

的な測定法としての有用性を検討した。

凝集板上の反応においては MOR 濃度 0  $\mu\text{g/mL}$  では反応時間 4 分で凝集が確認されたのに対し、MOR 濃度 0.516  $\mu\text{g/mL}$  では反応時間 8.5 分で凝集が起こったことから、時間経過による明らかな違いがみられ、容易に区別することが可能であった。凝集反応は抽出などの操作を必要とせず、簡便かつ迅速な方法であるため、毛髪中 MOR のスクリーニング法として大変有用であり、また濃度依存的な確認も可能である。過去の凝集板での感度は 30 ng/mg hair であったが、今回の結果では 5 ng/mg hair (0.020  $\mu\text{g/mL}$ ) まで測定可能となり、より良好な検出感度を得ることができた。

また、定量的なスクリーニング法の開発を目的として、透過率の測定を行った。その結果 Fig. 2 に示すように MOR 5~1000 ng/mg hair の濃度範囲では MOR を濃度依存的に測定することができ、試料中 MOR 濃度がこの範囲内である時、LAIRT 法でも試料中の薬物濃度を推定することが可能となった。しかしながら MOR を 1000 ng/mg hair 以上の高濃度に含む試料では、透過率が飽和してしまうため、MOR の存在は明らかでも、検体中の MOR 濃度を推定することはできないが、このような例はきわめて希であると考えられる。

また、透過率測定の際には凝集板での反応と比較してラテックス抗原試薬の希釈倍率を低くする(例えば 1.5 倍濃い濃度にする)ことで良好な結果が得られた。これは透過率測定において、毛髪中に含まれる色素が透過率測定時の青色に影響するためと思われる。今回の凝集板反応と透過率測定法は毛髪溶解液を酸性にした

後フィルターに通し、試料中の蛋白を色素とともに除去することで測定可能範囲が 5~1000 ng/mg hair になり、感度をあげることができた。他の測定法と比較すると、ラジオイムノアッセイ法でのカットオフ値は 0.1 ng/mg hair<sup>6)</sup> であり、GC/MS でも 0.1 ng/mg hair<sup>7)</sup> (両測定法ともに、毛髪試料 50 mg 用いて実験している)と高感度測定が可能であり、微量含有サンプルに用いるには更に検討の余地がある。また、毛髪試料では、毛髪中の色素により、透過率の測定が影響を受けやすく、同じ毛髪試料でもフィルターろ過後の試料に透過率のバラツキが認められた。このことから個体差による色素の違いを克服することが本試験法を確立する上で重要であると考えられた。

一方、サイロシビン及びサイロシン特異的抗体の作成では 4-HT のハプテン結合体を免疫原にしてウサギより抗血清を得たが、ハプテン合成時の夾雑物である BSA-EDC を認識する抗体も共存していることが判明したので、今後、抗血清をアフィニティークロマトグラフィーなどにより、特異的抗体のみに精製する必要がある。また、サイロシビン及びサイロシンはセロトニン(5-hydroxytryptamine)に構造的に極めて類似しているのでその交叉反応性も確認する必要がある。

本研究では毛髪溶解試料を酸性に戻しフィルターろ過することで、透過率測定によるモルヒネ濃度の定量感度を改善することができた。更に低濃度における測定も検討し、感度を上げていくよう改善を試みたい。また社会的有用性が増しているサイロシビン及びサイロシン特異的抗体作成および簡便かつ高感度の免疫測定法の確立を目指していく予定である。

## E. 結 論

本研究では磁性ラテックス LAIRT 法を用いた毛髪試料中のモルヒネの検出感度向上を目的として検討を行ったところ、毛髪を溶解した後、試料をフィルター濾過して除蛋白を確実にする事で、モルヒネの毛髪試料中濃度が 5~1000 ng/mg hair の濃度範囲で良好に測定でき、これまでの検出限界を 30 ng/mg hair より感度を上げる事が出来た。

また近年その乱用が問題となり麻薬に指定されたマジックマッシュルーム中に含まれるサイロシビンおよびサイロシンに対する特異的抗体の作成を試み、酵素免疫測定法により抗血清中にその抗体活性が認められたが、さらにアフィニティークロマトグラフィーなどにより特異抗体に精製する必要があった。

## F. 参考文献

1. K. Aoki, T. Yoshida and Y. Kuroiwa, Forensic immunochemistry, *Forensic Sci. Int.*, **80**, 163-173 (1996)
2. K. Aoki, Y. Shikama, A. Kokado, T. Yoshida and Y. Kuroiwa, Enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination inhibition reaction test for morphine in urine, *Forensic Sci. Int.*, **81**, 125-132 (1996)
3. K. Aoki, Y. Shikama, A. Kokado, T. Yoshida and Y. Kuroiwa, Enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination inhibition reaction test for cocaine and benzoylecgonine in urine. *Forensic Sci. Int.*, **77**, 151-157 (1996)
4. H. Lindenblatt, E. Kramer, P. Holzmann-Erens, E. Gouzoulis-Mayfrank and K.A. Kovar, Quantitation of psilocin in human plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection: comparison of liquid-liquid extraction with automated on-line solid-phase extraction. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.*, **709**, 255-63 (1998)
5. M.J. Bogusz, Liquid chromatography-mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.*, **748**, 3-19 (2000)
6. F. Tagliaro, R. Valentini, G. Manetto, F. Crivellente, G. Carli and M. Marigo, Hair analysis by using radioimmunoassay, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine, and/or ecstasy in applicants for driving licences, *Forensic Sci. Int.*, **107**, 121-128 (2000)
7. L. Skender, V. Karacic, I. Brcic and A. Bagaric, Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, **125**, 120-126 (2002)

## 研究協力報告書

### サイロシンを認識する特異的抗体の調製

研究協力者 北條 博史 昭和薬科大学薬学部 教授

研究要旨 平成14年6月に規制対象となった麻薬原料植物の鑑別のため、その含有成分であるサイロシン及びサイロシピンを測定することのできる免疫化学的簡易測定法が求められている。本研究は、まずサイロシンのインドール骨格の4位OH基を修飾した誘導体をキャリアタンパクに結合させて抗原とし、ウサギに免疫して薬物特異的抗血清を調製することを目的とした。

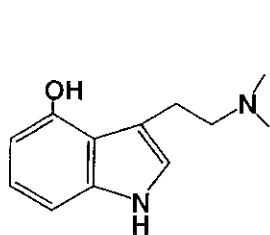
#### A. 研究目的

我が国の薬物事犯の現状は、「第3次覚せい剤乱用期」とよばれ、薬物濫用が広がっている。この中で、サイロシンやサイロシピン(図1)を多量に含むマジックマッシュルームも濫用されてきたが、平成14年6月に麻薬原料植物として規制対象になった。しかし、これらを所持するものはまだ多数存在すると推定され、麻薬原料植物を簡易に識別する測定法の開発が急務である。現在、サイロシン及びサイロシピンを検出可能なキットとしては、インドール骨格を着色させるエールリッヒ反応を基本原理としたPSILOTESTが販売されているものの特異性が低い。メタンフェタミンなどの濫用薬物の検出では、特異的抗体を用いた

