

(3) 薬用セッコクと基原植物の遺伝子配列による同定

研究協力者 朝比奈はるか お茶の水女子大学人間文化創成科学研究科
ライフサイエンス 博士課程(後期)

研究要旨 市場で流通しているセッコク商品が基原植物不明のまま混在している現状を科学的に把握する手段として、セッコクの基原植物、また植物そのものの同定法について遺伝子配列を使って検討した。二つの葉緑体遺伝子、Maturase-coding gene (*matK*) および Large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-coding gene (*rbcL*) を使った系統樹解析による解析の結果、植物体の *D. fimbriatum*、*D. moniliforme*、*D. nobile*、*D. pulchellum*、*D. tosaense* の中では、*matK* 配列単独での種の同定が行えることが明らかとなった。熱及び水処理されている生薬セッコクからは、今回目的とする配列は抽出できず、利用する遺伝子配列の検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

デンドロビウム植物は、生薬名をセッコク(中国名:石斛、Shihu)といい、さまざまな薬理的作用をもつと報告されてきた。花を除き形態学的に種間で似ており、形態に基づく同定を困難にしている。加工された生薬の形は、一般に中国語で楓斗(Fengdou)と呼ばれるもので、植物が茹でられ、変形され、乾燥され小さなコイル状の形の生薬となるので、この状態からの基原植物の同定は最も難しい。非常に多くの生薬セッコクが、アジアの市場に混在して流通しており、高級品とされる種とその他の区別が困難になっている。一方、本プロジェクトでは麻薬代替作物として薬用ランデンドロビウム属植物のミャンマー山岳地域での栽培を計画し、検討を重ねてきた。本年度は、市場で流通している商品が基原植物不明のまま混在しているという現状において、現流通品およびその基原植物の同定手段、および今後の栽培予定品の他との差別化

の科学的手段として、遺伝子配列による系統樹解析がどの程度有効であるかについて、検討することを目的とした。

B. 研究方法

生薬セッコクサンプル数種、および *D. fimbriatum*、*D. moniliforme*、*D. nobile*、*D. pulchellum*、*D. tosaense* の五種に園芸交雑種を加えた薬用デンドロビウム属植物と(Table 1)、DDBJ/EMBL/GenBankの国際塩基配列データベース(DNAデータベース)に登録されているデータを用いて系統樹解析による種の同定を試みた。その際 *matK* と *rbcL* 二つの葉緑体の遺伝子を用いサブクローニングを行った。ゲノムDNAは、生薬または新鮮な植物サンプルから Qiagen 社の DNeasy[®] Plant Mini Kit を用いて抽出した。*matK* 遺伝子の増幅に用いたプライマーセットは、OMAT1F(5'-CCGTTMTSACCATATTGC-3') と *trnK*-2R(5'-AACTAGTCGGATGGAGTAG-3')であり(Topik, Yukawa et al. 2005) *rbcL*

Table 1. 系統樹解析に使用した *Dendrobium* 属植物試料

Taxon	Identifier ^a	Source			Accession no.	
		Abbreviation	Collection site ^b	origin	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
<i>D. fimbriatum</i> Hooker	KK	fitk	Thailand, KKC	Market	AB519776	AB519784
<i>D. moniliforme</i> (Linn.) Swartz	SM	mot	Tochigi Pref., SMC	Wild	AB519775	AB519786
<i>D. moniliforme</i> (Linn.) Swartz	n/a	mom	Mikurajima, SMC	Market	AB519773	AB519788
<i>D. moniliforme</i> (Linn.) Swartz	n/a	mok	Kagoshima Pref., SMC	Market	AB519774	AB519787
<i>D. nobile</i> Lindley	KK	notk	Thailand, KKC	Market	AB519772	AB519785
<i>D. pulchellum</i> Roxburgh ex Lindley	KK	putk	Thailand, KKC	Market	AB519778	AB519790
<i>D. pulchellum</i> Roxburgh ex Lindley	HB	puth	Thailand, HBG	Market	AB519777	AB519789
<i>D. sp. noc-a</i>	A	noca	Okayama Pref.	Market	AB519779	AB519791
<i>D. sp. noc-b</i>	A	nocb	Okayama Pref.	Market	AB519780	AB519792
<i>D. sp. noc-c</i>	A	nocc	MPG, unknown	Market	AB519781	AB519793
<i>D. tosaense</i> Makino	KK	totb	Tanegashima., STC	Wild	AB519770	AB519782
<i>D. tosaense</i> Makino	KK	tosk	Shikoku, KKC	Market	AB519771	AB519783

^a KK, Karasawa, Kohji; SM, Satake, Motoyoshi; n/a., results matched but final identification by experts only at next flowering period; HB, The Hiroshima Botanical Garden, ID no. 5477; A, Hybrid Cultivars of *D. nobile*; ^bSMC, Satake Collection; KKC, Karasawa Collection; HBG, Hiroshima Botanical Garden; STC, Seki Collection; MPG, Medicinal Plant Garden of Showa Pharmaceutical University; unknown, unknown origins; All voucher specimens are deposited in Satake laboratory at the Ochanomizu University.

遺伝子は aF(5'-ATGTCACCACAAACAG AGACTAAAGC-3')と cR(5'-GCAGCAGC TAGTTCCGGGCTCCA-3')である(Hasebe, Omori et al. 1994)。PCRはEx Taq[®] Hot Start Version (TaKaRa Bio.)を用いた。PCR産物はアガロースゲル電気泳動で分離し、Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いて精製した。精製したDNAはT-vector using pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega)に組み込み、*Escherichia coli* DH5 α COMPETENT high (TOYOBO)を形質転換し、illustra[™] plasmid Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare Bioscience)にてプラスミドDNAを回収した。シーケンシングは、BigDye[®] Terminator v1.1及びv3.1 Cycle sequencing kits (Applied Biosystems)を用い調製後、ABI 3100 Avant and 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で

行った。DNA配列データの解析については、ClustalW、Neighbor-joining (NJ) method (Saitou and Nei 1987)、Maximum Composite Likelihood method (最尤法) (Tamura, Nei et al. 2004)で行った。系統樹の出力はMEGA4 (Tamura, Dudley et al. 2007)を使った。

C. 結果及び考察

D. fimbriatum、*D. moniliforme*、*D. nobile*、*D. pulchellum*、*D. tosaense*の中では、*matK*配列単独 (Fig. 1) または3'側半分の配列での種の同定が行えることが明らかとなったが、*rbcL*では種の分離は不明瞭だった。これは、*rbcL*が種レベルの分離に適すほどの変異を蓄積していないことから考えると考えられた。またDNAデータベースの*D. officinale*のデータを加えた*matK*による系統樹では (Fig. 2)、

