

これらの試料においてもルチンは検出されなかった。

次に、LC/PDA/MS 分析を行ったところ、sample 1 由来のクロマトグラムでは、全草試料にある UV ピーク並びに *Arnica* 属に特徴的なヘレナリン、ジヒドロヘレナリンカルボン酸エステル類由来と考えられる MS ピークが観測され、上記の推定を支持した。また、sample 7.9 では、UV のシグナルとしては観測されないものの、同様にヘレナリン、ジヒドロヘレナリンカルボン酸エステル類と考えられる MS ピークが観測され、これらも、*Arnica* 属由来の製剤であることが確認された。

EP では、ALNICA FLOWER は、2000 年 (EP3 追補) にモノグラフに記載され、その基原植物は、*A. montana* と規定されている。しかし、ドイツ薬局方では、一時期 *A. chamissonis* Less. ssp. *foliosa* (Nutt.) Maguire (North American meadow arnica) が ALNICA FLOWER として記載されていた。また、文献にも、同植物は、2000 年以前、公的な ALNICA FLOWER であると記載がある。また、同じ文献に *A. montana* がの圃場栽培に適した品種 (Arbo) の育種の成功とこの栽培の増加により、東部ドイツでの *A. chamissonis* ssp. *foliosa* の栽培は必要なくなったと報告がある。

本研究で分析した Sample 1 は、これまでの実験結果より、明らかに *Arnica* 属植物と考えられる。他方 UV225 nm のクロマトグラム上、主要なセスキテルペンラクトンと考えられる 3 本のピークは、EP で規定された *A. montana* の主セスキテルペンラクトン類と考えられるヘレナリン、ジヒドロヘレナリンカルボン酸エステルではなかった。そこで、これらのピークの化合物情報を得るため、3 ピークについてマススペクトルを作成した。その結果、全てのピークで m/z 385 が疑似イオンピークとして観測され (Fig. 8)、高分解能測定の結果より分子式

$C_{20}H_{26}O_6Na_1$ が得られた。本分子式は、ヘレナリン (helenalin) 類でなく、helenalin の 2.3 位に水がマイケル付加したと考えられる arnifolin の tigloyl, angelicoyl, senecioyl エステルのものと同一であった。また、これらの化合物は、*A. chamissonis* Less. ssp. *foliosa* に存在することが知られている。以上の結果を考え合わせると、本研究で使用した *Arnica* 属全草試料と Sample 1 は、*A. chamissonis* Less. ssp. *foliosa* である可能性が示唆された。他方、sample 7.9 は、UV225nm でこれらの特徴的な 3 本のピークは観測されず、また m/z 385 の MS クロマトグラム上でも *Arnica* 属全草試料や sample 1 と同様のピークは観測されなかった。従って、これらの製剤は、*A. montana* 由来である可能性が示唆された。

Sample 2 は、EP に準拠した TLC の結果より、Mexican Arnica として知られている *Heterotheca inuloides* である可能性が示唆された。そこで、さらに、GC/MS 分析を行ったところ、得られたスペクトルのライブラリーサーチにより、同植物に含有することが知られている cadalene, carryophyllen oxide, 7-hydroxycadalene, 4-methoxy isocadalene, 7-hydroxy-3, 4-dihydrocadalene と考えられるピークが検出された。従って、本薬草茶は、EP の純度試験で異物として混入の恐れがある植物として規定されている *Heterotheca inuloides* である可能性が非常に高いことが明らかとなった。なお、本研究班で別に行った遺伝子並びに形態学的検討でも Sample 2 の ITS 領域の比較や種子の形態学的特徴から、この試料は、*Heterotheca inuloides* であると推定されている。

Sample 2 は、表示上は、明確に *A. montana* 由来と記載されている。しかしながら、本試料が EP で混入が禁止されている植物由来であった。この事実及び Sample 1 は、*A. montana* 由来ではなく、

A. chamissonis Less.. ssp. *foliosaa*. である可能性が高いことを考え合わせると、ヨーロッパの市場において、平成 16 年度の段階で *Arnica* の取り扱いに明らかに混乱が生じていることを示すものと考えられる。従って、食薬区分では、明確に基原種を規定することが非常に重要であり、食薬区分を正しく行うためには、個々の、成分・本質において、基原種を確認する方法の確立が重要であることが明らかとなった。

【E. 結論】

ヨーロッパ市場で購入したアルニカ関連製品について、各種分析を行い、各種クロマトグラフィーのプロファイル並びに構成成分情報より、いくつかの製品が、EP で規定した *A. montana* 由来でない可能性が高いことを示した。

【F. 参考文献】

- 1) 岡田稔 監修“新訂原色牧野和漢薬草大圖鑑 (NEWLY REVISED ILLUSTRATED MEDICINAL PLANTS OF THE WORLD). 北隆館. 2002. p.532 (ISBN 483260810X).
- 2) Douglas JA, Smallfield BM, Burgess EJ, Perry NB, Anderson RE, Douglas MH, Glennie VL. Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: a rapid analytical method and the effects of flower maturity and simulated mechanical harvesting on quality and yield. *Planta Med.*, **70**, 166-70 (2004).
- 3) Willuhn G, Rottger PM, Matthiesen U, Helenalin and 11 alpha,13-dihydrohelenalin esters from the flowers of *Arnica montana*. *Planta Med.*, **49**, 226-231 (1983).
- 4) Bomme U, Daniel G, First results on selection breeding of *Arnica montana*.

Gartenbauwissenschaft, **59**, 67-71 (1994).

- 5) European Pharmacopoeia 5th Ed., 15. Jun., (2004).
- 6) Willuhn G., Röttger. P.-M., Heterotheca inuloides Cass., die „Mexikanische Arnica“ *Dtsh. Apoth. Ztg.*, **120**, 1039-41(1980)
- 7) Willuhn G., Schneidert R., Matthiesen U., Mexikanische Arnikablüten. *Dtsh. Apoth. Ztg.*, **125**, 1941-44(1985)

【G. 健康危機情報】

特になし。

【H. 研究発表】

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

【I. 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
3. その他
なし



Fig. 1 アルニカ関連製品

Sample 1: 薬草茶(チェコ), Sample 2: 薬草茶(フランス), Sample 3: 錠剤(スイス), Sample 4: 丸剤 5CH(スイス), Sample 5: 丸剤 30CH(フランス), Sample 6: ゲル(スイス), Sample 7: ゲル(フランス), Sample 8: 抽出液(スイス), Sample 9: 抽出液(フランス).

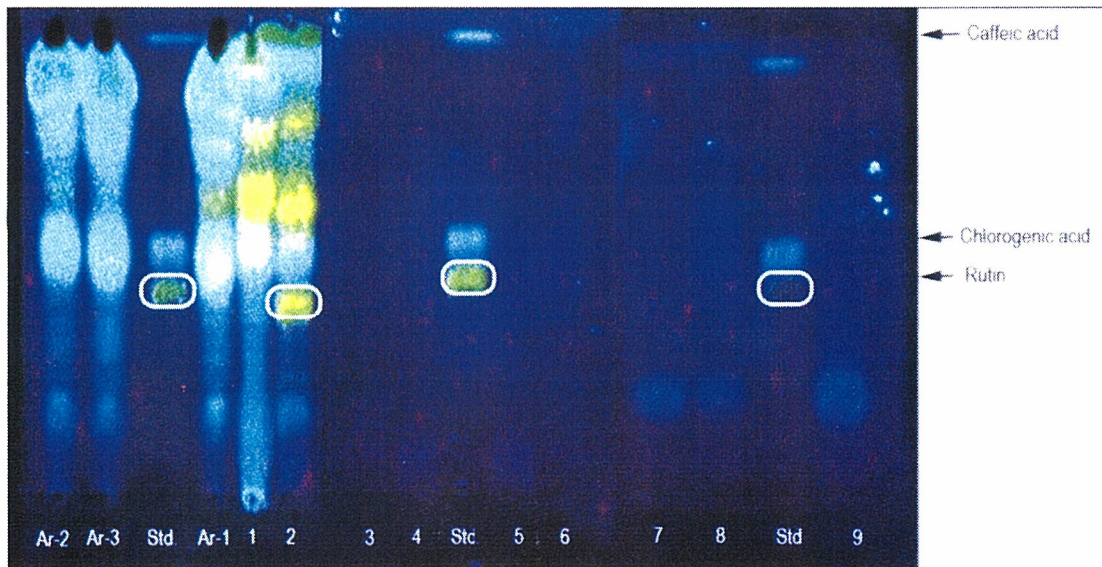


Fig. 4 *Arnica* 属全草試料及びアルニカ関連製品の TLC 分析

Ar-1: *Arnica montana*, Ar-2: *Arnica angustifolia*, Ar-3: *Arnica angustifolia*; 1: Sample 1, 2: Sample 2, 3: Sample 3, 4: Sample 4, 5: Sample 5, 6: Sample 6, 7: Sample 7, 8: Sample 8, 9: Sample 9, Std: standard (Caffeic acid, Chlorogenic acid, Rutin).

