

[M+H]⁺ 520.28)、FTFQDPVVEK が見つかった (Fig 3)。本システムでは Leu と Ile

の区別ができないため、今後ペプチドシーケンサによる解析が必要である。

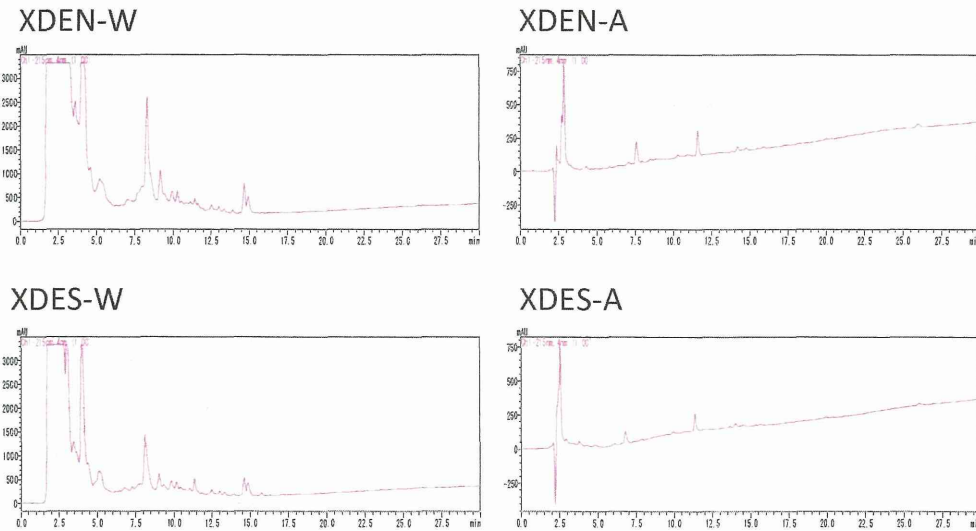


Fig1. タケバチ抽出物の HPLC 分析

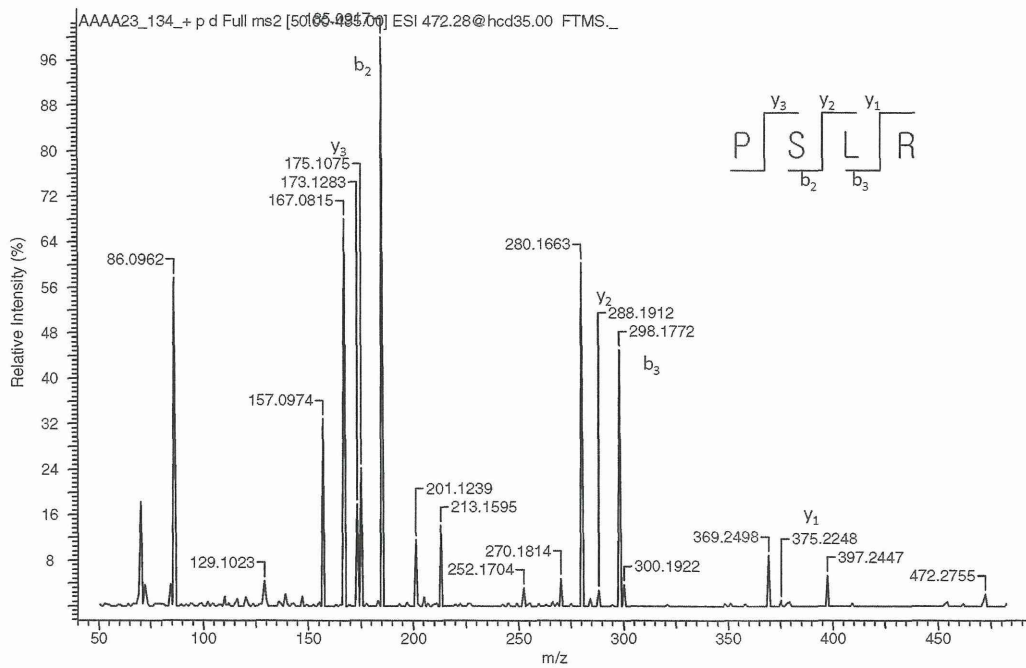


Fig.2 PSLR の MS/MS 解析

XDEN-H2	XDEN-A
LAYLEKANT	PSLR(transposase)
FTFQDPVVEK	FTFQDPVVEK
AGFAGDDARP(actin)	

Fig.3 竹蜂のペプチド成分、() 内はペプチドの由来となるたんぱく質

D. 結論

本研究によりタケバチのペプチド成分の構造決定を行った。通常のタケバチの服用方法は翅をとり粉碎後、塩を加えて少量のお湯に溶かして服用する。本研究の HPLC 分析の結果より、塩の有無によるペプチド性抽出物の差は少ないであろうと考えられる。しかし、水溶性の高い低分子などの成分については Capcell pak C₁₈ カラムには吸着しないため、今後、水溶性成分の探索が必要である。

MS/MS 解析により 4 つのペプチドの構造を決定した。MS/MS 解析により XDEN-H2 及び XDEN-A からはペプチド成分が検出されたが、XDES-W、XDES-A からは分析可能なペプチド成分が検出されなかった。HPLC 解析では塩の有無による成分の違いが分からなかったが、MS/MS 解析によりペプチド成分に違いがあることが分かる。しかし検出されたペプチド成分はどれも微量であり、薬効成分であるか疑問が残

る。キムネクマバチのペプチド成分である Xylocopin の構造に相関性のあるペプチド成分はなく、毒成分由来ではない可能性もある。また、本システムでは Leu と Ile が区別できないため、今後、

ペプチドシーケンサによる解析が必要である。

今後、ペプチドを分取し、ペプチドシーケンサによる解析、ペプチド成分の薬効解析、水溶性成分の解析を行う。

E. 参考文献

- [1] 中薬大辞典 3 巻, 1747. 小学館
- [2] Baek YH, Huh JE, Lee JD, Choi do Y, Park DS, Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (*Apipuncture*) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by alpha2-Adrenoceptors, *Brain Res.* 2006 Feb 16;1073-1074:305-10. Epub 2006 Feb 2.

研究協力報告書

ミャンマー薬局方の作成について

研究協力者 数馬 恒平 富山大学和漢医薬学総合研究所 助教

研究要旨 ミャンマー保健省は生薬局方を作り、流通する生薬の品質の確保を目指している。我々はミャンマー保健省から、生薬局方作成における技術援助を求められたことを受け、ミャンマー生薬局方作成に関する問題点の克服を支援している。これまでに、保健省の現地研究施設での技術指導及び富山大学和漢医薬学研究所における保健省技官の研修を行った。その結果、ミャンマー生薬局方初版が出版される運びとなったほか、生薬の化学的及び植物学的同定技術に関して保健省技官の力量を高めることが出来た。生薬局方の完成は、ミャンマー国民の医療におけるプライマリーヘルスケアの実践につながるものと期待される。

A. 研究目的

ミャンマーにおける医薬品の諸問題には、主として偽薬、起源切れ医薬品による薬の信頼性の深刻な低下が上げられる。したがって、ミャンマー薬局方を作成して、ミャンマー国内流通医薬品の品質を規格化し、薬としての信頼性を確保することは、最重要課題である。ミャンマーの医薬品は主に伝統薬（生薬等）で、西洋薬（化学薬品等）はまれであることから、ミャンマー保健省は、生薬局方の作成事業を進めており、これにより生薬の規格を作り、規制し、流通する生薬の品質を確保することを目指している。本研究では、ミャンマー保健省の生薬局方作成事業における種々の技術的問題点をミャンマー保健省生薬局方担当者とともに解決したので報告する。

B. 研究方法

保健省の要請に応じて現地で生薬の同

定に必須な薄層クロマトグラフィー (TLC)、検鏡図及びそれらの関連技術に関して指導を行った。また、ミャンマー人技術者の研修を富山大学和漢医薬学総合研究所で指導した。実験に必要な器具や試薬は日本で調達して現地に供給した。

C. 結果及び考察

ミャンマー保健省は2009年に、保健大臣を議長とした生薬局方作成委員会を設置した。実務段階として、生薬局方作成部会が薬局方の記載内容の検討のために設置された。2010年2月に初回会合が伝統医薬大学(マンダレー)にて開催され、富山大学和漢医薬学総合研究所から数馬と佐竹の二名が参加した。作業部会で、総合的まとめは伝統薬局長と副局長、生薬部長が担当し、化学グループと形態グループに分かれて生薬局方を作成することが決定された。局方記載事項と収載生薬が決定された。記載事項

項は、異名及び現地名、薬用部位、薬用部位の特徴、確認試験、純度（微生物・重金属等）、灰分等と決定された。収載されるモノグラフの 17 項目の詳細は下記に示す通りである。

- 1) Synonyms and local common names,
- 2) part used, 3) definition, 4) constituents,
- 5) description of the plant, 6) description of the part used (microscopic and macroscopic),
- 7) identification (color reaction and TLC),
- 8) moisture contents (loss on drying),
- 9) purity (foreign matter, chemical contamination, microbial contamination, and heavy metal), 10) total ash,
- 11) acid insoluble ash, 12) EtOH soluble extract, 13) water soluble extract,
- 14) volatile oil content, 15) important formulations, 16) traditional therapeutic uses, 17) dosage.