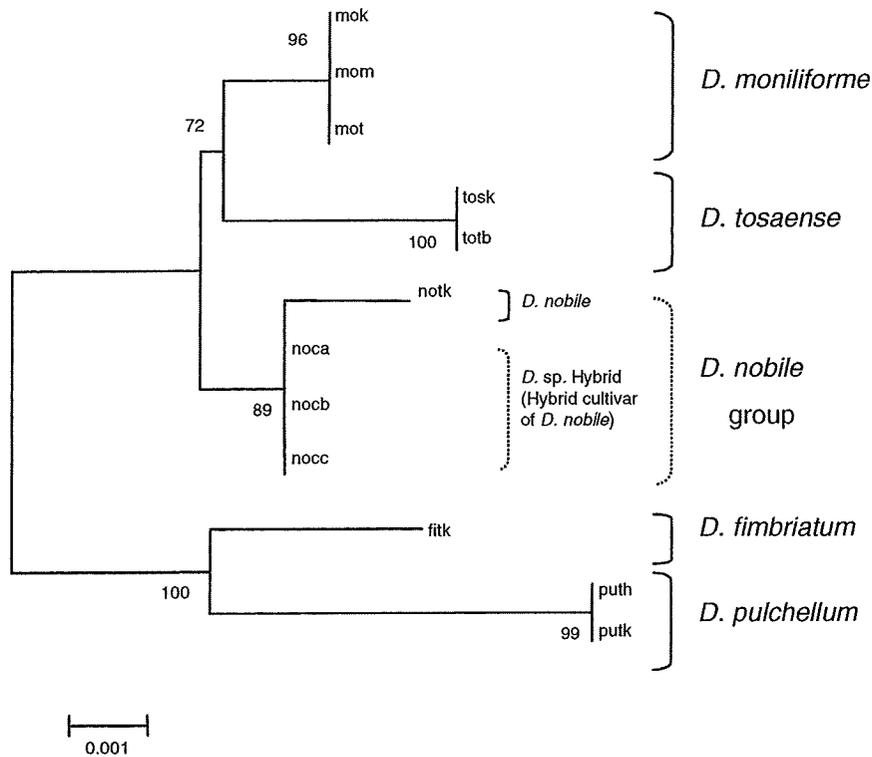


Fig. 1. 5種と園芸交雑種の *Dendrobium* 属植物における *matK* 配列より得られた系統樹

D. officinale と *D. tosaense* は同じ枝に位置した。形態学的な議論において、この二つの関係を同一種と扱うか否かについては意見が分かれているが、系統樹解析がより確かな同定をもたらす可能性が強く示唆された。いずれ系統樹解析用のデータが蓄積されることにより、議論は決着するものと考えられた。残念ながら生薬では今回はDNAが検出できなかった。加工過程でのDNAの損傷が考えられるため、より短く、しかし有意な情報をもつ配列の遺伝子利用を検討する必要があると考えられた。

D. 結論

植物体における種の分離は *matK* で明らかであった。しかし種の同定方法とし

てDNAの塩基配列をバーコードとして扱うに当たっては、雑種の出現、参照するDNAデータベース上の配列の原植物同定の信頼性および蓄積データ数などの問題を念頭に置きながら同定の判断基準とする必要があると考えられた。いずれにしても遺伝子配列は、季節、養分、平均気温、地質などの環境の影響を受けない絶対的データという利点があり、単独で同定できる可能性が高い。また今回は成功しなかったがDNA配列は生薬の同定の力の可能性も依然秘めており、引き続き生薬セッコクからのDNAの抽出について、葉緑体遺伝子のみならず広く核遺伝子を含めた中から目的DNA配列の検討が必要であることが明らかとなった。

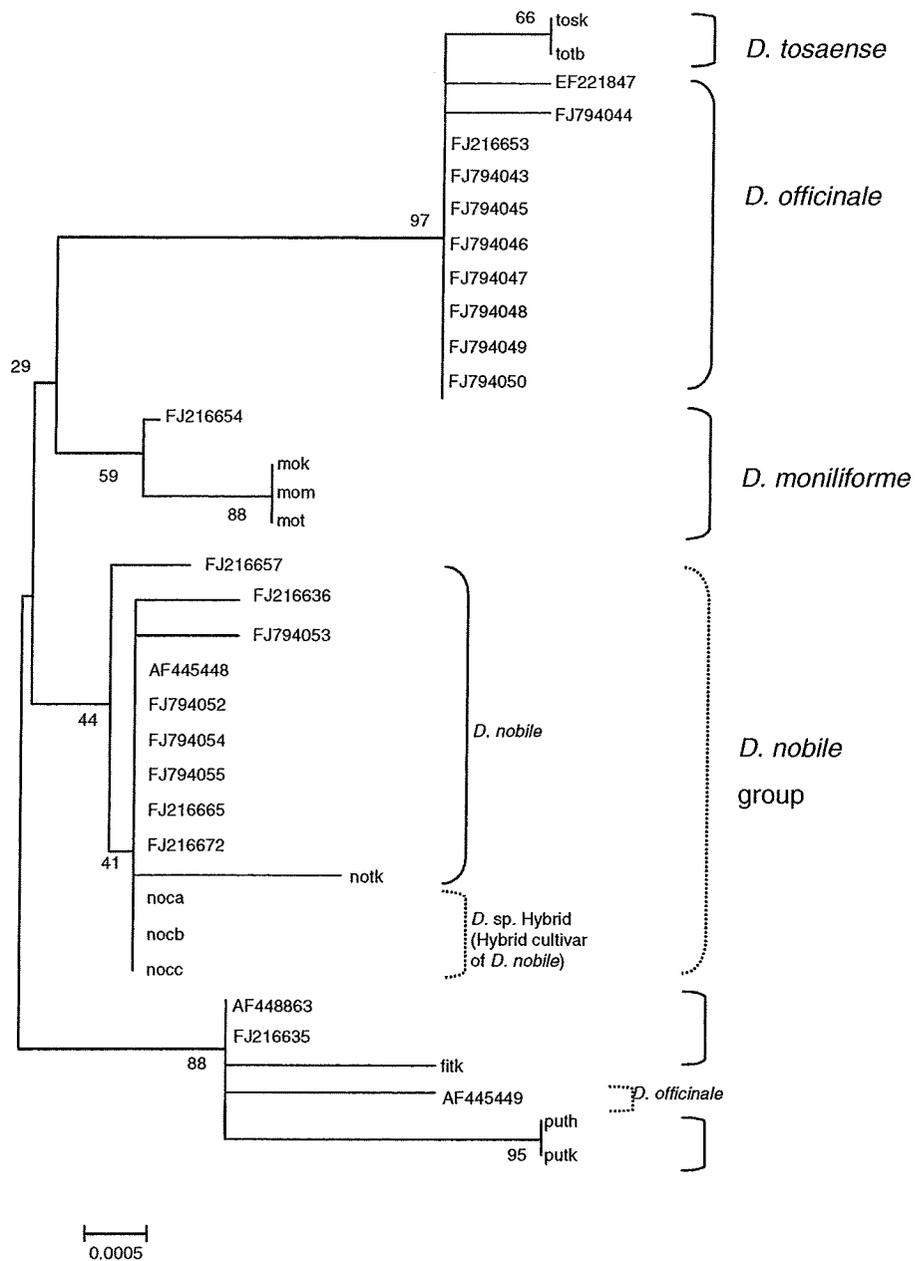


Fig. 2. 6種35株の *Dendrobium* 属植物における部分的 *matK* 配列 (Nt. 537-1341) による系統樹。DNA データベース上の同種および *D. officinale* の配列を合わせたもの。

E. 引用文献

- Hasebe, M., Omori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M. and Iwatsuki, K. (1994). "rbcL gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12): 5730-4
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol* 4(4): 406-25.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0." *Mol Biol Evol*

24(8): 1596-9.

4. Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S. (2004). "Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(30): 11030-5.
5. Topik, H., Yukawa, T. and Ito, M. (2005). "Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): Insights from plastid *matK* and nuclear ribosomal ITS sequences." *Journal of Plant Research*

118(4): 271-284.

F. 論文発表

1. Asahina, H., Shinozaki, J., Masuda, K., Morimitsu, Y. and Satake M. "Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using *matK* and *rbcL* sequences." *Journal of Natural Medicines*, Published online 6 February 2010.

