

139	<i>Pleione maculata</i>	Kachin state.	September, October.
140	<i>Renanthera coccinea</i>	Mon state, Tanintharyi Division.	March, April.
141	<i>Renanthera Imschootiana</i>	Chin state and Magwe Division.	April, May.
142	<i>Rhynchostylis gigantea</i>	Bago Division, Rakhine state.	December, January.
143	<i>Rhynchostylis retusa</i>	Fairly wide spread in Myanmar.	May, June, July.
144	<i>Spathoglottis affinis</i>	Fairly wide spread in lower Myanmar.	June, July.
145	<i>Trichoglottis dawsoniana</i>	Shan state.	March, April. May.
146	<i>Thunia marshalliana</i>	Fairly wide spread in the hilly regione of Myanmar.	July, August.
147	<i>Trichoglottis dawsoniana</i>	Shan state.	March, April. May.
148	<i>Trias oblonga</i>	Shan state	August, September.
149	<i>Vanda bensoni</i>	Chin and Shan state.	February, April
150	<i>Vanda Liouvillei</i>	Shan state	March, April.
151	<i>Vanda coerulea</i>	Chin state and Shan state.	April to July.
152	<i>Vanda coerulea alba</i>	Rarely found within the population of normal plants.	June, July.
153	<i>Vanda coerulescens</i>	Chin and Shan state, Mandalay and Bago Division.	March, April,
154	<i>Vanda denisoniana</i>	Bago Division, Rakhine.	Sep., Oct. and Apr., May.
155	<i>Vanda parvifolia</i>	Bago Dvision, Shan state Mandalay Division and Rakhine state.	March, April.
156	<i>Vanda pumila</i>	Shan state	April, May.
157	<i>Vanilla parishii</i>	Rakhine state	May, June.

研究協力報告書

ミャンマーの山岳地帯でのケシ代替植物の栽培

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

研究要旨 本研究は、ゴールデントライアングル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を行った。

A. 研究目的

ミャンマー連邦山間地域で、少数民族がケシ栽培を中止し、代替薬用植物栽培で営農できるようにするため、ミャンマー連邦での薬用植物栽培の振興、健康増進に役に立つ薬用植物に関する知識の普及、国内外での薬用植物の利用の拡大を行うことを目的とする。

B. 研究方法

ミャンマー連邦林業省林業研究所 Nynton 博士と協議し、本年度は下記事項について実施することとした。

1. ミャンマー北部のカチン州の海拔1,200mから1,800mの地域で、ケシ不法栽培地に薬用植物を導入するため、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。モデル研修薬草園での栽培指導は、薬草園に少数民族の研修員を集め、研修を行う。研修は種子又は種苗を薬草園圃場で栽培しながら、栽培管理方法、収穫方法、収穫品の加工調製法を教える。研修終了後、各部族の居住地に薬草園を作り栽培できるように、種苗を持って帰ってもらい、簡単な農機具や、

栽培に必要な資材を貸し出す。

各部族ごとに収穫品をモデル研修薬草園に持参して、これらの製品の品質評価を行ない、国内外の流通ルートを紹介する。

2. ケシ不法栽培地域のリーダーを薬草園に招待し、研修内容を教える。

3. ミャンマー研修薬草園での栽培植物の成育調査を行う。

C. 研究結果

Nynton 博士の協力を得て、本年度は下記の結果が得られた。

1. モデル研修薬草園の建設

薬草園用の地域として、林業省から2002年10月に4ヶ所が提供された。この中の2ヶ所のカチン州セイロン地区(海拔1,800m、20ha)及びガイテイ地区(海拔1,200m、10ha)を、栽培方法の研修から生産品の流通までを指導するモデル研修薬草園とすることとした。セイロン地区は中央研修薬草園とし、研修員を集め、植付けの実習から収穫方法、加工調製方法の研修までを行なう計画である。これらの事業を支援するために、マンダレー市郊外メイミョウ植物園付属薬用植物種

苗保存園(海拔 800m、20ha)で、導入植物の育苗、保存及び生育条件の検討を行う。メイミョウ植物園付属薬用植物種苗保存園は交通の便が良いので、一般国民に対しての本事業の概要と薬用植物への知識の普及のための見本園的役割を持つものとするを計画している。この他、シャン州バモウ地区林業事務所をこれらの地域の連絡事務所として林業省から提供された。

2. ケシ不法栽培地域のリーダーの薬草園への招待

カチン独立軍より地域でのケシ代替え植物栽培指導のため派遣されてきた研修員 1 名を受け入れた。研修終了後、革命軍上層部は独立軍地域内に研修薬草園の設立を要請してきた。

3. 研修薬草園での栽培植物の成育調査

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。特にガイテイ地区での成育がよかった。また、山岳地帯での栽培薬用植物の生育状況は表 1 の通りであった。

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。紅花が市場で要望されており、紅花の系統別に苗を導入し、最適品を選抜中であり、広い面積で栽培できる可能性が高い。果樹類も成育が良いので、剪定技術を本格栽培のために指導した。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。

E. 結論

ミャンマー林業省からの許可書が獲得でき、現地での活動が円滑に行えるようになった。平和協定軍からの要望を政府は認めて、我々の活動は非政府軍組織で活躍できるようになってきた。その結果として、薬用植物栽培を中心とした少数民族の村おこしが可能となってきた。今後もミャンマーにおける薬草園づくりを継続して指導し、山岳少数民族等の経済的自律を支援していく必要がある。

表1. ミャンマーの山岳地帯での栽培薬用植物(日本国内の医薬品として使用されているもの)の成育状況

	生薬名	植物名	成育状況
1	ウイキョウ 茴香	ウイキョウ	良い
2	オウゴン 黄ゴン	コガネバナ	良い
3	オウバク 黄柏	キハダ	良い
4	オウレン 黄连	セリバオウレン	良い
5	ガジュツ 我朮	ガジュツ	良い
6	カミツレ カムツレ	カミツレ	良い
7	カンゾウ 甘草	カンゾウ	やや良
8	キキョウ 桔梗	キキョウ	良い
9	キクカ 菊花	キク	良い
10	ケイヒ 桂皮	シナニッケイ	良い
11	コウカ 紅花	ベニバナ	良い
12	サンキライ 山帰来	サンキライ	良い
13	サンシシ 山梔子	クチナシ	良い
14	サンショウ 山椒	アサクラザンショウ	良い
15	シコン 紫根	ムラサキ	良い
16	シャクヤク 芍薬	シャクヤク	やや困難
17	シャゼンソウ 車前草	オオバコ	良い
18	シャクヤク 縮砂	シャクヤク	良い
19	ソヨウ 蘇葉	シソ	良い
20	ダイオウ 大黄	ダイオウ	困難
21	タイソウ 大棗	ナツメ	良い
22	チクセツニンジン 竹節人参	トチバニンジン	良い
23	トウキ 当帰	トウキ	良い
24	ナンテンジツ 南天実	ナンテン	良い
25	ハンゲ 半夏	カラスビシャク	良い
26	ビャクジュツ 白朮	オケラ	良い
27	ポタンピ 牡丹皮	ポタン	栽培中
28	ヤクチ 益智	ヤクチ	良い
29	ヨクイニン 意以仁	ハトムギ	良い
30	リョウキョウ 良姜	リョウキョウ	良い

