., Nagumo S., Biol. Pharm. Bull., 30, 2229-2230(2007)

第3章 ハルマラ *Peganum Harmala* の同定と ハルマリンおよび ハルミンの

含有量について

1. 中国科学院中国植物誌編集委員会, 中国植物誌第 43 卷第 1 分冊, 科学出版社, 北京, 1998, p123-125.
2. 傅立国, 陳潭清, 郎階永, 洪 涛, 林 祁, 中国高等植物第 8 卷, 青島出版社, 青島市, 2001, p51-453.
3. Tutin, T. G., Flora of Europaea II, Cambridge University Press, London, 1980, p204-205.
4. Zohary M., Feinbrun N. Flora Palaestina, The Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem, Israel, 1972, p.245.
5. El-Bahri, L., Chemli, R., *Vet. Hum. Toxicol.* **33**, 276-277 (1991).
6. 上海科学出版社, 中藥大辞典第 4 卷, 小学館, 東京, 1998, p2644-2645.
7. Callaway, J. C., Mckenna D. J., Grob, C. S., Brite, G. S., Mash, D. C., *J. Anal. Toxicol.*, **20**, 492-497 (1996).
8. Shapira, Z., Terkel, J., Egozi, Y., Nyska, A., Friedman, J., *J. Ethnopharmacol.*, **27**, 319-325 (1989).
9. 船山信次, アルカロイド, 共立出版, 東京, 1998, pp.81-83.
10. 島峯望彦, 高橋一徳, 大野昌子, 衛生試験 **99**, 79-83 (1981).
11. Airaksinen, M. M., Kari, I., *Med. Bio.* **59**, 21-34 (1981).
12. Degtyare, V. A., Sadykov, Y. D., Aksenov, V. S., *Chem. Nat. Com.* **20**, 240-241 (1984).
13. Al-Shamma, A., Drake, S., Flynn, D. L., Mitdsheer, L. A., Park, Y. H., Raa, G. S. R., Simpson, A., Swayze, J. K., Veysoglu, T., Wu, T.-S., *J. Nat. Pro.* **44**, 745-747 (1981).
14. Kartal, M., Altun, M. L., Kurycu, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**, 263-269 (2003).

15. Pranzatelli,M.R., Snodgrass,S.R., *Exp. Neurol.* **96**, 703-719 (1987).
16. Abdel-Fattah, A. F., Matsumoto, K., Gammaz, H. A.,Watanabe, H., *Pharmacol. Biochem. Behav.* **52**, 421-426 (1995).
17. Stratton, S. E., Lorden, J. F., *Neuroscience*, **41**, 543-549 (1991).
18. O`Hearn, E., Molliver, M. E., *Neuroscience*, **55**, 303-310 (1993).
19. Massoud M., Hossein J., Pirooz S. *Iranian J. Pharma. & Thera.* **1**, 1-4 (2002).
20. Moncrieff, J., *J. Chromatogr.* **496**, 269-278 (1989).
21. Lamchouri, F., Settaf, A., Cherrah, Y., Hamidi, M. El.,Tligui,N.S., Lyoussi,B., Hassar,M., *Ann. Pharm. Fr.*, **60**, 123-129 (2002).
22. 丸山卓郎, 川原信夫, 吹春俊光, 横山和正, 牧野由紀子, 合田幸広, 食衛誌 **46**, 49-54 (2005).
23. Nakagawasai O., Arai Y., Satoh. S., Satoh N., Neda M., Hozumi M., Oka R., Hiraga H., Tadano T. *Neuro Taxi.* **25**, 223-231 (2004).
24. Brush D. E., Bird S. B., Boyer E.W. *J. Toxi.* **42**, 191-195 (2004).

本研究は、以下の論文をまとめたものである。

1. Rapid identification of a narcotic plant *Papaver bracteatum* using flow cytometry

Aragane M., Watanabe D., Nakajima J., Yoshida M., Yoshizawa M., Abe T., Nishiyama R., Suzuki J., Moriyasu T., Nakae D., Sudo H., Sato H., Hishida A., Kawahara N., Makabe S., Nakamura I., Mii M., J Nat Med, **68 (4)**, 677-685 (2014)

2. Peyote identification on the basis of differences in morphology, mescaline content, and *trnL/trnF* sequence between *Lophophora williamsii* and *L. diffusa*

Aragane M., Sasaki Y., Nakajima J., Fukumori N., Yoshida M., Suzuki Y., Kitagawa S., Mori K., Ogino S., Yasuda I., Nagumo S., J Nat Med, **65 (1)**, 103-110 (2011)

