

インの LAIRT 法を開発し、さらにこれを定量化し、スクリーニング法としての有用性を検討した。

B. 方法

1. 試薬

牛血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA)、ウサギ血清アルブミン (rabbit serum albumin: RSA) および 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) は Sigma 社より購入した。Sephadex G-200 および Sephadex G-25 は Amersham Pharmacia Biotech 社より購入した。ラテックス粒子 [carboxylated polystyrene microparticle 青色(直径 0.550 μm)]、磁性粒子(直径 1-2 μm)は Polysciences 社より購入した。Benzoylcongonine (BE)抗体はモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体とも Biogenesis 社より購入した。

BE はコカインの加水分解により合成した。コカインは大日本製薬より購入した。

2. ELISA 法¹⁾

2-1. 固相抗体およびアルカリファスファターゼ標識体の調製

抗体溶液(モノクローナル抗体 10 mg/ml 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6、ポリクローナル抗体 10 mg/ml 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6)を 100 μL をマイクロタイタープレートのウェル内に加え、4°C で一夜放置することにより吸着させた。ウェルは 0.05% phosphate buffer pH 8.0 (以下 buffer A とする)で洗浄後、0.1% BSA 水溶液を加え 4°C で保存した。

アルカリフォスファターゼ(ALP)と BE の結合は 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide を用いて行い、ゲル

濾過により高 ALP 活性部を保存した。

2-2. ELISA 法

ウェル(固相抗体)は buffer A で 3 回洗浄を行った。ウェルにコカイン標準溶液 50 μL (0, 0.16, 0.8, 4, 20, 100, 500 ng/mL) と希釈 ALP 標識体($\times 250$)50 μL を加え(コカイン最終濃度は 0, 0.08, 0.4, 2, 10, 50, 250 ng/mL になる)、室温で 1 時間攪拌後、buffer A で 2 回、0.1%ゼラチン水溶液で 1 回ウェル内を洗浄後、100 μL の基質液(10 mM p-ニトロフェノールリン酸)を加えて室温で 1 時間反応させた。ついで 25 μL の反応停止液(1 M NaOH)を加えた後、405 nm で測定した。

3. ハプテン-タンパク質結合体の調製

BE は RSA とグルタルアルデヒド法³⁾により結合させた。ハプテン-タンパク質結合体は透析後に Sephadex G-25 を用いたゲルクロマトグラフィーにより精製した。RSA 結合体 (BE-RSA)は抗原としてラテックス抗原試薬の調製に用いた。

4. ラテックス試薬の調製³⁾

BE-RSA と青色ラテックス粒子、抗 BE 抗体とラテックス磁性粒子の結合体の調製は Polysciences 社のプロトコールに従い、ECD を用いるカルボジイミド法によりラテックス粒子上のカルボキシル基と抗原または抗体のアミノ基を結合させた。

ラテックス粒子懸濁液は 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) で 2 回遠心洗浄 (15000 rpm, 10 min) し、更に 0.02 M phosphate buffer (pH 4.5) で 3 回遠心洗浄した。次にラテックス粒子は 1% EDC を含む 0.02 M phosphate buffer (pH 4.5) 1.25 ml に懸濁させてイムノローテーターを用いて室温で 3 時間攪拌した。反応後ラテックス粒子は遠心し、0.2 M borate buffer (pH 8.5) を用いて 3 回遠心洗浄し

た。青色ラテックス粒子は抗原 (BE-RSA 1000 mg 蛋白) と、また磁性ラテックス粒子は抗体 (IgG 抗体, 1000 mg 蛋白) を含む 1.2 ml の 0.2 M borate buffer (pH 8.5) に懸濁させて一夜撹拌した。反応液に 0.25 mol/L ethanolamine 50 mL を加えて 30 分反応させることにより活性部位をブロックし、更に 1%BSA を含む 0.2 M borate buffer (pH 8.5) 1 ml に懸濁して 30 分撹拌することにより、非特異的タンパク結合部位をブロックした。抗原又は抗体結合ラテックス粒子は 0.5 ml の保存液に懸濁させて使用時まで 4°C で保存した。

5. LAIRT 法によるコカインの測定

5-1. 凝集像の観察

コカイン標準液 50 mL (GBS pH 8.2 で溶解希釈し、0, 0.1, 1, 5, 10, 20 ng/mL に調整) を凝集板上にアプライし、ラテックス抗体試薬 25 mL を滴下し、マイクロプレートミキサーを用いて 5 分間撹拌してコカインとラテックス抗体試薬を反応させた。これにラテックス抗原試薬 25 mL を加え、撹拌を続けながら凝集像の有無を肉眼で経時的に観察した(コカインの反応系最終濃度は 0, 0.05, 0.5, 2.5, 5, 25 ng/mL)。

5-2. 透過率測定法

標品のみの凝集反応は GBS(pH 9.6) 1000 mL、GBS(pH 8.2) 350 mL、各濃度に

希釈したコカイン 100 mL (0, 0.1, 1, 5, 10, 50 ng/mL を添加した。反応系のコカイン最終濃度は 0, 0.0067, 0.067, 0.33, 0.67, 3.3 ng/mL になる) 及びラテックス抗体試薬 50 mL を加えイムノローターを用いて 10 分撹拌後、コカインの結合した磁性ラテックス粒子をマグネットで引き、上清 1350 mL を除いた。残査にラテックス抗原試薬 50 mL を加え撹拌した(撹拌時間は凝集板上での反応を観察して、凝集像に最も差が認められた時間に設定した)。コカインの結合した磁性ラテックス粒子をマグネットで引き、上清 150 mL ずつをマイクロタイタープレートにとり 405 nm で透過率を測定した。

C. 結果

1. ELISA 法

定量的 LAIRT 法の開発を試みるにあたり、購入した抗体の抗体価をまず ELISA 法で確認する事とした。Fig. 1 に ELISA の結果を示す。ウェル当たりのコカインの用量範囲は 8 pg - 25 ng であり、従来報告しているものと変わりなく、高感度に測定できるものと思われた。

2. コカインの凝集板上での凝集阻止反応

ラテックス抗体試薬濃度は 1000 mg/mL × 60 倍希釈(1000 mg/mL はラテックス抗体試薬を作成した際に希釈した

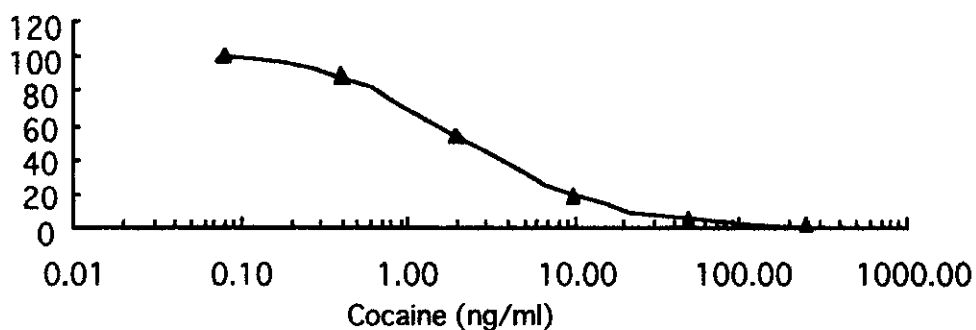


Fig. 1 Standard Curve for Cocaine by ELISA (monoclonal antibody)

