—技術報告—

Py-GC による植物細胞壁構成成分を指標とした植物分類法の検討

内山岳人^{*1}, 甲斐彩友美^{*2}, 谷村真一^{*3}, 佐田一浩^{*3}, 川村 修^{*2}, 明石 良^{*4}宮崎県警察本部刑事部科学捜査研究所^{*1}, 宮崎大学農学部^{*2}, 宮崎沖電気株^{*3},宮崎大学フロンティア科学実験総合センター^{*4}〒880-8509 宮崎市旭 1-8-28^{*1}〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1^{*2,*4}〒889-1695 宮崎郡清武町大字木原727^{*3}**Identification of Plant Species through the Detection of the Cell Wall Components Using Pyrolysis-Gas Chromatography**Taketo Uchiyama^{*1}, Sayumi Kai^{*2}, Shinichi Tanimura^{*3}, Kazuhiro Sata^{*3},
Osamu Kawamura^{*2} and Ryo Akashi^{*4}*Forensic Science Laboratory, Miyazaki Prefectural Police H.Q.**1-8-28 Asahi, Miyazaki 880-8509, Japan^{*1}**Faculty of Agriculture, Miyazaki University, 1-1 Gakuenkibanadainishi, Miyazaki 889-2192, Japan^{*2}**Miyazaki Oki Electric Co., Ltd, 727 Kihara Kiyotake, Miyazaki 889-1695, Japan^{*3}**Frontier Science research Center, Miyazaki University**1-1 Gakuenkibanadainishi, Miyazaki 889-2192, Japan^{*4}**(Received 15 June 2006; accepted 9 April 2007)*

Identification of plant species is one of the clues, which is an important tool in criminal investigation. However, morphological test and DNA extraction are very difficult in minute plant pieces. Thus, it is necessary to develop a technique for classification and identification based on biological and chemical components, which does not require DNA analysis. This study analyzed the lignin of the cell wall components, which are products of secondary metabolism of a plant and also examined the species peculiarity and utility in forensic science. An analysis method of lignin is Pyrolysis-Gas chromatography (Py-GC). Analysis of trace amounts of dried plant samples using Py-GC shows results in waveform data, called pyrogram. Powdered samples each of 1.4 mg were dried, in all 22 plant species including *Gramineae* and *Leguminosae* were used for Py-GC. Thirteen characteristic peaks were chosen among a pyrogram of *Gramineae* and it was converted into a bar graph and compared with other plant species. As a result, same plant species showed the similar pattern, and the same plant that was taken from a different place also showed the same pattern, and reproduction characteristics were recognized. Therefore, the

* 本論文の内容は日本鑑識科学技術学会第10回学術集会発表における奨励賞を受賞した。

possibility that difference in plant species is specific was shown by the pyrogram pattern. Even if it was the sample, in which DNA cannot be extracted, as for this method, a classification of a plant species was possible. Preprocessing of a sample is simple, as it has to only be dried. In conclusion, the application of this method in criminal investigation will involve swiftness and also forms a simple classification method for plant species.

Key words: Lignin, Pyrolysis–Gas Chromatography (Py–GC), Plant identification, Plant component

緒 言

植物種の分類・同定技術は、従来の葉や種子などの形態学的特徴や酵素多型から、RFLP法（Restriction Fragment Length Polymorphism法）やRAPD法（Random Amplified Polymorphic DNA法）などのゲノム解析へと変わってきている¹⁻⁵⁾。犯罪捜査においても植物片の異同識別は重要な証拠資料と考えられる。しかしながら、犯罪現場に遺留される極微量の植物片は、形態学的検査が難しく、また、DNA^{6,7)}抽出も熟練を要する技術が必要であること、コストパフォーマンスが高いことなどの問題を抱えており、現段階で微細植物片から植物種を推定することは非常に困難である。したがって、このような微量な資料に対して、DNAを用いない普遍的な植物構成要素による分類・同定法の開発が望まれている。

植物細胞壁の主要成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニン分子である。リグニンはフェニルプロパンを基本骨格とした極めて複雑・不規則な構造を有する高分子化合物で⁸⁻¹¹⁾、植物種固有の代謝系を保持していることから、その化学的多様性は種の進化とともに構築されてきたものと考えられる¹²⁾。また、リグニンは土壌中や動物の消化器官内でも分解されず、DNAよりも安定した高分子化合物であるため、DNAが抽出困難な法科学的試料にも応用可能と考えられる。そこで、植物細胞壁中のリグニン組成の違いが効果的に活用できれば植物種を分類できる可能性が考えられる。