3. Rapid and Sensitive Detection of *Lophophora williamsii* by Loop-Mediated Isothermal Amplification

Sasaki Y., Fujimoto T., Aragane M., Yasuda I., Nagumo S., Biol.pharm. Bull, **32 (5)**, 887-891 (2009)

4. 乱用薬物ハルマラの鑑定と *Peganum Harmala* 中の harmaline 及び harmine 含量

荒金眞佐子, 中嶋順一, 福田達男, 吉澤政夫, 鈴木幸子, 北川重美, 安田一郎, 生薬学雑誌, **62 (2)**, 35-42 (2008)

謝 辞

本論文は、著者が多くの先生方、諸先輩方、同僚の皆様からの多大なご指導とご助言、ご助力を賜りながら行った研究をまとめたものである。

本論文作成に当たり、主査をしていただきました今村順玉川大学学術研究所長のご指導に深謝いたします。副査をしていただきました小野正人教授(玉川大学大学院 農学研究科長 農学部 長 総合農学研究センター長)、渡邊博之教授(玉川大学 学術研究所 生物機能開発研究センター)、学外副査をしていただきました東京薬科大学の安田一郎教授(東京薬科大学 薬学部 医療薬物薬学科 薬事関係法規研究室 (元東京都健康安全研究センター)), 教務担当の新本洋士教授(玉川大学 農学部 生命化学科) に、ご指導をいただいたことを深謝いたします。

今村順教授には、貴重なご意見をいただき、渡邊博之教授と新本洋士教授に貴重なご助言をいただきました。小野正人教授には紹介の労を賜り、学位取得に向けて暖かい励ましをいただいたことを深く感謝いたします。

安田一郎教授には長年ご指導をいただき、TLCなどの成分分析について一から教えていただくなど、多大なご助力をいただきました。本論文作成に当たりまして、貴重なご意見とご指導をいただいたことに深く感謝いたします。

第1章のハカマオニゲシの同定に関する研究では、東京都健康安全研究センターの中江大部長に多大なご指導とご助力をいただきました。また、同センターの守安貴子医薬品研究科長に感謝いたします。東京都福祉保健局健康安全部薬務課(元東京都薬用植物園)の渡辺大介様、東京都健康安全研究センター(元東京都薬用植物園)の中嶋順一様、同センターの吉田正雄様、鈴木仁様のご指導とご助力がなくては、本研究ができませんでした。長年東京都薬用植物園でケシ・アサ等の麻薬原料植物について研究を重ねていた吉澤政夫様(元東京都薬用植物園)、薬事監視員として規制植物の不正栽培取締りを実施した阿部朋弘様(東京都薬用植物園)、西山麗様(東京都健康安全研究センター(元東京都薬用植物園))に深謝いたします。中嶋順一様には、常日頃から激励をいただき、阿部朋弘様には日常業務および本論文作成において、多大なご協力をいただきました。吉澤政夫様には、ケシ・アサ等の栽培技術および鑑定技術等のご指導をいただき、本研究についても多大なご助力をいただきました。

フローサイトメトリーについてのご助言とご指導をいただきました三位正洋千葉大学名誉教授(千葉大学環境健康フィールド科学センター(元千葉大学園芸学部園芸学研究科 植物細胞工学研究室)), 星薬科大学の須藤浩先生(星薬科大学 薬用植物研究室 薬用植物園)に, 深く感謝いたします。また, フローサイトメトリーの実験に際して, 多大なご協力をいただいた佐藤裕之様(沖縄美ら島研究センター(元千葉大学園芸学部園芸学研究科 植物細胞工学研究室))に深く感謝いたします。DNA 配列については, 中村郁郎先生(千葉大学園芸学部園芸学研究科 植物細胞工学研究室)と真壁壮様(同研究室)に多大なご協力をいただきましたことを, 深く感謝いたします。

ハカマオニゲシの実験に際して, 貴重な種苗の提供をいただきました, 独立行政法人 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター筑波研究部の川原信夫所長ならびに同センター北海道研究部の菱田敦之室長に深謝いたします。

第2章のウバタマの同定に関する研究では, 植物のDNA鑑別について, 一から教えていただいた佐々木陽平先生(金沢大学医薬保健研究域薬学系 資源生薬学研究室(元星薬科大学薬用植物研究室))に深く感謝いたします。佐々木陽平先生には, 本論文作成に際しても, 多大なご指導と激励をいただきました。また, 星薬科大学薬用植物研究室に, 快く研究生として迎えてご指導いただきました南雲清二星薬科大学名誉教授(元星薬科大学薬用植物研究室)に深謝いたします。DNAの実験に際しては, 鈴木敦子様(東京都健康安全研究センター(元星薬科大学薬用植物研究室))にご助力をいただき, 故滝戸道夫日大名誉教授には, 暖かい励ましをいただきました。成分分析については中嶋順一様(東京都健康安全研究センター)に, SEMの観察に際しては福森信隆様(元東京都健康安全研究センター)に, 多大なご協力をいただきました。吉澤政夫様(元東京都薬用植物園), 鈴木幸子様(元東京都薬用植物園), 北川重美様(元東京都薬用植物園園長), 森謙一郎様(元東京都健康安全研究センター科長), 荻野周三様(元東京都健康安全研究センター部長), 安田一郎教授(東京薬科大学(元東京都健康安全研究センター科長))にご助言, ご協力をいただいたことに感謝いたします。国立感染症研究所 感染症疫学センターの藤本嗣人室長に, 本論文作成に当たり暖かい励ましをいただきました。

