

トリプタミン系

AMT:  $\alpha$ -methyltryptamine

ピペリジン系

BZP: 1-benzylpiperazine

3CPP (SO-XTC):

1-(3-chlorophenyl)piperazine

4MPP (TOO-XTC):

1-(4-methoxyphenyl)piperazine

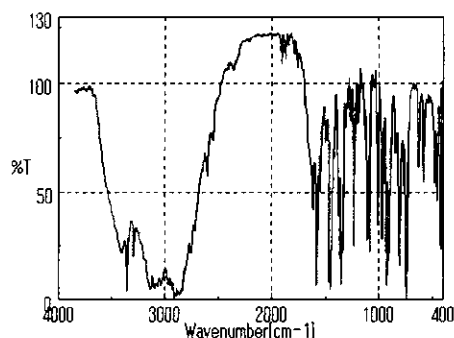
TMFPP (PSY-XTC):

1-(3-trifluoromethoxyphenyl)-  
piperazine

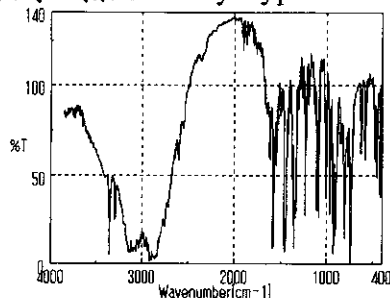
括弧内はケミカルドラッグとして販売された名称を示す。

## 2. 化学分析の結果

5種類のケミカルドラッグを、市販の化学試薬と比較し、構造的に一致するかをFT-IRや質量分析などにより確認した。図1にAMTのIRスペクトルを示しているが、構造的に一致した。また、他のケミカルドラッグも構造的に一致する単一の化学物質であることが確認された。



### a. 化学試薬 $\alpha$ methyltryptamine



### b. ケミカルドラッグ AMT

図1 AMTの化学試薬及びケミカルドラッグのFT-IRスペクトル

## 3. 動物実験の結果

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。

### (1) AMT

AMTは10、25、50 mg/kgの結果を図2に示している。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。結果には示していないが、100 mg/kgでは投与後に死亡した動物がみられた。この結果、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、古くは、AMTは旧ソ連で抗うつ薬に利用が試みられたこと<sup>2)</sup>が報告されている。毒性値や安全性などの報告はほとんど見られない。

### (2) BZP

図3に100 mg/kg投与の結果を示している。予備実験で、25及び50 mg/kgで検討を行った結果、対照群と行動量に相違がなかった。そこで、100 mg/kgについて検討したところ、行動量が対照群に比べ増加する傾向にあった。この結果、BZPは行動が亢進される傾向にあることが示された。

### (3) 3CPP

図4に100 mg/kg投与の結果を示している。予備実験で、25及び50 mg/kgで検討を行った結果、対照群と行動量に相違がなかったことから、100 mg/kgについて検討した。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。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。

