

同様であった。

EPI スペクトルが得られる最低の濃度を検出限界とした。その濃度はメタンフェタミン、アンフェタミン及び THCCOOH 共 100 pg/mL であった。なお、MDMA 及び MDA を同じ LC 条件で分析した場合検出限界は 1 ng/mL であった。(MS 条件は示していない。)

#### 4. 前処理法の検討

健康者尿にメタンフェタミン及びアンフェタミンを添加し、前処理法の検討を行った。水、メタノール、またはアセトニトリルにより尿をそれぞれ 1000 倍に希釈し、メンブランフィルターでろ過または遠心分離 (3000rpm, 3 min) を行って、ろ液または上澄液を試料液とした。その結果を表 2 に示す。いずれもクロマトグラム上に妨害ピークは認められず、添加回収率は類似した値であった。そのため所要時間の少ないメンブランフィルターろ過を採用することとした。

#### 5. 各濃度における添加回収率

上記で決定した方法により、メタンフェタミン及びアンフェタミンを尿に添加して回収試験を行った。その結果、表 3 に示した通りの回収率が得られた。THCCOOH については、HPLC の移動相がアセトニトリルであることから、アセトニトリルで 10 倍に希釈してろ過する方法により添加回収試験を実施した。その結果は表 4 に示す。

採用した前処理法による検出下限値を各化合物の尿中濃度として換算すると、メタンフェタミン及びアンフェタミンは 100 ng/mL、THCCOOH は 1 ng/mL であった。(試料液調製過程の減少無補正、EPI の閾値を検出下限とする。)

#### 5. 実試料への適用

実際に鑑定嘱託された尿約 30 検体 (覚せい剤約 10 検体、大麻約 20 検体) について、本方法を適用した。その結果は GC-MS の結果と一致しており、また、質量スペクトルも良好であった。

### D. 考察

#### 1. LC-MS/MS 条件

タンデム質量分析計による検出方法としては何通りかの方法があるが、一回の測定で感度高く特異的なスペクトルデータの得られる MRM の EPI モードを採用することとした。

覚せい剤使用を疑われる尿の鑑定においては、主に乱用される薬物メタンフェタミンと共に代謝物アンフェタミンも検出する必要がある。EPI モードではイオントラップに一定の時間を要するため、LC においてメタンフェタミンとアンフェタミンの溶出時間がある程度離れていなければ、1 回の分析で双方の MS/MS スペクトルを取得することができなかった。本研究で試みた ODS 系カラムでは十分な分離が得られなかったため、ODS と陽イオン交換樹脂が混合充填されている CR カラムを用いた。ただしこのカラムは ODS カラムより保持時間が安定しにくい傾向があった。鑑定の際には平衡化時間を長めに取る等の注意が必要である。

THCCOOH については分析対象物質が 1 物質のみであるため、ODS 系カラムを用いて短時間のプログラムにより問題のないクロマトグラムが得られた。

MS/MS の条件最適化のためには各種パラメータを組み合わせた測定を繰り返す必要がある。この操作は自動化されているが、1 化合物につき 1 時間弱の時間を要する。緊急の鑑定に備えて、嘱託される可能性のある薬物について予め最適条件の設定を行っておく必要があると考えられた。

#### 2. 夾雑物質の影響

本装置は極めて選択性が高く、覚せい剤・THCCOOH とも尿由来の夾雑物質はほとんど MRM クロマトグラム上に出現しなかった。メタンフェタミンについては  $m/z$  150、アンフェタミンについては  $m/z$  136 と比較的低分子量域をモニターしているが、選択反応検出を行っていること、また、尿を 1000 倍に希釈していることから、妨害ピークが現れないものと考えられる。THCCOOH については尿の希釈率は 10 倍であるが、より高分子量域の  $m/z$  343 をモニターしてお

り、この化合物についても妨害ピークは無かった。

### 3. 高濃度試料による汚染

装置が高感度であるために、覚せい剤を高濃度に含む試料による汚染が問題になった。本装置に注入する試料液の最適濃度は1~10ng/mL程度であるため、 $\mu\text{g/mL}$  オーダーのメタンフェタミンを含む尿は高倍率に希釈する必要がある。

一方、THCCOOHは50 ng/mL (トライエージ等の簡易判定試験の検出限界) 未満の場合もあり、10倍の希釈が最適であった。

ルーチンの鑑定において、尿が覚せい剤を含んでいた場合、加水分解処理後に10倍希釈するのみでLC-MS/MSに注入すると汚染が起こる恐れがある。従って、そのような尿については別のTHCCOOH試験法を検討する必要がある。

### 4. ルーチン鑑定スキームの構築

本研究における検討結果を踏まえ、図3の鑑定スキームを考案した。覚せい剤を含有する尿は必ず1000倍に希釈してLC-MS/MS装置に注入することとし、嘱託事項が大麻代謝物であっても簡易試験で覚せい剤含有の有無を確認してからTHCCOOH用試料液を調製する必要がある。

簡易試験で覚せい剤反応が無い尿にも微量の覚せい剤が含まれる場合があるが、簡易試験の検出限界はおおむね $1\mu\text{g/mL}$ であり、THCCOOH試験用に10倍希釈すれば濃度は $100\text{ ng/mL}$ 以下となるので、汚染を招く懸念はないものと思われる。

簡易試験で覚せい剤が検出された場合、10倍希釈してTHCCOOHのLC-MS/MS用試料液を調製すると装置の汚染を招く恐れがある。この場合は、加水分解後の尿を酸性として有機溶媒で抽出すれば、覚せい剤は水層に留まってTHCCOOHと分離することができ、汚染を回避することができると思われる。この点については実証実験をしておらず、今後の検討課題である。また、鑑定嘱託される尿にはアンフェタミンの濃度が非常に低いものがあり、1000倍希釈ではEPIスペクトルが取得できない場合がある。このような検体

についての手順も今後検討する必要がある。

### 5. 定量

本検討は尿中覚せい剤及び大麻成分代謝物の存在の確認を目的としている。添加回収率は100%から離れており、ばらつきも大きかった。本法を定量に利用するためには内部標準物質の利用が不可欠と考えられる。

### 参考文献

1) Dresen, S., Kempf, J., Weinmann, W. (2006) Electrospray-ionization MS/MS library of drugs as database for method development and drug identification. *Forensic Sci. Int.*, **161**, 86-91.

