

薬用植物の多様性と品質管理に関する研究：
黄連と大麻草について

北村 雅史

平成 30 年 3 月

博士論文

薬用植物の多様性と品質管理に関する研究： 黄連と大麻草について

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

分子生薬学研究室

学籍番号：1529012003

氏名：北村 雅史

主任指導教官名：佐々木 陽平

目次

序論.....	1
本論	
第一章 漢方生薬「黄連」の品質に関する研究	
緒言.....	4
第一節 日本産黄連原植物の鑑別	
第一項 実験材料・方法.....	8
第二項 実験結果	8
第三項 実験考察	12
第二節 日本産黄連の原植物の形態学的・遺伝学的多様性について	
第一項 実験材料・方法.....	13
第二項 実験結果	15
第三項 実験考察	19
第三節 日本産黄連原植物の新規鑑別法と品質管理への応用	
第一項 実験材料・方法.....	20
第二項 実験結果	23
第三項 実験考察	27
小括.....	29

第二章 大麻草の DNA に基づいた鑑別法

緒言.....	30
第一節 LAMP 法による系統鑑別法について	
第一項 実験材料・方法.....	34
第二項 実験結果	36
第三項 実験考察	38
第二節 LAMP 法による大麻草鑑別法について	
第一項 実験材料・方法.....	39
第二項 実験結果	41
第三項 実験考察	43
第三節 大麻草のオンサイト LAMP 法への応用	
第一項 実験材料・方法.....	44
第二項 実験結果	45
第三項 実験考察	49
小括.....	50
実験の部	51
引用文献	58
謝辞.....	62

序論

薬用植物は一般に加工され生薬として漢方方剤に用いられる他、医薬品原料や食品など様々な目的で使用される。生薬は自然の産物に由来していることから、それらの品質には必然的にばらつきが生じる。ばらつきの要因は、原植物、生育環境、加工調製法といった遺伝的、環境的、人為的な要素が挙げられる。薬用植物・生薬には医薬品原料として安定した品質が要求されるため、品質を評価し、把握することは重要な課題となっている。前述のばらつきの要因のうち、品質に最も影響を与えるものは原植物であると考えられる。原植物の違い、すなわち種の違いや変種・亜種などに由来する生薬は品質を変動させる非常に大きな要因である。原植物の違いを明確にする方法には大きく分けて組織学的、理化学的、そして分子生物学的手法があり、それぞれ対象物に適した方法が採用される。分析機器や技術の発展とともに品質の評価方法も進歩しており、精度や簡便性向上のために様々な工夫が試みられている。

本研究では、薬用植物・生薬の多様性の解明及び品質管理法を開発する目的で原植物の同定・鑑別に視点をおき、組織学的手法と分子生物学的手法による原植物の多様性の解明、変種間の鑑別法を漢方生薬「黄連」を対象に、そして分子生物学的手法の発展型である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を「大麻草」を対象に実施した。

第一章では、漢方生薬「黄連」の原植物に関する研究を行った。黄連 (*Coptidis Rhizoma*) はキンポウゲ科オウレン属の根茎に由来する生薬であり、第 17 改正日本薬局方には *Coptis japonica* Makino, *Coptis chinensis* Franchet, *Coptis deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao, *Coptis teeta* Wallich の 4 種が規定されている¹⁾。日本に自生するのは *Coptis japonica* のみであり、本種はさらにキクバオウレン (*Coptis japonica* var. *anemonifolia*)、セリバオウレン (*C. japonica* var.

major), コセリバオウレン (*C. japonica* var. *japonica*) の3変種に分類されている (Table 1). このうち, 薬用資源として重要なのが, キクバオウレンとセリバオウレンの2変種であり, これらは葉の形態で鑑別される. 自生するオウレンの葉の形態は地域・個体ごとに多様性が認められるため, 従来の手法により変種を決定できない個体も存在する. そのため, 第一章では, 組織学的・分子生物学的手法を用いて, 黄連原植物の多様性の解明, 従来の鑑別法の検証, 新規鑑別法の開発と品質評価への応用に関する研究を行った.

第二章では「大麻草」に関する分子生物学的な鑑別法の開発を行った. 大麻草 *Cannabis sativa* L. はアサ科の一年草で, 大麻草の所持や栽培は大麻取締法で厳しく制限されている. 一般的に, 大麻草の鑑別は理化学的検査や形態学的検査により行われ, 大麻草に特徴的な成分であるカンナビノイド類化合物を定性的にもしくは葉の剛毛や腺毛などを組織学的に探索することで行われる

(Table 2). 近年では, 分子生物学的な手法も多く報告されており, DNAによる鑑別法が新たな選択肢の一つとなっている. しかしながら, DNAによる従来の鑑別法は煩雑な操作を伴い, さらには実施場所もDNA検査設備の整った実験室内に限定される. このため, 第二章では, 実務応用性に優れ, オンサイト鑑別法としての潜在能力も有するLAMP法に着目し, 迅速簡便な大麻草の鑑別法の確立を目指した.

Table 1 Variety differences of *Coptis japonica*

	Morphological characteristics ²⁾	Chemical characteristics ³⁾	Molecular biological characteristics ⁴⁾
	Leaf shape	Alkaloid: components and contents	DNA sequences (Accession no.)
<i>C. japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>anemonifolia</i> (Siebold et Zucc.) H. Ohba (キクバオウレン)	ternate compound leaf	berberine :+++ jaterorrhizine :+++ coptisine :++ palmatine :+	<i>trn</i> L-F : KR697588 <i>trn</i> H- <i>psb</i> A : AB163752 ITS : AB695574
<i>Coptis japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>major</i> (Miq.) Satake (セリバオウレン)	bi-ternate compound leaf	berberine :+++ jaterorrhizine :+ coptisine :++ palmatine :++	<i>trn</i> L-F : KR697589 <i>trn</i> H- <i>psb</i> A : KR697586 ITS : KR697578
<i>Coptis japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>japonica</i> (コセリバオウレン)	tri-ternate compound leaf	berberine :++ jaterorrhizine :++ coptisine :+ palmatine :+	<i>trn</i> L-F : no data <i>trn</i> H- <i>psb</i> A : AB163751 ITS : AB695605

Table 2 *Cannabis sativa* detection methods

	Tissues			
	Leaf	Stem	Root	Seed
Morphological detection ^{5, 6)}	○	-	-	○
Chemical detection	○	△	-	△
DNA-based detection	○	○	○	○

○: suitable method, △: detectable method, -: unsuitable method

本論

第一章 漢方生薬「黄連」の品質に関する研究

緒言

黄連 (*Coptidis Rhizoma*) は第 17 改正日本薬局方に「本品はオウレン *Coptis japonica* Makino, *Coptis chinensis* Franchet, *Coptis deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao 又は *Coptis teeta* Wallich (Ranunculaceae) の根をほとんど除いた根茎」と規定されている¹⁾。Berberine, palmatine, coptisine などのアルカロイドを含有し、主成分である berberine は抗炎症・抗菌作用を示す⁷⁾。黄連は苦味健胃，殺菌，止瀉薬などの作用を有し，黄連解毒湯，三黄瀉心湯，半夏瀉心湯などの漢方処方に配合されている。黄連は医療用漢方製剤において 148 処方中 12 処方，一般用漢方製剤においても約 1 割以上に配合されており，重要生薬の一つである^{8,9)}。現在，国内における黄連の使用量は約 40,000~50,000 kg であり，大部分は中国産で賄われ，日本産はわずか約 5~10% である¹⁰⁾。

黄連は神農本草経の上品に収載され古来より使用されてきた。日本における黄連の使用は奈良時代に大陸の知識が伝わり，国内に自生する近縁植物を同等品として使用するようになったと考えられる¹¹⁾。江戸時代には日本産黄連のみが使用されており，当時の加賀地方で生産された「加賀黄連」が他の産地の黄連より品質が良いとされていた。「和語本草綱目」「物類品隲」「本草綱目啓蒙」「古方薬品考」など様々な文献から，加賀地方で生産された黄連が良質であり，また，良質の黄連がキクバオウレンであったことが記載されている¹¹⁻¹⁴⁾。加賀黄連が良質とされた理由の一つとして，キクバオウレンは他の変種（セリバオウレン・コセリバオウレン）に比べ根茎が太く成長することから，野生品で生育年数の長いキクバオウレンの根茎は見栄えが良かったことが予想

される¹²⁾.

昭和の半ばまで黄連は日本各地で生産されており、「丹波黄連」「越前黄連」「因州黄連」などが流通していた。現在市場品として流通する黄連は栽培品であり、いずれもセリバオウレンに由来している。セリバオウレンは他の変種より成長は早く、収量も多いため、栽培品として適していると考えられる。近年では、安価な中国産に押され、日本産黄連の生産は縮小傾向にあり、福井県で生産される「越前黄連」を始めとしたわずかな地域のみが生産となっている

¹⁵⁾。一方、生薬市場全体を見渡すと国産生薬の重要性が再認識されている。その理由として、主たる輸入元である中国の著しい経済成長による人件費の高騰、資源の枯渇化による自然保護対策及び輸出制限などが挙げられる。そのため、「甘草」や「麻黄」を始めとした生薬において、国産化へ向けた栽培技術の確立や育種の検討が盛んに行われている^{16,17)}。

キクバオウレンは市場品として現在用いられていないものの、オウレンの変種の多様性を理解することや品種選抜・品種改良の基礎的な情報を提供することに繋がる貴重な植物資源である。オウレンの3変種は葉の複葉の形態により1回3出複葉はキクバオウレン (*C. japonica* var. *anemonifolia*)、2回3出複葉はセリバオウレン (*C. japonica* var. *major*)、3回3出複葉はコセリバオウレン (*C. japonica* var. *japonica*) と分類され、キクバオウレンは北海道、本州の日本海側に分布し、セリバオウレンもしくはコセリバオウレンは北海道、本州、四国に分布している^{2,18,19)}。キクバオウレンは系統管理された栽培品が存在しないことから、品質を評価する上で自生する純系統のキクバオウレンを選抜することが最初のステップとなるが、これにはいくつかの問題点がある。北陸地方はキクバオウレンとセリバオウレンの2変種が自生する地域であり、現在自生するオウレンの葉の形態は地域・個体ごとに多様性が認められる。そのため、自生

する個体の中には従来の手法により変種を鑑別できないものも存在する。また、石川県において、昭和半ばまでキクバオウレンの野生品の採取が盛んに行われ、資源の枯渇に伴いオウレンの栽培が行われていた歴史的背景がある²⁰⁾。ここで導入されたオウレンは必ずしもキクバオウレンではなくセリバオウレンも存在していたと考えられ、さらに栽培地が放置されてから数十年ほど経過していることから、栽培目的で導入されたオウレンが野生化していることが懸念される。そのため、葉の形態からキクバオウレンと鑑別される個体がキクバオウレンとセリバオウレンと交雑した個体である可能性も考えられる。

種の分類や同定には分子系統分類学に基づく DNA 解析が有効な選択肢の一つになりつつある。植物種の特異性や同定に用いられる *ribulose 1, 5-bisphosphatecarboxylase* (*rbcL*) や *maturase K* (*matK*) などの領域に関して、*C. japonica* の DNA 配列が国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に登録されている。さらに、*Coptis* 属の系統分類を目的として核 DNA 領域の Internal transcribed spacer (ITS) 領域や葉緑体 DNA の *trnL-F* 領域や *trnH-psbA* 領域に基づく系統分類解析が試みられている⁴⁾。しかしながら、これらによる分類では種間の分類に留まり、2 変種間で保存された塩基の違いは葉緑体 DNA において数塩基の配列の違いが認められているのみである。しかも、1 個体ずつの比較である点や、葉緑体 DNA であるため雑種を区別できない点などから、明確に変種を識別する塩基としては不適である。そのため、変種や種内の多様性を解析するための、さらなる Single nucleotide polymorphism (SNP) 解析やマクロサテライト解析などの他のアプローチが必要であると考えられる。

このような背景から、本章ではキクバオウレンとセリバオウレン、さらには両変種の交雑種の鑑別法を確立することを目的に、北陸地方で採取した様々な葉の形態的特徴を有するオウレンを用いて、SNP 解析により 2 変種を分類し、

外部形態による新指標を用いた鑑別法の開発とその適否を評価し，品質管理への応用を目指した．

第一節 日本産黄連原植物の鑑別

第一項 実験材料・方法

葉の形態が1回3出複葉の典型的な特徴を有しているキクバオウレンを1試料, 2回3出複葉の典型的な特徴を有しているセリバオウレンを1試料, 大阪市場品の黄連の1試料について, Tetrahydroberberine oxidase (THBO) gene のダイレクトシーケンスを行った (Fig. 1). キクバオウレン及びセリバオウレンの同定は著者により行った.

第二項 実験結果

2変種を鑑別するためのDNAマーカーを探索するため, THBO gene のシーケンスを行った. THBO はベルベリン生合成経路の最終段階で機能し, 前駆体であるテトラヒドロベルベリンをベルベリンに変換する酸化酵素である (Fig. 2^{21,22}). 国際塩基配列データベースに登録されていたセリバオウレンの培養細胞の THBO gene の配列データ (AB564543) を基に, アライメントを行った結果を Table 3 に示す. その結果, THBO gene はイントロンを含まない 1623 bp で構成されており, キクバオウレン (LC269130), セリバオウレン (LC269150), 市場品の黄連 (LC269162) 及びセリバオウレンの培養細胞 (AB564543) の THBO gene の配列データの間で計 12 か所の SNP を認めた. また, キクバオウレン (LC269130) とセリバオウレン (LC269150, LC269162, AB564543) の配列データの間では, 計 9 か所 (塩基配列番号 338, 484, 957, 974, 1077, 1278, 1500, 1527, 1608) に SNP を認めた.

Fig. 1 Typical leaf shapes of *C. japonica* var. *anemonifolia* and *C. japonica* var. *major*



C. japonica var. *anemonifolia* characteristically has ternate compound leaves (left leaf), whereas *C. japonica* var. *major* has biternate compound leaves (right leaf). Both of the varieties were collected at Lo6 and Lo11, respectively from Ishikawa Prefecture shown in Fig. 3.