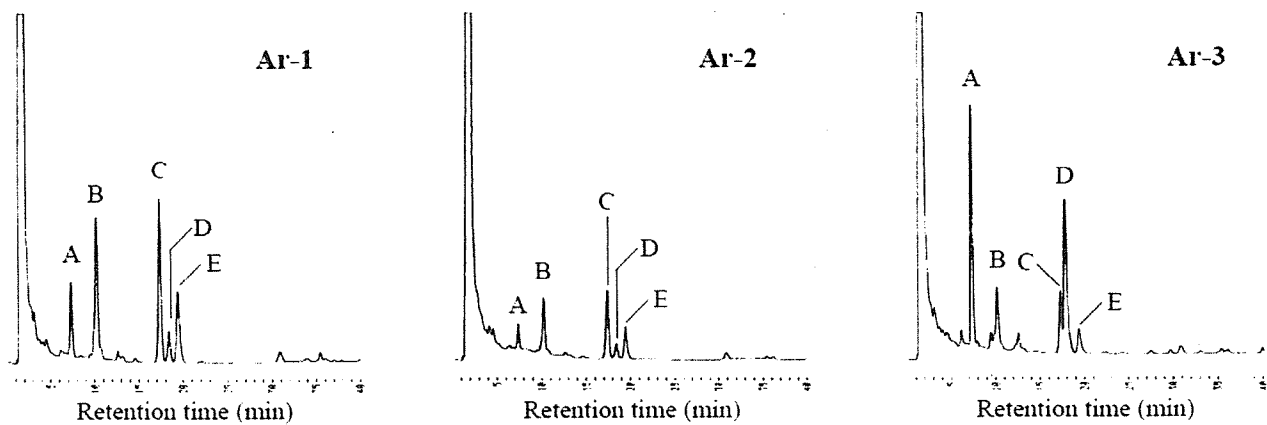


Fig. 2 *Arnica* 属全草試料の MeOH 抽出物の HPLC プロファイル

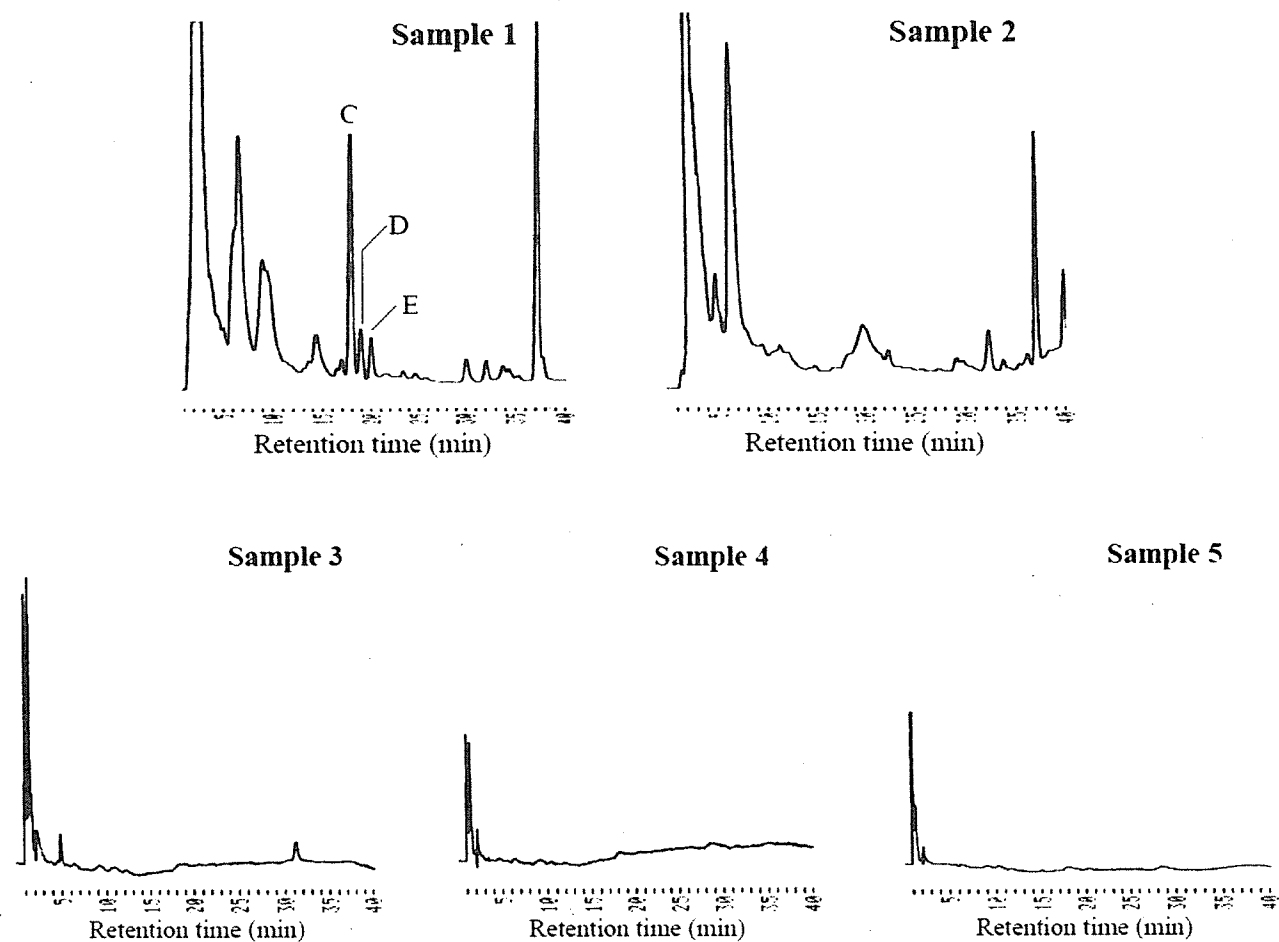


Fig. 3 アルニカ関連製品の MeOH 抽出物の HPLC プロファイル

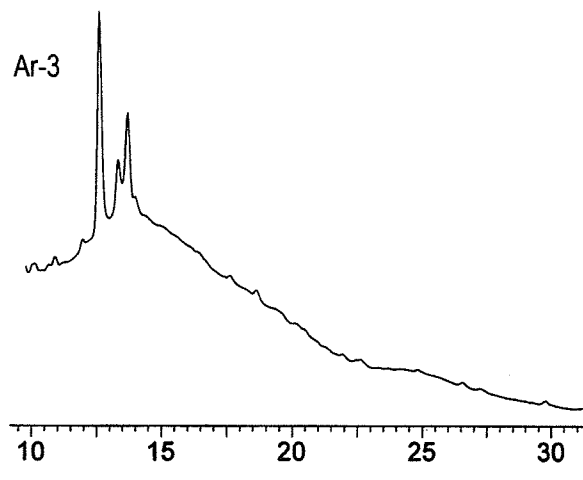
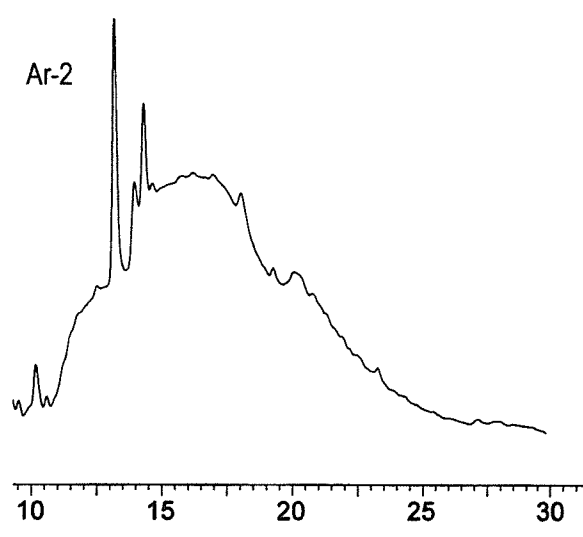
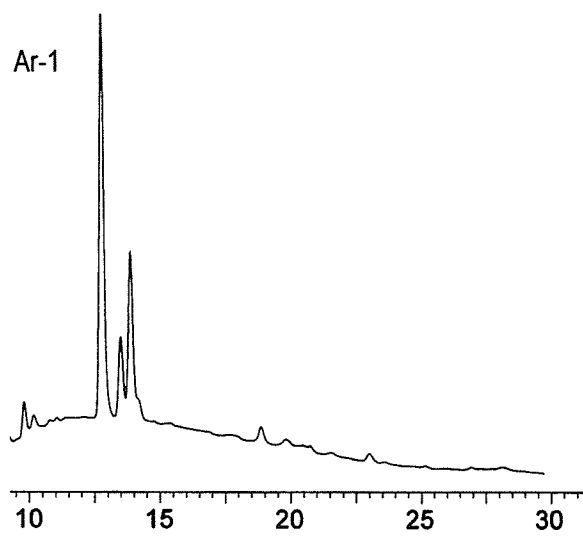


Fig.5-1 UV 225nm におけるクロマトグラム
Ar-1-3; *Arnica* 属全草試料

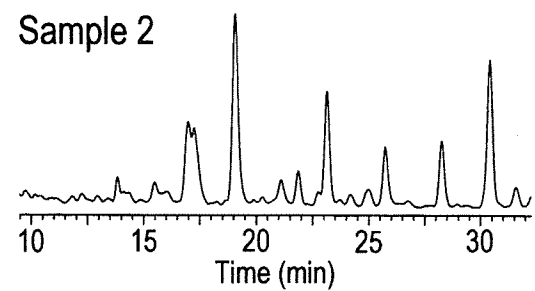
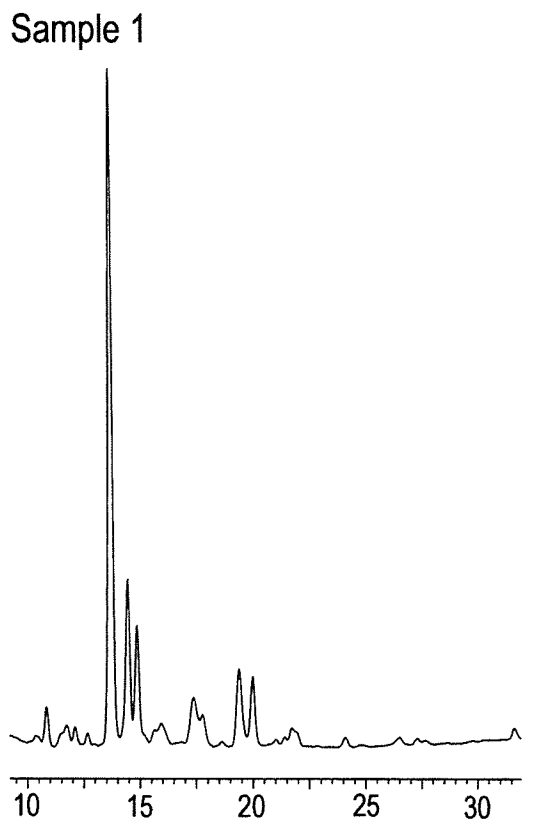