II-2. 分担研究報告書

覚せい剤(ATS)の原料物質等に関する研究 —水素・炭素・窒素の安定同位体比による密造原料の起源探索—

研究分担者 長野 哲雄 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究要旨 本研究は、世界各地で流通している覚せい剤原料エフェドリン及びプソイドエフェドリン(エフェドリン類)の化学的情報を覚せい剤密造用原料規制対策に役立てることを目的としている。これまでの研究では、覚せい剤プロファイリングを課題にして、不純物分析による合成ルート推定、光学異性体分析、覚せい剤原料の炭素・窒素・水素の安定同位体比質量分析(IR-MS)による起源推定について検討し、その有用性を明らかにしてきた。特に、エフェドリン類の水素安定同位体比は炭素・窒素の安定同位体比とともに新たな覚せい剤原料エフェドリン類の製造法分類に必須な指標であることを新たな知見として見出した。本年度は、我が国で押収された覚せい剤の炭素・窒素・水素の安定同位体比の値から各押収品の原料の起源推定において、各値に固有の変動があり判断しがたい場合もあったが、3次元のグラフで可視的に表すことにより、わかりやすい分類が可能となった。また、データ交換等の研究協力を検討してきたオーストラリアの研究グループからデータ提供を受けた覚せい剤原料エフェドリン類や押収品である覚せい剤の安定同位体比の値を本研究での結果と照らし合わせ、両国の覚せい剤密造原料エフェドリン類の起源についての傾向をとらえることができた。2009年には、インドネシアやマレーシアで、一度にトン単位の覚せい剤の押収事件も発生している。今後、炭素・窒素・水素の安定同位体比を組み合わせた密造原料エフェドリン類の起源解析についての化学情報を含めた覚せい剤のプロファイリング技術を関係国に積極的に提供し、原料規制対策に役立つ情報の確立を目指していくことは、我が国の大きな課題である覚せい剤問題に化学情報をフィードバックできるものといえる。

研究協力者

浦野 泰照 東京大学大学院薬学系
研究科 准教授
牧野 由紀子 東京大学薬学部
薬品代謝化学教室 研究員

性について報道があり、マスコミによる大きな薬物乱用防止キャンペーンが繰り広げられ、薬物の恐ろしさの認識が広まった効果は大きかった。しかし、薬物乱用をくい止めるためには、乱用者を摘発し社会復帰へのサポートを行って薬物の需要を絶つと同時に薬物の供給源自体を絶つことがきわめて重要である。

A. 研究目的

平成 21 年の夏に起こった芸能人の薬物乱用事件においては、連日薬物の危険

本研究は、1998年の国連麻薬犯罪取締

局(UNODC)主催の覚せい剤のプロファイリングに関する東京会議をスタートとしている。その後も引き続きアンフェタミン型覚せい剤(ATS)とその原料物質に関する取締行政への科学的支援に関する様々なプロジェクトが関係国で繰り広げられている。本研究は覚せい剤の原料規制に役立つ化学情報の提供を目的として、覚せい剤問題解決のため関係国の法化学者と連携をとり化学情報の取締行政での活用を視野に実施している。2009年にはマレーシアやインドネシアでの大規模な覚せい剤の密造所の摘発やトン単位の押収があった。東南アジアの法化学研究所グループは覚せい剤の密造原料規制への化学情報の活用に強い関心をいただき、ネットワークを組んでの取り組みをUNODCの協力を得て2009年11月にスタートさせている。日本も薬物乱用防止対策として事犯への厳罰化、乱用防止の啓発活動、密造原料植物の不正栽培や流通防止について、関係各国と協力し、薬物乱用防止対策をおこなっていかなくてはならない。

これまで、我々は世界各地で流通している覚せい剤押収品の様々なプロファイリング手法について検討し、有用性を明らかにしてきた。特に、エフェドリン類の水素安定同位体比は炭素・窒素の安定同位体比とともに新たな覚せい剤原料エフェドリン類の製造法分類に必須な指標であることを見出した。更に、覚せい剤の出発原料エフェドリン類の炭素・窒素・水素の安定同位体比が製品である覚せい剤メタンフェタミンに保持されていることを確認した。本年度は、日本で押収された覚せい剤についての炭素・窒素・水素の安定同位体比から、密造に使

用された覚せい剤原料の起源推定について検討した。更に、データ交換等の研究協力を検討してきたオーストラリアの研究グループからデータ提供を受けた覚せい剤原料エフェドリン類や押収品である覚せい剤の安定同位体比の値を本研究での結果と比較検討した。

B. 研究方法

1. 試料

l-Ephedrine の塩酸塩 16 試料、*d*-Pseudoephedrine 塩酸塩 10 試料及び *d*-Pseudoephedrine 硫酸塩 1 試料については表1の通りである。

実験室で合成したメタンフェタミン塩酸塩7試料は製造許可をとり合成した研究用覚せい剤を用いた。押収品メタンフェタミン塩酸塩25試料は、裁判終了後の国庫帰属品の交付を受けたものを使用した。

安定同位体比質量分析計(IR-MS)による水素・炭素・窒素の安定同位体比測定は関税中央分析所の研究協力を得て行った。

2. 装置及び測定条件

1) 炭素・窒素安定同位体比測定

ガス化前処理装置：

ThermoFinnigan Flash EA 1112

安定同位体比質量分析：ThermoFinnigan DELTA^{PLUS}

試料：

0.30 mg を錫容器 (錫の純度 97.5 %) に秤量し、高純度酸素とともに Flash EA 1112 内の燃焼炉に落とし、錫の酸化熱を利用して 1020°C の高温で試料を燃焼・ガス化させ、酸化触媒で完全燃焼させた。次に、還元炉(680°C)で窒素酸化物を還元し、水を過塩素酸マグ

Table 1 Ephedrine and pseudoephedrine samples used for this study

sample	origin	manufacturing method
1	extracted from ephedra plant	Biosynthetic (I)
2	extracted from ephedra plant	
3	extracted from ephedra plant	
4 <i>l</i> -Ephedrine/HCl	imported from China	
5	extracted from ephedra plant	
6	imported from China	
7	extracted from ephedra plant	
8	extracted from ephedra plant	Synthetic (II)
9 <i>d</i> -Pseudoephedrine/HCl	imported from China	
10	imported from China	
11	purchased from Fujiyakuhin (Japan)	Semisynthetic (molasses) (III)
12 <i>l</i> -Ephedrine/HCl	purchased from Maruishi Pharmaceutical	
13	purchased from Dainippon Pharmaceutical	
14 <i>d</i> -Pseudoephedrine/HCl	imported from Taiwan	Semisynthetic (pyruvic acid) (IV)
15 <i>d</i> -Pseudoephedrine/(H ₂ SO ₄) _{1/2}	imported from China	
16	imported from India	Semisynthetic (pyruvic acid) (IV)
17 <i>l</i> -Ephedrine/HCl	imported from India	
18	imported from India	
19	imported from India	
20 <i>d</i> -Pseudoephedrine/HCl	imported from India	
21	imported from India	Semisynthetic (pyruvic acid) (IV)
22	imported from Germany	
23 <i>l</i> -Ephedrine/HCl	imported from Germany	
24	imported from Germany	
25	imported from Germany	
26 <i>d</i> -Pseudoephedrine/HCl	imported from Germany	
27	imported from Germany	

ネシウム Mg(ClO₄)₂ でトラップ後、He をキャリアーガス(1 ml/min)としてポラパック Q を詰めた分離カラム(L.3 m x I.D.4mm)を用い 35°Cで CO₂ と N₂ を分離し、He をキャリアーガスとしインターフェースを通して質量分析計(磁場型)に導入し、安定同位体比を測定した。

燃焼炉での反応

Sample → CO₂, N₂, NO_x, H₂O

銅製還元炉での反応

NO₂ → N₂

2) 水素の安定同位体比測定
ガス化前処理装置

Thermo Electron TC/EA

安定同位体比質量分析:

ThermoElectron DELTA V

試料:

エフェドリン類は 0.245 mg、メタンフェタミンは 0.230 mg を銀容器(銀の純度 99.99%)に秤量し、TC/EA 内の熱分解炉に落とし、1400°Cの高温で試料を分解させた。発生した CO と H₂ を He キャリアーガスと共にモレキュラシーブを

つめた分離カラム(L. 60 cm x I.D. 1.4 mm)を用い 85°Cで分け、分離した CO と H₂を He ガスとともにインターフェースを通して質量分析計(磁場型)に導入し、安定同位体比を測定した。

熱分解炉での反応

(グラシーカーボン顆粒入りアルミナセラミック管)

Sample → H₂, CO, N₂, NO

3. 安定同位体比の算出

水素・炭素・窒素の各値は下記の計算式で算出した。

$$\delta (\text{‰}) = (R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}} - 1) \times 1000$$

$$R = {}^2\text{H}/{}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}, {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$$

標準試料：

水素：ウィーン標準平均海 (VSMOW)

$$\text{D}/\text{H} = 0.00015576$$

炭素：Pee Dee ベレムナイト (VPDB)

$${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} = 0.011237$$

窒素：大気中の N₂

$${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} = 0.003676$$

4. 測定法

各試料の測定順序

1. ブランク試料 5 回
2. ワーキングスタンダード 5 回
3. 試料(a) 5 回
4. ワーキングスタンダード 5 回
5. 試料(b) 5 回
6. ワーキングスタンダード 3 回

精度：0.1‰ for δ¹³C、0.2‰ for δ¹⁵N

5‰ for δ²H

C. 研究結果

Table 1 に記載した各エフェドリン類の炭素・窒素・水素の安定同位体比の測定結果は Table 2 に示す。また、起源既知の市販品エフェドリン類を出発原料とし、実験室で合成したメタンタンフェタミン

の炭素、窒素及び水素の安定同位体比は Table 3 に示す。日本で押収されたメタンフェタミンの炭素・窒素・水素の安定同位体比の測定結果は Table 4 に示す。

Table 2 Stable isotope ratios of ephedrines in

Table 1

Sample	δ ² H (‰)	δ ¹³ C (‰)	δ ¹⁵ N (‰)
1	-183	-30.5	6
2	-191	-29.5	3.9
3	-155	-31.1	10.6
4	-193	-28.5	5.6
5	-151	-26	3.8
6	-184	-29.2	4.2
7	-152	-30.9	-2.2
8	-191	-29.8	1.1
9	-164	-27.9	3.4
10	-184	-27.9	5.4
11	-35	-28	-10
12	-101	-29.2	-10.5
13	-57	-28.3	-11
14	-60	-28.2	-6.4
15	-30	-28.7	-9.1
16	229	-22.9	9.5
17	111	-23.1	6.2
18	-74	-22.9	6.4
19	72	-23.7	3.8
20	77	-23.5	3.0
21	146	-22.6	2.4
22	110	-26.9	-2.8
23	148	-25.3	-2.9
24	79	-26.3	-2.9
25	75	-27.3	-4.1
26	75	-27.5	-4
27	103	-25.8	-3.4

Table 3 Stable isotope ratios of methamphetamine synthesized from known ephedrines (‰)

Sample	synthetic pathway	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
A	Emde	51	-26.2	-2.0
precursor	SemiSyn(#24)	79	-26.3	-2.9
B	Nagai	172	-23.0	9.5
precursor	SemiSyn(#16)	229	-22.9	9.5
C	Emde	-215	-29.5	3.9
precursor	Natural (#6)	-184	-29.2	4.2
D	Nagai	-147	-29.2	-11.1
precursor	Syn (#12)	-101	-29.2	-10.5
E	Emde	-132	-26.1	-11.1
precursor	Syn (#12)	-101	-29.2	-10.5

D. 考察

製造法既知のエフェドリン類 27 試料の炭素と窒素の安定同位体比は、2 次元で図示すると Fig. 1 のようになる。Fig.1 において、出発原料は糖蜜とピルビン酸と異なるが同じ半化学合成品である III (No.16~21)と IV(No.22~27)は明瞭に区別できる。しかし、ピルビン酸を原料とする IV のグループは天然品 I と化学合成品 II に近接しており、区別が明瞭ではない。各エフェドリン類(Table1)の水素安定同位体比分布は Fig. 2 のようになり、麻黄由来のエフェドリン類 I は醗酵法過程を含む半合成品 III や IV と大きな差がある。そこで、Fig.1 と Fig.2 を交互に比較するのではなく、炭素・窒素・水素の三変量を同時にプロットし可視化する方法を検討した。まず、正三角形で三辺を炭素、水素及び窒素の値として表記する Ternary Plot で図示したが、各起源由来のグループに明瞭に可視化できなかった。

Table 4 Stable isotope ratios of seized methamphetamine samples (‰)

Sample	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
1	-237	-28.7	6.1
2	-230	-28.7	6.1
3	-228	-29.4	7.3
4	-227	-28.7	6.4
5	-224	-28.5	6.2
6	-212	-29.9	6.6
7	-208	-27.6	4.2
8	-206	-27.2	4.8
9	-204	-27.6	4.4
10	-202	-26.9	2.9
11	-200	-27.1	3.0
12	-196	-29.4	5.4
13	-195	-29.5	5.8
14	-192	-26.9	1.5
15	-180	-27.0	3.3
16	-122	-31.9	0.3
17	-107	-30.3	0.6
18	-64	-32.8	2.0
19	-18	-32.5	3.1
20	-1	-23.1	5.1
21	47	-23.3	9.4
22	19	-26.3	-2.6
23	41	-26.2	-3.2
24	45	-26.1	-3.0
25	46	-26.2	-2.2

そこで、3次元で3変量をプロットするに適したソフトウェアとして Sigma Plot 11(Systat Software, Inc.) を選び、炭素・窒素・水素の安定同位体比を 3D Scatter Plot で図示することにした。Table 1 の 27 試料を 3次元で図示すると Fig.3 のようになり、可視的に 4 グループ(I, II, III & IV) に明瞭に分類できた。

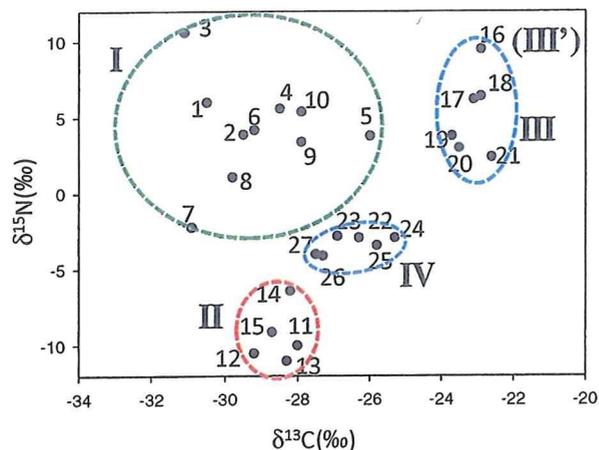


Fig. 1. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine samples in table 2, 'I': biosynthetic group, 'II': synthetic group, 'III': semisynthetic group from molasses, 'IV': semisynthetic group from pyruvic acid.