### E. 健康危機情報

なし

### F. 研究発表

なし

表1 LC-MS/MS 条件

	項目	覚せい剤	THCCOOH
HPLC	装置	島津製作所 Prominence	
	カラム	資生堂 CAPCELPAC CR (1:20) (2.0 id x 150 mm, 5 $\mu$ m)	東ソー TSK-GEL ODS-100V (2.0 id x 50 mm, 3 $\mu$ m)
	カラム温度	40 $^{\circ}$ C	40 $^{\circ}$ C
	移動相	10 mM HCOONH <sub>4</sub> (pH 4) : MeOH = 10:90 (アイソクラティック)	A:5mM HCOONH <sub>4</sub> pH 7.1 B:CH <sub>3</sub> CN B conc 5%(0 min) → 95%(5 min)→95%(8min) → 5%(8.1min) → 5%(13 min)
	流速	0.2 mL/min	0.2 mL/min
	注入量	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L
質量分析計	装置	アプライドバイオシステムズ 3200 Q TRAP	
	イオン源	ターボイオンスプレー(ESI)	
	測定モード	enhanced product ion scan (EPI)	
	IDA 閾値 <sup>1)</sup>	5000 cps	1000 cps
	MRM モニターイオン (Q1, Q3 の m/z)	AP 136 / 91 (主) AP 136 / 65 (確認用) MA 150 / 91 (主) MA 150 / 119 (確認用)	343 / 299 (主) 343 / 191 (確認用)
	極性	ポジティブ	ネガティブ
	スプレー電圧	5000V	-4000V
	コーン電圧	30V	-30V
	EPI のコリジョンエネルギー (CE)	20, 35, 50, 35 $\pm$ 15 V	20, 35, 50, 35 $\pm$ 15 V
	ターボガス温度	600 $^{\circ}$ C	600 $^{\circ}$ C
	モニタリング時間(バル コバルブ使用)	2 - 15 min	5 - 10 min

1) IDA: Information Dependent Acquisition (イオン量に応じ EPI スペクトルを取得する手法)

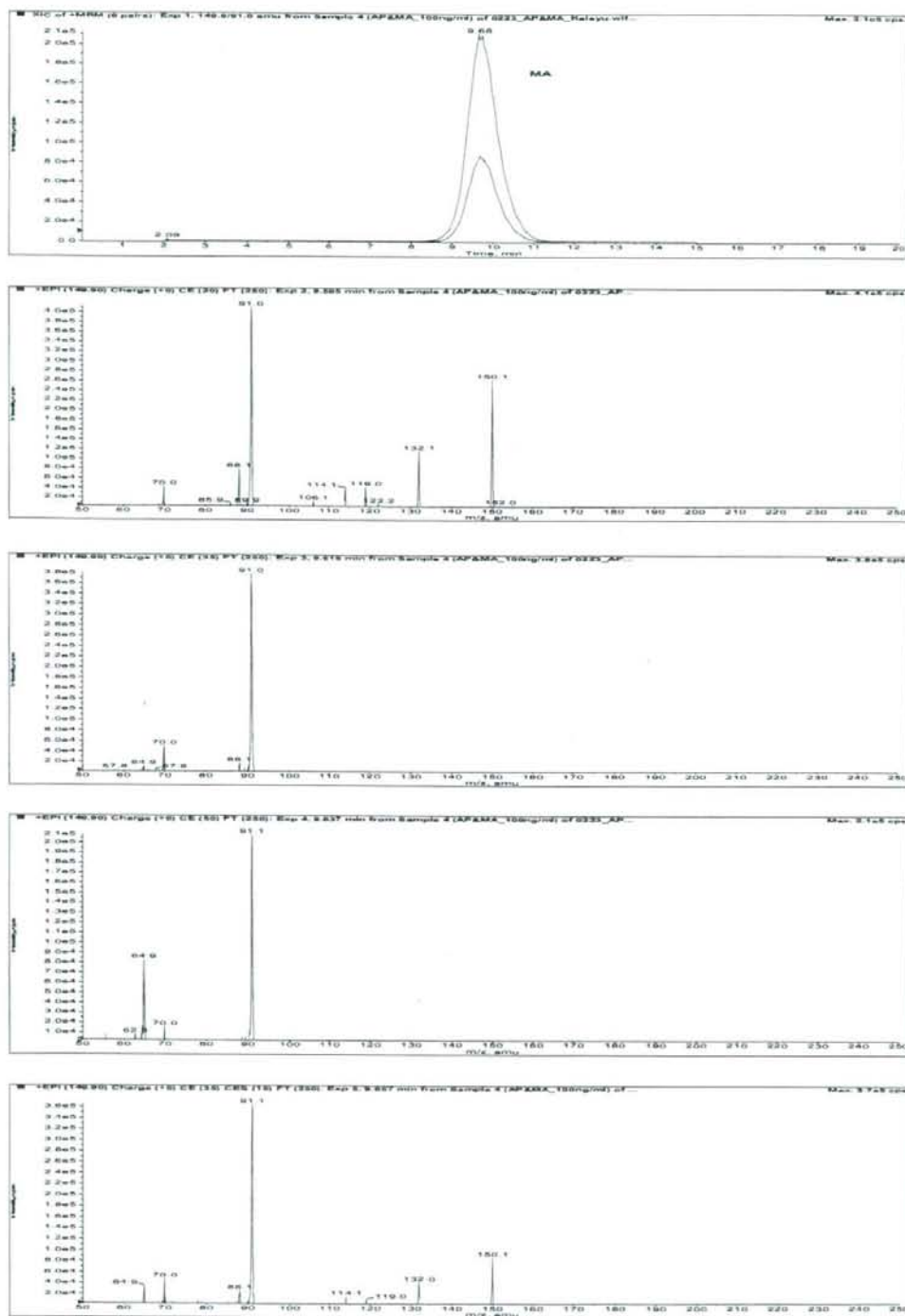


図1-1 メタンフェタミンのMRMクロマトグラム及びEPIスペクトル  
 (スペクトルは上から順にコリジョンエネルギー20, 35, 50, 35±15 Vのもの)

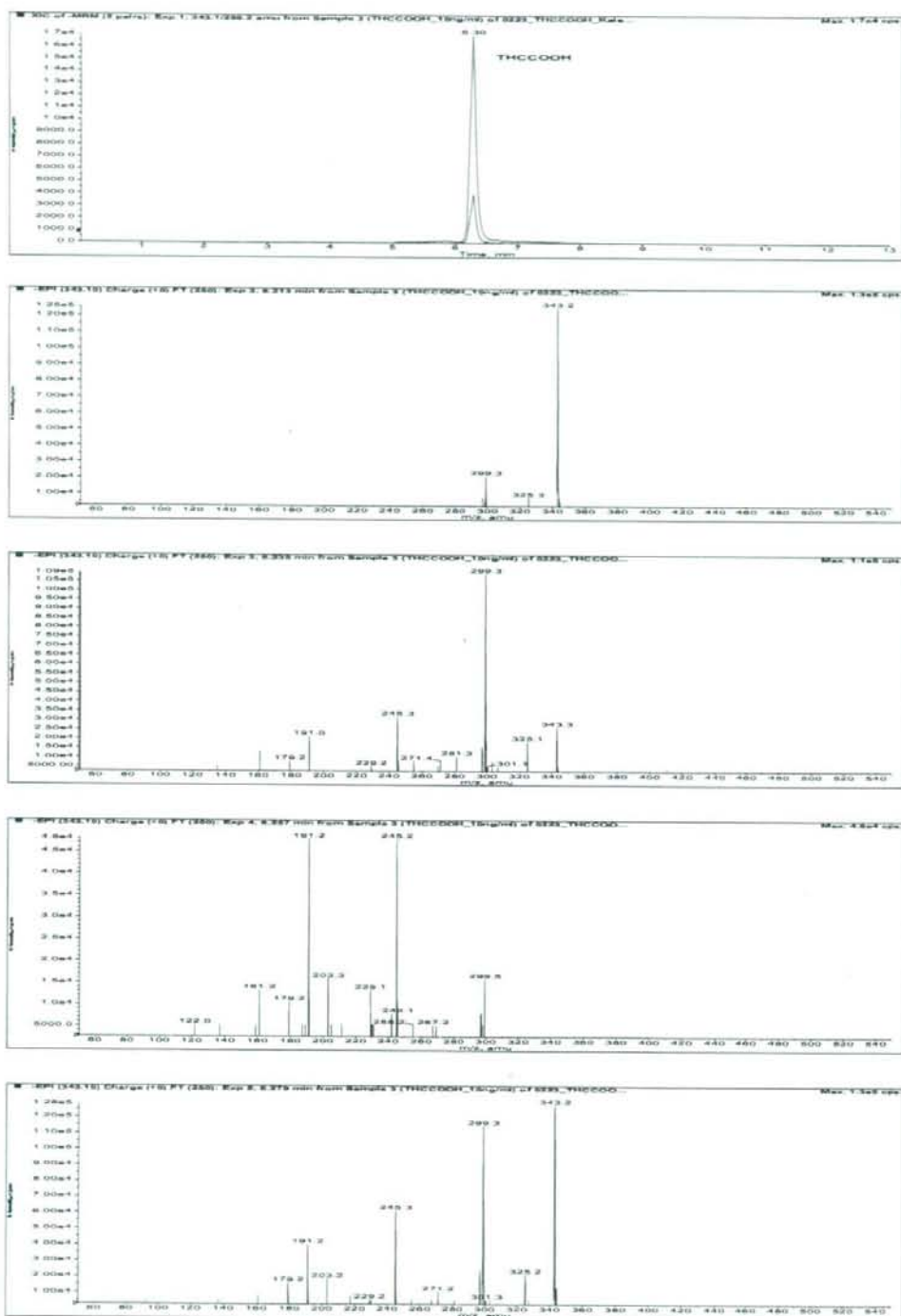
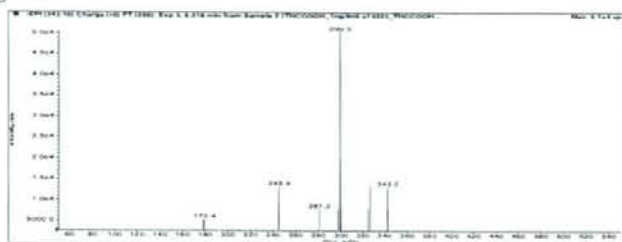
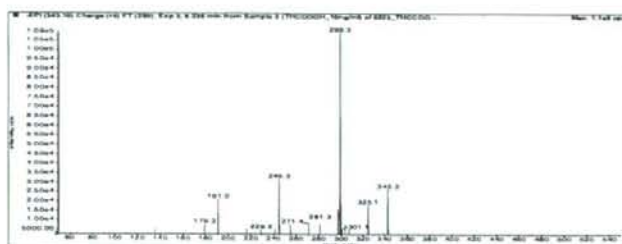