第3章のハルマラの同定に関する研究では, 福田達男先生(北里大学薬学部附属薬用植物園(元東京都薬用植物園))に, 多大なるご指導とご助力, ご協力を賜りましたことに深謝いたします。福田達男先生には, 長年栽培研究等のご指導をいただきました。なお, 成分分析に際しては, 中嶋順一様(東京都健康安全研究センター)に多大なご協力をいただきました。安田一郎教授(東京薬科大学(元東京都健康安全研究センター))に貴重なご指導とご助力をいただき, 吉澤政

夫様，鈴木幸子様，北川重美様にご助言，ご協力をいただいたことに感謝いたします．

本論文作成に使用しました研究植物の栽培管理に関して，東京生薬協会の皆様に多大なご協力をいただきました．また，東京都健康安全研究センター薬事環境科学部医薬品研究科の皆様に，多大なご助力をいただきましたことを感謝いたします．

Thesis summary

Author: Masako Aragane

Title: Research on identification methods for hallucinogenic plants

Drug-control-related laws and regulations restrict cultivation, possession, and selling of some plants. In Japan, eight plants which contain narcotic and/or hallucinatory components are under the control of such laws: *Papaver somniferum*, *Papaver setigerum*, *Papaver bracteatum*, *Erythroxylon coca*, *Erythroxylon novogranatense*, mushroom that contains psilocybin, psilocin, or their salts (magic mushroom), *Salvia divinorum*, and *Cannabis sativa*. They, in appearance, closely resemble plants of the same family which are not restricted. Thus, it is required to closely examine features of those plants and discern them without fail.

Hallucinogenic plants with psychotropic activity have been utilized since ancient times for various purposes. Effective components contained in these plants are known to have structures similar to brain transmitters, to modify states of consciousness when consumed, and then to induce altered state of consciousness. Recently, deaths, traffic accidents, transportation to hospitals by ambulances, and suspicious behaviors which are caused as a result of the use of so-called “dangerous drugs” containing chemical components similar to narcotics or other illegal substances have become a social problem, and controls over such drugs to prevent abuse have been tightened.

Regarding plants which are regulated by laws and regulations and hallucinogenic plants with psychotropic activity, identification of plant species is of great importance in order to provide scientific evidences required for the control aiming at prevention of drug abuse. Medical Plant Garden, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health cultivates narcotics-producing plants including *Papaver somniferum* and *Cannabis sativa* as well as hallucinogenic plants which are used in “dangerous drugs”, and performs plant differentiation tests as requested by governmental agencies, with the purpose of preventing contamination with regulated plants such as narcotics-producing plants and poisonous plants.

In this research, identification methods for three hallucinogenic plants, i.e., *Papaver bracteatum*,

Lophophora williamsii, and *Peganum harmala* were explored. Methods evaluated for the identification of species include morphological methods by the observation of plant morphologies and by SEM observation of the microstructures, a method based on relative nucleic DNA content with the application of flow cytometry, a molecular biological method based on DNA sequencing in the *trnL/trnF* region, and component analysis of the constituents.

This research enabled rapid identification of *Papaver bracteatum* even at the seedling stage with flow cytometry. Also, for *Lophophora williamsii*, relationship between the morphology and the presence of narcotic components was clarified, and identification methods with PCR-RFLP and LAMP methods, which allow identification using crushed samples, with which morphological identification is not possible, were developed. Regarding *Peganum harmala*, by the first introduction of the plant into Japan, the morphology was described, the hallucinogenic components were quantified, and their toxicity was elucidated. As the results, this research made it possible to identify these three species not only with matured plant body but also with immature seedlings, leaf pieces, or seeds, and contributed to government's guidance and control over drugs.

Other than the three hallucinogenic plants for which identification methods were developed in this study, lots of plants are known to have psychotropic activities and some of them are treated as narcotics in other countries. I plan to conduct study on the identification methods for regulated plants for which any identification methods has not been established yet and for other hallucinogenic plants for which abuse is concerned, by applying the results of this research.