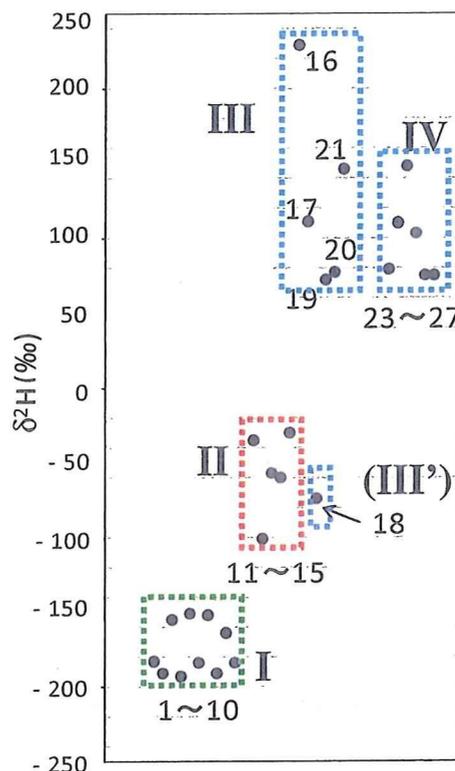


Fig. 2. $\delta^2\text{H}$ values for *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine samples in Table 2. Samples I-IV is the same as in Fig.1.

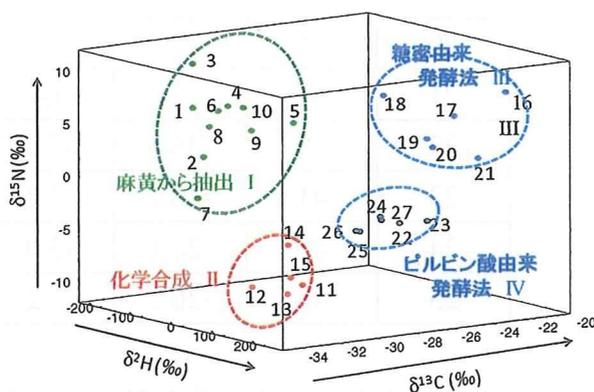


Fig.3. 3D scatter isotope plots of $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in three-dimensions of ephedrines: Numbers from 1 to 27 in Table 2.

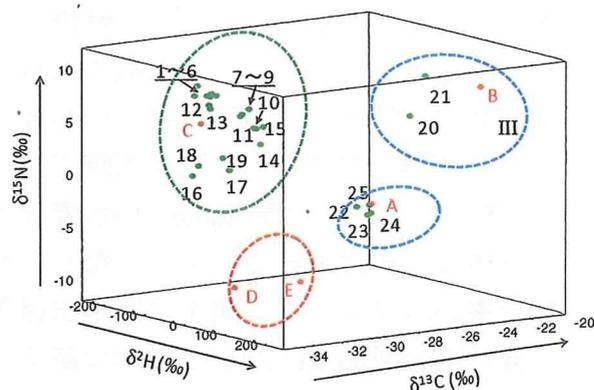


Fig.4 3D scatter isotope plots of $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in three-dimensions of methamphetamine: numbers from 1 to 25 are assigned to the seized samples in Table 4. Marks from A to E are 5 methamphetamines synthesized from known ephedrines in Table 3.

例えば、No.7の麻黄由来 *l*-ephedrine は Fig.1 では II や IV に近接しており、分類が不明瞭であるが、Fig.3 で製法由来が天然品の位置にプロットが入る。同様に No.26 と 27 も Fig.3 では IV のクラスターのところにはいり分類が明瞭になった。糖蜜由来の半合成で製造された No.18 は水素の値が合成由来の II のグループに近いが、炭素と窒素の値からは III のグループに属し不明瞭であったが、Fig.3 の 3次元プロットでは、起源と一致する III のグループの位置にスポットが入り、納得できる結果が得られた。

次に、Fig.3 と同じスケールで、Table 3 に示した実験室での合成品 5 試料(A~E) と Table 4 に記載の押収品メタンフェタミン塩酸塩 25 試料について、三次元プロットすると Fig.4 のようになった。実験室で合成した原料既知のメタンフェタミンは図中の A~E のプロットで示した。A~E のメタンフェタミン塩酸塩はそれぞれ原料由来の位置にスポットされた。Table 3 で水素の安定同位体比が原料エフェドリンより減少傾向にあったが、その変動は原料推定におおきな影響はないことを確認した。例は少ないが、押収品の値を 3次元で表記することで原料の起源推定が可能となったといえる。Table 4 の日本で押収されたメタンフェタミン塩酸塩 25 試料の原料を Fig.4 から推定すると、No.1~19 の原料は麻黄から抽出された天然品、No.20 と 21 は糖蜜を用いて醗酵法でつくられた半合成品、No.22~25 はピルビン酸由来の醗酵法による半合成品を原料としていることが推定できる。

2008 年 6 月にオーストラリアの National Measurement Institute の M.Collins 等のグループから、我々のメタンフェタ

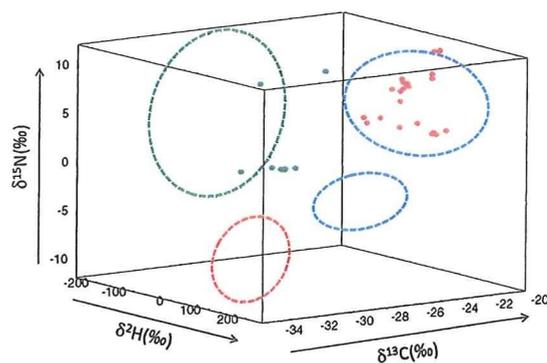


Fig.5 3D scatter isotope plots of $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in three-dimensions of seized methamphetamine in the report by Dr.M.Collins²⁾.

ミンの安定同位体比による原料起源解析研究について、彼らの会議において講演するよう依頼された。これまでの本研究班での結果及び考察について講演し、その後、研究データの共有について話し合った。互いに、原料規制対策に役立たせたいという共通目的をもっていることからデータ交換を試みることになった。会議の後、彼らのラボを訪問したところ、同じメーカーの装置が設置してあることがわかった。そこで、データ交換するにあたり、ワーキングスタンダードを共有することを提案し、炭素と窒素の値が保証されている L-alanine (昭光通商株式会社製) $\delta^{13}\text{C}$ vs PDB $-19.9 \pm 0.2(\text{‰})$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ vs Air $-1.1 \pm 0.2(\text{‰})$ を担当者に提供した。我々と同様の検討をしたと翌年春に報告があった。幾つかのデータを受領し意見交換した。その後、彼らも我々の論文¹⁾とほぼ同様の内容で論文を我々より少し遅れて発表した²⁾。M.Collins 等の論文に記載された既知原料からの合成メタンフェタミンのデータを引用し、Fig.4 と同じスケールでスポットしたところ、図は省略す

るが、合成した原料既知のメタンフェタミン塩酸塩は我々の結果同様、原料の安定同位体比が合成品に保持されていた。また、彼らの論文に記載されていたオーストラリアでの押収品についてのデータを Fig.4 と同じスケールで 3D scatter plot したのが Fig.5 である。論文に記載されていたオーストラリアでの押収品は、糖蜜由来の原料を用いて半合成法で作られたエフェドリン類を原料としたものが多いことが推定できる。

E. 結論

覚せい剤メタンフェタミンの水素・炭素・窒素の安定同位体比の 3 変量を 3 次元でプロットし、図示することにより、出発原料物質エフェドリン類の由来をより精確に識別できるようになった。2 次元表記よりも 3 次元での表記は炭素・窒素・水素の多少の変動があっても分類に大きく影響しないことも判り、可視化により明瞭な原料推定が可能となったことは大きな前進であった。また、安定同位体比の測定は高度な技術を要する分析であるが、共通の目的を持って意見交換し、基準となるワーキングスタンダードの共有等の測定のポイントを捕らえることで、データ交換が可能となることを一例ではあるが立証できたことは大きな成果であ