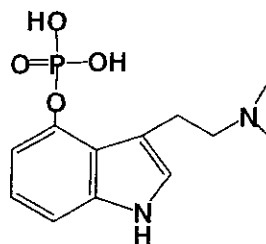
免疫化学的簡易測定法<sup>1,2)</sup>の有用性が実証されていることから、本研究では麻薬原料植物の識別にサイロシンやサイロシピンを高感度に検出できる免疫化学的簡易測定法を作製することを計画し、まずサイロシンキャリアタンパク複合体を作製し、これをウサギに免疫し、特異的抗体の調製を行った。

#### B. 方法

1. 材料：サイロシンは、4-hydroxyindoleより合成した。4-Bromobutylnitrileは、東京化成(株)より、リチウムアルミニウムハイドライドは、和光純薬工業より、炭酸セシウムはAldrich社より購入した。その他の試薬はすべて特級品を用い、溶媒は使用前に脱水し使用した。



サイロシン



サイロシピン

図1. サイロシン及びサイロシピンの構造

2. サイロシンの誘導体(ハプテン)の作製：サイロシンのインドール環の4位のOH基をアルキル化するために、アルキル化剤として4-bromobutyl nitrile、塩基として炭酸セシウム、そして溶媒としてアセトニトリルを用い、アルゴン気流下にて14時間室温で反応させた。反応の進行は、順層系シリカ薄層板及び溶媒として酢酸エチル：メタノール：アンモニア水(85:10:5)を用いて展開後、化合物をUV照射ならびにエールリッヒ試薬により発色させ確認した。生成した4-[3-(2-dimethylaminoethyl)indol-4-yloxy]-butyronitrile (PSI-CN)をTHF中、アルゴン気流下で3時間、リチウムアルミニウムヒドライド還元することにより4-[3-(2-dimethylaminoethyl)indol-4-yloxy]-butylamine (PSI-NH<sub>2</sub>)を得た。さらに無水コハク酸処理することでN-{4-[3-(2-dimethylaminoethyl)indol-4-yloxy]-butyl}succinamic acid (PSI-COOH)を合成した。

3. サイロシン結合へモシアニン(KLH)ならびにBSAの調製：KLHならびにBSAへのPSI-COOHの結合は、mixed anhydride法<sup>3)</sup>を若干改変して行った。すなわち、PSI-COOHに等mol数のisobutyl chloroformate及びtributylamineを加え、20℃以下(室温)で30分攪拌し、反応終了

後、KLHまたはBSAを加え、pH 8.5に調整した後、4℃で攪拌しながら4時間反応させた。反応溶液は、水に対して透析した後、凍結乾燥してPSI-KLHならびにPSI-BSAの粉末を得た。

4. ウサギ及びマウスへの抗サイロシンIgG画分の調製：PSI-KLH 100 µgを0.5 mLのPBSに溶解し、Titer-Max 0.5 mLと混ぜあわせウサギ(日本白色種、7週齢、雌)に2週間間隔で6回免疫した。抗体価の測定は、PSI-BSAを吸着させた免疫プレートを用いたELISA法により行った。最終免疫後、全採血し、血清分離後、硫酸沈澱ならびにDEAEカラムを通過させることによりIgG画分を精製した。

### C. 結果

サイロシンの構造中にはタンパク結合に必要な官能基がないため、はじめに4-bromobutyl nitrileを反応させてインドール環中の4位の水酸基を修飾し、その後、リチウムアルミニウムヒドライドによる還元を行って4-[3-(2-dimethylaminoethyl)indol-4-yloxy]-butylamineを得、さらに無水コハク酸を反応させることでN-{4-[3-(2-dimethylaminoethyl)indol-4-yloxy]-butyl}succinamic acid (PSI-COOH)を合成した(図2)。PSI-COOHをmixed