IgG の濃度)、ラテックス抗原試薬濃度は 1000 mg/mL×60 倍希釈(1000 mg/mL はラテックス抗原試薬を作成した際に用いた濃度)を用いた。コカイン最終濃度 0, 0.05, 0.5, 2.5, 5, 25 ng/mL の条件で経時的に凝集像の観察を行ったところ、反応 5 分後にはコカイン非添加および 0.05 ng/mL の添加濃度でラテックス粒子が結合した凝集塊が認められた。反応時間の経過に伴い、反応 10 分後には 0.5 および 2.5 ng/mL にも凝集像が認められたが、5 および 25 ng/mL の用量では凝集像は認められず、コカインの用量依存的に凝集阻害が生じる事が確認された(Fig.2)。

3. コカインの透過率測定

反応系のコカイン最終濃度が 0, 0.0067, 0.067, 0.33, 0.67, 3.3 ng/mL になる様に設定し透過率を測定した所、用量依存的な変化は認められなかった。

D. 考 察

磁性ラテックスを用いたコカイン LAIRT 法により凝集阻害の確認と透過率の測定をすることでより定量的な測定法としての有用性を検討した。

まずは購入した抗体の抗体価を確認するため ELISA 法によりコカインの測定可能な濃度範囲の検討を行った所、コカ

インの測定用量範囲は 8 pg - 25 ng/well (0.16 - 500 ng/mL)であり、従来報告しているものと変わりなく、高感度に測定できるものと思われた。

コカイン最終濃度 0, 0.05, 0.5, 2.5, 5, 25 ng/mL の条件で経時的に凝集像の観察を行ったところ、反応 5 分後にはコカイン非添加および 0.05 ng/mL の添加濃度でラテックス粒子が結合した凝集塊が認められた。反応時間の経過に伴い、反応 10 分後には 0.5 および 2.5 ng/mL にも凝集像が認められたが、5 および 25 ng/mL の用量では凝集像は認められず、コカインの用量依存的に凝集阻害が生じる事が確認できた。凝集反応は簡便かつ迅速な方法であるゆえ、尿中コカインのスクリーニング法として大変有用であり、また用量依存的な確認も可能である。当教室における過去の凝集板での感度は 0.1 mg/mL であったが、今回の結果では 0.5 ng/mL までとなり、より良い検出感度を得ることができた。これは用いた抗体が新規購入したものであり抗体の違いにより検出感度が向上したものと思われる。またこの値は ELISA の測定限界に近い値となった。

しかし、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

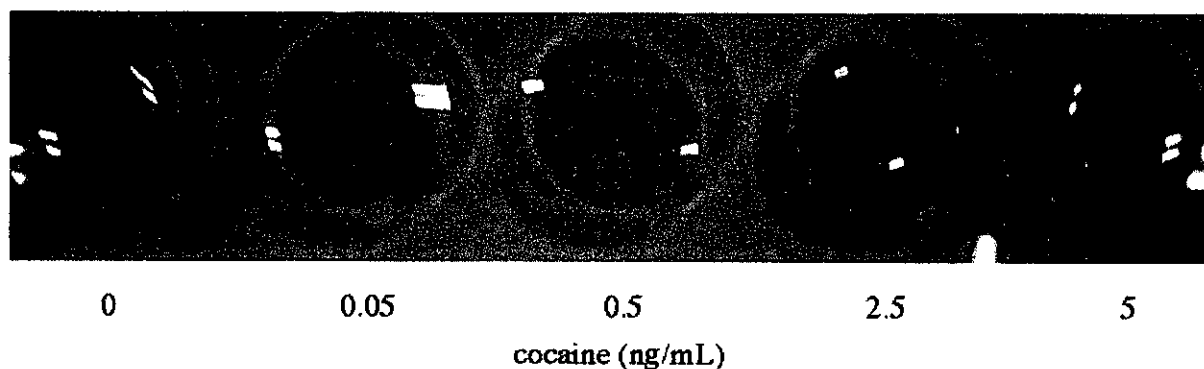


Fig. 2 コカインの LAIRT 法

たが、透過度を測定するにあたってはコカインの添加濃度依存的な変化は認められず、現段階では定量的 LAIRT 法を確立するには至っていない。定量的な結果が得られなかった理由としては、反応時間の設定の不備、ELISA の結果から、コカインの添加濃度をかなり低濃度で行ってしまい実際の LAIRT 法では ELISA の結果ほど高感度な検出はむずかしいのではないかと思われた。今後反応時間の設定や、コカインの濃度展開など検討することで改善できるものと思われる。定量的 LAIRT 法では 96 穴のマイクロタイタープレートを用いて一度に多数の検体を処理できる事、また測定に要する時間が GC/MS などと比較して極端に短縮できるという利点があることから、高感度のコカイン検出が行えるように今後改良を試みたい。

E. 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. Itoh, and T. Yoshida, Simultaneous determination of urinary methamphetamine, cocaine and morphine using a latex agglutination inhibition reaction test with colored latex Particles. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **43**, 285-292 (1997).

研究協力報告書

幻覚成分 Psilocin を認識するモノクローナル抗体の調製と簡易キットの構築

研究協力者 北條 博史 昭和薬科大学 教授

研究協力者 山口 光峰 昭和薬科大学 助手

研究要旨 麻薬原料植物として2002年6月より規制対象となった幻覚性キノコ(マジックマッシュルーム)は国内での自生が確認されているが、その識別には形態観察あるいは特異性が高いとはいえない化学反応を利用した方法しかない。このような識別にはそれらに含まれる psilocin もしくは psilocybin に対する特異性の高い抗体を用いた免疫酵素学的測定法が有用と考えられる。

そのため本研究では、免疫学的測定法構築のために必須となる抗 psilocin モノクローナル抗体産生細胞の樹立を試み、さらにそれにより産生される抗体を利用して psilocin を正確かつ迅速に検出できる簡易キットの構築を行った。

A. 研究目的

麻薬原料植物として2002年6月より規制対象となった幻覚性キノコ(マジックマッシュルーム)は国内での自生が確認されているが、その識別には形態観察あるいは特異性が高いとはいえない化学反応を利用した方法しかない。このような識別にはそれらに含まれる psilocin もしくは psilocybin に対する特異性の高い抗体を用いた免疫酵素学的測定法が有用と考えられる。

そのため本研究では、免疫学的測定法構築のために必須となる抗 psilocin モノクローナル抗体産生細胞の樹立を試み、さらにそれにより産生される抗体を利用して psilocin を正確かつ迅速に検出できる簡易キットの構築を行った。

B. 研究方法

1. 抗 psilocin 抗体を産生するハイブリドーマ細胞 PSI CA231 株の樹立

低分子化合物である psilocin に免疫原性を付与するため、フリーのカルボン酸をもつ psilocin 誘導體(PSI-COOH)を合成し、キャリアタンパク質である keyhole limpet hemocyanin (KLH)または BSA に結合させた。PSI 結合 KLH を2週間間隔で6回免疫した BALB/c マウスから脾細胞を調製し、ミエローマ細胞 PAI と融合しハイブリドーマを作成した。抗体産生陽性ハイブリドーマから psilocin 特異抗体産生クローン PSI CA231 を限界希釈法により選択した。