Fig.5-2 UV 225nm におけるクロマトグラム
Sample1, 2

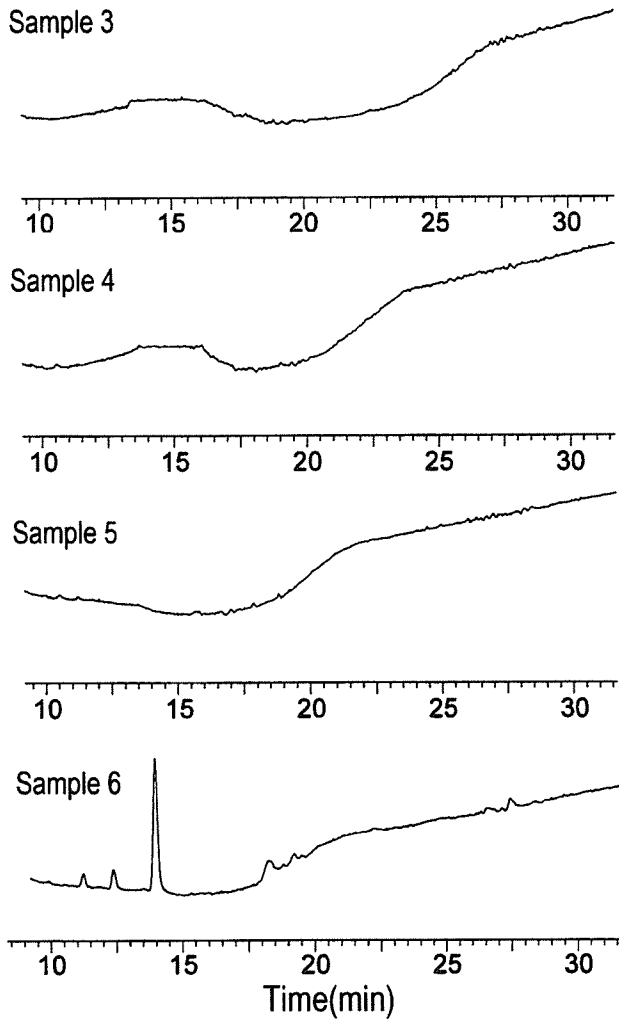


Fig.5-3 UV 225nmにおけるクロマトグラム

Sample 3-6

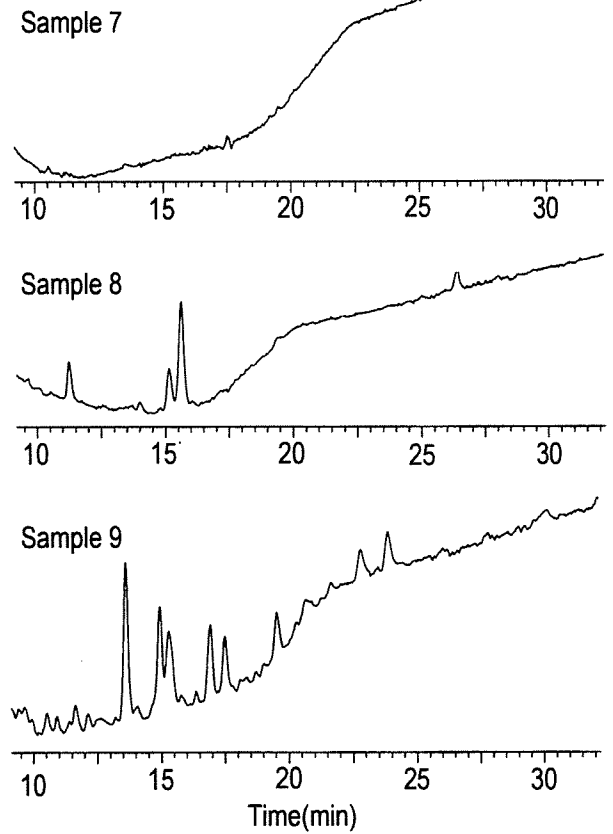


Fig.5-4 UV 225nmにおけるクロマトグラム

Sample 7-9

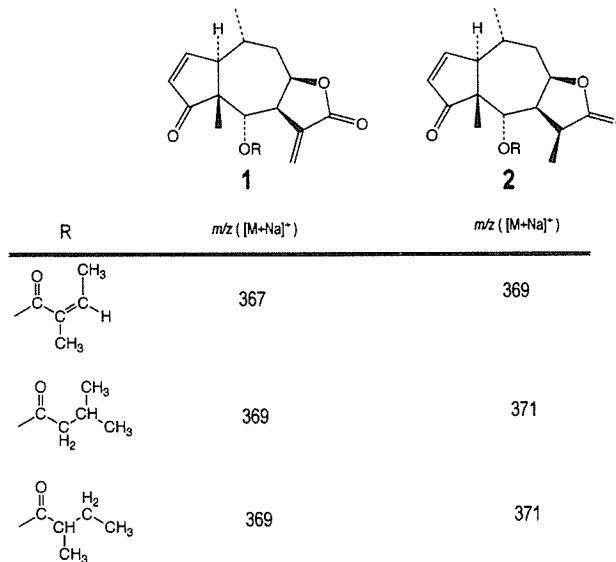


Fig. 6 ヘレナリン(1, R=H), ジヒドロヘレナリン(2, R=H)及びそれらのカルボン酸エステル類と分子量関連イオンの m/z 値

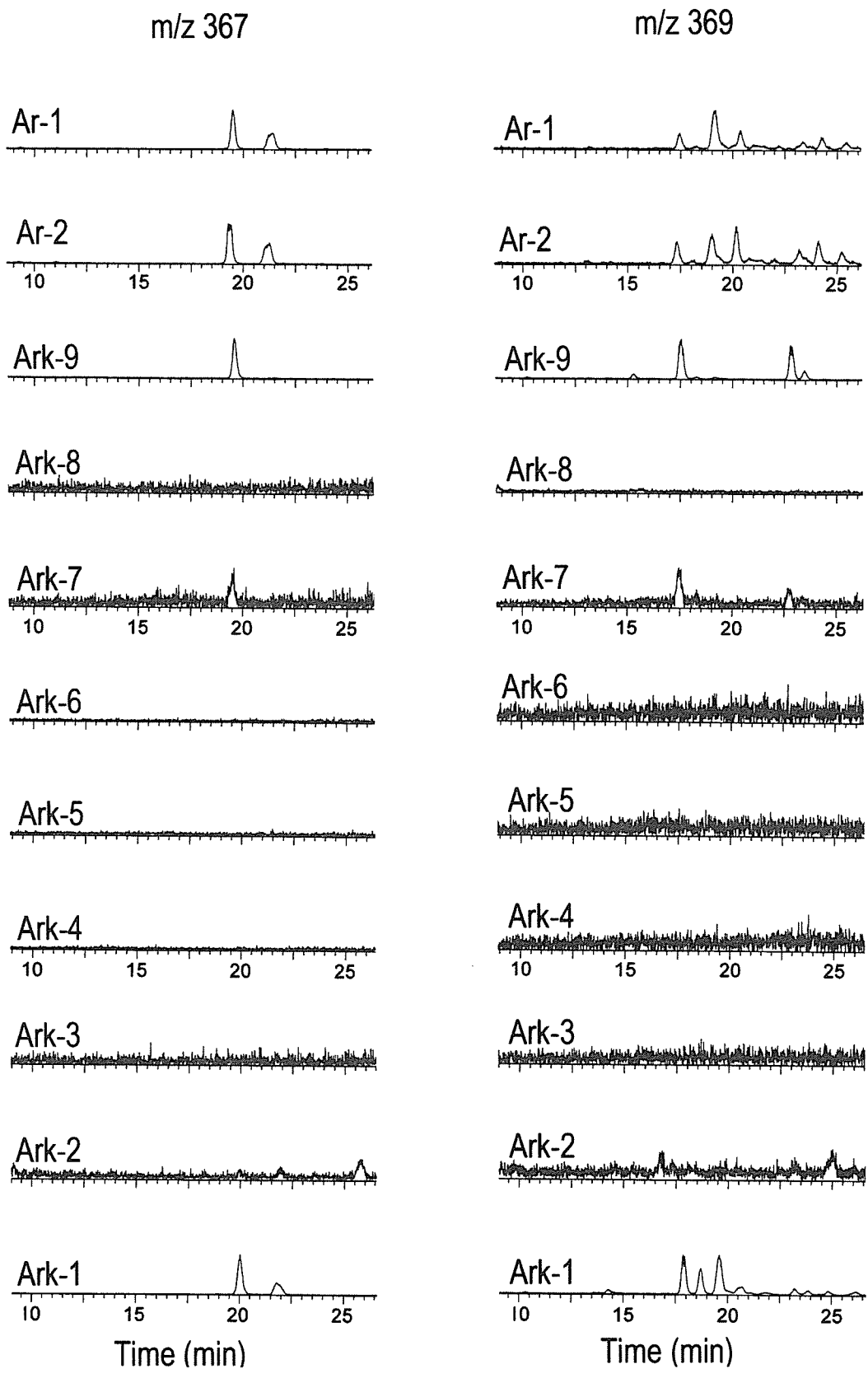


Fig. 7 ヘレナリン, ジヒドロヘレナリンカルボン酸エステル類の分子量関連イオンに相当するマスクロマトグラム

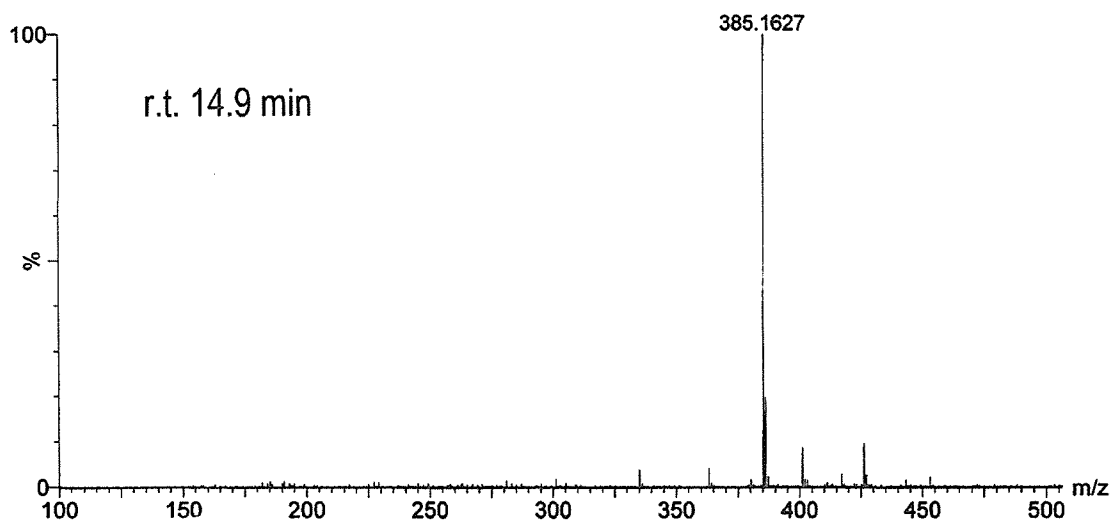
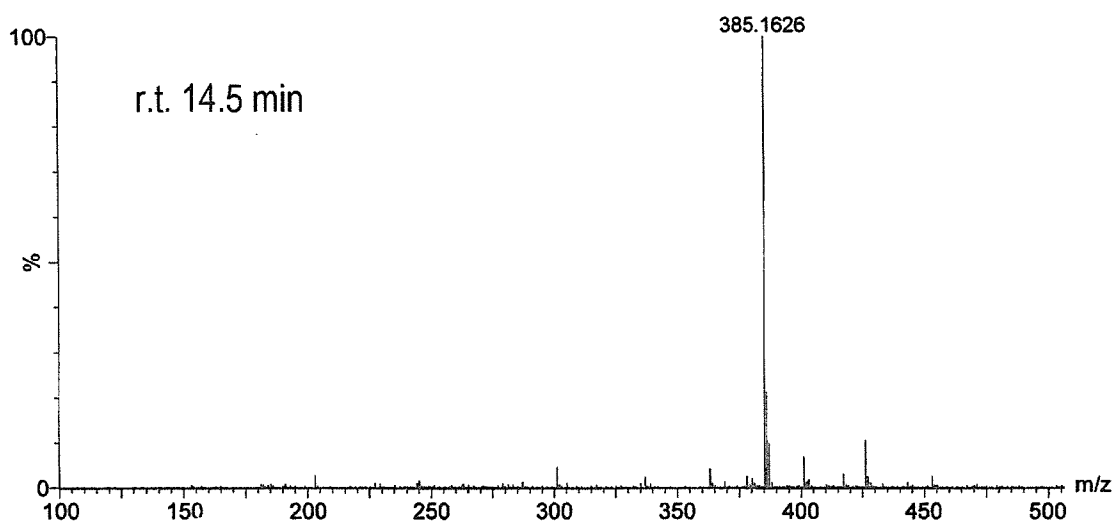
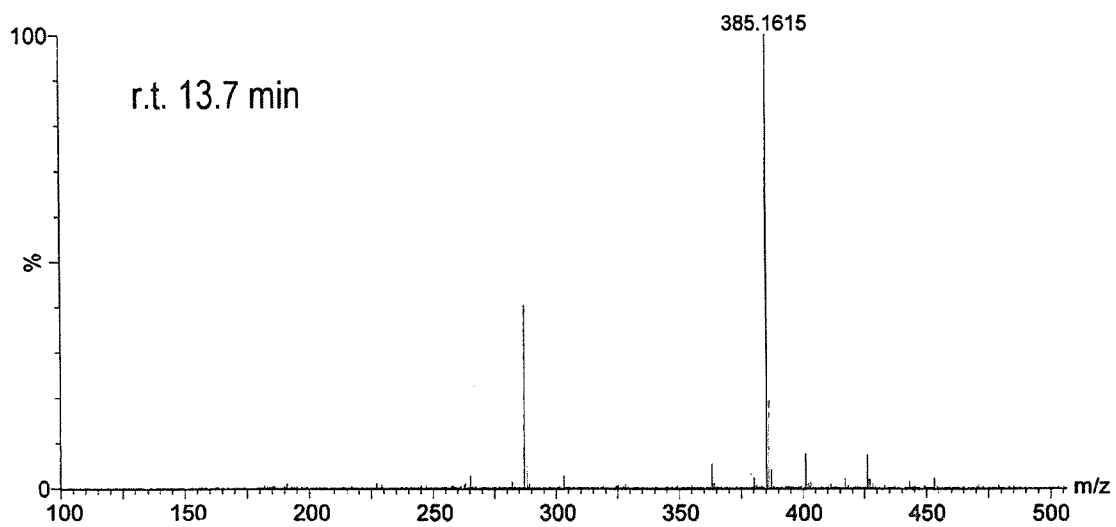