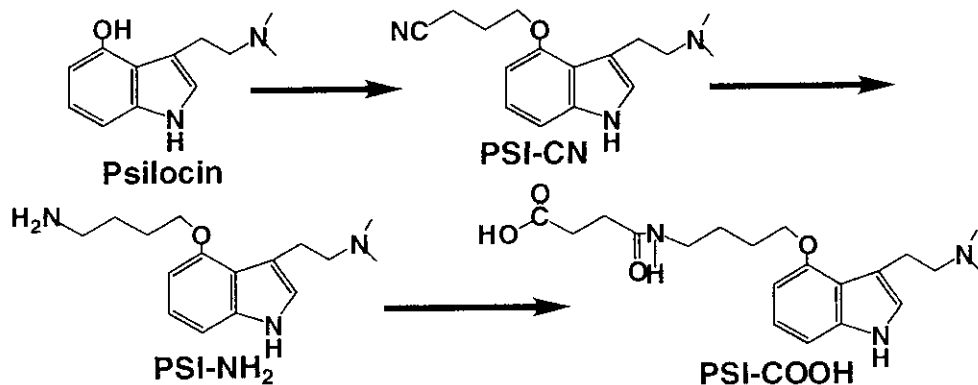


図 2. サイロシン誘導体の合成

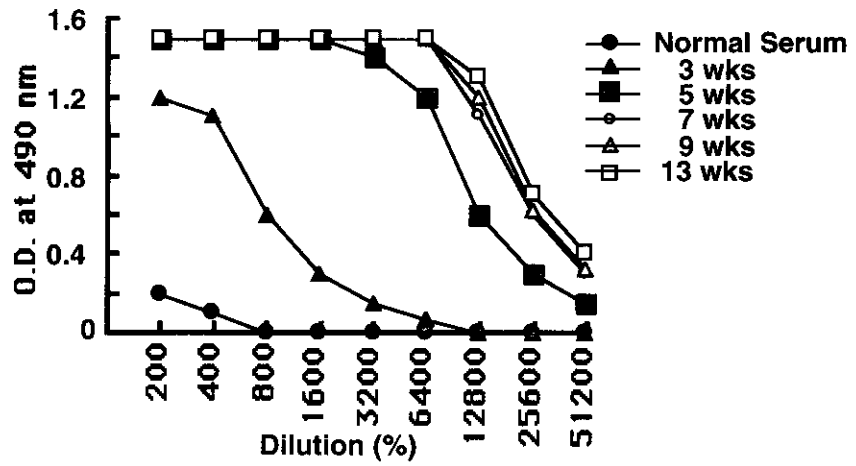


図 3. PSI-KLH 免疫後の抗体価の上昇

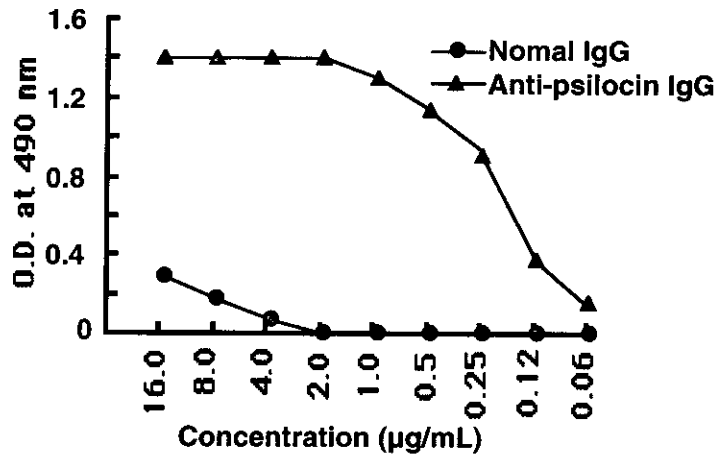


図 4. 抗サイロシン IgG の抗体価

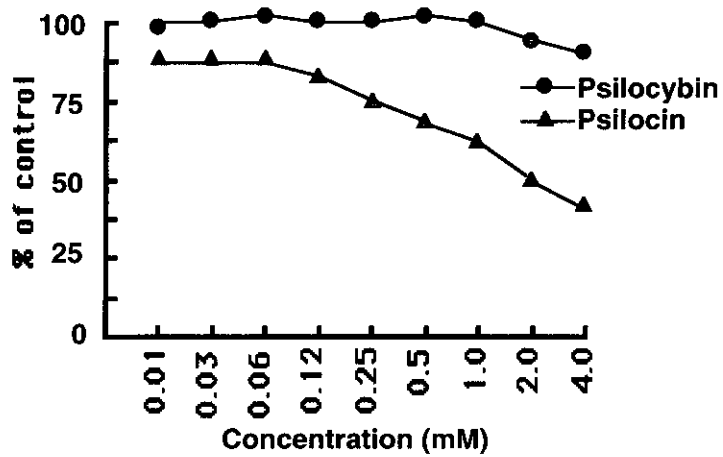


図 5. Psilocin による競合阻害試験

anhydride 法により KLH と反応させ PSI-KLH を合成した。

次に、PSI-KLH を PBS で溶解し Titer Max と等量で十分に混和し、ウサギに 2 週間間隔で 6 回免疫した。PSI-BSA に対する抗体価は投与後 7 週で上昇が確認され、9 週でも力価は維持されたため、最終免疫の 2 週間後、全採血を行った。さらに、血清を分離し、その抗体価を測定した。抗血清(13 wks)の抗体価は免疫期間中と同様に、非常に高く、12,800 倍希釈しても使用できた(図 3)。

さらに、抗血清を PBS で 10 倍希釈後、55%硫酸分画を行い、その沈澱を PBS で溶解し、その後、pH9.0 の条件下で DEAE カラムを通過させた抗体画分をすみやかに中和し、PBS で透析して抗サイロシン IgG 画分を得た。PSI-BSA に対する抗サイロシン IgG 画分の吸着性は、0.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から認められ、2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で平衡に達した(図 4)。さらに、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗サイロシン IgG 画分の吸着は高濃度のサイロシンを同時添加した場合 50%程度阻害されたが、サイロシピンを同時添加してもほとんど阻害を受けなかった(図 5)。

#### D. 考 察

本研究では、サイロシンの 4 位の OH 基を化学修飾し、フリーのカルボン酸を有する誘導体を作製し、それをキャリアタンパクに結合させ、ウサギに免疫し、抗サイロシン IgG 画分を調製した。しかし、PSI-BSA に対する抗サイロシン IgG の吸着は、高濃度のサイロシンを同時に添加した場合には約 50%程度の阻害が認められたが、完全な阻害は起らなかった。このことは、サイロシン構造を認識する抗体以外に、タンパク質と結合させ

るために化学修飾したスペーサ部分に対する抗体が多く含まれていることを示唆する。今後はサイロシンを結合したアフィニティーカラムを調製し、これにより特異性の高い IgG 画分を精製する予定である。

また、最終目標とするサイロシンを認識する免疫化学的簡易測定法を確立するために PSI-COOH をベルオキシダーゼに結合させたツールも合成していく予定である。

#### E. 結 論

サイロシンをキャリアタンパク質に結合させるために化学修飾し、これをキャリアタンパク質 KLH に結合させウサギに免疫し、抗サイロシン IgG 画分を調製した。しかし、サイロシンに対する特異性は十分ではなく、サイロシン構造以外を認識する抗体が多く含まれていることが示唆された。今後、アフィニティーカラムを用いて精製することにより特異性の高い抗サイロシン IgG を調製する予定である。同時に作製した PSI-KLH をマウスに免疫し、モノクローナル抗体を産生を行う。

#### F. 参考文献

- 1) K. Aoki, Y. Hirose, and Y. Kuroiwa, *Forensic Sci. Int.*, **44**, 245-255 (1990).
- 2) M. Yamaguchi, H. Inoue, T. Chikuma, J. Itoh, Y. Makino, and H. Hojo, *J. Health Sci.*, **47**, 419-423 (2001).
- 3) B.F. Erlangen, *J. Biol. Chem.* **228**, 713, (1957).

## 研究協力報告書

### 痩身用健康食品と称する未承認医薬品の分析 —フェンフルラミン及びニトロソフェンフルラミン—

研究協力者 中島憲一郎 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

**研究要旨** 本研究では、痩身用健康食品に違法に含まれるフェンフルラミンおよび *N*-ニトロソフェンフルラミンを簡便かつ高感度に分析するために、HPLC-蛍光および UV 定量法を検討した。蛍光ラベル化試薬には、4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)-benzoyl chloride (DIB-Cl)を用いた。開発した方法を用いて、市販の痩身用健康食品(カプセル剤、茶)を分析した結果、数種の健康食品から *N*-ニトロソフェンフルラミンあるいはフェンフルラミンを定量できた。また、*N*-ニトロソフェンフルラミンあるいはフェンフルラミンの摂取履歴を検証する目的で、毛髪中のフェンフルラミンおよびその代謝物であるノルフェンフルラミンの HPLC-蛍光定量法を開発した。

#### A. 研究目的

食欲抑制作用を有するフェンフルラミン (Fen) は心機能障害など重篤な副作用があり、わが国では未承認の医薬品である。然しながら、いわゆる痩せ薬としては効果が大きいため、同作用薬のフェンテルミンと共に違法に出回っている。最近、フェンフルラミンの *N*-ニトロソ体 (*N*-ニトロソフェンフルラミン, *N*-Fen)が健康食品中の添加成分として違法に使用された結果、肝機能障害が生じ、中には死亡例も発生している。当研究室ではこれまで食欲抑制剤関連の分析化学的研究を行っているが、その一環として、今回、話題となっている痩身用健康食品中のフェンフルラミン及び *N*-ニトロソフェンフルラミンの HPLC 定量を検討した。まず、フェンフルラミンが2級のアミノ基を有することから、DIB-Clによる蛍光ラベル化を行い、高感度化を図るとともに、HPLC キラル分離を検討した。次に、*N*-ニトロソフェンフルラミンは3級アミン

であり、DIB-Clによる誘導体化ができないため、吸光度を利用する HPLC-UV 法を用いて検討した。一方、Fen あるいは *N*-Fen の摂取履歴を検証するためには毛髪分析が有用であると考えられた。そこで、本研究においてもその基礎検討を行うことにした。

#### B. 方法

1. 分析試料：痩身用健康食品。蘭樹(カプセル)、せん之素こう囊(カプセル)、清脂精華素(カプセル)、スリムエスト・イージー(カプセル)、Ning Hong(パック茶)、Gold Slim Este(ハーブ茶)、Xenadrine(カプセル)
2. 試料の前処理：カプセルは、その内容量を取り出して秤量後、50 mL のメタノールに溶解し、25 分間ソニケーション後、ろ過する。ろ液の 1 mL をとり、メタノールで 100 mL とする。

パック茶は 0.5 g を秤量し、これにメタノール 8 mL を加え、20 分間ソニケーシ

オンして抽出する。メタノールで 10 mL として混和後、メンブレンフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) をろ過する。