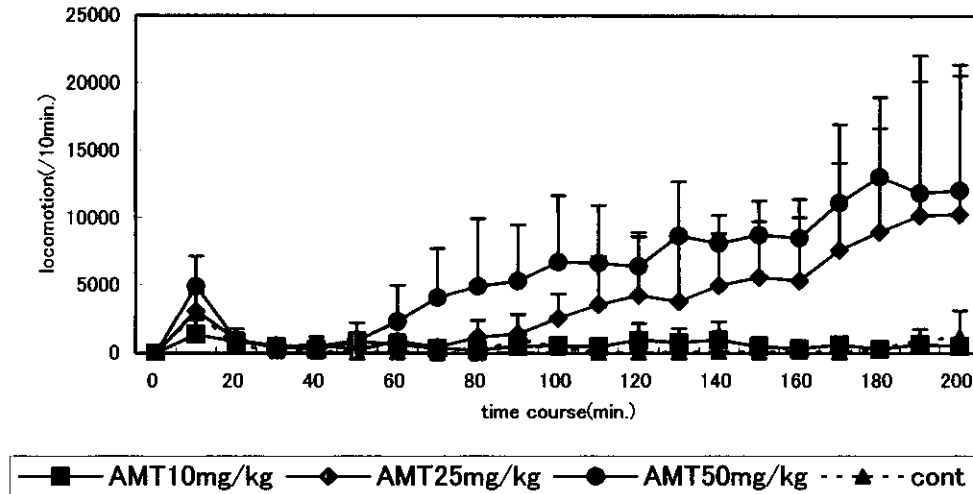


図 2. AMT のマウス行動量に及ぼす影響について

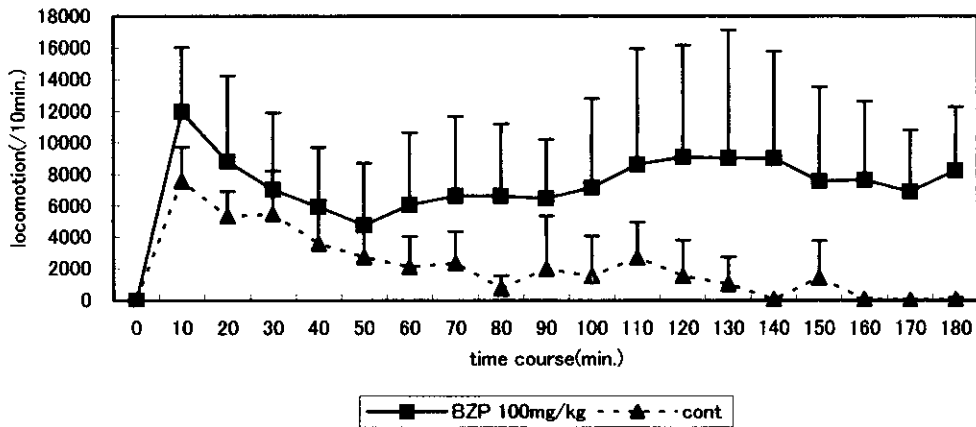


図 3. BZP のマウス行動量に及ぼす影響について

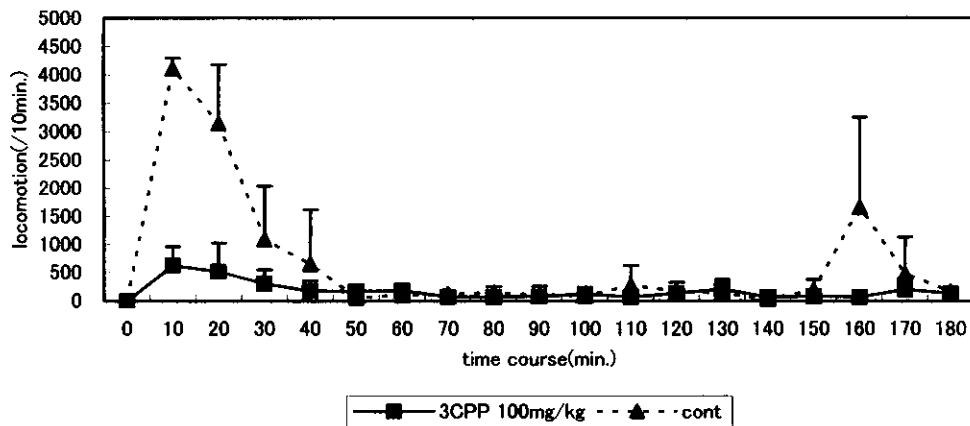


図 4. 3CPP のマウス行動量に及ぼす影響について

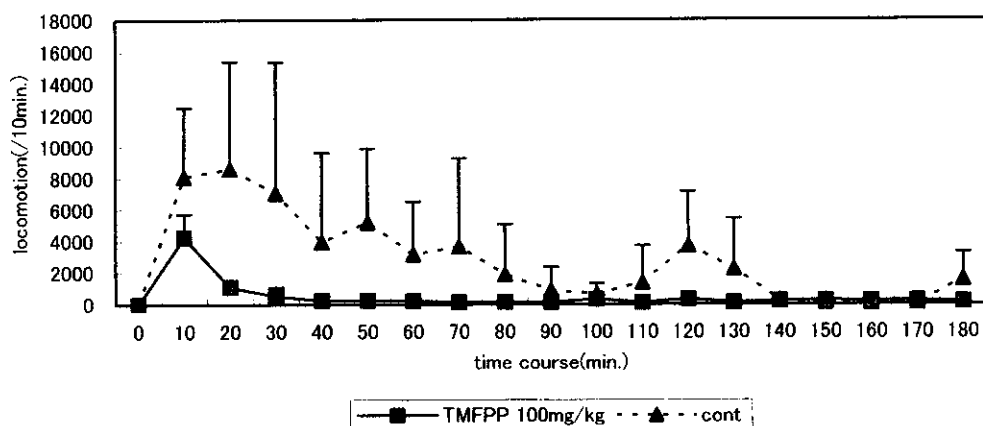


図 5. TMFPP のマウス行動量に及ぼす影響について

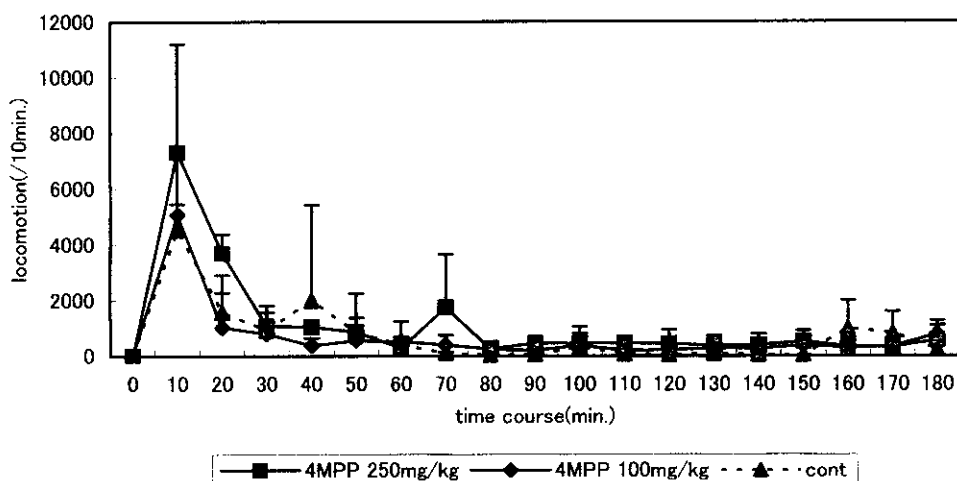


図 6. 4 MPP のマウス行動量に及ぼす影響について

この結果、3CPP は行動抑制作用が認められたことから、中枢抑制作用を有する可能性が示された。

#### (4) TMFPP

図 5 に TMFPP の結果を示している。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。この結果は 3CPP と同様に抑制作用を有することが確認された。

#### (5) 4MPP

4MPP100、250 及び 500 mg/kg の投与結

果を図 6 に示している。(1)から(4)とは異なり、100 mg/kg では行動量に及ぼす作用が観察されなかったことから、高用量を投与した。その結果、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。

#### D. 結論

今回、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。その結果、AMTは中枢亢進作用が強く、生体への影響も強いことが示された。また、ピペリジン系でも有する置換基が異なると中枢作用や毒性値なども異なることが今回の結果から示めされた。

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。

#### E. 参考文献

1. マルチフレネルレンズを組み込んだ赤外線センサーシステムによる自発運動量測定装置の強制水泳試験への応用 杉浦実, 村岡慎一郎, 吉澤豊吉, 渡部要, 村上理, 山口文雄 神経精神薬理 19, 287-291 (1997).
2. Comparison of three psychotropic drugs in volunteer subjects. Hollister LE,

Prusmack JJ, Paulsen JA and Rosenquist N. *J Nerv Mental Dis* 131 428-434 (1960).

#### F. 学会発表

最近の強壯強精を標榜した健康食品に含まれる医薬品成分の傾向について 小島尚、熊坂謙一、土井佳代、佐藤修二、関田節子 日本社会薬学会第21年会(東京, 平成14年11月)

## 研究協力報告書

### 酵素免疫測定法による健康食品に添加された甲状腺ホルモン成分の迅速検出法

研究協力者 三上 栄一 愛知県衛生研究所化学部 主任研究員

研究要旨 平成 14 年には、中国で製造されたいわゆるダイエット用健康食品を個人輸入等の方法により、購入、摂取した消費者の健康被害が報告された。それら健康被害の原因物質の一つと考えられる健康食品中に添加された甲状腺ホルモンのチロキシン(T4)を検出するためには、LC/MS 等の分析機器が必要であるが、高価な機器設備と熟練技術者を必要とする。また分析の前処理として、長時間の酵素分解を要するなどの問題がある。こうした機器分析にともなう諸問題を解決するため、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、主として臨床検査分野で応用されてきた市販の酵素免疫測定法(ELISA)による T4 検査キットを、健康食品に添加された遊離型 T4 の検出へ応用した。本 ELISA による T4 検出スクリーニング法は、LC/MS の分析結果(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って、数時間で T4 検出が可能となり、スクリーニング法としてほぼ良好な結果が得られた。

#### A. 研究目的

平成 14 年 7 月には、中国で製造されたいわゆるダイエット用健康食品を個人輸入等の方法により、購入、摂取した消費者の健康被害が報告された。これら健康食品に添加された甲状腺末中の成分であるトリヨードチロニン(T3)及びチロキシン(T4)などの甲状腺ホルモンは、健康被害の原因物質の一つと考えられている<sup>1)</sup>。健康食品に含まれる T3、T4 を検出するためには、甲状腺組織中のチログロブリン蛋白をプロテアーゼにより酵素分解し、遊離型の T3、T4 とした後、試験を行っている。一般に医薬品製剤における T3、T4 分析では、共存成分の影響が少なく、遊離型 T3、T4 濃度も高いため、HPLC による方法が適用される<sup>2)</sup>。しかし、多種多様な原料からなる健康食品における T3、T4 の分析に、HPLC 法は適用できず、

LC/MS 法のみが報告されている<sup>3)</sup>。LC/MS による分析は精密で微量測定も可能であるが、高価な機器設備と熟練技術者を必要とする。また分析の前処理として、試料を酵素で分解した後液々分配で精製するため、操作に長時間を要するなどの問題がある。こうした機器分析にともなう諸問題を解決するため、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、主として臨床検査分野で応用されてきた市販の酵素免疫測定法(ELISA)による T4 検査キットを、健康食品に添加された T4 遊離型の検出へ応用し、ほぼ良好な結果が得られたので報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 健康食品試料

