

201132021B

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)

麻薬・向精神・指定薬物等の乱用
防止に関する研究 国際的調和を
踏まえた麻薬代替としての
薬用植物等に関する研究

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 佐竹 元吉

平成 24 (2012)年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書	
「麻薬・向精神・指定薬物等の乱用防止に関する研究 国際的調和を踏まえた麻薬代替としての薬用植物等に関する研究」・・・	1
研究代表者 佐竹 元吉	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	8

研究成果の刊行物・別刷

I. 総合研究報告書

麻薬・向精神・指定薬物等の乱用防止に関する研究 国際的調和を踏まえた麻薬代替としての薬用植物等に関する研究

研究代表者 佐竹 元吉 お茶の水女子大学 客員教授

研究要旨 薬物乱用防止対策においては乱用者の摘発や薬物による病的症状の治療で需要を断つと同時に、密造原料規制や密輸・密売の取締まりにより供給遮断が重要である。本研究班は、供給遮断による薬物乱用防止対策の観点で重要な課題である、密造用原料植物の不正栽培や原料物質の不正流通防止に役立つ下記4テーマで、関係国との連携を強化しながら推進し、東南アジアを主な対象とした国際的な乱用薬物拡散防止の一翼を担う成果を得た。

1) けし代替植物の大量栽培指導と生産物の評価

国際的な代替植物栽培支援対策にもかかわらず、現在もケシ栽培とアヘン生産が継続されているインドシナ半島において、薬用植物栽培の推進による伝統医療振興による住民の正規の収入源確保により、不正麻薬原料植物生産防止を目指した。現地で、ソバ、紅花、ブドウ、モモ、チャノキの大量栽培の基盤を作った。更に、日本向け薬用植物の栽培を漢方薬企業と共同で行った。ミャンマーの伝統生薬の品質確保に必須の生薬局方の作成を支援し、生薬20種類の規格作成し、保健省から研修生を受け入れ、局方づくりに必要な技術指導を行った。ミャンマー・チン州で薬用ラン等の野生薬用植物の調査及び栽培指導を行った。

2) 覚せい剤等ATSの原料物質に関する研究

覚せい剤の供給遮断に役立つ化学情報の獲得用プロファイリング研究において、押収例が増えている高純度結晶に微量含まれると想定されるエフェドリンやプソイドエフェドリン及びクロール中間体のHPLC及びLC/MSによる検出法を確立した。覚せい剤押収品25試料についての炭素・窒素・水素の安定同位体比を3次元のグラフで可視的に表すことにより、密造原料エフェドリン類の製造法推定を可能にした。オーストラリアの研究所とデータ交換をし、両国の覚せい剤密造原料の起源についての傾向をとらえることができた。異なる3地域で生育していた麻黄の安定同位体比測定をし、プロファイリング用基礎データを得た。国際的な技術支援として、インドネシアBNNの法化学研究所からの要請にこたえ、相互訪問しドラッグプロファイリングの技術指導研修を行った。更に、AFSNの会議にて、関係国の担当者に覚せい剤のプロファイリングに関する最新の技術を紹介した。

3) ミャンマー薬用植物の有用性に関する研究

麻薬代替植物の導入にあたり、現地の植物の利用を目的に有用植物の探索を行った。熱帯感染症の病原であるリーシュマニア原虫に抗活性が認められた *Diospyros burmanica* Kurz. の材, *Tectona grandis* Linn. の葉について分画を行い、前者から14種の

化合物、後者から13種の化合物を得た。これらの構造決定を行った後に活性の比較を行い、前者、後者それぞれの化合物のうちから3種、合計6種が活性化合物であることを明らかにした。また、ヒト骨肉腫オステオサルコーマMG63細胞に対してチン州ディーティンで採取した*Bistorta* sp.は増殖抑制を示さないものの細胞の形態変化を誘導した。

4) 大麻のDNA鑑定を目的としたゲノム多様性に関する研究

大麻の原植物であるアサは世界中に分布することから、多くの多様性が存在する。葉、茎、種子など様々な形態的特徴を系統ごとに調べた。またTHC含有率、THCA生合成酵素遺伝子型を調べた。THCA生合成酵素遺伝子の配列は、THC高含有系統のD型2種類と低含有系統のF型7種類の2タイプに分かれた。30系統の形態的特徴、THC含有率、THCA生合成酵素遺伝子型の各情報をもとにデータベースの構築を行った。アサのDNA鑑定精度の向上を目的として大麻の「生葉」、「乾燥葉」、「種子」の3種類の検体については、*rbcl*遺伝子及びドラッグタイプ型THCA生合成酵素遺伝子の2領域の検出実験を行い、3種類全ての分析試料において*rbcl*遺伝子、ドラッグタイプ型THCA生合成酵素遺伝子の2領域の検出が可能であることを明らかにした。