毛髪試料は健常人の毛髪を 0.1% SDS で 5 分間ソニケーションし、次に水で 5 分間ソニケーションする。その後、キムワイプで水分をふき取り、30°C で 30 分間乾燥させる。毛髪試料を精秤後、2 cm 毎に切断し、これに Fen 及び norfenfluramine (Norf) のメタノール標準を添加し、最終毛髪濃度が 1 mg/0.5 mL となるようにメタノールを加え、1 時間のソニケーションを行った。

### 3. 定量分析

#### 1) HPLC

紫外検出：試料のメタノール溶液をメンブレンフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) でろ過後 HPLC に注入し *N*-Fen および Fen を UV 検出した。

蛍光検出：試料のメタノール液を蒸発乾固する。これに 10 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) 10 mL を加え、2 mM DIB-Cl のアセトニトリル溶液 150  $\mu\text{L}$  を加え、vortex mix 後、室温 10 分間放置して DIB 誘導体とする。28% アンモニア水 10  $\mu\text{L}$  を加えて反応を停止後、その 20  $\mu\text{L}$  を HPLC に付し、DIB-Fen を蛍光検出した。

蛍光検出(毛髪分析)：毛髪からのメタノール抽出液を 100  $\mu\text{L}$  とり、 $\text{N}_2$  ガスで乾固させた後、25 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) 25 mL および 1.5 mM DIM-Cl アセトニトリル懸濁液を加え、vortex mix 後、室温 10 分間放置して DIB 誘導体とする。28% アンモニア水 5  $\mu\text{L}$  を加えて反応を停止後、その 20  $\mu\text{L}$  を HPLC に付し、DIB-Fen を蛍光検出した。

HPLC 条件

[HPLC-UV]

ポンプ：SPD-10ADvp(島津)、カラム：Wakopak ODS (和光、250x4.6 mm, i.d.)、検出器：SPD-10Avp(島津)、検出波長：210 nm、溶離液：アセトニトリル-水 (= 60:40, v/v)、流速：1.0 mL/min、注入量：20  $\mu\text{L}$ 。  
[HPLC-蛍光(1)アキラル分離]

ポンプ：LC-10ADvp(島津)、カラム：Daisopak SP-120-5-ODS-BP (ダイソー、250 x 4.6 mm, i.d.)、検出器：RF-550(島津)、検出波長： $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$ 、溶離液：アセトニトリル-水 (= 65:35, v/v)、流速：1.0 mL/min、注入量：20  $\mu\text{L}$ 。  
[HPLC-蛍光(2)キラル分離]

ポンプ：LC-10ADvp(島津)3 台、システムコントローラー：SCL-10Avp(島津)、カラムオープン：CTO-10Asvp (25°C)(島津)、カラム：Chiralcel OD-R (ダイセル、250x4.6 mm, i.d.)、検出器：RF-550(島津)、検出波長： $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$ 、溶離液：(A) アセトニトリル-0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 2.7)-0.05 M 過塩素酸緩衝液 (pH 2.0) (= 50:25:25, v/v/v)、(B) アセトニトリル、流速：1.0 mL/min、注入量：20  $\mu\text{L}$ 、グラジエントプログラム：0-2 min, B = 0%; 20-21 min, B = 5%; 21-27 min, B = 10%; 37 min, B = 10%; 38 min, B = 15%; 38-44 min, B = 15%; 44 min, B = 0%、ポストカラム試薬：4% アンモニア水、流速：0.1 mL/min。

### C. 研究結果

HPLC-UV 法を用いる Fen および *N*-Fen の定量、HPLC-蛍光法を用いる Fen のキラルおよびアキラル定量法を検討した。HPLC-UV 法を用いる場合、上記の溶離条件下では Fen および *N*-Fen の保持時間はそれぞれ 14.5 min および 19.0 min であり、他の成分ピークから十分に分離する



ことができた。検量線を作成した結果、Fenは10~100  $\mu\text{M}$ 、*N*-Fenは1.25-20  $\mu\text{M}$ の範囲で良好な直線関係を与えた。なお、検出下限はそれぞれ5.6  $\mu\text{M}$  および0.43  $\mu\text{M}$ であった。蛍光検出法の場合、アキラルな分離においては、FenのDIB誘導体の保持時間は25.6 minであり、他の成分ピークから十分に分離できた。また、検量線は0.1-10  $\mu\text{M}$ の範囲で直線となった。検出下限は35 nMであった。一方、

キラル分離においては *d*-Fen-DIB と *l*-Fen-DIBの保持時間はそれぞれ28.0 min および44.5 minであった。検量線は0.1-2.5  $\mu\text{M}$ の範囲で良好な直線性を示した。検出下限はそれぞれ53 nM および75 nMであった。これらのデータをTable 1に示す。健康食品をそれぞれ定量した結果、Table 2に示すように、*N*-Fenが蘭樹およびせん之素こう嚢に多量に含まれていることが分かった。

Table 1. Calibration curves and detection limits for the determination of Fen and *N*-Fen

Compounds	Calibration range ( $\mu\text{M}$ )	Detection limit ( $\mu\text{M}$ , S/N=3)
Fen	UV	10-100
	FL Achiral	0.1-100
<i>d</i> -Fen	FL Chiral	0.1-2.5
<i>l</i> -Fen	FL Chiral	0.1-2.5
<i>N</i> -Fen	UV	1.25-20

Table 2. 瘦身用健康食品中のFenおよび*N*-Fenの定量値

瘦身用健康食品	含有量	
	<i>N</i> -Fen (mg) /capsule contents (mg) (UV)	Fen ( $\mu\text{g}$ /capsule contents (mg) (FL)
蘭樹	8.25 (272), 7.0 (264)	8.1 (260)
せん之素こう嚢	4.10 (250), 4.25 (244), 4.10 (248)	trace*
	Fen (mg)/capsule contents (mg)	
	(UV)	(FL)
清脂精華素	4.5 (420), 4.0 (380), 4.2 (460)	4.3 (420), 3.6 (380), 4.0 (460)
スリムエスト・イージー	5.3 (241), 6.2 (256)	5.0 (241), 6.1 (256)
		<i>d</i> -Fen 6.4 (256)
Ning Hong	192 $\pm$ 7.1 (ng/g)	
	<i>d</i> -Fen 74 $\pm$ 2.3 (ng/g)	<i>l</i> -Fen 71 $\pm$ 10.8 (ng/g)
Gold Slim Este		n.d.
Xenadrine		n.d.

\*lower than LOD.

クロマトグラムを Fig. 1 に示す。一方、清脂精華素、スリムエスト・イージーからは *N*-Fen は検出されず、高濃度の Fen が検出された。さらに、Fen には光学異性体が存在することから、そのキラル分離も試みた。その結果、Ning Hong からは微量の *d*-Fen および *l*-Fen が検出され

た。スリムエスト・イージーのキラル分離によるクロマトグラム例を Fig. 2 に示した。スリムエスト・イージーは非常に高濃度に、しかも *d*-Fen のみを含んでいることが分かった。Xenadrine およびハーブ茶を分析した結果、*N*-Fen および Fen は検出されなかった。

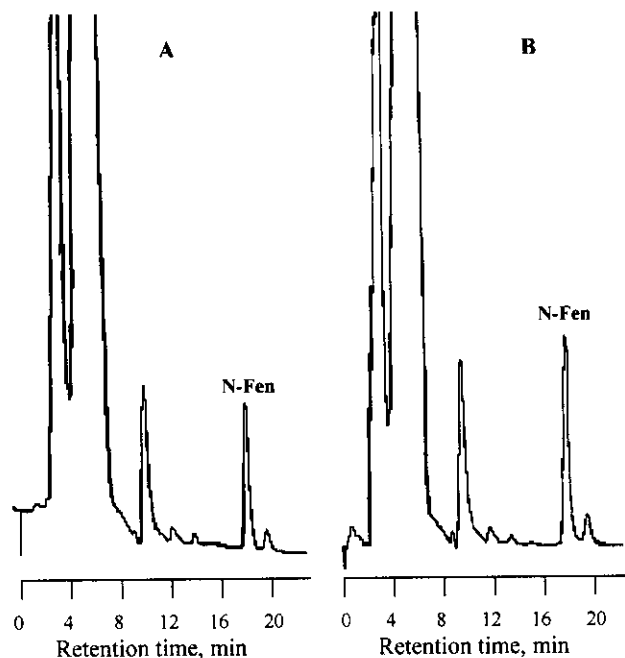


Fig. 1 Chromatograms of *N*-Fen in “せん之素胶囊” capsule (A) sample and (B) sample spiked with 1.25 mM *N*-Fen.