Fig. 2 Berberine synthetic pathway^{21, 22)}

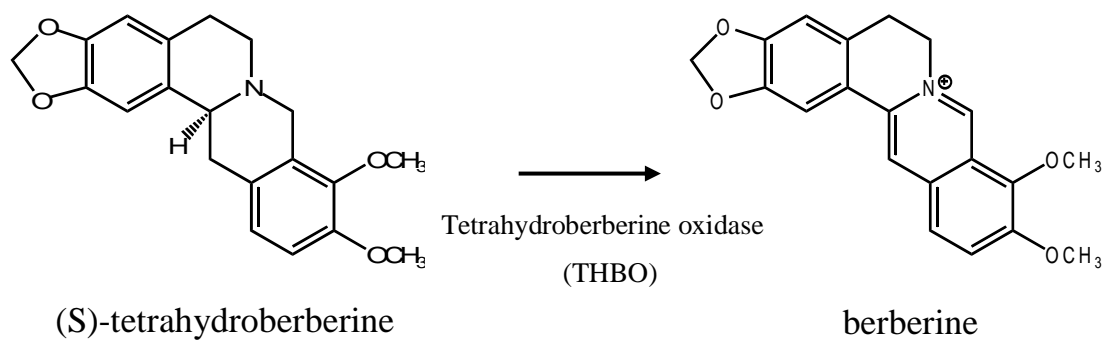


Table 3 SNP analysis of *C. japonica* THBO gene

Nucleotide position ^a	194	246	338	484	775	957	974	1077	1278	1500	1527	1608
THBO gene ^b	C	G	T	A	C	G	C	C	G	T	C	A
Cj-an (Lo6) ^c	* ^d	A	A	C	*	A	G	T	A	C	T	G
Cj-ma (Lo11) ^e	*	A	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*
Cj-ma (cp) ^f	*/G	A	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*

a Nucleotide position was based on GenBank Accession No. AB564543

b THBO gene from cultured cells of *Coptis japonica* var. *dissecta* Nakai (= *C. japonica* var. *major*) (AB564543)

c Sample of *C. japonica* var. *anemonifolia* collected at Lo6 (LC269130)

d The same nucleotide with THBO gene registered as AB564543

e Sample of *C. japonica* var. *major* collected at Lo11 (LC269150)

f Commercial product derived from rhizoma of *C. japonica* var. *major* (LC269162)

第三項 実験考察

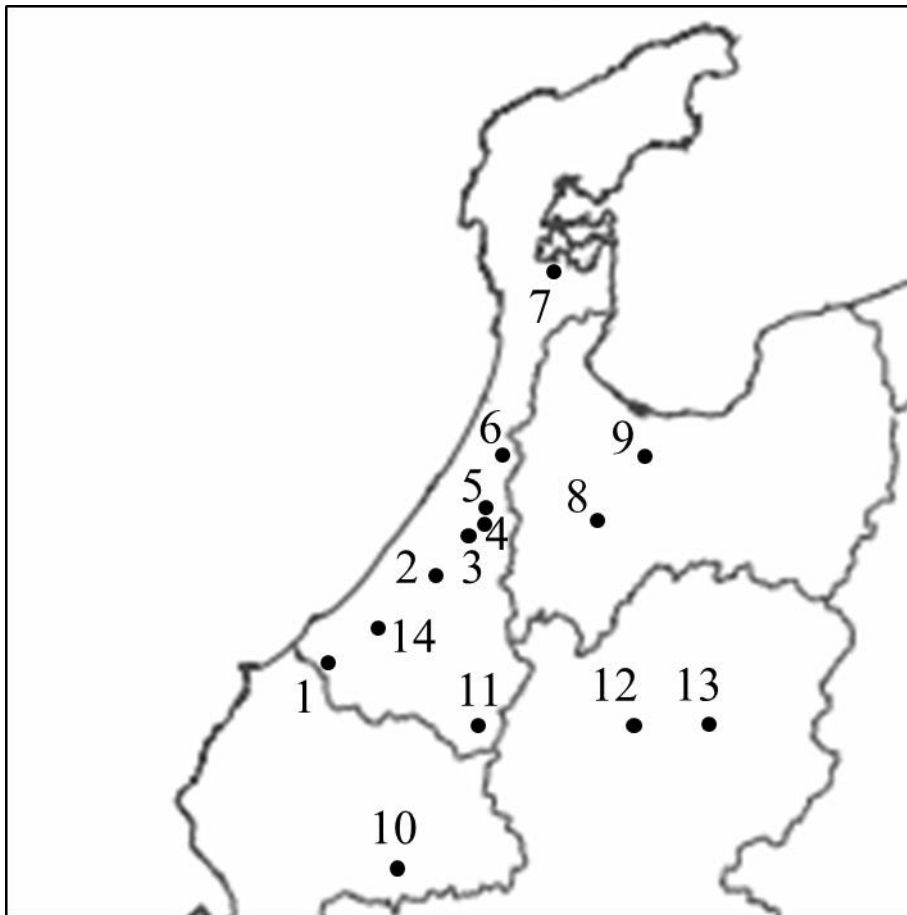
キクバオウレンとセリバオウレンの遺伝的な違いを探索するため、THBO gene の SNP 解析を行った。キクバオウレンとセリバオウレンの間に認められた 9 か所の SNPs のうち、塩基配列番号 957, 1077, 1278, 1500, 1527, 1608 の 6 か所はアミノ酸の置換を伴わない同義的置換であった。塩基配列番号 338, 484, 974 の 3 か所はそれぞれ、ロイシンからグルタミン、イソロイシンからロイシン、アラニンからグリシンに変わる非同義的置換であった。これら非同義的置換は極性などアミノ酸の特性が変わる置換でないことから、THBO gene の SNP 自体が直接的に酵素活性に影響を及ぼすことはないと思われる。これは、キクバオウレンとセリバオウレンの間でベルベリン含量に差は認められなかったとする先行研究の報告を一部支持する結果である。このように、THBO gene の多型は表現型に影響を与えるものではないと考えられるものの、2 変種を鑑別する遺伝的マーカーとして有効であることが示唆された。

第二節 日本産黄連の原植物の形態学的・遺伝学的多様性について

第一項 実験材料・方法

北陸地方に自生するオウレンを 14 地点から 6~35 個体 (Lo1; 11 個体, Lo2; 17 個体, Lo3, 11 個体, Lo4; 14 個体, Lo5; 10 個体, Lo6, 10 個体, Lo7; 10 個体, Lo8; 10 個体, Lo9; 6 個体, Lo10; 10 個体, Lo11; 10 個体, Lo12; 7 個体, Lo13; 6 個体, Lo14; 35 個体) を 2016 年 6 月~9 月に採取した (Fig. 3). またセリバオウレンの栽培系統として, 兵庫県丹波市及び福井県大野市において, いわゆる「丹波黄連」及び「越前黄連」の原植物をそれぞれ 13 個体ずつ 2017 年 10 月に採取した. 各採取地点 4 個体ずつ合計 64 個体について THBO gene のシーケンスを行い, SNP 解析を行った.

Fig. 3 Map of collection sites of *Coptis japonica* in this study.

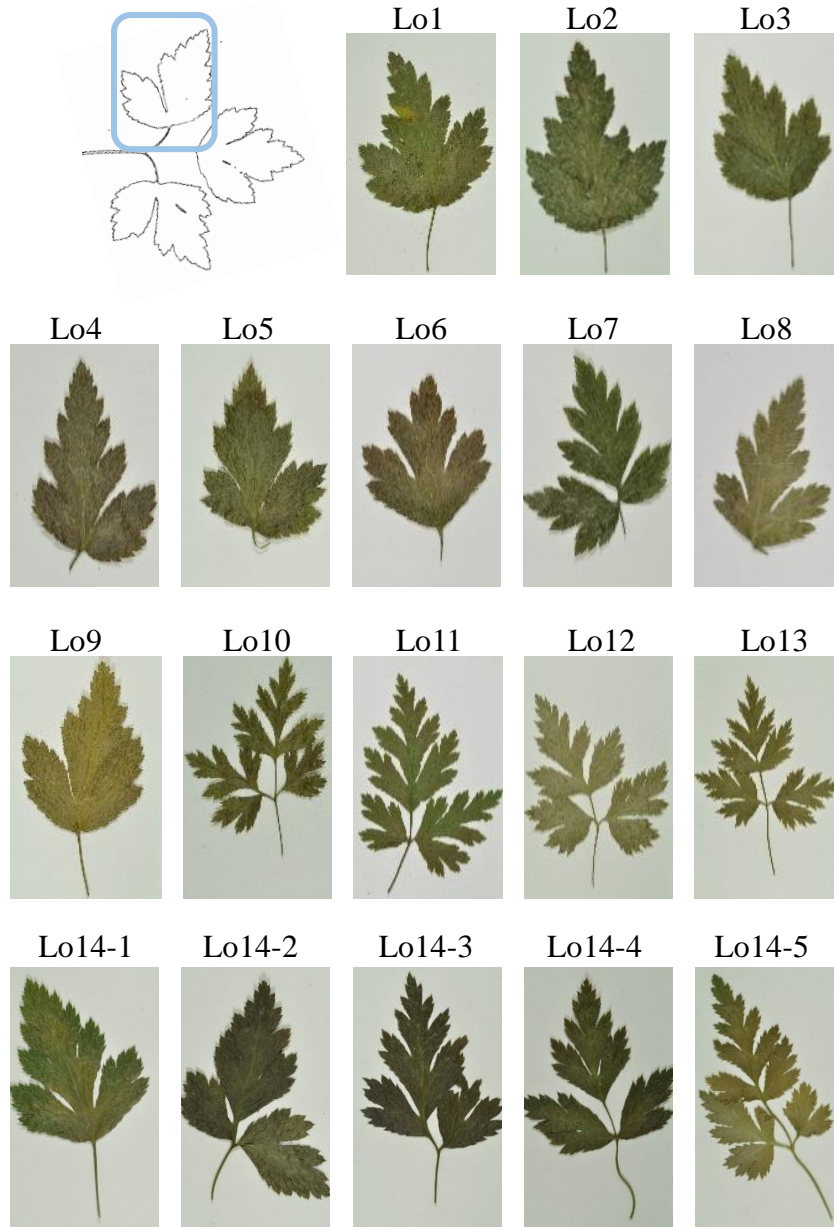


Samples of *C. japonica* (Lo1-Lo14) were collected from Ishikawa, Fukui, Toyama, and Gifu Prefectures

第二項 実験結果

採取したオウレンは葉の形態に多様性が認められ、特に Lo14 で採取したオウレンでは 2 変種の混在及び交雑した変種の存在が疑われた (Fig. 4). Lo1~Lo14, 丹波, 大野で採取したオウレンについて, 集団間及び集団内の SNP 解析を行った (Table 4). 典型的な特徴を有するキクバオウレン・セリバオウレンの集団 (Lo6・Lo11) に対する各採取地点の集団間の一塩基あたりの平均置換数 (Dxy) を算出した結果, 大きく二つのグループ (グループ 1 : Lo1~Lo9, グループ 2 : Lo10~Lo13, 丹波, 大野) に分類することができた (Fig. 5a). この結果を基に採取地点ごとに Lo1~Lo9 をキクバオウレン, Lo10~Lo13 をセリバオウレンと各変種に同定した. また, Lo14 は 2 つのグループの間に位置し, 2 変種が混合した集団である可能性が示唆された. 分類したキクバオウレン (Lo1~Lo9) とセリバオウレン (Lo10~Lo13, 丹波, 大野) のグループ間には, 保存された 4 か所の SNP (塩基配列番号 957, 1077, 1278, 1527) が認められ, 2 変種を鑑別する遺伝的マーカーとして有効であることを認めた (Fig. 5b).

Fig. 4 Typical leaflet morphology at each collection site



Lateral leaflets at each collection site were cut and were photographed. Lo14 leaflet morphology had highly diversified among samples (Lo14-1~Lo14-5)

Table 4 Summary of genetic diversity

Collection site	S	k	Pi	Lo6			Lo11		
				Sf	kf	Dxy	Sf	kf	Dxy
Lo1	6	2.786	0.0017	0	3.25	0.0020	9	12.00	0.0074
Lo2	19	6.542	0.0040	0	5.55	0.0034	7	13.19	0.0081
Lo3	5	2.071	0.0013	0	1.50	0.0009	8	10.00	0.0062
Lo4	10	4.000	0.0025	0	2.75	0.0017	7	10.50	0.0065
Lo5	15	4.107	0.0025	0	2.38	0.0015	8	11.63	0.0072
Lo6	2	0.500	0.0003	0	0.44	0.0003	10	10.25	0.0063
Lo7	16	4.536	0.0028	0	2.50	0.0015	8	11.88	0.0073
Lo8	9	3.107	0.0019	0	0.00	0.0012	8	10.75	0.0066
Lo9	9	2.250	0.0014	0	1.38	0.0009	8	10.63	0.0066
Lo10	4	1.357	0.0008	9	10.00	0.0062	1	1.75	0.0011
Lo11	0	0.000	0.0000	10	10.25	0.0063	0	0.00	0.0000
Lo12	5	2.071	0.0013	9	10.50	0.0065	0	1.50	0.0009
Lo13	4	1.000	0.0006	9	9.75	0.0060	0	1.25	0.0008
Lo14	20	8.643	0.0040	0	6.50	0.0040	1	8.00	0.0049
Tamba	4	1.464	0.0009	9	10.13	0.0062	1	1.88	0.0012
Ono	2	0.500	0.0003	9	10.50	0.0065	0	1.50	0.0009