分担研究報告書

大麻鑑定のためのゲノム分析手法の開発と植物生理学的研究

分担研究者 関田 節子 国立医薬品食品衛生研究所 筑波薬用植物栽培試験場長

研究要旨 分子生物学的手法による大麻鑑定法として、2種類の制限酵素の相補的アダプターを合成し、誘導したプライマーを試料とした *Cannabis sativa* に適用し、多形を示した AFLP フラグメントの配列を決定後、特異的なプライマーを設計することによりマーカーの開発を行った。また、大麻成分の Tetrahydrocannabinolic acid (THCA) 生合成酵素遺伝子の最上流にあたる polyketosynthase (PSK) のクローニングと大腸菌における発現、発現タンパクの性状、基質特異性等を検討した。

不正流通薬物であるケミカルドラッグ ATM、BZP、3CPP、TMFPP、4MPP のマウス行動量に及ぼす作用を検討し、化学構造の違いによる中枢作用への影響を明らかにした。また、分析法が煩雑であった健康食品中に添加された甲状腺ホルモン；チロキシン(T4)の迅速検出法として酵素免疫測定法を開発した。

研究協力者

正山 征洋 九州大学大学院薬学研究院
教授

小島 尚 神奈川県衛生研究所食品薬
品薬事毒性科 主任研究員

三上栄一 愛知県衛生研究所薬品化学
科化学部 主任研究員

高上馬 希重 理化学研究所 植物機能研究室
基礎科学特別研究員

大麻成分の生合成酵素・遺伝子についてはこれまでに下流領域の THCA synthase、CBDAsynthase、CBCA synthase を単離し、THCA synthase についてはクローニングとその発現、詳細な性状等を明らかにした。そのほかの関連酵素として olivetolic acid geranylphosphate transferase や polyketo synthase (PKS) についてもクローニングを行ってきた。今回は最上流の PKS についてその機能を明らかにすることを目的とした。

A. 研究目的

1. 大麻に関するゲノム分析法の開発

大麻 *Cannabis sativa* L. の DNA による鑑定手法の開発を目的に国内外の数多くの機関から種子を導入し、形態、成分などに注目した総合的な研究を展開している。今年度は AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) マーカーの開発として 23 系統の *Cannabis sativa* L. を実験材料に、AFLP 分析を用いたマーカー開発による系統の識別を試みた。

2. 不正流通薬物に関する研究

インターネット等で化学実験試薬と称して販売されている、いわゆる”ケミカルドラッグ”のうち一部の化学物質は医薬品成分に区分されているが、その安全性や生体影響はほとんど不明である。そこで、いわゆる”ケミカルドラッグ”の販売実態を調査するとともに、これら化学物質の生体影響を、中枢作用の指標としてマウスの行動に及ぼす作用を検討した。

平成14年7月に健康被害が報告された健康食品の原因物質の一つと考えられている甲状腺末中のトリヨードチロニン(T3)及びチロキシン(T4)の迅速・簡便・高感度の新たなスクリーニング法が求められている。そこで本研究では、酵素免疫測定法(ELISA)の応用を検討した。

B. 研究方法

1. 大麻に関するゲノム分析法の開発

1-1. AFLP の開発

(1) 植物材料

国内外の機関より導入した 23 系統の *Cannabis sativa* L. を実験材料に用いた。また比較のため同科植物であるホップ *Humulus lupulus* L. を用いた。

(2) DNA 抽出

人工気象室で育成して得られた植物体の生葉 150 mg を DNA 抽出材料とした。CTAB(cetyltri methylammonium bromide)法を一部改良し、抽出・精製を行った。

(3) AFLP 分析

DNA 250 ng を制限酵素 *Pst* I と *Msp* I (各 5U, TaKaRa, Kyoto)で切断、その DNA 末端に *Pst* I アダプターと *Msp* I アダプターを T4 DNA ligase (TaKaRa, Kyoto)でライゲース処理を行った。プレ増幅はノンセレクトティブプライマーにより行った。次いでプレ増幅された DNA 断片をテンプレートにセレクトティブ PCR を行った。プライマーには *Pst* I アダプター部位に相補の部位にさらに 2 塩基を付加した 3 種類の *Pst* I プライマー「*Pst* I (P+AC; P+AG; P+CT)」と *Msp* I アダプター部位に相補の部位にさらに 3 塩基を付加した 8 種類の *Msp* I プライマー「*Msp* I (M+CAA; M+CAC; M+CAG; M+CAT; M+ATA; M+ATC; M+ATG; M+ATT)」を用

いそれぞれのプライマーを組み合わせた 24 種類の反応で行った。

得られた PCR 増幅産物のゲル電気泳動は SYBR Green I (Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland)で染色し、UV 照射 (254 nm)で検出した。

(4) AFLP フラグメントの STS(Sequence Tagged Site)化

多型を示した AFLP フラグメントを含むポリアクリルアミドゲルを蒸留水中で抽出し、この溶液をテンプレートとし、同フラグメントが得られたプライマーセットを用いてセレクトティブ PCR を行った。得られた PCR 産物のバンドゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden)により DNA 断片を抽出し、この DNA 断片を TOPO TA Cloning (Invitrogen, California)によりクローニングした。QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden)によりプラスミド DNA を抽出、シーケンス反応、精製を行った。プライマーはベクター領域の基地配列 M13 プライマーを用いた。

(5) 特異的プライマーの設計

プライマー設計には GENETYX-Mac ver. 11 (Software Development, Tokyo)を用いた。

(6) STS 化した AFLP マーカーの検出

上記のように設計したプライマーを用い、葉から抽出したインタクト DNA をテンプレートとして PCR を行った後 2% アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV 照射(254 nm)で検出を行った。

1-2. 生合成遺伝子の解明

(1) 基質特異性の検討

発現ベクター pET24a(+)に PKScDNA を組み込んだ大腸菌 BL21(DE3)を培養

し、IPTG を添加して PKS を誘導した。培養液は His-tag 用アフィニティーカラムで精製し、以下の実験に供した。

スターター基質は、脂肪族基質として acetyl CoA、butyl CoA、isovaleryl CoA、octanoyl CoA、decanoyl CoA、芳香族基質として benzoyl CoA、*p*-coumaroyl CoA を選び、それぞれを malonyl CoA と共にインキュベートした。

(2) 酵素活性の検出

100 mM sodium citrate buffer(pH5.5)に各基質 100 μ M と 100 μ M malonyl CoA を溶かしたものを 160 μ l と酵素液(PKS 発現用ベクター pET24a(+))を組み込んだ大腸菌 BL21(DE3)で発現した PKS) 40 μ l を 30°C で 2 時間インキュベートした。反応後メタノールを添加して反応を停止し、HPLC で分析した。