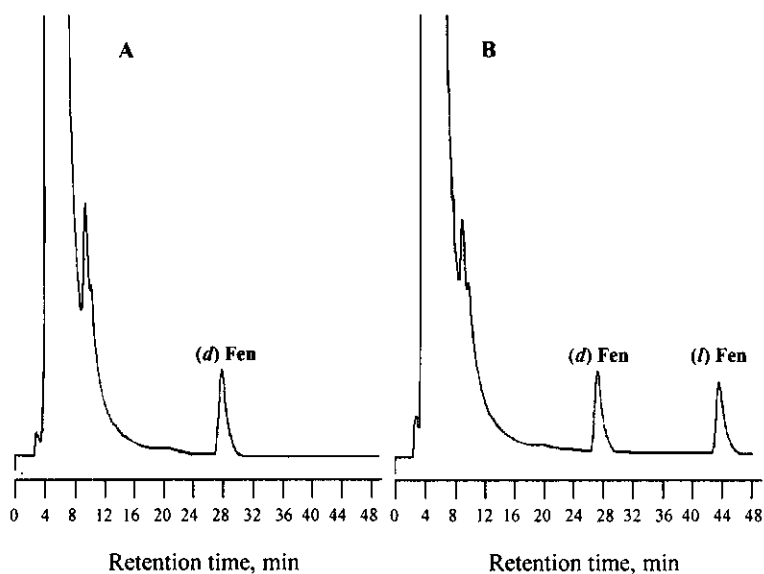


Fig. 2 Chromatograms of *d*- and *l*-Fen in “Slimest Easy” capsule by chiral HPLC. (A) sample and (B) 1 μM *dl*-Fen.

*N*-Fen を違法に混ぜた痩身用健康食品を摂取したヒトが重篤な肝機能障害を起こし、死亡する例が見られたことは社会的に大きな反響を与えたが、摂取したかどうか、あるいはどの期間摂取したか、などの情報は血液や尿からは推定できない。そこで、摂取歴がある程度予測できる毛髪分析を検討した。今回は、毛髪中の Fen およびその主代謝物である Norf を定量するための基礎的検討を行った。添加検量線は Fen が 0.036-144 ng/mg の範囲で、Norf が 0.016-127 ng/mg の範囲で直線となり、定量下限はそれぞれ、0.036 ng/mg および 0.016 ng/mg と非常に高感度であった。

#### D. 考察

2 種の健康食品、蘭樹およびせん之素こう嚢には少量の Fen も同時に含まれていたことが報告されているが、今回の検討結果では、少量の Fen が蘭樹に含まれていたものの、せん之素こう嚢で検出された Fen は trace であった。*N*-Fen とともに Fen が同時に検出されたことは、製造・保管過程での *N*-Fen の分解によるものかあるいは合成原料として残存していたものかのいずれかが考えられる。Ning Hong については、当初から *N*-Fen の検出を検討せずに試料を使用したため、*N*-Fen の有無を確認することができないが、検出された Fen が非常に微量であったことを考えると、*N*-Fen が添加してあった可能性が高い。開発した毛髪分析法は非常に高感度であり、微量の Fen を十分追跡できると思われるので、今後、*N*-Fen あるいは Fen を摂取したヒトの毛髪分析が可能であると考えられる。

#### E. 結論

痩身用健康食品に未承認の薬物が違法に加えられ、それを摂取したヒトが重篤な肝機能障害を引き起こしたが、その原因は *N*-Fen であると推定されている。本研究でも 2 種類の健康食品から *N*-Fen を定量することができた。一方、食欲抑制作用が強いものの、心機能障害を起こし、わが国では未承認であった Fen が含まれる健康食品が今回の研究の結果、スリムエスト・イージーおよび清脂精華素から高濃度に検出された。Fen は肝機能障害とは直接結びつかないものの、心機能障害が懸念されるため、違法な使用や入手に対して行政の強力な指導や対策が望まれる。今後、毛髪分析を利用して、摂取歴と病態との関係などを明らかにしたいと考える。

#### F. 参考文献

1. A. Kaddoumi, M.N. Nakashima, K. Nakashima: Fluorometric determination of DL-fenfluramine, DL-norfenfluramine and phentermine in plasma by achiral and chiral high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr., B*, **763**, 79-90 (2001).
2. A. Kaddoumi, M.N. Nakashima, M. Takahashi, K. Nakashima: Chiral HPLC Determination of dl-fenfluramine and dl-norfenfluramine in biological fluids using DIB-Cl as a label, *Anal. Sci.*, **17**, i907-i909 (2001).
3. Amal Kaddoumi、中嶋弥穂子、高橋正克、中島憲一郎：マイクロダイアリシスを用いたフェンフルラミンおよびフェンテルミン同時投与後の血中および脳内動態、日本薬学会第 122 年会講演要旨

集、p.48, 28[P]I-229、千葉、2002.

4. A. Kadoumi, M.N. Nakashima, M. Takahashi, K. Nakashima: Pharmacokinetics of fenfluramine and phentermine after simultaneous administration to rats using microdialysis, 26th International Symposium on High performance Liquid Phase Separation and Related Techniques (HPLC 2002), Abstract p.80, 198, Montreal, 2002.

## 分担研究報告書

### ミャンマーにおけるケシ代替植物の開発

分担研究者 佐竹元吉 お茶ノ水女子大学生生活環境研究センター 教授

**研究要旨** 本研究は、ゴールデンライアングル(ミャンマー北東部、ラオス西部、タイ西北部の山岳地域)と呼ばれるケシの不法栽培地でケシの代替に薬用植物を植え込み、山岳民族・少数民族の人々がケシ栽培を中止し、代替薬用植物栽培で営農出来るように指導することを目的とする。本年度はミャンマー北部のカチン州、海拔1,200mから1,800mの地域で、昨年度より栽培している薬用植物の生育状況の調査、カチン独立軍地域へのケシ代替植物栽培の指導、野生薬用植物の分布調査と資源保護、ミャンマー連邦での薬用植物栽培の振興、健康増進に役立つ知識の普及、新規導入薬用植物としてのラン科植物の収集、関連事項に関する講演会や展示会を行った。