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

## 2. 試薬、装置及び測定条件

1) 試薬；局方乾燥甲状腺は、帝国臓器製を用いた。0.01M リン酸緩衝生理食塩水(PBS)は和光純薬の組織洗浄用、その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

2) ELISA キット；DRG International 製の血中遊離チロキシン測定用(競合法)を用いた。本キットは、抗体固着マイクロプレート(96 ウェル)、酵素複合体、基質液、反応停止液、洗浄原液から構成されている。

3) 装置；ハンディフォトメーターはセティカンパニー製 MODEL-6 型、またマイクロプレートミキサーはアズワン製 NS-P 型を用いた。ESI-LC/MS はアジレント社製 HP1100LC システム及びマイクロマス社製 Qattro II 質量分析計を用いた。

4) ESI-LC/MS 測定条件；カラム：TSK gel ODS 80TM ( $\phi$ 4.6×150 mm、5 $\mu$ 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

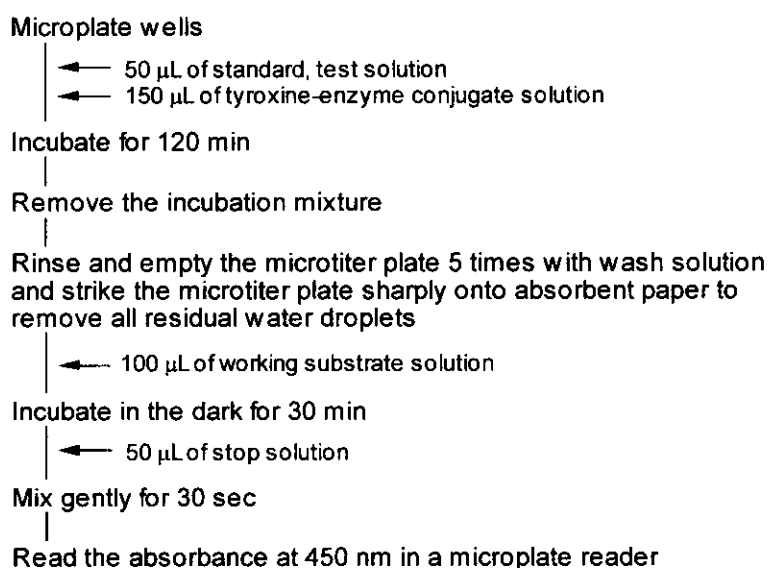
ラム温度：40°C、保持時間：T3(6.5 分)、T4(11.9 分)、スプレー電圧：30kV、コーン電圧：30V、イオン源温度：100°C、デソルベーション温度：250°C、測定イオン：正イオン。

## 3. 分析操作

### 1) ELISA によるスクリーニング

錠剤型は粉碎し、カプセル剤型試料、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 20 mL を加え、20 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 1mL 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 1 mL をとり、0.1 mol/L 塩酸試液 1 mL を加え、PBS で 25 mL とし、ELISA 用標準溶液とした。

これらの試験溶液を Scheme に従って操作し、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。



Scheme Assay procedure for free T4 by ELISA

## 2) ESI-LC/MS による確認

LC/MS用試験溶液の調製は、小坂らの方法に従った<sup>3)</sup>。すなわち、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2 mLに溶解し、試験溶液とした。

## C. 研究結果及び考察

### 1. ELISA による T4 スクリーニング法の検討

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<sup>4)</sup>。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 の検出へ応用した。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、DRG International 社製検査キットのマニュアルに準じ、Scheme に従って操作し試験した。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 2 mg 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。

### 2. ESI-LC/MS による T4 確認法の検討

試料をタンパク質分解酵素で加水分解した後、遊離した T3、T4 を ESI-LC/MS により分析する方法について検討した。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 の測定では、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 の測定では、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。

### 3. 健康食品試料の分析結果

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 (Table 1.)。一方 ELISA において陰性と判定された検体を

Table 1. Analytical results for T4 in commercial dietary supplements

Dietary supplement	ELISA	LC/MS
1. Capsule type	+	+
2. Capsule type	+	+
3. Capsule type	+	+
4. Capsule type	+	+
5. Capsule type	—	nd
6. Capsule type	—	nd
7. Tablet type	—	nd
8. Tablet type	—	nd
9. Tablet type	—	nd
10. Tablet type	—	nd
11. Tea bag type	—	nd
12. Tea bag type	—	nd
13. Tea bag type	—	nd

+: positive, —: negative, nd: not detected.

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

本 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って、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たり、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. 参考文献

1. 厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課長通知“甲状腺末を含有する痩身用健康食品の監視指導について”平成 13 年 6 月 20 日、医薬監麻第 785 号(2001)。
2. “The United States Pharmacopeia” 24th, United States pharmacopeial Convention Inc., 2000, p.1655-1656.
3. 小坂妙子、浜田洋彦、食品衛生学雑誌、43、225-229 (2002)。
4. 井村裕夫ほか編“最新内科学大系 13 甲状腺疾患”中山書店、1993、p.41-44.

#### F. 関連研究発表

1. 学会発表
  - 1) 三上栄一、大野 勉、松本 浩、いわゆる「健康食品」に添加された医薬品成分(シルデナフィル、フェントラミン)の同時検出事例、日本社会薬学会第 21 年会(八王子、2002 年 11 月)要旨集 p.74.
  - 2) 三上栄一、「中国製ダイエット食品」問題における衛生研究所の対応、第 16 回公衆衛生情報研究協議会研究会(横浜、2003 年 1 月)抄録集 p.16-17.
  - 3) 三上栄一、大野 勉、松本 浩、関田節子、ELISA による「健康食品」中に添加された甲状腺ホルモン成分の迅速検出法、日本薬学会第 123 年会(長崎、2003 年 3 月)要旨集-3 p.215.
2. 誌上発表
  - 1) HPLC を用いた 4 種の汎用利尿薬の同時分析法の開発とその痩身効果を標榜



した健康食品分析への応用、後藤智美、三上栄一、大野 勉、松本 浩、食品衛生学雑誌、**43**、95-98(2002).

2) 三上栄一、大野 勉、松本 浩、関田節子、滋養強壮効果を標ぼうする飲料に添加されたフェントラミンの分析、医薬品研究、**33**、477-482(2002).

3) E.Mikami、 T.Ohno、 H.Matsumoto、 Simultaneous identification/determination system for phentolamine and sildenafil as adulterants in soft drinks advertising roborant nutrition、 *Forensic Sci. Int.*、 **130**、 140-146 (2002).