続いて初回収載生薬 20 品目が決定された。詳細は下記の通りである（ミャンマー語読み、学名、カッコ内は薬用部位）。

- 1) Kyaung-pan-lay, *Vitex trifolia* Linn. (Leaves); 2) Kun ywet, *Piper betle* Linn. (Leaves); 3) Kant gyoke ni, *Plumbago rosea* Linn. (Stems); 4) Kunzah gamon, *Kaempferia galanga* Linn. (Leaves); 5) Gyin, *Zingiber officinale* Rose. (Rhizome); 6) Ngayok Kaung, *Piper nigrum* Linn. (Fruits); 7) Hsin don ma new, *Tinospora cordifolia* Miers (Stem); 8) Zee phyu, *Embllica officinalis* Gaertn. (Fruits); 9) Hsay gah gyi, *Andrographidis paniculata* Nees (Whole plant); 10) Zar deik pho, *Myristica fragrans* Houtt. (Fruits); 11) Ta mar, *Azadirachta indica* A. Juss (Leaves);

- 12) Mayagyi, *Adhatoda vasica* Nees. (Leaves); 13) Sha zaung let pat, *Aloe vera* Linn. (Leaves); 14) Shan hsay gah, *Swertia purpurseince* (Whole plant); 15) Linlay, *Acorus calamus* Linn. (Rhizome); 16) Dant da luns ywet, *Moringa oleifera* Lamk. (Whole plant); 17) Hsan nwin, *Curcuma longa* Linn. (Rhizome); 18) Myin khwa, *Centella asiatica* Linn. (Whole plant); 19) Yeyo, *Morinda citrifolia* Linn. (Fruits); 20) Thet yin gynt, *Croton oblongifolis* Roxb. (Leaves).

これらの生薬は市場品ではなく、天然或いは栽培品を適切な季節に直接採集に行くことで入手した。

2010年6月中旬から7月上旬にかけて、ミャンマーの首都ネピドーにある保健省に数馬が2週間滞在し、TLCプロファイル及び鏡頭図の作成について技術指導した。この時点で、TLCプロファイルについては、7種類（*Vitex trifolia*, *Piper betle*, *Piper nigrum*, *Myristica fragrans*, *Adhatoda vasica*, *Moringa oleifera*, *Centella asiatica*）について完成し、検鏡図については2種類（*Adhatoda vasica*, *Piper nigrum*）について完成したが、残りは担当職員が自力でやることとなった。その後、2011年12月までに20種類すべてが完成し、2012年3月上旬に開かれた薬局方作成委員会で承認を得た。今後、出版されることになっている(図1)。

ミャンマー保健省は生薬局方の収載生薬数を段階的に増やすことにしている。改訂版(第2版)の作成に当たり、2011年の秋にはすでに追加収載予定生薬10品目を決定していたが、これらのモノグラ

Vasaka Folium

***Adhatoda vasica* Nees (Acanthaceae)**

1. **Synonym(s)** - *Adhatoda zeylanica* Medicus, *Justicia adhatoda* Linu; Local name(s) - Vasaka (English), Ma-ya-gyi (Myanmar)

2. **Part(s) used** - Leaves

3. **Constituents** - Alkaloid, Amino acid, Flavonoid, Phenolic compounds, Tannin, Saponin, Steroid, Reducing sugars and Anthraquinones

4. **Definition** - Vasaka folium consists of the mature leaves of *Adhatoda vasica* Nees. (Family Acanthaceae)

5. **Description of the plants**

6. **Description of the part used**

6.1. **Macroscopic** - Upper surface dull brown and paler beneath, lanceolate or ovate-lanceolate, apex acuminate, base tapering, margin entire. (9-15)cm long and (3-5)cm broad, 9-10 pairs of veins, pinnate venation, few hairs present on the midrib, petiole (0.7-1.5)cm long glabrous. Slightly characteristic odour and bitter taste.

6.2. **Microscopic** -

6.2.1. Transverse section of the leaf shows 1) large central midrib region and long wings of the lamina on both side. 2) In surface with two layers of palisade cells under the upper epidermis. 3) Epidermal cells sinusoid with anomocytic stomata on both surfaces, more numerous on lower surface. 4) Clothing trichomes and glandular trichomes are present on both surfaces. 5) Prismatic calcium oxalate crystals and elongated cystoliths are found in the mesophyll layer. 6) In the midrib region 4-6 layers of collenchyma cells occurring beneath the epidermis.

6.2.2. Characteristic particles of *Adhatoda vasica* leaves powder: the powdered drug is

greenish in colour, characteristic odour and bitter taste. The diagnostic characters of the powdered drug are 1) trichomes more or less with base, 2) Sinusoid epidermal cell with anomocytic stomata in surface view. 3) Elongated cystolith in mesophyll layer.

7. **Identification**

7.1. **Colour reaction** - a) Dissolve a few mg of alcoholic extract of *Adhatoda vasica* in 5 ml of distilled water, add 2 M HCl until an acid reaction occurs, then add 1ml of dragendorff's reagent, an orange precipitate is produced immediately. b) In a test tube containing 0.5 ml of alcoholic extract of the *Adhatoda vasica*, add 5 drops of dil. HCl followed by a small piece of magnesium. Boil the solution for few minits. Pink colour is produced.

7.2. **Thin layer chromatographic identification** - Powder of *A vasica* (1g) was mixed thoroughly with 10% ammonia solution and then extracted for 10 min with 5 ml MeOH under reflux. The filtrate was used for TLC analysis

8. **Moisture contents** (Loss on drying at 105 °C): 7.2 % (w/w)

9. **Purity**

9.1. **Foreign matter**: Not more than 3 %

10. **Total ash**: Not more than 19.9 % (w/w)

11. **Acid-insoluble ash**: Not more than 0.4 % (w/w)

12. **Ethanol soluble extract**: Not less than 6.3 % (w/w)

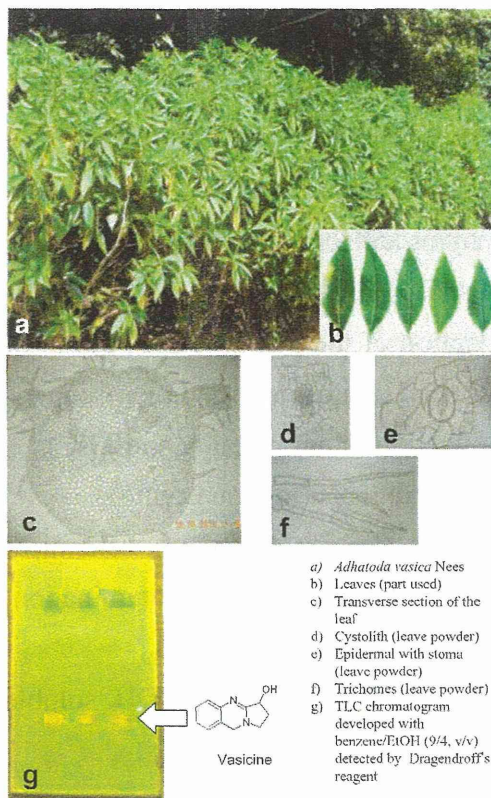
13. **Water soluble extract**: Not less than 16.7 % (w/w)

14. **Volatile oil content**

15. **Important Formulations**: TMF -20 and Some private traditional medicine formulation

16. **Traditional therapeutic uses**:

17. **Dosage**:



a) *Adhatoda vasica* Nees
b) Leaves (part used)
c) Transverse section of the leaf
d) Cystolith (leave powder)
e) Epidermal stoma (leave powder)
f) Trichomes (leave powder)
g) TLC chromatogram developed with benzene/EtOH (9/4, v/v) detected by Dragendorff's reagent

図1. ミャンマー生薬局方初版のモノグラフ(*Adhatoda vasica* Nees.)

