

Fig. 4 薬物投与後ラットの覚醒時における各周波数での脳波のパワースペクトル変化

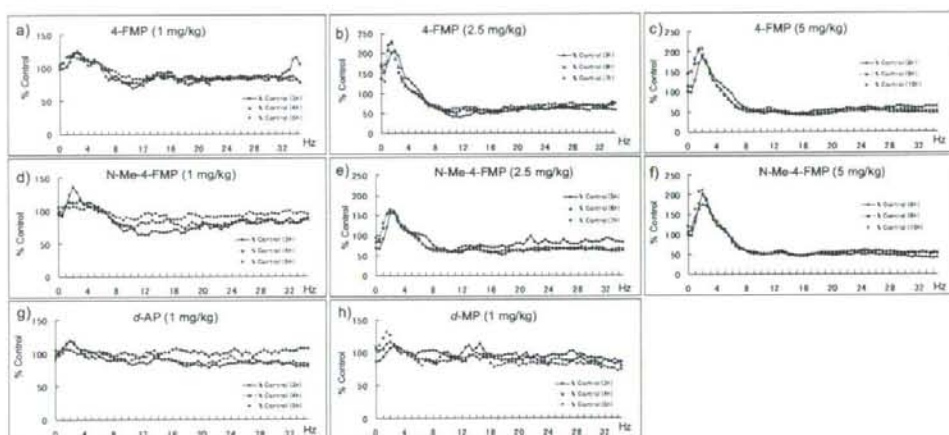


Fig. 5 薬物投与後ラットのノンレム睡眠時における各周波数での脳波のパワースペクトル変化

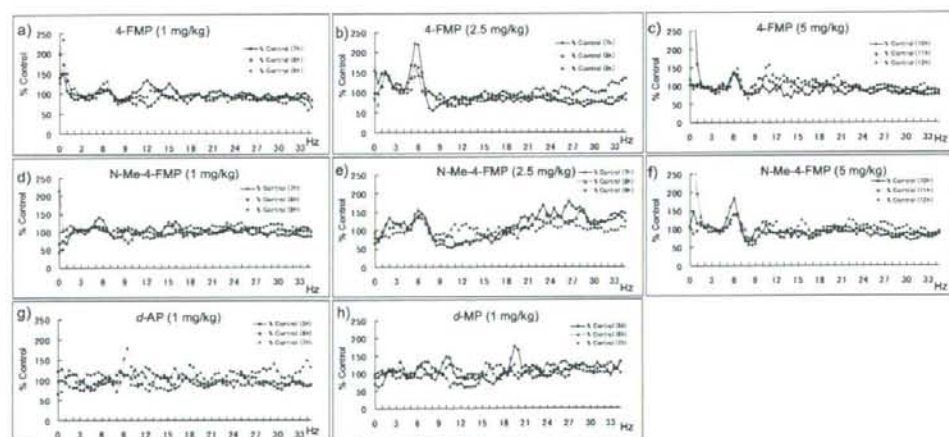
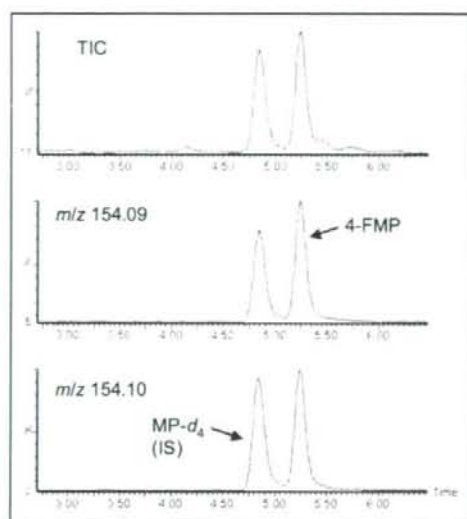
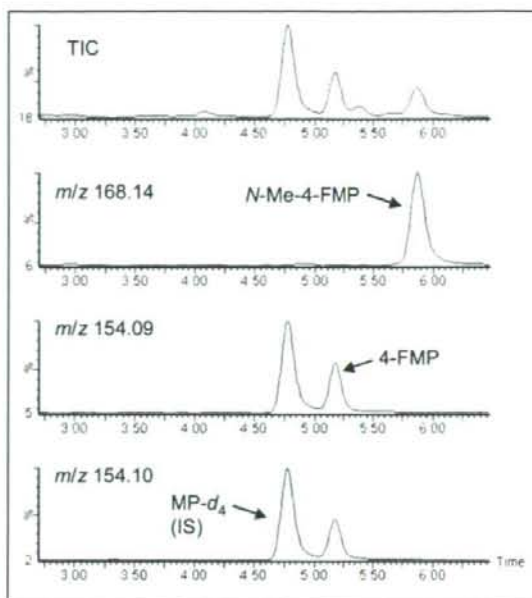


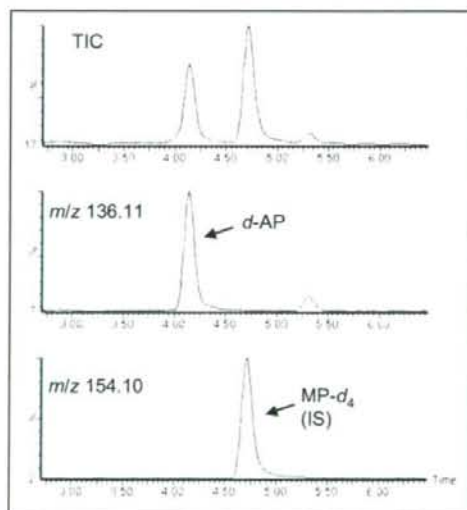
Fig. 6 薬物投与後ラットのレム睡眠時における各周波数での脳波のパワースペクトル変化



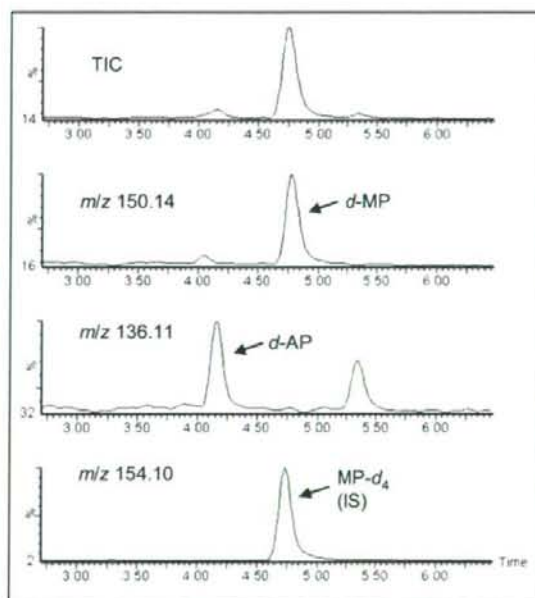
a) 4-FMP (1mg/kg) 投与



b) *N*-Me-4-FMP (1mg/kg) 投与



c) *d*-AP (1mg/kg) 投与



d) *d*-MP (1mg/kg) 投与

Fig. 7 薬物投与 30 分後のラット血漿抽出物の LC-MS-SIR クロマトグラム

分担研究課題：植物系違法ドラッグ製品の基原種の特定
研究分担者：合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