2. 不正流通薬物に関する研究

2-1 ケミカルドラッグの実験動物による行動試験

FT-IR は臭化カリウム錠剤法により日本分光 FT-IR420 で測定した。

8~13 週齢の ddy 系雄マウスを行動観察装置に入れ、被検薬投与を 4 日目に行った。行動観察は光センサーによる行動量を測定する小動物行動量解析装置(メルクエスト製、scanetSV-20)を用い、投与直後から一定時間(180 あるいは 200 分)、ブラチックケージ(215×320×140mm)内の 3 次元行動を記録し、1 分間の行動量として表した。結果は 1 群 3~4 匹の平均行動量及び標準偏差とした。投与方法は、AMT は 0.1%CMC 懸濁液とし、他の化学物質は水溶液とし、強制経口投与した。対照群には CMC 懸濁液あるいは水を同量投与した(投与量: 1 mL/100 g)。

2-2. 健康食品中の甲状腺ホルモン成分

の迅速検出法

医師により健康被害事例と診断された消費者から提供を受けたダイエット用食品 5 検体と通信販売等で入手したダイエット用食品 8 検体を用いた。

(1) ELISA によるスクリーニング

錠剤型は粉碎し、カプセル剤型試、茶類試料は内容物を取り出し粉末とした後、1/2 回摂取相当量を取り、希水酸化ナトリウム試液 20mL を加え、0 分間振り混ぜた。この上澄液 1 mL をとり 0.1 mol/L 塩酸試液 1 mL を加え、更に PBS を加え 5 mL とし、ELISA 用試料溶液とした。別に局方乾燥甲状腺約 10 mg を量り、希水酸化ナトリウム試液 20 mL を加え、20 分間振り混ぜた。この上澄液 1mL をとり、0.1 mol/L 塩酸試液 1mL を加え、PBS で 25mL と、ELISA 用標準溶液とした。吸光度が標準溶液の吸光度より低い場合をスクリーニング法における検体陽性と判定した。

(2) ESI-LC/MS による確認

LC/MS用試験溶液の調製は、小坂らの方法に従い、粉末とした健康食品試料約 0.1gを褐色試験管に量り、タンパク質分解酵素で 37°C 28時間加水分解した。希釈したリン酸で加水分解反応を停止した後、遠心分離し、その上澄液を酢酸エチルで分配した。更に酢酸エチル層を減圧留去し、残留物を HPLC 移動相 2mL に溶解し、試験溶液とした。ESI-LC/MS 測定条件；カラム：TSK gel ODS 80TM (ϕ 4.6×150mm, 5 μ m)、移動相：水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸 (600:400:4.5)、流速：1mL/min、カラム温度：40°C、保持時間：T3(6.5分)、T4(11.9分)、スプレー電圧：30kV、コーン電圧：30V、イオン源温度：100°C、デソルベーション温

度：250°C、測定イオン：正イオン

C. 研究結果

1. 大麻に関するゲノム分析法の開発

1-1. AFLPの開発

本実験における DNA 染色は一般的なエチジウムブロマイド染色では感度が低くかったので SYBR Green I による検出を試みた。セレクトティブプライマー24種類全ての組み合わせにおいてバンドの増幅生成が認められ、各々の系統を他の系統と識別することが可能となり、AFLP分析から *C. sativa* と他の植物を明確に識別することが可能となった。系統間で明らかな多型が認められたバンド数個から得た塩基配列情報によりプライマーを設計しそのプライマーを用いてインタクトな DNA をテンプレートとして PCR を行った結果、*Pst* I-AG と *Msp* I-ATA のプライマーセットで得られた約 0.2 kbp の AFLP フラグメントから有効なマーカーが得られた。このフラグメントの塩基配列から設計されたプライマーによって増幅される PCR 産物のサイズは 130bp であった。

1-2. 生合成遺伝子の解明

PKS と各種基質との反応性を検討した結果、脂肪族 CoA が基質となりうることを確認した。Butyl CoA と malonyl CoA を反応させた場合、divarinol が得られた。しかし hexanoyl CoA のそれと比較すると Km 値はほぼ同等であるのに反して、Vmax が約 5 分の 1 に低下していた。

2. 不正流通薬物に関する研究

2-1. いわゆる“ケミカルドラッグ”の実験動物による行動試験

ケミカルドラッグとして販売される 5 種類の化学物質について、構造的に一致

する化学試薬が及ぼす影響を検討した。

AMT は、10、25、50 mg/kg で濃度依存的に行動量が増加し、25 と 50 mg/kg で有意に増加していた。また、50 mg/kg では実験終了後、1 匹(4 匹中)が死亡した。BZP、3CPP とともに予備実験で、25 及び 50 mg/kg では顕著な行動は認められなかったが、BZP は 100 mg/kg で行動量が対照群に比べ増加する傾向にあった。一方 3CPP は 100 mg/kg 投与で、対照群で認められる投与直後の行動量増加が、3CPP 投与により有意に抑制された。また、観察開始 2 時間過ぎにみられる行動量増加も抑制された。TMFPP は、投与直後にみられる行動量の増加が抑制される傾向にあり、また、開始 2 時間過ぎにみられる行動量増加も抑制される傾向にあった。4MPP は 100 mg/kg および 250 mg/kg でも行動量に及ぼす作用は認められず、500 mg/kg では投与後、死亡する個体が確認された。この結果、4MPP は亢進また抑制いずれの作用も軽微で、中枢作用を期待することはできないものと判断された。このような化学物質を過量に摂取した場合、死亡事故が発生する危険が懸念された。

2-2. 健康食品中の甲状腺ホルモン成分の迅速検出法

水酸化ナトリウム溶液中で、T4 はその溶解性が高まることから、試料中に含まれる T4 を抽出するため、希水酸化ナトリウム試液を用いた。この抽出液を中和し、PBS で希釈した後調製した試験溶液を用いて試験した。スクリーニング法の結果を判定する吸光度値は、試料 1/2 回摂取量あたり局方乾燥甲状腺 2mg が添加されたときの吸光度(約 1.0)を用いた。本 ELISA は競合法のため、試料中の T4

が高濃度であれば反応液の黄色は薄く、低濃度であれば反応液の黄色は濃く呈することから、試料溶液の吸光度が標準溶液の吸光度より低い場合をスクリーニング法における検体陽性と判定した。ESI-LC/MSによるT4確認法では水-アセトニトリル系のLC移動相溶媒では、T3、T4のピークが観察されないため揮発性の高いトリフルオロ酢酸を電解質として添加した。標準として用いた局方乾燥甲状腺のT4のピークは保持時間11.9分に検出され、正イオン測定により m/z 777.6 ($[M+H]^+$)に分子イオンピーク、 m/z 731.6 ($[M+H-HCOOH]^+$)にフラグメントイオンピークが観察された。一方T3のピークは保持時間6.5分に検出され、正イオン測定により m/z 651.9 ($[M+H]^+$)に分子イオンピーク、 m/z 605.9 ($[M+H-HCOOH]^+$)にフラグメントイオンピークが観察された。このとき若干の余裕をもたせたT4の検出限界は試験溶液中濃度 $0.5\mu\text{g/mL}$ であり、局方乾燥甲状腺の用量を考えると十分な感度と考えられた。