2. 抗 psilocin モノクローナル抗体を用いた EIA 法

PSI CA231 株の培養上清 1/1 より protein G カラムを用いて IgG を精製した。ヌンクイムプレートに炭酸緩衝液を用い PSI-COOH 結合 BSA を塗布し、つぎに抗体溶液(1 µg/mL)および被検化合物を等量混和したものを1時間反応させ、さらにペルオキシダーゼ結合抗マウス

IgG を反応させた後、常法により発色させた。本 EIA は 2 時間以内で作業が完了した。

3. 抗 psilocin 抗体 PSI-CA231 を用いたイムノクロマトグラフィー法

ニトロセルロース膜の第 1 捕捉帯部位に PSI-COOH 結合 BSA を、第 2 捕捉帯部位に抗マウス IgG ヤギ抗体をそれぞれ塗布し、乾燥後、膜をトレーに装着した。さらに反応部位に PSI-CA231 抗体が吸着した金コロイドを加えカバーをかぶせることでイムノクロマトグラフィー用の測定トレーを作製した(図 3)。また、種々のインドール化合物を試料滴下部へ添加させた出現する金コロイドのバンドにより評価した。

C. 研究結果

1. 抗 psilocin 抗体 PSI-CA231 の抗原特異性 (図 1, 2)

PSI-CA231 抗体の抗原特異性を調べるため、抗体と psilocin-BSA との反応系に、種々のインドール化合物を加え競合試験を行った。4-hydroxyindole、tryptamine 及び tryptphan では競合阻害は認められず psilocin 及び DMT では阻害が認められた。

2. 抗 psilocin 抗体 PSI-CA231 を用いたイムノクロマトグラフィー法の確立(図 3、4) 種々のインドール化合物を試料滴下部へ添加させたところ、psilocin および DMT

を添加した場合には 10 分以内に第 1 及び第 2 捕捉帯に金コロイドバンドが現れた。またその他の化合物を添加した場合には第 1 捕捉帯にのみ金コロイドバンドが見られた(図 4)。この現象は、PSI-CA231 抗体吸着金コロイドが第 1 捕捉帯へ結合することに対して試験溶液中の psilocin または DMT が競合阻害を引き起こしていることを意味している。従って、今回構築したイムノクロマトグラフィー法は ELISA の結果と一致し、試験したインド

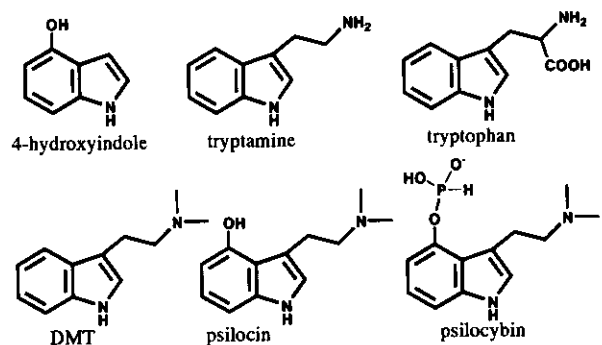


Fig. 1. 各種インドール化合物の構造

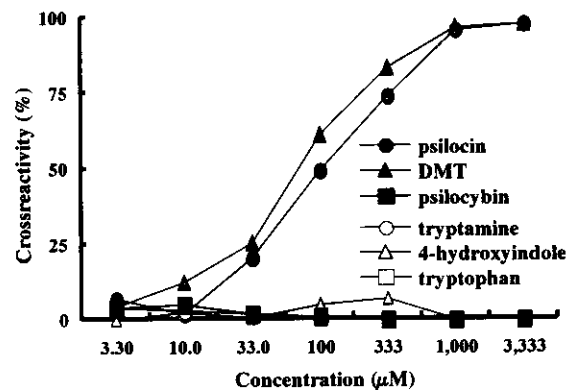


Fig. 2. 各種インドール化合物による競合阻害

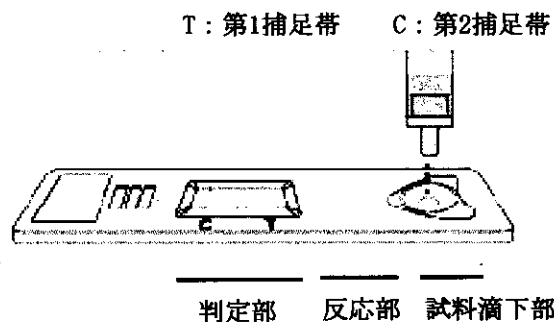


Fig. 3. イムノクロマトグラフィー法の測定トレー

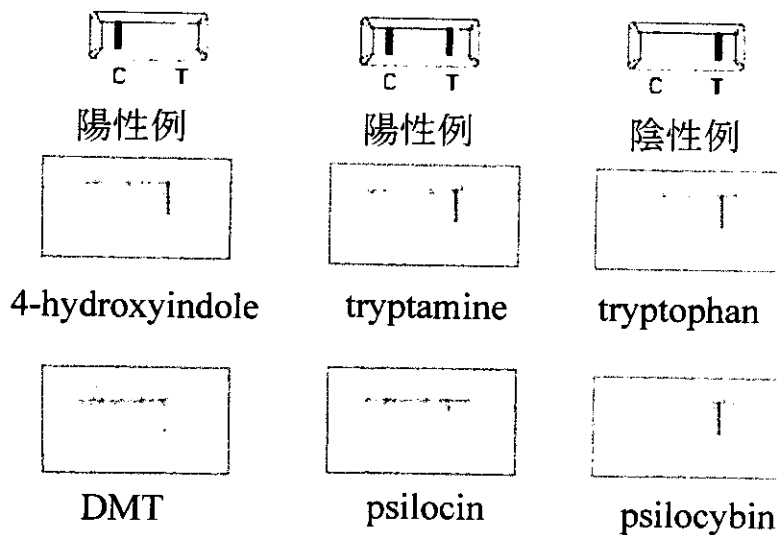


Fig. 4. イムノクロマトグラフィー法による判定

ール化合物中では psilocin と DMT を特異的に検出可能であった。

D. 考察

モノクローナル抗体 CA231 はインドール骨格には反応せず、インドール骨格 3 位のジメチルアミノエチル基を含めた分子構造を認識するため、psilocin を含むきのこの識別に有用な抗体であることが示唆された。

今回の研究ではさらに迅速 psilocin 測定法として、この抗体を利用したイムノクロマトグラフィー法を構築した。このイムノクロマトグラフィー法では第 2 補足帯の金コロイドバンドの出現により試験溶液中の psilocin の存在を確認することが可能であった。予備的な実験では psilocin を含むきのこも識別可能であったため、今後、muscarine、buffotenin などを含む幻覚性きのこや多くの食用キノコに対して評価を行いその正確性や精度について詳細に検討を行う。

E. 結論

麻薬原料植物として 2002 年 6 月より規制対象となった幻覚性キノコ(マジックマッシュルーム)は国内での自生が確認されているが、その識別に含有成分 psilocin に対する特異性の高い抗体を用いた免疫酵素学的測定法としての抗 psilocin モノクローナル抗体産生細胞の樹立を試み、さらにそれにより産生される抗体を利用して psilocin を正確かつ迅速に検出できる簡易キットの構築に成功した。