図1-2 THCCOOHのMRMクロマトグラム及びEPIスペクトル  
 (スペクトルは上から順にコリジョンエネルギー20, 35, 50, 35±15 Vのもの)

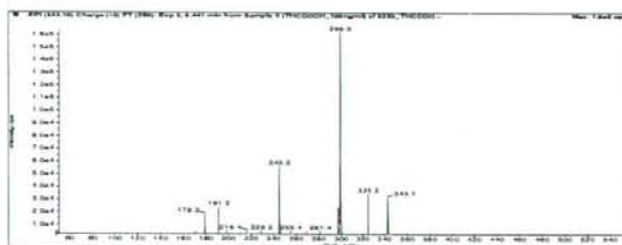
THCCOOH 1ng/mL



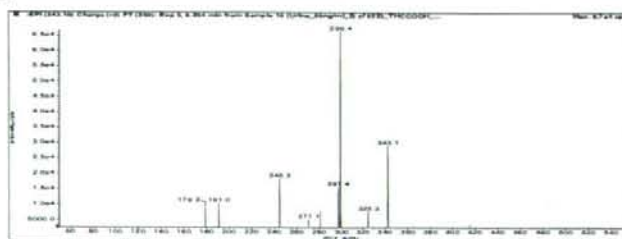
THCCOOH 10ng/mL



THCCOOH 100ng/mL



大麻尿 50ng/mL



大麻尿 500ng/mL

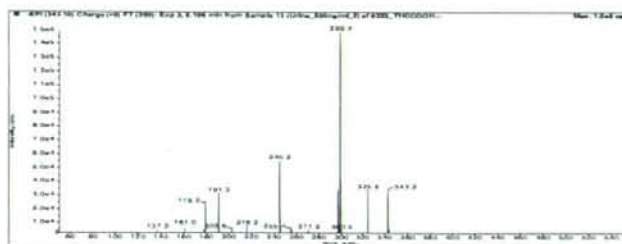


図2 各濃度及び尿中の THCCOOH の EPI スペクトル例

表2 各前処理法による添加回収率

不溶物除去法	希釈溶媒	化合物	検出イオン	回収率(%)
遠心分離	メタノール	MP	150 / 91	59
			150 / 119	59
		AP	136 / 91	43
			136 / 65	43
	水	MP	150 / 91	34
			150 / 119	34
		AP	136 / 91	36
			136 / 65	37
	アセトニトリル	MP	150 / 91	50
			150 / 119	50
		AP	136 / 91	34
			136 / 65	35
フィルター	メタノール	MP	150 / 91	57
			150 / 119	57
		AP	136 / 91	37
			136 / 65	38
	水	MP	150 / 91	25
			150 / 119	25
		AP	136 / 91	24
			136 / 65	25
	アセトニトリル	MP	150 / 91	58
			150 / 119	59
		AP	136 / 91	34
			136 / 65	34

尿にMP及びAPを10 µg/mL添加し、各溶媒で1000倍に希釈した。n = 1

表3 最終的に決定した前処理法による尿への添加回収試験(覚せい剤)  
(n=3)

添加濃度 (µg/mL)	化合物名	回収率(%)	標準偏差(%)
1	MA	146	16
		(135)	(12)
	AP	80	66
		(57)	(50)
10	MA	120	10
		(121)	(10)
	AP	63	12
		(46)	(33)
100	MA	124	10
		(124)	(10)
	AP	64	10
		(64)	(11)

( )内は確認用イオンによる数値

表4 最終的に決定した前処理法による尿への添加回収試験(THCCOOH)  
(n=3)

添加濃度 (µg/mL)	回収率(%)	標準偏差(%)
10	137	20
	(146)	(13)
50	109	5
	(114)	(4)
500	132	20
	(129)	(22)