#### 研究協力者

我妻 豊 財団法人 日本薬剤師研修  
センター 囑託

#### A. 研究目的

本研究は、世界の麻薬撲滅運動の対象地域の一つであるミャンマー連邦山間地域に、ケシの代替薬用植物を導入し、少数民族の営農を支援することを目的とする。そのための代替薬用植物栽培の推進、野生薬用植物の分布調査と資源保護、健康増進に役立つ薬用植物の知識の普及による薬用植物栽培の振興、国内外での薬用植物の利用の拡大を行う。

#### B. 研究方法

ミャンマー連邦山間地域のケシ不法栽培地に薬用植物を導入するために、森林局の協力を得て、モデル研修薬草園を作り、そこでの研修に必要な種苗を導入し、栽培指導を行う。ミャンマー研修薬草園で昨年度より栽培している植物の成育調査を行う。また、野生薬用植物のカチン

州での分布調査を実施する。新規導入薬用植物として野生ラン科植物の収集を行う。ケシ不法栽培地域のリーダーと薬草園での研修内容について話し合い、薬用植物普及に関する広報活動として講演会、展示会を行う。

#### C. 研究結果

2002年4月より、ミャンマー政府は薬用植物栽培を国家事業としてとりあげるための検討を開始し、モデル研修薬草園の建設用地として、林業省から2002年10月に4ヶ所が提供された。カチン独立軍より研修生を1名受け入れ研修を行った。昨年度つくり上げたミャンマー研修薬草園における栽培植物の成育調査を行ったところ、継続的な栽培でトリカブトの開花が見られた。人参は発芽がよく、セイロン人参は数株残っていた。特にガイティ地区での成育がよかった。6~7月の雨期に、ミャンマー国内の自生薬用植物の調査を行い、野生薬用植物を採集した。採集した植物は国立医薬品食品衛生

研究所で成分を抽出し、活性試験を行っている。

#### D. 考察

紅花や果樹類等の栽培可能な薬用植物がほぼ決まり、採算可能な栽培方法の検討段階に入った。次の段階としては、調整加工方法の修得を行う必要がある。野生薬用植物では、人参の新種と思われるものが見つけ出された。この他に中国で保護されている植物が多数見つかった。セッコク類については有効性を含める試験及び組織培養での増殖について検討を開始した。ミャンマーでの活動及びラン類の研究機関として認知を要請するために、お茶の水ミャンマーフォーラムを設立し、月例で研究会を開くこととした。

#### E. 結論

ミャンマーでは様々な組織による活動が行われているが、相互の活動がばらばらに行われている。ミャンマーにおける相互の活動を円滑にするための情報交換の場として、本年度「お茶の水 ミャンマーフォーラム」を作り、第1回のフォーラムを開催したところ、関係者の様々な活動成果の報告があった。今後のミャンマー支援活動のために情報交換の場を現地又は日本国内で設け、支援の活動をおこなっていくことが、今後の活動に役立つものとする。

## 分担研究報告書

### ミャンマーにおけるケシ代替植物の調査

分担研究者 佐竹元吉 お茶ノ水女子大学生生活環境研究センター 教授

研究要旨 ミャンマー北東部、ラオス西部、タイ西北部の山岳地域はケシの不法栽培地として知られている。この地域でのケシ代替植物栽培導入により、ケシ栽培を撲滅するため、野生薬用植物の分布調査と資源保護、ミャンマー連邦での薬用植物栽培の振興、健康増進に役立つ知識の普及、新規導入薬用植物としてラン科植物の収集と関連事項に関する講演会、展示会を行った。

#### A. 研究目的

本研究は、世界の麻薬撲滅運動の対象地域の一つであるミャンマー連邦山間地域に、ケシの代替薬用植物を導入し、少数民族の営農を支援することを目的とする。そのための野生薬用植物の分布調査と資源保護、健康増進に役立つ薬用植物の知識の普及による薬用植物栽培の振興、国内外での薬用植物の利用の拡大を行う。

#### B. 研究方法

ミャンマー連邦山間地域のケシ不法栽培地に薬用植物を導入するために、種苗を供給し、栽培技術を指導する。野生薬用植物のカチン州での分布調査を実施する。新規導入薬用植物として野生ラン科植物の収集を行う。ケシ不法栽培地域のリーダーと薬草園での研修内容について話し合い、薬用植物普及に関する広報活動として講演会、展示会を行う。

#### C. 研究結果

2002年4月より、ミャンマー政府は薬用植物栽培を国家事業としてとりあげるための検討を開始した。2002年4月の世界麻薬会議(東京)で昨年度の研究成果を

発表した。2002年6~7月の雨期にかけ、ミャンマー国内の自生薬用植物の調査を行い、野生薬用植物を採集した。採集した植物は国立医薬品食品衛生研究所で成分を抽出し、活性試験を行っている。採集・調査地域の概要は下記の通りである。今回の採集した主な植物は、カチン州では、ラン科 *Orchidasceae* のセッコク属 *Dendrobium* sp.、ユリ科 *Liliaceae* のツクバネソウ属 *Paris* sp.及びナルコユリ属 *Polygonatum* sp.、ウコギ科 *Araceae* のチクセツニンジン属 *Panax* sp.、バラ科 *Rosaceae* のボケ属及びバラ属、トウダイグサ科 *Euphorbiaceae* のカシュウナッツ類縁の種子2種類、キノコ類のニセショウロ属の1種であった。セッコク属は3種を持ち帰った。これらの植物はワシントン条約の保護植物であったが、ミャンマー政府の許可書が発行され、国内に導入した。これらは、天然林の伐採地から取られたものを栽培したものを入手したもので、現地の栽培証明を付けて許可されたものである。ユリ科 *Liliaceae* のツクバネソウ属 *Paris* sp.植物は花が大きく中国の重楼と呼ばれる生薬に類似している。又、ナルコユリ属 *Polygonatum* sp.は茎が

高く、葉は輪生し、葉の先が鉤状に巻き込む特徴があり、根茎は黄精に類似している。チクセツニンジン属 *Panax* sp.の地上部はトチバニンジンに類似し、根茎も竹の節状に横走しているが、主根茎部分がやや大きい特徴がある。成分的にはベトナム人参とチョウセンニンジンとも関連があると思われるが、採取量が少ないので活性試験は行っていない。ボケ属植物はカリンと思われるが、酸味が強く、果実を乾燥したものはミャンマーでの調味料として日常的に利用されている。バラ属植物は大型の花を付けているものであったが、数個しかなく、今回は標本にとどめた。カシュウナツ類縁植物は果実に大型の果托があり、果実の部分は黒く堅い。この部分の大型のものと小形のものが見られた。ニセショウロ属のキノコは少数民族が食用にしているもので、ジャヤガイモくらいの大きさで、内側が黒く、外側は淡褐色である。キンシ及び胞子からニセショウロ属と鑑定されたが、キノコの種名は不明である。特徴として、少し放置すると腐敗臭がする。この他の主な開花植物はシャクナゲ属 *Rhododendron* sp.の大型の白色の花及び自生のラン科植物で *Thuya* sp.も大型の花を咲かせていた。世界最大のカラスウリと思われる *Trichosanthes* sp.は未熟な果実ではあったが直径 20cm の扁平形のものであった。ラン科のセッコク属の *Dendrobium pierardii* 及び *Dendrobium lacinosum* も栽培されているので今後の実験材料として導入可能と思われる。ミャンマーにおける野生ランのリストは表 1. に示したとおりである。