研究分担者

長野 哲雄

東京大学大学院薬学系研究科教授

関田 節子

徳島文理大学香川薬学部教授

高上馬希重

北海道医療大学薬学部准教授

A. 研究目的

本研究は、薬物乱用防止対策で重要な課題である密造用原料植物の不正栽培や原料物質の不正流通防止をめざし、国際的な観点から、約6年間継続して代替植物栽培、伝統的生薬の成分、密造原料に関する化学情報、大麻に関する生物学的鑑定法等多面的な研究を行ってきた。不正取引を目的としたケシ栽培とアヘンの生産が依然として継続されている覚せい剤等ATSの密造所は世界の様々な国に拡散傾向にある。覚せい剤の密造阻止を目的に、化学情報の検討を10余

年にわたり検討し、安定同位体分析や対象を絞った有機不純物分析手法は国内の関係機関の実務をリードし、国際的に評価されるデータの獲得に寄与を目指した。植物の栽培は、気候、土質調査、灌水、等の調査、技術が重要である。麻薬代替植物の導入にあたり、これらの点を克服し易い現地の植物の利用を考え、熱帯周辺の88ヶ国に患者が報告されている感染症リーシュマニア症の治療薬開発を目的に、ミャンマーに生育する植物を対象にした。

多様性の存在が知られている大麻については、形態的特徴や麻薬成分、DNA情報などを総合的に関連付けた情報が大麻鑑定の効率化と精度向上に役立つと考え、アサ30系統の葉、茎、種子の形態的特徴やTHC含有率、THCA生合成酵素遺伝子型を調べ、これらの情報を一つに関連させたデータベースの構築を行うことを目指した。違法大麻事犯などで

の大麻 DNA 鑑定精度の向上を目的として大麻の「乾燥葉」および「種子」を試料として DNA 分析手法の開発を行った。

B. 研究方法

1) けし代替植物の大量栽培指導と生産物の評価

ミャンマー連邦山間地にあるカチン州ミッチーナ、プタオ及びチン州北部で、薬用植物の栽培指導、沈香栽培による精油生産、生薬市場調査をした。プタオでの薬用植物の生育環境解明のため、水生昆虫、野生生物の調査を行った。地元生育の薬用ランや日本産のランをピンウーリンにて栽培を試みた。動物性生薬であるタケバチの成分研究を行った。ミャンマーやカンボジアで、伝統医療の普及に役立つシンポジウムの開催や生薬薬局方作成の支援をし、日本で研修生を受け入れ、人材育成をした。ASEAN 伝統薬会議に出席し、伝統薬規格の重要性について講演し、アセアンの伝統薬振興に関する技術支援を進めた。

2) 覚せい剤等 ATS の原料物質に関する研究

日本で押収された純度の高い結晶を含む覚せい剤試料について、炭素・窒素・水素の安定同位体比を安定同位体比質量分析(IR-MS)、汎用型 HPLC 及び LC/MS によるエフェドリン及びクロルエフェドリン類の簡便でかつ高感度な検出を試みた。更に、麻黄の水素、炭素及び窒素の安定同位体比測定を SI サイエンスの協力を得て行った。

3) ミャンマー薬用植物の有用性に関する研究

ミャンマー産の *D. burmanica* の材、*T. grandis* の MeOH エキスを作製し、各種

クロマトグラフィーにより分画、精製した。*D. Burmanica* の材から 4 新規化合物を含む 14 化合物を、*T. grandis* の葉から 2 新規化合物を含む 13 化合物を得、化学構造を決定した。構造決定は MS、NMR、X-Ray 等の機器解析により行った。生物活性は、*Leishmania major* を 10%FCS 入り Medium199 培地を用いて培養後調整した試料を加え、IC₅₀ を求めた。RAW264.7 細胞及び MG63 オステオサルコーマ細胞は、調整 DMEM 培地で培養、インキュベートした後 XTT 試薬 (Roche) を加え、マイクロプレートリーダーにより OD 値 (450-630nm) を測定した。

4) 大麻の DNA 鑑定を目的としたゲノム多様性に関する研究

人工気象条件下で 30 系統のアサを育成し、葉を通風乾燥後粉碎し分析試料とした。試料のエタノール抽出液を遠心分離し、HPLC で分析した。生薬から genomic DNA を得て、THCA 生合成酵素遺伝子を単離した。2 種類のプライマーを用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit で、フラグメント配列を決めた。DNA 分析手法の開発では、ドラッグタイプ型のアサの生薬、乾燥葉、と種子を試料とした。各 1 試料から QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit により DNA 抽出を行い、試料とした。*rbcL* 遺伝子及びドラッグタイプ型 THCA 生合成酵素遺伝子の 2 領域を検出対象とした。