( )内は確認用イオンによる数値

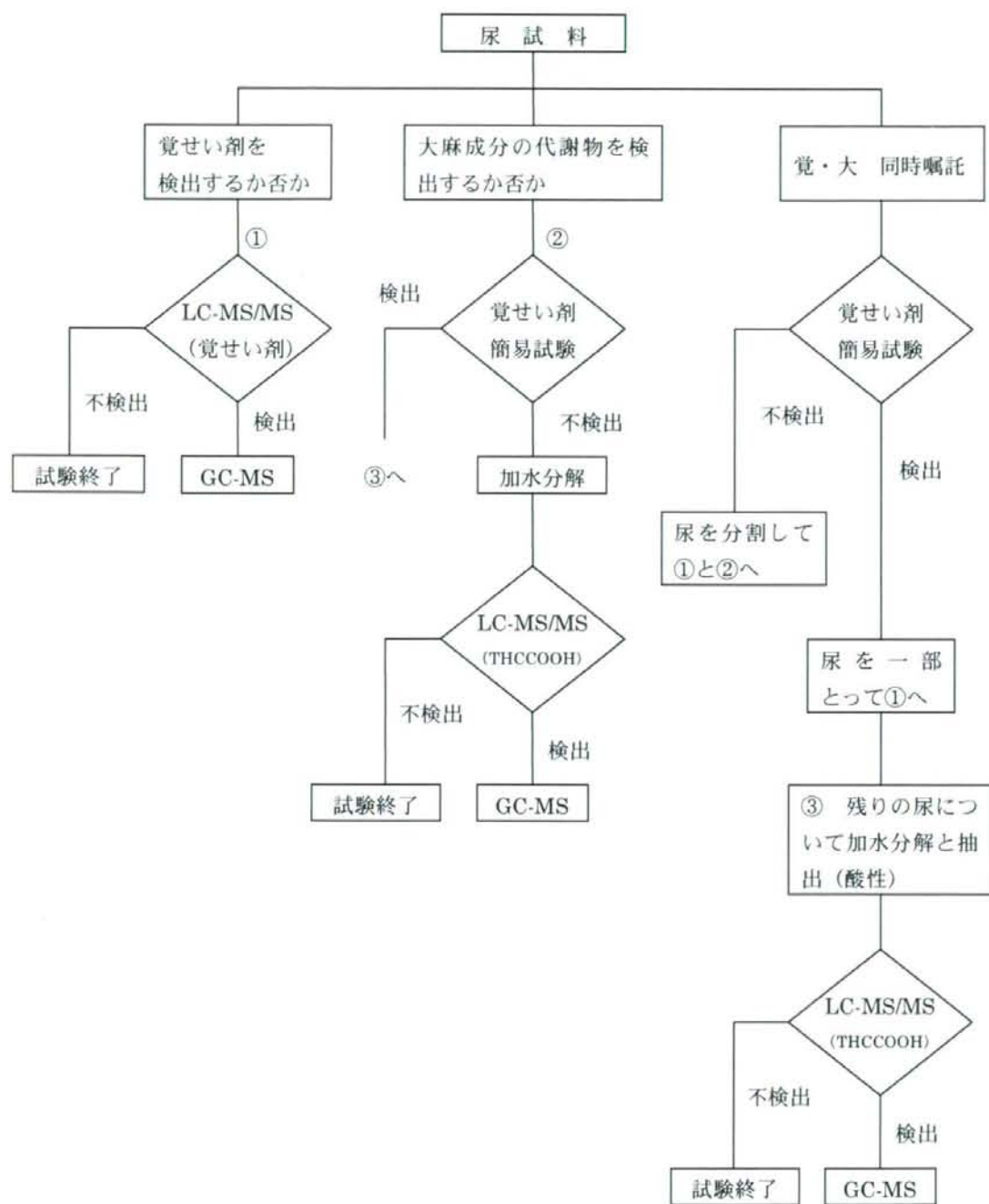


図3 尿鑑定における LC-MS/MS の利用スキーム



## 分担研究課題 薬物の分析と同定に関する研究

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  
研究協力者 緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

### 大麻種子の発芽能力鑑定法の確立

研究要旨 近年、大麻事犯は増加の一途をたどり、特に大麻栽培による検挙者の増加も顕著である。そこで発芽試験に代わる簡便で迅速な発芽能力鑑別法としてテトラゾリウム塩(2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride: TTC)を用いた呈色反応による判別法の確立を試みた。本法は、迅速かつ明確に、その発芽能力を色の有無で鑑定することが可能であると考えられた。種子を実際に発芽させる従来の試験では、発芽能力鑑定に数日以上かかる。一方、本法は、短時間で発芽能力を判定することができ、犯罪捜査の現場での試験に利用可能である。また、結果が非常に明確で、その原理を考えると誤判定の可能性がほとんどない。本法は、大麻種子の発芽能力鑑定法として、従来の発芽試験に代わる優れた手法であると考えられる。

#### 研究協力者

花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部  
室長

木内文之(独) 医薬基盤研究所薬用植物資  
源研究センター センター長

吉松嘉代(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育種生理研究室  
室長

潤野裕之(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栽培研究室室長  
木本茂 関東信越厚生局麻薬取締部鑑定官

#### A. 研究目的

大麻 *Cannabis sativa* L. は中央アジア原産のアサ科の一年草で古くから世界各国で栽培され、様々な原料および用途に利用されている<sup>1)</sup>。一方で、本植物には向精神作用があることが知られており、20世紀後半以降、幻覚剤としての濫用が日本を含め

世界各国で大きな社会問題となっている<sup>2)</sup>。本植物は成分として麻酔性の強い  $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール(酸)を含むことから、日本では大麻取締法により、その所持、栽培などが禁止されている。しかし、本植物の種子(果実: 瘦果)は、江戸時代より「麻の実」として調味料(七味唐辛子)に利用され、ペットショップなどでは「鳥のエサ」としても購入することができる。また、日本薬局方では、生薬「マシニン」(麻子仁)が規定され、薬物として使用されている<sup>3)</sup>。これらの点をふまえ、大麻取締法では、本種子の所持や売買、流通に關しての規制を行っていないが、一般市場に流通している本種子は加熱などによる発芽防止処理が施されており、水を与えても発芽することはない。

近年、大麻事犯は増加の一途をたどり、平成18年、大麻栽培による検挙者数は100

人を超えている<sup>4)</sup>。一般に流通している大麻種子は上記の理由により発芽することはないが、発芽可能な種子が様々な方法で日本国内に持ち込まれていることも事実である。一般に種子の発芽力の有無は外観などからでは確認が困難であるため、発芽試験によって確認がなされている。当然ながら大麻種子の発芽能力を判定する方法としては、実際に発芽試験を行うことになるが、種を播種し、判定するにはある程度の日数が必要となる。また、一度に多量の検体を処理するためには予試験法があることが望ましい。そこでこれらの諸事情を考慮し、一般市販試薬（テトラゾリウム塩類）を用いた、迅速かつ簡便な大麻種子の発芽能力を判定する方法の確立を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 試料

発芽能力（発芽防止未処理）を有する大麻種子として、メキシコ産系統種子（以下、メキシコ種）（2007年収穫）および栃木白種の種子（以下、栃木白種）（2005年収穫）は（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において栽培、収穫されたものを使用した。また、一般流通市場品試料（発芽防止処理済み）として都内ペットショップにて「鳥のエサ」（以下、飼料種子）および食料品店にて「麻の実」（以下、食用種子）を購入し、実験に供試した。

### 2. 発芽試験

試料である各種子は流水にて十分に洗浄後、70%アルコールに30秒間浸漬後、実験シャーレに MilliQ 水を十分に含ませた脱脂綿をひいたものに播種し、常温にて放置した。培養時のカビの繁殖を防止するため極力、無菌的に操作した。

### 3. 呈色反応

テトラゾリウム塩類のひとつである 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) は和光純薬工業より、1,3,5-triphenylformazan (TPF) は関東化学工業よりそれぞれ購入した。0.1% TTC 水溶液を作成し。実験に使用する際の各種子は、胚を露出させるために破砕し用いた。これらを直接、TTC 水溶液に入れ、60分間常温にて放置した。反応後は目視により発色（発芽）能力の有無を検討した。