本研究では、熱分解ガスクロマトグラフィー(Py–GC)^{13,14)}により、乾燥植物体のリグニンを含む細胞壁構成成分から得られた熱分解生成物の波形データ（パイログラム）のパターンについて、その

法科学的有用性を検討した。

材料および方法

1 供試材料

供試材料は、宮崎大学農学部附属博物館で保存しているさく葉標本、または宮崎大学農学部で系統保存中の単子葉植物綱イネ目イネ科植物14種（Gramineae：ノシバ、コウライシバ、ヒメコウライシバ、イタリアンライグラス、ペレニアルライグラス、オーチャードグラス、ローズグラス、ギニアグラス、イネ、チガヤ、ソルガム、バミューダグラス、バヒアグラスおよびトウモロコシ）、双子葉植物綱バラ亜綱マメ目マメ科植物3種（Leguminosae：アカクロバ、シロクロバおよびミヤコグサ）、双子葉植物綱キク亜綱キク目キク科植物（Compositae：セイヨウタンポポ）、双子葉植物綱バラ亜綱トウダイグサ科植物（Euphorbiaceae、コニシキソウ）、単子葉植物綱ユリ目アヤメ科植物（Iridaceae、ニワゼキショウ）、双子葉植物綱コショウ目ドクダミ科植物（Saururaceae、ドクダミ）および双子葉植物綱オオバコ目オオバコ科植物（Plantaginaceae、オオバコ）の7科22種を用いた（Table 1）。各々植物は、60℃で2日間乾燥後、その組織片を実験に供試した。

2 熱分解ガスクロマトグラフィー（Py–GC）および測定条件

Py–GCは、キュリー点方式の誘導加熱型熱分解装置の日本分析工業製モデルJHP-3を使用した。Table 1に示す各植物の植物片を1.4 mg 精秤してパイロヒールに包んだ後、キュリーポイントで500℃まで上昇させて4秒間熱分解した¹²⁾。生成した揮発性熱分解物はUltra-ALLOY-1のキャピラリーカラム（FRONTIER LAB社製0.8 mm×30 m、膜厚2.0

Table 1 Plant species used in this study.

No	Family Names	Generic names	Botanical Names	Common Names	Japanese Names
1	Gramineae	<i>Zoysia</i>	<i>Z. japonica</i> steud.	Japanese lawngrass	Noshiha
2			<i>Z. matrella</i> Merr.	Manilagrass	Kourashiba
3			<i>Z. tenuifolia</i> Willd.	Mascarenegrass	Himekourashiba
4		<i>Lolium</i>	<i>L. multiflorum</i> Lam.	Italian ryegrass	Italian ryegrass
5			<i>L. perenne</i> L.	Perennial ryegrass	Perennial ryegrass
6		<i>Dactylis</i>	<i>D. glomerata</i> L.	Orchardgrass	Orchardgrass
7		<i>Chloris</i>	<i>C. gayana</i> kunth	Rhodesgrass	Rhodesgrass
8		<i>Panicum</i>	<i>P. maximum</i> Jacq.	Guineagrass	Guineagrass
9		<i>Oryza</i>	<i>O. sativa</i> L.	Rice	Ine
10		<i>Imperata</i>	<i>I. cylindrica</i> Beauv. var. <i>koenigii</i>	Cogongrass	Chigaya
11		<i>Sorghum</i>	<i>S. bicolor</i> Moench	Sorgham	Sorgham
12		<i>Cynodon</i>	<i>C. dactylon</i>	Bermudagrass	Bermudagrass
13		<i>Paspalum</i>	<i>P. notatum</i> Fulluge	Bahiagrass	Bahiagrass
14		<i>Zea</i>	<i>Z. mays</i> L.	Maize	Corn
15	Leguminosae	<i>Trifolium</i>	<i>T. pratense</i> L.	Red clover	Akakuroba
16			<i>T. repens</i> L.	White clover	Shirokuroba
17		<i>Lotus</i>	<i>L. corniculatus</i> var. <i>japonicus</i>	Birdsfoot trefoil	Miyakogusa
18	Compositae	<i>Taraxacum</i>	<i>T. officinale</i> Weber	Dandelion	Seiyoutanpopo
19	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia</i>	<i>E. supina</i> Rafin.	Milk-purslane	Koniskisou
20	Iridaceae	<i>Sisyrinchium</i>	<i>S. atlanticum</i>	Eastern blue eyed	Niwazekisyou
21	Saururaceae	<i>Houttuynia</i>	<i>H. cordata</i>	Dokudami	Dokudami
22	Plantaginaceae	<i>Plantago</i>	<i>P. asiatica</i>	Plantain	Oobako

μm)を使用したガスクロマトグラフ (GC-17A, 島津製作所製) により分析を行った. 熱分解条件および GC 条件は, サンプルの分析時間が70分で, カラム温度が50°Cで1分間保持した後, 5°C/minで280°Cまで昇温した. キャリヤーガスは, ヘリウムを用い, 検出器は FID (Flame ionization detector, 水素炎イオン化検出器) を使用した. その他の条件は, インジェクション温度が140°C, デテクター温度が280°C, パイロライザー温度が500°Cで, 一試料について2回ずつ測定を行った.