C. 結果及び考察

1) けし代替植物の大量栽培指導と生産物の評価

カチン州プタオでの栽培薬用植物は、

- Mutisia acuminataの活性成分-, 日本生薬学会 第57回年会(徳島) 2010.9
7. 安元(森)加奈未等、抗リーシュマニア活性を有する有用植物の探索(その22)-ミャンマー産植物KYUN *Tectona grandis*の成分について-. 日本薬学会 128年会(静岡) 2011.3
8. 安元(森)加奈未等、抗リーシュマニア活性を有する有用植物の探索(その 23)-ミャンマー産植物KYUN *Tectonagrandis*の成分について-. 日本生薬学会第58回年会(東京) 2011.9
9. 安元加奈未、熱帯植物からの抗リーシュマニア活性物質の探索, 日本薬学会生薬天然物部会奨励研究受賞講演, 第4回食品薬学シンポジウム, 東京.2011.10
10. 高上馬希重等、違法薬物「大麻」のDNA 鑑別手法開発に関する研究、日本生薬学会北海道支部第 34 回支部例会(札幌) 2010.5.8
11. 高上馬希重等、違法薬物「大麻(アサ)」の植物学的特徴と多様性について、日本薬学会北海道支部第 134 回支部例会(札幌) 2010.5.8
12. 高上馬希重、Cannabis 大麻の植物としての多様性、生薬若手懇談会第 4 回勉強会(筑波) 2010.8.10
13. 高上馬希重、2010.9.9、違法薬物「大麻」の植物としての多様性、日本植物学会第 74 回大会シンポジウム(春日井)

Simple HPLC method for detection of trace ephedrine and pseudoephedrine in high-purity methamphetamine

Yukiko Makino*

ABSTRACT: A simple and sensitive HPLC technique was developed for the qualitative determination of ephedrine and pseudoephedrine (ephedrines), used as precursors of clandestine *d*-methamphetamine hydrochloride of high purity. Good separation of ephedrines from bulk *d*-methamphetamine was achieved, without any extraction or derivatization procedure on a CAPCELLPACK C₁₈ MGII (250 × 4.6 mm) column. The mobile phase consisted of 50 mM KH₂PO₄-acetonitrile (94:6 v/v %) using an isocratic pump system within 20 min for detecting two analytes. One run took about 50 min as it was necessary to wash out overloaded methamphetamine for column conditioning. The analytes were detected by UV absorbance measurement at 210 nm. A sample (20 mg) was simply dissolved in 1 mL of water, and a 50 µL aliquot of the solution was injected into the HPLC. The detection limits for ephedrine and pseudoephedrine in bulk *d*-methamphetamine were as low as 3 ppm each. This analytical separation technique made it possible to detect ephedrine and/or pseudoephedrine in seven samples of high-purity *d*-methamphetamine hydrochloride seized in Japan. The presence of trace ephedrines in illicit methamphetamine may strongly indicate a synthetic route via ephedrine in methamphetamine profiling. This method is simple and sensitive, requiring only commonly available equipment, and should be useful for high-purity methamphetamine profiling. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: HPLC; ephedrine; pseudoephedrine; high-purity methamphetamine; profiling analysis

Introduction

Clandestine manufacture of methamphetamine is an increasing problem, particularly in East and Southeast Asia, where the main precursor for illicit methamphetamine has been ephedrine or pseudoephedrine for a long time. Impurity profiling of methamphetamine hydrochloride is a very useful tool for monitoring the synthetic routes and distribution of drugs and precursors (Remberg and Stead, 1999). The chemical information on the precursor is useful for the strict control of precursor chemicals, which is a valuable countermeasure to prevent illicit synthesis. Therefore, the identification of ephedrine or pseudoephedrine as a starting material in illicit methamphetamine is essential to estimate the precursor (Makino *et al.*, 2005; Kurashima *et al.*, 2009). There have been seizures of high-purity *d*-methamphetamine hydrochloride in Japan. It is not possible to detect ephedrine and/or pseudoephedrine in these samples by GC-MS (Sasaki and Makino, 2006) or HPLC (Makino *et al.*, 2002). A number of analytical methods have been developed for the separation and determination of ephedrines in herbal materials and illicit methamphetamine hydrochloride (Makino *et al.*, 2002; Iwata *et al.*, 2006; Pellati and Benvenuti, 2008). It may be possible to determine trace ephedrines in bulk samples if using HPLC-MS or GC-TOF-MS with high sensitivity and selectivity. However, these instruments are not yet available for many forensic laboratories in East and Southeast Asia. Therefore, I have investigated a simple and practical HPLC method for the detection of trace ephedrine and pseudoephedrine in high-purity methamphetamine. Few simple methods for the determination of trace ephedrines in bulk methamphetamine hydrochloride have been reported in the literature. In our previous work, the