### 4. 最適化条件の検討

反応温度、時間および pH に関して詳細な検討を行った。反応温度に関する条件検討では反応時間を 10 分間とし、ブレインキュベーション時間を 2 分間とした。反応時間の検討では、温度（4℃、25℃および 45℃）についても検討に加えた。至適反応 pH の測定には反応温度 45℃、反応時間 10 分とし、酢酸-酢酸 Na 緩衝液（3-5）、リン酸 K 緩衝液（6、7）、Tris-HCl 緩衝液（8、9）、グリシン-NaOH 緩衝液（10、11）を用い、終濃度 0.1M とし測定を行った（カッコ内は使用 pH を示す）。これらすべての条件検討では、各種子 1 粒を 1 試験区とし、各種子を縦線に沿って 2 分割後、胚のみを全摘出し、反応容量 500  $\mu$ l として 1.5ml チューブ内で反応を行った。反応終了後、胚を MilliQ 水にて 3 回洗浄し、胚に付着した TPF をメタノール:クロロホルム（2:1）混液 1ml を用いて溶出した。検出は島津 UV-2550 UV-Visible Spectrophotometer を用い、480nm の吸光度にて活性能力を測定した。

## C. 研究結果

### 1. 発芽試験

本研究で用いた各種大麻種子試料は、通常の発芽試験を行い、発芽能力の有無を確

認した。

その結果、発芽防止未処理の2種(メキシコ種および栃木白種)は100%発芽が観察された(各20粒)。播種後10日間で発根および根の伸長がすべての種子で確認された。特に収穫後の保存期間年数の短いメキシコ種は播種後の発芽速度は速く、5日程度で根の伸長までが確認された。また、一般流通市場品(発芽防止処理済み)としての飼料種子および食用種子は播種後4週間を経過しても、発芽を確認することはできなかった(各200粒)。

## 2. 呈色反応

大麻種子試料4種(メキシコ種、栃木白種、飼料種子、食用種子)を用い、TTC<sup>5, 6, 7)</sup>による呈色試験を行った。本法による鑑定は、種子胚(芽)中の呼吸系酵素活性によってTTCが還元されTPF(赤色物質)に変換し(図1)、結果として胚が着色することを肉眼で判定するものである。その結果、メキシコ種(54粒)および栃木白種(180粒)において100%赤色の着色が観察された。これらの着色は明確に赤色と判定できるものであり、「薄く」や「淡く」等の状態の着色は見られなかった(図2)。また、上記2種に着色の差は見られなかった。なお、種子の成熟および保存時に虫による食害にあったものや、胚自体が腐敗や酸化によって褐色に変化したものについては除外した。

一般流通市場品の種子では100%着色が見られなかった(各100粒)。また、オートクレーブ処理(120℃, 10分間)したメキシコ種および栃木白種でも同様に着色は見られなかった。これらの結果は胚の成分などが着色に影響を与えるものではないということを示している。基質濃度0.1、0.2、0.5および1.0%のTTC溶液を実験に用いたが、陽性反応において違いは見られなかった。テトラゾリウム塩類は、高濃度で染色が鋭敏になるものの、陰性判定においても長時間で淡く着色が見られることから、

0.1% TTC 溶液を標準液として以下の実験にも使用した。

## 3. 最適化条件の検討

本法の大麻種子における最適条件を検討するために、反応後の着色胚からTPFをメタノール:クロロホルム(2:1)で抽出し、分光光度計(480nm)により定量する方法を採用した。市販のTPFのスペクトル解析の結果においても480nm付近に極大が存在した。

本反応は生きた細胞や組織が有する酵素による還元力を利用(二次反応)したものである。そこで、この酵素反応の最適条件を検討するために、反応温度、時間およびpHについて検討した。温度は20~70℃で10℃ずつ変化させ反応時間10分で測定した。40~50℃の間で最大活性が得られることがわかった(図3)。

反応時間は温度(4℃, 25℃および45℃)の条件も考慮して行った。25℃および45℃では時間の経過とともに活性(着色)には直線的上昇が見られ、25℃(常温)よりも45℃の方が約3倍強い活性が得られている(図4)。これらの結果を踏まえると鑑別法として加温することは早期判定にも重要であると考えられる。4℃での反応では活性の時間的上昇が見られなかった。これは生細胞の酵素反応(活動)が停止していることに起因するものと考えられる。

最適pHは各緩衝液を用いpH3~11の間で検討した。pH8~9付近で活性は最大となった(図5)。これらの結果は一般的な植物由来酵素の性質と大きな違いは見られなかった。なお、強アルカリ条件下でのTTC溶液の保存は、溶液が淡い赤色に変化した。

## D. 考察

種子の発芽能力を検討する方法としては、その種子が最低限、生きているかどうかを確認することが必要となる。そこで細胞中に存在

する呼吸系還元酵素の活性の有無を指標とした。細胞の生死判別を指示薬による呈色反応で検査する方法は多数<sup>8,9)</sup>存在しているが、簡便性と正確性<sup>7)</sup>においてテトラゾリウム塩類が優れていると考えられる。

現在までに TTC を含め、3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) や 3,3'-[3,3'-dimethoxy-(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl]-bis[2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride] (Nitro-TB) など多くのテトラゾリウム塩類を用いた指示薬が試薬メーカーから生産・販売されているが、試験研究機関以外の場所での、目視による迅速簡易鑑別という点では、反応指示液そのものが無色透明であること、その反応(判定)産物が水に不溶であること、陽性、陰性の差が色の違いではなく有無であること、誤判定を回避するために、反応産物の色が植物本来の組織の色と異なること等があげられる。これらの点を踏まえると、今回用いた TTC は大麻種子判定試験において最も有効な試薬の一つであると考えられた。

TTC を用いた本方法は、温度 45℃、pH 9.0、20 分間の反応において迅速かつ明確に、その発芽能力を鑑定することが可能であると考えられた(図 6)。また、これまでに、栽培用大麻種子以外の大麻種子の追試及び確認試験として、生薬「マシニン」および商業用輸入大麻種子においても同様の実験を行ったが、明確な判定結果を得られている。

#### E. 参考文献

- 1) Yamamoto I., "Taima no Bunka to Kagaku," Hirokawa Shoten, Tokyo, 2001.
- 2) Taura F., Shyoyama Y., Morimoto S., *Seibutsu-butsumuri* **45** (4) 178-184 (2005).
- 3) The Japanese Pharmacopoeia, 15<sup>th</sup> ed., ed. by The Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, 2006, p. 1273

- 4) The general Situation of Administrative Measures against Narcotics and Stimulants Abuse, ed. by The Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, December 2007.
- 5) Hatano K., *Journal of the Japanese Forestry Society*, **34** (2), 37-41 (1952).
- 6) Honjyo H., Nakagawa I., *Kajyu Shiho A*, **6**, 37-42 (1979).
- 7) Zehao H., Jinmao Z., Xijin M., Jinxing L., *Annals of Botany*, **93**, 295-301 (2004).
- 8) Utsunomiya T., *Sakumotsugaku kenkyushuroku*, **14**, 14-15 (1971).
- 9) Crippen, R. W., Perrier, J. L., *Stain Technology*, **49**, 97-104 (1974)

F. 健康危険情報  
なし。

G. 研究発表  
論文発表

- 1) Ogata J., Kikura-Hanajiri R., Yoshimatsu K., Kiuchi F., Goda Y. Detection method for the ability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed germination by the use of 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) *YAKUGAKU ZASSHI* **128**(11) 1707-1711 (2008)

学会発表

- 1) 緒方潤、花尻瑠理、吉松嘉代、木内文之、合田幸広、大麻種子の迅速発芽能力鑑別法、日本生薬学会 第 55 回年会(長崎、2008 年 9 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