Fig.8 UV 225nm で観測された保持時間 13~15 分付近の 3 ピークの
高分解能マススペクトル

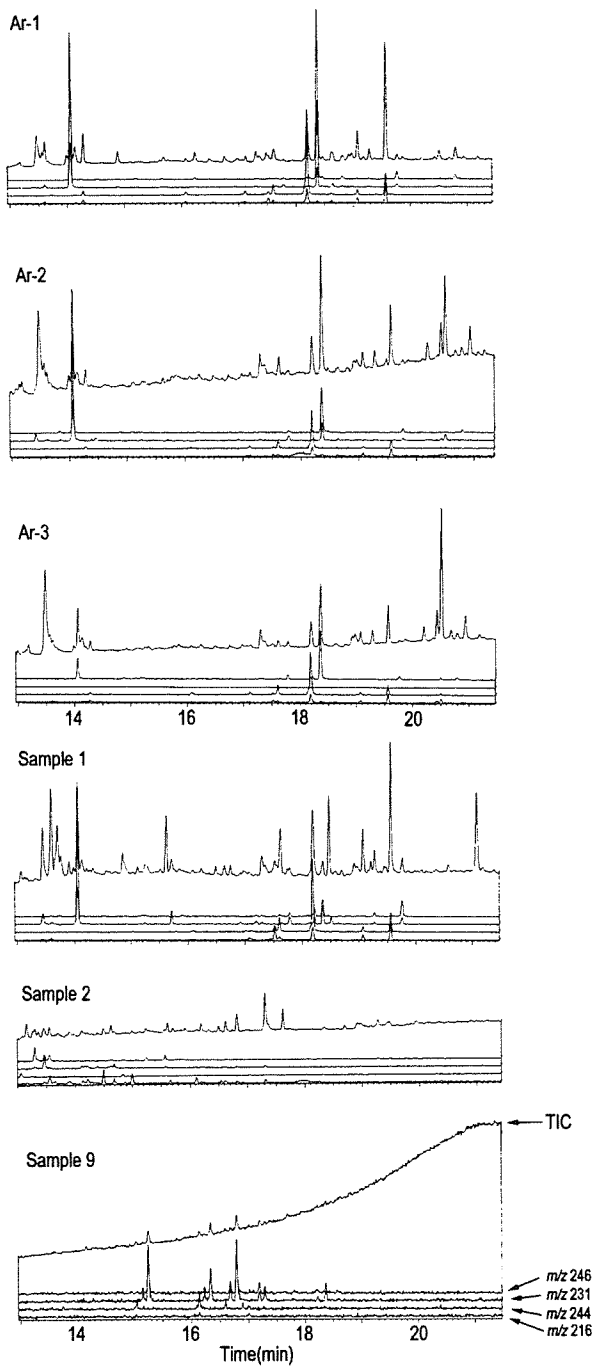


Fig. 9-1 *Arnica* 属全草試料, Sample 1, Sample 2, Sample 9 の全イオンクロマトグラム及び抽出マスクロマトグラム (m/z 246, 231, 244 及び 216)

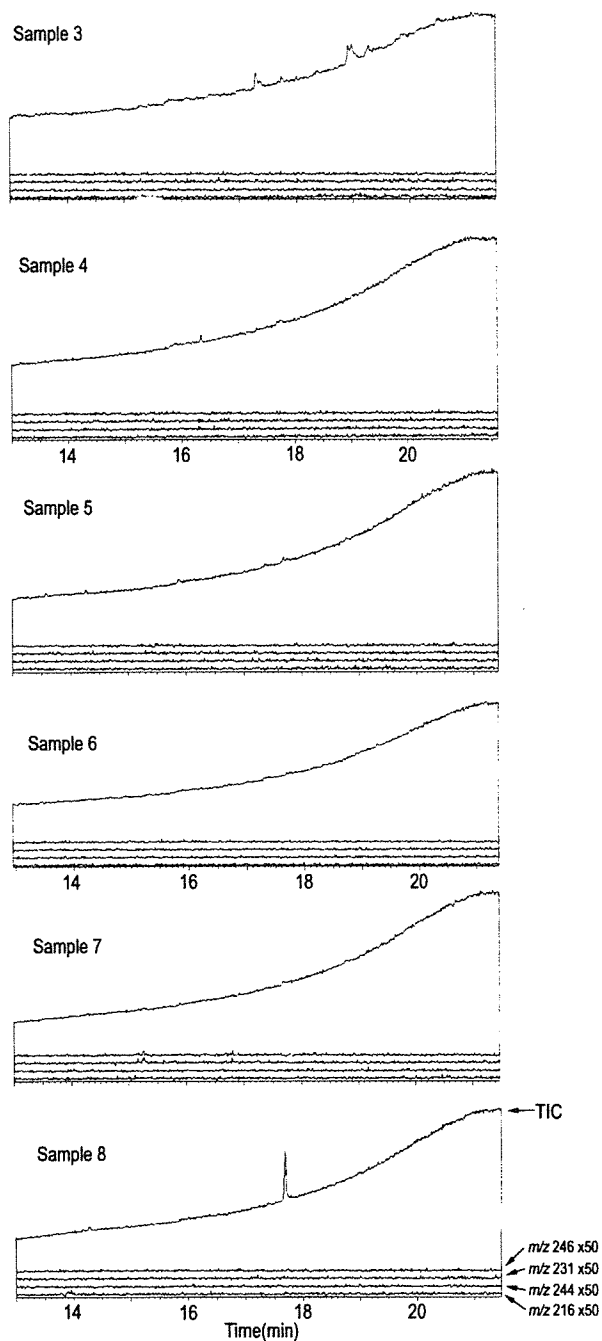


Fig. 9-2 Sample 3~8 の全イオンクロマトグラム及び抽出マスクロマトグラム (m/z 246, 231, 244 及び 216)

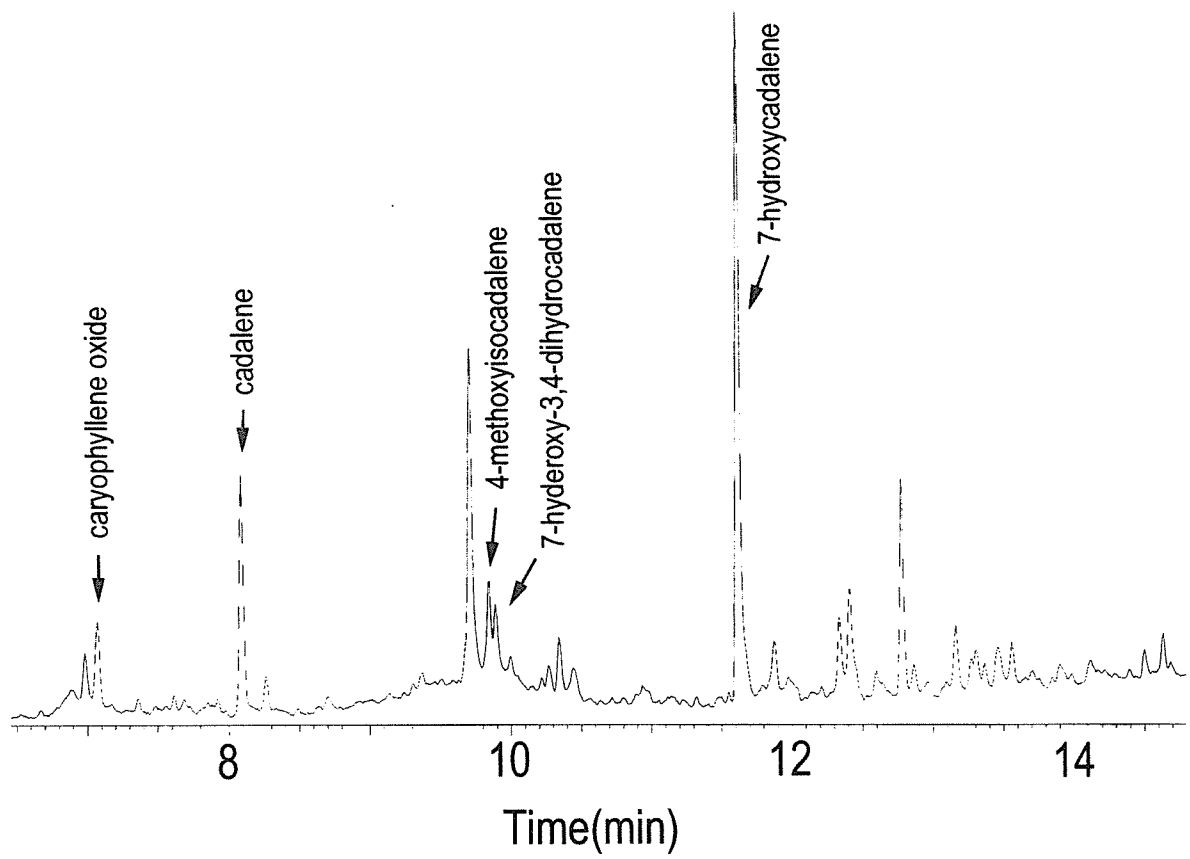


Fig. 10 Sample 2 で観測されたセスキテルペン類

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題「専ら医薬品」の有効性及び安全性等の評価に関する調査及び実証的研究
並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討