図1. ミャンマー生薬局方初版のモノグラフ (*Adhatoda vasica* Nees.)

フの作成に合わせて、同定技術の更なる高度化を目指したいとの事で、日本で研修を行いながらモノグラフを完成させることになった。10品目の詳細を以下に示す(学名, 薬用部位)。

- 1) *Vitis repens*, rhizome; 2) *Soymida febrifuga*, wood; 3) *Capparis sepiaria*, bark; 4) *Alpinia galanga*, rhizome;
- 5) *Santalum album*, heartwood; 6) *Valeriana wallichii*, rhizome; 7) *Gentiana kurroo*, root; 8) *Scoparia dulcis*, whole plant;
- 9) *Cinnamomum zeylanicum* (*C. verum*), bark; 10) *Eclipta alba*, whole plant.

ミャンマーでは社会資本や流通網の整備が十分でないことから、頻繁な停電、品質管理が不十分な水道、顕微鏡の不足、化学実験用の薄層板、溶媒や発色試薬が

入手困難である。これらの点からも、日本での研修は、円滑な技術研修のために必要なことであった。

研修者の選考は、保健省の技官の中から中堅で実質的な技術指導の出来る立場の人を選び、(1) 植物と薬用部位の同定(特に検鏡図)とそれらの条文作成及び(2) 確認試験の実際とモノグラフの作成を行うことであった。このような観点から、検鏡と化学分野から1名ずつ、中堅でやる気のある研究官(それぞれ、キンサンリンおよびヌヌウィン)が選ばれた。2011年12月から2月にかけて、2名の研修を富山大学和漢医薬学総合研究所和漢薬製剤開発研究部門において行った。

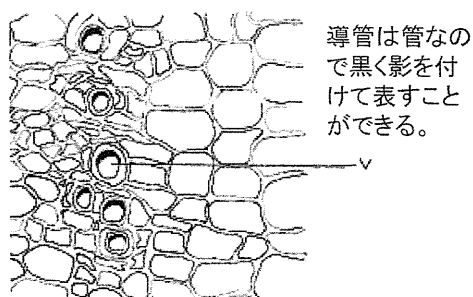
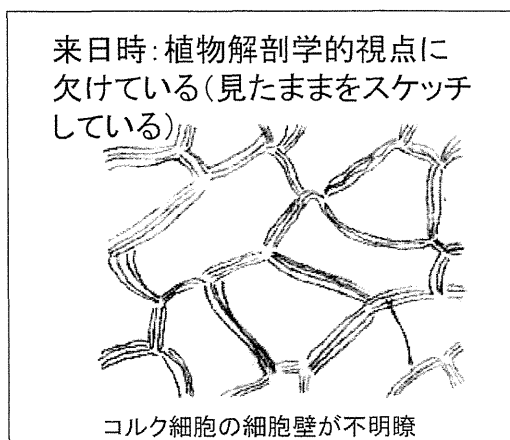
キンサンリンの研修予定内容としては、検鏡による生薬の規格の作成に関して、

具体的には、顕微鏡観察法と検鏡図作成法、検鏡図作成による薬用植物の規格、植物解剖学的所見による根拠を示すことが出来ること。ヌヌウインの研修予定内容としては、化学分析による生薬の規格の作成に関して、具体的には、薄層クロマトグラフィーによる薬用植物の規格、成分組成の分析化学的所見による根拠を示すことが出来ることを目指した。

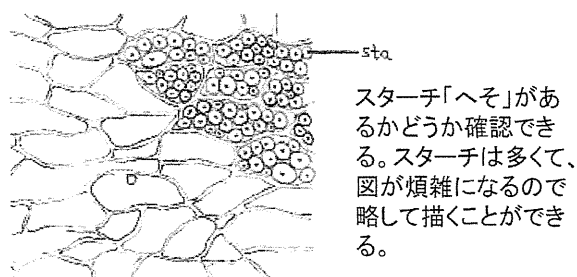
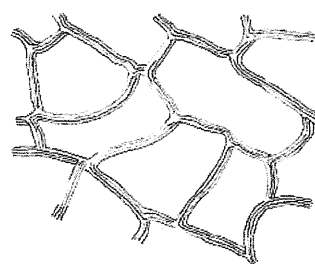
しかし、来日時早々に明らかになった技術的問題点は、キンサンリンに関しては、検鏡図が植物解剖学的視点に欠けており図になっていない事(見たままをスケッチしている)であった。ヌヌウインに関しては、薄層クロマトグラフィーの条件検討はできるが、硫酸やアニスアルデヒドなど限られた発色試薬しか知らない

こと及び機器分析の経験が無いことであった。これらのことを改善する方向で研修を進めることとした。

キンサンリンの検鏡図作成については、特にハンドミクロトームや凍結ミクロトームによる切片の作成、切片の染色、顕微鏡写真の撮影、写真のトレースから模式図へ落とし込んでいくときの描画法に関して技術習得を行った。これにより、例えば、1) 植物解剖学テキスト、スタンIII染色によるコルク層の可視化、メチレンブルーによる厚角細胞の可視化などによる植物解剖学的な視点の導入、2) 生薬学関連文献を手本にしつつ、経験のある研究者との対面指導による検鏡図描画法の習得が図られた。その結果、来日時の問題点は大いに改善した(図2)。



現在: いくつかの特徴的な組織構造の描画法について改善が見られる



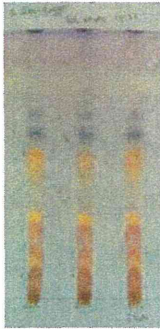
同定に必須の組織的特長の会得して、検鏡図に反映できることが長期的課題

図2.キンサンリンの検鏡図とそれらの主な改善点

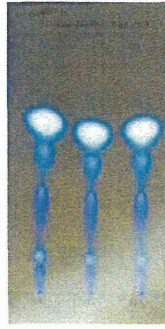
来日時:薄層クロマトグラフィーの条件検討ができるが、硫酸やアニスアルデヒドなど限られた発色試薬しか知らない。

来日後

1. 薄層クロマトグラフィー発色試薬を約10数種類試し、持参した生薬10種について、最適な条件を決定した。



Soymida febrifuga
Toruene/EtOAc
= 7/3
Anisaldehyde
sulphuric acid



Vitis repen
Hexane/EtOAc
= 7.5/2.5
UV 365 nm

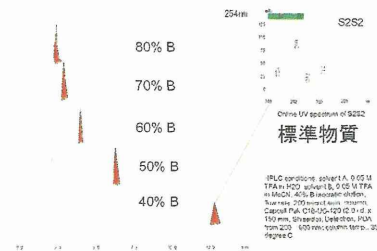
2. ミャンマーの生薬には標準化合物がほとんどない。そこで、自ら粗精製できるように、分離精製技術を教えた。(カラムクロマトグラフィーで標準物質を精製した)



標準物質となりえる化合物を、自ら精製できることが課題

3. HPLCの条件検討方法を学んだ

How you can find a right HPLC condition for S2S2



4. HPLCによる成分同定を学んだ 生薬成分中に標準物質を同定した

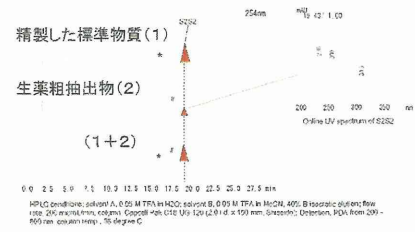


図3. ヌヌウインの研修内容及び技術的向上

ヌヌウインは化学分析に関して、まず約 20 種類 TLC 発色試薬をすべての生薬に対して体験した。この中で、次回収載予定生薬 10 種類の TLC 条件をすべて決定した。現段階での生薬局方の作成という視点からはこれで十分であった。しかし、対象生薬には標準化合物がないことが問題であり、将来解決すべき問題点である。そこで、標準物質調製技術習得の一環として、標準化合物を自ら粗精製できるように、カラムクロマトグラフィーで適当な物質を標準化合物として精製した。加えて、HPLC による確認試験法の条件検討方法を学んだ。また、最新の機器分析法として、核磁気共鳴や質量分析の実際を体験した。これにより、来日時の問題点は大きく改善したと考える(図 3)。