ったといえる。

2009 年の我が国の覚せい剤押収量は 358 kg で前年比で 1 割減少したが、インドネシアやマレーシア等の東南アジアでは、一度にトン単位の覚せい剤の密輸事件が発生していた。今後、密造原料エフェドリン類の起源解析に炭素・窒素・水素の安定同位体比を組み合わせた覚せい剤のプロファイリング技術を関係国に積極的に提供し、原料規制対策に役立つ情報の確立を目指していくことは、我が国の大きな課題である覚せい剤問題に化学情報をフィードバックできるものといえる。

F. 参考文献

1. N.Kurashima, Y.Makino, S.Sekita, Y.Urano, T.Nagano, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 4233-4236
2. M.Collins, A.T.Cawley, A.C.Heagney, L.Kissane, J.Robertson, H.Salouros, *ARapid Commun. Mass Spectrom.*, 23 (2009) 2003-2010

G. 研究発表

1. N.Kurashima, Y.Makino, Y.Urano, K.Sanuki, Y.Ikehara, T.Nagano, *Forensic Sci. Int.*, 189 (2009) 14-18

II-3. 分担研究報告書

麻薬植物の不法栽培地域での代替え薬用植物の導入研究

研究分担者 関田節子 徳島文理大学香川薬学部 教授

研究要旨 ミャンマーの麻薬栽培地の代替植物として栽培を検討している薬用植物 *Diospyros burmanica* の有効利用を検討した。熱帯リーシュマニア原虫に対する活性を検討し、有用な成分を見出した。

研究協力者 安元加奈未

徳島文理大学香川薬学部 助教

A. 研究目的

ミャンマー連邦山間地域に代替植物を導入し経済植物栽培を確立する方策の一つとして、現地の有用植物の活用を検討している。そのためには科学的な選定基準を設定し、健康に寄与するものであるとの理解を得ることが必要である。そこで、現地に生育する植物を対象に抗リーシュマニア活性等を検討している。WHOの報告によると、リーシュマニア症は新旧大陸の熱帯地域 88 カ国に蔓延し、少なくとも 1200 万人の患者がいるとされている。現在用いられているアンチモン製剤は、副作用が強く、厳しい管理下に限られているため、有効かつ副作用が少なく安価な医薬品の開発が望まれている。

これまでに、我々は、抗リーシュマニア活性が顕著であった成分として、*Paris tibetica* Franc からステロイド配糖体である (25R)-spirost-5en-3β-yl-O-α-L-arabinofuranosyl-(1-4)-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]β-D-glucopyranoside など 2 種類の化合物を、また、ウルシ科の植物 *Semecarpus anacardium* からは ursiol 類似

の新規化合物 3 種を見出し、構造決定を行った。また、古文献に香りが良く化粧品として利用されていると記述されている *Cordia fragrantissima* Kurz. の化学的研究を行い、新規化合物 3 種を含む 8 成分の構造決定と活性強度の比較を行った。さらに、建築材や家具材として有用な樹木であるチークの木について検討し活性試験と成分検査を行い、2 種の成分を単離同定した。

本年度は、予備実験より抗リーシュマニア活性を示した *Diospyros burmanica* の材について研究を進めた。*D. burmanica* はミャンマーの豊富な森林資源の一つで、その緻密で重厚な材の性質から主に家具や野球のバットに使用されている。この *D. burmanica* の材メタノールエキスについて、活性成分の探索と構造決定、活性を検討した。

B. 研究方法

試料 *Diospyros burmanica* の材は研究代表者より供与された。

溶媒、試薬類は和光純薬工業、化学用を用いた。NMR 測定は Bruker Avance-400 並びに 700 を使用した。

RAW264.7 細胞の培養：RAW264.7 細胞

(ECACC) は、25cm² tissue culture Flask 中 10%FCS 入り DMEM 培地を用いて 37 度 5% CO₂ に設定した CO₂ インキュベーター内で培養を行い、コンフルエント到達後 30-50 倍希釈を行い継代とした。

細胞毒性試験: Roche 社製 XTT assay kit を用いて検定を行った。

Leishmania 原虫の培養: *Leishmania major* は 25cm² tissue culture Flask 中 10%FCS 入り Medium199 培地を用いて 26.5 度 5% CO₂ に設定した CO₂ インキュベーター内で培養を行い、2-3 日後コンフルエント到達後 50~100 倍希釈を行い継代とした。アッセイに使用するリーシュマニアは、使用直前に血球計算板上でカウントし、Medium 199 培地により 1x10⁶ promastigotes/mL に希釈して用いた。

活性評価 (in vitro): 試料は DMSO に溶解した後、Medium 199 培地で希釈し、メンブレンフィルターを通した。試料溶液は 9 つの濃度に調製し、96 穴マイクロタイタープレートに各濃度の試料溶液 50 μL と 1x10⁵ promastigotes/mL となるように調製した *L. major* 液 50 μL をそれぞれ接種し、培養液の全量を 100 μL とした。27 度 5% CO₂ 下で 48 時間インキュベートを行った後、Tetracolor ONE (生化学工業) 試薬を加え、6 時間のインキュベートの後にマイクロプレートリーダーにより OD 値 (450-630nm) を測定した。試験は n=3 で行い、平均値および平均誤差を求めてグラフを作成した。IC₅₀ はグラフより求めた。

抽出と単離: 材は、グラインダーで削り、メタノールにて温浸抽出した。減圧濃縮後、得られたメタノールエキスは、90%メタノールと n-ヘキサンで分配し、

更に水を加えてクロロホルムで分配を行った。活性を示したクロロホルム層 (MIC=1.56 μg/mL) を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した (n-hexane: acetone, Silica gel 60N, 40-50 μm, Kanto Chemical Co.)。分画した各フラクションについて、リーシュマニア原虫を用いたバイオアッセイを行ったところ fr.4-6 に顕著な活性が見られた (MIC=1.56 μg/mL)。これに従って、さらに ODS オープンカラムクロマトグラフィー (methanol: water = 8:2-9/1-95/5-100/0, Cosmosil 75C18-OPN, Nakalai tesque)、HPLC をそれぞれのフラクションについて行い化合物 1-15 を得た。

(HPLC condition : Mobile Phase/ acetonitrile : H₂O-1:1. Detection /UV at 210, 254, and 280. RI range 64. Column/ Shiseido Capcell Pak C18 MG 5 μm, ø 20 x 250 mm. Flow Rate/ 4.0 mL/min) 。

バイオアッセイガイドによる分離スキームを図 1 に示した。

C. 研究結果

得られた化合物 **1-14** について、各種機器分析 (NMR, MS, UV, IR) を用いて構造を推定した。化合物 **1, 4-5, 7, 9-14** は新規化合物であった。

得られた化合物一覧を図 2 に示した。これらの構造のうち、化合物 **11** について詳細に以下に述べる (図 3)。

化合物 **11** は、¹H-NMR において、アロマティックに結合した (6.5-8.0 ppm 付近) H が 5 つ観測され、そのカップリングパターンと化学シフトから (シングレット 3 つ、カップリングしたダブルット 1 つ、*J* = 8.0 Hz)、オルト位で 2 置換されたベンゼン環が一つ、1 置換ベンゼン環がひ

とつ、メタ位で2置換されたベンゼン環であると推定した。また、共役系に結合したメトキシ基が2つ(δ 4.01, 3.90 ppm)、2.48, 1.99 ppmに4級メチル基由来シングレットが認められた。また ^{13}C NMRでも上記の部分構造を示唆しており、キノ

由来カルボニル炭素と考えられる炭素が4つ観測され(δ 183.5, 183.4, 183.1, 182.5 ppm)、キノン骨格を2つ有することが示唆された。(不飽和度は9, ベンゼン環由来炭素16本、キノン由来4本)。全体構造はHMBC及びH-H COSYスペクトル