## 分担研究報告書

### 幻覚性キノコの DNA 解析等による鑑定法確立に関する研究

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

研究要旨 幻覚性キノコの高感度検知法として、DNA による鑑定法及び、ELISA 法の構築をおこなった。前者では、マジックマッシュルーム標品の rRNA 遺伝子 (internal transcribed spacer 1、ITS 1； large subunit、LSU) の塩基配列解析を行い、その結果を基に日本国内に流通するマジックマッシュルームの基原種の分類を行った。その結果、国内市場品は MM-1~MM-6 の 6 種類であり、その内の 2 種 (MM-1、2) が検体の約 9 割を占めていることが明らかになった。マジックマッシュルーム及び食用キノコの LSU の配列を比較したところ、マジックマッシュルームに特異的な領域が見出されたため、この領域を利用した TaqMan PCR による鑑定法の構築が可能となった。後者では、幻覚成分サイロシンをモチーフとしたハプテンを合成、合成したハプテンをキャリアタンパク質に結合させて免疫源とし、ウサギ及びマウスに免疫を行い、血清中のサイロシンに対する抗体価の上昇について検討を行った。

#### 研究協力者

代田 修 国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部 主任研究官

丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所  
研究員

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法  
および高速液体クロマトグラフ/質量分  
析(LC/MS)法で確認する方法が一般的で、  
法的には、サイロシン、サイロシピンが  
検出されると麻薬原料植物として取り  
扱われる。しかし裁判化学的には、化学  
的な同定だけでなく複数の検出方法で、  
マジックマッシュルームを確認するこ  
とが望ましい。本研究では、このような  
背景を鑑み、幻覚性キノコの DNA 解析  
を行い、DNA による鑑定法の構築を行っ  
た。さらに、サイロシン類を極微量で簡  
便に検出可能とする ELISA (enzyme-  
linked immunosorbent assay)の開発のため、  
サイロシンをモチーフとしたハプテン  
を合成し、ウサギ及びマウスに対する免  
疫を検討した。

#### A. 研究目的

幻覚性キノコ、いわゆるマジックマッシュルームの同定には、通常、植物形態学的手法が用いられるが、これらのキノコ類は、*Psilocybe* 属、*Panaeolus* 属を中心に 50 種以上が知られており、その分類には、高い専門性が要求される。さらに、マジックマッシュルームは、市場において粉末やカプセル剤として流通する場合も多いため、形態学的手法では同定が困難な場合がある。他方、化学的同定法としては、シロシン類を、ガスクロマトグラフ/質量分析(GC/MS)法または

#### B. 研究方法

## 1. 幻覚性キノコの DNA 解析による鑑定法確立

マジックマッシュルーム試料として平成 13 年度に国内 13 都道府県の店舗及び通信販売により購入された 42 検体(基原種未知)、日本国内で採集された自生品 5 検体 (*Panaeolus sphinctrinus* (J1)、*Pa. subbalteatus* (J2)、*Psilocybe argentipes* (J3)、*Ps. fasciata* (J4)、*Ps. subaeruginascens* (J5))、オランダの市場で購入された 2 検体 (*Ps. subcubensis* (N1)、*Ps. tampanensis* (N2)) を用いた。また、食用キノコの試料としてエノキ、エリンギ、シイタケ、ナメコ、ブナシメジ、マイタケの国内栽培品を用いた。

## 2. 幻覚性キノコの ELISA 法による検出法開発

ハプテンとして、リン酸基を持たないシロシンを念頭に置き、4 位フェノール性水酸基に 4 炭素長のスペーサーをエーテル結合させ、スペーサーを活性化カルボン酸エステル体を介しキャリアタンパク質と結合させることにした。

免疫するウサギは日本白色種を、マウスは BALB/C 系統を用いた。血清の抗体価は、シロシンハプテンを OVA に結合させたものを固相抗原として用い、二次抗体には horseradish peroxidase(HRP)が結合した抗マウス及びウサギ IgG 抗体を、その酵素基質として過酸化水素水、呈色反応試薬として ABTS {2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt} を用い、414 nm にて吸光度を測定する系により求めた。

## C. 研究結果

### 1. 幻覚性キノコの DNA 解析による鑑定法確立

国内市場品で入手した 42 検体の ITS 及び LSU の塩基配列は、6 種類 (MM-1~MM-6) に分類された。それぞれの長さは、ITS が約 280-310 bp、LSU が 970-978 bp であった。標品及びデータベースの配列との比較から MM-1~MM-4 の基原種は、それぞれ、*Psilocybe cubensis* (Ear.) Singer、*Panaeolus cyanescens* (Berk. et Br.) Sacc.、*Psilocybe semilanceata* (Fr. ex Sec.) Kummer、*Psilocybe tampanensis* Guzman et Pollock、と推定され、MM-5,6 は相同性検索の結果からテングタケ (*Amanita pantherina*)、ベニテングタケ (*A. muscaria*) など、*Amanita* 属のキノコであると考えられた。またこれらのキノコの内、2 種 (MM-1、2) が検体の約 9 割を占めていることが明らかになった。

今回の LSU 配列の解析結果に、データベース中の *Psilocybe* 属及び *Panaeolus* 属の配列を加え、分子系統樹を作成したところ、見出された 3 つの属はそれぞれ個々のクラスターに分類され、これまでの形態学的な分類の結果をよく反映していた。また、*Psilocybe* 属のクラスターはさらに 2 つに分れ、その分岐パターンは、既に Moncalvo ら (J. M. Moncalvo et al., *Mol. Phylogenet. Evol.*, **23**, 357-400 (2002).) が指摘しているように幻覚性の有無を区別するものであった。次に、マジックマッシュルーム及び食用キノコ類の ITS 1 及び LSU の配列解析結果を比較したところ、LSU の配列においてマジックマッシュルームに特異的な配列が見出された。そこで、新たにプローブを設計し、TaqMan PCR 法による簡易鑑定法を構築した。現在、各キノコ類に本試験法を適用し、至適条件及び適用範囲を検討中である。

## 2. 幻覚性キノコの ELISA 法による検出法開発

トシル基を脱離基とし、無水ジメチルスルホオキシド中にて水素化ナトリムを用いて反応させることで、スパーサー部分が導入できることを見出した。さらにエチルエステルとして保護されたカルボキシル基を水酸化リチウムにて脱保護することにより、目的とするサイロシンハプテンを高収率で得た。次に、DMF 中にて *N*-hydroxysuccinimide および EDC によりサイロシンハプテンを活性化エステルとした後、BSA および OVA をそれぞれ加えて 4°C にて一日攪拌した。HPLC 分析により、BSA または OVA とは異なる新たなピークを反応液に見出すことができたため、目的とするサイロシン-タンパク質結合体が生成したものと判断した。本反応液を 10% MeOH-PBS、PBS、および脱イオン水 2 回にて透析を行い、凍結乾燥することにより目的物を白色粉末として得た。次に、本ハプテンをキャリアタンパク質に結合させ、免疫実験を行った。その結果、免疫の回数により抗体価が上がることを確認されたが、サイロシンとの競合的阻害実験では、弱い競合阻害しか観察されなかった。従って、本免疫源により誘起された抗体は、サイロシンそれ自身を認識するものではないものと考えられた。

## D. 考察

### 1. 幻覚性キノコの DNA 解析による鑑定法確立

本研究の結果、日本国内に流通するマジックマッシュルームの基原種は比較的少数に限られていることが判明した。さらに、同一種内で rRNA 遺伝子塩基配

列のバラつきが小さいことが明らかになった。したがって、本遺伝子の配列を利用した TaqMan PCR 法による鑑定法の構築が可能となった。今後、確立された鑑定法を用いた場合、サイロシン、サイロシビンの未検出種において、擬陽性となる種の確認が必要と考えられる。

## 2. 幻覚性キノコの ELISA 法による検出法開発

今回設計したサイロシンのハプテンは、空気酸化に不安定であるサイロシンの構造を安定なものとした点で、優れたものと考えられる。他方、作成した抗体は、残念ながらサイロシンを特異的に認識するものではなかった。今後、現状のウサギ抗血清から抗サイロシンポリクローナル抗体の精製、およびマウス脾臓の細胞融合による抗サイロシンモノクローナル抗体生産株のクローニングを行い、ハイブリドーマを確立すると共に、さらに新たなハプテンの設計を行い、再度免疫を行う予定でいる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) T. Maruyama, O. Shiota, N. Kawahara, K. Yokoyama, Y. Makino, Y. Goda, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **44**, 44-48 (2003).
- 2) T. Maruyama, K. Yokoyama, Y. Makino, Y. Goda, *Chem. Pharm. Bull.*, in press.
- 3) O. Shiota, W. Hakamata, Y. Goda, Concise large scale synthesis of psilocin and psilocybin : Principal hallucinogenic constituents of "Magic Mushroom". *J. Nat. Prod.* in press.