#### D. 考察

栽培可能な薬用植物がほぼ決まり、採算可能な栽培方法の検討段階に入った。野生植物では、人参の新種と思われるものが見つけ出された。この他中国で保護されている植物が多数見つかった。セッコク類については有効性を含める試験及び組織培養での増殖について検討を開始した。ミャンマーでの活動及びラン類の研究機関として認知を要請するために、お茶の水ミャンマーフォーラムを設立し、月例で研究会を開くこととした。ランの展示は東京ドーム及び沖縄海洋博記念植物園で行った。

世界麻薬会議での講演は成果が多く、アフガニスタンから講演依頼の招待の話があった。

#### E. 結論

ミャンマーには様々な組織による活動が行われているが、相互の活動がばらばらに行われている。ミャンマーにおける相互の活動を円滑にするための情報交換の場として、本年度「お茶の水 ミャンマーフォーラム」を作り、第1回のフォーラムを「ミャンマーにおけるラン」をテーマに開催したところ、関係者の様々な活動成果の報告があった。今後のミャンマー支援活動のために情報交換の場を現地又は日本国内で設け、支援の活動をおこなっていくことが、今後重要になってくると考える。



表 1. ミャンマーの野生ラン植物

	Speces	Distribution	Flowering season
1	<i>Acampe papillosa</i>	Wide spread throughout Myanmar	November, Janauary
2	<i>Aerides crassifolia</i>	Chin state, Shan state.	March, April, May
3	<i>Aerides odorata</i>	Central Myanmar, Mandalay Division.	May, June
4	<i>Aerides odorata alba</i>	Mandalay Division, Sagaing Division.	May, June
5	<i>Aerides rosea</i>	Rakhine, Chin, Kachin state.	April, May, June
6	<i>Anoectochilus albolineatus</i>	Kachin state, Shan state.	November,December
7	<i>Ascocentrum ampullaceum</i>	Lower Myanmar, Central Myanmar, Chin state.	April, May.
8	<i>Ascocentrum curvifolium</i>	Wide spread throughout Myaumar	March April,May.
9	<i>Arachnis labrosa</i>	Kachin state.	May, June, July.
10	<i>Arundina gramanifolia</i>	Shan state. Kachin, Chin state.	Throughout the year.
11	<i>Bulbophyllum auricomum</i>	Rakhine state, Central Myanmar, Kayin & Mon state.	October to Febuary.
12	<i>Bulbophyllum blepharistes</i>	Shan state.	March, April.
13	<i>Bulbophyllum careyanum</i>	Central Myanmar, Lower Myanmar, Shan state.	April, May, June
14	<i>Bulbophyllum comosum</i>	Shan state.	March, April, May.
15	<i>Bulbophyllum lemniscatum</i>	Mandalay Division, Northan Shan state.	Jaunary, February.
16	<i>Bulbophyllum lobbii</i>	Shan state.	April, May, June.
17	<i>Bulbophyllum odoratissimum</i>	Rakhine, Kachin state, Shan state.	Apr., May, Aug., Sep.
18	<i>Bulbophyllum picturatum</i>	Shan state.	February, March April
19	<i>Bulbophyllum pollicolosum</i>	Rakhine state.	March, April, May.
20	<i>Bulbophyllum rufinum</i>	Shan state, Central Myanmar.	February, March, April
21	<i>Bulbophyllum wallichii</i>	Shan state.	February, March, April.
22	<i>Calanthe cardioglossa</i>	Shan state.	February, March, April.
23	<i>Calanthe vestita</i>	Kayin state, Mon state.	November, December.
24	<i>Calanthe triplicata</i>	Shan state.	March, April, May.
25	<i>Calanthe sylvatica</i>	Northern Myanmar.	Oct., Nov., Dec.
26	<i>Calanthe rubens</i>	Shan state, Chin state.	February, March April.
27	<i>Chilochista parishii</i>	Lower and Central Myanmar. Shan state.	April, May, June.
28	<i>Coelogyne maculata</i>	Chin State, Shan state.	April, May.
29	<i>Coelogyne hutteriana</i>	Rakhine, Chin, Kachin state.	April, May. June.
30	<i>Coelogyne fimbriata</i>	Shan state, Chin state.	May, June.
31	<i>Cymbidium ensifolium</i>	Shan state, Kachin and Chin state.	Nov., Dec., Jan., Feb.
32	<i>Cymbidium eburneum</i>	Chin and Kachin state.	February. March April.
33	<i>Cymbidium elegans</i>	Chin state, Shan state.	March April, May.

34	<i>Cymbidium findlaysonianum</i>	Wide spread in Myanmar.	March, April, May
35	<i>Cymbidium giganteum</i>	Shan, Chin and Kachin state.	February, March, April
36	<i>Cymbidium insigne</i>	Chin, Kachin state.	November, December, January
37	<i>Cymbidium lowianum</i>	Shan, Chin and Kachin state.	March, April, May.
38	<i>Cymbidium tracyanum</i>	Chin, Shan and Kachin state.	March, April, May.
39	<i>Dendrobium aduncum</i>	Northern Myanmar.	May, June, July.
40	<i>Dendrobium albosanguineum</i>	Rakhine state. Central Myanmar and Lower Myanmar	March April, May.
41	<i>Dendrobium anceps</i>	Wide spread in Myanmar.	April, May, June.
42	<i>Dendrobium anosmum</i>	Lower Myanmar.	January, February.
43	<i>Dendrobium anosmum alba</i>	Lower Myanmar .	Jan., Feb., Mar.
44	<i>Dendrobium aphyllum</i>	Wide spread in lower Myanmar, Itakhine scattered in Shan state.	March, April, May.
45	<i>Dendrobium bensoniae</i>	Magwe Division, Sagaing Division.	May, June, July.
46	<i>Dendrobium bilobulatum</i>	Rakhine and Shan state.	Aug., Sep., Oct.
47	<i>Dendrobium brymerianum</i>	Northern Myanmar.	March, April, May.
48	<i>Dendrobium capillipes</i>	Shan state, Chin state	January to April.
49	<i>Dendrobium carniferum</i>	Kachin, Chin and Shan state.	April to June.
50	<i>Dendrobium chrysocrepis</i>	Shan state.	May, June.
51	<i>Dendrobium chrysotoxum</i>	Wide spread in hilly regions of Myanmar.	March, April.
52	<i>Dendrobium chrysotoxum var. suavisimum</i>	Shan state, Kayan and Rakhine state.	April to June.
53	<i>Dendrobium chrysanthum</i>	North Myanmar, Kayar and Shan State .	March, April.
54	<i>Dendrobium crepidatwn</i>	Wide spread in Myanmar.	January to April.
55	<i>Dendrobium crumenatum</i>	Lower Myanmar.	Throughout the year, after the thunder shower
56	<i>Dendrobium crystallinum</i>	Wide spread in hilly region of Myanmar.	May to July.
57	<i>Dendrobium cumulatum</i>	Shan State. Kachin state.	January to June.
58	<i>Dendrobium delacourii</i>	Lower Myanmar, Rakhine and Shan state.	June, July.
59	<i>Dendrobium devonianum</i>	Sagaing Division. Kachin and Shan state.	May, June.
60	<i>Dendrobium densiflorum</i>	Chin state, Shan and Kachin state.	March to May.
61	<i>Dendrobium dixanthum</i>	Mon, Kayin state, Bago and Mandalay Division.	Jan., Feb., Mar.
62	<i>Dendrobium draconis</i>	Wide spread in hilly regions of Myanmar.	Dec., Jan., Feb.
63	<i>Dendrobium eriaefiorum</i>	Yangon, Bago Division.	July., Aug., Sep.
64	<i>Dendrobium falconeri</i>	Higher altitude of Shan state, Kachin and Chin state.	January, February.
65	<i>Dendrobium farmeri</i>	Hilly regions of Myanmar.	February to April.
66	<i>Dendrobium fimbriatum</i>	Fairly wide spread in Myanmar.	March, April.
67	<i>Dendrobium findalayanum</i>	Bago Division, Mon. Kayin and Rakhine state.	May, June.
68	<i>Dendrobium findalayanum var. maculatum</i>	Rakhine state, Bago Division.	Jul., Aug., Sept.
69	<i>Dendrobium formosum</i>	Lower Myanmar and Rakhine state.	May, June.