研究協力報告書

毛髪中のフェンフルラミン類の分析

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(Fen)およびN-ニトロソフェンフルラミン(N-Fen)の摂取歴を調べる目的で、Fen およびその主要代謝物であるノルフェンフルラミン(Norf)をバイオマーカーとする毛髪分析を検討した。分析には、ラベル化試薬として、4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride (DIB-Cl)を用いる HPLC-蛍光定量法を用いた。ラットおよびヒトの毛髪分析を試みた結果、Fen あるいは N-Fen を単回投与後のラット毛髪から Fen および Norf が検出され、黒毛と白毛の間でそれぞれの濃度に大きな相違は見られなかった。一方、N-Fen の摂取被疑者毛髪からも Fen および Norf が検出され、セグメント分析の結果、約 1 年間にわたる摂取の経過を推定することができた。また、同一被疑者から得られた黒髪と白髪間でラットと同じく Fen および Norf の各濃度に大きな相違は見られなかった。

A. 研究目的

違法な医薬品を使用しているかどうかを調べる場合、血液や尿などの生体試料が一般に使用されるが、薬物の摂取時期や試料の採取時期によっては、体内から排泄されてしまうことで計測が不可能になることが多い。この点、毛髪試料は長期間にわたって摂取された薬物を分析することが可能であり、使用歴等を調査するのに適しており、保管などが容易であるなどの利点も有している。食欲抑制作用を有する 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-ニトロソ体であるN-Fenが中国製痩身用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

例も発生した。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おり、その一環として、Fen 及び N-Fen の HPLC 定量を開発し痩身用健康食品の分析に適用し、Fen や N-Fen を検出することができた。本研究では、DIB-Cl を蛍光ラベル化試薬に用いる HPLC-蛍光定量法を基礎として、N-Fen あるいは Fen の摂取履歴を調べることを目的に、毛髪中の濃度測定を検討した。N-Fen は体内で Fen および Norf に代謝される。そこで、毛髪中の Fen あるいは Norf をバイオマーカーとして、それらの濃度を測定することで、Fen あるいは N-Fen の摂取歴を推定することにした。すなわち、ラットに N-Fen あるいは Fen を投与後の毛髪中の Fen および Norf の濃度を検討するとともに、N-Fen の摂取被疑者の毛髪分析を検討した。

B. 方法

1. ラットでの in vivo 実験: Zucker および Wistar ラットを用いた。Fen (5 mg/kg) および N-Fen (25 mg/kg) を単回投与後、Zucker ラットでは 10 h および 2 weeks 後、Wistar ラットでは 3 h 後に毛髪試料を採取した。また、別の Zucker ラット実験では、Fen (5mg/kg) あるいは N-Fen (10, 25 mg/kg) を 4 日間連続投与後、最初の投与から 1-4 weeks 後に shaft と root の試料を採取した。

2. 毛髪試料の前処理: ヒトおよびラット毛髪 (shaft 部) は 0.1% SDS、水でそれぞれ 5 分間ソニケーション洗浄し、30°C、30 分乾燥した。毛根部はそのまま使用した。

3. 毛髪試料からの Fen および Norf の抽出: 毛髪試料は精秤後試験管に入れ、メタノールを加え、最終毛髪濃度を 1 mg/0.5 mL (ヒト)、および 1 mg/mL (ラット) とした。1 時間のソニケーションの後、200 mL (ヒト) および 400 mL (ラット) の抽出液を取り、減圧乾固して誘導体化に付した。

4. 定量分析

1) 蛍光誘導体化

抽出液の蒸発乾固残渣に 20 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) 20 mL を加え、2 mM DIB-Cl のアセトニトリル懸濁液 75 mL を加え、vortex mix 後、室温 10 分間放置して DIB 誘導体とする。25% アンモニア水 5 mL を加えて反応を停止後、その 20 mL を HPLC に付し、DIB-Fen を蛍光検出した。

2) HPLC 条件

ポンプ: LC-10ADvp (島津)、カラム: Daisopak SP-120-5-ODS-BP (ダイソー、250x4.6 mm, i.d.)、検出器: RF-550 (島津)、

検出波長: $\lambda_{ex} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$ 、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 mL。

C. 結果

毛髪試料中の Fen および Norf の高感度 HPLC-蛍光定量法を検討した。上記の溶離条件下では Fen および Norf の DIB 誘導体の各保持時間はそれぞれ 16 min および 23 min であり、他の毛髪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、ヒトでは 36 pg/mg-144 ng/mg (Fen) および 16 pg/mg-127 ng/mg (Norf)、ラットでは 50 pg/mg -144 ng/mg (Fen) および 30 pg/mg-127 ng/mg (Norf) の濃度範囲で良好な直線関係となった ($r > 0.999$)。ヒト毛髪の添加試料の検出下限は $S/N=3$ の場合、Fen および Norf でそれぞれ 36 pg/mg および 16 pg/mg であった。また、ラットでは 50 pg/mg および 30 pg/mg となり、いずれの試料でも非常に高感度に検出することができた。代表的なクロマトグラムを Figure 1 に示した。

N-Fen が含まれる痩身用健康食品を摂取したことが疑われている 6 名の被疑者の毛髪試料を分析した結果、Fen および Norf は 43-1389 pg/mg (Fen) および 18-680 pg/mg (Norf) であった。Figure 2 には 3 例 (Case I, II, III) のフラグメント分析の結果を示した。また、同一被疑者の黒髪、白髪中の Fen 濃度はほぼ同一であった。Fen (5 mg/kg) あるいは N-Fen (10, 25 mg/kg) をそれぞれ単回投与した場合、Zucker ラットの黒毛および白毛のいずれからも Fen および Norf が検出された。また、Fen および N-Fen を連続投与した場合、白毛と黒毛間にそれらの濃度に差