S, number of segregating sites

k, Average number of pairwise nucleotide differences

Pi, Average number of pairwise nucleotide differences per site

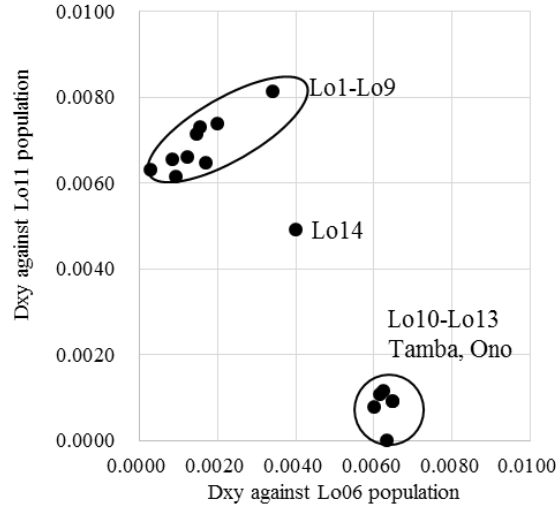
Sf, Number of fixed differences between populations

kf, Average number of fixed pairwise nucleotide differences between populations

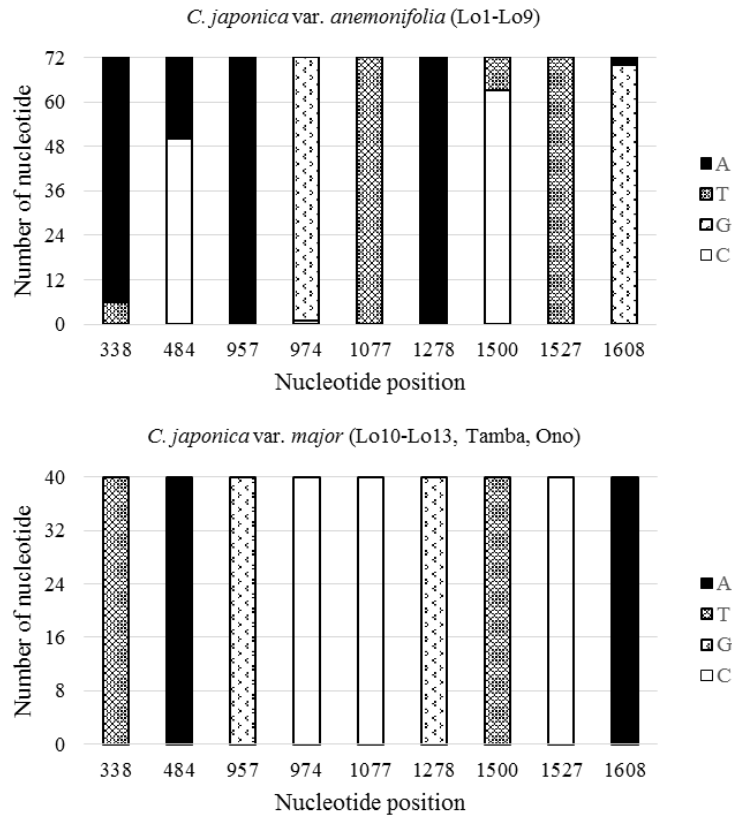
Dxy, Average number of nucleotide substitutions per site between populations

Fig. 5 SNP analysis of *C. japonica* collected at each site

a



b



- (a) The average number of nucleotide substitutions per site between populations (Dxy) was calculated. Each Dxy of Lo1–Lo14, Tamba, and Ono against Lo6 population, which has the typical leaf shape of *C. japonica* var. *anemonifolia*, was plotted on the x-axis and each Dxy of Lo1–Lo14, Tamba, and Ono against Lo11 population, which has the typical leaf shape of *C. japonica* var. *major*, was plotted on the y-axis by collection site.
- (b) The number of nucleotides at SNP sites was calculated following the sequencing of DNA from four samples per collection site by counting homozygosity as two and heterozygosity as one. SNPs conserved between the two varieties were observed at nucleotide positions 957, 1077, 1278, and 1527.

第三項 実験考察

Fig. 5b で示すように、セリバオウレンは 9 か所の塩基ですべて同一であり、集団間及び集団内においても塩基置換が少ないことから遺伝的に安定した変種であることが示唆された。一方、キクバオウレンは集団間及び集団内の塩基置換がセリバオウレンに比べ大きく、遺伝的多様性が大きいことが示唆された。そのため、採取地点の異なる様々なキクバオウレンを対象として、遺伝的多様性と合わせて、根茎の成長度合いや化学成分などの評価を行うことが、品質管理や育種や品種の選抜を見据える上でも重要になると考えられる。

今回、2 変種間の遺伝的な違いが集団として保存されていることを前提条件として、採取地点ごとに 2 変種を分類した。これは形態学的な多様性を許容する形で分類しており、例えば Lo7 のキクバオウレンのように、一見すると複葉の形態で判断できないオウレンもキクバオウレンと同定している。一方、2 変種が混生している Lo14 の個体において、従来の形態学的手法では同定できない個体を多く認めた。このため、北陸地方で採取したオウレンについて、形態学的に変種の同定するためには、従来の形態学的鑑別法以外の新指標が必要であると考えられた。

第三節 日本産黄連原植物の新規鑑別法と品質管理への応用

第一項 実験材料・方法

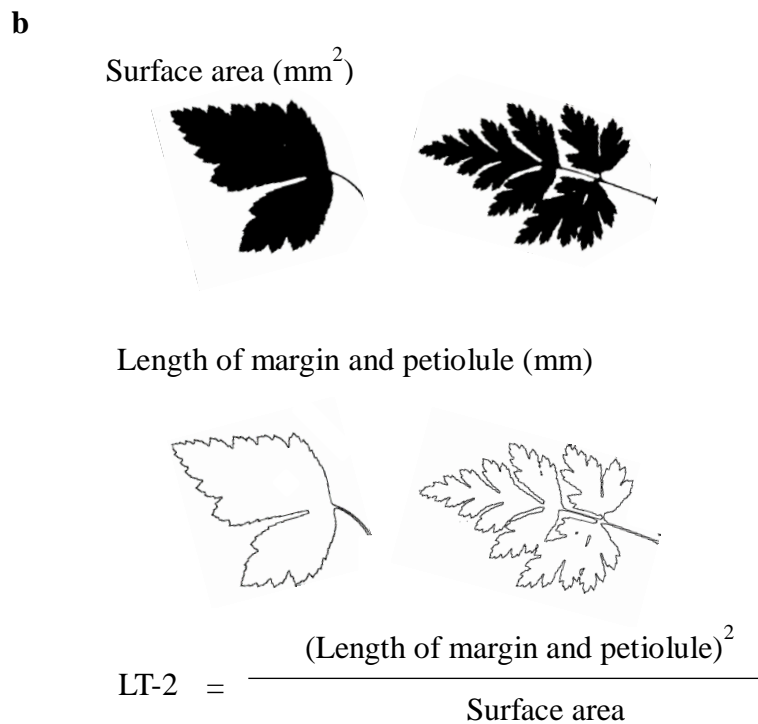
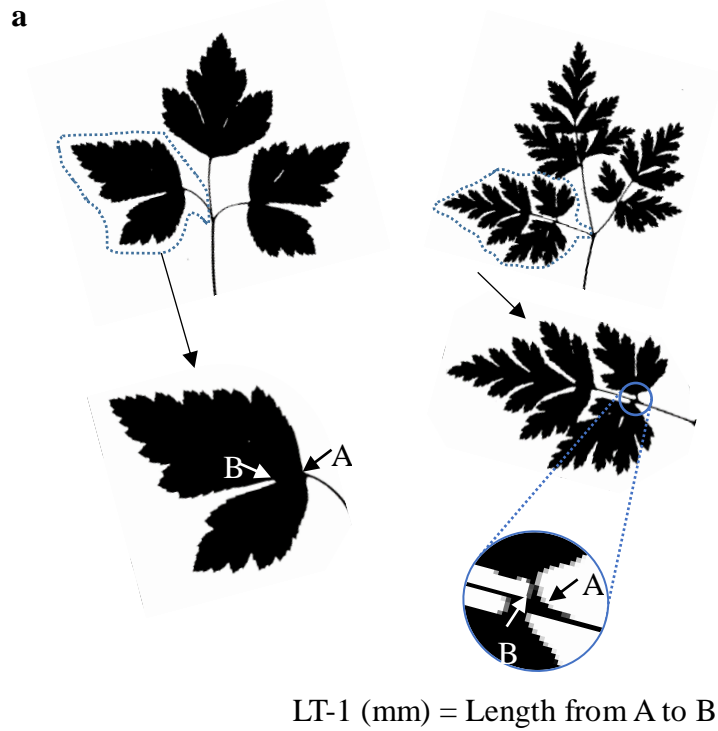
1 個体あたり 1~3 枚の葉を採取し、各葉の側小葉を小葉柄の基部から切り取り、キクバオウレン計 235 枚、セリバオウレン計 130 枚について、写真撮影により画像データを取得した (Fig. 4, Table 5). 画像データは ImageJ を用いて、小葉の基部から葉縁の長さ、表面積、小葉と小葉柄の外周などを測定し、外部形態指標である Leaf type index 1 (LT-1) 及び Leaf type index 2 (LT-2) を算出した (Table 5, Fig. 6). LT-1 は既存の鑑別手法を反映するため、小葉の基部から葉縁のまでの最短距離を測定することで算出した. LT-2 は小葉の全体的な切れ込みの深さを反映するため、側小葉と小葉の柄の長さの二乗から表面積を除いて算出した. 算出された LT-1 及び LT-2 について、統計解析ソフト R (ROCR package for R, pROC package for R) を用いて ROC 解析を行った^{23, 24)}.

Table 5 LT1 and LT-2 values by collection area

Species	Location	Voucher No.	Num	Leaf type index 1 (mm) (LT-1)			Surface area (mm ²)			Length of margin and petiole (mm)			Leaf type index 2 (LT-2)	
				Average	Max	Min	Average	Max	Min	Average	Max	Min	Average	
<i>C. japonica</i> var. <i>anemomifolia</i>	Lo1	KMCj01-01~KMCj01-11	31	8.51	16.38	2.46	709.2	1580.42	146.78	263.28	413.86	105.07	104.51	
	Lo2	KMCj02-01~KMCj02-17	44	5.94	19.07	0.91	846.19	2707.61	206.15	300.36	473.28	111.32	122.11	
	Lo3	KMCj03-01~KMCj03-11	22	8.69	13.32	2.18	1009.77	1690.83	327.8	280.88	379.9	144.64	81.44	
	Lo4	KMCj04-01~KMCj04-14	41	9.04	20.68	1.82	897.15	2517.25	359.95	288.18	551.97	182.88	100.69	
	Lo5	KMCj05-01~KMCj05-10	25	9.76	17.18	2.8	998.38	1732.32	465.54	314.73	486.58	168.64	108.35	
	Lo6	KMCj06-01~KMCj06-10	13	11.16	21.76	2.64	697.35	1436.62	189.21	246.96	404.1	129.01	93.68	
	Lo7	KMCj07-01~KMCj07-10	26	3.79	7.65	1.16	801.32	1893.48	262.88	329.85	563.7	131.49	140.78	
	Lo8	KMCj08-01~KMCj08-10	18	7.75	13.52	3.2	594.34	1142.79	154.4	228.69	376.66	113.66	92.88	
	Lo9	KMCj09-01~KMCj09-06	15	8.39	16.63	2.11	1213.9	1848.55	629.94	321.64	459.01	229.02	87.95	
			235	7.83	21.76	0.91	859.5	2707.61	146.78	289.23	563.7	105.07	106.85	
<i>C. japonica</i> var. <i>major</i>	Lo10	KMCj10-01~KMCj10-10	27	1.33	3.01	0.87	626.83	1134.07	135.84	424.14	777.38	150.52	300.97	
	Lo11	KMCj11-01~KMCj11-10	21	1.91	4.64	0.8	996.88	1963.95	136.77	555.35	1004.5	143.19	326.74	
	Lo12	KMCj12-01~KMCj12-07	9	1.99	5.05	0.7	642.13	1536.29	172.09	414.45	910.76	106.47	275.06	
	Lo13	KMCj13-01~KMCj13-06	8	1	1.56	0.52	608.66	1304.54	181.85	473.12	918.8	201.17	375.74	
	Tamba	KMCj15-01~KMCj15-13	30	1.96	7.28	0.94	1230.21	1867.48	470.45	580.41	1039.92	312.75	286.69	
	Oro	KMCj16-01~KMCj16-13	35	1.87	2.79	1.32	1155.68	1882.98	430.13	625.35	933.46	314.71	349.28	
			130	1.74	7.28	0.52	968.17	1963.95	135.84	537.91	1039.92	106.47	317.65	

*Num; Number of leaflets measured in this study. One to three lateral leaflets per sample were cut and lateral leaflets were photographed and analyzed using Image J.

Fig. 6 Leaf type index



(a) Measurement of leaf type index1 (LT-1). LT-1 was measured as the shortest length between the margin (A) and the base of a leaflet (B). (b) Measurement and calculation of leaf type index 2 (LT-2). The surface area of a leaflet and the length of the leaflet margin and the petiolule were measured and LT-2, which reflects the degree of leaflet dissection, was calculated as $LT-2 = (\text{Length of leaflet margin and petiolule})^2 / \text{Surface area}$.

第二項 実験結果

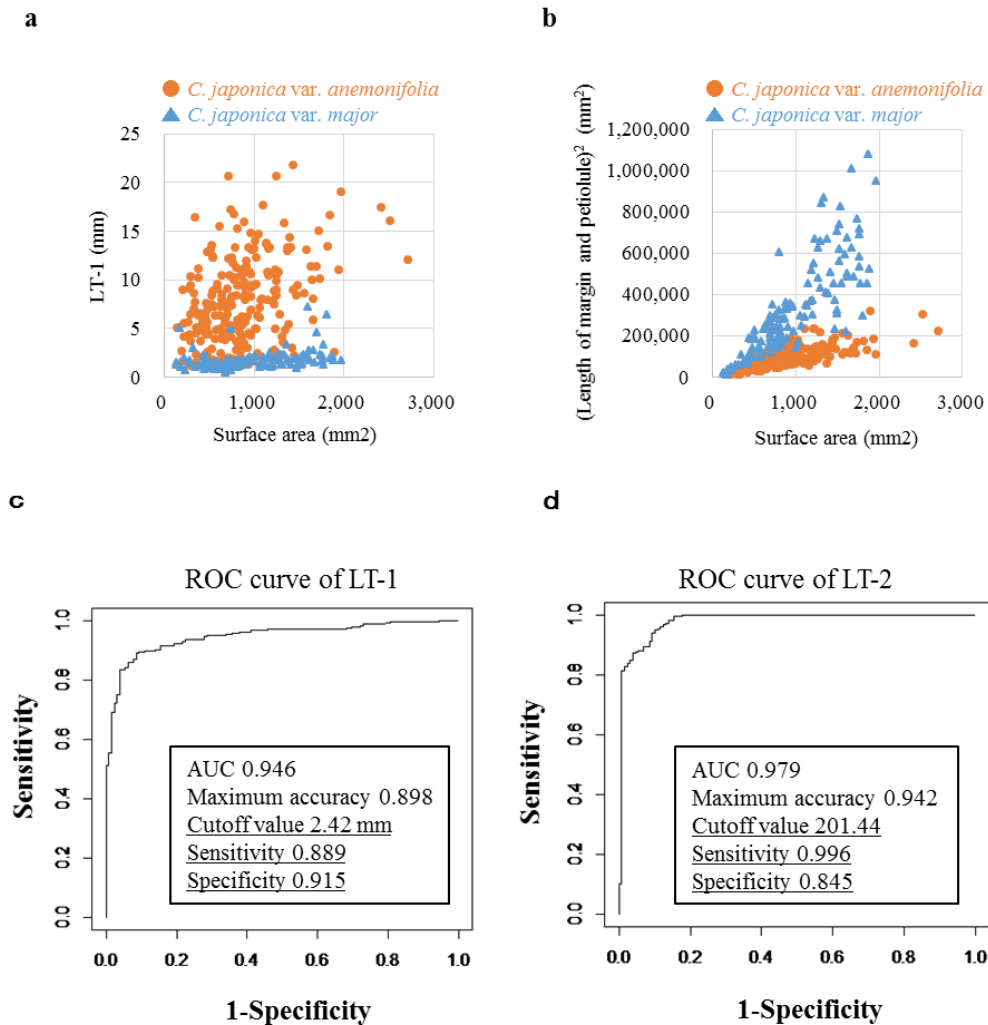
キクバオウレンとセリバオウレンの形態学的な違いを評価するために、小葉の形態に基づいた外部形態指標 LT-1 及び LT-2 を導入した (Fig. 6). 小葉の基部から葉縁までの最短距離で表される LT-1 は既存の出葉状態で分類される手法を反映した数値である. 側小葉と小葉の柄の長さの二乗から表面積を除いて表される LT-2 は小葉の全体的な切れ込みの深さを反映した数値である. 各小葉の算出値について、横軸に表面積、縦軸に LT-1 の値をプロットした散布図を Fig. 7a に示す. 各採取地点の LT-1 の平均値はキクバオウレンで 3.79~11.16 mm であり、セリバオウレンで 1.00~1.99 mm であった. Figure 7b は横軸に表面積、縦軸に側小葉と小葉の柄の長さの二乗をプロットした散布図である. 散布図において傾きで表される LT-2 の各地点の平均値は、キクバオウレンで 81.44~140.78 であり、セリバオウレンで 275.06~375.74 であった (Table 5).