－ロータス系製品の遺伝学的手法を用いた流通実態調査－

研究協力者：緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

研究要旨：昨年度違法ドラッグ市場に流通するロータス系製品について、熱帯性種の雑種である可能性が示唆された。そこで今回、スイレンの交配園芸種を用い、その配列を調査し、違法ドラッグ市場品が交雑種であることの確認を行った。葉緑体 DNA 上の *trnL-trnF* 領域および核 DNA 上の ITS 領域の塩基配列解析結果は、市場品と交雑種が類似していることがあきらかとなった。また、今回新たに市場品を調査した結果、ロータス製品はスイレンだけではなくハス (*Nelumbo nucifera*) も原料として使われていることが明らかとなった。

研究協力者

丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究員

飯田 修 (独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部研究リーダー

杉村康司 (独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部研究員

A. 研究目的

違法ドラッグ市場において、古代エジプトや古代マヤ民族によって麻薬性の植物、幻覚発現薬として宗教的儀式に用いられた Lotus などと標榜したスイレン (*Nymphaea* : *N.*)

やハス (*Nelumbo*) の「乾燥花卉」などが販売されている。これらには数種のアルカロイドが含有成分として報告されており、特に、ハスにはセロトニン受容体アンタゴニストであるアボルフィン系アルカロイドの Asimilobine, Lirinidine が報告されている¹⁾。

このような背景のもと、本研究では違法ドラッグ市場に「お香 (Incense)」, 「植物標本」という名称で流通しているロータス系製品の DNA 塩基配列解析を行い原料植物の流通実態調査を昨年より行った。その結果、ロータス系製品の多くは熱帯性種であり、また ITS 領域の解析から雑種であるものが多いこともわかった。そこで、スイレン園芸種を用い変異の多様性を考慮した基原種鑑定の再検討を行った。また、新たに違法ドラッグ市場品である「Pink Lotus」についても調査を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

違法ドラッグ市場品としてインターネット上で販売されている「Pink Lotus おしべ」(植物体乾燥品)を使用した。また、スイレン属植物の園芸種として、温帯性種 *N.*

alba, *N. odorata*, 熱帯性雑種として「Blue star」, 「Pennsylvania」²⁾および、草津市立水生植物公園みずの森(滋賀県)より供与していただいた *N. caerulea* (以後:「Caerulea」と示す。)を用いた(表1)。

2. 実験方法

各試料 20mg を液体窒素で凍結させた後、MM-300 (Qiagen) により粉碎した。粉碎した各試料より DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出した。これを鋳型として核 rDNA に存在する ITS 領域、および葉緑体 DNA の *trnL-trnF* 領域を、各領域で保存性の高い配列を基にしたプライマー^{3, 4)}を用い、酵素には Gene TaqNT DNA polymerase (Nippon Gene) を使用して PCR によって各領域の増幅を以下のプログラムで行った(94℃ 180sec; 94℃ 30sec, 50℃ 45sec, 72℃ 90sec, 40cycle; 72℃, 300sec)。Montage-PCR (Millipore) を用い PCR 反応溶液から未反応のプライマーおよび dNTP を除いた後、ダイレクトシーケンシングにより PCR 産物の塩基配列を決定した。Cycle Sequence 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 (ABI) を使用した。ITS 領域に関しては TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いサブクローニング後、塩基配列の決定を行った。

C. 研究結果

1. *trnL-trnF* 領域の塩基配列解析

植物の鑑別・同定に使われる葉緑体(クロロプラスト)DNA 上のロイシンを運搬する transfer RNA をコードする遺伝子(*trnL*)とフェニルアラニンの tRNA 遺伝子(*trnF*)間のスペーサー領域を PCR を用い増幅し、これらの配列を国際塩基配列データベース(DDBJ, EMBL, GenBank)に登録されている配列と比較した。

違法ドラッグ市場品である「Pink Lotus」は *trnL-trnF* 領域の塩基配列解析の結果 *Nelumbo nucifera* と 2 塩基の違いであった(1012/1014)。これまで違法ドラッグ市場におけるロータス製品(White, Blue, Yellow Lotus)は調査の結果、すべてスイレンを基原とするものであったが、「Pink Lotus」はハスが基原であった。

温帯園芸種 2 種は共に、明記してある学名とほぼ一致していた(表1)。昨年度、調査し水生植物公園水の森の *N. alba* は塩基配列解析から *N. odorata* と相同性が高く、*N. alba* とは 10 塩基の違いが見られていた。

園芸店から購入した熱帯性雑種であるが、「Blue star」は交配来歴から胚珠親(母系)は *N. gracilis* である。今回の配列結果においても *N. gracilis* で一致した。熱帯性雑種「Pennsylvania」および「Caerulea」は交配来歴および純系種であることから *trnL-trnF* 領域は同一種で *N. caerulea* の可能性が示唆されたが、いずれも *N. thermarum* で一致した。

2. ITS 領域の塩基配列解析

同じく、植物の鑑別・同定に多く用いられる核ゲノム DNA 上の ribosomal RNA をコードしている領域の ITS (internal transcribed spacer) を解析した。「Blue star」, 「Pennsylvania」は雑種であり、胚珠親、花粉親の 2 種類の配列が検出されることが考えられる。そこであらかじめ、サブクローニングを行い、ITS 領域を解析した。

「Blue star」は *N. capensis* および *N. gracilis* の 2 つの配列が確認されると予想されたが、相同性検索の結果、*N. capensis* および *N. caerulea* であった。更に *N. caerulea* の結果は 26 塩基もの違いが見られた。

「Pennsylvania」は *N. capensis* および *N. caerulea* の配列が検出されることが予想され、更に各々の配列は「Blue star」および「Caerulea」にそれぞれ共通の配列が見られるこ