### 2. 学会発表等

- 1) 丸山卓郎、代田修、合田幸広、横山和

- 正、牧野由紀子、ITS 遺伝子の塩基配列解析による幻覚性キノコ (いわゆるマジックマッシュルーム) の基原種の分類、日本食品衛生学会第 84 回学術講演会、2002 年 11 月、大阪.
- 2) 丸山卓郎、合田幸広、横山和正、牧野由紀子、TaqMan PCR 法を用いた幻覚性キノコの鑑定、日本薬学会第 123 年会、2003 年 3 月、長崎.
  - 3) 合田幸広、脱法ドラッグに関する最近の話題、九州大学大学院薬学研究院特別講演会、2003 年 1 月.
  - 4) 代田 修、袴田 航、牧野由紀子、合田幸広、サイロシンおよびサイロシビンの簡易大量合成、日本薬学会第 123 年会、2003 年 3 月、長崎.

## 分担研究報告書

### 幻覚性キノコ(いわゆるマジックマッシュルーム)の高感度検知法の開発

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長  
研究協力者 丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

研究要旨 幻覚性キノコの DNA による鑑定法を構築するため、まず、マジックマッシュルーム標品の rRNA 遺伝子(internal transcribed spacer 1、ITS 1; large subunit、LSU)の塩基配列解析を行い、その結果を基に日本国内に流通するマジックマッシュルームの基原種の分類を行った。その結果、国内市場品は MM-1~MM-6 の 6 種類であり、その内の 2 種(MM-1、2)が検体の約 9 割を占めていることが明らかになった。マジックマッシュルーム及び食用キノコの LSU の配列を比較したところ、マジックマッシュルームに特異的な領域が見出されたため、現在、この領域を利用した TaqMan PCR による鑑定法の構築を進めている。

#### A. 研究目的

幻覚性キノコ、いわゆるマジックマッシュルームは、「麻薬及び向精神薬取締法」により麻薬成分に指定されているサイロシン、サイロシピンを含有するキノコ類である。近年、これらのキノコ類が脱法ドラッグとして市場に流通し中毒事故が発生したことから、厚生労働省では、平成 14 年 6 月より上記の成分を含有するキノコ類を「麻薬、向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令の一部を改正する政令」により麻薬原料植物として規制することとした。しかし、上記のキノコ類には、*Psilocybe* 属、*Panaeolus* 属を中心に、50 種以上が知られており、この種類の多さに加え、マジックマッシュルームは、市場において粉末やカプセル剤として流通する場合も多いため、形態学的手法では同定が困難な場合がある。そこで本研究では、DNA の塩基配列の違いを利用したマジックマッシュルームの鑑定法の開発を目的とした。

#### B. 研究方法

マジックマッシュルーム試料として平成 13 年度に国内 13 都道府県の店舗及び通信販売により購入された 42 検体(基原種未知)、日本国内で採集された自生品 5 検体 (*Panaeolus sphinctrinus* (J1)、*Pa. subbalteatus* (J2)、*Psilocybe argentipes* (J3)、*Ps. fasciata* (J4)、*Ps. subaeruginascens* (J5))、オランダの市場で購入された 2 検体 (*Ps. subcubensis* (N1)、*Ps. tampanensis* (N2)) を用いた。また、食用キノコの試料としてエノキ、エリンギ、シイタケ、ナメコ、ブナシメジ、マイタケの国内栽培品を用いた。

乾燥試料約 50 mg より genomic DNA を抽出し、rRNA 遺伝子の内部転写スペーサー領域(internal transcribed spacer 1; ITS 1)の全長配列及び大サブユニット(large subunit; LSU)の部分配列を PCR にて増幅し、塩基配列解析を行った。解析結果を、データベース (DDBJ, EMBL, GenBank) 中の他の *Psilocybe* 属及び

*Panaeolus* 属のものと比較することにより、国内に流通するマジックマッシュルームの基原種の推定を行うとともに、DNA の塩基配列を用いたマジックマッシュルームの鑑定を行うために利用可能な領域を探索した。

### C. 研究結果及び考察

国内市場品 42 検体の ITS 及び LSU の塩基配列は、6 種類 (MM-1~MM-6) に分類された。それぞれの長さは、ITS が約 280-310 bp、LSU が 970-978 bp であった。標品及びデータベースの配列との比較から推定された MM-1~MM-6 の基原種とその検体数は Table 1 に示すとおりだった。MM-1 については、*Ps. cubensis*、*Ps. subcubensis* の ITS、LSU の配列が全く同じであったため、どちらであるかを特定することは出来なかった。しかし、MM-1 及び MM-2 が検体数の 9 割近くを占めている点、*Ps. cubensis* 及び *Pa. cyanescens* には栽培キットが存在する点を考慮すると MM-1 の多くは *Ps. cubensis* であると思われる。これについては、現在、横山和正滋賀大学教育学部教授が形態学的な同定を行っている最中である。MM-5、MM-6 は、相同性検索の結果からテングタケ (*Amanita pantherina*)、ベニ

テングタケ (*A. muscaria*) など、*Amanita* 属のキノコであると考えられたが、今回の結果からはそれ以上特定することが出来なかった。上記のキノコは、サイロシン類とは異なる幻覚物質、イボテン酸を含むことが知られていること、また日本国内には同属種で、猛毒のアマニチンを含むものが自生していることから、これらについては、今後、注意が必要である。また、流通品中の種内変異は、MM-2 における 1 検体のみであった。一方、Lee らの報告 (J. C. Lee et al., *Forensic Sci. Int.*, **112**, 123-133 (2000).) では、*Ps. semilanceata*、*Pa. subbalteatus* などの ITS 1 領域の塩基配列に多くの種内変異が認められている。このことを考えると、今回の結果は日本国内に流通するマジックマッシュルームの供給源が限られた数であることを示唆している。その他、西日本 (近畿以西) で購入されたマジックマッシュルームの 8 割 (8/10) が、MM-2 であったことを付記しておく。今回の LSU 配列の解析結果に、データベース中の *Psilocybe* 属及び *Panaeolus* 属の配列を加え、分子系統樹を作成したところ Fig.1 に示すような結果が得られた。今回見出された 3 つの属はそれぞれ個々のクラスターに分類され、