3 パイログラムデータの変換

上記測定条件で得られるパイログラムは, 主にリグニン由来熱分解生成物のピーク強度 (mV) を示すものであり, ピークの保持時間 (retention time) と強度 (peak height) のパターンが試料によって異なる特徴をもっている¹²⁾. しかし, 試料毎に検出されるピーク数も異なり, 同一成分でも保持時間に

ずれがあることから, 試料間の比較には保持時間の補正とピーク数の統一が必要である. そこで, イネ科植物に特徴的なピークのうち, Fig. 1-2 (Pyrogram data) に①から⑬の矢印で示した13成分のピークについて検討を行った. 13ピークに該当する保持時間 (Fig. 1-a: R. TIME) のピーク強度 (Fig. 1-b: HEIGHT) を抽出 (Fig. 1-3) し, Fig. 1-4 に示すように, リグニン熱分解生成物のうちの13成分の比率を表したグラフに変換した. 同様に22種の植物についても, 同一成分と推定される13ピークのデータ (Table 2 および Table 3) を変換し, Fig. 3 および Fig. 4 の結果を得た.

4 採取場所の異なる同種植物によるパイログラムの再現性

異なる場所から採取した同種植物の分析には, 野球場およびサッカー場からそれぞれ採取したバミューダグラスの葉を用いて, パイログラムから得ら

1 Peak Information data

Fig. 1 Conversion to a bar graph of pyrogram data. Arrows from No. 1 to No. 13 show chosen peaks. a): run time, b): peak height.

れた変換データを比較した。(Fig. 5)

5 植物の組織別データの比較

同種植物の異なる組織についての分析には、ノシバ、パヒアグラス、ローズグラス、ソルガムおよびトウモロコシからそれぞれ採取した葉と茎を用いて、パイログラムから得られた変換データを比較した。(Fig. 6)

6 サンプルの大きさの影響

サンプルの大きさについての分析には、ローズグラス、ソルガムおよびトウモロコシからそれぞれ採取した葉と茎について、それぞれ粉末サンプルと固形サンプルを用いて、パイログラムから得られた変

換データを比較した。(Fig. 6-3, 4, 5)

7 草本類以外の植物について

双子葉植物ブナ目ブナ科コナラ属のアラカシ (*Quercus glauca*) および双子葉植物イラクサ目ニレ科エノキ亜科のムクノキ (*Aphananthe aspera*) の葉と茎について、パイログラムから得られた変換データを比較した。(Fig. 7)

結果および考察

現在、Py-GCは塗膜片、繊維、プラスチックおよび粘着剤等の高分子化合物を対象とした異同識別の手法として科学捜査に活用¹⁵⁾されているが、植物

Fig. 2 Pyrogram pattern of Py-GC in 22 plant species.

に関しては一部のイネ科植物や木類のリグニン組成分析等に利用されているものの、草本類を含む植物種全体の異同識別への応用については報告がない。また、Py-GC/MSにより得られたリグニン熱分解生成物の組成を分析することも可能であるが、本研