とが期待されるが、*N. nouchali* と *N. capensis* であった。*N. capensis* の結果は「Blue star」のそれと一致していた。

「Caerulea」は交雑種であることも予想されたためサブクローニングを行ったが、配列は 1 つのみが検出されたため純系であることが示唆された。また、この結果は *N. nouchali* であった。この結果は「Pennsylvania」と一致した。

D. 考察

昨年に引き続き違法ドラッグ市場に流通するロータス系製品について遺伝子解析を用い、その植物種の同定を行った。相同性検索において今回、交雑種で得られた結果は、昨年度、違法ドラッグ市場品で得られた結果と類似していた。今回の *trnL-trnF* 領域解析において、*N. gracilis* や *N. thermarum* の配列に高い相同性を示す点は、昨年度の市場品調査と同一の結果であった⁵⁾。また、市場品において花色の異なる製品であっても DNA 解析は一致する結果が得られており、このことは同一種であっても、青い花を「Blue Lotus」、白い花を「White Lotus」として販売していることが示唆された。

今回、*N. caerulea* 基原の種を 2 種類（「Pennsylvania」、「Caerulea」）集めたがデータベース上での *trnL-trnF* 既報配列 (*N. caerulea*) とは 2 種とも一致しなかった。上記 2 種ならびに市場品のこれまでの結果からも、既報 *N. caerulea* と一致するものは一度も検出されていない。このことは既報配列に誤同定があることも考えられる。

今回の市場品の DNA 配列検索結果からハスが検出された。クロンキスト体系においてハスは、スイレン目、ハス科、ハス属。スイレンはスイレン目、スイレン科、スイレン属であるが、DNA 配列解析を基にする APG 植物分類体系ではハスはスイレン目ではなくヤマモガシ目に分類されている^{6,7)}。これは両者が進化上かなり早い

段階で分岐したことを意味している。ハスはアルカロイド成分の構造決定が数多くなされているが、スイレンはほとんどなされていない。両種のアルカロイドを含めた二次代謝産物に類似性があるのかどうかは化学分類学の側面からまたいへん興味深い。

E. 結論

違法ドラッグ市場に流通するロータス系製品は原種や純系種を原料とするものではなく、スイレン属、熱帯性スイレンの(交)雑種を用いていることが示唆された。また、一部製品にはハスを使用していることも新たにわかった。

F. 参考文献

- 1) 花尻瑠理, 内山菜穂子, 麻葉様中枢作用を示す植物に関する調査研究, 厚生労働科学研究補助金(特別研究事業)違法ドラッグ(麻葉等類似化合物)の有害性評価の研究 平成 18 年度分担研究報告書: 47-58 (2007)
- 2) 赤沼敏春, 宮川浩一 睡蓮と蓮の世界 マリン企画 (2005)
- 3) P. Talbert *et al.*, Universal primers for amplification of three non-coding chloroplast regions. *Plant Mol. Biol.* 14: 1105-1109 (1991)
- 4) T. White *et al.*, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications* : 315-322 (1990)
- 5) 合田幸広ら, ロータス系植物の遺伝学的手法による流通実態調査, 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)違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究, 平成 19 年度分担研究報告書: 117-123 (2008)
- 6) Angiosperm Phylogeny Group (APG), An ordinal classification from the families of flowering plants. *Ann. MO Bot. Gard.* 85: 531-553 (1998)

7) APG, An update of the angiosperm phylogeny group classification from the orders and families of flowering plants: APG α , *Bot. J. Linn. Soc.* **141**: 399-436 (2003)

G. 健康危険情報

特になし.

H. 研究発表

学会発表

1) 緒方潤, 内山奈穂子, 丸山卓郎, 杉村康司, 飯田修, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 違法ドラッグ市場に流通する Lotus (ロータス) 製品の DNA 解析について (日本薬学会発表予定 京都 2009年3月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.

表1 本研究で使用したサンプルおよび相溶性検査結果

サンプル	備考	来歴	trnL-trnF	ITS
Pink Lotus	おしべ 乾燥品	遠法ドラッグ市場品 (LOVE SALVIA)	<i>Nelumbo nucifera</i> (AM397161)	1012/1014
<i>N. alba</i>	白花 温帯性種	園芸店購入品 (宮川農園(大分))	<i>N. alba</i> (AJ627251)	988/989
<i>N. odorata</i>	白花 温帯性種	園芸店購入品 (宮川農園(大分))	<i>N. odorata</i> (AM422073)	943/944
Blue Star	青花 熱帯性雑種	園芸店購入品 (宮川農園(大分))	<i>N. gracilis</i> (AM422050)	970/971
	<i>N. gracilis</i> x <i>N. capensis</i>			<i>N. capensis</i> (AY707898) 783/791
Pennsylvania	青花 熱帯性雑種	園芸店購入品 (宮川農園(大分))	<i>N. thermarum</i> (AM422054)	961/961
	<i>N. caerulea</i> x <i>N. capensis</i>			<i>N. caerulea</i> (AY707897) 774/800
<i>N. caerulea</i>	青花 熱帯性種	水生植物公園水の森(滋賀)		<i>N. nouchali</i> (AY707896) 799/799
				<i>N. capensis</i> (AY707898) 784/792
				<i>N. nouchali</i> (AY707896) 799/799

分担研究課題：植物系違法ドラッグ製品の基原種の特定
研究分担者：合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

—シニクイチ製品の遺伝学的手法による流通実態調査—

研究協力者：緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

研究要旨：指定薬物制度導入後、違法ドラッグ市場において植物を基原とする製品が益々増加している。そこで違法ドラッグ市場に流通するシニクイチ製品について DNA 配列解析を利用した基原種鑑別を行った。製品から DNA を抽出し、植物の鑑定に良く用いられる *trnL-trnF* 領域および ITS 領域を調査した。その結果、シニクイチを標榜する製品は *Heimia salicifolia* を原料植物としていることがわかった。

研究協力者

丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究員

飯田 修（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部研究リーダー

杉村康司（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部研究員

A. 研究目的

平成 18 年の薬事法改正により、幻覚・中枢興奮等の精神毒性を有し、保健衛生上の危害のおそれがある薬物および植物を「指定薬物」として規制することとなったが、指定された薬物は化学合成系化合物が中心であり、植物は *Salvia divinorum* の 1 品目にすぎない¹⁾。このことは天然物を規定することの難しさを示している²⁾。しかし、指定薬物制度施行後から今日までインターネットなどにおける違法ドラッグ市場には植物由来の製品が「お香」などと称して様々なかたちで紹介され、販売されている。また、その植物系製品の種類は増加傾向にもある。