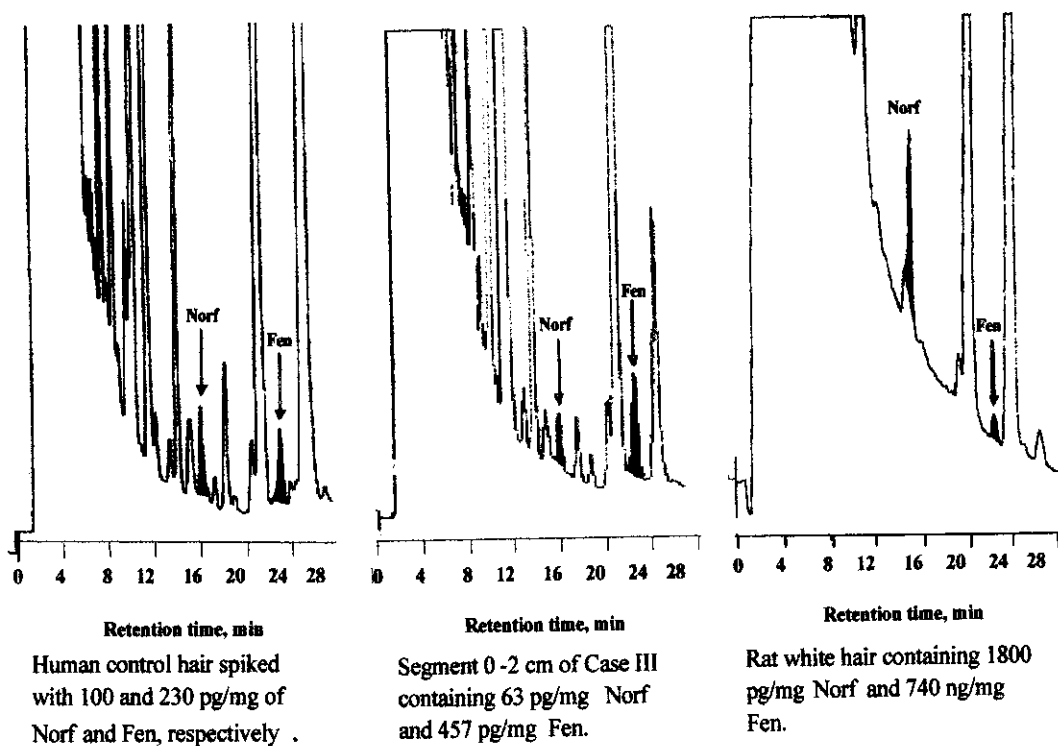


Fig. 1 Representative Chromatograms of DIB-Fen and DIB-Norf in Hair Samples.

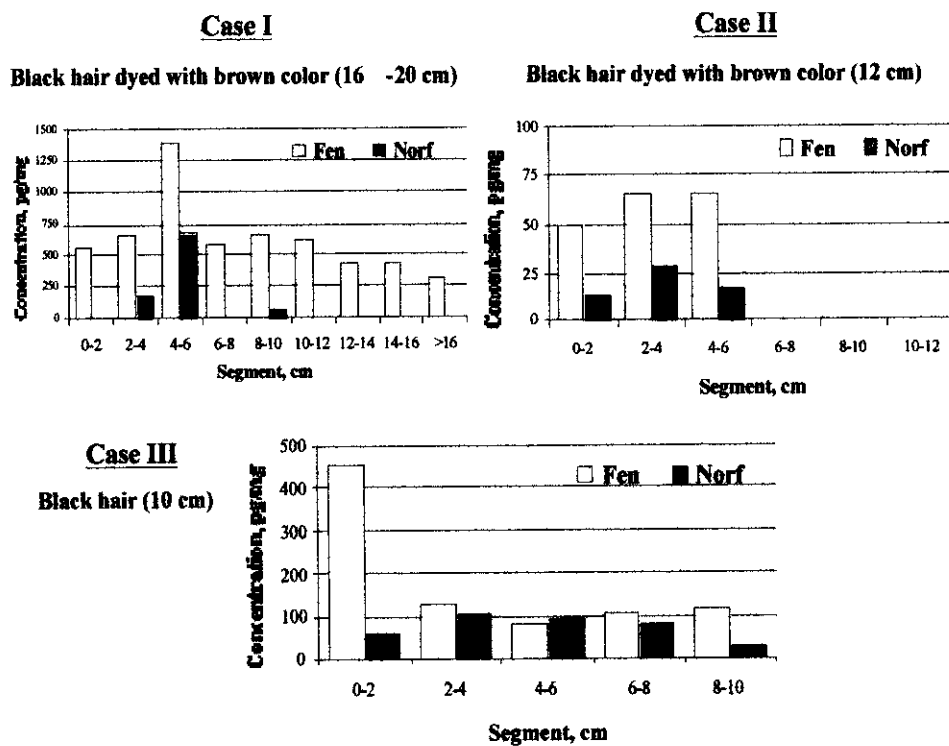


Fig. 2 Segmental Analysis of Human Hair Samples.

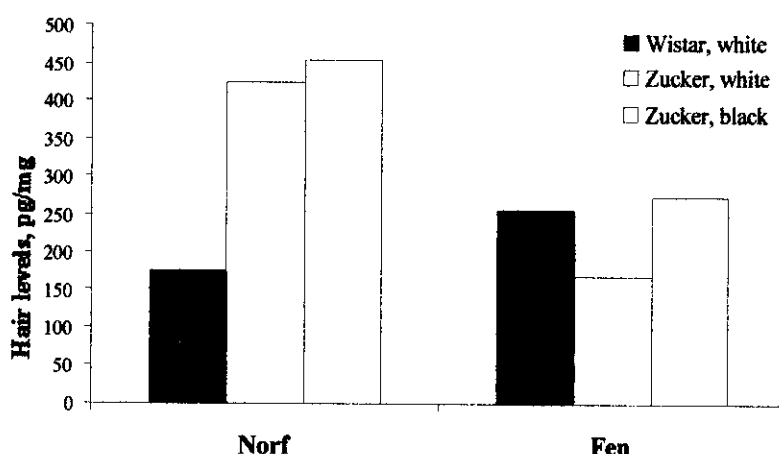


Fig. 3 Fen and Norf Levels in Rats' Hair Administered with Repeated Doses of N-Fen (10mg/kg, i.p.) for 4 Consequent Days. Sampling by shaving after 2 weeks of the first dose.

は見られなかった。Figure 3 には Wistar および Zucker ラットへの N-Fen 投与後の毛髪移行の変化を示した。

D. 考 察

ラットによる in vivo 実験の結果、Fen を投与した場合も、N-Fen を投与した場合も、Fen およびその代謝物である Norf が検出されたことから、N-Fen から Fen および Norf が生成することが明らかとなった。黒毛と白毛が混在する Zucker ラットを用いて Fen および N-Fen の投与を検討した結果、毛髪中に、色素（メラニン）に関係なく Fen と Norf が同レベルで検出された。また、N-Fen 摂取が疑われる同一人の黒髪と白髪中で、ラット同様色素と濃度に関係なく検出されたことから、両化合物はメラニンが関係しない機構で毛髪に取り込まれる可能性が示唆された。類似の構造を有するメタンフェタミンやアンフェタミンはメラニンに依

存する取り込みが主であると考えられていることから、大変興味深い。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履歴調査などに利用できるものとする。

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、死亡例も生じたが、その原因は Fen をニトロソ化した N-Fen であった。本研究ではラットによる in vivo 実験の結果、毛髪中の Fen および Norf が N-Fen 摂取のバイオマーカーとなりうることを明らかにすることができた。一方、N-Fen 摂取被疑者毛髪をセグメント分析することで、摂取履歴を推定することができたことから、本法は N-Fen あるいは Fen 摂取を証明するのに有用な方法であり、病態との関連性を明

らかにする上で有用である。

また、毛髪分析が法中毒や臨床化学の分野で重要項目となっているが、本研究ではメラニンを介さない毛髪への薬物移行機構の存在を示唆することができた。今後の解明が期待される。

F. 参考文献

1. A. Kaddoumi, M.N. Nakashima, T. Maki, Y. Matsumura, J. Nakamura, K. Nakashima: Liquid chromatography studies on the pharmacokinetics of phentermine and fenfluramine in brain and blood microdialysates after intraperitoneal administration to rats, *J. Chromatogr. B*, **791**, 291-303 (2003).
2. 中島憲一郎: HPLC を利用する覚せい剤関連化合物の分析、*法中毒*, **21**, 197-209 (2003).
3. 中島憲一郎、アマルカドウミ、和田光弘、中嶋弥穂子、黒田直敬: 食欲抑制剤フェンフルラミンの毛髪移行性に関する研究、日本法中毒学会第23年会、秋田、2004年4月