D. 結論

今回の日本における技術研修は 2 ヶ月間と必ずしも十分な時間ではなかったが、取得した技術は必ずや今後の生薬方作成に活かされるであろう。我々としても今後の支援のあり方を考えさせられた。例えば、生薬の検鏡図作成に関する種々の技法は、日本では分野が成熟して最先端ではなくなったことにより、研究者が忘れつつある。そういった技術も、途上国ではまだこれから必要としているという現状があり、古典的な基礎技術を継承し続けていく努力を忘れてはならない。

ミャンマーが政情不安定の中から新しく立ち上がろうとする中で、薬局方が完成したことは画期的なことである。この国では、感染症、結核、Malaria、AIDS

等の治療対策において、薬が高価で買えないため、偽薬、期限切れ薬の周辺国の流入で、薬の信頼性がなくなってきたり、病気に十分対処できない現状にある。このような状況の中で、生薬局方の完成は、国民の医療における適切なプライマリーヘルスケアの実践につながるものと期待される。

我々としては、今後もミャンマー生薬局方作成事業における技術支援を進める所存である。なお、この研修には多く専門家の支援を受けた。富山大学和漢医薬学総合研究所の小松かつ子先生、伏見裕利先生、金沢大学の御影雅幸先生、三宅克典先生、堂井美里博士、クラシエ製薬漢方研究所の大窪敏樹所長、達川早苗博士、ウチダ和漢薬の伏見直子博士、お茶の水女子大学の朝比奈はるか博士、昭和

薬科大学中根孝久先生の支援を得た。

E. 参考文献

なし

F. 発表等

1. 数馬恒平、紺野勝弘、佐竹元吉(2010) ミャンマー生薬局方作成支援の現状。日本生薬学会第 57 回年会。
2. 数馬恒平(2011) ミャンマー生薬局方作成の現状。お茶の水女子大学ミャンマーフォーラム。
3. 数馬恒平、紺野勝弘、佐竹元吉(2011) ミャンマー生薬局方作成支援の現状。第 28 回和漢医薬学会学術大会。
4. 数馬恒平 (2012) ミャンマー保健省技官の技術研修。お茶の水女子大学ミャンマーフォーラム

II-2. 分担研究報告書

覚せい剤等 ATS の原料物質に関する研究

キー不純物の LC/MS による検出

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、グローバルな不正流通が問題となっている覚せい剤原料の化学的情報を、国際的な密造原料規制対策に役立てることを目的としている。昨年度は、汎用型 HPLC による簡便で高感度なエフェドリン類の分析法を確立し、AFSN のシンポジウムで関係国の担当者に技術提供を行った。本年度は、Emde 法で密造された覚せい剤中に存在する原料エフェドリン類のクロル中間体の LC/MS による検出を試みた。覚せい剤のプロファイリングにおいては、GC/MS による不純物分析が中心であり、GC/MS では、微量のエフェドリンのクロル中間体は *cis/trans*-1,2-dimethyl-3-phenylaziridine に環化するので、検出がむずかしい。本年度は、押収品メタンフェタミン塩酸塩が Emde 法で密造された場合に、微量含まれると想定されるエフェドリン類のクロル中間体の LC/MS による検出法について検討した。カラムは ODS 系の Poroshell EC-C18 (2.1 I.D. x 150 mm, 2.7 μ m) を使い、20 mM HCOONH₄ aq./CH₃CN (80/20) の溶液にイオンペア剤として TFA (trifluoroacetic acid) を 5mmol/L 加えた移動相を用いた。これまで報告してきた GC/MS 及び HPLC による密造法由来のキー不純物情報に、LC/MS によるクロルプソイドエフェドリンを加え、考察した。更に、麻黄由来のエフェドリン類を覚せい剤原料とした場合の覚せい剤の詳細なプロファイリングを進めるために、異なる 3 地域で生育していた麻黄そのものについて炭素、窒素及び水素の安定同位体比を測定し比較検討した。国際的な技術支援としては、昨年度の分析法の技術指導に引き続き、インドネシアから 3 名の法化学者の研修を依頼され、11 月末に 2 週間、安定同位体分析を主とした覚せい剤のプロファイリングについて多面的な検討をおこなった。

研究協力者

牧野 由紀子 東京大学薬学部
薬品代謝化学教室 研究員

A. 研究目的

英国では、急速な国家財政悪化と不況の影響で、うつ病に苦しむ人が急増し、抗うつ剤の処方件数が急激に増加していると、BBC ニュースが伝えている。この

ニュースは、わが国の状況と重なり、経済減速の社会不安や震災後の苦境に直面している被災地の方々の放射性物質への不安等を背景に様々な薬物乱用につながるような、日本でもメンタル・ヘルス問題への対処を正しくおこなっていくことが、一つの課題になりつつある。また、薬物依存者対策としては、啓発活動による予防と同時に、治療が懲罰より効果的

であるとのコンセンサスが得られつつあり、効果的な治療の大切さが認識されている。「ダメゼッタイ」的な気合のみで、再犯率の高い薬物乱用は無くならない。しかし、啓発活動や乱用者の治療により薬物の需要を絶つと同時に、薬物そのものの供給を阻止することが重要である。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、アンフェタミン型覚せい剤 (ATS) とその原料物質の化学情報による取締行政への支援に関する様々なプロジェクトが関係国で積極的に繰り広げられてきた。本研究は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、覚せい剤の原料規制に役立つ化学情報交換に役立ってきた。覚せい剤等 ATS の密造所は世界の様々な国に拡散傾向にある。我が国への覚せい剤の主要な流通ルートとして、密造地アフリカ、経由地中近東諸国、集積地東南アジアと推測されるものが、日本に流入していると発表されている。東南アジアの法化学研究所で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 Asian Forensic Sciences Network (AFSN) にて、情報交換をすすめている。本年度は、インドネシアの法化学研究所 (BNN) から覚せい剤のプロファイリング特に安定同位体比分析について学びたいという希望があり、3名の化学者を2011年11月に2週間受け入れた。彼らは、日本が招聘するのではなく、国費で来日し、自国でのプロファイリングに生かすべく積極的に研究を行って帰国した。近日中

にインドネシアで押収された覚せい剤のプロファイリング結果をまとめ、報告するとの連絡を受けている。このような背景を踏まえ、本年度は、これまで行ってきた GC/MS 及び HPLC による密造法由来のキー不純物情報に、LC/MS によるエフェドリン類のクロル中間体を加え、考察した。更に、麻黄由来のエフェドリン類を覚せい剤原料とした場合の詳細なプロファイリング法確立のため、麻黄そのものと麻黄から抽出したエフェドリンの安定同位体比の相関について検討することが必要である。基礎実験として、異なる3地域で生育していた麻黄そのものについて炭素、窒素及び水素の安定同位体比を測定し予備的な検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料

l-Ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine の両塩酸塩は富士薬品製を使用した。エフェドリン類のクロル中間体は当研究室所有の研究者用覚せい剤原料を使用した。メタンフェタミン塩酸塩試料は、研究者用覚せい剤として当研究室で収集保管してあるものを用いた。麻黄は本研究班の関田節子研究分担者から提供を受けた。水は MILLI-Q ADVANTAGE A10 (日本ミリポア社製)により製造した精製水を用いた。その他の試薬は HPLC 分析用を購入し使用した。

2. 装置と分析条件

装置及び分析条件は下記の通りである。

LC/MS システム :

Agilent Technologies 1200 Series Quar Pump、1260 Infinity Autosampler (ニード

ル洗浄付き注入方式、フラッシュポートモード)、1200 Series Degasser、G1316A カラムオーブン、APESI 方式 6130 Quadrupole MS、AIR-TECH 10NP-CS N₂ Generator (0.7 M Pa). UV: 210 nm.