インターネット上の違法ドラッグサイトにはインディアンが儀式に使ったお香として Sinicuichi (シニクイチ) が販売されている。シニクイチは *Heimia salicifolia* (ミソハギ科) が基原植物と言われている³⁾。*H. salicifolia* はメキシコからアルゼンチンにかけて生育しており、現地では全草が民間薬として用いられている⁴⁾。Diaz らは *Heimia* 属を恍惚状態を誘発する幻覚発現薬として分類しているが⁵⁾、幻覚発現薬であるとする実験的、臨床的なデータは報告されていない。成分としては多数のアルカロイドが含まれており *vertine*, *nesodine*, *sinicuichine* などが報告されている⁶⁾。*Heimia* 属は *salicifolia* の他に *myritifolia*, *montana* の 2 種が存在する。本研究では違法ドラッグ市場に流通しているシニクイチ製品の DNA 塩基配列解析を行い流通実態調査を行った。

B. 研究方法

1. 試料

違法ドラッグ市場品としてインターネット上で販

売されているシニクイチ製品 2 検体, 製品名「SN-1」(植物体(葉)乾燥品)(S-1)および *H. salicifolia* 幼苗(S-2)を用いた。また, 標準試料として, 種子導入で得た *H. salicifolia* (1 系統 22 個体; S-X)を用いた。

2. 実験方法

各試料 20mg を液体窒素で凍結させた後, MM-300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した各試料より DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出した。これを鋳型として核 rDNA に存在する ITS 領域, および葉緑体 DNA の *trnL-trnF* 領域を, 各領域で保存性の高い配列を基にしたプライマー^{7, 8)} を用い, 酵素には KOD plus ver.2 (TOYOBO) を使用して PCR によって各領域の増幅を以下のプログラムで行った(94°C 180sec; 94°C 30sec, 50°C 45sec, 68°C 90sec, 40cycle; 68°C, 600sec)。Montage-PCR (Millipore) を用い PCR 反応溶液から未反応のプライマーおよび dNTP を除いた後, ダイレクトシーケンスにより PCR 産物の塩基配列を決定した。Cycle Sequence 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 (ABI) を使用した。

C. 研究結果

1. *trnL-trnF* 領域の塩基配列解析

植物の鑑別・同定に使われる葉緑体(クロロプラスト)DNA 上のロイシンを運搬する transfer RNA をコードする遺伝子(*trnL*)とフェニルアラニンの tRNA 遺伝子(*trnF*)間のスペーサー領域を PCR を用い増幅し, これらの配列を国際塩基配列データベース (DDBJ, EMBL, GenBank) に登録されている配列と比較した。標準植物試料 1 系統 22 個体すべての配列が一致した(S-X)。また, データベース上の *H. salicifolia* (Acc. No. AY905463)⁹⁾ と 2 塩基の違

いがみられ, *H. montana* (AY905464) と 8 塩基の違いがみられた。違法ドラッグ市場品 S-1 は *H. salicifolia* (AY905463) と 100% 一致した。S-2 は *H. salicifolia* (AY905463) と 2 塩基の違いがみられ, S-X と 100% と一致した(図 2)。

2. ITS 領域の塩基配列解析

同じく, 植物の鑑別・同定に多く用いられる核ゲノム DNA 上の ribosomal RNA をコードしている領域の ITS (internal transcribed spacer) を解析した。標準植物試料 22 個体全てで一致した。また, S-2 とも 100% 一致した。S-1 とは 10 塩基異なっていた。S-1 のデータベースでの相同性検索の結果, 最も相同性の高い植物種は *H. myritifolia*¹⁰⁾ であった。*H. myritifolia* との相同性を図 3 に示す(*H. salicifolia* の ITS 領域の報告はない)。

D. 考察

今回の調査結果からインターネット市場品は *trnL-trnF* および ITS の配列解析から *Heimia salicifolia* を使用したものであると考えられた。しかし, 一方で標準試料としての *myritifolia*, *montana* の確保ができなかった。両種は *salicifolia* よりアルカロイド含量が少ない種であるとも言われているが定かではない。今後は両種についても調査を行わなくてはならない。

H. salicifolia はアルカロイドを含むものの幻覚性などがほとんどないとも言われている⁴⁾。一方で, インディアンの伝承薬として宗教儀式に使われるとの報告もある⁵⁾。また, 使用する際に抽出後一晩放置する, 砂糖と酵母を入れ発酵させるなどの方法が用いられている³⁾。これらがどのような効果をもたらすかは不明であるが, この様なことを踏まえた幻覚性成分の同定も必要である。

E. 結論

違法ドラッグ市場に流通するシニクイチ製品について、葉緑体 DNA 上の *trnL-trnF* 領域および核 DNA 上の ITS 領域の配列解析を利用した基原種鑑別を行った。その結果シニクイチを標榜する違法ドラッグ製品は *Heimia salicifolia* であることがわかった。

F. 参考文献

- 1) 厚生労働省令第 14 号, 「薬事法第二条第十四項に規定する指定薬物制度及び同法第七十六条の四に規定する医療等の用途を定める省令」, 平成 19 年 2 月 28 日
- 2) 合田幸広, 乱用薬物の分析と同定に関する研究, 厚生労働科学研究費補助金(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) H19 年度 総括・分担研究報告書 1-9 (2009)
- 3) Kempfa, J *et al.*, Identification of sinicuichi alkaloids in human serum after intoxication caused by oral intake of a *Heimia salicifolia* extract. *Forensic Sci Int.* **179**: e57-e61 (2008)
- 4) Malone, M. H. & Rother, A., *Heimia salicifolia*: A phytochemical and phytopharmacologic review. *Journal of Ethnopharmacology* **42(3)**: 135-159 (1994)
- 5) Diaz, J. L., Ethnopharmacology sacred psychoactive plants used by the Indians of Mexico. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **17**: 647-675 (1977)
- 6) Smith, R. L. *et al.*, Agonist Properties of *N*, *N*-Dimethyltryptamine at Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} Receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **61(3)**: 323-330 (1998)
- 7) P. Talbert *et al.*, Universal primers for amplification of three non-coding chloroplast regions. *Plant Mol. Biol.* **14**: 1105-1109 (1991)
- 8) T. White *et al.*, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for

phylogenetics. in *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications* : 315-322 (1990)