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

ヨーロッパ市場に流通するアルニカ製品の DNA 配列による基原植物の検討

研究要旨 ヨーロッパの薬局、薬店で購入したアルニカ製品の DNA 配列解析を行い、原料植物を調査した。その結果、EP において規定されている *A. montana* とは異なる基原の植物が使用されている検体が見出された。このものは、その DNA 配列及び文献情報から、別のキク科植物である *Heterotheca inuloides* であると推定された。本植物は、EP における純度試験により、排除されるべき種であり、本製品は、EP 不適合品であることが明らかとなった。従って、今後、アルニカについて食薬区分を再考する場合には、*A. montana* 以外の流通も考慮することが重要であると考えられた。

A. 研究目的

アルニカは、European Pharmacopeia (EP) に Arnica Flower として収載されているハーブである¹⁾。EP では、Arnica Flower は、*Arnica montana* L. の乾燥花部で、0.4% (m/m) 以上のセスキテルペンラクトン類 (dihydrohelenalin tiglate) を含むと規定している。一方、我が国では、アルニカの全草を「専ら医薬品として使用される成分本質」に指定している。しかし、ヨーロッパには、他の *Arnica* 属植物が多数分布している他、北米では、*Heterotheca inuloides* を“Mexican Arnica”と称しており、Arnica Flower の原料植物に *A. montana* 以外の種が使用されている可能性もある。本研究では、ヨーロッパの薬局、薬店で購入したアルニカ製品に関する品質調査の一環として、当該製品の原料植物を DNA 配列解析により調査した。

B. 研究方法

1. 実験材料

アルニカ製品については、一昨年度、花尻分担研究者が欧州各国において購入したもののうち、DNA の調製が可能な葉草茶、2 検体を用いた (表 1)。*A. montana* 及び *A. angustifolia* 標品には、(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部より分譲を受けたものを用いた (表 2)。

2. 実験方法

各試料を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて凍結粉碎した後、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型とし、植物の rDNA に保存性の高い領域に設計した各プライマー対を用いて、PCR を行うことにより、核 rDNA の ITS 領域 (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) を増幅した。PCR は、酵素に KOD DNA

polymerase (Toyobo) を用い、以下の温度プログラムにより行った：96°C 4 min; 98°C 15sec, 50°C 5 sec, 74°C 30 sec, 40 cycles; 74°C 4min。得られた PCR 産物を、Microcon-PCR (Millipore) により、精製した後、ダイレクトシーケンスへと供した。また、Ark-1 由来の PCR 産物について行ったサブクローニングには、Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いた。Cycle sequencing 反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、解析は、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムを用いて行った。本研究に用いたプライマーの配列は、White らの報告²⁾にある ITS5 及び ITS4 によった。

C. 研究結果

標品 2 種 3 個体の ITS 塩基配列は、全て同一の配列を示した。この結果は、*A. montana* と *A. angustifolia* が、ITS 領域において、同一の配列を有するか、あるいは、どちらかの種の同定に誤りがあるのか、どちらかを意味すると考えられる。これについては、今後、他の標準植物試料を入手し、確認する必要がある。なお、本配列を、Blast search program により同源性検索したところ、国際塩基配列データベース上の *A. mollis* (Acc. No.: M93789) 及び *A. longifolia* (AF229302) と 97% の同源性を示した(表 3)。

各検体の塩基配列解析では、Ark-1 は、よく似た複数の配列の混合物として検出された。PCR 産物をサブクローニングし、6 つのクローンについて、塩基配列解析を行ったところ、2 つのクローンが、上述の標準試料の配列とほぼ一致した。残る 4 つのクローンについては、いずれも異なる配列を示したが、これらの配列もデータベース上の *Arnica* 属植物のものと高い同源性を有していた(図 1、表 3)。

このことから、Ark-1 の原料植物は、複数の *Arnica* 属植物の混合物であるか、あるいは、複数の *Arnica* 属植物の雑種であると考えられた。この点を確認するため、次に、Ark-1 より、単一の個体からなる種子及び萼片を取り出し、それぞれ、別々に DNA 配列解析に供した。このものから得られた ITS 配列は、いずれも、複数個体より調製した DNA から得られた配列パターンと同様、複数の配列の混合物として検出された(図 1)。このことから、Ark-1 の原料植物は、多数の *Arnica* 属植物が、複雑に交配した個体であると考えられた。

一方、Ark-2 から得られた ITS 配列は、*Arnica* 属植物との同源性が、70% 程度と低かった。このものの同源性検索の結果は、*Heterotheca fulcrata* (U97615)、*Croptilon rigidifolium* (U97606)、*Chrysopsis gossypina* (AF046993) など、他のキク科植物が上位を占めた(表 3)。

D. 考察

今回の研究で得られた配列及びデータベース上の *Arnica* 属植物の配列を基に作成した系統樹を図 2 に示した。図で、*Platycodon grandiflorus* (AF134863) は、out group、また、標準植物は、全て同一配列のため、Ark-1 のみを示した。系統樹は、3 つの群に分かれ、欧州・北米分布種 (group 1)、国内分布種 (group 2) 及び *Heterotheca* 属と高い同源性を示した Ark-2 に、それぞれ分類された。Ark-1 由来の 6 つのクローンの配列は、いずれも group 1 に分類されており、このことから、Ark-1 の原料植物は、欧州に分布する *Arnica* 属植物同士の交配種であることが示唆された。Ark-2 の配列と最も高い同源性を示した *Heterotheca* 属植物の中で、*H. inuloides* は、1980 年代、欧州において、*Arnica montana* との混同が指摘されている³⁻⁵⁾。また、本種は、Mexican arnica と呼ばれ、メキシコにおいて、

Arnica montana と同様に使用することが知られている⁶⁾。Ark-1 及び Ark-2 に含まれる種子を取り出し観察したところ、両者には、その形状に明確な違いが認められた。すなわち、Ark-1 (*Arnica* sp.) の種子は、長軸がより長く、針状の形状をしているのに対し、Ark-2 (*Heterotheca* sp.) のものは、長軸が短く、また、短軸も大きく、太っている(図3)。この特徴は、文献³⁾にある *Arnica montana* と *Heterotheca inuloides* の種子についての記述とよく一致する。以上のことから、Ark-2 の原料植物は、*Heterotheca inuloides* であると考えられる。

EP では、*H. inuloides* や *Calendula officinalis* の Arnica Flower への混入を避けるために、TLC による純度試験(rutin の不検出)を規定しているが、今回の結果から、ヨーロッパの薬局、薬店で扱われるアルニカ製品の一部には、EP に不適合なものが存在することが確認できた。今後、国内及び米国に範囲を広げ、アルニカ製品の基原種調査を行う予定である。

E. 結論

DNA 配列解析により、ヨーロッパ産アルニカ製品の基原植物の調査を行った結果、EP 記載の基原植物とは異なる *Heterotheca inuloides* の存在が明らかになった。この種は、EP が純度試験による排除を規定している種であり、ヨーロッパ市場に流通するアルニカ製品には、EP に準拠していないものが存在することが確認された。従って、アルニカについて食薬区分を再考する場合には、*A. montana* 以外の流通も考慮することが重要であると考えられた。

F. 参考文献

- 1) European Pharmacopoeia 5th Ed., 15, Jun., 2004.
- 2) T. J. White, T. Bruns, S. Lee *et al.*, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA

genes for phylogenetics, in M. A. Innis *et al.* ed., PCR Protocols-A guide to methods and applications, Academic press, San Diego, USA (1990).

- 3) Saukel J., Pharmacobotanical investigations of plant drugs. Part 3. Differentiation between *Arnica montana* L. and *Heterotheca inuloides* Cass., *Sci. Pharm.*, **52**, 35-46 (1984).
- 4) Willuhn G., Rottger P. M., *Heterotheca inuloides* Cass, the Mexican Arnica, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **120**, 1039-1042 (1980).
- 5) Willuhn G., Schneider R., Mattiesen U., Mexican arnica flowers: composition of the essential oil of the inflorescences of *Heterotheca inuloides*, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **125**, 1941-1944 (1985).
- 6) Delgado G., Oliveres M. D. S., Chávez M. I., Ramírez-Apan T., Linares E., Bye R., Espinosa-Garcia F. J., Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*, *J. Nat. Prod.*, **64**, 861-864 (2001).