分担研究報告書

5. 大麻鑑定のためのゲノム分析手法の開発と植物生理学研究

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 大麻鑑定に有効な基礎データの作成を進めて、複数の系統の大麻の THCA および CBDA 分析、および THCA 生合成酵素遺伝子のゲノム配列情報を解析した。成分分析により分類した系統の DNA 解析から THC 生成系等に得意的なシングルバンドの一塩基多型を見いだした。結果的にこれらの違いは機能には影響を及ぼさないものと考えられた。また、大麻の向精神作用物質 THCA synthase は FAD 依存型のオキシダーゼであることを証明した。ケミカルドラッグ”の不正流通を防止するため、BZP、TMFPP、3CPP、4MPP についての毒性実験、行動量に及ぼす影響を観察し、生命への危険性や安全性に問題のあることを実験的に明らかにした。4 成分間では毒性、行動への作用に差が認められ、また、2 成分の同時投与により行動量の減少と死亡数の増加が観察された。

研究協力者

正山 征洋 九州大学大学院薬学研究科 教授
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
小島 尚 神奈川県衛生研究所

A. 研究目的

国内における大麻の使用、栽培事例は近年拡大していて取締り件数が増加している。押収サンプルの鑑定法として化学的手法や組織形態学的手法が行われているところであるが、これに加えて DNA を指標とした生物学的判定方法が求められている。そこで、国内外の系統を用いて形態、成分、DNA 情報などに注目した総合的な研究を展開し、今年度は複数の系統の大麻について個体毎の THCA および CBDA 分析、および THCA 生合成酵素遺伝子のゲノム配列情報を解析した。大麻中の THCA の含有量は各系統によって様々に異なっており多様な表現型が表れ

るが、このような現象の原因として THCA 生合成酵素遺伝子そのものの存在の有無、あるいはゲノムレベルでの変異、あるいは転写制御などによる機能変化が想定される。本年度は本酵素を昆虫細胞で大量発現し、反応メカニズムについて詳細に検討することを目的とした。また、新たに麻薬に指定されたピペラジン系化合物について中枢作用の指標として行動量に及ぼす作用を検討した。平成 15 年 10 月、麻薬指定された BZP や TMFPP などのピペラジン系化合物は、いわゆる“ケミカルドラッグ”としてインターネット上で、サイケデリック効果や MDMA 類似作用をうたい興味をそそっている。そこで、こ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と考え、中枢作用の指標として行動量に及ぼす作用を、マウス自発運動で検討した。

B. 研究方法

23系統の *C. sativa* を実験材料に用い、それぞれの種子を 25 °C、24 時間連続照明下の人工気象室で育成したものを実験材料とした。THCA 及び CBDA の定量は HPLC で行った。DNA に関しては、植物体の生葉 150 mg を用い、CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 法を一部改良し DNA の抽出・精製を行い、得られた DNA を 0.5 ng/ μ l になるよう希釈調製し試料とし、PCR およびシーケンシングを行い、フラグメントの配列を決定した。THCA synthase の昆虫細胞での発現と精製の検討及び変異導入用のプライマーを用いた PCR により、ポイントミュータントの作製及び発現について検討した。素活性の測定は CBGA を含む基質バッファーに酵素液を加え、インキュベート後、生成した THCA を HPLC で測定することにより酵素活性を測定した。酵素反応により生成した過酸化水素は peroxidase により測定した。ピペラジン系化合物については、BZP、TMFPP、3CPP 及び 4MPP を ddy 系雌マウスに、被検薬を水溶液とし、強制経口投与し作用の検討を行った。

C. 研究結果

Genomic DNA を用いて PCR を行った結果、THCA を高含量に含む 9 系統においては、1 系統の例外を除く 8 系統全てにおいて約 1.2kb にシングルバンドが検出された。一方、成分分析で THCA が未検出であった、あるいは殆ど確認できなかった 14 系統では全てにおいてバンドが検出されなかった。次にバンドの得られた系統について、塩基配列を決定した結果、配列決定したゲノム領域内ではイントロン部位は存在せずエクソンのみで

構成されていた。また特異的な三部位で一塩基多型が認められた。

THCA synthase を電気泳動上単一に精製した組み換え酵素について分光学的性質を検討したところ、flavoenzyme に特徴的な性質を示した。FAD の結合部位はポイントミューテーションにより検討したところ、種々の変異酵素のうち H114 をアラニンに変異したもので活性及び蛍光が完全に消失したことから H114 が FAD 結合部位であり、また、FAD は酵素活性に必須であると確認した。さらに本酵素反応は酸素の存在下のみ進行し、また本酵素反応により THCA と過酸化水素が 1:1 の比率で生成することが明らかとなり、本酵素はオキシダーゼであると結論した。ピペラジン系化合物は 4 成分とも 300 mg/kg では 2/3 以上のマウスが死亡した。50mg/kg 投与では、死亡する個体はなかった。BZP と 3CPP を混合して経口投与した、BZP 単独投与との比較を行ったところ、行動量の減少が見られ、単独の場合より死亡数が多かった。

D. 考察

DNA 配列の結果から、THCA を含む系統のゲノムに認められた一塩基多型はアミノ酸レベルでは全て同じ配列となる同義的置換で、ゲノムレベルでは多型が存在するものの、遺伝子機能としては変化しないものと考えられた。

THCA synthase は flavoenzyme であると推定されており、昆虫細胞の組み込み実験により推定通り実際に FAD と結合していることが確認できた。本酵素の活性部位の構造には極めて興味もたれることから、X 線結晶解析などの手法によりこれを原子レベルで解明することが今後

の検討課題と考えている。

BZP と TFMPP は行動への作用が異なり、また、一方、3CPP は死亡例が多く、毒性作用が強かった。4MPP は行動抑制作用が見られた。ピペラジン系化合物でも置換基により作用が異なり、健康被害の可能性も異なることが明らかになった。

E. 結論

大麻鑑定に有効な基礎データの作成を進めて、複数の系統の大麻の THCA および CBDA 分析、および THCA 生合成酵素遺伝子のゲノム配列情報を解析した。成分分析により分類した系統の DNA 解析から THC 生成系等に得意的なシングルバンドの一塩基多型を見いだした。結果的にこれらの違いは機能には影響を及ぼさないものと考えられた。大麻の向精神作用物質 THC Synthase は FAD 依存型のオキシダーゼであることを証明できた。また、BZP、TMFPP、3CPP、4MPP についての毒性実験、行動量に及ぼす影響を観察し、生命への危険性や安全性に問題のあることを実験的に明らかにした。4成分間では毒性、行動への作用に差が認められ、また、2成分の同時投与により行動量の減少と死亡数の増加が観察された。

F. 研究発表

論文発表

1. 高上馬希重, 村中俊哉, 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. における cannabinoid 生合成遺伝子の解析, *DNA 多型* 12 (in press)
2. エフェドラアルカロイドを含む健康食品に含まれる医薬品成分の検討, 小島

尚, 関田節子 *医薬品研究* 35 22-28 (2004).