D. 考察

1. 大麻に関するゲノム分析法の開発

1-1. AFLPの開発

作出したAFLPプライマーを用いることによって、大麻系統の違いによりフラグメントが得られるものと得られないものとに区別することが可能であった。今後さらに多くのAFLPフラグメントを解析し、有効なAFLPマーカーが得られるプライマーセットを設計することが大麻系統識別に有用であると考えた。

1-2. 生合成遺伝子の解明

Hexanoyl CoAとmalonyl CoAを反応した場合、本来はolivetolic acidが得られ

るものと予想されるが、予想に反してolivetolが得られた。この理由については不明であり、今後検討する計画である。なお、条件によってはolivetolic acidの生成量が若干増加する場合もあるので、この点も合わせて検討が必要である。malonyl CoAとButyl CoA及びhexanoyl CoAそれぞれの反応によりPKSは明らかに基質特異性を持つ事が判明した。

アサにはhexanoyl CoAをスターターとする生理品種とbutyl CoAをスターターとする生理品種があるが、酵素の基質特異性は比較的ルーズであることが予想される。今後divarinol系アサのPKS遺伝子をクローニングし、pentyl系アサのそれとホモロジーを比較することによって、アサに顕著に見られる生理品種の問題が解決出来るものと期待している。

2. 不正流通薬物に関する研究

2-1. いわゆる“ケミカルドラッグ”の実験動物による行動実験

AMTは行動量が増加し、中枢神経系を亢進することが確認された。過量を摂取した場合、健康危害の可能性が増大することが明らかになった。現在、AMTは医薬品成分に分類されているが、古く、AMTは旧ソ連で抗うつ薬に利用が試みられたことが報告されているが、毒性値や安全性などの報告はほとんど見られない。BZPは行動が亢進される傾向を示し、3CPPは行動抑制作用が認められた。3CPPとTMFPPは中枢抑制作用を有する可能性が示された。また、4MPPは亢進また抑制いずれの作用も軽微で、中枢作用を期待することはできないものと判断された。このような化学物質を過量に摂取した場合、死亡事故が発生する危険が

懸念された。

2-2. 健康食品中の甲状腺ホルモン成分の迅速検出法

T4 は甲状腺組織のみで産生され大部分はチログロブリン蛋白に結合しており、甲状腺末中の含量は T3 より多い。また血中では総 T4 の 0.02~0.03% が遊離型として存在している。これらのことから臨床検査分野で汎用されている ELISA による市販遊離型 T4 検査キットを健康食品に添加された甲状腺末中に含有される遊離型 T4 の検出へ応用し良好な結果が得られた。ELISA は迅速・簡便という点では大変優れた方法であるが、一般に共存する試料マトリックス成分、特に抗原の類縁体との交差反応により測定値がばらつくという問題点がある。このため ELISA の結果を基に LC/MS による確認試験を行った。ELISA において陽性と判定された検体を分析したところ、日局乾燥甲状腺を分析したときに得られた T3、T4 と同様な保持時間及びマススペクトルが測定されたことから LC/MS においても T3、T4 の混入が確認された。一方 ELISA において陰性と判定された検体を分析したところ、T3、T4 と同様な保持時間及びマススペクトルは測定されなかった。

D. 結論

大麻の不正使用は増加していて、栽培地の特定等鑑別法について求められる状況が変化している。これらに 대응するために DNA を利用する鑑別法の検討を進め AFLP マーカーの開発を行った。本マーカーは 23 系統の識別の一端を担うことが明らかとなった。

PKS を検討した結果本物質がアサの

生理品種に関わる重要な生合成酵素であることを明らかにした。このポイントミューテーションの手法により、基質特異性に関わるアミノ酸を特定することが可能と考えられた。カンナビノイドは全てカルボン酸タイプであるが、PKS が触媒した生成物は殆どが脱炭酸タイプである。この点は疑問の残るところであり、今後の検討課題となった。

ケミカルドラッグとして販売されている化学物質 5 種類のマウス行動量に及ぼす影響を検討した結果、AMT は中枢亢進作用が強く、生体影響も強いことが示された。また、ピペリジン系化合物類は置換基の違いにより中枢作用や毒性値が異なることが今回の結果から示された。

AMT 及び BZP は医薬品成分の範疇に区分されているが、現状の流通では化学実験試薬とは考えられず、ヒトが摂取することを目的に購入すると思われる。また、医薬品成分や毒物劇物などに指定されていない他の検体では法的な制限を受けないことから、ヒトが摂取する可能性は大きい。今後、これらの化学物質が不正流通を防止するため、生命への危険性や安全性に問題のあることを科学的に明らかにし、これらの実験結果や収集された情報を公開することにより、健康危害の可能性が大きいことを周知する必要がある。さらに、マーケットリサーチを行い、流通あるいは今後利用されうる化学物質の情報を収集するとともに、行動作用のみならず、循環器系や呼吸器系に及ぼす薬理毒性作用を検討する必要がある。

ELISA による T4 検出スクリーニング法は LC/MS 分析結果 (13 検体) と同一であったことから従来数日を要した機器分析と異なり、数時間で T4 検出が可能

となり、迅速、簡便、高感度なスクリーニング法として良好な結果が得られた。しかしながら、ELISA は検査キットごとで力価に差が生じ、また、試料マトリックス成分による妨害が避けられないことも報告されており、食品など複雑な成分の混合物の分析に擬陽性反応を示すことも否定できない。このため ELISA によるスクリーニング法において陽性と判定された試料については LC/MS を用いた精密試験を併用することも必要と考えられる。無承認無許可医薬品による健康被害未然防止のため、本 ELISA を活用するなどして市場に流通するこれら健康食品の調査確認事例を増やす努力が今後はますます必要になると考えられる。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 高上馬希重、吉田茂男、飯田 修、関田節子、佐竹元吉、牧野由紀子：大麻 *Cannabis sativa* L. 識別のための AFLP マーカー，DNA 多形，10, 55-59 (2002)

分担研究報告書

大麻鑑定のための AFLP マーカーの開発

分担研究者 関田 節子 国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場 場長
研究協力者 高上馬 希重 理化学研究所 植物機能研究室 基礎科学特別研究員

研究要旨 分子生物学的手法による大麻鑑定法として新たに AFLP マーカーを開発した。2 種類の制限酵素を採用し、これらの相補的アダプターを合成後、誘導したプライマーを組み合わせるにより PCR 反応を行った。多形を示した AFLP フラグメントの配列を決定した後、特異的なプライマーを設計しマーカーの開発を行った。試料の 23 系統の *Cannabis sativa* について開発したマーカーを適用したところ系統間の識別に有用であった。