LT-1 及び LT-2 の鑑別能力を評価するため、Receiver operating characteristics (ROC) 解析を行った (Fig. 7c, d). ROC 解析は鑑別の精度を評価するための統計学的手法である. LT-1 を基準に分類した場合、LT-1 の area under the curve (AUC) は 0.946 であり、最も高い精度 (0.898) をもつカットオフ値 2.42 mm を採用した場合、その感度 (測定したキクバオウレンが正しくキクバオウレンとして判定された割合) は 0.889 であり、特異性 (測定したセリバオウレンが正しくセリバオウレンとして判定された割合) は 0.915 であった. LT-2 を基準に分類した場合、LT-2 の AUC は 0.979 であり、最も高い精度 (0.942) をもつカットオフ値 201.44 を採用した場合、その感度は 0.996 であり、特異性は 0.845 であった. AUC 間の比較を行ったところ、LT-2 の AUC が有意に LT-1 の AUC より高い数値を示した ($p < 0.05$).

遺伝学的・形態学的手法に基づき、2 変種が混生し、交雑した変種 (以下、交

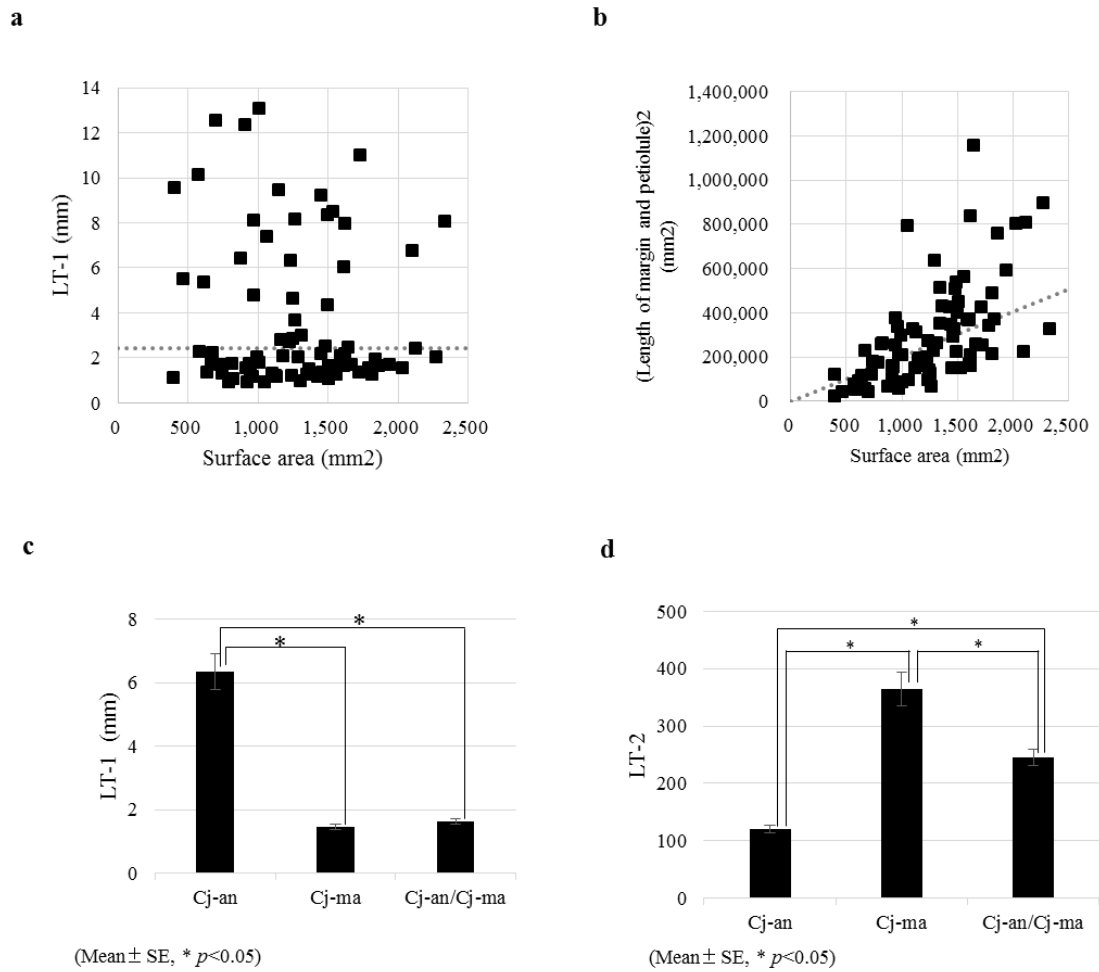
雑変種とする)が存在する地点 (Lo14) で採取された個体の多様性の解析を行った. サンプルとして用いた採取地点 Lo14 のオウレンは小葉の形態が様々であり, 従来の方法では集団として変種を鑑別することができなかった. 採取したオウレンの計測値を散布図として表したものが Fig. 8a, b であり, ROC 解析で用いたカットオフ値を用いても集団としてどちらの変種に属するか不明であった. まず個々のサンプルについて, THBO gene の 4 か所 (塩基配列番号 957, 1077, 1278, 1527) を基に, キクバオウレン, セリバオウレン, 交雑変種に分類した. SNP 解析の結果, 採取された 35 個体は, キクバオウレン 17 個体, セリバオウレン 9 個体, 交雑変種が 9 個体であることが判明した. 次に, SNP による分類を基に, LT-1 の平均値を算出した結果, キクバオウレンで 6.35 ± 0.56 mm, セリバオウレンで 1.47 ± 0.09 mm, 交雑変種で 1.63 ± 0.07 mm であった (Fig. 8c). キクバオウレンとセリバオウレン, キクバオウレンと交雑変種の間で有意差が認められたが, セリバオウレンと交雑変種の間で有意差が認められなかった. 一方, LT-2 の平均値はキクバオウレンで 115.47 ± 7.42 , セリバオウレンで 415.10 ± 47.00 , 交雑変種で 267.50 ± 15.18 とそれぞれ固有の値を示した (Fig. 8d). LT-2 を用いた場合, キクバオウレンとセリバオウレンの間, キクバオウレンと交雑変種の間で有意差が認められただけでなく, セリバオウレンと交雑変種の間でも有意差が認められた.

Fig. 7 Leaflet measurement of *C. japonica* var. *anemonifolia* and *C. japonica* var. *major* and ROC curve analysis of LT-1 and LT-2



(a) Scatter plot of surface area of leaflet plotted on the x-axis and LT-1 plotted on the y-axis. (b) Scatter plot of surface area (x-axis) and length of margin and petiole squared (y-axis). (c, d) ROC curves of LT-1 and LT-2 showing 1-specificity on the x-axis and sensitivity on the y-axis for each potential threshold. AUCs were determined on the basis of the ROC curves. Significant differences were observed between two AUCs ($p < 0.05$). The cutoff, sensitivity, and specificity values with the highest accuracy are underlined.

Fig. 8 Classification of samples from site with two varieties coexisting.



Samples collected from Lo14 were measured. Scatter plot of surface area of leaflets plotted on the x-axis and LT-1 plotted on the y-axis (**a**). Scatter plot of surface area (x-axis) and length of margin and petiole squared (y-axis) (**b**). Dotted lines indicate cutoff values of LT-1 (2.42 mm) and LT-2 (201.44) with maximum accuracy. On the basis of SNPs, the samples were classified into *C. japonica* var. *anemonifolia* (Cj-an, number of samples: 17, number of measurements: 35), *C. japonica* var. *major* (Cj-ma, number of samples: 9, number of measurements: 23), or their crossbreds (Cj-an/Cj-ma, number of samples: 9, number of measurements: 26) and LT-1 (**c**) and LT-2 (**d**) values were measured. Values are means ± standard error and asterisk indicates significant difference (ANOVA and Tukey's test; $p < 0.05$)

第三項 実験考察

北陸地方で採取されたオウレンは、採取地点ごとに十分なサンプル数を用いて LT-1 値もしくは LT-2 値を算出することで、2 変種を集団として分類することが可能であった。しかしながら、どちらの指標を用いても、キクバオウレンとセリバオウレンで重複する値の領域が存在するため、2 変種を個体として厳密に分類することは困難であると考えられる。そのため、2 変種を外部形態で正確に鑑別するためには、ある程度の個体数、すなわち群生したオウレンが必要となる。

ROC 解析の結果から、LT-2 が 2 変種の鑑別を行う新規の指標として有効であることが示唆された。また 2 変種が混生し、かつ交雑変種が存在する地点

(Lo14) の解析において、キクバオウレン、セリバオウレン、交雑変種の LT-2 値はそれぞれ固有の値を示したことから、混合変種の鑑別にも有効であることが示された。一方で、LT-2 は画像解析を行う必要があることから、フィールドで用いる指標としては不向きである。しかしながら、今回の結果は小葉の全体的な切れ込みの深さを考慮に入れることが重要であることを示す結果でもある。全体的な小葉の切れ込みの深さの違いがキクバオウレン及びセリバオウレンの形態学的な特徴を反映していることは、2 変種を並べて比較することにより容易に理解できるが、本研究ではその妥当性を科学的に証明し、指標とすることができた。2 変種及び混合変種を肉眼で鑑別する際には、従来の鑑別法に小葉の切れ込みの深さを加味し、複合的に鑑別することでより正確な鑑別を行うことができると考えられる。

これまでも他植物種において種内の多様性を示すために、葉の切れ込みの深さを指標とする様々な試みがなされている²⁵⁻²⁸⁾。また、画像解析による葉縁や表面積を計測する手法も報告されているが、LT-2、すなわち葉縁や表面積を

基にした計算式で表される指標は用いられていなかった。LT-2は葉の多様性を表現する新規外部形態指標として他の植物種への応用も可能であると考えられる。

小括

キクバオウレン (*C. japonica* var. *anemonifolia*) とセリバオウレン (*C. japonica* var. *major*) の違いについて、遺伝学的及び形態学的手法を用いて解析を行った。THBO gene において 2 変種間に SNP が認められることを見出し、北陸地方に自生するオウレンを SNP 解析に基づき変種を決定した。さらに、従来の外部形態の鑑別法である複葉の形態を反映する指標 (LT-1) と小葉の全体的な切れ込みの深さを反映する新規指標 (LT-2) を用いて、その鑑別能力を評価した。LT-2 は LT-1 に比べ高い鑑別能力を有し、さらに 2 変種の混合変種の分類にも有効であることが示された。2 変種の鑑別をより明確にする新たな手法を開発した本研究結果は、日本産黄連原植物 (*C. japonica*) の多様性に係る品質管理に有効であると考えられる。

第二章 大麻草の DNA に基づいた鑑別法

緒言

大麻草 *Cannabis sativa* L. は中央アジアを原産とするアサ科の一年草で、大麻草の果実は漢方生薬「麻子仁」として瀉下作用を目的に漢方処方に配合される。大麻草の果実は他にも七味唐辛子など食用や鳥のエサなどの飼料として用いられる。日本には BC1000 年頃に伝播したと考えられ、万葉集に「麻衣」と記載があることから、古くから繊維原料として用いられていた²⁹⁾。近年ではバイオマスとしての活用も期待されるなど幅広い用途を持つ植物である³⁰⁾。

一方、大麻取締法の中で、「この法律で大麻とは、大麻草（カンナビス・サティバ・エル）及びその製品をいう。ただし、大麻草の成熟した茎及びその製品（樹脂を除く。）並びに大麻草の種子及びその製品を除く。」と定義されており、大麻草の所持および栽培は厳しく制限されている。大麻草の特徴的な成分はカンナビノイド類化合物であり、大麻草から約 70 種類以上のカンナビノイド類化合物が同定されている³¹⁾。その中でも Tetrahydrocannabinol (THC) は幻覚麻酔作用などの強い中枢神経作用を示すことが知られている (Fig. 9)³²⁾。大麻取締法違反の検挙人員は平成 21 年 (3087 人) をピークに平成 25 年 (1616 人) まで減少していたが、平成 26 年 (1813 人) 及び平成 27 年 (2167 人) は再び増加している³³⁾。蔓延していた危険ドラッグに対し、乱用薬物の成分を指定薬物として迅速に指定するとともに包括指定（化学構造の一部が共通した化合物群を包括的に指定）を実施するなどの取締りを強化したことで、薬物乱用の闇市場が危険ドラッグから大麻草に移ったことが考えられる。大麻草に関する事案はニュースで大きく取り上げられ、社会的な関心度は非常に大きい。また、若年層に乱用が多く「ゲートウェイドラッグ」としての側面を有すること