detection limit for ephedrines was 500 ppm (Makino *et al.*, 2002). Iwata *et al.* (2006) reported the detection limit of ephedrines in bulk methamphetamine to be 40 ppm by capillary electrophoresis. In recent years, Indonesia and Malaysia have reported the increasing scale and sophistication of methamphetamine manufacture (World Drug Report by UNODC, 2010), and there is a need for forensic laboratories in Southeast Asia to obtain chemical information on seized methamphetamine quickly and conveniently, using conventional instruments in hand. Most forensic laboratories in Southeast Asia already have facilities to determine key impurities of seized methamphetamine by GC-MS and the optical activity by simple HPLC (Makino *et al.*, 1999). However, there is no decisive chemical information for estimating the precursor for high-purity methamphetamine, because there is no simple and sensitive method that would be applicable in many forensic laboratories in which only conventional HPLC is available. As a continuation of our previous work (Makino *et al.*, 2002), the present paper describes a simple and more sensitive HPLC method for the qualitative analysis of ephedrine and pseudoephedrine in high-purity methamphetamine samples from which ephedrines were not detected by GC-MS or GC as reported in our methamphetamine profiling (Sasaki and Makino, 2006).

* Correspondence to: Y. Makino, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. E-mail: ymakino@mol.f.u-tokyo.ac.jp

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

authentic ephedrine and samples (nos 1 and 6). The spectra of peaks 1 and 2 in the chromatogram of Fig. 2(B and C) matched the spectra of the standard solution of *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine in the chromatogram of Fig. 2(A).

Conclusion

This simple and convenient HPLC method could determine ephedrine and pseudoephedrine at levels as low as 3 ppm in bulk methamphetamine. As it is very difficult to extract trace ephedrine from the structural analog methamphetamine, this method without any extraction or derivatization procedure may bring benefits for the profiling of high-purity methamphetamine. This developed method was confirmed to be effective for qualitative determination of ephedrine in illicit bulk methamphetamine hydrochloride samples, in which the contents were substantially below the detection limit of the previous method. The configuration of ephedrine is not acquired by this method, but the detection of trace ephedrine may provide valuable information in impurity profiling of high-purity samples. If the content of ephedrine is rich in seized methamphetamine sample, it's favorable to confirm the configuration of ephedrine by our previous method (Makino *et al.*, 2002). Illicit *d*-methamphetamine is prepared only from *l*-ephedrine or *d*-pseudoephedrine, not from *d*-ephedrine or *l*-pseudoephedrine. The ephedrine and pseudoephedrine detected in seized samples may be considered *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine. Conventional HPLC apparatus is available at most forensic laboratories, so the present method should be widely applicable for identifying trace ephedrine in bulk methamphetamine hydrochloride, and should be helpful for monitoring trends in synthetic methods and precursors used for the illicit production of methamphetamine hydrochloride.

Acknowledgments

I thank the Shiseido Research Center for technical advice on HPLC analysis. This work was done with technical and financial assistance from Professor Tetsuo Nagano at the Graduate School

of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, and was also supported by a Health Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

References

- Iwata Y, Inoue H, Kuwayama K, Kanamori T, Tsujikawa K, Miyaguchi H and Kishi T. Forensic application of chiral separation of amphetamine-type stimulants to impurity analysis of seized methamphetamine by capillary electrophoresis. *Forensic Science International* 2006; **161**: 92–96.
- Kanda T, Takezawa K, Kobayashi A, Xin X and Kutsuna H. Capcell Pak C18: ultimately silanol-shielded HPLC column for improved peak shapes of basic compounds under neutral conditions. *LC-GC* 2004; **56**: 43.
- Kurashima N, Makino Y, Urano Y, Sanuki K, Ikehara Y and Nagano T. Use of stable isotope ratios for profiling of industrial ephedrine samples: application of hydrogen isotope ratios in combination with carbon and nitrogen. *Forensic Science International* 2009; **189**: 14–18.
- Luo H, Ma L, Paek C and Carr PW. Application of silica-based hyper-crosslinked sulfonate-modified reversed stationary phases for separating highly hydrophilic basic compounds. *Journal of Chromatography A* 2008; **1202**: 8–18.
- Makino Y, Suzuki A, Ogawa T and Shirota O. Direct determination of methamphetamine enantiomers in urine by liquid chromatography with a strong cation-exchange precolumn and phenyl- β -cyclodextrin-bonded semi-microcolumn. *Journal of Chromatography B* 1999; **729**: 97–101.
- Makino Y, Urano Y and Nagano T. Impurity profiling of ephedrine in methamphetamine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2002; **947**: 151–154.
- Makino Y, Urano Y and Nagano T. Investigation of the origin of ephedrine and methamphetamine by stable isotope ratio mass spectrometry: a Japanese experience. *Bulletin on Narcotics* 2005; **57**: 63–78.
- Pellati F and Benvenuti S. Determination of ephedrine alkaloids in Ephedra natural products using HPLC on a pentafluorophenylpropyl stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; **48**: 254–263.
- Remberg B and Stead A H. Drug characterization/impurity profiling, with special focus on methamphetamine: recent work of the United Nations International Drug Control Programme. *Bulletin on Narcotics* 1999; **51**: 97–117.
- Sasaki T and Makino Y. Effective injection in pulsed splitless mode for impurity profiling of methamphetamine crystal by GC or GC/MS. *Forensic Science International* 2006; **160**: 1–10.
- World Drug Report by UNODC, 2010; available from: <http://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/WDR-2010.html>

Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using *matK* and *rbcL* sequences

Haruka Asahina · Junichi Shinozaki ·
Kazuo Masuda · Yasujiro Morimitsu ·
Motoyoshi Satake

Received: 15 September 2009 / Accepted: 24 November 2009 / Published online: 6 February 2010
© The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer 2010

Abstract Species identification of five *Dendrobium* plants was conducted using phylogenetic analysis and the validity of the method was verified. Some *Dendrobium* plants (Orchidaceae) have been used as herbal medicines but the difficulty in identifying their botanical origin by traditional methods prevented their full modern utilization. Based on the emerging field of molecular systematics as a powerful classification tool, a phylogenetic analysis was conducted using sequences of two plastid genes, the maturase-coding gene (*matK*) and the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-coding gene (*rbcL*), as DNA barcodes for species identification of *Dendrobium* plants. We investigated five medicinal *Dendrobium* species, *Dendrobium fimbriatum*, *D. moniliforme*, *D. nobile*, *D. pulchellum*, and *D. tosaense*. The phylogenetic trees constructed from *matK* data successfully distinguished each species from each other. On the other hand, *rbcL*, as a single-locus barcode, offered less species discriminating power than *matK*, possibly due to its being present with little variation. When results using *matK* sequences of *D. officinale* that was deposited in the DNA database were

combined, *D. officinale* and *D. tosaense* showed a close genetic relationship, which brought us closer to resolving the question of their taxonomic identity. Identification of the plant source as well as the uniformity of the chemical components is critical for the quality control of herbal medicines and it is important that the processed materials be validated. The methods presented here could be applied to the analysis of processed *Dendrobium* plants and be a promising tool for the identification of botanical origins of crude drugs.

Keywords *Dendrobium* spp. · *matK* · *rbcL* · DNA barcoding · Phylogenetic analysis

Introduction

The genus *Dendrobium*, distributed in most Asian countries and Australia, belongs to the family Orchidaceae [1, 2], and includes 900–2000 species [2]. In China, about 50 *Dendrobium* species have long been used in traditional medicines [3]. Also in Japan, Kan-ro-in, a Kampo medicine, consists of *Dendrobium* plants, referred to as Gan-lou-in in the Chinese historical prescription book, Heji Jufang. Although it has been reported that *Dendrobium* plants have various pharmacological actions, including anti-cancer, anti-oxidant, immune modulation, and vasodilation effects [4], the chemical constituents that are responsible for these activities have yet to be identified. The fact that some *Dendrobium* species have been used as a tonic for hundreds of years in China suggests that these plants have potential for modern medicinal application in Japan. Jin chai shi hu, ma bien shi hu, and tie pi shi hu are listed in the latest Pharmacopoeia of the People's Republic of China [5]. According to Flora Reipublicae Popularis

H. Asahina (✉) · Y. Morimitsu
Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Humanities
and Sciences, Ochanomizu University, 2-1-1 Ohtsuka,
Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan
e-mail: asahina.haruka@ocha.ac.jp

M. Satake
Institute of Environmental Science for Human Life,
Ochanomizu University, 2-1-1 Ohtsuka, Bunkyo-ku,
Tokyo 112-8610, Japan

J. Shinozaki · K. Masuda
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Showa Pharmaceutical University, 3 Higashi-Tamagawagakuen,
Machida City, Tokyo 194-8543, Japan

Sinicae (FRPS) vol 19 [6], the scientific names of these species are *D. nobile*, *D. fimbriatum*, and *D. officinale* (*D. candidum* auct. non Lindl. [7]), respectively.

Many kinds of processed *Dendrobium* herbs, sometimes falsely sold as a more expensive variety, such as *D. officinale*, and numerous processed *Dendrobium* herbs with vernacular names are distributed in the Asian markets, making identification of their origin species more difficult. On the other hand, it is essential that processed materials of herbal medicine are validated from the point of view of quality control. Thus, the identification of the plant source as well as the uniformity of their chemical components is critical for their use as herbal medicines.