A. 研究目的

法律により取り扱いの規制されている大麻の乱用防止のため、譲渡譲受事犯において大麻の同一性を鑑定する方法の一つとして DNA による鑑定手法の開発を目的とした研究を行っている。

大麻 *Cannabis sativa* L. は 1 年生の草本で、花期の葉、および花穂に麻醉性成分が含まれる。一方で繊維採取や油採取の用途のため、本植物の栽培が数千年にわたり世界中に広がった。そのため同一種でありながら多様な変異の存在することが認められている。このような背景から、*C. sativa* の種内における多様性について基礎的知見を得ることは大麻鑑定に有効であると考え、我々は国内外の数多くの機関から種子を導入し、形態、成分などに注目した総合的な研究を展開している。

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 解析は PCR により増幅された制限酵素断片の長さの違いを検出する方法である。AFLP は RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) と同様に、制限酵素切断部位の違いによって生じ、

又、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) と同様にプライマー結合部位の塩基配列の違いによっても生じる。RFLP に比較して PCR ベースであるため解析に使用する DNA サンプルが少量ですむ。また制限酵素認識配列に従ったプライマーを使用するため、RAPD に比較して実験データの再現性が高い。また解析を開始するにあたりプローブとなる DNA クローンや塩基配列情報をあらかじめ用意しておくことが不要である。このため DNA マーカー作出に要する時間を大幅に短縮することが可能であり、広範なゲノムデータのマーカー化において有効な技術として近年、多くの生物の DNA マーカー開発に利用され始めている。

本研究では 23 系統の *Cannabis sativa* L. を実験材料に、AFLP 分析を用いたマーカー開発による系統の識別を試みた。

B. 研究方法

1. 植物材料

国内外の機関より導入した 23 系統の *Cannabis sativa* L. を実験材料に用いた(表

表1 実験に用いた試料

Taxon	Exp. code	Accession number*	Country	Institute or arboretum
<i>Cannabis sativa</i> L.	# 001	0122-98-200	Czech	Jaromir Svoboda Orechova
<i>C. sativa</i>	# 004	0125-98-200	Germany	Botanischer Garten Technischen Hochschule, Aachen
<i>C. sativa</i>	# 005	0126-98-200	Hungary	Agratudományi Egyetem Botanikus Godollo
<i>C. sativa</i>	# 009	0130-98-200	Poland	The Botanical Garden of Lublin
<i>C. sativa</i>	# 010	0131-98-200	Iran	Medicinal and Aromatic Plants Research Center, University of Shahied Beheshti, Teheran
<i>C. sativa</i>	# 011	0132-98-200	Germany	Botaniachwe Garten Heinrich-Heine Universitat, Dusseldorf
<i>C. sativa</i> (Mexican strain)	# 013	0134-98-102	Mexico	Kyushu University (Japan), from Mexico
<i>C. sativa</i>	# 017	0138-98-102	China	Kyushu University (Japan), from China
<i>C. sativa</i> (THCA strain)	# 020	0141-98-102	unknown	Kyushu University (Japan)
<i>C. sativa</i>	# 028	0149-98-200	Germany	Alter Botanischer Garten, Gerg-August Universitat, Gottingen
<i>C. sativa</i>	# 030	0151-98-200	Germany	Botaniachwe Garten J.W. Goetne Universitat, Frankfurt
<i>C. sativa</i>	# 032	0153-98-200	Swiss	Zurich Botanischer Garten, Zurich
<i>C. sativa</i>	# 044	0041-98-050	Japan	Tochigi Agricultural Experiment Station, Tochigi
<i>C. sativa</i> (cv. CBDA)	# 045	0042-98-050	Japan	Tochigi Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Tochigi
<i>C. sativa</i>	# 053	0172-98-050	Japan	Kanto-Shin'etsu Regional Narcotic Control Office, Tokyo
<i>C. sativa</i>	# 054	0173-98-050	Japan	Kanto-Shin'etsu Regional Narcotic Control Office, Tokyo
<i>C. sativa</i>	# 057	0176-98-050	Japan	Kanto-Shin'etsu Regional Narcotic Control Office, Tokyo
<i>C. sativa</i>	# 066	0185-98-200	France	Jardin Botanique E. M., Marseille
<i>C. sativa</i>	# 067	0186-98-200	France	Jardin Botanique de la Ville, Caen
<i>C. sativa</i>	# 068	0187-98-200	Czech	Agricultural University Prague, Prague
<i>C. sativa</i>	# 069	0188-98-200	France	Jardin Botanique de la Gacilly, Gacilly
<i>C. sativa</i>	# 078	0094-99-200	Italy	Civico Orto Botanico, Marchesetti
<i>C. sativa</i>	# 084	0098-99-200	Italy	Orto Botanico, Lucca
<i>Humulus lupulus</i> L. (Hop)		0023-00-000	Japan	Izu Experimental Station for Medicinal Plants, NIHS

*) "Accession No."は国立医薬品食品衛生研究所・伊豆薬用植物栽培試験場における登録番号。

1. また比較のため、同科植物であるホップ *Humulus lupulus* L.を用いた。
 2. DNA 抽出
人工気象室で育成して得られた植物体の生葉 150 mg を DNA 抽出材料とした。CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)法を一部改良し、抽出・精製を行った。
 3. AFLP 分析
AFLP のプロトコールは Zabeau and Vos, Vos et al.に従い若干の変更を加えた。
- DNA 250 ng を制限酵素 *Pst* I と *Msp* I (各 5U、TaKaRa, Kyoto) で切断した。切断した DNA 末端に *Pst* I アダプターと *Msp* I アダプターを T4 DNA ligase (TaKaRa, Kyoto) でライゲース処理を行った。各制限酵素認識配列に相補なアダプターは表 2 示したものを新たに合成した。アダプターのライゲーション処理をした DNA 断片のプレ増幅をノンセレクトティブプライマー (表 2) により行った。PCR によ

る DNA 増幅は 20 μ L の反応系に調製し、Takara PCR Thermal Cycle MP (TaKaRa, Kyoto) を用いて増幅反応を行った。反応サイクルは下記のプログラムで行った。

94°C (10 min) 1 サイクル
 94°C (1 min) → 56°C (1 min) → 72°C (2 min)
 20 サイクル
 72°C (5 min) 1 サイクル

プレ増幅された DNA 断片を蒸留水で 20 倍希釈したものをテンプレートに以下のセレクトティブ PCR を行った。反応ボリュームは 20 μ l とし、反応サイクルは下記のプログラムで行った。