G. 研究発表

1. 学会発表
無し
2. 誌上発表
無し

H. 知的財産権の出願、登録状況

無し

I. 健康危機情報

本研究で、アルニカとしての流通が明らかになった *Heterotheca inuloides* は、メキシコにおいて、アルニカ同様、外用薬としての使用実態があり、「専ら医薬品」として扱われている限り、国民への健康被害の恐れは低いものと思われる。

```

clone 1  GGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAAATCCTGCATAGC 70
clone 2  GGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAAATCCTGCATAGC 70
clone 3  GGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAAATCCTGCATAGC 70
clone 4  GGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAAATCCTGCATAGC 70
clone 5  GGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAAATCCTGCATAGC 70
clone 6  GGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAAATCCTGCATAGC 70
Ark-1 seed  -----
Ark-1 coly. ----- 0

clone 1  AGAACGACCCGTGAACACGTACAAACAACATGGCTTAAAGAGGACCGGATTCATTGTTTGGGGCCTCGTTA 140
clone 2  AGAACGACCCGTGAACACGTACAAACAACATGGCTTAAAGAGGACCGGATTCATTGTTTGGGGCCTCGTTA 140
clone 3  AGAACGACCCGTGAACACGTACAAACAACATGGCTTAAAGAGGACCGGATTCATTGTTTGGGGCCTCGTTA 140
clone 4  AGAACGACCCGTGAACACGTACAAACAACATGGCTTAAAGAGGACCGGATTCATTGTTTGGGGCCTCGTTA 140
clone 5  AGAACGACCCGTGAACACGTACAAACAACATGGCTTAAAGAGGACCGGATTCATTGTTTGGGGCCTCGTTA 140
clone 6  AGAACGACCCGTGAACACGTACAAACAACATGGCTTAAAGAGGACCGGATTCATTGTTTGGGGCCTCGTTA 140
Ark-1 seed  -----GAAACACGTACAAACAACATGGCTTAAAGAGGACCGGATTCATTGTTTGGGGCCTCGTTA 58
Ark-1 coly. -----GAAACACGTACAAACAACATGGCTTAAAGAGGACCGGATTCATTGTTTGGGGCCTCGTTA 58

clone 1  AGCCCTCCTGTCGACATTGTGTTTATGATCTCCTCTTTAGGACTCATGGACATCATGCTGGGCACAAACAACAAC 210
clone 2  AGCCCTCCTGTCGACATTGTGTTTATGATCTCCTCTTTAGGACTCATGGACATCATGCTGGGCACAAACAACAAC 210
clone 3  AGCCCTCCTGTCGACATTGTGTTTATGATCTCCTCTTTAGGACTCATGGACATCATGCTGGGCACAAACAACAAC 210
clone 4  AGCCCTCCTGTCGACATTGTGTTTATGATCTCCTCTTTAGGACTCATGGACATCATGCTGGGCACAAACAACAAC 210
clone 5  AGCCCTCCTGTCGACATTGTGTTTATGATCTCCTCTTTAGGACTCATGGACATCATGCTGGGCACAAACAACAAC 210
clone 6  AGCCCTCCTGTCGACATTGTGTTTATGATCTCCTCTTTAGGACTCATGGACATCATGCTGGGCACAAACAACAAC 210
Ark-1 seed  -----GTCGACATTGTGTTTATGATCTCCTCTTTAGGACTCATGGACATCATGCTGGGCACAAACAACAAC 128
Ark-1 coly. -----GTCGACATTGTGTTTATGATCTCCTCTTTAGGACTCATGGACATCATGCTGGGCACAAACAACAAC 128

clone 1  CCCCAGCACAAACATGTGCCAAGGAAAAACAAACTTAAAGAAAGGCTGTGTCATGACACCCTTTTCTGGTG 280
clone 2  CCCCAGCACAAACATGTGCCAAGGAAAAACAAACTTAAAGAAAGGCTGTGTCATGACACCCTTTTCTGGTG 280
clone 3  CCCCAGCACAAACATGTGCCAAGGAAAAACAAACTTAAAGAAAGGCTGTGTCATGACACCCTTTTCTGGTG 280
clone 4  CCCCAGCACAAACATGTGCCAAGGAAAAACAAACTTAAAGAAAGGCTGTGTCATGACACCCTTTTCTGGTG 280
clone 5  CCCCAGCACAAACATGTGCCAAGGAAAAACAAACTTAAAGAAAGGCTGTGTCATGACACCCTTTTCTGGTG 280
clone 6  CCCCAGCACAAACATGTGCCAAGGAAAAACAAACTTAAAGAAAGGCTGTGTCATGACACCCTTTTCTGGTG 280
Ark-1 seed  -----GTCGACATTGTGTTTATGATCTCCTCTTTAGGACTCATGGACATCATGCTGGGCACAAACAACAAC 128
Ark-1 coly. -----GTCGACATTGTGTTTATGATCTCCTCTTTAGGACTCATGGACATCATGCTGGGCACAAACAACAAC 128

clone 1  GTGCTCATTGTGGTGGCTTCTTTCAAATCTTAAACGACTCTCGGCAACGSAATATCTCGGCTCACGGCATT 350
clone 2  GTGCTCATTGTGGTGGCTTCTTTCAAATCTTAAACGACTCTCGGCAACGSAATATCTCGGCTCACGGCATT 350
clone 3  GTGCTCATTGTGGTGGCTTCTTTCAAATCTTAAACGACTCTCGGCAACGSAATATCTCGGCTCACGGCATT 350
clone 4  GTGCTCATTGTGGTGGCTTCTTTCAAATCTTAAACGACTCTCGGCAACGSAATATCTCGGCTCACGGCATT 350
clone 5  GTGCTCATTGTGGTGGCTTCTTTCAAATCTTAAACGACTCTCGGCAACGSAATATCTCGGCTCACGGCATT 350
clone 6  GTGCTCATTGTGGTGGCTTCTTTCAAATCTTAAACGACTCTCGGCAACGSAATATCTCGGCTCACGGCATT 350
Ark-1 seed  -----GTGCTCATTGTGGTGGCTTCTTTCAAATCTTAAACGACTCTCGGCAACGSAATATCTCGGCTCACGGCATT 268
Ark-1 coly. -----GTGCTCATTGTGGTGGCTTCTTTCAAATCTTAAACGACTCTCGGCAACGSAATATCTCGGCTCACGGCATT 268

clone 1  GATGAAAGAACGTAGCAAAAATGCGATACCTGGGTGTGAATTGCAAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGA 420
clone 2  GATGAAAGAACGTAGCAAAAATGCGATACCTGGGTGTGAATTGCAAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGA 420
clone 3  GATGAAAGAACGTAGCAAAAATGCGATACCTGGGTGTGAATTGCAAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGA 420
clone 4  GATGAAAGAACGTAGCAAAAATGCGATACCTGGGTGTGAATTGCAAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGA 420
clone 5  GATGAAAGAACGTAGCAAAAATGCGATACCTGGGTGTGAATTGCAAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGA 420
clone 6  GATGAAAGAACGTAGCAAAAATGCGATACCTGGGTGTGAATTGCAAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGA 420
Ark-1 seed  -----GATGAAAGAACGTAGCAAAAATGCGATACCTGGGTGTGAATTGCAAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGA 338
Ark-1 coly. -----GATGAAAGAACGTAGCAAAAATGCGATACCTGGGTGTGAATTGCAAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGA 338

clone 1  CGCAAAGTTGCGCCGAAAGCCTTCTGGTTGAGGGCACGCTGCTGGGGCTCACGCAATCACGCTCGCCCA 490
clone 2  CGCAAAGTTGCGCCGAAAGCCTTCTGGTTGAGGGCACGCTGCTGGGGCTCACGCAATCACGCTCGCCCA 490
clone 3  CGCAAAGTTGCGCCGAAAGCCTTCTGGTTGAGGGCACGCTGCTGGGGCTCACGCAATCACGCTCGCCCA 490
clone 4  CGCAAAGTTGCGCCGAAAGCCTTCTGGTTGAGGGCACGCTGCTGGGGCTCACGCAATCACGCTCGCCCA 490
clone 5  CGCAAAGTTGCGCCGAAAGCCTTCTGGTTGAGGGCACGCTGCTGGGGCTCACGCAATCACGCTCGCCCA 490
clone 6  CGCAAAGTTGCGCCGAAAGCCTTCTGGTTGAGGGCACGCTGCTGGGGCTCACGCAATCACGCTCGCCCA 490
Ark-1 seed  -----CGCAAAGTTGCGCCGAAAGCCTTCTGGTTGAGGGCACGCTGCTGGGGCTCACGCAATCACGCTCGCCCA 408
Ark-1 coly. -----CGCAAAGTTGCGCCGAAAGCCTTCTGGTTGAGGGCACGCTGCTGGGGCTCACGCAATCACGCTCGCCCA 408

clone 1  CCAATCATCTCTTGGCAGGATGCGTTGGATGTGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGTAAATGACGCGGTTGG 560
clone 2  CCAATCATCTCTTGGCAGGATGCGTTGGATGTGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGTAAATGACGCGGTTGG 560
clone 3  CCAATCATCTCTTGGCAGGATGCGTTGGATGTGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGTAAATGACGCGGTTGG 560
clone 4  CCAATCATCTCTTGGCAGGATGCGTTGGATGTGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGTAAATGACGCGGTTGG 560
clone 5  CCAATCATCTCTTGGCAGGATGCGTTGGATGTGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGTAAATGACGCGGTTGG 560
clone 6  CCAATCATCTCTTGGCAGGATGCGTTGGATGTGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGTAAATGACGCGGTTGG 560
Ark-1 seed  -----CCAATCATCTCTTGGCAGGATGCGTTGGATGTGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGTAAATGACGCGGTTGG 478
Ark-1 coly. -----CCAATCATCTCTTGGCAGGATGCGTTGGATGTGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGTAAATGACGCGGTTGG 478

clone 1  CTAAATATGAGTCCCATCAAGAGGGACGCTGACTAGTGGTGGTTGATTACACAGTCTGCTGTTGTTG 620
clone 2  CTAAATATGAGTCCCATCAAGAGGGACGCTGACTAGTGGTGGTTGATTACACAGTCTGCTGTTGTTG 620
clone 3  CTAAATATGAGTCCCATCAAGAGGGACGCTGACTAGTGGTGGTTGATTACACAGTCTGCTGTTGTTG 620
clone 4  CTAAATATGAGTCCCATCAAGAGGGACGCTGACTAGTGGTGGTTGATTACACAGTCTGCTGTTGTTG 620
clone 5  CTAAATATGAGTCCCATCAAGAGGGACGCTGACTAGTGGTGGTTGATTACACAGTCTGCTGTTGTTG 620
clone 6  CTAAATATGAGTCCCATCAAGAGGGACGCTGACTAGTGGTGGTTGATTACACAGTCTGCTGTTGTTG 620
Ark-1 seed  -----CTAAATATGAGTCCCATCAAGAGGGACGCTGACTAGTGGTGGTTGATTACACAGTCTGCTGTTGTTG 548
Ark-1 coly. -----CTAAATATGAGTCCCATCAAGAGGGACGCTGACTAGTGGTGGTTGATTACACAGTCTGCTGTTGTTG 548

clone 1  GGTCTTGTGATCTTGAAGGGTAAAGGCTTAAAATACCTGATGTGTGTCTTCTGATGGGGCTTCGATCG 700
clone 2  GGTCTTGTGATCTTGAAGGGTAAAGGCTTAAAATACCTGATGTGTGTCTTCTGATGGGGCTTCGATCG 700
clone 3  GGTCTTGTGATCTTGAAGGGTAAAGGCTTAAAATACCTGATGTGTGTCTTCTGATGGGGCTTCGATCG 700
clone 4  GGTCTTGTGATCTTGAAGGGTAAAGGCTTAAAATACCTGATGTGTGTCTTCTGATGGGGCTTCGATCG 700
clone 5  GGTCTTGTGATCTTGAAGGGTAAAGGCTTAAAATACCTGATGTGTGTCTTCTGATGGGGCTTCGATCG 700
clone 6  GGTCTTGTGATCTTGAAGGGTAAAGGCTTAAAATACCTGATGTGTGTCTTCTGATGGGGCTTCGATCG 700
Ark-1 seed  -----GGTCTTGTGATCTTGAAGGGTAAAGGCTTAAAATACCTGATGTGTGTCTTCTGATGGGGCTTCGATCG 699
Ark-1 coly. -----GGTCTTGTGATCTTGAAGGGTAAAGGCTTAAAATACCTGATGTGTGTCTTCTGATGGGGCTTCGATCG 699

clone 1  CGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA 737
clone 2  CGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA 737
clone 3  CGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA 737
clone 4  CGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA 737
clone 5  CGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA 737
clone 6  CGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA 736
Ark-1 seed  -----CGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA 559
Ark-1 coly. -----CGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA 575