究の目的はそれぞれのピーク成分を特定せずピーク全体を一つのパターンとして認識し、植物種の分類に応用可能かどうかについて検討を行ったものである。

Fig. 2は、イネ科植物14種類およびマメ科植物

Table 2 Retention time and peak height of pyrolysis of a gramineous plants

Samples	Peak No.	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬
	retention time	14.331 ± 1.09	15.213 ± 0.36	17.614 ± 0.66	18.442 ± 0.61	22.158 ± 0.86	24.758 ± 0.44	28.335 ± 1.55	31.837 ± 0.31	34.036 ± 0.27	37.395 ± 0.28	46.097 ± 0.77	50.045 ± 0.97	56.249 ± 1.43
1-1 Japanese lawnggrass	Ret. time	14.792	15.212	17.880	18.672	22.244	24.923	27.695	31.729	33.897	37.246	46.403	49.419	55.629
	Peak height	76,193	141,903	140,762	38,989	27,806	14,145	16,204	36,945	42,594	68,375	13,054	4,268	9,562
1-2 Japanese lawnggrass	Ret. time	14.806	15.219	17.886	18.674	22.395	24.916	27.692	31.723	33.890	37.238	46.398	49.312	55.615
	Peak height	78,126	166,636	174,826	37,824	28,059	13,418	14,714	39,728	38,221	64,069	12,307	3,861	6,770
2-1 Manilagrass	Ret. time	15.139	15.564	18.259	19.046	22.605	24.783	28.102	32.141	34.307	37.671	46.870	50.092	57.135
	Peak height	66,701	253,161	195,092	40,295	18,310	15,247	12,850	35,403	35,192	53,992	9,506	3,615	4,394
2-2 Manilagrass	Ret. time	14.766	15.208	17.879	18.663	22.284	24.684	27.683	31.717	33.878	37.220	46.375	49.124	57.188
	Peak height	82,226	214,188	198,341	44,731	26,323	10,930	15,658	28,284	33,531	50,833	10,386	4,259	2,235
3-1 Mascarenegrass	Ret. time	14.782	15.213	17.881	18.663	22.764	24.384	27.686	31.708	33.873	37.213	46.041	49.415	55.573
	Peak height	77,126	190,314	187,053	30,534	42,823	28,284	17,208	28,019	38,099	51,419	15,173	6,149	17,375
3-2 Mascarenegrass	Ret. time	14.763	15.210	17.876	18.659	21.404	24.377	27.680	31.707	33.867	37.211	46.378	49.113	55.582
	Peak height	75,399	163,667	151,785	28,916	20,595	21,396	13,659	26,443	33,938	44,412	7,861	10,005	12,485
4-1 Italian ryegrass	Ret. time	14.832	15.134	17.805	18.597	21.560	24.319	28.291	31.654	33.803	37.135	45.331	50.276	55.433
	Peak height	91,069	51,679	79,691	44,631	23,940	26,879	36,391	12,458	29,109	25,937	5,152	8,737	5,190
4-2 Italian ryegrass	Ret. time	14.882	15.134	17.797	18.597	21.551	24.316	28.299	31.646	33.807	37.135	45.324	50.259	55.420
	Peak height	119,768	67,131	92,961	56,424	29,251	33,243	34,673	17,937	47,278	45,561	6,200	13,767	7,577
5-1 Perennial ryegrass	Ret. time	14.758	15.181	17.851	18.651	21.606	24.369	28.354	31.710	33.894	37.270			
	Peak height	56,744	98,856	77,866	36,190	15,949	17,548	15,893	29,513	65,703	145,930			
5-2 Perennial ryegrass	Ret. time	14.761	15.182	17.852	18.651	22.213	24.369	28.353	31.710	33.899	37.279			
	Peak height	69,551	92,660	71,426	35,288	17,588	18,738	17,848	30,276	74,712	163,993			
6-1 Orchardgrass	Ret. time	14.769	15.182	17.855	18.659	21.450	24.366	27.676	31.715	33.895	37.286		50.389	
	Peak height	74,647	44,138	62,911	23,084	23,000	11,127	10,271	37,331	58,624	169,958		95,372	
6-2 Orchardgrass	Ret. time	14.752	15.183	17.856	18.657	21.441	24.366	27.675	31.715	33.890	37.276		50.386	
	Peak height	79,409	39,843	59,482	23,987	26,431	10,614	9,250	34,455	52,578	150,699		85,603	
7-1 Rhodesgrass	Ret. time	15.165	15.562	18.274	19.051	22.009	24.781	28.803	32.133	34.284	37.619	45.906	49.703	
	Peak height	73,264	270,382	429,268	49,611	37,482	23,143	28,683	13,414	31,942	22,134	5,616	7,202	