3. いわゆる“ケミカルドラッグ”の実態調査の結果, 小島 尚, 宮澤真紀, 石川哲也, 高柳栄郎, 浅谷秀行, 土井佳代 *中毒研究* 17, 71-72 (2004).

学会発表

1. 高上馬希重, 村中俊哉, 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. における cannabinoid 生合成遺伝子の多様性, 日本生薬学会年会, 東京
2. 高上馬希重, 村中俊哉, 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. における cannabinoid 生合成遺伝子の解析, 日本 DNA 多型学会学術集会, 東京
3. 脱法ドラッグの調査結果について, 全国衛生化学技術協議会関東甲信静支部理化学部会. 小島 尚, 宮澤真紀, 土井佳代 (横浜, 平成 16 年 1 月)
4. いわゆるケミカルドラッグ(ピペラジン化合物)のマウス行動に及ぼす作用 第124年会日本薬学会 小島 尚, 宮澤真紀, 土井佳代, 関田節子 (大阪, 平成 16 年 3 月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

分担研究報告書

大麻 *Cannabis sativa* L.における cannabinoid 生合成酵素遺伝子の解析

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 大麻鑑定に有効な基礎データの作成を進めて、複数の系統の大麻の THCA および CBDA 分析、および THCA 生合成酵素遺伝子のゲノム配列情報を解析した。成分分析により分類した系統の DNA 解析から THC 生成系等に得意的なシングルバンドの一塩基多型を見いだした。結果的にこれらの違いは機能には影響を及ぼさないものと考えられた。

A. 研究目的

大麻 *Cannabis sativa* L.における特徴的な向精神作用成分は、cannabinoid 類化合物と総称される数十種類にのぼる化合物のうち tetrahydrocannabinol (THC)である (THC は通常、酸化された tetrahydrocannabinolic acid (THCA)の状態にあるため以後 THCA と表記する)。大麻は古代から栽培され、薬としてまた線維として用いられている1年生の草本で、本植物の分布域は人為的な要因などによって世界中に広がっている。そのため同一種でありながらも多様な変異の存在することが認められていて、一般的に THCA を主 cannabinoid 化合物として含有するタイプと cannabinoid 類化合物の一つである cannabidiolic acid (CBDA)を主に含有するタイプの2グループに大別される。協力研究者の正山のグループは、THCA の前駆物質と考えられる cannabigerol acid (CBGA)から THCA に至る生合成酵素遺伝子配列をクローニングし、現在さらに上流に位置する生合成酵素 poly ketide synthase (PKS)の遺伝子について研究を進めている。前述のように THCA の含有量

は各系統によって様々に異なっており多様な表現型が表れるが、このような現象の原因として THCA 生合成酵素遺伝子そのものの存在の有無、あるいはゲノムレベルでの変異、あるいは転写制御などによる機能変化が想定される。大麻の取り締まり規制に関しては、押収サンプルの鑑定法として化学的手法や組織形態学的手法が行われているところであるが、これに加えて DNA を指標とした生物学的判定方法が求められている。そこで *C. sativa* の一種内において、どのような生物的多様性が存在するのかという基礎的知見を得ることは大麻鑑定に有効であると考え、国内外の系統を用いて形態、成分、DNA 情報などに注目した総合的な研究を展開している。そこで今年度は複数の系統の大麻の THCA および CBDA 分析、および THCA 生合成酵素遺伝子のゲノム配列情報を解析した。

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1)。

表1 実験に用いた植物試料.

Taxon	Exp. code	Accession number ¹	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 Botanisher 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.

また比較のため、同科植物である近縁のホップ *Humulus lupulus* L.を用いた。それぞれの種子を 25 °C、24 時間連続照明下

の人工気象室で育成したものを実験材料とした。

2) HPLC 分析

大麻の主要成分であるカンナビノイド類の内、THCA 及び CBDA の定量分析を行った。出芽後 40 日目の植物体の葉を暗黒、50°C で 12 時間通風乾燥したものを分析試料とした。試料を粉碎後、エタノールを加え、室温で 2 時間溶出した。抽出液を遠心分離(7,000×g, 5 min)し、上澄を分析試料とし HPLC によって分析を行った。分析システムは model LC-9A (Shimadzu)、SPD-6 AV spectrophotometric detector、C-R5A chromatopac、CTO-6A column oven、SCL-6B system controller、カラム：Waters Symmetry C18 (3.5 μm, φ4.6 mm×100 mm, Waters)、カラム温度：30°C。Solvent system, MeOH・H₂O (85:15, v/v, 0.6 ml/min flow rate)、検出：210 nm とした。

3) DNA 抽出

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。得られた DNA を 0.5 ng/μl になるよう希釈調製し試料とした。

4) PCR およびシーケンシング

前述の配列情報をもとに THCA 生合成酵素遺伝子特異的プライマー「can#025」と「can#026」を新たに設計した(図 1)。1ng の DNA, 0.25units の AmpliTaq Gold(PE biosystems)、1/10 容量の AmpliTaq Gold 添付 Buffer、0.2 μM の

プライマー、各 200 μM の dNTP、2.5mM の MgCl₂ を滅菌水で 10 μl の反応系に調製した。反応には Takara PCR Thermal Cycler MP(TAKARA)を使用した。反応条件は 95°C 10 分プレヒートに引き続き、94°C 30 秒、59°C 30 秒、72°C 2 分を 30 サイクル後、72°C 10 分とした。得られた増幅産物を 2%アガロースゲル(TAE buffer)電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、254nm で THCA 生合成酵素遺伝子断片の存在を検出した。

次に、上記 PCR で断片の検出された試料に関して、新たに PCR 法を改めて実験を行った。より正確な塩基配列情報を得るため、3'→5' exonuclease 活性を有し DNA 合成ミスを校正する α 型ポリメラーゼ酵素を用いた。5ng の DNA, 1.25units の PfuTurboR DNA Polymerase (STRATAGENE)、1/10 容量の Pfu Turbo 添付 Buffer、0.3 μM のプライマー、各 200 μM の dNTP を滅菌水で 25 μl の反応系に調製した。反応条件は 95°C 2 分プレヒートに引き続き、95°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 2 分を 30 サイクル後、72°C 10 分とした。PCR 産物を精製後、TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen, California)によりクローニングした。BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE biosystems)に添付の方法に従ってシーケンシング反応、精製を行った。ABI PRISM 310

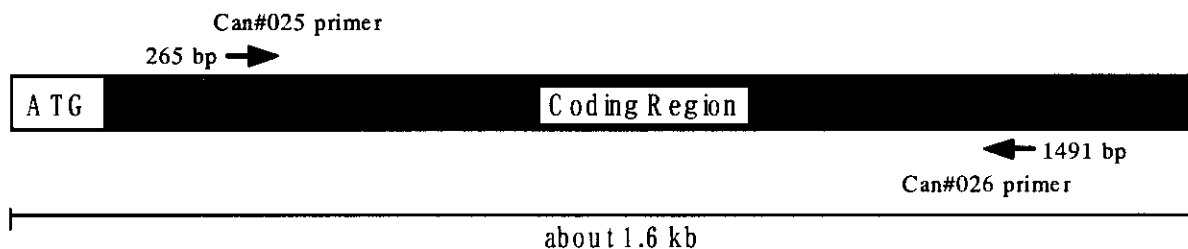


図 1 THCA 生合成酵素遺伝子領域の PCR 増幅に用いたプライマー部位。

および ABI PRISM 3100 automated DNA sequencing system(PE biosystems)によりフラグメントの配列を決定した。