Table 1. Classification of magic mushrooms obtained in Japanese market by size and DNA sequencing data of PCR product and their name of species elucidated

Group	Number of samples (n)	Species
MM-1	22	<i>Psilocybe cubensis</i> or <i>Ps. subcubensis</i>
MM-2	15	<i>Panaeolus cyanescens</i>
MM-3	2	<i>Ps. semilanceata</i>
MM-4	1	<i>Ps. tampanensis</i>
MM-5	1	<i>Amanita</i> sp.-1
MM-6	1	<i>Amanita</i> sp.-2

これまでの形態学的な分類の結果をよく反映していた。また、*Psilocybe* 属のクラスターはさらに2つに分れ、その分岐パターンは、既に Moncalvo ら (J. M. Moncalvo et al., *Mol. Phylogenet. Evol.*, **23**, 357-400 (2002).) が指摘しているように幻覚性の有無を区別するものであった。

マジックマッシュルーム及び食用キノコ類の ITS 1 及び LSU の配列解析結果を比較したところ、LSU の配列においてマジックマッシュルームに特異的な配列が見出された (Fig. 2)。そこで、図に示した各位置にプローブを設計し、TaqMan PCR

法による鑑定法を構築した。現在、各キノコ類に本試験法を適用し、至適条件及び適用範囲を調べている。

#### D. 結論

日本国内に流通するマジックマッシュルームの基原種は比較的少数に限られており、また、その rRNA 遺伝子の塩基配列は種内でのバラつきも小さいため、本遺伝子の配列を利用した簡易鑑定法の構築が可能であると考えられる。しかし、今回の調査に用いた市場品は、いずれも法規制前に購入されたものであり、その後

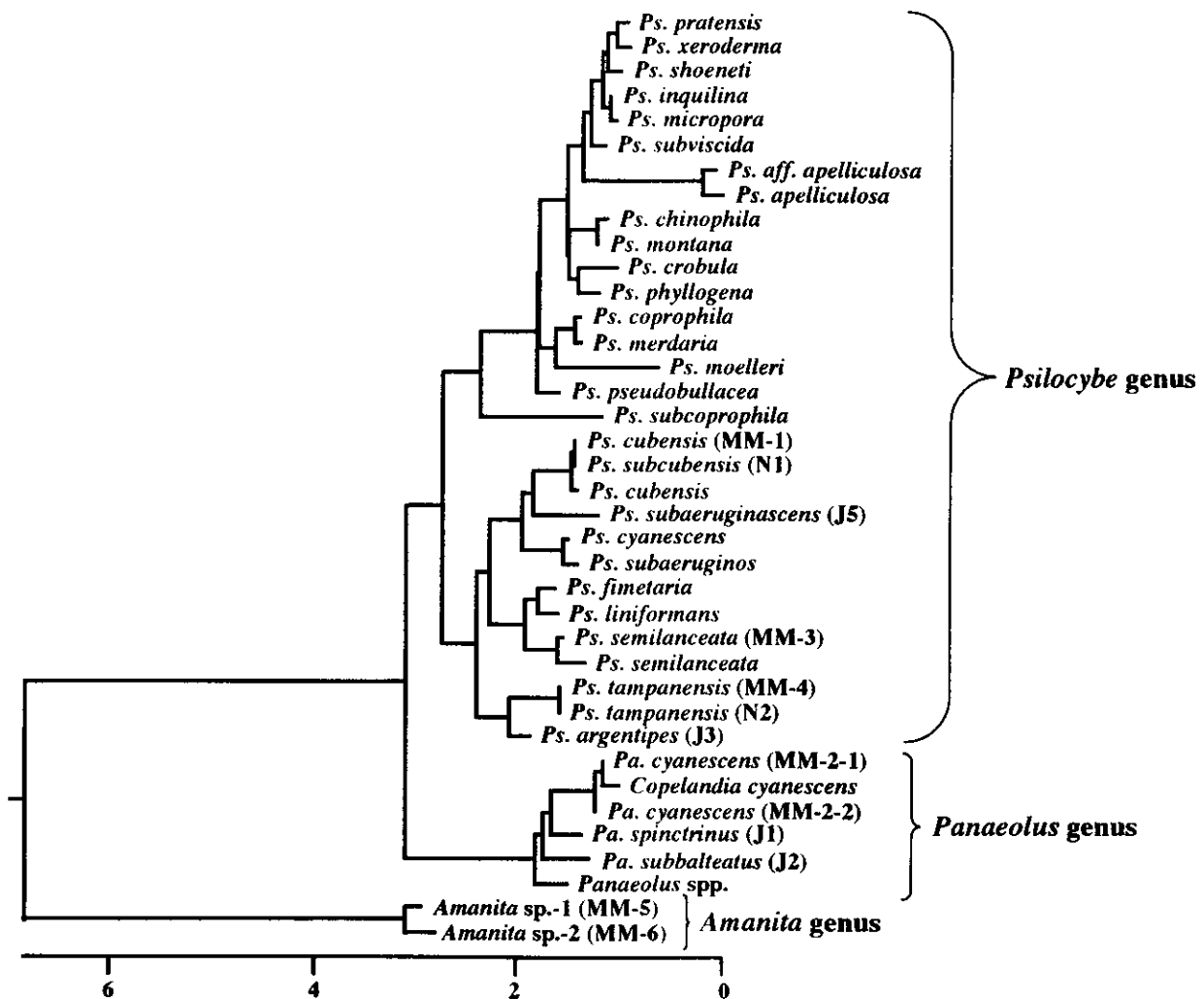


Fig. 1 Phylogenetic tree constructed from the nucleotide sequences of the rRNA large subunit genes of several magic mushrooms