7-2 Rhodesgrass	Ret. time	15.108	15.525	18.236	19.016	21.991	24.762	28.773		34.364	37.609	45.911	49.692	
	Peak height	53,172	149,772	265,838	29,244	21,395	14,549	19,637		18,831	18,529	5,571	6,604	
8-1 Guineagrass	Ret. time	14.736	15.188	17.841	18.637	21.592	24.347	27.650	31.677	33.843	37.136	45.356	49.399	
	Peak height	69,564	300,912	106,017	64,379	31,236	29,184	25,793	14,313	47,607	24,537	7,370	4,201	
8-2 Guineagrass	Ret. time	14.753	15.196	17.854	18.649	21.607	24.361	27.666	31.694	33.866	37.161	45.386	49.428	
	Peak height	56,802	211,967	91,207	51,136	23,610	23,336	20,863	17,335	47,484	27,908	6,348	3,881	
9-1 Rice	Ret. time	14.720	15.545	17.336	18.250	21.780	24.776	28.096	31.981	34.285	37.671	45.908		56.637
	Peak height	30,206	94,876	26,641	172,425	14,495	18,210	11,210	7,738	24,218	4,796	4,684		3,619
9-2 Rice	Ret. time	15.224	15.549	17.369	18.255	21.780	24.776	28.102		34.288	37.643	45.654	50.071	
	Peak height	42,837	92,421	25,895	170,420	14,042	17,283	10,968		18,819	4,725	5,301	5,024	
10-1 Cogongrass	Ret. time	14.968	15.208	17.863	18.660	21.613	24.378	27.677	32.120	33.841	37.145	46.310	49.406	55.541
	Peak height	157,410	224,772	154,412	90,972	48,213	64,823	44,069	6,638	15,269	8,011	5,951	4,312	5,449
10-2 Cogongrass	Ret. time	14.764	15.202	17.869	18.652	22.738	24.892	27.673	31.695	33.855	37.192			
	Peak height	76,377	187,520	173,620	32,042	41,263	15,996	16,094	23,973	32,605	41,284			
11-1 Sorgham	Ret. time	15.293	15.484	18.102	18.909	21.869	24.644	27.959	31.532	34.149	37.474	45.816	49.570	55.926
	Peak height	146,754	367,242	104,580	42,029	29,418	20,743	19,320	2,783	9,241	2,603	3,618	3,063	1,613
11-2 Sorgham	Ret. time	15.254	15.498	18.129	18.939	21.900	24.675	27.994	32.073	34.199	37.505	45.844	50.045	55.314
	Peak height	88,591	317,662	99,110	37,100	22,257	18,736	16,194	4,145	18,479	3,873	4,406	2,261	1,227
12-1 Bermudagrass	Ret. time	15.335	15.550	17.325	18.197	21.719	24.731	28.050	32.079	34.296	37.671	46.824	50.054	57.683
	Peak height	28,384	148,582	56,039	138,594	23,321	22,992	18,762	94,732	89,560	140,344	25,794	6,870	6,404
12-2 Bermudagrass	Ret. time	15.306	15.517	17.293	18.164	21.686	24.695	28.008	32.034	34.250	37.621	46.768	49.974	56.411
	Peak height	19,451	121,785	62,086	129,997	24,633	27,211	19,823	109,365	92,025	143,359	23,624	6,889	8,350
13-1 Bahia grass	Ret. time	14.752	15.202	17.873	18.658	21.422	24.422	27.676	31.709	33.871	37.216	46.361	49.442	55.639
	Peak height	87,570	106,196	121,317	35,164	24,166	18,253	12,054	24,799	32,420	60,937	12,993	4,237	7,386
13-2 Bahia grass	Ret. time	14.757	15.202	17.871	18.660	21.426	24.378	27.680	31.713	33.880	37.224	46.360	49.446	55.598
	Peak height	93,482	113,073	124,478	40,453	27,569	21,259	14,132	28,266	37,223	70,126	13,571	4,725	5,534
14-1 Maize	Ret. time	14.827	15.219	17.869	18.669	21.609	24.370	28.354	31.691	33.878	37.224	46.346	49.073	55.511
	Peak height	83,078	146,680	144,597	48,490	25,185	31,262	29,929	52,603	62,624	99,438	22,677	5,973	8,169
14-2 Maize	Ret. time	15.089	15.481	18.154	18.953	21.913	24.682	27.997	32.028	34.212	37.575	46.756	49.577	56.407
	Peak height	57,850	157,126	147,640	40,793	21,027	28,256	14,364	62,768	51,989	83,781	11,444	3,479	5,455