94°C (10 min) 1 サイクル
 94°C (1 min) → 65°C (1 min) → 72°C (2 min)
 1 サイクル
 94°C (1 min) → 64°C (1 min) → 72°C (2 min)
 1 サイクル
 94°C (1 min) → 63°C (1 min) → 72°C (2 min)
 1 サイクル
 94°C (1 min) → 62°C (1 min) → 72°C (2 min)
 1 サイクル
 94°C (1 min) → 61°C (1 min) → 72°C (2 min)
 1 サイクル
 94°C (1 min) → 60°C (1 min) → 72°C (2 min)
 1 サイクル
 94°C (1 min) → 59°C (1 min) → 72°C (2 min)
 1 サイクル
 94°C (1 min) → 58°C (1 min) → 72°C (2 min)
 1 サイクル
 94°C (1 min) → 57°C (1 min) → 72°C (2 min)
 1 サイクル
 94°C (1 min) → 56°C (1 min) → 72°C (2 min)
 23 サイクル

プライマーには *Pst* I アダプター部位に相補の部位にさらに 2 塩基を付加した 3 種類の *Pst* I プライマー「*Pst* I (P+AC; P+AG; P+CT)」と *Msp* I アダプター部位

に相補の部位にさらに 3 塩基を付加した 8 種類の *Msp* I プライマー「*Msp* I (M+CAA; M+CAC; M+CAG; M+CAT; M+ATA; M+ATC; M+ATG; M+ATT)」を用いた (表 2)。それぞれのプライマーを組み合わせた 24 種類の反応で行った。

得られた PCR 増幅産物を 5% (5% T) ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い (200 V、2 hr、TBE buffer)、その後 SYBR Green I (Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland) で染色し、UV 照射 (254 nm) で検出を行った。

表 2. AFLP 分析で用いたアダプターおよびプライマーの配列

Adapter	
<i>Pst</i> I	5'- CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA-3' 3'-CAT CTG ACG CAT GT-5'
<i>Msp</i> I	5'- GAC GAT GAG TCC TGA G-3' 3'-TA CTC AGG ACT CGC- 5'
Primary primer	
<i>Pst</i> I	5'- GAC TGC GTA CAT GCA G-3'
<i>Msp</i> I	5'- AT GAG TCC TGA GCG G-3'
Selective primer	
<i>Pst</i> I+AC	5'- GACTGCGTACATGCAGAC-3'
<i>Pst</i> I+AG	5'- GACTGCGTACATGCAGAG-3'
<i>Pst</i> I+CT	5'- GACTGCGTACATGCAGCT-3'
<i>Msp</i> I+CAA	5'- ATGAGTCCTGAGCGGCAA-3'
<i>Msp</i> I+CAC	5'- ATGAGTCCTGAGCGGCAC-3'
<i>Msp</i> I+CAG	5'- ATGAGTCCTGAGCGGCAG-3'
<i>Msp</i> I+CAT	5'- ATGAGTCCTGAGCGGCAT-3'
<i>Msp</i> I+ATA	5'- ATGAGTCCTGAGCGGATA-3'
<i>Msp</i> I+ATC	5'- ATGAGTCCTGAGCGGATC-3'
<i>Msp</i> I+ATG	5'- ATGAGTCCTGAGCGGATG-3'
<i>Msp</i> I+ATT	5'- ATGAGTCCTGAGCGGATT-3'

4. AFLP フラグメントの STS(Sequence Tagged Site)化

各系統間で多型を示した AFLP フラグメントの塩基配列情報を明らかにし、そのフラグメントを容易に PCR で検出可能なプライマーの設計を行った。多型を示した AFLP フラグメントを含むポリアクリルアミドゲルを蒸留水中で抽出した。この溶液をテンプレートとし、同フラグメントが得られたプライマーセットを用いて上記反応条件によるセレクトティブ PCR を行った。得られた PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動、エチジウムブロマイド染色し、UV 照射(312 nm)で得られるバンドゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN、Hilden)により DNA 断片を抽出した。この DNA 断片を TOPO TA Cloning (Invitrogen、California)によりクローニングした。QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN、Hilden)によりプラスミド DNA を抽出した。BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE bio Systems)に添付の方法に従ってシークエンス反応、精製を行った。プライマーはベクター領域の基地配列 M13 プライマーを用いた。ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PE biosystems)と塩基配列解析ソフト Sequence Analysis ver 3.3 Analyzer (PE biosystems)によりフラグメントの配列を決定した。

5. 特異的プライマーの設計

得られたフラグメントの塩基配列データから、同フラグメントを増幅することが期待されるプライマーを設計した。プライマー設計には GENETYX-Mac ver. 11 (Software Development、Tokyo)を用いた。

6. STS 化した AFLP マーカーの検出

上記のように設計したプライマーを用い、葉から抽出したインタクト DNA をテンプレートとして PCR を行った。反応条件は 95°C 10分ホットスタートに引き続き、94°C 1分、60°C 1分、72°C 2分を 30 サイクルとし、最後に 72°C 5分とした。2%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV 照射(254 nm)で検出を行った。

C. 研究結果と考察

はじめに、DNA 染色では一般的なエチジウムブロマイド染色に検出方法を試みた。しかしながらエチジウムブロマイド染色では感度が低く、各系統間での多型性を検出することが不可能であった。そこで高感度検出試薬である SYBR Green I による染色検出を試みた。

24 種類のセレクトティブプライマーの組み合わせで AFLP 分析を行った結果、全ての組み合わせにおいてバンドの増幅生成が認められた。さらに各種のセレクトティブプライマーを組み合わせた結果から、各々の系統を他の系統と識別することが可能となった。図 1 には *Pst* I-AG と *Msp* I-CAA のセレクトティブプライマーによる組み合わせでの結果を示した。*C. sativa* と植物学的に近縁であり、形体的にも非常に類似している *H. lupulus* の AFLP パターンはどのセレクトティブプライマーの組み合わせにおいても明らかに *C. sativa* とは異なっており、AFLP 分析から *C. sativa* を他の植物を明確に識別することが可能となった。AFLP 分析は *C. sativa* の各系統間で多くの多型を得るのに非常に有効な手法であることが認められた。