70	<i>Dendrobium fytchianum</i>	Bago Division, Mon, Kayin State.	December, January, February.
71	<i>Dendrobium griffithianum</i>	Shan state.	January, February.
72	<i>Dendrobium harveyanum</i>	Shan State.	March, April.
73	<i>Dendrobium heterocarpum</i>	Shan State, Kachin State.	January to March.
74	<i>Dendrobium incurvum</i>	Rakhine, Shan and Kachin state.	April, May, June.
75	<i>Dendrobium infundibulum</i>	Shan, Kachin, Rakhine and Chin state.	March, April.
76	<i>Dendrobium jenkinsii</i>	Shan state. Kachin state.	March, April.
77	<i>Dendrobium lindleyi</i>	Wide spread in Myanmar.	February to April.
78	<i>Dendrobium longicornum</i>	Kachin state	October, November, December.
79	<i>Dendrobium lituiflorum</i>	Shan state, Kachin state and Mandalay Division.	Marchhh, April.
80	<i>Dendrobium moschatum</i>	Wide spread in Myanmar.	May, June, July.
81	<i>Dendrobium monoliforme</i>	Kachin state.	March April.
82	<i>Dendrobium nobile</i>	Fairly wide spread in hilly regions of Myanmar.	March, April.
83	<i>Dendrobium ochreatum</i>	Shan, Kachin and Chin state.	May, June, July.
84	<i>Dendrobium pachyglossum</i>	Shan state.	July, August, September
85	<i>Dendrobium pachyphyllum</i>	Rakhine, Shan state.	June, July, April.
86	<i>Dendrobium parishii</i>	Wide spread in hilly regions.	April, May.
87	<i>Dendrobium parcum</i>	Wide spread in hilly regions.	February, March, April.
88	<i>Dendrobium pendulum</i>	Chin, Shan and Kachin state.	March, April,
89	<i>Dendrobium polyanthum</i>	Magwe and Mandalay Division.	January, February.
90	<i>Dendrobium podagraria</i>	Rakhine and Shan state, Mandalay Division.	December to April.
91	<i>Dendrobium primulinum</i>	Shan and Chin state.	April, May.
92	<i>Dendrobium pulchellum</i>	Wide spread in Myanmar.	April, May.
93	<i>Dendrobium revolutum</i>	Shan state	July, August.
94	<i>Dendrobium rhodopterygium</i>	Rakhine state.	March to May.
95	<i>Dendrobium scabrilingue</i>	Mon, Kayin, Kayah and Shan state.	Dec. to May, Early flowering in the lower regions and late in higher altitude.
96	<i>Dendrobium secundum</i>	Rakhine, Mon state. Tanintharyi Division and Bago Division.	Marchi, April.
97	<i>Dendrobium secundum alba</i>	Lower Myanmar.	March, April.
98	<i>Dendrobium senile</i>	Shan state, Mon state and Tanintharyi Division.	December, January.
99	<i>Dendrobium strongylathum</i>	Chin and Kachin state.	March, April.
100	<i>Dendrobium stuposum</i>	Kachin state.	April, May.
101	<i>Dendrobium sulcatum</i>	Kachin state.	March, April, May.
102	<i>Dendrobium sutepense</i>	Shan state.	March, April.
103	<i>Dendrobium thyrsoflorum</i>	Shan, Kachin and Chin state.	April, May.
104	<i>Dendrobium tortile</i>	Mon state, Bagon Division.	May, June.

105	<i>Dendrobium transparens</i>	Kachin state.	April, May.
106	<i>Dendrobium trigonopus</i>	Shan state.	April, May.
107	<i>Dendrobium wardianum</i>	Previously recorded in Shan State, now collected in Kachin state.	April, May.
108	<i>Eria densa</i>	Rakhine, Shan and Kachin state.	September, October.
109	<i>Eria sp.1</i>	Rakhine state and Bago Division.	Dec., Jan., Feb.
110	<i>Eria sp.2</i>	Rakhine	March, April
111	<i>Eria sp.3</i>	Kachin state.	April, May.
112	<i>Eria tomentosa</i>	Rakhine state and Bagon Division.	April, May.
113	<i>Epipogium roseum</i>	Kachin state,	April, May.
114	<i>Epiginum coelogyne</i>	Shan state	March, April.
115	<i>Esmeralda clarkei</i>	Mandalay Division.	April, May.
116	<i>Eulophia andamanensis</i>	Lower Myanmar and Andaman Islands.	May, June.
117	<i>Hemipilia calophylla</i>	Shan state.	June, July, August.
118	<i>Holcoglossum amesiana</i>	Shan state.	April, May.
119	<i>Holcoglossum kimballiana</i>	Shan state and Chin state.	February, March.
120	<i>Hygrochilus gigantea</i>	Bago, Division and Rakhine state	May, June.
121	<i>Hygrochilus parishii</i>	Shan, Rakhine, Chin state.	April, May,
122	<i>Kingidium deliciosum</i>	Central Myanmar and Rakhine.	December, January.
123	<i>Liparis viridiflora</i>	Bago Divison, Rakhine and Shan state.	January, February, March.
124	<i>Luisia sp.</i>	Shan state.	October, November, December.
125	<i>Ornithochillus difformis</i>	Bago, Mandalay Division, Rakhine and Shan state.	April, May.
126	<i>Paphiopedilum bellatulum</i>	Shan state, Mandalay Division.	June to August, sporadic flowering throughout the year.
127	<i>Paphiopedilum bellatulum alba</i>	Rarely found with in the normal population in Shan state .	Same as Paphiopedilum beliatulum.
128	<i>Paphiopedilum charlesworthii</i>	Shan state.	August, September, October.
129	<i>Paphiopedilum hirsutissimum</i>	Mandalay Divison.	February, March.
130	<i>Paphiopedilum parishii</i>	Shan state.	June, July, August.
131	<i>Paphiopedilum wardii</i>	Kachin state.	December, January.
132	<i>Paphiopedilum villosum</i>	Shan state, Mandalay Division and Kachin state.	December, January.
133	<i>Panisea uniflora</i>	Shan state, Kachin state.	March, April.
134	<i>Phaius tankervilleae</i>	Shan state, Kachin and Rakhine state.	April, May, June.
135	<i>Phalaenopsis cornu cervi</i>	Mandalay Division, Bago Division, Shan and Rakhine state .	Whole year round with successive growth inflorescence
136	<i>Phalaenopsis manni</i>	Shan state.	April, May.
137	<i>Phalaenopsis parishii</i>	Kachin state.	April, May.
138	<i>Pleione praecox</i>	Shan, Chin and Kachin state.	November to January.