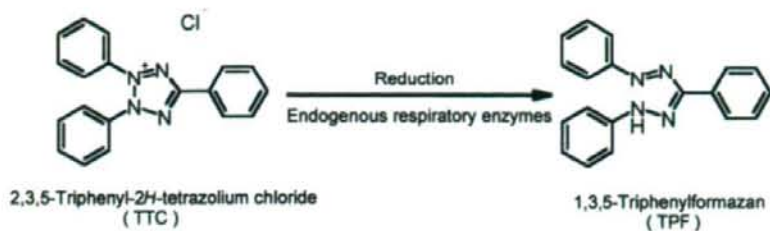


図1. TTCからのTPF生成経路



図2. メキシコ種および飼料種子のTTC反応(25°C、60min)結果  
 左:メキシコ種、右:飼料種子、バーの長さは1cm

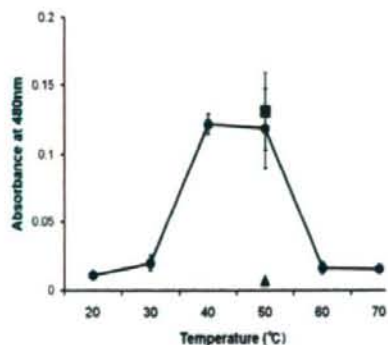


図3. 反応温度条件の検討

●:メキシコ種、■:栃木白種、▲:  
 飼料種子

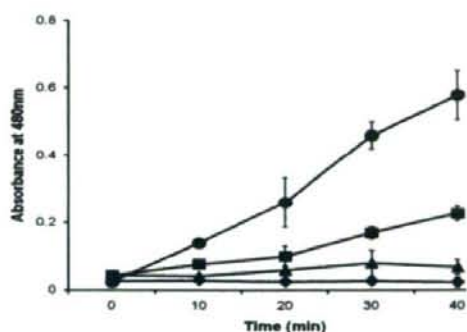


図4. 反応時間及び温度によるTPF生成の変動

●:栃木白種 45°C、■:栃木白種 25°C  
 ▲:栃木白種 4°C、◆:飼料種子 45°C

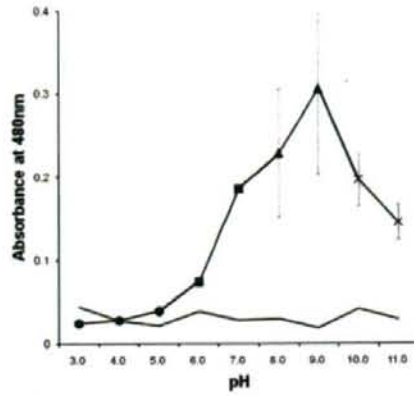


図 5. 反応 pH による TPF 生成の影響  
 ●: 栃木白種 (酢酸・酢酸 Na 緩衝液)、■: 栃木白種 (リン酸 K 緩衝液)、▲: 栃木白種 (Tris-HCl 緩衝液)、×: 栃木白種 (グリシン・NaOH 緩衝液)、-: 飼料種子

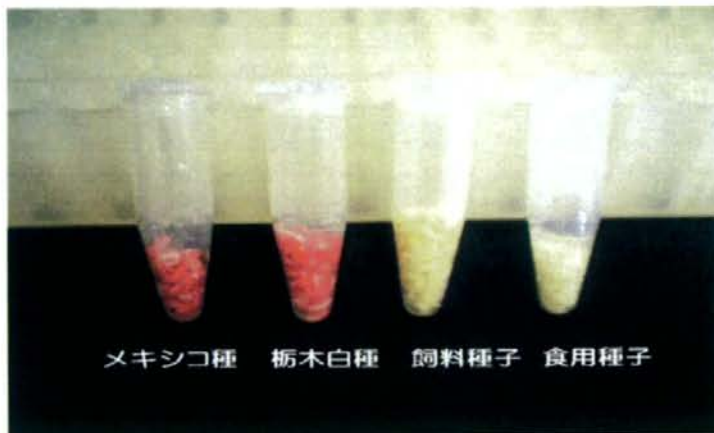


図 6. 本研究における最適条件下での迅速発芽能力検定  
 45 °C, pH 9.0, 反応時間 20 分

分担研究課題 薬物の分析と同定に関する研究

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  
協力研究者 丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 主任研究官

幻覚性サボテンの基原種と mescaline の有無について

研究要旨 園芸市場に流通する *Lophophora* 属植物について、葉緑体 DNA, *trnL-F* 領域の塩基配列解析を行い、基原種を検討するとともに、LC-MS 分析により、mescaline の含有の有無について調べた。その結果、主に 4 つの遺伝子型に大別され、それぞれが、microsatellite 領域の繰り返し塩基数の違いに基づき、さらに細分類された。この内、*L. diffusa* 及び *L. williamsii* var. *decipiens* 型の遺伝子型を持つものは、mescaline を含有せず、*L. williamsii* 型の遺伝子型を持つものでも、一部の個体には、mescaline を検出出来ないものが認められた。

協力研究者

飯田 修 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リーダー

杉村康司 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

鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官

A. 研究目的

Mescaline (1; 図 1) は、経口服用により、LSD 様の幻覚症状を引き起こすことから、麻薬に指定されている化合物である。サボテン科の植物の中には、ウバタマ (*Lophophora williamsii*)、サンペドロ (*Trichocereus pachanoi*) を始め、1 を含有するものがあることが、よく知られているが、形態学的な特徴が乏しい上に、非常に多くの園芸品種が開発されていることから、1 を含有する植物種

の範囲は、よく分かっていない。

東京都立衛生研究所（現東京都健康安全研究センター）の安田は、平成 12 年度の厚生労働科学研究費補助金事業「未規制薬物の乱用防止に関する研究」において、*Lophophora* 属植物の成分研究を行い、ウバタマにおける 1 の含有量と源植物の成長の遅さに基づき、当該サボテンが、乱用の対象になるとは考えにくいとの結論を示している<sup>1)</sup>。

一方、本研究班の昨年度の報告書には、北海道において、サンペドロと思われる柱サボテン類から 1 の抽出を試みた事例が示されている<sup>2)</sup>。柱サボテンは、ウバタマ類に比べ、1 の含有量は低いものの、成長が非常に早いため、乱用の対象となる危険性が懸念される。

前述の安田は、先の研究において、*Lophophora* 属植物の成分パターンと外部形態に基づく基原種鑑別の結果が完全には一致し

ないことから、本植物の遺伝子情報による鑑別を行い、種と成分パターンの相関性を調査する必要性を指摘している。

そこで本研究では、幻覚性植物の規制の範囲を検討することを目的に、これまでに1の含有が示されている *Lophophora* 属及び *Trichocereus* 属植物について、遺伝子情報の整備を行うとともに、LC-MS による成分分析を行い、種と幻覚性成分の含有の関係を調査することとした。

材料植物の収集は、医薬基盤研究所・薬用植物資源研究センター・種子島研究部が行い、今年度は、より多くの試料が入手出来た *Lophophora* 属植物について、検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 実験材料

本研究に使用した *Lophophora* 属植物を表1に示した。これらは、日本カクタス企画社より購入した。なお、表中の学名は、販売店の記載によるものである。DNA 塩基配列解析による基原種鑑別は、全ての試料で行った。LC-MS 分析については、内部組織を使用するため、小さな個体については、試料採取後、枯れることが懸念された。このため、DNA 配列解析による鑑別結果に基づき、各遺伝子型より代表個体を選択し、T-41, -43, -45, -46, -47, -53, -56, -57, -61 の9個体を LC-MS 分析に供した。LC-MS 分析に使用した1の標品は、国立衛研生薬部第三室より御分与いただいた。