次に系統間で明らかな多型が得られた

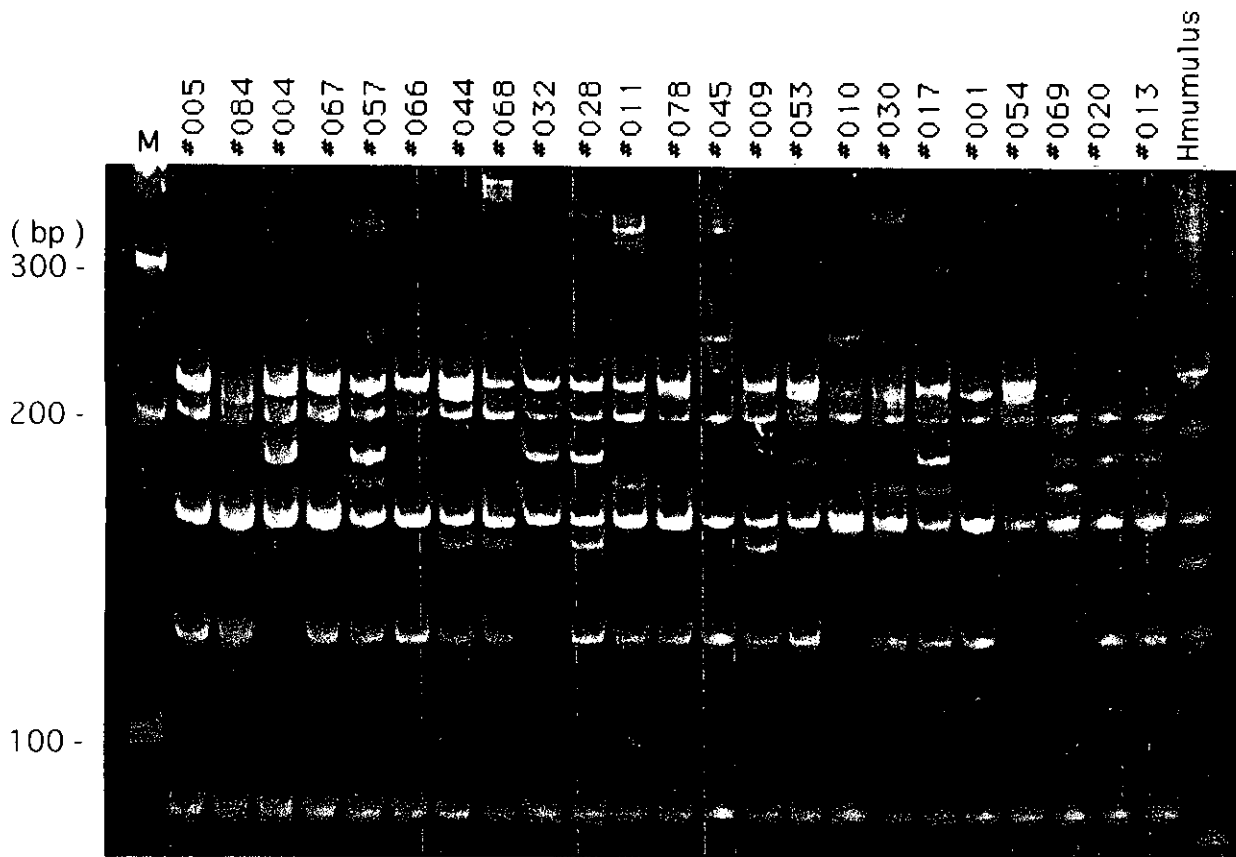


図 1. 23 系統の *Cannabis sativa* における *Pst* I-AG と *Msp* I-CAA プライマーでの AFLP プロファイル.

M, 100bp ladder molecular markers (bp)、

Humulus, *Humulus lupulus*

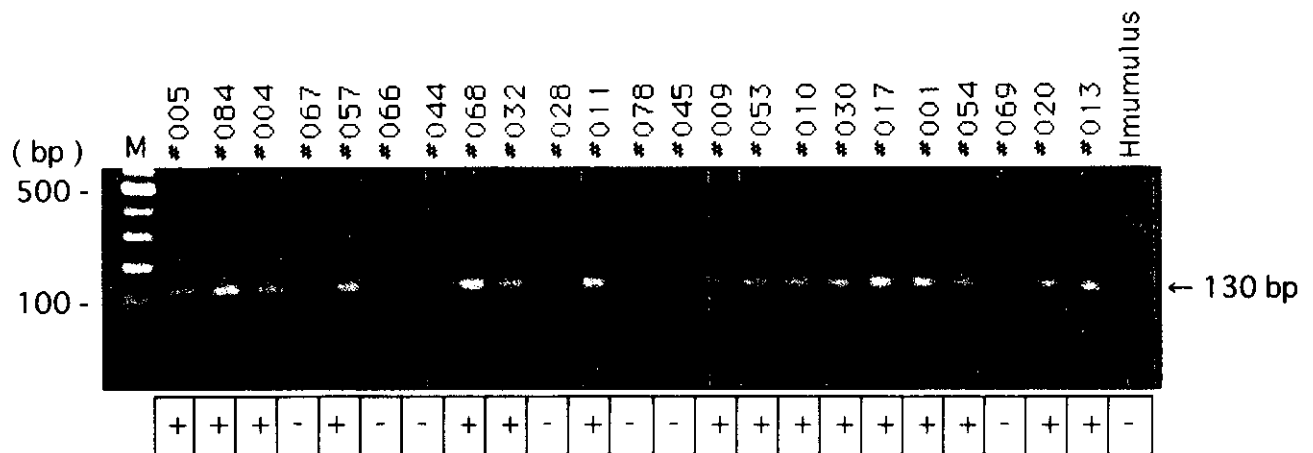


図 2. 23 系統の *Cannabis sativa* における AFLP マーカーの検出。

M, 100bp ladder molecular markers (bp)、

Humulus, *Humulus lupulus*

バンド数個についてクローニング、塩基配列の決定を行った。さらに得られた塩基配列情報から、そのバンドを PCR によって増幅が期待されるプライマーを設計した。そのプライマーを用いてインタクトな DNA をテンプレートとして PCR を行った結果、*Pst* I -AG と *Msp* I -ATA のプライマーセットで得られた約 0.2 kbp の AFLP フラグメントから有効なマーカーが得られた。このフラグメントの塩基配列から設計されたプライマーによって増幅される PCR 産物のサイズは 130bp であった(図 2)。このプライマーを用いることによって、大麻系統の違いによりフラグメントが得られるものと、得られないものとに区別することが可能であった。今後さらに多くの AFLP フラグメントを解析し、有効な AFLP マーカーが得られるプライマーセットを設計することが大麻系統識別に有用であると考えられる。

D. 結論

大麻の不正使用は増加していて、栽培地の特定等鑑別法について求められる状況が変化している。これらに 대응するために DNA を利用する鑑別法の検討を進め AFLP マーカーの開発を行った。本マーカーは 23 系統の識別の一端を担うことが明らかとなった。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 高上馬希重、吉田茂男、飯田 修、関田節子、佐竹元吉、牧野由紀子：大麻 *Cannabis sativa* L. 識別のための AFLP マーカー、DNA 多形、**10**、55-59 (2002)

研究協力報告書

大麻成分の生合成酵素遺伝子に関する研究

研究協力者 正山 征洋 九州大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨 大麻成分の生合成酵素遺伝子については、現在までに THCA synthase のクローニングを行い、大腸菌、タバコ、昆虫細胞を用いて発現させ、酵素タンパクとして単離し、その性状を明らかにした。今年度は最上流の polyketo synthase (PKS) のクローニングと大腸菌における発現、発現タンパクの性状、基質特異性等を詳細に検討した。