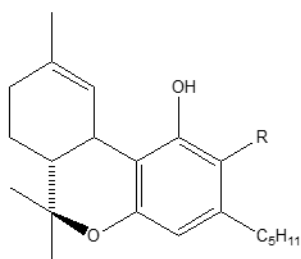
から、大麻草の取締りは薬物乱用防止対策の中でも特に重要である。

新鮮な大麻草の葉や花穂では、THC はカルボキシル基を含む Tetrahydrocannabinolic acid (THCA) として存在している。大麻草は THCA を多く含有する drug-type (THCA-dominant type) とほとんど含有しない fiber-type (Cannabidiolic-acid dominant type) の 2 系統に大別される (Fig. 9)^{29,34,35}。日本を含め大部分の国が大麻草自体を禁止しているが、EU やカナダでは、乾燥重量で THC を 0.3% 以上含有する大麻草とそれ以下の大麻草を明確に区分している³⁶⁻³⁸。Drug-type と fiber-type の系統の交雑系統では THC を含有する系統として表現型が現れることも知られている³⁵。また、送粉範囲も広いことなどから、fiber-type 系統を繊維目的で栽培する際には THC 含有率及び系統維持が重要な監視事項となる。THCA は前駆体の Cannabigerolic acid から THCA synthase により THCA が合成される (Fig. 9)。THCA synthase をコードする THCAS gene はイントロンを含まない 1632 bp の Open reading frame より構成されている³⁹。⁴⁰。Drug-type と fiber-type の系統間に、THCA synthase (THCAS) gene において 63 個の SNP が認められることが報告されている³⁴。

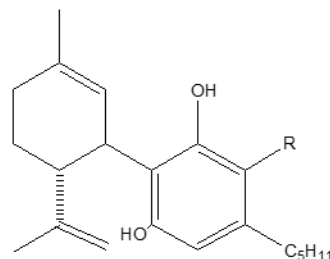
一般的に、大麻草の鑑別は理化学的検査と形態学的検査により行われる。理化学的検査は liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) や gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) を用いて、大麻草の特徴的な成分である THC, Cannabidiol, Cannabinol などを分離・同定することで行われる (Fig. 9)⁴¹⁻⁴³。形態学的検査は、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いて、葉の剛毛や腺毛などを探索することで行われる^{5,6}。一方、粉末など形態学的に特徴がない植物試料において、大麻草 DNA による種鑑別が有効である。これまで核 DNA の ITS 領域または THCAS gene, 葉緑体 DNA の *trnL-F* 領域を利用した PCR 法やリアルタイム PCR 法による大麻草 DNA の鑑別法が報告されている⁴⁴

46). しかしながら、これらの鑑別法では DNA 検査過程（抽出・増幅・分離・判定）の各作業において煩雑な操作が伴う。また、サーマルサイクラーもしくはリアルタイム PCR 装置、電気泳動装置などの装置を必要とするため、検査の実施は DNA 検査設備の整った実験室内に限定される。DNA による鑑別法を実務応用として用いるためには、必要とする機材が少なく、操作手順が単純である手法が望ましい。LAMP 法は一つのターゲット DNA 領域に対し 4~6 つのプライマーを反応させ増幅する手法であり、動植物、菌類、ウイルスの核酸検出手法として広く活用されている⁴⁷⁻⁵⁰⁾。LAMP 法は PCR 法における 2~3 ステップの温度制御プログラムを必要とせず、60~65°C の一定温度で増幅反応が進行するため、インキュベーターなどの簡便な装置で実施することができる。迅速で高感度であり操作も簡単であることから実務応用性に優れており、結核菌・百日咳菌における診断法として実用化されている⁵¹⁾。また、LAMP 反応の判定は指示薬を予め加えておくことにより肉眼で行うことも可能であるため、オンサイト判定法としての潜在能力を有している。本研究では、LAMP 法を用いて、大麻草の系統及び植物種鑑別法を開発し、さらに簡易鑑別プロトコールの評価を行った。

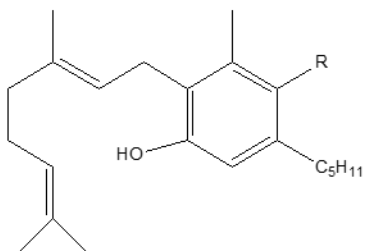
Fig. 9 Cannabinoids



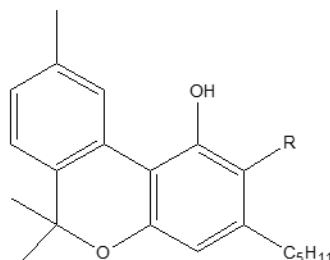
R= H (Tetrahydrocannabinol; THC)
R= COOH (Tetrahydrocannabinolic acid; THCA)



R= H (Cannabidiol; CBD)
R= COOH (Cannabidiolic acid; CBDA)



R= H (Cannabigerol; CBG)
R= COOH (Cannabigerolic acid; CBGA)



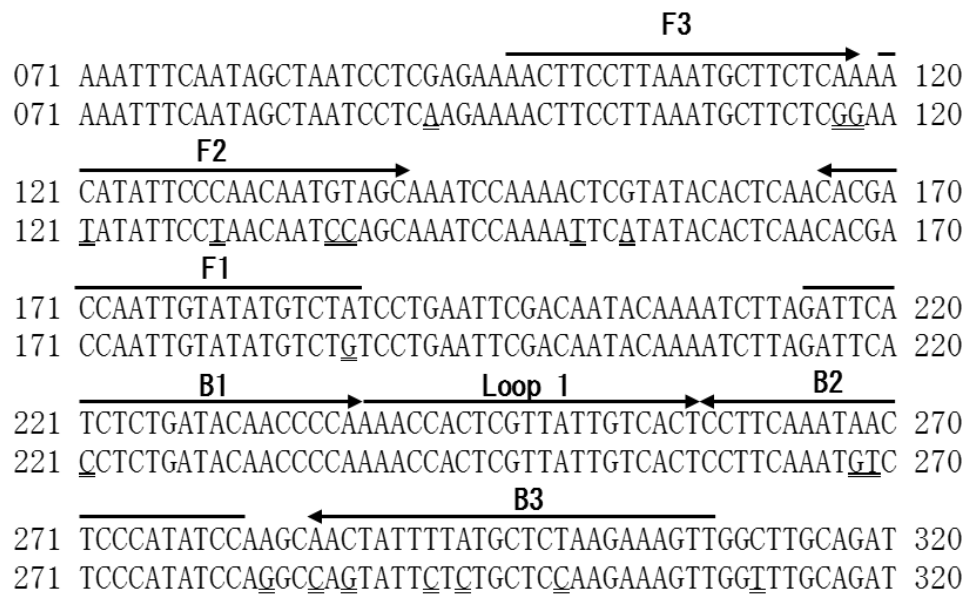
R= H (Cannabinol; CBN)
R= COOH (Cannabinolic acid; CBNA)

第一節 LAMP 法による系統鑑別法について

第一項 実験材料・方法

国際塩基配列データベースに登録されている drug type THCAS gene (accession no. AB212834) と fiber-type THCAS gene (accession no. AB212830) についてアライメントを行い, Primer Explorer (<https://primerexplorer.jp/>) を用いて Drug-type THCAS gene 特異的に反応する LAMP プライマーセット (Dt-LAMP set) を Primer Explorer を用いて設計した (Fig. 10). LAMP プライマーセットは 6 つの領域を含む 4 つのプライマー (FIP, BIP, F3, B3) を基本構造としており, さらに反応速度を早めるために Loop primer を加えている⁵²⁾. 設計した Dt-LAMP set は drug-type THCAS gene と fiber-type THCAS gene の間に合計 15 か所の SNP を含んでおり, さらに fiber-type THCAS gene への非特異的な増幅を抑える目的で F3 の 3'末端に故意に両系統に反応しない変異を導入している. drug-type 系統及び fiber-type 系統の大麻草果実各 1 粒から DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を用いて DNA 抽出した DNA を鋳型に LAMP 反応を行った. LAMP 反応は, 反応試薬に Isothermal Master Mix (株式会社ニッポンジー) を用いて行った. LAMP 反応試薬の組成は, 2×Reaction mix 15 µL, Dt-LAMP set (5 pmol each of F3 and B3 primers, 40 pmol each of FIP and BIP primers, 20 pmol of loop primer), DNA 溶液 2 µL を加え, 総量を純水で 25 µL とした. 反応条件は装置に Smart Cycler II Systems (Cepheid 製) を用いて 63°C, 20 分増幅反応を行い 510~527 nm の蛍光波長を測定した. また, drug-type THCAS gene 及び fiber-type THCAS gene についてクローニングを行い, 6×10^5 コピー数に相当する量を DNA 溶液として LAMP 反応を行った.

Fig. 10 Dt-LAMP primer set for drug-type *C. sativa* detection



Primer	Sequence (5' - 3')
Dt-FIP (F1c-F2)	KAGACATATACAATTGGTCGTGTTGACATATTCCCAACAATGTAGC
Dt-BIP (B1-B2c)	GATTCATCTCTGATACAACCCCAAGGATATGGGAGTTATTTGAAGG
Dt-F3	AACTTCCTTAAATGCTTCTT ^a AA
Dt-B3	AACTTCTTAGAGCATAAAAATAGTT
Dt-Loop 1	AACCACTCGTTATTGTCACT

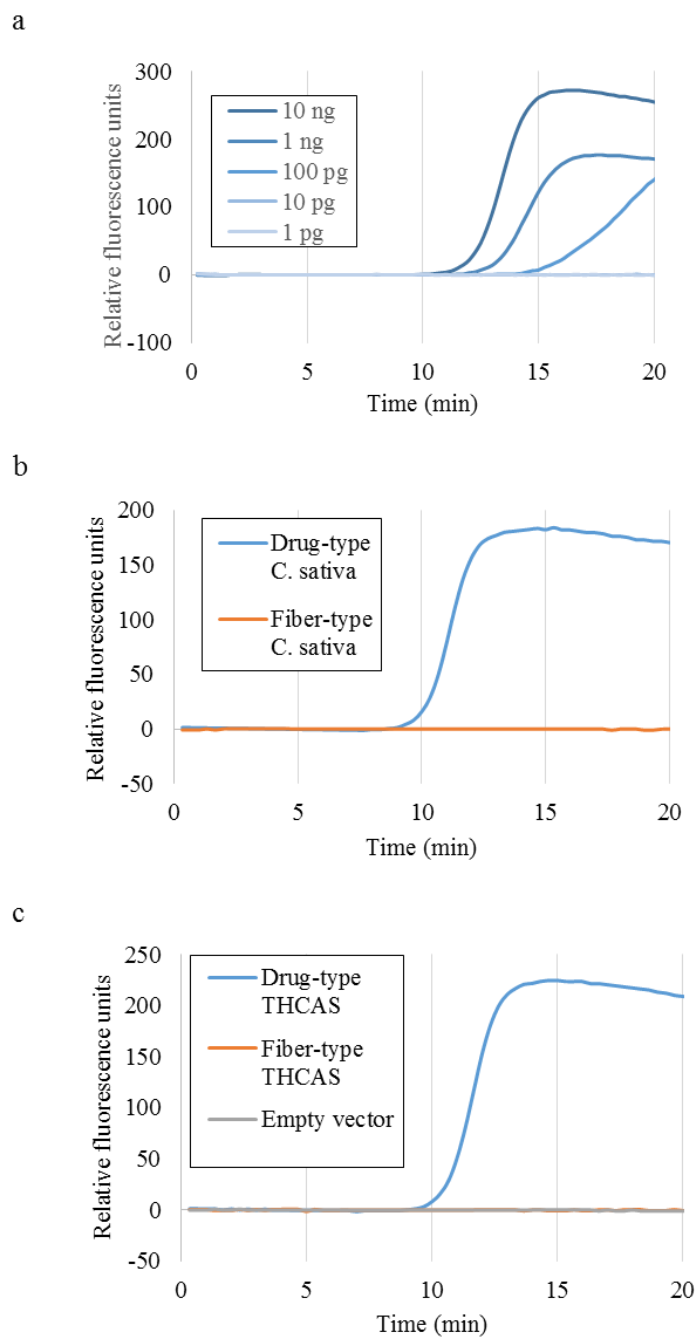
^a In order to avoid non-specific annealing, the nucleotide is designed not to react both types of THCA synthase gene.

Drug-type (upper array; accession no. AB212834) and fiber-type (lower array; accession no. AB212830) THCA synthase genes were aligned. Primer binding sites are indicated by arrows. Nucleotide differences in used primer sequences are double underlined.

第二項 実験結果

Drug-type 系統の特異的な検出を行うため、THCAS gene の多型性を標的とした Dt-LAMP set を設計し、感度及び特異性を検討した。まず、Dt-LAMP set を用いて検出感度の検討を行った。精製した drug-type 系統の大麻草 DNA を用いて希釈系列 (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg) を作成し、これらを鋳型として 63°C 20 分の LAMP 反応を行った。その結果、10 ng, 1 ng で再現性のある増幅が認められ、100 pg で再現性のある増幅は認められず (Positive rate; 2/3), 10 pg, 1 pg で増幅が認められなかった (Fig. 11a)。特異性を確認するため、drug-type 系統及び fiber-type 系統の大麻草から抽出精製した DNA を用いて LAMP 反応を行ったところ、drug-type 系統に対してのみ増幅が認められ、fiber-type 系統に対して増幅が認められなかった (Fig. 11b)。さらに、drug-type THCAS gene (accession no. LC120319) 及び fiber-type THCAS gene (accession no. LC120320) についてクローニングを行い、THCAS gene に対する LAMP 反応性を検討したところ、drug-type THCAS gene に対して特異的な増幅が認められた (Fig. 11c)。

Fig. 11 LAMP reaction using Dt-LAMP set.



(a) The LAMP reaction of 10-fold serial dilutions of purified DNA (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, and 1 pg) was performed. (b) The LAMP specificity were assessed using DNA (10 ng) of Drug-type *C. sativa* (White Rhino) and fiber-type *C. sativa* (Tochigishiro). (c) The LAMP specificity were also confirmed using pBluescript vector with drug-type THCA synthase gene and fiber-type THCAS gene and pBlue script vector (empty vector).