It is known that many *Dendrobium* plants are morphologically similar, making their identification based on morphology very difficult, except during flowering, when they can be easily classified. The most popular form of the processed drug of *Dendrobium* is called “Fengdou” in Chinese, and it appears in the shape of a small coil [3]. Identifying the botanical origin of such a processed drug is difficult because during the process, the natural resource is boiled, coiled, dried, and sometimes cut into pieces. As little is known about the chemical constituents of *Dendrobium* species, chemotaxonomy has not been applied for their botanical identification. Therefore, a reliable and brief method for the identification of these plant species needs to be developed for their further pharmaceutical utilization and investigation.

Recently, molecular systematics in plants as well as other organisms has been widely used for species identification and in the determination of phylogenetic relationships. In plants, the genes for maturase (*matK*), for the large subunit of the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (*rbcL*), and for the *trnH-psbA* intergenic spacer on the chloroplast genome, are often used for molecular phylogenetic analysis [8–13]. For example, in a study using 1566 specimens of orchids in Costa Rica representing 1084 species, the *matK* sequence was shown to be useful for species identification and reconstructing phylogeny [14]. In addition to these three loci, several plastid DNA regions (*atpF-atpH* spacer, *rpoB* gene, *rpoC1* gene, and *psbK-psbI* spacer) [15] are also used in plant species identification.

Furthermore, the concept “DNA barcoding” has emerged and was successfully applied for many animal groups as an efficient species identification tool (e.g. [16]). In 2009, the Consortium for the Barcode of Life (CBOL) Plant Working Group has recommended the 2-loci combination of *rbcL* plus *matK* as plant DNA barcodes, which are sequences that vary extensively between species but hardly at all within them [15]. The methodology of DNA barcoding could be applied to identify species, and to provide taxonomic information in clarifying the evolutionary relevance [17, 18].

In this study, five unprocessed medicinal *Dendrobium* plants and data deposited in the DNA database of DDBJ/EMBL/GenBank were used for species identification by phylogenetic analysis. Based on the proposal of CBOL Plant Working Group, we chose the two plastid genes, *matK* and *rbcL*, to conduct our phylogenetic analyses for assessing the intra- and interspecies relationship of the *Dendrobium* species.

Materials and methods

Plant materials

Leaves or stems of medicinal *Dendrobium* plants were collected from botanical gardens, individual cultivators, and a field, which are listed in Table 1. *Dendrobium* spp. noc-a to noc-c are *Dendrobium* hybrid cultivars of *D. nobile*. *Dendrobium* spp. noc-a and b are strains that were hybridized more than once. Both have different evolutionary lineages but the details are unknown. *Dendrobium* spp. noc-c is also a hybrid cultivar but its lineage is unknown. For *D. officinale*, plant material was not available in Japan. Therefore, the data deposited in the DNA database of DDBJ/EMBL/GenBank was used.

Isolation of DNA, amplification, and sequencing

Genomic DNAs were extracted from fresh plant samples by DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN). Synthetic oligonucleotides for polymerase chain reaction (PCR) primers were obtained from Nihon Bioservice (Saitama, Japan). The primer sets used for amplification of *matK* and *rbcL* gene were as follows: OMAT1F (5'-CCGTTMTSACCAT ATTGC-3') and trnK-2R (5'-AACTAGTCGGATGGAGTAG-3') for *matK* [19]; aF (5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3') and cR (5'-GCAGCAGCTAGTTCCGGCTCCA-3') for *rbcL* [11]. Using Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa Bio.), PCR was carried out with the above primer sets and DNA (approximately 5–55 ng) as a template. The PCR conditions were 30 cycles of denaturation at 98°C for 10 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min. The PCR reaction products were separated by agarose gel electrophoresis and purified by Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). The purified DNA was ligated into a T-vector using pGEM®-T Easy Vector System (Promega) and *Escherichia coli* DH5α COMPETENT high (TOYOBO) was transformed with the resultant plasmid. Plasmids were isolated by illustra™ plasmid Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare Bioscience). At least three clones were obtained for each species and used for sequencing. Sequencing was carried out by ABI 3100 Avant and 3130xl Genetic Analyzer

Table 1 Plant materials of *Dendrobium* species examined in this study

Taxon	Identifier	Source			Accession no.	
		Abbreviation	Collection site	Wild/market	<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	Kagoshima Pref., STC	Wild	AB519770	AB519782
<i>D. tosaense</i> Makino	KK	tosk	Shikoku, KKC	Market	AB519771	AB519783

All voucher specimens are deposited in Satake laboratory at the Ochanomizu University

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*; SMC Satake Collection; KKC Karasawa Collection; HBG Hiroshima Botanical Garden; STC Seki Collection; MPG Medicinal Plant Garden of Showa Pharmaceutical University; unknown unknown origins

(Applied Biosystems) using BigDye[®] Terminator v1.1 and v.3.1 Cycle sequencing kits (Applied Biosystems). Each procedure using the kits was carried out following the manufacturers' instructions. The nucleotide sequences of *matK* and *rbcL* reported here had been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank database and their accession numbers are listed in Table 1. In this study, the obtained sequence of each gene excluding the primer sequence was considered to be the full-length sequence of the genes.