A. 研究目的

大麻成分の生合成酵素については、下流領域の THCA synthase、CBDA synthase、CBCA synthase を単離し、THCA synthase についてはクローニングとその発現、詳細な性状等を明らかにした。そのほかの関連酵素として olivetolic acid geranyl-phosphate transferase や polyketo synthase (PKS) についてもクローニングをおこなってきた。今回は、最上流の PKS についてその機能を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 基質特異性の検討

既に PKScDNA を発現ベクター pET24a(+) に組み込み、このものを発現用大腸菌 BL21(DE3) へ組み込んでいるので、本発現用大腸菌を培養し、IPTG を添加して PKS を誘導した。培養液は His-tag 用アフィニティーカラムで精製し、以下の実験に供した。

スターターとなる基質は脂肪族基質として acetyl CoA、butyl CoA、isovaleryl CoA、octanoyl CoA、decanoyl CoA、芳香族基質として benzoyl CoA、p-coumaroyl CoA を

選び、それぞれを malonyl CoA と共にインキュベートした。

2. 酵素活性の検出

100 mM sodium citrate buffer (pH5.5) に各基質 100 μ M と 100 μ M malonyl CoA を溶かしたものを 160 μ L と酵素液(PKS 発現用ベクター pET24a(+)) を組み込んだ大腸菌 BL21(DE3) で発現した PKS) 40 μ L を 30°C で 2 時間インキュベートした。反応後メタノールを添加して反応を停止し、反応液を 100 μ L とり HPLC で分析した。

C. 研究結果と考察

PKS と各種基質との反応性を検討した結果、芳香族 CoA は基質となりえないことが明らかとなった。一方、脂肪族 CoA とインキュベートした場合、反応生成物を与えることから、基質となりうることを確認した。

Hexanoyl CoA と malonyl CoA を反応した場合、本来は olivetolic acid が得られるものと予想されるが、予想に反して olivetol が得られた。この理由については不明であり、今後検討する計画である。なお、条件によっては olivetolic acid の生成量が若干増加する場合もあるので、こ

の点も合わせて検討が必要である。

Butyl CoA と malonyl CoA を反応させた場合、divarinol が得られた。しかし hexanoyl CoA のそれと比較すると K_m 値はほぼ同等であるのに反して、 V_{max} が約 5 分の 1 に低下しており、PKS は明らかに基質特異性を持つ事が判明した。

我々は“メオ”種と称する北部タイのメオ部落で入手したアサから divarinol 系のカンナビノイドとして一連の THCVA、CBDVA、CBCVA、CBGVA 等を単離した。このことからアサには hexanoyl CoA をスターターとする生理品種と butyl CoA をスターターとするものがあるが、酵素の基質特異性は比較的ルーズであることが予想される。今後 divarinol 系アサの PKS 遺伝子をクローニングし、pentyl 系アサのそれとホモロジーを比較することによって、アサに顕著に見られる生理品種の問題が解決出来るものと期待している。

D. 結論

既にアサからは PKS-2 と命名した PKS 類似遺伝子をクローニングしたが、このものは calchone synthase であることが判明した。今回検討した PKS はアサの生理品種に関わる重要な生合成酵素であることが明らかとなった。Divarinol 系アサの PKS 遺伝子をクローニングすると共に、今後は我々が通常行っているポイントミューテーションの手法により、基質特異性に関わるアミノ酸を特定することが可能と考えている。カンナビノイドは全てカルボン酸タイプであるが、PKS が触媒した生成物は殆どが脱炭酸タイプである。この点は疑問の残るところであり、今後の検討課題となった。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. Kusnandar Anggadiredja, Taku Yamaguchi, Hiroyuki Tanaka, Yukihiro Shoyama, Shigenori Watanabe, Tsuneyuki Yamamoto, Prostaglandin E2 attenuates SR141716A-precipitated withdrawal in tetrahydrocannabinol-dependent mice, *Brain Res.*, 2002 in press.

G. 学会発表

1. 田浦太志、Shahar Cohen, 森元聡、矢崎一史、正山征洋、大麻プレニルトランスフェラーゼの cDNA クローニング、日本薬学会第 122 年会、(2002 年 3 月、千葉)、講演要旨集 p.152。
2. Supaart Sirikantaramas, Futoshi Taura, Satoshi Morimoto, Yukihiro Shoyama, High level expression of recombinant tetrahydrocannabinolic acid synthase in insect cell culture, 日本薬学会第 123 年会、(2003 年 3 月、長崎)発表。

研究協力報告書

いわゆる”ケミカルドラッグ”の実験動物の行動に及ぼす影響

研究協力者 小島 尚 神奈川県衛生研究所食品薬品部 主任研究員

研究要旨 いわゆる”ケミカルドラッグ”のマウス行動量に及ぼす作用を検討した。購入した10検体のうち5検体が市販の化学試薬として入手できたことから、ケミカルドラッグと化学試薬を比較した結果、同一構造を有することが確認された。この5種類について動物実験を行った結果、AMTは有意な行動亢進作用を示した。また、ペリジン系ではBZPが行動亢進作用を示したが、3CPPやTMFPPでは行動抑制作用が認められ、4MPPは行動量に影響がなかった。類似した構造を有する化合物でも置換基の種類により中枢作用は異なり、生体影響や危険性が大きく異なることが明らかになった。

A. 研究目的

インターネットの普及により海外の情報リアルタイムで入手できるようになり、また、同時に、話題となる商品が国境を越えて流通するようになった。それらの中で、化学実験試薬と称して販売されている、いわゆる”ケミカルドラッグ”がある。すでに一部の化学物質は医薬品成分に区分されているが、その安全性や生体影響はほとんど不明である。また、ヒトが摂取することを考えると、それらの安全性や健康への被害の可能性についてのデータを蓄積し、危険性を周知する必要がある。そこで、いわゆる”ケミカルドラッグ”の販売実態を調査するとともに、これら化学物質の生体影響を、中枢作用の指標としてマウスの行動に及ぼす作用を検討した。

B. 研究方法

1. 化学分析

FT-IRは日本分光FT-IR420を用い、臭化カリウム錠剤法により測定した。

2. 動物実験

ddy系雄マウスを予備飼育した後(8～13週齢)、3日間、水を経口投与し、行動観察装置に入れ、被検薬投与と同様に行動観察を行い順化し、行動が定常状態に至ったことを確認した。このマウスに、被検薬を4日目に投与し試験を行った。行動観察は光センサーによる行動量を測定する小動物行動量解析装置(メルクエスト製、scanetSV-20)を用い¹⁾、投与直後から一定時間(180あるいは200分)、ブラチックケージ(215×320×140mm)内の3次元行動を記録し、1分間の行動量として表した。結果は1群3～4匹の平均行動量及び標準偏差とした。

投与方法は、AMTは0.1%CMC懸濁液とし、他の化学物質は塩酸塩であることから水溶液とし、強制経口投与した。対照群にはCMC懸濁液あるいは水を同量投与した(投与量:1mL/100g)。

C. 研究結果

1. ケミカルドラッグの種類