第三項 実験考察

これまでも drug-type THCAS gene を標的とした drug-type 系統の鑑別法がいくつか報告されている^{38,46)}。また系統解析の結果からも drug-type THCAS gene を有する系統が THCA 含有量の多い系統であることが判明している^{34,38)}。一方で、大麻草の THCA 含有量を定める要因が THCAS gene の SNP に伴うアミノ酸置換によるものであるかどうか不明である。トランスクリプトーム解析によると、2 系統間では THCAS gene やカンナビノイド合成経路に関係する遺伝子の発現量が異なっているため、THCA の合成には転写因子を含め、より複雑な制御がなされていると推測される⁵³⁾。そのため、Dt-LAMP set は、SNP に伴うアミノ酸置換の有無を重視せず、THCAS gene の SNP を単純に系統間の違いと捉え、なるべく多くの SNP をカバーできる領域を基に作成した。Dt-LAMP set は検出感度が 100 pg~1 ng であり、一般的なリアルタイム PCR 法（約 10~100 pg）に比べて低感度ではあるが、高コピー数の fiber-type THCAS gene に対して増幅が認めらず、高い特異性を有していた。そのため、Dt-LAMP set は高感度を要求する法科学的な応用には不向きであるが、大麻草果実や葉を試料にした fiber-type 系統維持のための品質管理に有用であると考えられる。

第二節 LAMP 法による大麻草鑑別法について

第一項 実験材料・方法

国際塩基配列データベースに登録されている drug type THCAS gene (accession no. AB212834) と fiber-type THCAS gene (accession no. AB212830) についてアライメントを行い, Primer Explorer (<https://primerexplorer.jp/>) を用いて共通領域を標的とした大麻草 LAMP プライマーセット (Cs-LAMP set) を作成した (Fig 12). 設計した Cs-LAMP set を用いて, 大麻草 22 品種及び陰性対照 50 試料の計 72 試料から抽出した DNA を鋳型に LAMP 反応を行った. LAMP 反応は, 反応試薬に Isothermal Master Mix を用いて行った. LAMP 反応試薬の組成は, 2×Reaction mix 15 μ L, Dt-LAMP set (5 pmol each of F3 and B3 primers, 40 pmol each of FIP and BIP primers, 20 pmol of loop primer), DNA 溶液 2 μ L を加え, 総量を純水で 25 μ L とした. 反応条件は装置に Smart Cycler II Systems を用いて 63°C, 20 分増幅反応を行い 510~527 nm の蛍光波長を測定した.

Fig. 12 Cs-LAMP set for *C. sativa* detection

```

                                     F3
451 GCCGGAGCTACCCTTGGAGAAGTTTATTATTGGATCAATGAGAAGAATGA 500
451 GCCGGAGCTACCCTTGGAGAAGTTTATTATTGGATCAATGAGAGAAATGA 500
                                     F2      Loop 1
501 → GAATCTTAGTTTTCTGGTGGGTATTGCCCTACTGTTGGCGTAGGTGGAC 550
501 GAATTTTAGTTTTCTGGTGGGTATTGCCCTACTGTTGGCGTAGGTGGAC 550
                                     F1      B1
551 ← ACTTTAGTGGAGGAGGCTATGGAGCATTGATGCGAAATTATGGCCTTGCG 600
551 ACTTTAGTGGAGGAGGCTATGGAGCATTGATGCGAAATTATGGCCTTGCG 600
                                     Loop 2      B2
601 → GCTGATAATATTATTGATGCACACTTAGTCAATGTTGATGGAAAAGTTCT 650
601 GCTGATAATATCATTGATGCACACTTAGTCAATGTTGATGGAAAAGTTCT 650
                                     B3
651 → AGATCGAAAATCCATGGGAGAAGATCTGTTTTGGGCTATACGTGGTGGTG 700
651 AGATCGAAAATCCATGGGAGAAGATCTATTTTGGGCTATACGTGGTGGAG 700

701 GAGGAGAAAACTTTGGAATCATTGCAGCATGGAAAATCAAACTGGTTGCT 750
701 GAGGAGAAAACTTTGGAATCATTGCAGCATGGAAAATCAAACTTGTTGT 750

```

Primer	Sequence (5' - 3')
C-FIP (F1c-F2)	CAATGCTCCATAGCCTCCTCCTGGTGGGTATTGCCCTAC
C-BIP (B1-B2c)	ATGCGAAATTATGGCCTTGC GCGATCTAGAACTTTCCATCAAC
C-F3	TGGATCAATGAGAWGAATGAGA
C-B3	AGCCCAAAAAYAGATCTTCTCC
C-Loop 1	TGTCCACCTACGCCAACA
C-Loop 2	GCTGATAATATCATTGATGCACACTTAG

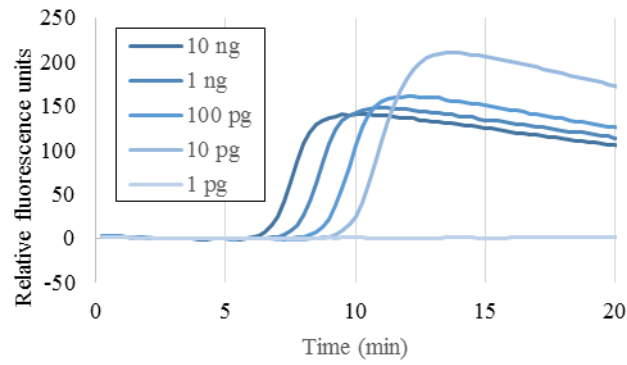
Nucleotide sequence of THCA synthase gene. The upper array is the drug-type sequence (accession No. AB212834) and the lower array is the fiber-type sequence (accession No. AB212830). The sequences of the primer binding sites are indicated by arrows. Nucleotide differences in the used primer sequences are double underlined.

第二項 実験結果

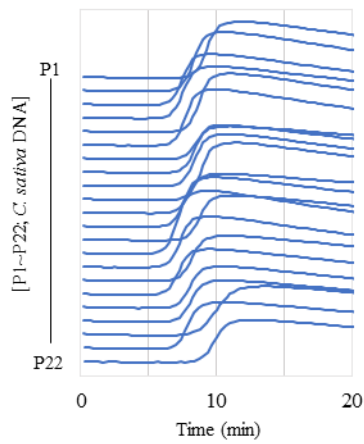
大麻草に特異的な検出を行うため、THCAS gene の共通領域を標的とした Cs-LAMP set を設計し、その感度及び特異性を検討した。まず、Cs-LAMP set を用いて検出感度の検討を行った。抽出精製した大麻草 DNA を用いて希釈系列 (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg) を作成し、これらを鋳型として 63°C 20 分の LAMP 反応を行った。その結果、10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg で 20 分以内の増幅が認められ、1 pg で増幅が認められなかったことから、検出感度は 10 pg と判断した (Fig 13a)。次に、大麻草及び陰性対照試料を用いて特異性の検討を行った。63°C 20 分の LAMP 反応において、大麻草 22 試料すべてに対して増幅が認められたが、陰性対照 50 試料すべてに対して増幅は認められなかった (Fig 13b, c)。

Fig. 13 LAMP reaction using Cs LAMP set.

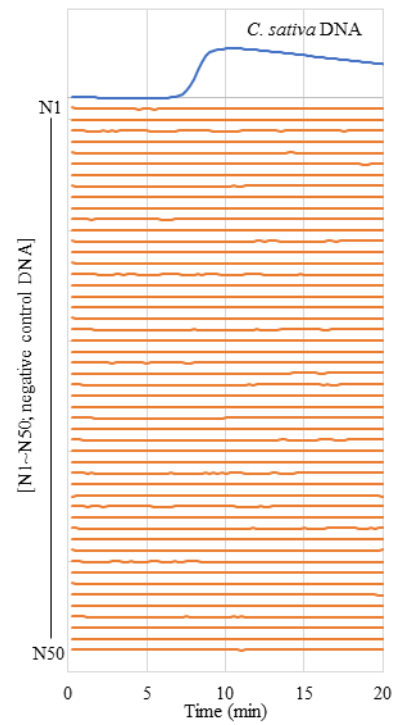
a



b



c



(a) Sensitivity of LAMP reaction The LAMP reaction of 10-fold serial dilutions of purified DNA (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, and 1 pg) was performed. (b) Amplification occurred with purified DNA from 22 *C. sativa* strains (P1-P22). (c) No amplification occurred with purified DNA from 50 other plant species (N1-N50).

第三項 実験考察

本来、種の分子系統学的分類は The Consortium for the Barcode of Life (<http://www.barcodeoflife.org/>) の推奨する DNA 配列 (*matK*, *rbcL*) や ITS 領域などの DNA 配列を用いるのが適切な手法である。しかし、THCAS gene を標的とする利点の一つとして、その遺伝子の機能から大麻草に特有の遺伝子であると容易に推測しやすいという点が挙げられる。法科学分野で行われる鑑別は専門外の人に内容を説明する機会も多いことから、一般の人に説明しやすいという点が重要な要素となる。このような背景から、種鑑別のマーカーとして THCAS gene の共通領域を標的に用いた。

Cs-LAMP set の検出感度は 10 pg と細胞数個分に相当する感度であった。これは葉緑体 DNA をターゲットとしたリアルタイム PCR 法による鑑別とほぼ同等の感度であるため⁴⁵⁾、本法を最高感度の鑑別法の一つに位置付けすることができる。反応時間は 20 分で完了するため、一般的な PCR を原理とする核酸増幅手法に比べ迅速に行うことが可能であった。また、本法は 50 試料の陰性対照や近縁種に対する非特異的な増幅が認められず、高い特異性も有していた。近縁種である *Humulus lupulus* には THCAS gene と約 80% 相同性が認められる遺伝子領域を有することが報告されている⁵⁴⁾。Cs-LAMP set は *Humulus lupulus* (Fig. 11c; N:50) にも反応が認められなかったことから、今回検討していない他の植物種に対しても非特異的な増幅が起きる可能性は極めて低いと考えられる。

そのため、Cs-LAMP set による LAMP 法は特異性が高く、高感度且つ迅速に大麻草の鑑別を行うことができ、法科学的な鑑別法として有効であると考えられる。

第三節 大麻草のオンサイト LAMP 法への応用

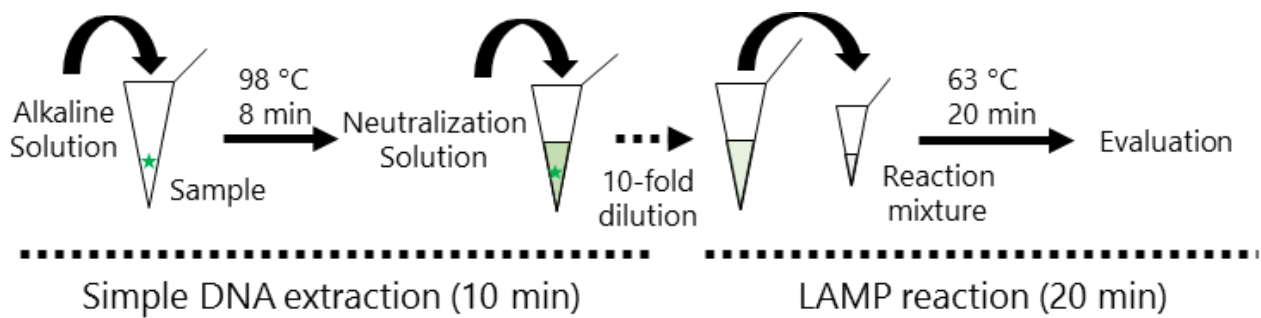
第一項 実験材料・方法

大麻草の各組織（drug-type 系統：葉，花穂，茎，根，果実，fiber-type 系統：果実），大麻草樹脂 3 試料，*Humulus lupulus*（葉）・*Morus australis*（葉）・*Humulus japonicus*（葉），*Hibiscus cannabinus*（果実），*Papaver somniferum*（抽出物）・*Nicotiana tabacum*（葉）を実験材料として用いた．各試料に対し，カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2（株式会社カネカ）を用いて簡易 DNA 抽出を行った．約 3~10 mg の乾燥した各植物組織や抽出物（果実は 1 粒）からアルカリ溶液である Solution A 100 μ L を加え 98°C 8 分間加熱処理を行ったのち，中和溶液である Solution B を 14 μ L を加え crude DNA を抽出した．crude DNA を 10 倍希釈したものを 2 μ L を含む総量 25 μ L の LAMP 反応溶液について，63°C 20 分の反応及び増幅の確認を 2 つの方法で行った．1 つ目はリアルタイム PCR 装置を用いて行い，二次微分法により算出された Threshold Cycle 値を時間に変換することで，増幅開始時間を算出した．2 つ目は予め LAMP 反応溶液に D-QUICK⁵⁵⁾（株式会社カネカ）を加え，MyAbscope（株式会社カネカ）を用いて 63°C，20 分増幅反応を行い，反応後の溶液の色調変化により増幅の有無を確認した．

第二項 実験結果

簡易 DNA 抽出した crude DNA を鋳型として LAMP 反応を行う簡易鑑別プロトコールを用いて、大麻草由来試料や陰性対照試料に対する反応性の検討を行った (Fig 14). 大麻草の各組織 (drug-type 系統: 葉, 花穂, 茎, 根, 果実, fiber-type 系統: 果実), 大麻草樹脂 3 試料, 近縁種である *Humulus lupulus* (葉)・*Morus australis* (葉)・*Humulus japonicus* (葉), 形態的に間違えやすい *Hibiscus cannabinus* (果実), 法科学の植物試料として想定される *Papaver somniferum* (抽出物)・*Nicotiana tabacum* (葉) から簡易 DNA 抽出を行い, crude DNA を鋳型として LAMP 反応を行った (Table 6). Cs-LAMP set を用いた場合, 大麻草由来のすべての試料に対して増幅が認められ, 陰性対照に対しては増幅が認められなかった. Dt-LAMP set を用いた場合, drug-type 系統の葉, 根, 果実, 大麻樹脂の 1 試料 (Resin 1) で増幅が認められたのに対し, 茎及び大麻樹脂の 2 試料 (Resin 2, Resin 3) で再現性のある増幅は認められなかった. また, fiber-type 系統の大麻草の果実や陰性対照試料に対して増幅は認められなかった. Crude DNA の LAMP 反応性を確認するため, 核 18S rRNA 遺伝子領域をターゲットにした植物プライマーセット⁵⁰⁾を用いて LAMP 法を行ったところ, すべての試料で増幅を確認することができた. さらに, オンサイトによる鑑別を想定し, 反応試薬に判定指示薬を予め反応溶液に加え, ポータブル装置を用いて反応を行った. LAMP 反応後の溶液について呈色の有無により鑑別結果は蛍光検出による鑑別結果と同じであり, 技術的にオンサイトによる鑑別が可能であった (Fig. 15).

Fig. 14 Simple protocol for rapid identification



Procedure of the protocol. The protocol is divided into two processes: simple DNA extraction and LAMP reaction. Simple DNA extraction was as follows: Samples were lysed with alkaline solution and heated at 98 °C for 8 min, and neutralization solution was added. A 10-fold diluted DNA solution was used as DNA template. LAMP amplification was conducted at 63 °C for 20 min.

Table 6 Results using simple protocol (N=3).