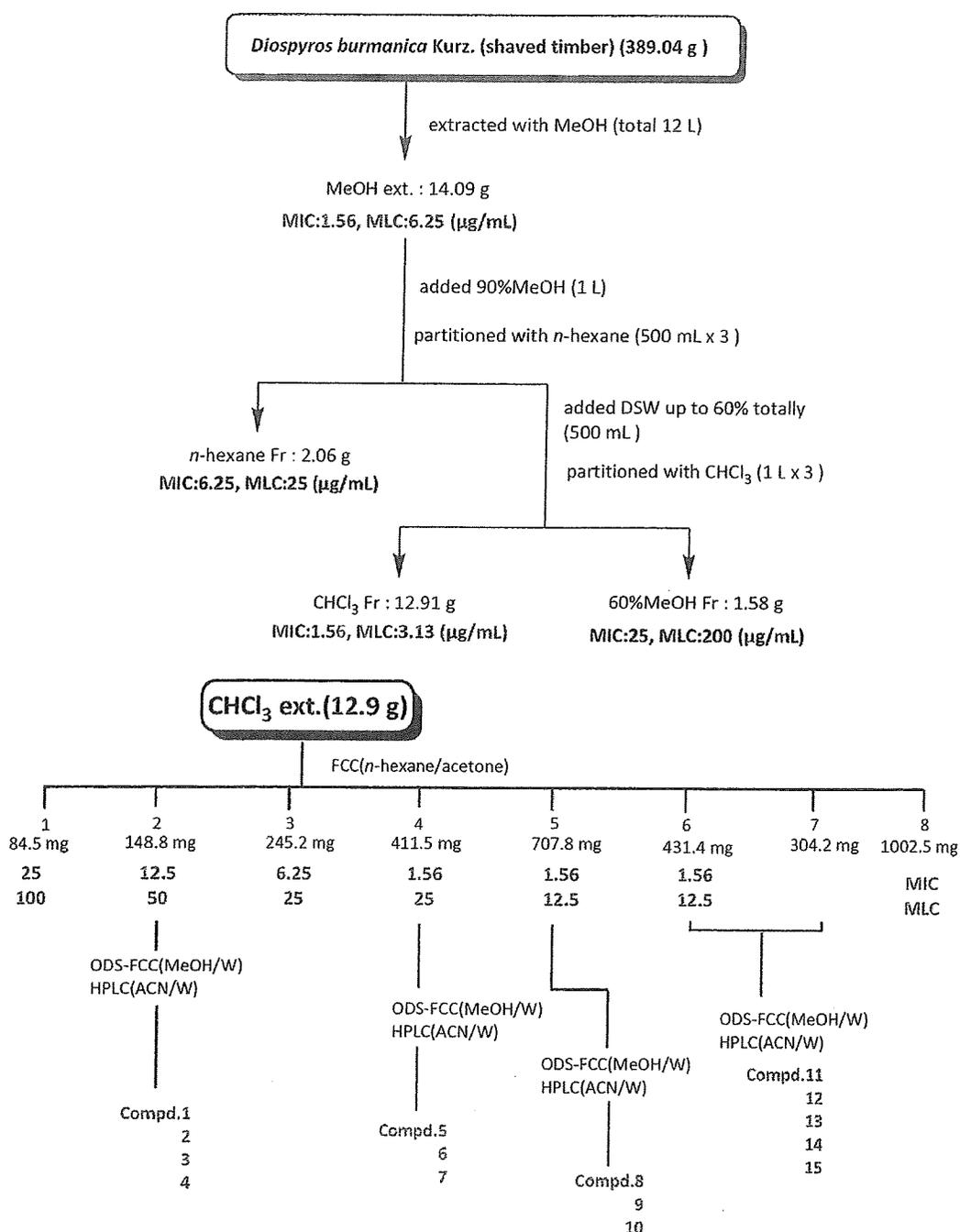


図1 *D. burmanica* の抽出・単離スキーム

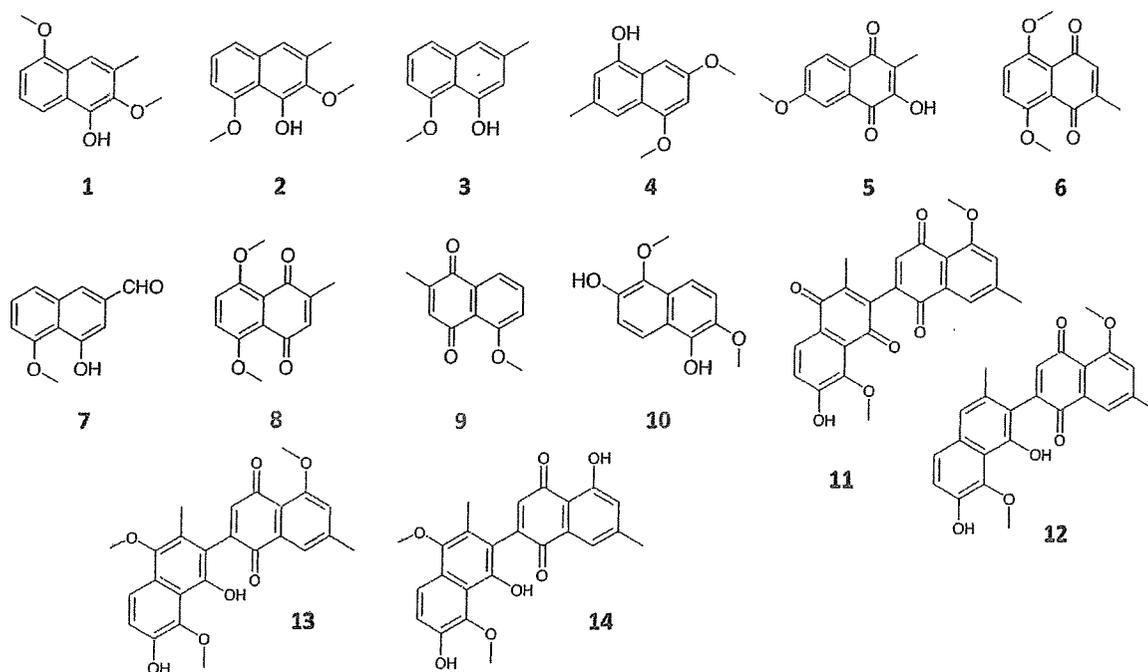
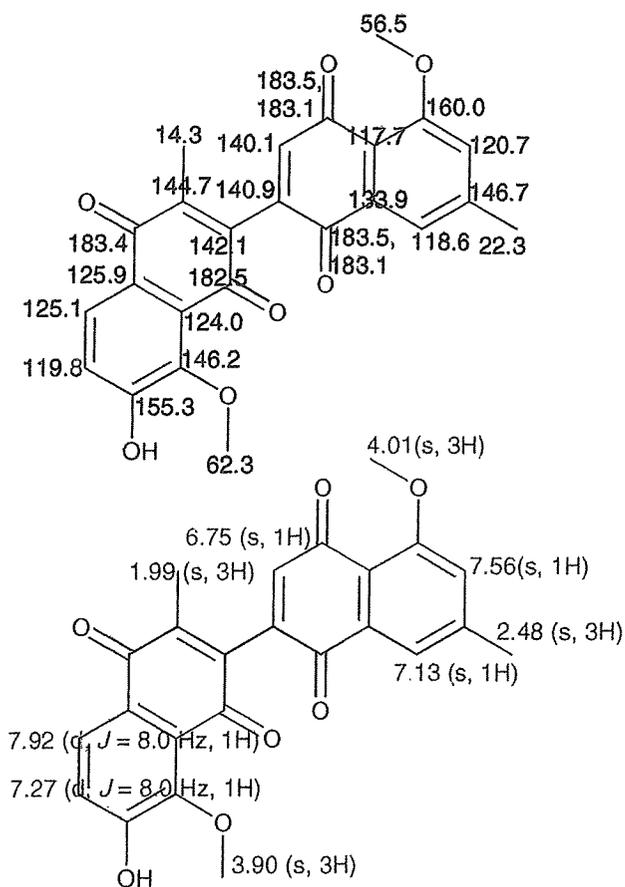