- 9) Graham, S. A. *et al.*, Phylogenetic analysis of the Lythraceae based on four gene region and morphology. *Int. J. Plant Sci.* **166(6)**: 995-1017 (2005)
- 10) Huang, Y-L. & Shi, S-H., Phylogenetics of Lythraceae *Sensu lato*: a preliminary analysis based on chloroplast *rbcL* gene, *psaA-ycf3* spacer, and nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Int. J. Plant Sci.* **163(2)**: 215-225 (2002)

G. 健康危険情報

なし。

H. 研究発表

なし。

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<i>H. myritifolia</i>	1	GC	GT	TAG	CTG	GAT	GGA	AAG	GC	CCAC	CAAG	CA	CCG	ATG	GAG	A	GAC	GCT	TCC	G	GAC	AG	TGC	
S-X																								
S-1																								
S-2																								
<i>H. myritifolia</i>	61	CG	AG	GGG	GCAA	TG	CTA	CC	ACC	CGG	CGG	TCC	GCG	GAG	TAC	G	TGC	GTC	CA	A	GCT	CAT	A	
S-X																								
S-1																								
S-2																								
<i>H. myritifolia</i>	121	AG	GCC	AG	CCG	CAG	CAA	AAG	AT	GCC	ACG	GGG	AG	GCC	AACT	TCC	GCG	CCT	TAC	TCT	GCC	AAG		
S-X																								
S-1																								
S-2																								
<i>H. myritifolia</i>	181	CC	GTG	ACG	GG	ACT	GTG	GG	CGT	GGG	GGT	TGG	GG	CGG	CA	TGA	TGC	GTG	AC	C	CC	AGG	CAG	
S-X																								
S-1																								
S-2																								
<i>H. myritifolia</i>	241	GT	GCC	CT	CGG	CC	AG	TGG	CT	TCG	GGG	GCAA	CT	TGC	GTT	CA	AAG	ACT	CG	A	GTT	CAC	GGG	
S-X																								
S-1																								
S-2																								
<i>H. myritifolia</i>	301	AT	TCT	GCA	AAT	TC	AC	CA	CA	AAG	TAT	CG	CA	TAT	T	CG	CT	AC	G	TTC	AT	CG	A	
S-X																								
S-1																								
S-2																								
<i>H. myritifolia</i>	361	GAT	AT	CCG	TG	GCC	GAG	AG	T	GTT	GTT	GTT	A	AG	T	CGA	A	AGG	GG	CG	CAG	CC		
S-X																								
S-1																								
S-2																								
<i>H. myritifolia</i>	421	CCC	GCA	TGC	G	GGG	CA	CTT	T	CAA	AG	CT	C	CG	CAC	CG	GAT	CCT	TG	TAT	T			
S-X																								
S-1																								
S-2																								
<i>H. myritifolia</i>	481	GC	CTT	CCG	CG	CCG	GGG	TAC	G	TTG	TAC	AG	CC	GAG	AC	CG	CAC	GG	CG	CAC	A			
S-X																								
S-1																								
S-2																								
<i>H. myritifolia</i>	541	GAT	CC	A	G	A	CG	GT	CT	TG	AT	C	AG	AG	T	C	AC	GG	G	T	CT	G	CT	A
S-X																								
S-1																								
S-2																								

図3 *H. myritifolia* と各検体の ITS 領域の配列比較

分担研究課題：植物系違法ドラッグ製品の基原種の特定
研究分担者：合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

－ファラリス属植物の遺伝学的手法による流通実態調査－

研究協力者：緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

研究要旨：違法ドラッグ市場に流通するファラリス製品（栽培用種子）および国内自生ファラリスについて、*trnL-trnF* 領域配列解析を利用した基原種鑑別を行った。その結果、栽培用種子は *Phalaris* 属ではあるが、日本に広く分布自生しているクサヨシ (*P. arundinacea*) ではない可能性が示唆された。また、日本に自生しているクサヨシには遺伝子レベルでの地理的変異が見られた。

研究協力者

丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

飯田 修（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部研究リーダー
杉村康司（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部研究員

A. 研究目的

ファラリス属植物、クサヨシ: Reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L.) はイネ科の単子葉植物で日本の湿地帯にも多く見られる植物である。クサヨシは *N,N*-dimethyltryptamine (DMT), *N,N*-dimethyl-5-methoxytryptamine (5-MeO-DMT) を含むトリプタミン系化合物が含まれる植物の1つであると報告されている (図1)¹⁾。また、同属の Bulbous canary grass (*P. aquatica* syn. *tuberosa*) にも DMT の含有の報告があり、実生においてその生合成に関わる酵素活性の検出も行われている¹⁻³⁾。DMT はトリプタ

ミン系幻覚剤の1種であり、セロトニンレセプター (5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} サブタイプ) のアゴニストとして作用し⁴⁾、ファラリス属をはじめ様々な植物種にその存在が報告されているため、違法ドラッグ製品のひとつのカテゴリーを成している。南米アマゾン川流域の原住民に古くから宗教儀式で用いられる「Ayahuasca (アヤワスカ)」は DMT を含有した向精神性の飲料である⁵⁾。

DMT は国連の「向精神薬に関する条約 (向精神薬条約)」(Convention on Psychotropic Substances, 1971) の Class I に指定されている薬物であり、世界的に厳しく規制されている。日本においても麻薬及び向精神薬取締法により厳しく規制されているが、DMT を含有する植物は、麻薬原料植物としての規制対象になっていない。また、現在、5-MeO-DMT は指定薬物として指定されている⁶⁾。

本研究では、来歴の明確な *Phalaris* および国内自生 *Phalaris* の DNA 塩基配列解析調査を踏まえ流通実態調査を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

種子交換により基盤研・種子島研究部に導入された *P. arundinacea* 3系統 8個体および Canary grass (*P. canariensis*) 1系統 1個体、高知県自生種 2系統、神奈川県自生種 1系統、北海道自生種 1系統、飼料用種子 3系統 (リードキャナリー、リードキャナリー・パラトン、ベンチャー)、違法ドラッグ市場品としてインターネット上で販売されているファラリス AQ-1 の計 17 検体を用いた (表 1)。