Table 3 Retention time and peak height of pyrolysis of expect gramineous plants

Samples	Peak No.	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬
	retention time	14.331 ±1.09	15.213 ±0.36	17.614 ±0.66	18.442 ±0.61	22.158 ±0.86	24.758 ±0.44	28.335 ±1.55	31.837 ±0.31	34.036 ±0.27	37.395 ±0.28	46.097 ±0.77	50.045 ±0.97	56.249 ±1.43
15-1 Red clover	Ret. time	14.778	15.166	16.994	17.809	21.326	24.320	27.460	31.663	33.860	37.222	46.331	50.660	
	Peak height	29,964	23,819	49,048	24,582	17,713	16,798	19,840	37,550	73,406	136,329	22,110	5,373	
15-2 Red clover	Ret. time	15.186	15.512	17.308	18.175	21.696	24.709	28.024	32.068	34.271	37.651	46.800	49.623	
	Peak height	27,251	33,423	54,485	40,029	21,526	18,700	19,629	51,194	73,381	138,662	24,900	4,885	
16-1 White clover	Ret. time	14.767	15.150	17.789	18.626	21.311	24.858	27.576	31.643	33.838	37.203	46.306	50.634	54.968
	Peak height	31,969	30,059	15,235	18,274	20,117	18,406	21,266	56,427	71,233	150,294	23,464	12,389	9,933
16-2 White clover	Ret. time	14.769	15.148	17.385	17.791	21.294	24.302	27.797	31.647	33.832	37.190	46.307	50.641	54.972
	Peak height	42,443	26,165	17,945	19,952	20,294	15,233	20,282	37,072	55,269	129,992	23,205	15,723	8,134
17-1 Birdfoot trefoil	Ret. time	14.830	15.222	16.993	17.856	21.323	24.640	27.823	31.699	33.891	37.237	46.366	50.335	55.060
	Peak height	34,328	130,330	49,049	24,864	21,672	11,139	23,123	47,419	65,647	94,797	27,445	20,087	7,105
17-2 Birdfoot trefoil	Ret. time	15.170	15.559	17.354	18.218	22.587	24.723	28.223	32.113	34.307	37.673	46.852	51.011	56.097
	Peak height	30,910	150,891	46,389	32,121	21,227	8,897	21,879	50,907	61,576	83,206	20,804	19,944	7,219
18-1 Dandelion	Ret. time	14.686	15.102	16.878	18.559	21.375	24.517	27.380	31.579	33.775	37.131	46.228	50.172	54.836
	Peak height	84,928	28,751	55,652	20,417	60,249	14,145	9,826	57,169	67,892	131,958	22,566	8,132	12,211
18-2 Dandelion	Ret. time	14.681	15.095	16.870	18.545	21.362	24.505	28.445	31.575	33.764	37.116	46.220	49.268	54.815
	Peak height	73,480	26,682	49,923	17,869	46,757	11,574	8,178	55,202	58,109	110,044	15,880	4,363	8,180
19-1 Milk-purslane	Ret. time	14.715	15.116	17.755	18.562	22.337	24.790	28.235	31.591	33.779	37.119	46.249	50.188	54.856
	Peak height	80,460	19,559	31,297	15,523	27,837	12,149	14,082	47,807	58,123	80,932	19,702	6,148	12,637
19-2 Milk-purslane	Ret. time	15.072	15.461	18.129	18.965	23.022	25.199	29.882	32.020	34.213	37.572	46.743	50.856	56.372
	Peak height	60,527	18,447	21,789	12,552	27,305	12,845	13,770	50,521	73,030	81,860	40,628	7,176	25,899
20-1 Eastern blue eyed	Ret. time	13.246	14.861	16.956	17.832	22.679	24.889	26.787	31.688	33.852	37.181	46.356	49.082	
	Peak height	61,979	126,655	37,469	20,949	33,135	17,682	9,515	29,952	34,067	32,361	11,840	8,404	
20-2 Eastern blue eyed	Ret. time	13.525	14.887	16.954	17.832	22.909	24.895	27.659	31.684	33.846	37.171	46.353	49.079	55.523
	Peak height	64,890	138,509	45,532	44,355	37,381	13,097	8,863	19,735	29,069	24,942	8,656	5,146	7,038
21-1 Dokudami	Ret. time	14.669	14.862	17.749	18.547	21.503	24.787	28.214	31.588	33.768	37.100	46.243	48.938	55.288
	Peak height	129,003	38,975	25,906	23,727	23,675	16,095	11,583	20,408	49,134	50,710	14,836	6,101	6748
21-2 Dokudami	Ret. time	15.005	15.223	18.133	18.928	21.910	24.670	27.989		34.189	37.535	46.739	49.547	
	Peak height	106,489	21,171	47,155	30,430	25,599	17,431	12,241		27,355	26,851	10,596	4,677	
22-1 Plantain	Ret. time	14.624	15.175	18.205	19.019	22.586	24.737	27.201	32.101	34.293	37.653	46.832	46.668	56.562
	Peak height	21,880	32,698	19,240	14,451	22,897	12,632	11,756	60,544	50,108	74,323	19,995	6,748	6,271
22-2 Plantain	Ret. time	14.624	15.175	18.205	19.019	22.586	24.737	27.201	32.101	34.293	37.653	46.832	49.668	56.562
	Peak height	21,880	32,698	19,240	14,451	22,897	12,632	11,756	60,544	50,108	74,323	19,995	6,748	6,271

3 種類を含む計22種類 (Table 1) について, Py-GC により得られたパイログラムを示したもので, それぞれパイログラムパターンに特徴が認められた. そこで, その特徴をより顕著にグラフ化し, 植物種の比較を行った.