クロマトグラムと MS スペクトル:

分離用カラム Poroshell EC-C18 (2.1 I.D. x 150 mm, 2.7 μ m)、カラム温度 25°C、移動相 6 %又は 20 % acetonitrile 含有 20 mM HCOONH₄ 溶液 (5mmol/L TFA 含有) を目的に応じ適宜使用、流速 0.10 mL/min 又は 0.20 mL/min、MS 検出 (positive mode) m/z 40~500 Scan、SIM m/z 166.1 (*l*-ephedrine & *d*-pseudoephedrine)、m/z 184.1 185.1 186.1 (chloropseudoephedrine)、フラグメンタ 70、ドライガス 流量 12.0 L/min 温度 350°C、ネブライザ圧力 35 psig、キャピラリー電圧 (Positive) 3000 V、Cham Cur 0.83 μ A.

3. 試料調製及び LC/MS 分析

標準品添加実験用試料は、昨年度報告したと同様に、押収品の中から純度の高い *d*-methamphetamine/HCl 結晶を選び、再結晶を 5 回繰り返す、本分析系でエフェドリン類及びエフェドリン類のクロル化体が検出されないことを確認後使用した。添加実験用試料としては、*l*-ephedrine のクロル化体を 30、20 & 10 ppm 相当含有となるよう添加し、測定をおこなった。押収品試料溶液は、結晶 50 mg を直接ガラス製容器に量り、ミリ Q 水 2.5 mL を加えた溶液を用事調製し、各試料の測定をおこなった。

4. 麻黄の安定同位体比

測定は、SI サイエンスの協力を得て行った。使用装置及び測定条件の概略は下記の通りである。

$\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ の Natural Abundance

装置: Thermo Fisher Scientific

Flash EA1112-DELTA V ADVANTAGE
ConFlo IV System (EA-IRMS)

$\delta^2\text{H}$ の Natural Abundance

装置: Thermo Fisher Scientific

TC/EA-DELTA V PLUS ConFlo III
System

C. 研究結果及び考察

1. HPLC 条件の検討

エフェドリン類の SOCl₂ を用いたクロル化反応では、出発原料が *l*-ephedrine (1R,2S) 又は *d*-pseudoephedrine (1S,2S) のいずれでも、chloropseudoephedrine (1S,2S) が主に生成することは平成 16 年度の NMR による検討で、報告済みである¹⁾。*d*-Pseudoephedrine 又は *l*-ephedrine を原料とし、クロル化した試料の UV 210 nm でのクロマトグラムを Fig.1-1 に示す。*l*-Ephedrine が原料のときは下段に示すようにほぼ単一の主生成物が得られた。*l*-ephedrine (1R,2S) は SOCl₂ との反応によって SN2 反応が起こり、C-1 位の反転が生じたためと考える。*d*-Pseudoephedrine (1S,2S) の場合は中間体の立体障害のため SN2 反応が完全には起こらず上段に示すように混合物を与えたものとする²⁾。本結果は Noggle らの報告³⁾やマレーシアの KIMIA グループの検討結果と一致している⁴⁾。

l-Ephedrine と *d*-pseudoephedrine の両ピーク (Fig.1-1 の矢印) は、20% アセトニトリル含有の条件では、保持時間は同じ 6.5 分である。本年度はエフェドリン類のクロル中間体の検出を主目的としたので、両ピークの分離は目的とせず、20 mM

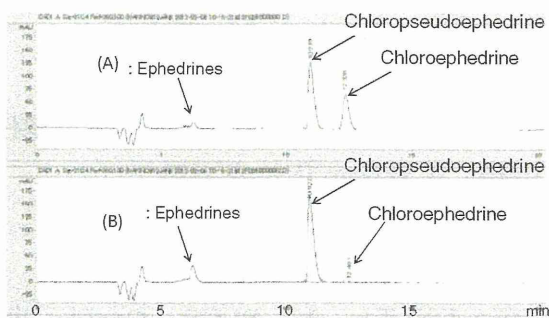


Fig. 1-1 (A) Chromatogram of the chlorinated product of *d*-pseudoephedrine
 (B) Chromatogram of the chlorinated product of *l*-ephedrine
 高圧カラムEC-C18 (2.1 x 150), UV 210nm
 Flow 0.1ml/min, 20%CH₃CN/20mM HCOONH₄ (5mmol/L TFA含有)

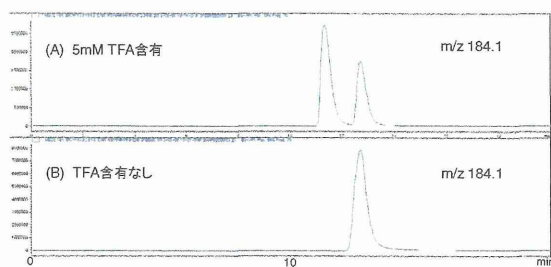


Fig. 1-2 SIM chromatogram of the chlorinated product of *d*-pseudoephedrine
 高圧カラムEC-C18 (2.1 x 150), UV 210nm
 Flow 0.1ml/min, 20%CH₃CN/20mM HCOONH₄

HCOONH₄ 水溶液 / CH₃CN (80 / 20) の溶液にイオンペアー剤として TFA(trifluoroacetic acid)を 5mmol/L 加えた移動相で、分析を行った。Table 1 に結果をまとめた。カラムは ODS 系高圧分析用を用いた。参考までに、Fig.1-2 には、移動相にイオンペアー剤のクロル中間体の分離への影響を示した。

昨年度の HPLC 条件を参考にし、6%アセトニトリル含有の初期移動相 (5 mmol/L TFA 含有) を 30 分間流し、30.01 分から 20%含有する移動相に切り替えると Fig.2 に示すように *l*-ephedrine (#1 のピーク) と *d*-pseudoephedrine (#2 のピーク) の同時検出は可能である⁵⁾。Fig. 3 には、Fig.2 での # 1~3 の各ピークのマススペクトルを示す。Fig. 4 に、*l*-Ephedrine と *d*-pseudoephedrine をクロル化した試料から検出された *l*-ephedrine と *d*-pseudo-

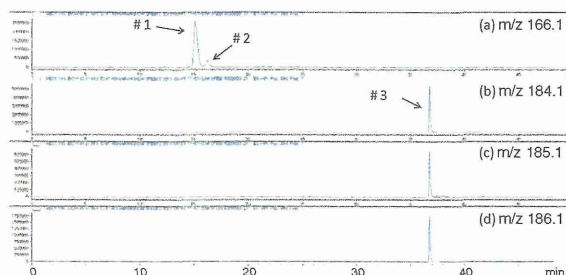


Fig. 2 SIM chromatogram of the chlorinated product of *d*-pseudoephedrine.
 # 1 : *l*-ephedrine, # 2 : *d*-pseudoephedrine, # 3 : Chloropseudoephedrine .
 高圧カラムEC-C18 (2.1 x 150 mm), Flow 0.2 ml/min,
 移動相: 6%CH₃CN/20mM HCOONH₄ (5mM TFA含有) 30分間、
 30.01分に20%CH₃CN/20mM HCOONH₄ (5mM TFA含有) に切り替え

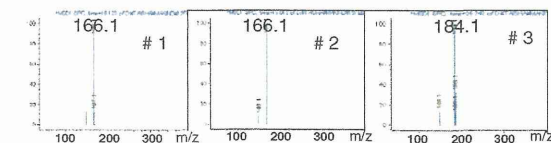


Fig. 3 Mass Spectra of #1, 2 & 3 in the chromatogram of figure 2.