2. 実験方法

各試料 20 mg を液体窒素で凍結させた後、MM-300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した各試料より DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。これを鋳型として葉緑体 DNA の *trnL-trnF* 領域および核 DNA 上の ITS 領域を、各領域で保存性の高い配列を基にしたプライマー^{7,8)} を用い、酵素には NovaTaq Hot start DNA polymerase (Novagen) を使用し、PCR 反応試薬には Ampdirect Plus (Shimazu) を用い PCR によって各領域の増幅を以下のプログラムで行った (94°C 10min; 94°C 30sec, 50°C 30sec, 72°C 90sec, 35cycle; 72°C, 10min)。Montage-PCR (Millipore) を用い PCR 反応溶液から未反応のプライマーおよび dNTP を除いた後、ダイレクトシーケンシングにより PCR 産物の塩基配列を決定した。Cycle Sequence 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 (ABI) を使用した。得られた塩基配列データは、DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベース内のデータと比較した。多重配列解析は CLUSTAL W program を用いて行った。

C. 研究結果

trnL-trnF 領域の塩基配列解析

植物の鑑別・同定に使われる葉緑体 (クロロプラスト) DNA 上のロイシンを運搬する transfer RNA をコードする遺伝子 (*trnL*) とフェニルアラニンの tRNA 遺伝子 (*trnF*) 間のスペーサー領域を PCR を用い増幅し、これらの配列を比較した。

本研究で用いた 17 検体の配列結果は 6 種に分類された (表 1)。データベースには *P. arundinacea* の *trnL-trnF* 領域は 3 種類が報告されている (Acc. No. AY589138⁹⁾, EF137615, EU639579)。A type は *P. arundinacea* (AY589138) と 1 塩基 (978/979) の違いであり、B type は 2 塩基の違いであった。C type は *P. arundinacea* (AY589138) と 17 塩基異なり、*P. canariensis* (DQ631443) と 18 塩基違いが見られた。D type は *P. arundinacea* (AY589138) と 14 塩基異なるが、*P. arundinacea* (EU639579) とは 100% 一致した。E type は *P. arundinacea* (AY589138) と 3 塩基異なっていた。F type は *P. arundinacea* の (AY589138) と 16 塩基、(EF137615) と 22 塩基、(EU639579) と 20 塩基と異なっていた。C および F type は他の type と比べても塩基数の違いが多く見られるが、A~F いずれの type も *Phalaris* 属が最も相同性が高いという結果が得られたが *P. arundinacea* ではない可能性が示唆された。また、C type と F type は 1 塩基の違いであった。

D. 考察

Phalaris 属における DMT を含むアルカロイド含有の報告はいくつかあるものの系統や季節変動によりバラツキが多いことが示されている^{10,11)}。それが理由であるのかは定かではないが、違法ドラッグ市場においては乾燥した植物体が販売されていることはほとんどない。しかし、*Phalaris* を標榜した種子の販売や、日本国内

にも多数自生しているために、その成分の抽出方法がいくつかインターネット上に示されている。今回、海外を含め国内に自生する *Phalaris* および、飼料会社における低アルカロイド *Phalaris* 品種について、その遺伝子配列の多様性を調査した。*Phalaris* 属は牧草としても有用であるが、一方で、DMT ではないが別種のアルカロイドを多く含み家畜の突然死を引き起こす原因ともなっている¹²⁾。そのため各飼料会社は低アルカロイド品種の開発を行っている(表1;P-15,16)。

今回、*Phalaris* の葉緑体 DNA 上の *trnL-trnF* について解析を行った。その結果、*P. arundinacea* では4種類に分類された。海外からの導入種子と国内自生種とでは配列が大きく異なっているものの(A, B および D type)、*P. arundinacea* には3種類(Acc. No. EU639579, EF137615, AY589138)の配列が報告され、この3 type はいずれかの *P. arundinacea* と一致もしくは、ほぼ一致した。また、核ゲノム上の ITS 領域では A および D type では6塩基の違いのみであった(データベース上に *Phalaris* 属の配列の報告はない。)。このことから、データベース上の3種の配列の報告は植物種の誤同定ではなく、遺伝子配列の地理的、環境的変異が起こっていることが予想される。また、四国、関東自生種(P-10~12)では配列が一致するものの、北海道自生種(P-13)とは異なることは、外来種と言われる *Phalaris* の国内での自生繁殖の経緯が地域によって異なることも考えられる。

飼料種子(P-14~16)の解析結果において既報 *P. arundinacea* および今回検討した試料との大きな違いは見られなかったことから(図2)、アルカロイド含量と *trnL-trnF* 領域配列の相関関係を見いだすことはできなかったが、一方で国内自生種に変異が見られることは、自生地によって成分含量が異なることも考えられる。

P-9 は *P. canariensis* として海外より導入した種子であるが *P. canariensis* との配列の一致は見られなかった。一方、インターネット市場品である AQ-1 と標榜している P-17 (F type) は P-9 とほぼ一致した。「AQ-1」という名称は *P. aquatica* の品種名で、本サンプルの名称が正しいかは定かではないが、*P. aquatica* は他の *Phalaris* 属植物よりもアルカロイド含量が高いとも言われている。また、*P. aquatica* の配列がデータベースに報告されていないことも明確な判断をくだせない点であるが、種子導入によって得られた P-9 とほぼ一致することから *Phalaris* 属であることが示唆され、*P. arundinacea* ではない可能性が高い結果となった。今後は来歴の明確な *P. aquatica*、*P. canariensis* 種子の導入になどにより解明を試みる必要がある。今後はこれらの配列結果を踏まえ、アルカロイド含量の系統による違いを明らかにする必要がある。

E. 結論

違法ドラッグ市場に流通するファラリス製品について、*trnL-trnF* 領域塩基配列の解析を行った結果、違法ドラッグ製品は *Phalaris* 属ではあるものの *P. arundinacea* ではない可能性が示唆された。

F. 参考文献

- 1) Smith, T. A., Tryptamine and Related Compounds in Plants. *Phytochem.* **16**: 171-175 (1977)
- 2) Mulvena, D. P. and Slaytor, M., Separation of tryptophan derivatives in *Phalaris aquatica* by thin-layer chromatography. *J. Chromatog.* **245(1)**: 155-157 (1982)
- 3) Mack, J. P. G. et al., *N,N*-Dimethyl-tryptamine Production in *Phalaris aquatica* Seedlings. *Plant Physiol.* **88**: 315-320 (1988)
- 4) Smith, R. L. et al., Agonist Properties of *N*,