### 2. 実験方法

#### 2-1. DNA 塩基配列解析

各試料より外皮、約 50 mg を採取し、液体

窒素にて凍結し、MM-300 (Qiagen) を用いて、粉砕した。このものより、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて total DNA を抽出、精製した。得られた total DNA を鋳型に用いて、PCR を行うことにより、葉緑体 DNA, *trnL-F* 領域を含む DNA を増幅した。Montage-PCR (Millipore) により、PCR 産物を精製した後、直接シーケンス法により塩基配列解析を行った。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W program により行い、NJ 法により系統樹を作成した。

#### 2-2. LC-MS 分析

各試料より内部組織、約 100 mg を採取し、100 mg/mL の比率となるように 1% 酢酸を加え、ティッシュグライNDER でホモジナイズした後、約 1 分、ボルテックスミキサーで混合した。このものの遠心上清をメンブランフィルター、Millex-HV (0.45 µm; Millipore) でろ過したものを試料溶液とした。ただし、T-47, -56, -57, -61, -63 については、試料溶液を 10 倍釈したものについても分析を行った。分析は、以下の条件で行った。

[装置] LCMS-IT-TOF (Shimadzu)

[カラム] Inertsil ODS-3 (2.1 x 250 mm; 5 µm; GL Sciences)

[移動相] 10 mM HCOONH<sub>4</sub>, pH3.5 (A) : Acetonitrile/MeOH (1/1) (B)

[グラジエントプログラム] 0 min (10% B)-22 min (10% B)-22.01 min (50% B)-30 min (50% B)-30.01 min (10% B)-50 min (10% B)

[流速] 0.3 mL/min

[注入量] 5.0 µL

[オープン] 40°C



[検出] PDA (190-800 nm), MS (ESI, positive and negative)

[MS 測定条件]

ネブライザガス流量 1.5 L/min

CDL 温度 200°C

ヒートブロック温度 200°C

検出器電圧 1.7 kV

### C. 研究結果

各試料の遺伝子型を表 1 に示した。多くの試料は、荒金ら<sup>3)</sup>が先の学会で報告した塩基配列 (Acc. no.: AB362488-AB362492) と一致した。*Lophophora* 属植物の *trnL* intron 領域内には、(AT) の配列単位を繰り返す microsatellite 領域が見られ (表 2), その繰り返し数が、種及び系統により異なっていることから、本領域を確認することで、*L. williamsii*, *L. williamsii* var. *decipiens*, *L. diffusa*, *L. diffusa* var. *koehresii* を容易に区別することが可能であった (ただし、*Lophophora* 属植物は、*L. williamsii* と *L. diffusa* の 2 種のみで分類する E. F. Anderson の見解が、現在は一般的である<sup>4)</sup>)。また、microsatellite 領域における繰り返し数が、荒金らの報告と異なるタイプのものが、*L. williamsii* で、1 個体 (T-41), *L. williamsii* var. *decipiens* と *L. diffusa* で各 2 個体 (それぞれ、T-57, -59 と T-61, -66), 認められた。*L. diffusa* var. *koehresii* の配列は、microsatellite 領域の他にも多くの塩基置換が認められた。T-47, -67 は、販売店記載の学名は、それぞれ、*L. fricii* (Syn.: *L. williamsii* var. *decipiens*) 及び *L. jourdaniana* であったが、塩基配列解析の結果からは、*L. diffusa* 及び *L. williamsii* と、

それぞれ判断された。

*Lophophora* 属植物からの単離の報告のある主なアルカロイドを図 1 に、LC-MS 分析の結果の一部を図 2 に示した。前述の条件において、1 は、保持時間、約 12.3 分で、質量電荷比 ( $m/z$ ) 224 のピークとともに溶出された。安田は、先の報告において、「*L. williamsii* は、1 及び anhalonidine を主成分とし、anhalonine, pellotine, hordenin を含有し、*L. diffusa* は、pellotine を主成分とし、anhalonidine, hordenin を痕跡程度含有し、1 及び anhalonine は検出されない」ことを示している<sup>1)</sup>。この報告と分子量に基づき、保持時間、約 12.8 分のピークは、pellotine、同、約 18 分のピークは、anhalonine と推定された。また、保持時間、約 17 分の  $m/z$  252 のピーク及び保持時間、約 7 分、 $m/z$  254 のピークは、その精密質量から、組成式、 $C_{13}H_{17}NO_4$  (252. 1230; -2.0 mmu) 及び  $C_{13}H_{19}NO_4$  (254. 1387; -1.8 mmu) が推定されたことから、これらのピークは、*N*-acetylanhalamine 及び *N*-acetylmescaline とそれぞれ推定された。他のピークについては、同一組成のアルカロイドが *Lophophora* 属植物より複数報告されており、化合物の推定は、困難であった。

### D. 考察

*trnL*-F 部分塩基配列に基づき作成した分子系統樹と 1 の含有の有無を図 3 に示した。*L. williamsii* の遺伝子型を示した試料の内、1 が検出されたのは、LC-MS 分析に供した 4 個体 (T-41, 43, 45, 46) の内、T-41, -45, -46 の 3 個体であった。また、T-46 は、保持時間、約 13 分の pellotine とと思われるピーク、同、約 19 分の推定 anhalonine のピーク及

び約 20.5 分のピークが非常に小さく、他の個体と成分組成にやや違いが認められた。*L. diffusa* 及び *L. williamsii* var. *decipiens* の遺伝子型を示した個体は、いずれも pelletine を主成分とし、非常によく似た成分パターンを示した。今回の分析条件による成分プロファイルからの両者の区別は、困難であり、販売店表記の学名と遺伝子型が一致しなかった T-47 の基原植物について、成分プロファイルからの検討は、出来なかった。*L. williamsii* var. *decipiens* 及び *L. diffusa* の遺伝子型を示した試料からは、いずれの個体からも、1 は検出されず、安田の報告<sup>1)</sup>と一致する結果となった。

塩基配列解析において、別群に分類された *L. diffusa* と *L. williamsii* var. *decipiens* が同様の成分プロファイルを示す一方で、より近縁の関係を示した *L. williamsii* var. *decipiens* と *L. williamsii* が、異なる成分パターンを示した。この結果の要因として、今回の研究に使用した遺伝子領域における塩基配列の進化とアルカロイド成分の生合成を担う遺伝子の進化が関連していなかったことが考えられる。今後は、他の遺伝子領域、特に核ゲノム由来の遺伝子領域を解析することにより、各品種の育種過程の推定を行い、成分型と遺伝子型の相関を探る必要があると思われる。

#### E. 結論

葉緑体 DNA, *trnL-F* 領域の塩基配列解析により、園芸市場に流通する *Lophophora* 属植物を 4 種に分類することが出来た。しかしな

がら、同領域における遺伝子型と幻覚性成分の成分型には、必ずしも相関関係があるとは、結論づけることは出来なかった。今後、他の遺伝子領域を調べる等し、幻覚性成分を含有する種の範囲を慎重に検討する必要があると思われる。

#### F. 研究発表

論文発表

無し

学会発表

無し

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

#### 参考文献

- 1) 安田一郎, 未規制薬物の乱用防止に関する研究, 厚生労働科学研究費補助金, 医薬安全総合研究事業, 平成 12 年度研究報告書
- 2) 花尻瑠理, 阿久津守, 木本茂, 津村ゆかり, 幻覚成分含有サボテンの鑑定分析法の検討, 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「乱用薬物の分析・同定に関する研究」, 平成 19 年度研究報告書, pp. 61-67
- 3) 荒金ら, メスカリンを含有するサボテンの鑑別について, 日本生薬学会第 53 回年会講演要旨集, pp. 134 (2006).
- 4) E. F. Anderson, The biogeography, ecology, and taxonomy of *Lophophora* (Cactaceae). *Brittonia*, **21**, 299-310 (1969).