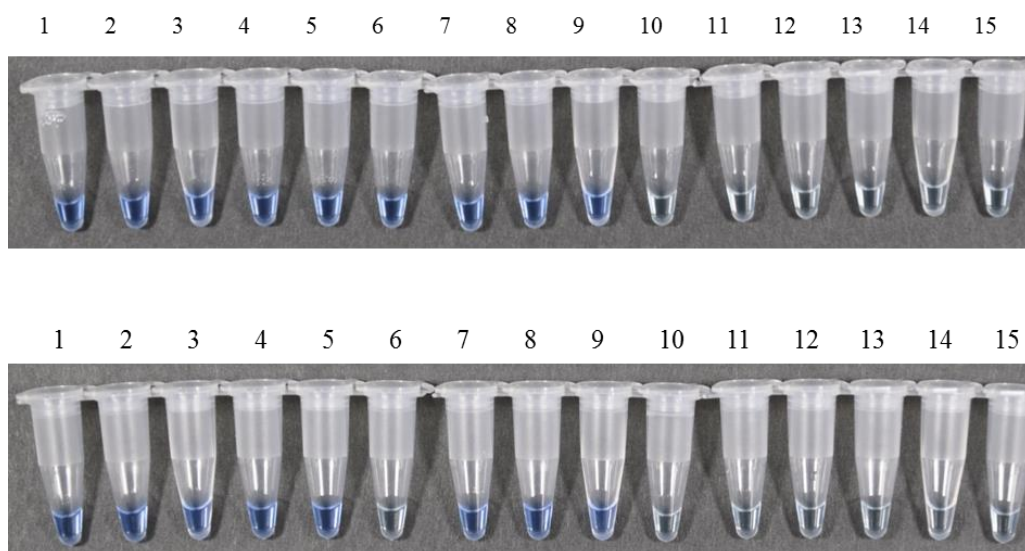
No.	Species	Sample	Cs-LAMP set			Dt-LAMP set			Plant LAMP set		
			Initial rise time (min±SD)	Initial rise time (min±SD)	Initial rise time (min±SD)	Initial rise time (min±SD)	Initial rise time (min±SD)	Initial rise time (min±SD)	Initial rise time (min±SD)	Initial rise time (min±SD)	Initial rise time (min±SD)
1	<i>Cannabis sativa</i>	leaf	9.3±0.2	16.3±3.0	10.4±0.3						
2		flower	8.0±0.1	15.3±2.9	9.0±0.2						
3		stem	8.3±0.3	(13.4)*	9.5±0.2						
4		root	8.3±0.2	13.8±0.5	9.0±0.3						
5		seed	8.6±0.3	12.5±0.6	8.1±0.5						
6		seed (fiber-type strain)	11.2±0.1	n.d.	8.4±0.2						
7		resin 1	8.7±0.1	14.5±0.4	9.7±0.4						
8		resin 2	9.0±0.1	(18.4, 14.4)**	10.3±0.2						
9		resin 3	9.1±0.1	(16.0, 19.0)**	10.1±0.1						
10		extracts	n.d.	n.d.	14.6±0.6						
11		<i>Papaver somniferum</i>	leaf	n.d.	n.d.	10.9±0.4					
12		<i>Humulus lupulus</i>	leaf	n.d.	n.d.	9.1±0.6					
13		<i>Humulus japonicus</i>	leaf	n.d.	n.d.	9.2±0.5					
14		<i>Morus australis</i>	leaf	n.d.	n.d.	10.1±0.1					
15		<i>Hibiscus cannabinus</i>	seed	n.d.	n.d.	9.4±1.2					
	<i>Nicotiana tabacum</i>	leaf	n.d.	n.d.							

*Two of three samples were not amplified even after 20 min.

**One of three samples was not amplified even after 20 min

***n.d.: not detected even after 20 min.

Fig. 15 Reactivity of on-site protocol for LAMP



Reactivity of on-site protocol for *C. sativa* detection LAMP (a) and drug-type *C. sativa* detection LAMP (b) Simple protocol was performed with drug-type *C. sativa* derived samples (1; leaf, 2; flower, 3; stem, 4; root, 5; a seed), a fiber-type *C. sativa* sample (6; a seed), resin samples (7-9; resins), and other species derived samples (10; *Papaver somniferum* extracts, 11; *Humulus lupulus* leaf, 12; *Humulus japonicus* leaf, 13; *Morus australis* leaf, 14; *Hibiscus cannabinus* seed, and 15; *Nicotiana Tabacum* leaf).

第三項 実験考察

これまで報告されている DNA による鑑別は数時間を要し、また実施場所も DNA 設備の整った実験室内に限定されていた。簡易鑑別プロトコールは約 30 分で実施可能で、装置や検出系をシンプルにすることで、オンサイト検出を想定した鑑別も可能であった。大麻草を簡易的に確認する方法としてデュケノア反応が知られており、これは THC に対する呈色の有無により大麻草由来の試料を鑑別する手法である⁵⁶⁾。しかしながら、一部の試料で疑陽性となることも知られており、従来の手法ではオンサイトによる正確な鑑別は困難であった。本研究の簡易鑑別プロトコールは上記手法に比べ、はるかに高い精度で鑑別を行うことができる。そのため、本法は DNA による簡便・迅速・高感度検出を特徴とする、犯罪捜査や税関における簡易スクリーニングを始めとした様々な状況に対応可能な新規鑑別法であると考えられる。

小括

LAMP 法による大麻草の系統及び種鑑別法の開発を行った。系統間で多型性が認められる THCAS gene の drug-type 系統特異的な領域及び共通領域を標的とした LAMP プライマーセットを作成し、検出感度や特異性の評価を行った。両プライマーセットは目的に応じた十分な感度を有し、高い特異性を有していた。さらに、DNA 抽出を簡略化した簡易鑑別プロトコルを用いることにより、様々な植物組織から約 30 分で鑑別することができ、さらにオンサイトによる鑑別も技術的に可能であった。開発した鑑別法は系統維持を目的とした品種管理法や法科学分野における新規鑑別法として応用可能である。

実験の部

使用機器

- ・ サーマルサイクラー：GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- ・ リアルタイム PCR 装置：SmartCycler II System (Cepheid 社)
- ・ ポータブル等温増幅装置：MyAbscope (カネカ株式会社)
- ・ シークエンサー：3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems)
- ・ DNA 解析ソフトウェア：Sequencing Analysis version 5.2
- ・ DNA 解析ソフトウェア：Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0
- ・ DNA 解析ソフトウェア：DnaSP v.5
- ・ 画像解析ソフトウェア：ImageJ
- ・ 統計解析ソフトウェア：ROCR package for R, pROC package for R^{22, 23)}
- ・ LAMP プライマー設計ソフトウェア：Primer Explorer (栄研化学株式会社)

使用試薬

- ・ DNA 抽出試薬：DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社)
- ・ 簡易 DNA 抽出試薬：カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2 (カネカ株式会社)
- ・ プライマー：理科研株式会社
- ・ シークエンス試薬：BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- ・ LAMP 反応試薬：Isothermal Master Mix (株式会社ニッポンジーン)

実験方法（第一章）

・ダイレクトシーケンス

植物試料を液体窒素下で凍結粉砕し、DNeasy Plant Mini Kit（Qiagen 社）を用いて DNA 抽出を行った。抽出した DNA を鋳型として PCR 反応を行った。反応溶液は 10×PCR buffer（2.5 μ L）、2.5 mM deoxynucleoside triphosphates（2.0 μ L）、10 μ M primer a（0.5 μ L）、10 μ M reverse primer b（0.5 μ L）、5 units/ μ L TaKaRa Taq HS polymerase（Takara, Japan; 0.125 μ L）を含む総量 25 μ L とした。PCR プライマー及び PCR 反応条件は以下に示した。PCR 産物は Fast Gene™ Gel/PCR Extraction Kit（Nippon Genetics Europe GmbH）を用いて精製し、精製した PCR 産物について primer b-f を用いて BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.1.1（Applied Biosystems）によりシーケンス反応を行った。用いたプライマー配列及び反応条件は以下に示した。反応産物は精製後、3130xl genetic analyzer（Applied Biosystems）を用いて泳動分離し、Sequencing Analysis version 5.2 を用いて DNA 配列を取得した。得られた DNA 配列について Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 を用いてアライメントを行い、集団間の平均塩基置換数は DnaSP v.5 を用いて解析を行った。得られた THBO gene の配列（Lo01～Lo13 各 4 個体、市場品黄連 1 個体）について LC269110-LC269162 として国際塩基配列データベースに登録した。

PCR reaction

Number of cycles (35×)

98 °C for 10 sec

57 °C for 30 sec

72 °C for 1 min

Final extension at 72 °C for 1 min

Cycle sequencing

Hot start 96°C for 2 min

Number of cycles (25×)

96°C for 10 sec

50°C for 5 sec

60°C for 4 min

Primer

Primer Name	Prime Sequence	Length	Nucleotide*
Primer a	TAGTGAAGCTCCATAGAAACATTGA	25	1–25
Primer b	CCTGCTTTTCTCAGCAATCC	20	522–503
Primer c	TGCAGGGCTTGTACTGAG	20	908–889
Primer d	AGGCTGTGTTGGAAGGGATA	20	1190–1209
Primer e	TCTTTCCACCGTAAGGACTCA	21	1270–1250
Primer f	TCACTTCTTTGCTTCTGCCA	20	1653–1634

*Nucleotide position was based on GenBank Accession no. AB564543

実験材料・方法（第二章）

・実験材料

北陸大学より 2015 年栽培された drug-type 系統の大麻草の各組織（葉，花穂，茎，根）を 1 個体譲受した． drug-type 系統の 21 品種の大麻草（Table 7 : P1~21）の葉または種子は東京都健康安全研究センターより譲受した． 栃木県農業試験場より fiber-type 系統の大麻草（Table 7 : P22）を譲受した． 大麻樹脂は科学警察研究所で保管されていた 3 試料を用いた． Table 7 の陰性試料 50 試料及び陰性対照 5 種（*Humulus lupulus*, *Humulus lupulus*, *Morus australis*, *Hibiscus cannabinus*, *Nicotiana tabacum*）は金沢大学薬用植物園で栽培されている試料を用いた．

・DNA 解析

植物試料を液体窒素下で凍結粉碎し， DNeasy Plant Mini Kit（Qiagen 社）を用いて DNA 抽出を行い抽出精製 DNA として用いた． DNA 濃度を吸光度計により測定し， 特異性の検討において 1.0~10 ng を LAMP 反応の鋳型 DNA 量として用いた．

・THCAS gene クローニング

1×PCR buffer（TaKaRa, Japan）， 0.2 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate（dNTP）（TaKaRa）， 0.5 μM forward primer（5→3; GCG GAT CCA TGA ATT GCT CAG CAT TTT CCT TTT）， 0.5 μM reverse primer（5→3; GCC TGC AGT CTA TTT AAA GAT AAT TAA TGA TGA TGC GGT GG）， Ex Taq DNA polymerase 0.625 unit（TaKaRa）， 1 μL genomic DNA（*C. sativa*, Big Bud）を含む総量 25 μL で PCR 反応を行った． PCR 増幅産物と pBluescript vector について *Bam*HI と *Pst*I

を用いて制限酵素処理を行い、ライゲーション反応後、大腸菌に形質転換を行った。得られたクローンはシーケンスにより塩基配列を決定し、得られた drug-type THCAS gene 及び fiber-type THCAS gene の配列について LC120319, LC120320 として国際塩基配列データベースに登録した。プラスミドは 6×10^5 コピー数に相当するよう希釈し、特異性の検討における LAMP 反応の鋳型量として用いた。

・LAMP 反応

反応試薬に Isothermal Master Mix (株式会社ニッポンジーン) を用いて行った。LAMP 反応試薬の組成は、2×Reaction mix 15 μ L, プライマー混合液 (5 pmol each of F3 and B3 primers, 40 pmol each of FIP and BIP primers, 20 pmol each of loop primers), DNA 溶液 2 μ L を加え、総量を純水で 25 μ L とした。反応条件は装置に Smart Cycler II Systems (Cepheid 製) を用いて 63°C, 20 分増幅反応を行い 510~527 nm の蛍光波長を測定した。増幅曲線の 2 次導関数から算出された Threshold cycle 値を基に反応開始時間を算出した。

・植物 LAMP プライマーセット⁵⁰⁾

U-FIP : TCA GGA TTG GGT AAT TTG CGC GCC TAT AGG AGA GGG AGC CTG
AGA AAC GG

U-BIP : TGG TAA TTG GAA TGA GTA CAA TCT AAA TCC CTT ATT ATT GGA
GCT GGA ATT ACC GCG G

U-F3 : ACG GAG AAT TAG GGT TCG ATT

U-B3 : ACT GCA ACA ACT TAA ATA TAC GC

U-Loop 1 : TGC TGC CTT CCT TGG ATG

U-Loop 2 : CAA GTC TGG TGC CAG CAG

Table 7 *C. sativa* and negative control species names for specificity evaluation