- N*-Dimethyltryptamine at Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} Receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **61(3)**: 323-330 (1998)
- 5) McKenna, D. J. & Towers, G. H., Biochemistry and pharmacology of tryptamines and beta- carbolines. *J. Psychoactive Drugs* **16**: 347-358 (1984)
- 6) 厚生労働省令第 14 号, 「薬事法第二条第十四項に規定する指定薬物制度及び同法第七十六条の四に規定する医療等の用途を定める省令」, 平成 19 年 2 月 28 日
- 7) P. Talbert *et al.*, Universal primers for amplification of three non-coding chloroplast regions. *Plant Mol. Biol.* **14**: 1105-1109 (1991)
- 8) T. White *et al.*, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications* 315-322 (1990)
- 9) Patterson, J. T. *et al.*, Genome relationships in polyploid *Poa pratensis* and other *Poa* species inferred from phylogenetic analysis of nuclear and chloroplast DNA sequences. *Genome* **48(1)**: 76-87 (2005)
- 10) Oram, R. N. *et al.*, Variation in concentration and composition of toxic alkaloids among strains of *Phalaris tuberosa* L. *Nature* **213**: 946-947 (1967)
- 11) Gander, J. E. *et al.*, The occurrence of 2-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline and variation in alkaloids in *Phalaris arundinacea*. *Phytochem.* **15**: 737-738 (1976)
- 12) Bourke, C. A. *et al.*, Suspected *Phalaris paradoxa* (*paradoxa* grass) poisoning in horses. *Aust. Vet. J.* **81**: 635-637 (2003)
- G. 健康危険情報
なし。
- H. 研究発表
なし。
- I. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

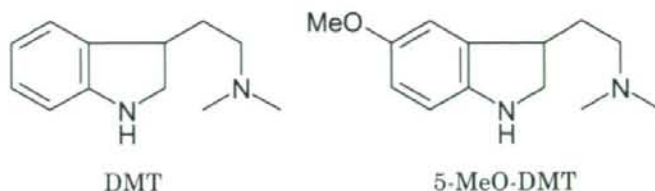


図1 DMT類の構造

表1 本研究に使用したサンプル

サンプルNo.	名称 (学名)	種子島導入番号および来歴		<i>trnL-trnF</i>
P-1	<i>P. arundinacea</i>	S49-1	(ドイツ)	A type
P-2	<i>P. arundinacea</i>	S50-3	(ドイツ)	A type
P-3	<i>P. arundinacea</i>	S236-1	(ドイツ)	A type
P-4	<i>P. arundinacea</i>	S236-2	(ドイツ)	A type
P-5	<i>P. arundinacea</i>	S236-3	(ドイツ)	A type
P-6	<i>P. arundinacea</i>	S236-7	(ドイツ)	A type
P-7	<i>P. arundinacea</i>	S236-9	(ドイツ)	A type
P-8	<i>P. arundinacea</i>	S236-10	(ドイツ)	B type
P-9	<i>P. canariensis</i>	S146-1	(ルーマニア)	C type
P-10	<i>P. sp.-1</i>	国内自生地採取 (四国)		D type
P-11	<i>P. sp.-2</i>	国内自生地採取 (四国)		D type
P-12	<i>P. sp.-3</i>	国内自生地採取 (関東)		D type
P-13	<i>P. sp.-4</i>	国内自生地採取 (北海道)		B type
P-14	リードキャナリー	種苗会社A社		A type
P-15	リードキャナリー・パラトン	種苗会社A社		E type
P-16	ベンチャー	種苗会社B社		A type
P-17	AQ-1	インターネット市場品		F type

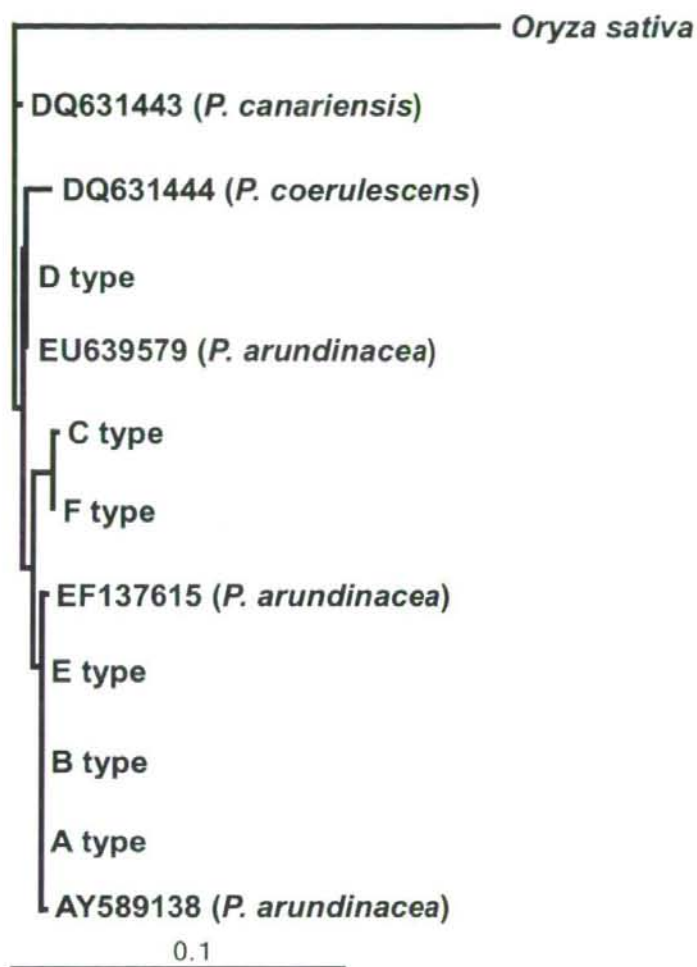


図2 フェアラリス属植物の *trnL-trnF* 領域の配列に基づく分子系統樹

分担研究報告書

分担研究課題：植物系違法ドラッグの主活性成分の検索及び分析標準品の調製
研究分担者：高山 廣光 千葉大学大学院薬学研究院 教授

—植物系違法ドラッグとして流通している *Voacanga africana* の根皮中に含有される
アルカロイドの調査—

研究要旨：違法ドラッグ市場で流通している「イボガ」の原植物である *Tabernanthe iboga* と同一の活性成分を含有するといわれ、インターネット上で流通している植物 *Voacanga africana* の根皮のアルカロイド成分の検索を行った。その結果、主塩基のビスインドールアルカロイド Voacamine (19) とともに、既知アルカロイド 15 種、新規アルカロイド 11 種を単離構造決定し、違法ドラッグ「イボガ」(*Tabernanthe iboga*)の主成分で幻覚性物質の Ibogaine (1)の存在を確認した。従って、*Voacanga africana* の根皮は *Tabernanthe iboga* のような幻覚様作用を示す可能性があると推察される。