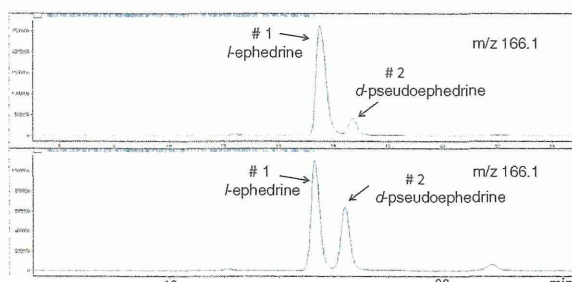


Fig. 4 (A) SIM chromatogram of ephedrine in the chlorinated product of *d*-pseudoephedrine
 (B) SIM chromatogram of the chlorinated product of *l*-ephedrine
 高圧カラムEC-C18 (2.1 x 150 mm), Flow 0.2 ml/min,
 移動相: 6%CH₃CN/20mM HCOONH₄ (5mM TFA含有)

ephedrine のピーク近辺を拡大したクロマトグラムを示す。検出された *l*-ephedrine と *d*-pseudoephedrine のピーク面積に差があるクロマトグラムが得られた。未反応のプレカーサー又はクロル化された後に一部加水分解されたエフェドリン類が検出されたかのいずれとも考えられるが、原料にいずれのエフェドリン類が使用されたかの判断は更なる検討が必要である。しかし、いずれの結果が得られても、原料が P-2-P でないことだけは明瞭にいえ。

本法での chloropseudoephedrine の添加試料では、20 ppm の濃度まで MS スペク

トルが得られ、定性可能であった。注入量は 1 又は 2 μ L が適切で、3 μ L 以上では主成分メタンフェタミンのオーバーロードで、良好なクロル中間体のピーク形状が得られなかった。エフェドリン類の添加試料での検出は 0.2ppm まで可能であった。

2. 押収品等からの chloropseudoephedrine の検出

各試料中のクロル中間体の確認は、*l*-ephedrine 及び *d*-pseudoephedrine を SOCl_2 でクロル化した chloropseudoephedrine を標準品とし、保持時間及びマススペクトルを比較しておこなった。保持時間は一致するが、夾雑物のフラグメントイオンが混じり明瞭なスペクトルがとれない場合には、標準品を添加した試料の測定をし、保持時間の一致を確認後、クロル化合物に特徴的な m/z 184、185、186 の SIM クロマトグラムでピーク面積を比較し定性確認をした。

分析例を Fig. 5~9 に示す。Fig. 5-1 及び 5-2 は医薬品として市販されていた「ヒロポン」注射液を、前処理せずに直接分析した例である。Fig.5-1 の SIM クロマトグラムで #2 と保持時間は異なるが、 m/z 184、185、186 のピーク面積比が類似しているピークが存在する。そこで、試料液に chloropseudoephedrine を添加し保持時間を比較したクロマトグラムが Fig. 6 である。

メーカーからの情報では、「ヒロポン」注射液中のメタンフェタミン塩酸塩の合成法は、Emde 法である。微量であるが chloropseudoephedrine が検出されたことは合成法情報と一致していた。Fig. 7 は

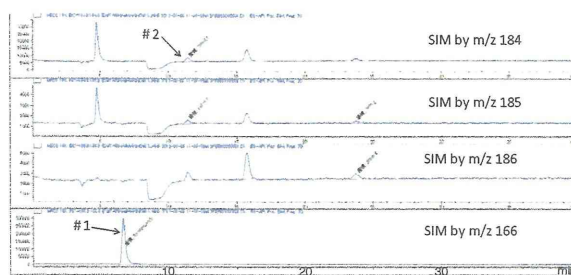


Fig. 5-1 SIM chromatogram of the injectable of sample (Philopon)
高圧カラムEC-C18 (2.1 x 150),
Flow 0.1ml/min, 20%CH₃CN/20mM HCOONH₄ (5mM TFA含有)

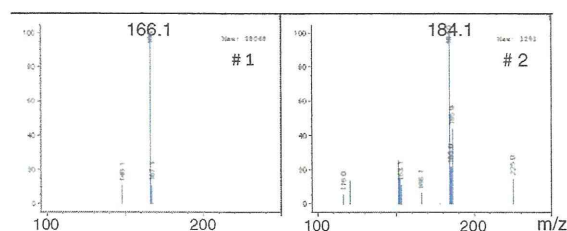


Fig. 5-2 Mass Spectra of #1 & 2 in the chromatogram of Fig. 5-1.

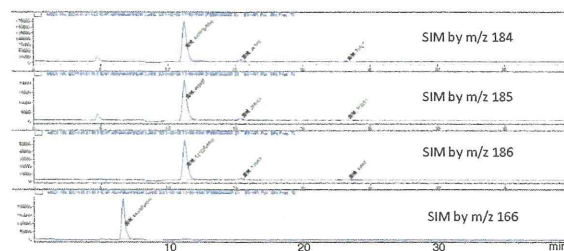


Fig. 6 SIM chromatogram of the injectable of sample (Philopon)
with Cl-pseudoephedrine
高圧カラムEC-C18 (2.1 x 150),
Flow 0.1ml/min, 20%CH₃CN/20mM HCOONH₄ (5mM TFA含有)

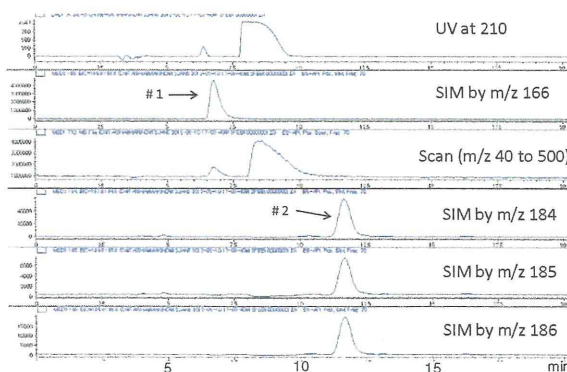


Fig.7 SIM chromatogram of seized sample # 17
高圧カラムEC-C18 (2.1 x 150), Flow 0.1ml/min,
20%CH₃CN/20mM HCOONH₄ (5mM TFA含有)

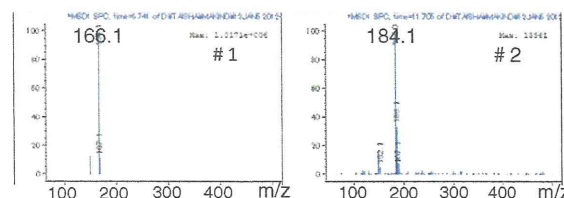


Fig. 8 Mass Spectra of #1 & 2 in the chromatogram of Fig. 7.

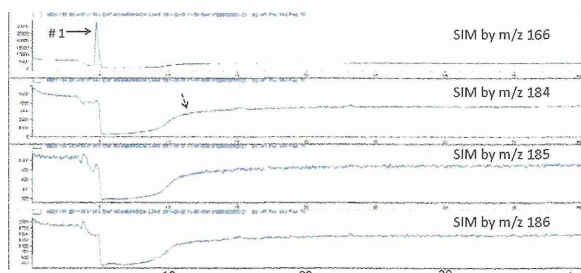


Fig.9 SIM chromatogram of seized sample # 22
 高圧カラムEC-C18 (2.1 x 150), SIM m/z 184.1
 Flow 0.1ml/min, 20%CH₂CN/20mM HCOONH₄ (5mM TFA含有)

chloropseudoephedrine が不純物としては比較的多く含まれていた押収品の分析例である。濃度 20 mg/mL の試料を 1 μ L 注入したクロマトグラムである。ピーク#1と#2の保持時間及びマススペクトル(Fig. 8)は、標準品と一致していた。Fig. 9には Nagai 法で密造されたと推定される押収品の分析例である。濃度 20 mg/mL の試料を 2 μ L 注入したが、この試料からは chloropseudoephedrine は検出されなかった。

これまでのプロファイリング結果に本年度検討した chloropseudoephedrine の有無を追加したデータの集計結果は Table 1-1~1-3 に示すとおりである。詳細は省くが、Table 1 に記載した不純物分析結果は、平成 11 と 12 年度報告の HPLC によるメタンフェタミンの光学異性体分析^{6 & 7)}、昨年度報告の HPLC によるエフェドリン類の分析⁸⁾、平成 15 年度報告の GC/MS による分析⁹⁾及び平成 16 と 21 年度報告の安定同位体比分析^{1 & 10)}によるものである。Table 1-1 には、キー不純物である Naphthalenes (1,2-dimethyl-2-phenyl-naphthalene and/or 1-benzyl-3-methyl-naphthalene) が検出されなかった覚せい剤についての結果を、Table 1-2 には Naphthalenes が検出された覚せい剤に