No.	Species (product name) [Strains]	No.	Species (product name) [Strains]
P1	<i>Cannabis sativa</i> L. (Afghani special) [drug-type]	N15	<i>Coptis japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>anemonifolia</i>
P2	<i>Cannabis sativa</i> L. (Bahia Black Head) [drug-type]	N16	<i>Stauntonia hexaphylla</i> (Thunb.) Decne.
P3	<i>Cannabis sativa</i> L. (Big Bud) [drug-type]	N17	<i>Cocculus trilobus</i> (Thunb.) DC.
P4	<i>Cannabis sativa</i> L. (Cal. Orange) [drug-type]	N18	<i>Clematis chinensis</i> Osbeck
P5	<i>Cannabis sativa</i> L. (Crystal Paradise) [drug-type]	N19	<i>Crocus sativus</i> L.
P6	<i>Cannabis sativa</i> L. (Durban Poison) [drug-type]	N20	<i>Valeriana fauriei</i> Briq.
P7	<i>Cannabis sativa</i> L. (Early Bud) [drug-type]	N21	<i>Hordeum vulgare</i> L.
P8	<i>Cannabis sativa</i> L. (Haze Special) [drug-type]	N22	<i>Matricaria chamomilla</i> L.
P9	<i>Cannabis sativa</i> L. (Isis) [drug-type]	N23	<i>Cnidium officinale</i> Makino
P10	<i>Cannabis sativa</i> L. (Leda Uno) [drug-type]	N24	<i>Platycodon grandiflorus</i> (Jacq.) A.DC.
P11	<i>Cannabis sativa</i> L. (Mango) [drug-type]	N25	<i>Fritillaria verticillata</i> Willd. var. <i>thunbergii</i> (Miq.) Baker
P12	<i>Cannabis sativa</i> L. (Northern Light) [drug-type]	N26	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.
P13	<i>Cannabis sativa</i> L. (Northern Light Special) [drug-type]	N27	<i>Lilium pumilum</i> Redouté
P14	<i>Cannabis sativa</i> L. (Purple) [drug-type]	N28	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx.
P15	<i>Cannabis sativa</i> L. (Purple Star) [drug-type]	N29	<i>Atractylodes japonica</i> Koidz. ex Kitam.
P16	<i>Cannabis sativa</i> L. (Sacra Frasca) [drug-type]	N30	<i>Symphytum officinale</i> L.
P17	<i>Cannabis sativa</i> L. (Shaman) [drug-type]	N31	<i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC.
P18	<i>Cannabis sativa</i> L. (Skunk Pussion) [drug-type]	N32	<i>Glehnia littoralis</i> F.Schmidt ex Miq.
P19	<i>Cannabis sativa</i> L. (Twilight) [drug-type]	N33	<i>Artemisia absinthium</i> L.
P20	<i>Cannabis sativa</i> L. (Voodoo) [drug-type]	N34	<i>Panax ginseng</i> C.A.Mey.
P21	<i>Cannabis sativa</i> L. (White Rhino) [drug-type]	N35	<i>Panax japonicus</i> (T.Nees) C.A.Mey.
P22	<i>Cannabis sativa</i> L. (Tochigishiro) [fiber-type]	N36	<i>Hemerocallis fulva</i> L. var. <i>kwanso</i> Regel
N1	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	N37	<i>Armoracia rusticana</i> P.Gaertn., B.Mey. et Scherb.
N2	<i>Glechoma hederacea</i> L. subsp. <i>grandis</i>	N38	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.
N3	<i>Astragalus membranaceus</i>	N39	<i>Phellodendron amurense</i> Rupr.
N4	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	N40	<i>Magnolia obovata</i> Thunb.
N5	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	N41	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
N6	<i>Angelica acutiloba</i>	N42	<i>Acer japonicum</i> Thunb.
N7	<i>Patrinia scabiosifolia</i> Fisch. ex Trevir.	N43	<i>Clinopodium gracile</i> (Benth.) Kuntze
N8	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	N44	<i>Amorpha fruticosa</i> L.
N9	<i>Asiasarum sieboldii</i> (Miq.) F.Maek.	N45	<i>Styrax japonica</i> Siebold et Zucc.
N10	<i>Coptis japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>japonica</i>	N46	<i>Staphylea bumalda</i> DC.
N11	<i>Coptis trifoliolata</i> (Makino) Makino	N47	<i>Symplocos coreana</i> (H.Lév.) Ohwi
N12	<i>Coptis japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>major</i>	N48	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
N13	<i>Anemone flaccida</i> F.Schmidt	N49	<i>Callicarpa japonica</i> Thunb.
N14	<i>Cimicifuga simplex</i> (DC.) Wormsk. ex Turcz.	N50	<i>Humulus lupulus</i>

参考論文

1. The Ministry of Health, Labour and Welfare, The Japanese pharmacopoeia. 17th edn (English version), 1837–1838, (2016)
2. Satake Y, A note on the Coptis of Japan. *J Jpn Bot*, **24**:69-74, (1949)
3. 水野瑞夫, 小島弘之, 飯沼宗和, 田中稔幸, 日本産オウレン属の成分とその変異. *生薬学雑誌*, **46**(1):42-48, (1992)
4. Xiang KL, Wu SD, Yu SX, Liu Y, Jabbour F, Erst AS, Zhao L, Wang W, Chen ZD, The First Comprehensive Phylogeny of Coptis (Ranunculaceae) and Its Implications for Character Evolution and Classification. *PLoS One*, **11**(4):e0153127, (2016)
5. Mitosinka GT, Thornton JI, Hayes TL, The examination of cystolithic hairs of Cannabis and other plants by means of the scanning electron microscope. *J Forensic Sci Soc*, **12**:521-529, (1972).
6. 吉松嘉代, 北澤 尚, 河野徳昭, 飯田 修, 川原信夫, 大麻草の種子形態, 発芽・生育特性と類似植物ケナフとの判別. *薬学雑誌*, **130**(2):237-246, (2010)
7. Cho JY, Baik KU, Yoo ES, Yoshikawa K, Park MH, In vitro antiinflammatory effects of neolignan woorenosides from the rhizomes of *Coptis japonica*. *J Nat Prod*, **63**(9):1205-1209, (2000)
8. 日本漢方生薬製剤協会, 医療用漢方製剤委員会, 有用性研究部会, 「医療用漢方製剤 2016 -148 処方の添付文書情報」 1-184, (2016)
9. 厚生労働省・生活衛生局長, 一般用漢方製剤販売承認基準について. 薬生発 0328 第 1 号, 平成 29 年 3 月 28 日
10. 日本漢方生薬製剤協会, 「原料生薬使用量等調査報告書(4) -平成 25 年度および平成 26 年度の使用量-」 1-36, (2016)
11. 難波恒雄解説, 「詳解 古方薬品考」古方薬品考刊行会, 77-78, (1969)
12. 御影雅幸, 川本光重, オウレンの史的考察(第一報) 江戸時代に加賀黄連が良質品とされた理由. *Nat Med*, **52**(5):414-420 (1998)
13. 「古事類苑 植物部二・金石部」吉川弘文館, 東京, 192-195, (1936)
14. 正宗敦夫編, 「日本古典全集 平賀源内 “物類品隲”」 54-55, 日本古典全集刊行会, (1928)
15. 公益財団法人 日本特産農作物協会, 「薬用植物及び和紙原料等に関する資料」 1-64, (2017)
16. 吉松嘉代, 乾 貴幸, 植物工場における薬用植物の栽培・生産, *特産種苗*. **16**:35-41, (2013)
17. 御影雅幸, 麻黄(マオウ)の国内栽培を目指して. *特産種苗*, **16**:53-57, (2013)

18. Iwatsuki K, Boufford DE, and Ohba H “Flora of Japan” 講談社, **2a**:323-326 (2006)
19. 嶋野 武, 水野瑞夫, 鈴木富子, オウレンの生薬学的研究 (第一報) オウレンの分布と Palisade ratio について, *岐阜薬科大学紀要*, **10**:51-55, (1960)
20. 木村久吉, 失われゆく石川の自然. *社会教育研究*, **12**:73-103, (1972)
21. Okada N, Shinmyo A, Okada H, Yamada Y, Purification and characterization of (S)-tetrahydroberberine oxidase from cultured *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry*, **27**:979-982, (1998)
22. Matsushima Y, Minami H, Hori K, Sato F, Pathway engineering of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in transgenic California poppy cells with ectopic expression of tetrahydroberberine oxidase from *Coptis japonica*. *Plant Biotechnol*, **29**:473-481, (2012)
23. Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T, ROCr: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics*, **21**:3940-3941, (2005)
24. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, Müller M, pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, **12**:77, (2011)
25. Wang XM, Hou XQ, Zhang YQ, Li Y, Morphological variation in leaf dissection of *Rheum palmatum* complex (Polygonaceae). *PLoS One*, **9**:e110760, (2014)
26. Viscosi V, Cardini A, Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. *PLoS One*, **6**:e25630, (2011)
27. Li X, Li Y, Zhang Z, Li X, Influences of environmental factors on leaf morphology of Chinese jujubes. *PLoS One*, **10**:e0127825, (2015)
28. Xu F, Guo W, Xu W, Wei Y, Wang R, Leaf morphology correlates with water and light availability: What consequences for simple and compound leaves? *Progress in Natural Science*, **19**:1789-1798, (2009)
29. 山本郁男. 大麻文化科学考 (その1) . *北陸大学紀要*, **14**:1-16, (1990)
30. Kuglarz M, Alvarado-Morales M, Karakashev D, Angelidaki I, Integrated production of cellulosic bioethanol and succinic acid from industrial hemp in a biorefinery concept. *Bioresour Technol*, **200**:639-647, (2016)
31. Gould J, The cannabis crop. *Nature*, **525**(7570):S2-3, (2015)
32. Grotenhermen F, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet*, **42**(4):327-360, (2003)
33. 法務省, 平成 28 年版 犯罪白書
<<http://hakusyo1.moj.go.jp/jp/63/nfm/mokuji.html>>

34. Kojoma M, Seki H, Yoshida S, Muranaka T, DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in "drug-type" and "fiber-type" *Cannabis sativa* L. *Forensic Sci Int*, 159:132-140, (2006)
35. de Meijer EP, Bagatta M, Carboni A, Crucitti P, Moliterni VM, Ranalli P, Mandolino G, The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*, **163**(1):335-346, (2003)
36. Weiblen GD, Wenger JP, Craft KJ, ElSohly MA, Mehmedic Z, Treiber EL, Marks MD, Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. *New Phytol*, **208**(4):1241-1250, (2015)
37. Sawler J, Stout JM, Gardner KM, Hudson D, Vidmar J, Butler L, Page JE, Myles S, The Genetic Structure of Marijuana and Hemp. *PLoS One* **10**:e0133292, (2015)
38. Staginnus C, Zörntlein S, de Meijer E, A PCR marker linked to a THCA synthase polymorphism is a reliable tool to discriminate potentially THC-rich plants of *Cannabis sativa* L. *J Forensic Sci*, 59:919-926, (2014)
39. Sirikantaramas S, Morimoto S, Shoyama Y, Ishikawa Y, Wada Y, Taura F, The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Delta1-tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *J Biol Chem* **279**:39767-39774, (2004)
40. Taura F, Dono E, Sirikantaramas S, Yoshimura K, Shoyama Y, Morimoto S, Production of Delta(1)-tetrahydrocannabinolic acid by the biosynthetic enzyme secreted from transgenic *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun* **361**:675-680, (2007)
41. Grauwiler SB, Scholer A, Drewe J, Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of *Cannabis sativa* extracts. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **850**(1-2):515-522, (2007)
42. Aizpurua-Olaizola O, Omar J, Navarro P, Olivares M, Etxebarria N, Usobiaga A, Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **406**(29):7549-7560, (2014)
43. Omar J, Olivares M, Alzaga M, Etxebarria N, Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS. *J Sep Sci*, **36**(8):1397-1404, (2013)
44. Linacre A, Thorpe J, Detection and identification of cannabis by DNA. *Forensic Sci Int*, **91**(1):71-76, (1998)
45. Johnson CE, Premasuthan A, Satkoski Trask J, Kanthaswamy S, Species

- identification of *Cannabis sativa* using real-time quantitative PCR (qPCR). *J Forensic Sci*, **58**(2):486-490, (2013)
46. Rotherham D, Harbison SA, Differentiation of drug and non-drug Cannabis using a single nucleotide polymorphism (SNP) assay. *Forensic Sci Int*, **207**(1-3):193-197, (2011)
 47. 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)
 48. Sasaki Y, Komatsu K, Nagumo S, Rapid detection of *Panax ginseng* by loop-mediated isothermal amplification and its application to authentication of Ginseng. *Biol Pharm Bull*, **31**(9):1806-1808, (2008)
 49. Kurosaki Y, Magassouba N, Oloniniyi OK, Cherif MS, Sakabe S, Takada A, Hirayama K, Yasuda J, Development and Evaluation of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay Coupled with a Portable Device for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Disease in Guinea. *PLoS Negl Trop Dis*, **10**(2):e0004472, (2016)
 50. Focke F, Haase I, Fischer M, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): methods for plant species identification in food. *J Agric Food Chem*, **61**(12):2943-2949, (2013)
 51. 厚生労働省保険局医療課長, 診療報酬の算定方法の一部改正に伴う実施上の留意事項について. 保医発1031第2号, 平成28年3月4日
 52. Nagamine K, Hase T, Notomi T, Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*, **16**(3):223-229, (2002)
 53. van Bakel H, Stout JM, Cote AG, Tallon CM, Sharpe AG, Hughes TR, Page JE, The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biol*, **12**(10):R102, (2011)
 54. Natsume S, Takagi H, Shiraishi A, Murata J, Toyonaga H, Patzak J, Takagi M, Yaegashi H, Uemura A, Mitsuoka C *et al*, The Draft Genome of Hop (*Humulus lupulus*), an Essence for Brewing. *Plant Cell Physiol*, **56**(3):428-441 (2015)
 55. Miyamoto S, Sano S, Takahashi K, Jikihara T, Method for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmethane dyes. *Anal Biochem*, **473**:28-33, (2015)
 56. 渡辺和人, 山折 大, 山本郁男. 大麻文化科学考 (その24) . 北陸大学紀要, **37**:27-35, (2013)

謝辞

佐々木准教授には、3年数か月前に面識のなかった私を快く受け入れてくださいました。研究面だけではなく、生薬の面白さから所作の一つ一つに至るまで多くのご指導賜りました。ここに言葉に言い尽くせない感謝の意を表します。

東京農業大学 御影雅幸教授には心強い励ましを賜りました。漢方生薬ソムリエ協会の活動や加賀能登シンポジウムを通じ、生薬に関する知識だけでなく、生薬分野に携わる者としての心得をご教授賜りました。謹んで御礼申し上げます。

第一章の研究にあたり、貴重なご助言や試料の提供を賜りました兵庫県農林水産技術センター 栗畑直實様、五箇特殊林産物振興組合 加藤好昭様に深謝いたします。第二章の研究にあたり、貴重なご助言や試料の提供を賜りました第一薬科大学 渡辺和人教授、東京都健康安全研究センター 荒金眞佐子様に深謝いたします。

研究を遂行するにあたり、安藤広和助教にご助言、ご協力を賜りましたことを深謝いたします。また、分子生薬研究室の皆さまにも本当にお世話になりました。10歳以上離れた私を対等に扱ってくださり、様々な意見を年齢の壁を越えて交わすことのできた3年間は貴重な経験となりました。

社会人過程として、科学捜査研究所の皆さまに多大なご迷惑をおかけしたことを深謝するとともに、協力してくださった方々に感謝いたします。

私に研究者としての基本を教えてください、また20代の頃から温かく見守ってくださいました京都大学 中山和久教授、金沢大学 加藤将夫教授に御礼申し上げます。研究者として遅れながらのスタートではありますが、今後大きく成長できるよう精進いたします。

最後に、公私にわたりバックアップをしてくださり、チーム「北村雅史」の中核を担ってくださいました妻 香織、勇気と元気を与えてくださいました娘 有理佳に深く感謝いたします。