A. 研究目的

違法ドラッグ市場で「イボガ」として流通している製品の原植物は、キョウチクトウ科に属する *Tabernanthe iboga* とされ、アフリカの赤道地帯に生育する灌木である。この植物の樹皮や根の抽出物は「イボガ」と称され、先住民により催淫剤あるいは幻覚剤として長い間用いられてきた。*Tabernanthe iboga* の主成分はインドールアルカロイドの Ibogaine (1) で、本物質には中枢神経賦活作用と向精神性がある¹⁾。大量に投与すると麻痺と呼吸停止を引き起こすことが報告されている。Ibogaine (1)は *Tabernanthe iboga* 以外の数種のキョウチクトウ科植物 (*Tabernanthe pubescens*, *Tabernamontana crassa*, *Voacanga thouarsii* など)からも見いだされている。インターネット上で同様に流通している植物 *Voacanga africana* も、上記の幻覚成分 Ibogaine (1)を含有すると言われているが流通品の成分に関する詳細な研究例は少ない²⁾。昨年度の研究では本植物種子の含有アルカロイドの探索を行っ

たが、Ibogaine (1)の存在は認められなかった。そこで、本年度の研究では本植物根皮の含有アルカロイドを明らかにすることにより、*Voacanga africana* が「イボガ」同様の作用を発現する可能性があるかについて化学成分の観点から検討することとした。

B. 研究方法

インターネット上で流通している植物 *Voacanga africana* の根皮について、以下のよう抽出、アルカロイド成分の分離を行った。
The root bark of *Voacanga africana* (608 g dry weight) was extracted with MeOH (7 l, twice at room temperature and two times under reflux to give a MeOH extract (70.12 g). The extract was dissolved in AcOEt (0.5 l) and extracted with 1N HCl aq (0.5 l x 3) to give the AcOEt extract (5.4 g). The aqueous layer was made basic (pH 8) by addition of Na₂CO₃ and then extracted with CHCl₃ (0.5 l x 8) and then with *n*-BuOH (1 l x 3)

to give the CHCl_3 extract (15.5 g) and the *n*-BuOH extract, respectively. The CHCl_3 extract (15.5 g) was separated by silica gel open column chromatography with a MeOH/ CHCl_3 gradient to give 8 fractions: fr. 1 1% MeOH/ CHCl_3 (18.1 mg); fr. 2 1-3% MeOH/ CHCl_3 (2.7 g); fr. 3 3% MeOH/ CHCl_3 (2.6 g); fr. 4 3-5% MeOH/ CHCl_3 (4.1 g); fr. 5 5-8% MeOH/ CHCl_3 (4.6 g); fr. 6 8-10% MeOH/ CHCl_3 (308 mg); fr. 7 10-20% MeOH/ CHCl_3 (235 mg) and fr. 8 MeOH (269 mg). Fractions were purified by repeated chromatography to afford 11 new alkaloids and 17 known alkaloids as follows. Voacangine (**2**, 947.1 mg) was isolated from fractions 2-5. From fraction 3, Voacristine hydroxyindolenine (**8**, 1.1 mg), Obovamine (**10**, 10.8 mg), VAR6 (**13**, 2.0 mg), VAR7 (**14**, 1.5 mg), Tetrahydroalstonine (**16**, 27.4 mg) were obtained. From fraction 4, VAR3 (**6**, 1.7 mg), Vobasine (**15**, 7.1 mg), Voacamidine (**18**, 20.9 mg), Vobtusine (**19**, 32.1 mg), Voacinol (**23**, 2.1 mg), VAR9 (**24**, 4.9 mg), VAR10 (**25**, 13.0 mg), VAR11 (**26**, 6.3 mg) were isolated. From fractions 3 and 4, 3-Oxovoacangine (**3**, 21.7 mg), Voacristine (**4**, 239.8 mg), VAR2 (**5**, 9.2 mg), 3,6-Oxidovoacangine (**11**, 6.8 mg), VAR5 (**12**, 2.8 mg), Voacamine (**17**, 1441.4 mg), Dihydroanhydrovobtusine (**20**, 20.9 mg), VAR8 (**21**, 2.9 mg), Subsessiline (**22**, 65.8 mg) were isolated. From fraction 5, Ibogaine (**1**, 10.7 mg) and Ibogaine hydroxyindolenine (**9**, 8.5 mg) were obtained. (7α)-Voacangine hydroxyindolenine (**7**, 371.2 mg) was isolated from fractions 3-5.

単離した化合物については各種スペクトルデータの測定により構造を決定した。

C. 研究結果・考察

Voacanga africana の根皮の粗塩基分画15.5 gより、モノマータイプのアлкаロイドとして、Iboga型のIbogaine (**1**), Voacangine (**2**), 3-Oxovoacangine (**3**), Voacristine (**4**), VAR2 (**5**), VAR3 (**6**), (7α)-Voacangine hydroxyindolenine (**7**), Voacristine hydroxyindolenine (**8**), Ibogaine hydroxyindolenine (**9**), Obovamine (**10**), 3,6-Oxidovoacangine (**11**), VAR5 (**12**), VAR6 (**13**), VAR7 (**14**), Sarpagine型のVobasine (**15**), Heteroyohimbine型のTetrahydroalstonine (**16**)を得た。また、ビスインドールタイプのアлкаロイドとして、Iboga-Vobasine型のVoacamine (**17**), Voacamidine (**18**), Aspidosperma-Aspidosperma型のVobtusine (**19**), Dihydroanhydrovobtusine (**20**), VAR8 (**21**), Subsessiline (**22**), Voacinol (**23**), VAR9 (**24**), VAR10 (**25**), VAR11 (**26**)を得た。このうち、モノマータイプのVAR2, 3, 5-7 (**5, 6, 12-14**), ビスインドールタイプのVAR8-11 (**21, 24-26**)が新規アルカロイドである。これまでの分離結果から、根皮の主な塩基はビスインドールアルカロイドのVoacamine (**17**, 粗塩基の9.3%)とモノマータイプのVoacangine (**2**, 6.1%)であり、その他に (7α)-Voacangine hydroxyindolenine (**7**, 2.4%), Voacristine (**4**, 1.6%)の含有量が高いことがわかった。また、幻覚性物質Ibogaine (**1**, 0.07%)が含有されていることが明らかとなった。各化合物は、 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, UV, Mass, CD スペクトルを測定することにより構造を確認した。

ここでは、単離した新規アルカロイドVAR2, 3, 5-11 (**5, 6, 12-14, 21, 24-26**)の各種スペクトルデータを記載する。

VAR2 (**5**)

UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 310.0 (3.44), 298.0