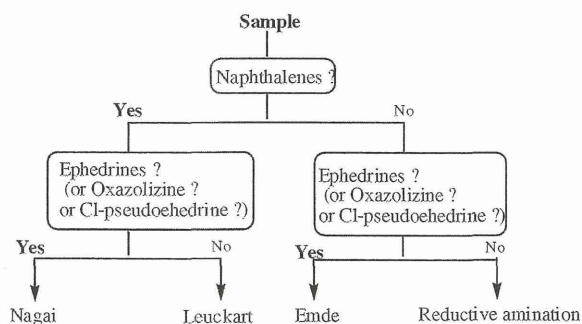


Fig. 10 合成ルート識別フローチャート

ついでの結果を、Table 1-3 には光学異性体の混合していた覚せい剤についての結果を収載した。Table 1-1 にまとめた覚せい剤は、平成 12 年度の分担研究で提案した覚せい剤密造ルート識別フローチャート (Fig. 10)を用い密造法を推定すると Emde 法又は Emde 法に類似の方法で合成されたと考えられる覚せい剤である。27 試料すべてから chloropseudoephedrine が検出され、キー不純物として、密造法がより確実に推定できることになった。No. 34 と 38 は *l*-form の覚せい剤であるが、それぞれからエフェドリン類及び chloropseudoephedrine が検出され、更にキラルカラムを用いての詳細な分析で、*d*-ephedrine が検出された。両押収品は、*d*-ephedrine (1S,2R)を原料とし Emde 法で密造した可能性も考えられる。Table 1-2 に記載した覚せい剤は、Nagai 法又は Nagai 法類似の方法で密造されたと推定されるものである。しかし、Table 1-2 の試料番号 7 からは Naphthalenes 及び Chloropseudoephedrine の両不純物が検出されている。No.7 については、上記フローチャートから密造法の推定ができない。No. 7 は Nagai 及び Emde 法で密造されたものが混合されていることが推定される。

Table 1-1 Profiling of methamphetamine crystals which did not contained Naphthalens.

試料番号	光学異性	I (p-2-p)	II (Aziri)	III(Naphth)	IV(Oxa)	V (Eph)	VI (CL)	安定同位体比
1	<i>d</i> -form	+	+	-	-	+	+	C -29, N 4
6	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	D -107, C-30, N 1
10の1	<i>d</i> -form	+	-	-	-	+	+	C -33, N 5
12	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	C -29, N 7
16	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	C -32, N 3
17	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	-----
18	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	-----
20	<i>d</i> -form	+	-	-	+	+	+	-----
21	<i>d</i> -form	+	-	-	-	+	+	D -122, C -32, N 0
25	<i>d</i> -form	+	+	-	-	+	+	D -18, C -33, N 3
26	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	C -32, N 3
34	<i>l</i> -form	+	-	-	-	+	+	C -32, N 3
35	<i>d</i> -form	+	+	-	-	+	+	C -32, N 1
36	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	D -111, C -29, N 8
37	<i>d</i> -form	+	-	-	-	+	+	C -28, N 5
38	<i>l</i> -form	+	-	-	-	+	+	D -124, C -32, N 1
39	<i>d</i> -form	+	-	-	-	+	+	C -32, N 1
77	<i>d</i> -form	+	+	-	-	+	+	-----
80	<i>d</i> -form	+	+	-	-	+	+	-----
82	<i>d</i> -form	+	-	-	+	+	+	-----
92	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	-----
93	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	-----
122	<i>d</i> -form	-	-	-	+	+	+	-----
127	<i>d</i> -form	+	-	-	+	+	+	-----
146	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	-----
150	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	-----
ヒロポン	<i>d</i> -form	+	+	-	+	+	+	D -198, C -26, N 3

+ : detected , - : not detected

I (P-2-P) : 1-phenyl-2-propanone,

II (Aziridine) : cis/trans-1,2-dimethyl-3-phenylaziridine、

III (Naphthalenes) : 1,2-dimethyl-2-phenylnaphthalene and/or 1-benzyl-3-methylnaphthalene

IV (Oxazolidine) : erythro-3,4-dimethyl-5-phenyloxazolidine

V (Eph) : ephedrine and/or pseudoephedrine

VI (CL) : chloropseudoephedrine

Table 1-2 Profiling of methamphetamine crystals which contained Naphthalens.

試料番号	光学異性	I (p-2-p)	II(Aziri)	III(Naphth)	IV(Oxa)	V (Eph)	VI (CL)	安定同位体比
15	<i>d</i> -form	+	-	+	-	+	-	D -202, C-27, N 3
22	<i>d</i> -form	+	-	+	-	+	-	D -1, C-23, N 5
23	<i>d</i> -form	+	-	+	-	+	-	D -206, C-27, N 5
24	<i>d</i> -form	+	-	+	-	+	-	-----
32	<i>d</i> -form	+	-	+	+	+	-	C -30, N 6
64	<i>d</i> -form	+	+	+	+	+	-	-----
73	<i>d</i> -form	-	-	+	+	+	-	-----
85	<i>d</i> -form	+	-	+	-	+	-	-----
87	<i>d</i> -form	+	-	+	-	+	-	-----
137	<i>d</i> -form	+	+	+	-	+	-	-----
138	<i>d</i> -form	+	+	+	-	+	-	-----
155	<i>d</i> -form	+	+	+	+	+	-	-----
157	<i>d</i> -form	+	-	+	-	+	-	-----
7	<i>d</i> -form	+	+	+	-	+	+	-----

Table 1-3 Profiling of crystals which consisted of *l*- and *d*-methamphetamine.

試料番号	光学異性	I (p-2-p)	II (Aziri)	III(Naphth)	IV(Oxa)	V (Eph)	VI (CL)	安定同位体比
29	<i>d</i> :- <i>l</i> -(3: 97)	+	+	-	-	+	+	D -202, C-32, N 1
31	<i>d</i> :- <i>l</i> -(1 : 1)	+	+	-	+	+	+	D -139, C-28, N-1
133	<i>d</i> :- <i>l</i> -(9:1)	+	-	-	+	+	+	-----
134	<i>d</i> :- <i>l</i> -(9:1)	+	-	-	+	+	+	-----

参考までに、No.7からはカフェインが検出されている。現時点でのドラッグプロファイリングでは、密造法の異なるものが混合された試料では、合成法の推定はできない。Table 1-3の光学異性体の混合されている覚せい剤4試料からは、エフェドリン類及びクロル中間体のいずれも検出されていることから、エフェドリンのラセミ体を原料とし Emde 法で密造後、ラセミのメタンフェタミンを、光学分割処理していった可能性が高い。Table 1-1～1-3に記載したすべての試料から p-2-p

が検出されている。p-2-p はキー不純物ではないことを再確認するため表にいった。本報告での覚せい剤のプロファイリングは、我が国で押収された限られた試料についての検討であるが、今後新たに押収される覚せい剤の不純物によるプロファイリングを行い、密造法や原料物質の情報を得る際の参考になる結果であるといえる。安定同位体比は、測定値のある試料についてのみ参考までに併記した。

3. 麻黄の炭素、窒素及び水素の安定同位体比測定

本年度は、生育地の異なる麻黄 3 種類について、予備実験として、微粉末にし、炭素、窒素及び水素の安定同位体比を測定した。測定結果は Table 2 に示すとおりである。異なる 3 地域で生育した麻黄の結果はそれぞれ特徴的な値であった。より詳しい覚せい剤原料のプロファイリングを行うため、今後エフェドリンを各麻黄から抽出し、Table 2 の値と比較し検討する予定である。

D. 結論

近年、覚せい剤の密造地がアフリカ、メキシコ、中近東とグローバルに拡散している。関係国の覚せい剤原料規制担当者による、覚せい剤原料の横流し規制対策に役立つ化学情報の重要性が徐々に認識されつつあり、国連の担当部局が日本の覚せい剤プロファイリングの化学情報について情報を求めてきている。本年度は、LC/MS によるエフェドリンのクロル中間体及びエフェドリン類の検出を試みた。Emde 法で覚せい剤密造がおこなわれた場合には、合成ルート由来のクロル中間体はキー不純物であり、プロファイリングにおいては対象とすべき不純物であった。しかし、これまでの GC/MS による不純物分析では、微量のクロルエフェドリン類は高温の注入口で、環化し cis/trans-1,2-dimethyl-3-phenyl-aziridine に変化するので、クロル中間体そのものの検出がむずかしく対象とされていなかった。本年度は、近年普及が急速に進んでいる汎用型の LC/MS でクロル中間体及びエフェドリン類の検出法を確立した。密造される覚せい剤に含まれる多数の微