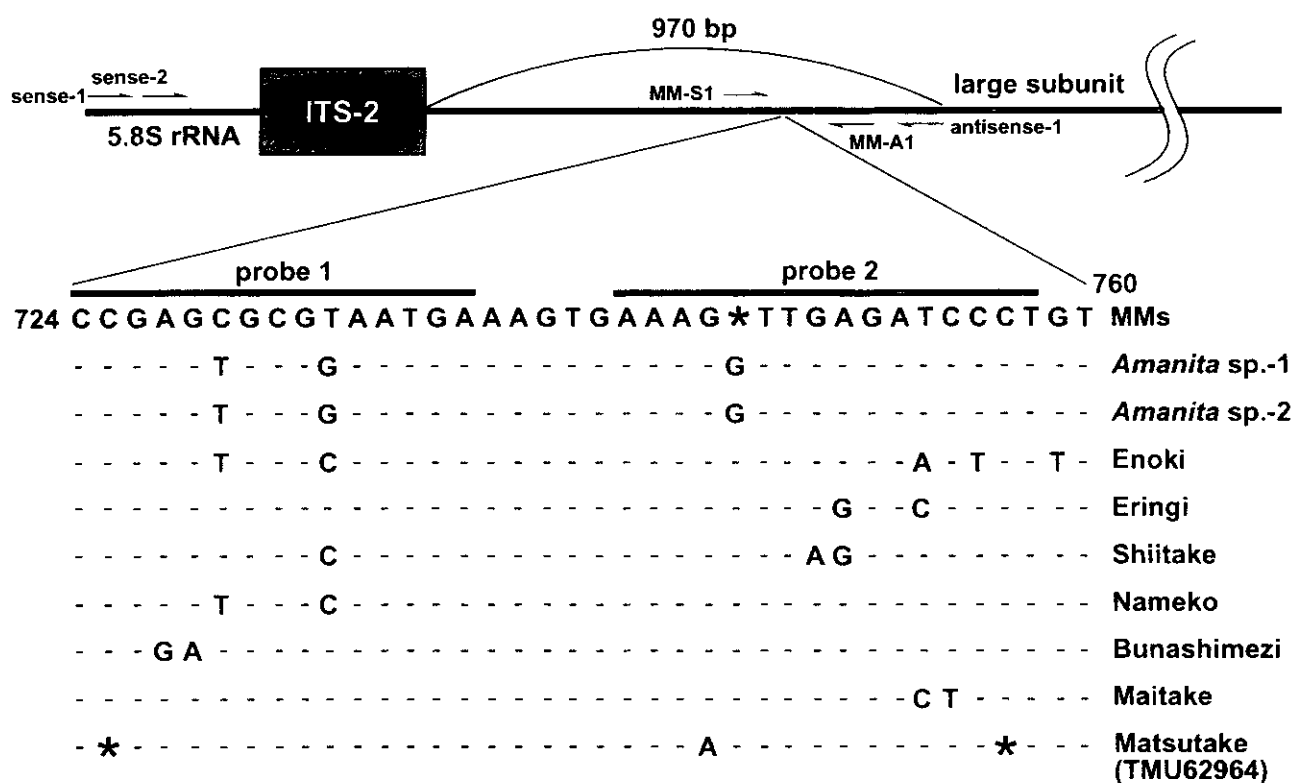


Fig. 2 Nucleotide sequences of the LSU region amplified from several fungi

Number is the nucleotide position in *Psilocybe cubensis*. A hyphen '-' and '\*' indicate the same nucleotide as MMs and a gap, respectively.

の状況の変化に注意する必要があるものと思われる。

#### E. 危険情報

今回の調査において流通が明らかになった *Amanita* 属キノコの中には、ドクツルタケ等、致死率の高いものも存在し、これらが誤って流通した場合、死亡事故の起る可能性が高い。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) T.Maruyama, O.Shirota, N.Kawahara, K.Yokoyama, Y. Makino, Y. Goda, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **44**, 44-48 (2003).
- 2) T. Maruyama, K.Yokoyama, Y.Makino, Y.

Goda, *Chem. Pharm. Bull.*, **51** 710(2003).

##### 2. 学会発表等

- 1) 丸山卓郎、代田修、合田幸広、横山和正、牧野由紀子、ITS 遺伝子の塩基配列解析による幻覚性キノコ (いわゆるマジックマッシュルーム) の基原種の分類、日本食品衛生学会第 84 回学術講演会、2002 年 11 月、大阪。
- 2) 丸山卓郎、合田幸広、横山和正、牧野由紀子、TaqMan PCR 法を用いた幻覚性キノコの鑑定、日本薬学会第 123 年会、2003 年 3 月、長崎。
- 3) 合田幸広、脱法ドラッグに関する最近の話題、九州大学大学院薬学研究院特別講演会、2003 年 1 月。

## 研究協力報告書

### 幻覚性キノコ(いわゆるマジックマッシュルーム)の高感度検知法の開発 サイロシビン類を検出する ELISA の開発

研究協力者 代田 修 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨 幻覚性キノコ(マジックマッシュルーム)に含有される幻覚性成分であるサイロシビン類を極微量で検出可能とする ELISA の開発を目指して、サイロシンをモチーフとしたハプテンを合成した。合成したハプテンをキャリアタンパク質に結合させて免疫源とし、ウサギ及びマウスに免疫を行い、血清中のサイロシンに対する抗体価の上昇について検討を行った。

#### A. 研究目的

いわゆるマジックマッシュルームと呼ばれる幻覚性キノコは、南米などではシャーマンが啓示を得る目的で使用し、かつてのマヤ・アステカ文明では神聖な宗教儀礼に用いられていた。他方、日本では「笑い草」として知られていた。マジックマッシュルームには「麻薬及び向精神薬取締法」により麻薬成分に指定されているサイロシンおよびサイロシビンが含まれており、近年、この幻覚性キノコの乱用が社会問題化したこともあり、平成14年6月6日より、サイロシン又はサイロシビンを含むキノコ類は、麻薬原料植物として規制された。

マジックマッシュルームの同定には、通常、植物学的手法が用いられるが、高い専門性が必要となる。化学的同定法としては、サイロシビン類を、ガスクロマトグラフ/質量分析 (GC/MS) 法または高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法および高速液体クロマトグラフ/質量分析 (LC-MS) 法で確認する方法が一般的である。しかし、幻覚性キノコの押収現場においてサイロシビン類含有の有無を

確認するには、免疫化学的手法を用いた簡便な検査方法の導入が最適であると思われる。そこで本研究では、サイロシビン類を極微量で検出可能とする ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) の開発を目指し、サイロシンをモチーフとしたハプテンを合成し、ウサギ及びマウスに対する免疫を検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. サイロシンをモチーフとしたハプテンの合成およびタンパク質複合体の調製計画

一般的に低分子化合物はそのままでは免疫反応を誘起することは難しい。サイロシビン類を認識する抗体を得るためには、サイロシビン類をモチーフとしたハプテン-タンパク質複合体を調製する必要がある。サイロシビンは生体内において脱リン酸化されてサイロシンとなる。そこでハプテンとしてははじめからリン酸基を持たないサイロシンを念頭に置いた。

ハプテンは適切なスペーサーを持って BSA などのキャリアタンパク質に結

合した構造でなければならない。スペーサーの長さは、一般的と考えられた4炭素長のものを用いることにした。また、スペーサーを介してキャリアタンパク質に結合させる部位としては、サイロシンの側鎖上のアミン、インドール骨格上の窒素、および4位フェノール性水酸基が考えられるが、化合物の安定性を考慮して、4位フェノール性水酸基にエーテル結合させることとした。さらに、キャリアタンパク質との結合方法は、活性化カルボン酸エステル体、アルデヒド体、アミン-グルタルアルデヒド体を用いることなどが考えられるが、今回はタンパク質との反応性を考慮し、活性化カルボン酸エステル体を介した結合による調製を試みることにした。

## 2. ウサギ、マウスへの免疫および抗体価の測定

免疫するウサギは日本白色種を、マウスは BALB/C 系統を用いた。免疫源の PBS 溶液 (3 mg/mL) とその 2 倍量の Freund's Complete Adjuvant とをソニケーターを用いて乳化させたものを免疫原とした。免疫は3週間おきに行い、ウサギには免疫原 0.5 mL を皮下数カ所に分け