```

図 1 Ark-1 由来 PCR 産物の ITS 配列

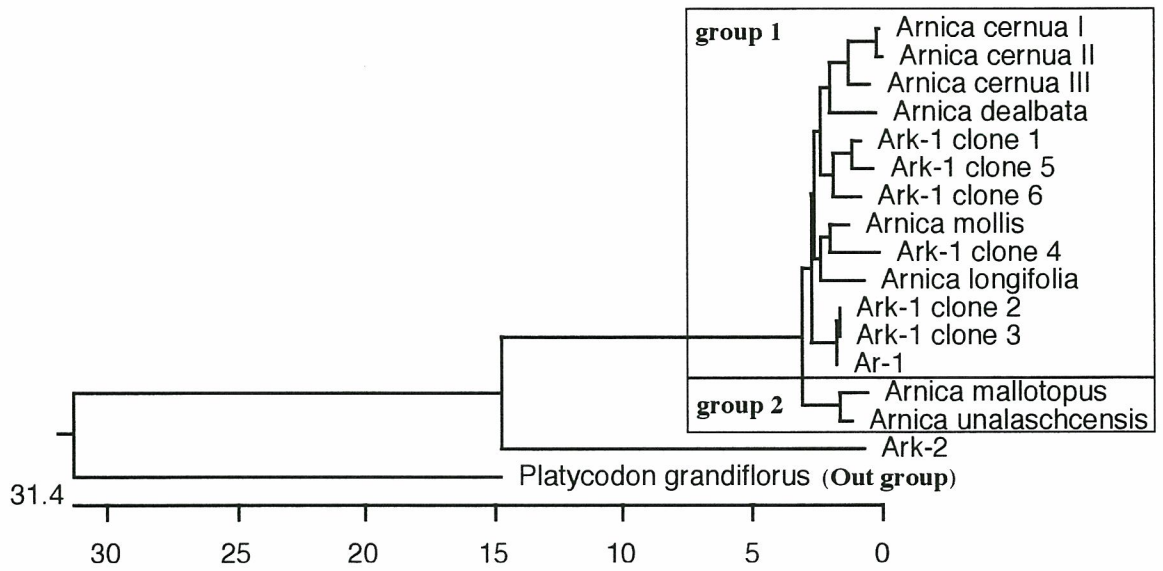


図2 *Arnica* 属植物及びアルニカ市場品の ITS 配列に基づく分子系統樹

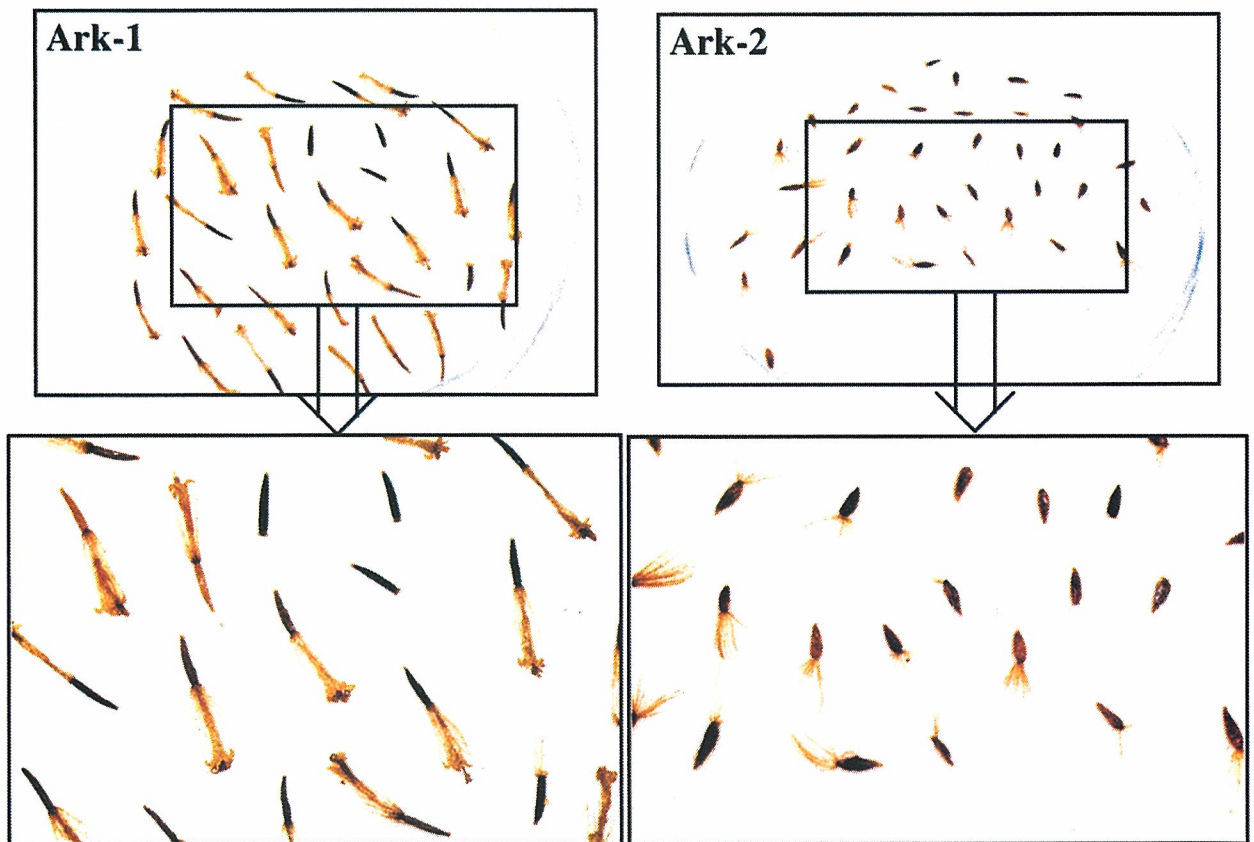


図3 アルニカ製品中の種子

表 1 本研究に使用した *Arnica* 製品

Sample #	Product name	Country	Sold form	Discription
Ark-1	Arnika kvet	チェコ	薬草茶	
Ark-2	ARNICA	フランス	薬草茶	<i>Arnica montana</i>

表 2 本研究に使用した *Arnica* 属標準試料

Sample #	species	locality	vouchor #	collection date
Ar-1	<i>Arnica montana</i>	基盤研北海道	13164-91HK	2005.8.31
Ar-2	<i>A. angustifolia</i>	基盤研北海道	13158-91HK	2005.8.31
Ar-3	<i>A. angustifolia</i>	基盤研北海道	13159-91HK	2005.8.31

表 3 *Arnica* 属植物及び市場品の相同性検索結果

Sample #	Similarity		
Ar-1 ~ Ar-3	<i>Arnica mollis</i> (97)	<i>A. longifolia</i> (97)	
Ark-1 clone 1	<i>Arnica mollis</i> (96)	<i>A. cernua</i> (96)) identical with authentic samples
clone 2	<i>Arnica longifolia</i> (97)	<i>A. mollis</i> (97)	
clone 3	<i>Arnica longifolia</i> (97)	<i>A. mollis</i> (97)	
clone 4	<i>Arnica mollis</i> (96)	<i>A. longifolia</i> (95)	
clone 5	<i>Arnica mollis</i> (96)	<i>A. cernua</i> (96)	
clone 6	<i>Arnica mollis</i> (96)	<i>A. cernua</i> (95)	
Ark-2	<i>Heterotheca fulcrata</i> (98)	<i>Croptilon rigidifolium</i> (96)	<i>Chrysopsis gossypina</i> (95)

分担研究課題「専ら医薬品」の有効性及び安全性等の評価に関する調査及び実証的研究
並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討

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

違法ドラッグ(脱法ドラッグ)市場に流通する植物の基原種について

研究要旨 違法ドラッグ市場に流通する植物系ドラッグのうち、ダツラ、モーニンググローリー、ハワイアンウッドローズについて、基源植物標品の DNA 配列情報を整備すると共に、その情報に基づき、上記違法ドラッグの市場品の基原種鑑別を行った。その結果、上記商品の基原種は、概ね、商品名から予想される植物であった。

A. 研究目的

近年、幻覚性植物を利用した違法ドラッグ(脱法ドラッグ)が、アダルトショップやインターネット上の販売店を通じて流通している。これらの中には、専ら医薬品として使用される成分本質に指定されている *Datura* 属(リスト上での名称: チョウセンアサガオ属、他名等: チョウセンアサガオ、部位等: 種子、花、葉、学名: *Datura* sp.) やアサガオ(リスト上での名称: ケンゴシ、他名等: アサガオ、部位等: 種子、学名 *Pharbitis nil* Choisy) の種子も含まれている。これらは、観賞用植物標本などとして販売し、食品衛生法や薬事法の適用外であると称しているが、インターネット上の販売店の説明書きをみると、幻覚作用を目的とした商品として販売しているのは明らかで、植物系の違法ドラッグ類であると考えられる。これらの違法ドラッグは、摂取・乱用することで、健康被害が発生する可能性が高いだけでなく、麻薬や向精神薬へのゲートウェイドラッグとなる危険性が高いため、早急な実態調査

と、調査結果に基づいた対策が必要と考えられる。本研究では、植物系違法ドラッグの実態調査を目的に、市場に流通するダツラ、モーニンググローリー、ハワイアン(ベビー)ウッドローズについて、DNA 配列解析を利用した基原種鑑別を行ったので報告する。なお、*Datura* 属植物の分類は、A. G. Avery のものに従った¹⁾。

B. 研究方法

1. 実験材料

DNA 配列の比較用標準試料として、東京都薬用植物園及び(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部より分譲を受けた20個体の葉部を用いた(表1)。各市場品には、インターネット上の販売店より購入した9検体を用いた(表2)。

2. 実験方法

各試料を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて凍結粉碎した後、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、genomic DNA を抽出、精製した。その

際、各標準試料は、分譲後、-80°Cにて凍結保存したものを、適量を、各検体は、乾燥品約20 mgを供した。このものを鋳型とし、植物のrDNAに保存性の高い領域に設計した各プライマー対を用いて、PCRを行うことにより、核rDNAのITS領域(ITS1-5.8S rDNA-ITS2)を増幅した。PCRは、酵素にKOD DNA polymerase (Toyobo)を用い、以下の温度プログラムにより行った：96°C 4 min; 98°C 15sec, 50°C 5 sec, 74°C 30 sec, 40 cycles; 74°C 4min。得られたPCR産物を、Microcon-PCR (Millipore)により、精製した後、ダイレクトシーケンスへと供した。また、Dt-15について行ったサブクローニングには、Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen)を用いた。Cycle sequencing 反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、解析は、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて行った。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムを用いて行った。本研究に用いたプライマーの配列は、Whiteらの報告²⁾にあるITS5及びITS4によった。