Table 2 麻黄の炭素・窒素・水素安定同位体比

Sample	$\delta^{13}\text{CvsVPDB}$	$\delta^{15}\text{NvsAir}$	δ^{DvsVSMOW}
Nepal	-25.6	5.77	-80.2
Uzbekiztan	-12.9	1.65	-39.1
Mongolia	-30.4	2.62	-124.7

単位：(‰)

量不純物から、プロファイリング目的にそったキーとなる不純物情報が確実に得られることで、より正確な密造法推定が可能となる。医薬品として市販されていた「ヒロポン」注射液からクロル中間体得られたことは、メーカーからの情報と一致する結果であった。今回使用した「ヒロポン」注射液は、長期間アンプル中に封入されていた覚せい剤水溶液であり、覚せい剤そのものも分解が進んでいるのではないかと想定したが、記載どおりの濃度で存在し、原料エフェドリン及びクロル中間体も検出できた。更に、麻黄由来のエフェドリン類を覚せい剤原料とした場合の覚せい剤の詳細なプロファイリングを進めるために、予備実験ではあるが、異なる 3 地域で生育していた麻黄について特徴的な炭素、窒素及び水素の安定同位体比の値を得ることができた。今後各試料からエフェドリンを抽出し、植物で得られた値がどの程度覚せい剤原料エフェドリンに反映されるか検討し、麻黄由来の原料のより詳細なプロファイリングに生かしていく予定である。1998 年から継続して検討してきた本研究班での多面的な覚せい剤の安定同位体分析や有機不純物分析によるプロファイリング手法は、国内の関係機関の実務をリードし、国際空港等の水際で押収される覚せい

い剤についての役立つデータが蓄積されつつある。適切にこの化学情報がオープンされれば、今後の国際的な原料規制に役立つものと確信する。また、2011年5月の韓国でのAFSNで米国の覚せい剤プロファイリング研究の実際についてGeorgia州のCrime LABの担当者から本研究とほぼ同程度のことが行われているとの報告があった。韓国、オーストラリアの関係機関でもほぼ同レベルの手法でデータ蓄積を行っている。本報告は、交付を受けた覚せい剤について、これまで長期間にわたり検討してきたプロファイリングの基礎的な検討結果である。各国の法化学分析機関が可能なデータを取り、事件名等公表できないものは伏せ、世界各国で流通している覚せい剤が、どのような化学情報をもっているか明らかにしていくことが必要である。同時に、関係各国の行政担当者に、覚せい剤の化学情報を収集し、有効に原料物質規制対策に役立てていく努力を期待し、最終報告とする。

F. 参考資料

1. 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業、薬物の分析鑑定法の開発に関する研究、2005.
2. Flores-Para, *et al*, "Chlorination Reactions of Ephedrine Revisited", *Tetrahedron: Asymmetry*, 9 (1998) 1661-1671.

3. Noggle, *et al*, "Liquid Chromatographic Determination of the Enantiomeric Composition of Methamphetamine Prepared from Ephedrine and Pseudoephedrine" *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1643-1648.

4. *DrugNetAsia* Issue 5 Year 2006 page 3.
5. Y.Makino, Simple HPLC method for detection of trace ephedrine and pseudoephedrine in highpurity methamphetamine, *Biomed. Chromatogr.*, 26 (2012) 327-330
6. 医薬安全総合事業、乱用薬物の検査に関する研究、2000.
7. 医薬安全総合事業、乱用薬物の検査に関する研究、2001.
8. 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業、麻薬・向精神・指定薬物等の乱用防止に関する研究、2011.
9. 医薬安全総合事業、不正流通薬物対策に関する研究、2004, page 32~34.
10. 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業、麻薬・向精神・指定薬物等の乱用防止に関する研究 2010.

G. 論文発表

1. Y.Makino, Simple HPLC method for detection of trace ephedrine and pseudoephedrine in highpurity methamphetamine, *Biomed. Chromatogr.*, 26 (2012) 327-330

II-3. 分担研究報告書

ミャンマー薬用植物の有用性に関する研究 —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 ミャンマーの重要な森林資源であるチークノキ *Tectona grandis* の葉に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。また、ミャンマーにて入手した3種の植物 (*Bistorta* sp., *Cephalandra indica*, *Acacia concinna*, *Tectona hamiltoniana*) についてエキス作成し抗リーシュマニア活性試験およびヒト骨肉腫オステオサルコーマMG63細胞(MG)に対する増殖抑制試験を行い、興味ある化合物を見出さした。

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

本研究は、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、現地の多様な植物から有用な植物を見出すことを目的としている。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前提となる。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、厳しい管理の下でしか適用できないため、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-3 β -yl-O- α -L-arabino-furanosyl-(1-4)-O- [α - L - rhamnopyranosyl - (1 \rightarrow 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、新規ハイドロキノン化合物 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・家具材や仏壇、野球のバットに使用されているカキノキ科の *Diospyros burmanica* Kurz. について検討し、活性試験と成分検査を行い、新規ビスナフトキノン 4 種ならびに新規ナフトキノン 2 種を含む 14 種の成分を単離同定した。

本年度は、昨年度に引き続きチークノキ *Tectona grandis* Linn. について、抗リーシュマニア活性を示した葉の成分研

究を進めた。 *T. grandis* はミャンマーの重要な森林資源の一つであり、主に高級家具材として使用されている。本研究では、通常、資源として利用されず、廃棄される葉の有効利用を検討するべく、葉のメタノールエキスについて活性成分の探索を行った。今回、あらたに3種の化合物を得て、構造を決定した。抗リーシュマニア活性およびマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に対する増殖抑制試験を XTT アッセイにより検討した(1)。また、23年度にミャンマーチン州ディーティン及びマンダレー管区ピンウーリンにおいて入手した4種の植物について抗リーシュマニア活性試験およびヒト骨肉腫オステオサルコーマ MG63 細胞に対する増殖抑制試験を行ったので併せて報告する(2)。

B. 研究方法

植物体に関して、入手は以下の通りであった。

- (1) 試料 *Tectona grandis* の葉は主任研究者より供与された。
- (2) イブキトラノオの仲間 *Bistorta* sp. の根および葉はチン州ディーティンにて (N: 23°18.317, E: 096°28.054, 標高 2381 m), *Cephalandra indica* の葉, *Acacia concinna* の地上部は伝統医薬大学にて, *Tectona hamiltoniana* の枝はマンダレー管区ピンウーリン国立ガンドー公園 (N: 22°01.091, E: 093°45.430, 標高 1074 m) にて研究協力者が平成 23 年度のミャンマー調査にて入手した。

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-700 並びに 400 を使用した。

Leishmania 原虫の培養: *Leishmania major*

の前鞭毛体 (promastigote) 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。

RAW264.7 細胞の培養: RAW264.7 細胞 (ATCC) は、100 mm セルカルチャーディッシュ中にて調整 DMEM 培地 (10% 非働化 FCS, 抗生物質混合) を用いて 37 °C 5% CO₂ に設定した CO₂ インキュベーター内で培養を行い、70%コンフルエント到達後 スクレイピングにより剥離し 1:3-1:6 に希釈し、継代とした。

MG63 オステオサルコーマ細胞の培養: ヒト骨肉腫 MG63 細胞 (HS 研究資源バンク, 徳島文理大学田元浩一教授より供与) は、100 mm セルカルチャーディッシュ中調整 DMEM 培地 (10% 非働化 FCS, 抗生物質混合) を用いて 37 °C 5% CO₂ に設定した CO₂ インキュベーター内で培養を行い、70%コンフルエント到達後 0.05%トリプシン-EDTA により剥離し 2 x 10⁵ cells/mL に調整し継代とした。

抗リーシュマニア活性評価 (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、1x10⁶ 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°C 5% CO₂ 下で 48 時間インキュベートを行っ