Fig. 1 に示すように, イネ科植物のパイログラムを基準として特徴のあるピークを選定し, それぞれの植物についてもピーク情報から保持時間が近似値で, その保持時間付近で最も高いピークを目安として, 各植物から同一のリグニン熱分解生成物と推定される13成分のピークを選択した (Table 2 および Table 3). その結果, 22種類の植物種は Fig. 3 (1~14: イネ科植物14種) および Fig. 4 (15~22: イネ

科以外の植物 8 種) に示すとおりであり, それぞれ特異的なピークパターンを示した.

単子葉植物イネ科の西洋芝であるイタリアンライグラス (Fig. 3-4), ペレニアルライグラス (Fig. 3-5), オーチャードグラス (Fig. 3-6), ローズグラス (Fig. 3-7), ギニアグラス (Fig. 3-8), バミューダグラス (Fig. 3-12) およびバビアグラス (Fig. 3-13) は, 同じイネ科植物であっても, それぞれのパターンが異なり, 識別が可能であった.

単子葉植物イネ科の同族種である日本芝 *Zoysia* 属のノシバ (Fig. 3-1), コウライシバ (Fig. 3-2) およびヒメコウライシバ (Fig. 3-3) ならびに双子葉植物マメ科植物の同族種である *Trifolium* 属のア

Fig. 3 Bar graph data of *Gramineae*s converted from 13 peaks of pyrogram data.

カクローバ (Fig. 4-15) およびシロクロバ (Fig. 4-16) についてそれぞれ比較したところ、いずれもそのピークパターンが酷似しており、近縁種もしくは同属内での植物種においては二次代謝産物の代謝系が共通で、検出されるリグニン熱分解生成物も類似するものと考えられた。

Fig. 5 は、同种植物の採取場所別サンプルによる分析結果である。野球場とサッカー場の異なる場所で育成しているバミューダグラスを採取し、それぞ

れの試料について分析を行ったところ、いずれのバイログラムも類似するパターンを示した (Fig. 5)。このことから、Py-GC による分析で得られる植物のバイログラムは、採取場所にはほとんど影響されず再現性があるものと考えられた。

Fig. 6 は、同植物の組織別の分析結果である。イネ科植物 5 種 (ノシバ、バヒアグラス、ローズグラス、ソルガムおよびトウモロコシ) の葉と茎について、それぞれ分析したところ、ノシバ (Fig. 6-1)、

Fig. 4 Bar graph data except *Gramineae*s converted from 13 peaks of pyrogram data.

Fig. 5 Conversion data of *Cynodon dactylon* collected at baseball ground and soccer ground.

ローズグラス (Fig. 6-3) およびソルガム (Fig. 6-4) は、葉と茎のパターンに差異は見られなかったが、バヒアグラス (Fig. 6-2) 及びトウモロコシ (Fig. 6-5) については、部位によりそれぞれ異なるパターンを示した。これは、植物体を構成する上で大きな役割を担っているリグニンの性質上、植物の成長段階や植物体を維持する物理的理由により部位的にリグニン組成の違いがあるものと考えられる。そのため、異同識別を行う上で、同試料間の部位別データのばらつきについては注意が必要であり、測定条件の検討も必要と考えられる。なお、ローズグラス (Fig. 6-3)、ソルガム (Fig. 6-4) およびトウモロコシ (Fig. 6-5) については、試料の形態について、粉末状と固形状のサンプルをそれぞれ分析したところ、差異は認められなかった。

最後に、イネ科植物のような草本類以外の樹木の試料について、Py-GC を行った。ブナ科コナラ属

のアラカシおよびニレ科エノキ亜科のムクノキの葉と茎について分析したところ、Fig. 7に示すように、いずれもイネ科植物とは異なるパターンを示した。

以上のように、本研究では13ピークのみと比較であったが、少なくとも Py-GC により得られたパイログラムは植物種により様々なパターンを示しており、種の分類に応用できる可能性が示された。実際には、パイログラムとして得られる全てのピーク情報がある一定の形式で植物種固有のパターンとして取得・データベース化し、マッチング率による検索システムを用いることで、将来的には迅速な植物異同識別技術を確立できるものと考えられる。また、植物種によっては、パイログラム上の分類と学問上の系統分類が必ずしも一致するとは限らず、植物の代謝系レベルでの新しい分類法の確立も期待される。本法は、分子生物学的な手法のように DNA 抽

Fig. 6 Conversion data of *Gramineae* collected at a part of leaf and stem.