DNA sequence data analysis

DNA sequences obtained from *matK* and *rbcL* were aligned with ClustalW [20]. The Neighbor-joining (NJ) method [21] was selected for the construction of phylogenetic trees. Maximum Composite Likelihood method [22] was used for computing the evolutionary distance. The output data was processed using MEGA4 [23] to draw the phylogenetic trees. A total of 1000 bootstrap replicates were calculated for the NJ tree construction [24].

Results

First, two species classified in the Chinese pharmacopoeia, *Dendrobium fimbriatum* and *D. nobile*, were chosen. The most important medicinal *Dendrobium* in China, *D. officinale*, was not available in Japan. Therefore, we used the sequence data deposited in the DNA Database of DDBJ/EMBL/GenBank for comparison. Second, *D. moniliforme* and *D. tosaense* were chosen because these were Japanese

native species that have a history of medicinal use and had been exported from Japan to China in the early twentieth century [25]. Lastly, *D. pulchellum*, which is widely found in Southeast Asia as well as in India [1, 2] and considered as a medicinal *Dendrobium*, was studied.

Phylogenetic tree analysis

For the twelve samples containing the five *Dendrobium* species (Table 1), the PCR-amplified fragments of both *matK*, including parts of the *trnK* intron, and *rbcL* genes, were sequenced. The full-length *matK* gene ranged between 1870 base pairs (bp) and 1879 bp, and that of *rbcL* was 1324 bp long. The number of nucleotides in the variable site between each pair of species is shown in Table 2.

The phylogenetic tree from the *matK* sequences including parts of the *trnK* intron showed that each species formed clearly distinctive clades (Fig. 1). *D. nobile* (notk) and three hybrid cultivars of *D. nobile* formed one clade (*D. nobile* group) although a genetic distance between notk and the other species was detected. The analysis of the phylogenetic tree constructed from *matK* without the *trnK* intron revealed that species clustering was not affected by the discarded sequence (data not shown). When using the 3'-half of the *matK* sequence without the *trnK* intron, the phylogenetic tree resulted in a clustering pattern similar to that of the full-length *matK*, although the genetic variation among *D. nobile* group was absent (data not shown). To compare the sequences obtained from the present study with other sequences deposited in the DNA database, a phylogenetic tree was constructed from partial *matK*

Table 2 Number of nucleotides in the variable site between species for full-length sequences of *matK* (upper) and *rbcL* (lower)

		<i>matK</i>												
		fitk	notk	mot	mom	mok	putk	puth	noca	nocb	nocc	totb	tosk	
<i>matK</i>	fitk	-	19	17	17	17	14	14	16	16	16	20	20	
	notk	5	-	9	9	9	23	23	3	3	3	11	11	
	mot	6	3	-	0	0	21	21	6	6	6	9	9	
	mom	6	3	0	-	0	21	21	6	6	6	9	9	
	mok	8	5	2	2	-	21	21	6	6	6	9	9	
	<i>rbcL</i>	putk	3	2	3	3	5	-	0	20	20	20	24	24
		puth	4	3	4	4	6	1	-	20	20	20	24	24
		noca	37	38	39	39	41	36	37	-	0	0	8	8
		nocb	7	2	5	5	7	4	5	40	-	0	8	8
		nocc	6	1	4	4	6	3	4	39	3	-	8	8
		totb	3	2	3	3	5	0	1	36	4	3	-	0
		tosk	3	2	3	3	5	0	1	36	4	3	0	-