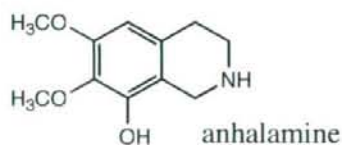
表1 本研究に使用した *Lophophora* 属植物の詳細と遺伝子型.

種子島 導入番号	学名	品種名	<i>trnL</i> -F genotype	microsatellite region	Acc. no.
T41	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	鳥羽玉	<i>L. williamsii</i> new type	(AT)11	this study
T42	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	テキサーナ	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10	AB362488
T43	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	ペンタゴナ	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10	AB362488
T44	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	子吹鳥羽玉	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10	AB362488
T45	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	中型鳥羽玉	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10	AB362488
T46	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	刺鳥羽玉	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10	AB362488
T47	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	銀冠玉	<i>L. diffusa</i>	(AT)2+8	AB362491
T48	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	銀冠錦 (上斑)	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i>	(AT)5+9	AB362490
T49	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	疣銀冠玉	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i>	(AT)5+9	AB362490
T50	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	翠冠玉	<i>L. diffusa</i>	(AT)2+8	AB362491
T51	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	翠冠錦 (並斑)	<i>L. diffusa</i>	(AT)2+8	AB362491
T52	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo var. <i>koehresii</i> Riha	コエルシー	<i>L. diffusa</i> var. <i>koehresii</i>	(AT)4+6	this study
T53	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	翠冠玉翁	<i>L. diffusa</i>	(AT)2+8	AB362491
T54	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	翠冠玉吹上	<i>L. diffusa</i>	(AT)2+8	AB362491
T55	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	子吹鳥ウバ錦 (並斑)	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10	AB362488
T56	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	仔吹銀冠	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i>	(AT)5+9	AB362490
T57	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	銀冠モンスター	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i> new type	(AT)5+8	this study
T58	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	グリーン翠冠玉	<i>L. diffusa</i>	(AT)8	AB362491
T59	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	銀冠仔吹モンスター	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i> new type	(AT)5+8	this study
T60	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	赤花鳥羽玉	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10	AB362488
T61	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	富岡翠冠玉	<i>L. diffusa</i> new type	(AT)2+9	this study
T62	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	仔吹銀冠モンスター	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i>	(AT)5+9	AB362490
T63	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	グリーンスイカン	<i>L. diffusa</i>	(AT)2+8	AB362491
T64	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	小池デフーサ	<i>L. diffusa</i>	(AT)2+8	AB362491
T65	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	ウルトラデフーサ	<i>L. diffusa</i>	(AT)2+8	AB362491
T66	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	大毛デフーサ	<i>L. diffusa</i> new type	(AT)2+9	this study
T67	<i>Lophophora jourdaniana</i>	ヨーベルニアナドイ イブ	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10	AB362488

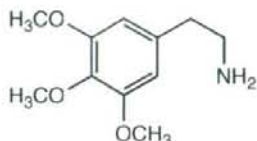
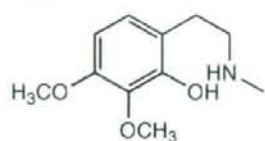
表2 各遺伝子型と microsatellite 配列.

Genotype	<i>TrnL</i> intron partial sequence (5'-3')	Microsatellite	Acc. no.
<i>L. williamsii</i> -2	C C T T - - - - - A T A T A T A T A T A T A T - - - - - A A	(AT)8	AB362489
<i>L. williamsii</i> -1	C C T T - - - - - A T A T A T A T A T A T A T A T A T - - - - - A A	(AT)10	AB362488
<i>L. williamsii</i> new type	C C T T - - - - - A T A T A T A T A T A T A T A T A A - - - - - A A	(AT)11	this study
<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i>	C C T T A T A T A T A T A T T T - - - - - A T A T A T A T A T A T A T A T - - - - - A A	(AT)5+9	AB362490
<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i> new type	C C T T A T A T A T A T A T T T - - - - - A T A T A T A T A T A T A T A T - - - - - A A	(AT)5+8	this study
<i>L. diffusa</i>	C G T T A T T T A T A T G T - - - - - A T A T A T A T A T A T A T A T - - - - - A A	(AT)2+8	AB362491
<i>L. diffusa</i> new type	C G T T A T T T A T A T G T - - - - - A T A T A T A T A T A T A T A T - - - - - A A	(AT)2+9	this study
<i>L. diffusa</i> var. <i>koehresii</i>	C G T T A T A T A T A T A C A T T T A T A T T T A T T T A T A T A T A T A T - - - - - A A	(AT)4+6	this study

MW: 209

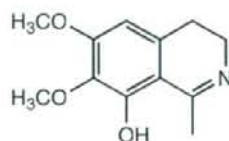
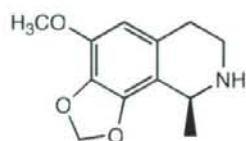


MW: 211



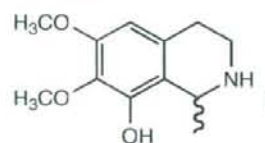
mescaline (1)

MW: 221

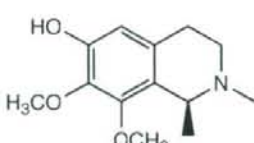


anhalonine

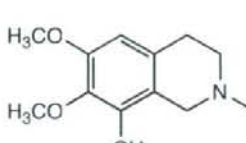
MW: 223



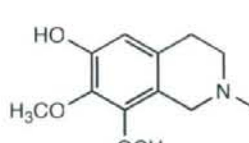
*IR*: anhalonidine



isoanhalonidine

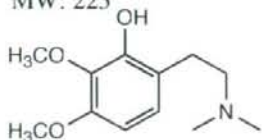


anhalidine

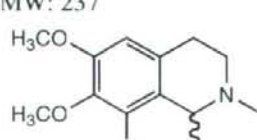


isoanhalidine

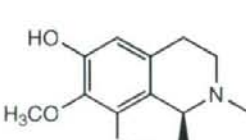
MW: 225



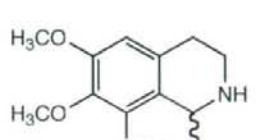
MW: 237



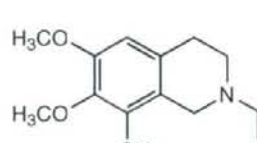
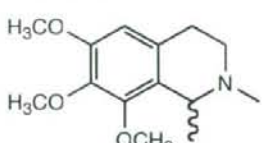
pellotine



isopellotine

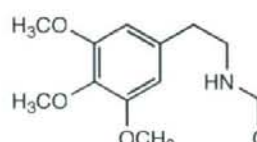
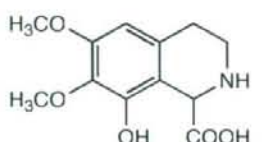


MW: 251



*N*-acetylanhalamine

MW: 253



*N*-acetylmescaline

図1 *Lophophora* 属植物における含有が報告されている主なアルカロイド