図 2 *D. burmanica* より得られた化合物の構造一覧.



m/z 441.0941 (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{Na}$, 441.0950)
 Bruker AVANCE 400 and 100 MHz
 measured with CDCl_3

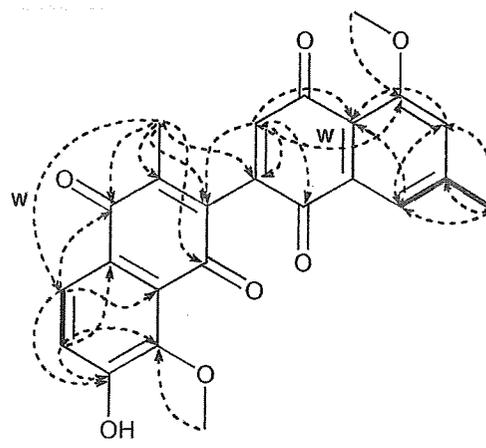


図 3 化合物 11 の構造 (400 MHz, CDCl_3)

表1 単離された化合物の抗リーシュマニア活性と細胞毒性試験の結果 (IC₅₀, µg/mL)

Compd	Leishmanicidal activity	Cell viability for RAW264.7
1	37.4	>75
2	4.9	31.2
3	4.6	45.7
4	4.3	51.2
5	>100	60.5
6	4.6	-
7	92.4	>100
8	20.3	9
9	0.67	26.3
10	0.93	9.9
11	<0.05	12.5
12	0.075	9.7
13	0.064	50.9
14	0.25	9.9
15	0.17	27.7

Leishmanicidal assay (*in vitro*):

Leishmania major promastigote, value is IC₅₀ (µg/mL), positive control:

amphotericin B (IC₅₀ <0.1 µg/mL).

Cell viability: XTT assay kit (Roche)

RAW264.7 cell line. Mouse,

macrophage like, value is IC₅₀ (µg/mL),

positive control: MG132 (10 nM)

により決定した。高分解能マスマスペクトル(HRESI-TOFMS)によりその分子式を確認した(図 3, in CDCl₃)。本化合物は、現在まで天然より得られた報告は無い。

また、単離された化合物の抗リーシュマニア活性並びにマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に対する細胞毒性試験の結果を表 1 に示した。

D. 考察

黒檀(*D. burmanica*)の材はミャンマーにおいて主に家具材として使用され、薬用に用いられてはいないが、今回行った抗リーシュマニア試験で強い活性が見出された。同属植物(*Diospyros sp.*) は以前より盛んに研究されている。成分として炭化水素、トリテルペン、ナフトキノン、クマリン誘導体、フラボノイドなどを含む化合物が多く含まれていることが明らかになっており、様々な病気の治療に各地で伝承薬として使用されている。本研究試料の *D. burmanica* に関する報文は出されておらず、研究は未だ途上であるが、上記のような見地からも有用成分が多く含まれると推測される。

今回の成分検索により、得られた化合物のうち、新規化合物**11-14**が最も顕著な活性を示した。(IC₅₀ <0.05, 0.075, 0.064 µg/mL)

これらの化合物は、マウスマクロファージ様細胞RAW264.7に対する細胞毒性試験において、活性が見られなかったことから、有用な抗リーシュマニア薬の候補化合物と言える。

今後、*in vivo*での試験(足踵感染マウスに静注・湿布)を行う予定である。

E. 学会発表

- 「抗リーシュマニア活性を有する有用植物の探索(その14)-ミャンマー産およびペルー産植物について-」森加奈未^{1,2}、瀧野裕之³、泉本頌子¹、松川龍之介¹、臼井陽平¹、小林正規⁴、竹内 勤⁴、佐竹元吉⁵、関田節子¹(¹徳島文理大学香川薬、²徳島大院薬、³基

盤研薬植セ・筑波、⁴ 慶應義塾大・医、⁵
お茶女大), 日本生薬学会 第54回年会
(名古屋)2007.10.

2. 「抗リーシュマニア活性を有する有用植物の探索(その 17)ーミャンマー産植物 *Diospyros burmanica* の成分について 2ー」
安元(森)加奈未¹、渕野裕之²、我妻 豊³、

佐竹元吉³、関田節子¹(¹徳島文理大学
香川薬、² 基盤研薬植セ・筑波、³ お茶女
大、⁴ 富山大), 日本生薬学会 第 56 回
年会 (京都)2009.9.

E. 論文発表 なし

II-4. 分担研究報告書

大麻の DNA 鑑定を目的としたゲノム多様性に関する研究

研究分担者 高上馬 希重 北海道医療大学薬学部 准教授

研究要旨 大麻成分である THC(tetrahydrocannabinol、カンナビノイド化合物)を含有する「ドラッグタイプ大麻」、THC を含有しない「ファイバータイプ大麻」の二種を植物材料として、「新鮮葉」と「乾燥葉」からの DNA 抽出を試みた。そして①*rbcL* 遺伝子、②*trnL-trnF* 遺伝子 IGS、③ドラッグタイプ型 THCA 生合成酵素遺伝子の3領域の検出実験を行った。その結果ドラッグタイプおよびファイバータイプの両タイプにおいて「乾燥葉」試料でも「新鮮葉」と同様に *rbcL* 遺伝子、*trnL-trnF* 遺伝子 IGS の2領域の検出が可能であった。さらにドラッグタイプ型 THCA 生合成酵素遺伝子の検出においてはドラッグタイプの「新鮮葉」、「乾燥葉」にのみバンドが検出され、ファイバータイプでは検出されず、「乾燥葉」試料においてもドラッグタイプとファイバータイプを見分けることが可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、我が国における違法大麻事犯が急増し、特に種子からの栽培事犯の増加が問題となっている。この場合に、個人で栽培したものであるか、或いは他者から譲り受けたものであるか等を調べる必要が生じている。本研究では大麻のゲノム多様性を様々な観点から解析し、特に大麻の「乾燥試料」や「種子」を試料とし、DNAによる系統間差、個体間差などの識別技術の開発をおこない、大麻事犯解決に役立つ容易なDNA鑑定技術を確立することを目指す。本年度は大麻主成分であるTHC (カンナビノイド化合物、tetrahydrocannabinol)を含有する「ドラッグタイプ大麻」、THCが含まれない「ファイバータイプ大麻」の二種を植物材料として、「新鮮葉」と「乾燥葉」からのDNA抽出を試みた。そして①*rbcL*遺伝子、②

*trnL-trnF*遺伝子IGS、③ドラッグタイプ型THCA生合成酵素遺伝子、の3領域の検出実験を行った。

B. 研究方法

【植物材料】

大麻主成分である THC を含有する「ドラッグタイプ」1系統、THC を含有しない「ファイバータイプ」1系統の *Cannabis sativa* L.)それぞれ1個体ずつを植物材料として用いた。種子の発芽後、人工気象条件下 (25 °C, 24 時間連続照明) で育成し、出芽後約 40 日の展開葉を以下の実験材料とした(図 1)。

【THC 分析】

THC の定量分析を行った。「ドラッグタイプ」および「ファイバータイプ」の植物体の展開葉を暗黒、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