Fig. 7 Conversion data of *Quercus glauca* and *Aphananthe aspera*

出や PCR, 電気泳動による一連の煩雑な操作を必要としないため, 法科学分野において微量植物片の新たな異同識別技術になりうるものと考えられる。

結 語

Py-GC によるリグニン分解物を指標とすることは, これまでの DNA による分類・同定とは異なり, 微量なサンプルでその前処理の必要がなく, 乾燥したサンプルで分析できるなどの特徴を有していることから, DNA の弱点をカバーした新たな分類法として期待できるものである。さらに, 植物の分類から犯罪・鑑識等への応用, 野生動物における糞中の植物片を指標とした動物の行動・生態学研究, さらに, 考古学分野における遺跡調査にまで応用することが可能であるものと考えられる。本研究において, 分析・調査した植物種は少ないものの, 今後は, 多くの植物種を分析・調査することでそのデータベースを構築し, バーコード形式で植物を登録・検索できるソフトウェアの開発を含めた一連のシステムを構築する予定である。

文 献

- 1) Tsuruta, S., Hashiguchi, M., Ebina, M., Matsuo, T., Yamamoto, T., Kobayashi, M., Takahara, M., Nakagawa, H. and Akashi, R.: Development and characterization of simple sequence repeat markers in *Zoysia japonica* Steud, *Grassland Sci.*, **51**: 249–257 (2005).
- 2) Kaplan, D. R.: The science of plant morphology: definition, history, and role in modern biology, *Am. J. Botany*, **88**: 1711–1741 (2001).
- 3) Hannan, G. L. and Orick, M. W.: Isozyme diversity in *Iris Cristata* and the threatened glacial endemic *I. Lacustris* (Iridaceae), *American Journal of Botany* **87**: 293–301 (2000).
- 4) Manjunatha, B. R., Virupakshi, S. and Naik, G. R.: Peroxidase isozymes polymorphism in popular sugarcane cultivars, *Current Sci.*, **85**: 1347–1349 (2003).
- 5) 木村鉄也, 伴 義之, 山本俊哉, 林 建樹: 濃縮法による植物の SSR マーカーの開発, DNA 多型, **11**, 72–75 (2003).
- 6) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Sebata, T., Isshiki, K., Toyoda, M. and Hino, A.: A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **40**: 149–157 (1999).
- 7) Matsuoka, T., Kuribara, K., Takubo H., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M. and Hino, A.: Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*), *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2100–2109 (2002).
- 8) 和泉明子, 黒田健一, 大井 洋, 山口 彰: 熱分解ガスクロマトグラフィーによるリグニンの構造解析 (第 3 報), 紙パ技協紙, **49**, 1339–1345 (1995).
- 9) 鈴木 聡, 和泉明子, 大井 洋, 黒田健一, 山口 彰: 熱分解ガスクロマトグラフィーによるアルカリ蒸煮リグニンの構造解析 (ブナ材チップの脱リグニン不均一性の評価), 紙パ技協紙, **48**, 1212–1220 (1994).
- 10) Kuroda, K. Izumi, A. Mazumder, BB. Ohtani, Y. and Sameshima, K.: Characterization of kenuf (*Hibiscus cannabinus*) lignin by pyrolysis-gas

- chromatography-mass spectrometry in the presence of tetramethylammonium hydroxide, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.*, **64**, 453–463 (2002).
- 11) Ohra-aho, T. Tenkanen, M. and Tamminen, T.: Direct analysis of lignin and lignin-like components from softwood krat pulp by Py-GC/MS techniques, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.*, **74**, 123–128 (2005).
- 12) Kuroda, K. and Yamaguchi, A.: Classification of Japanese softwood species by pyrolysis-gas chromatography, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.*, **33**, 51–59 (1995).
- 13) 寒川喜三郎, 大栗直毅: 熱分解ガスクロマトグラフィー入門. 技報堂出版 (1994).
- 14) 黒田健一: 木材の熱分解, 木材工業, **48**, 460–465 (1993).
- 15) 雲岡義雄: 布およびクラフト粘着テープに使用されているアクリル系粘着剤の熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析法による分析, 法科学技術, **10**, 11–18 (2005).