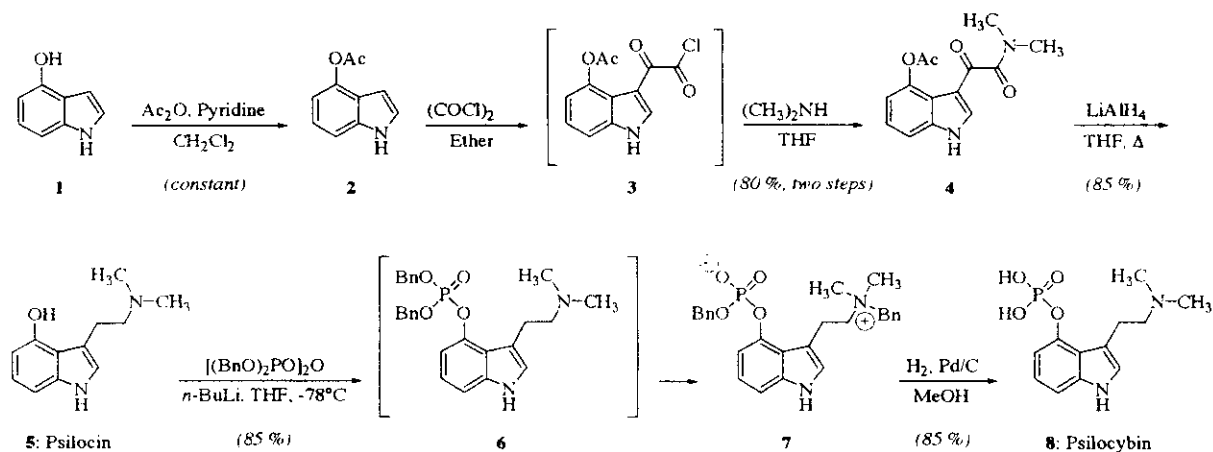
て投与、マウスには 0.05 mL を足蹠に投与した。採血は、ウサギの場合には免疫前と2回目以降の各免疫の一週間後に外縁耳静脈より、マウスは2回目以降の各免疫の一週間後に眼窩より行った。得られた血液を1時間室温にて放置した後、遠心により血清を分離した。また、血清の抗体価は、サイロシンハプテンを OVA に結合させたものを固相抗原として用い、二次抗体には horseradish peroxidase (HPR) が結合した抗マウス及びウサギ IgG 抗体を、その酵素基質として過酸化水素水、呈色反応試薬として ABTS {2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt} を用い、414 nm にて吸光度を測定する系により求めた。

## C. 研究結果

### 1. サイロシンハプテンの合成およびタンパク質結合体の調製

既に、サイロシンおよびサイロシビンの、クロマトグラフィーによる精製を必要としない簡易大量合成法を既に確立している<sup>1)</sup> (Scheme 1)。この合成サイロシン (5) を用いてサイロシンハプテン (10) へと導くことにした (Scheme 2)。

Scheme 1. Synthesis of Psilocin and Psilocybin



Scheme 2. Synthesis of Psilocin Hapten

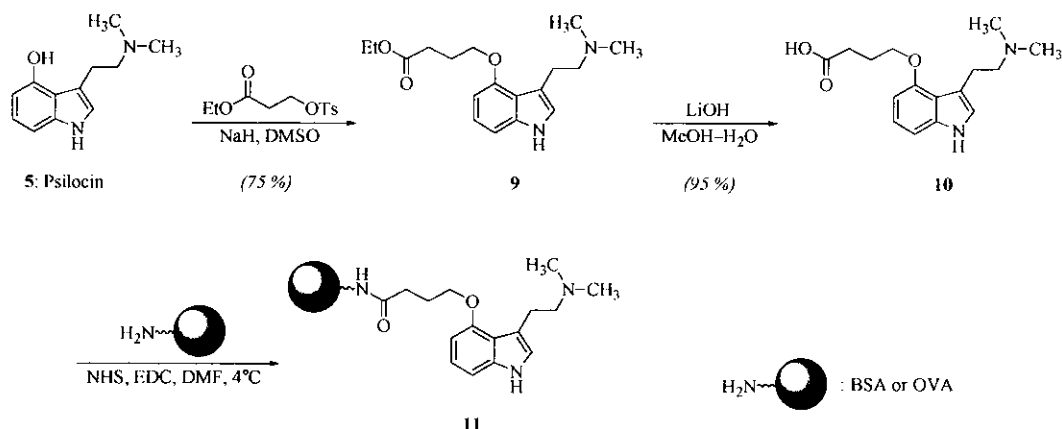
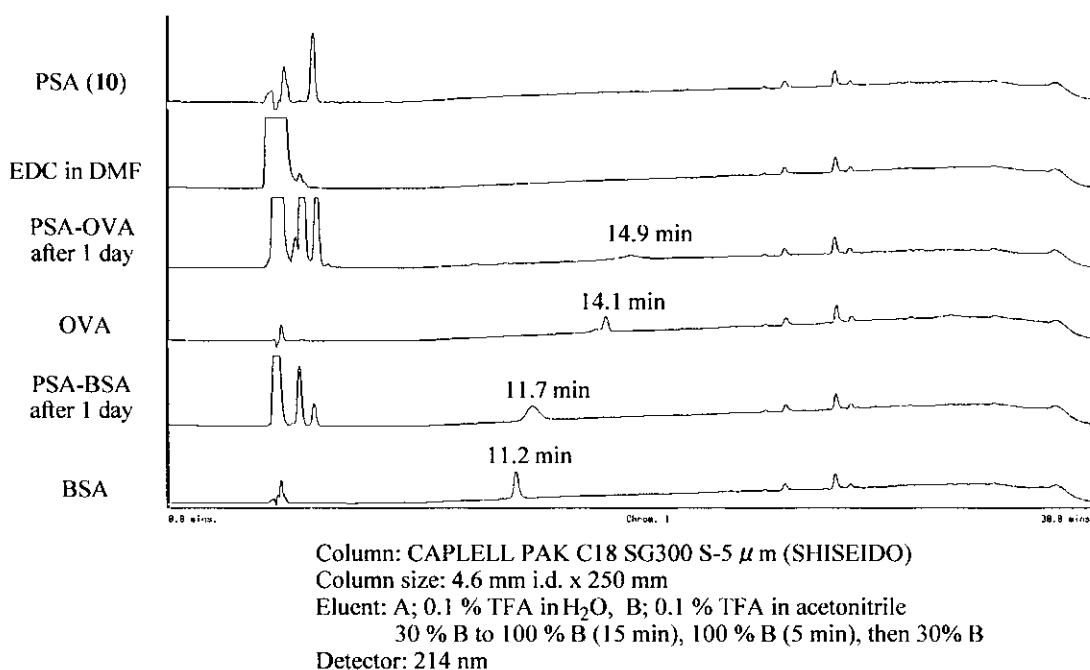


Chart 1. HPLC profile of PSA-BSA, PSA-OVA conjugate reaction mixture



まず、サイロシンの4位フェノール性水酸基にスペーサー部分をエーテル結合させるために種々反応条件を検討した結果、トシル基を脱離基とし、無水ジメチルスルホオキシド中にて水素化ナトリウムを用いて反応させることで、スペーサー部分が導入できることを見出した。そして、エチルエステルとして保護されたカルボキシル基を水酸化リチウムにて脱保護することにより、目的とするサイロシンハ

プテン(10)を得た。この2段階での収率は満足いくものであった。次に、このハプテン(10)をキャリアタンパク質に結合させるべく、DMF中にて *N*-hydroxy-succinimide および EDC により 10 を活性化エステルとした後、BSA および OVA をそれぞれ加えて 4°C にて一日攪拌した。HPLC 分析により、BSA または OVA とは異なる新たなピークを反応液に見出すことができたため、目的とするサイロシ