C. 研究結果

CBDA を主カンナビノイドとして含有するタイプ(I型)として 14 系統、THCA を主とするタイプ(II型)として 6 系統、および両化合物を同程度の割合で含むタイプ(III型)として 3 系統の 3 タイプにグループ分けられた(図 2)。

それぞれの系統の genomic DNA を用いて PCR を行った結果、II 型グループおよび III 型グループに属する THCA を高含量に含む 9 系統においては、1 系統の例外を除く 8 系統全てにおいて約 1.2kb にシングルバンドが検出された(図 2)。一方、成分分析で THCA が未検出であった、あるいはほとんど確認できなかった I 型グループの 14 系統では全てにおいてバン

ドが検出されなかった。次に II 型グループおよび III 型グループでバンドの得られた系統について、PCR 産物のサブクローニングを行い、塩基配列を決定した(系統 #017 を除く)。その結果、配列決定したゲノム領域内ではイントロン部位は存在せずエクソンのみで構成されていた。また特異的な三部位で一塩基多型が認められた(図 3)。366bp 部位(翻訳開始点を 1 と定義)では系統#001 および系統#030 が「T」であったのに対して他は「A」であった。399bp 部位では系統#001 のみが「G」であり、その他の系統は全て「A」であった。1179bp 部位では系統#001 および系統#030 が「T」であり、その他の系統「A」であった。すなわち、系統#001 は「TGT 型」、系統#030 は「TAT 型」、そして系統 #010、系統#013、系統#020、系統#053、系統#054 および系統#069 は「AAA 型」の 3 タイプにそれぞれ分かれた。

Hop, *Humulus lupulus*

Marker, 100 bp ladder molecular markers (bp)

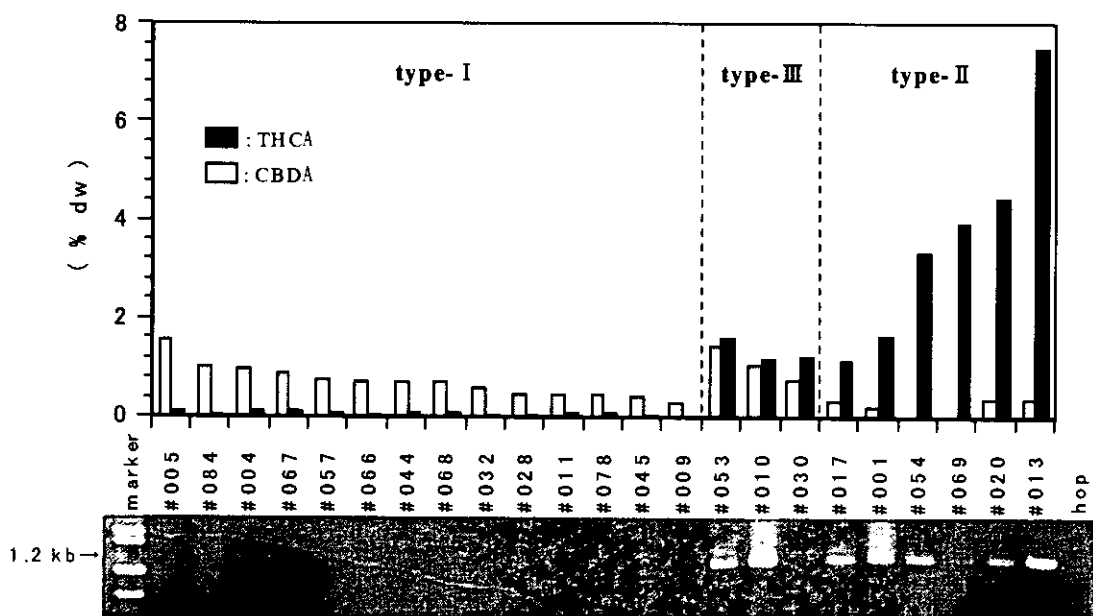


図 2 23 系統の THCA および CBDA 含有量と THCA 生合成酵素遺伝子領域断片の検出

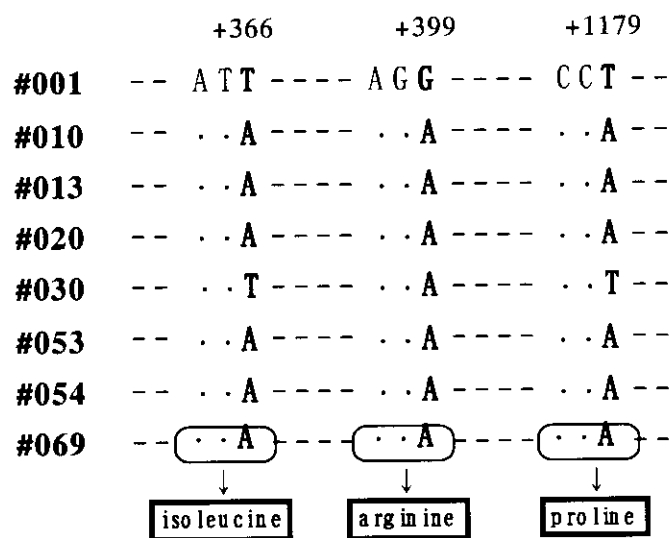


図3 各系統における THCA 生合成酵素遺伝子領域の塩基置換。

D. 考察

今回の実験で得られた DNA 配列は、アミノ酸配列に置き換えた場合、366bp 部位での「T」、「A」の多型はそれぞれコドン「ATT」、「ATA」の第三塩基置換にあたる。「ATT」、「ATA」ともにアミノ酸としてはイソロイシンをコードしていた。399bp 部位での「G」、「A」の多型はそれぞれコドン「AGG」、「AGA」の第三塩基置換にあたり、ともにアルギニンをコードしていた。1179bp 部位での「T」、「A」の多型はそれぞれコドン「CCT」、「CCA」の第三塩基置換にあたり、どちらもプロリンをコードしていた。このように特異的な三部位での一塩基多型はアミノ酸レベルでは全て同じ配列となる道義的置換であった。つまりゲノムレベルでは多型が存在するものの、遺伝子機能としては変化しないものと考えられた。以上本研究で明らかになった THCA 生合成酵素遺伝子の一塩基多型解析は大麻の遺伝的な基礎研究の発展、ならびに今後の DNA 鑑定技術の開発に寄与するものと考えられる。

E. 研究発表

論文発表

1. 高上馬希重, 村中俊哉, 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. における cannabinoid 生合成遺伝子の解析, *DNA 多型*, 12, (in press)

学会発表

1. 高上馬希重, 村中俊哉, 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. における cannabinoid 生合成遺伝子の多様性, 日本生薬学会年会, 東京
2. 高上馬希重, 村中俊哉, 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. における cannabinoid 生合成遺伝子の解析, 日本 DNA 多型学会学術集会, 東京

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録