C. 研究結果

各種 *Datura* 属植物のITS塩基配列は、696-699 bpであった。その内部配列は、*D. stramonium* 及びその変種(Dt-1~Dt-6)で完全に一致し、また、*D. metel*と*D. fastuosa*(Dt-7~Dt-10)の配列も一致した。従って、ITS塩基配列からはこれらを区別することは出来ないことが明らかになった。ただし、*D. fastuosa*は、*D. metel*の異名として扱われる場合がある。一方、その他の種では、塩基配列の明確な違いを示し、区別が可能であった。2つの*Ipomoea*属植物は、互いに良く似た配列を示し、国際塩基配列データベース(DDBJ, EMBL, GenBank)上の*I. tricolor*の配列(Acc. No.: AY538330, AY538331)と576 bp中、1-2塩基の違いであった。また、*Merremia*

tuberosa (Dt-16)の配列もデータベース上の*M. tuberosa*の配列(Acc. No.: AF110909)の配列と528 bp中、2塩基の違いであった。これらは、種内変異の範囲内と考えられる。一方、4つの*Argyrea nervosa*の配列は、いずれも複数の配列の混ざりであった。Dt-15由来のPCR産物をサブクローニングし、それぞれの配列に分離した後に、3クローンについて塩基配列解析を行った結果、そのうちの 하나가、データベース上の*Argyrea nervosa*の配列(Acc. No.: AF309153)と一致した。残りの2つのクローンは、同一の配列であり、このものは、Blast search プログラムによる相同性検索の結果、*Argyrea*属植物各種の配列と高い相同性を示した。

違法ドラッグ市場品の分析結果を表3にまとめた。ダツラ及びモーニンググローリーの基原種は、それぞれ、*D. stramonium*類、*I. tricolor*と推定された。ハワイアン(ベビー)ウッドローズのうち、Dtk-5, 6, 8は、複数の配列の混合物であったが、そのシーケンスパターンは、Dt-15のものと同く似ており、*A. nervosa*であると考えられる。一方、Dtk-7, 9の塩基配列は、*M. tuberosa*標品のものと一致した。従って、市場に流通するハワイアンウッドローズの中には、*A. nervosa*, *M. tuberosa*の2種が存在することが明らかになった。

D. 考察

*Datura*属植物標品の配列を基に作成した系統樹を図1に示した。系統樹は、主に3つのクラスターに分かれた。それぞれのクラスターは、*Datura*節、*Stramonium*節、*Brugmansia*節(最近では、*Brugmansia suaveolens*として、別属に扱われている)の種で構成され、形態学的な分類とよく一致していた。野呂ら³⁾は、*Datura*属植物の種子のアルカロイド含量及び組成について報告しているが、今回の結果で得られた遺伝子型とアルカロイドの組成は、よく一致

していた(図1)。また、川村ら⁴⁾及び福田ら^{5),6)}は、*Datura* 属植物の果実及び種子の形態による種の鑑定法を報告しているが、最近の違法ドラッグ市場では、種子をすりつぶし、粉末の状態で販売される場合が多い。今回、*Datura* 属植物の標準試料の遺伝子情報を整理したことにより、このような粉末状態のものについても種の鑑定が可能となった。

Dt-15 由来の PCR 産物のサブクローニングにより得られた3つのクローンの配列に、データベース上の *Argyria* 属植物のものを加え、系統樹を作成した(図2)。系統樹は、2つに分かれ、3つのクローンの配列及び *A. nervosa* の配列が、同じクラスターに分類された。さらに、*A. nervosa* 標準試料4個体全てが、混ざりの配列であったことを考え合わせると、*A. nervosa* は、近縁植物2種の雑種基原であることが示唆された。

E. 結論

各種幻覚性植物の DNA 情報を整備することにより、DNA 配列解析による違法ドラッグの基原種鑑別が可能であることを明らかにした。違法ドラッグ市場品に、本方法を適用した結果、概ね、商品名から予想される植物であった。

F. 参考文献

- 1) A. G. Avery, S. Satina, J. Rietsema, Blackeslee : The Genus *Datura*, The Ronald Press Co., New York, 16-55 (1959).
- 2) T. J. White, T. Bruns, S. Lee *et al.*, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in M. A. Innis *et al.* ed., PCR Protocols-A guide to methods and applications, Academic press, San Diego, USA (1990).
- 3) Noro M., Hisata Y., Okuda K. *et al.*, Pharmacognostical studies on the genus *Datura*

plants (2)-Variation of alkaloid contents in the seeds, *Natural Medicines*, **53** (3), 130-133 (1999).

- 4) Kawamura T., Okuda K., Hisata Y. *et al.*, Pharmacognostical studies on the genus *Datura* plants (3)-Morphological characteristics of the fruits and the seeds, *Natural Medicines*, **56** (3), 90-96 (2002).
- 5) Fukuda T., Arakane M., Iwasaki Y. *et al.*, 薬物乱用で問題となる植物ドラッグの鑑定, 1. ダツラシード, *東京都保健医療学会誌*, **107**, 140-141 (2003).
- 6) Fukuda T., Takahashi M., Arakane M. *et al.*, Studies of identification of *Datura* seeds, *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P.H.*, **55**, 61-66 (2004).

G. 研究発表

1. 学会発表

丸山卓郎、福田達男、合田幸広、違法ドラッグ市場に流通する幻覚性植物について-ダツラ、モーニンググローリー、ハワイアンウッドローズ-、日本薬学会第126年会、2006年3月(仙台)。

2. 誌上発表

無し

H. 知的財産権の出願、登録状況

無し

I. 健康危機情報

今回、試料として選択したダツラ、モーニンググローリー、ハワイアン(ベビー)ウッドローズには、トロパンアルカロイドやリゼルギン酸誘導体が含有することが知られている。特にダツラの種子や根を原因とする中毒事故は、例年、一般の食卓においても発生しており、違法ドラッグとして多量に服用した場合、非常に危険である。

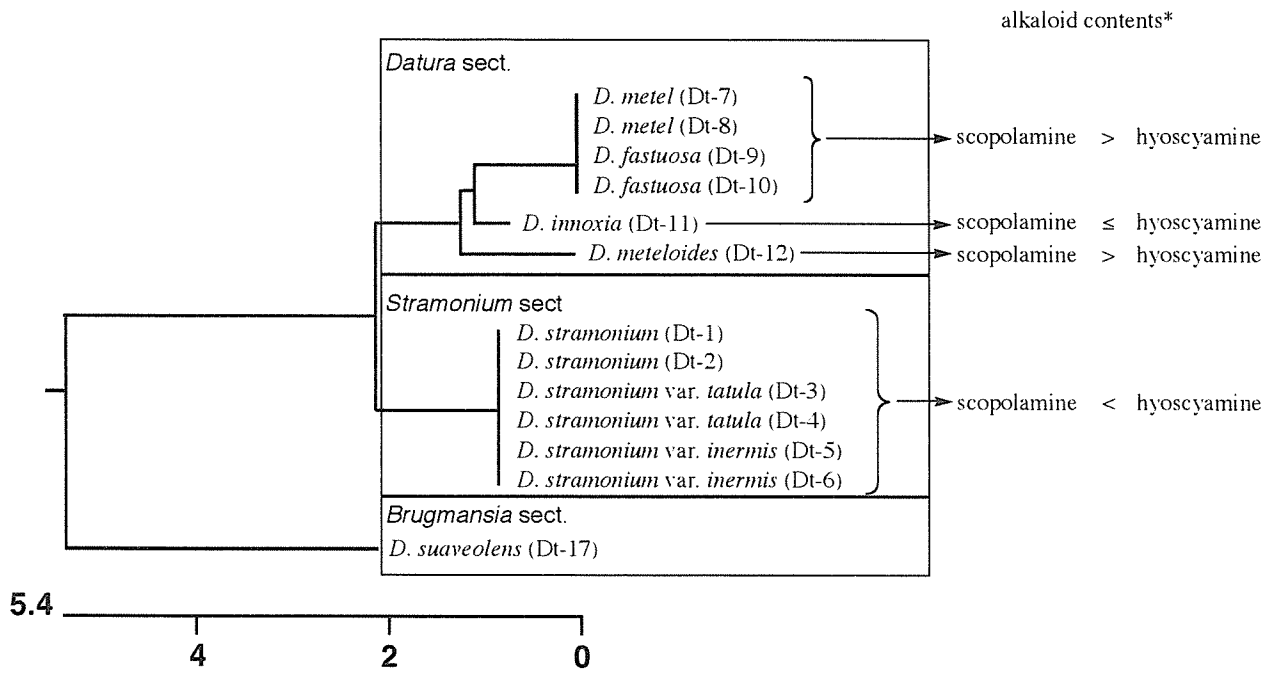


図1 *Datura* 属植物の ITS 塩基配列に基づく系統樹及び文献記載のアルカロイド

*: Noro M., Hisata Y., Okuda K. *et al.*, Pharmacognostical studies on the genus *Datura* plants (2)-Variation of alkaloid contents in the seeds, *Natural Medicines*, **53** (3), 130-133 (1999).

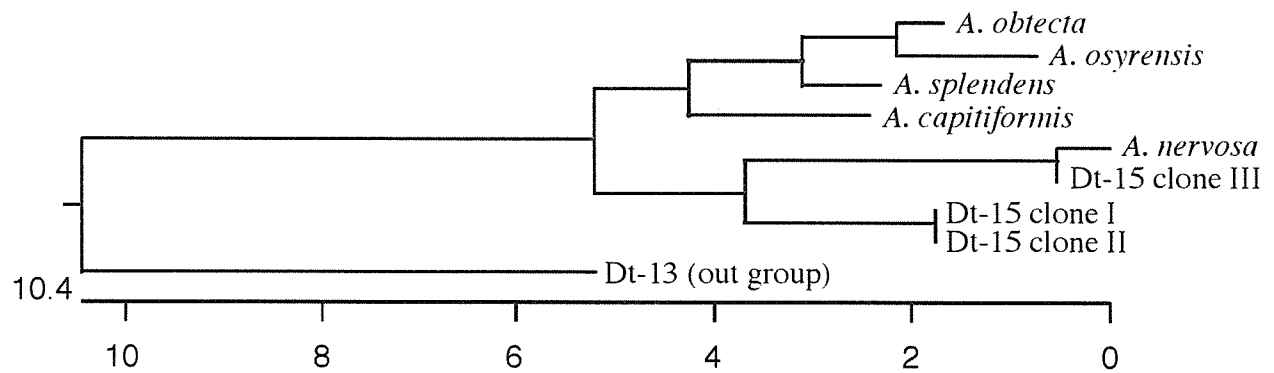


図2 *Argyreia* 属植物の ITS 塩基配列に基づく系統樹