Refer to Table 1 for abbreviation of samples

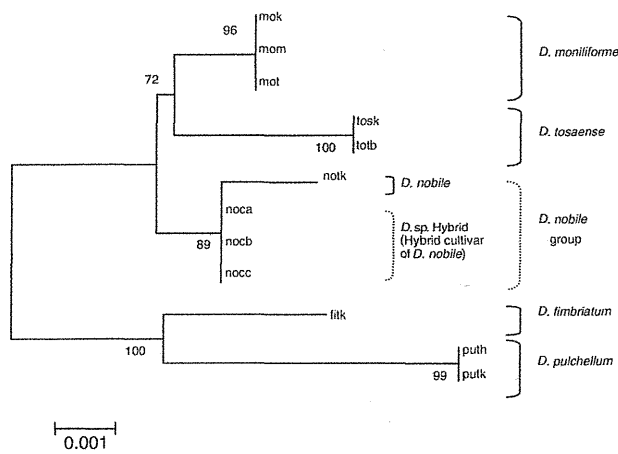


Fig. 1 Phylogenetic tree from full-length *matK* including partial *trnK* intron of 12 strains of five *Dendrobium* species. Bootstrap values (%) are shown on each branch. The indicated scale represents 0.001 nucleotide substitution per site

sequences (Nt. 537–1341, Fig. 2). In Fig. 2, most of the species formed distinct clades as shown in Fig. 1. Interestingly, sequences from *D. tosaense* and *D. officinale* excluding *D. officinale* AF445449 formed one clade.

The phylogenetic analysis using full-length *rbcL* sequences showed no species discrimination power between *D. pulchellum* and *D. tosaense* (Fig. 3). In addition, a hybrid cultivar of *D. nobile*, was not positioned within the clade of the *D. nobile* group formed from *D. nobile* and other hybrid cultivars of *D. nobile* (noc-b and noc-c). These results were also obtained in the phylogenetic tree constructed with partial *rbcL* sequences (Nt. 1–697) that were available in the database (Fig. 4). *D. officinale* (FJ216567) was located in a clade formed from *D. tosaense* but also in the clade from *D. pulchellum*.

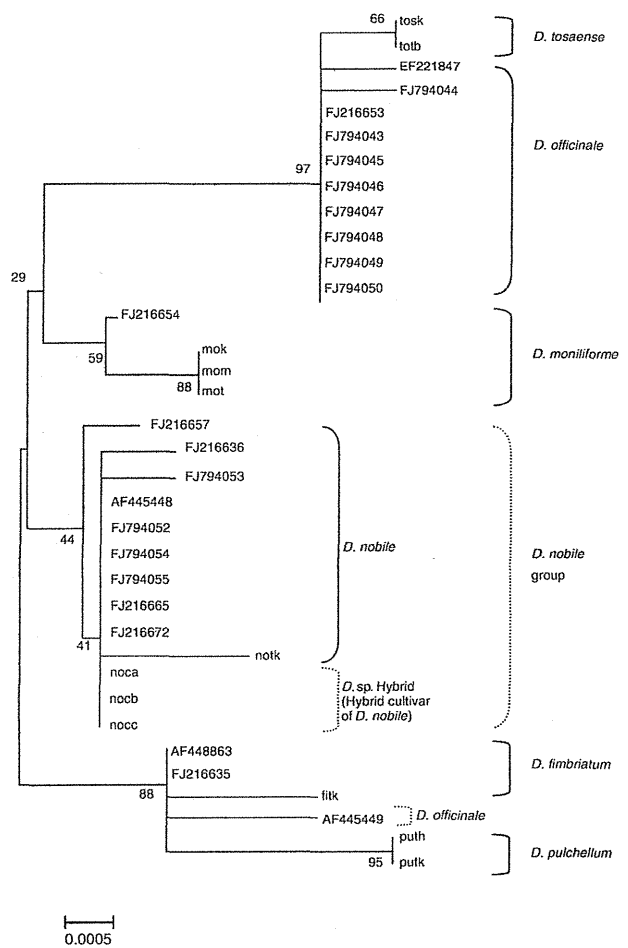


Fig. 2 Phylogenetic tree from partial *matK* (Nt. 537–1341) of 35 strains of six *Dendrobium* species. Bootstrap values (%) are shown on each branch. The indicated scale represents 0.0005 nucleotide substitution per site

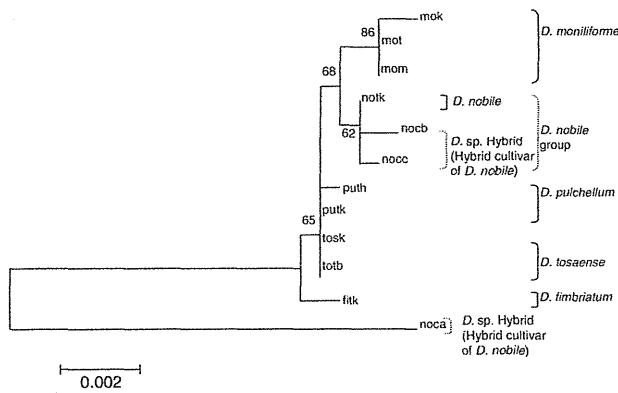


Fig. 3 Phylogenetic tree from *rbcL* of 12 strains of five *Dendrobium* species. Bootstrap values (%) are shown on each branch. The indicated scale represents 0.002 nucleotide substitution per site

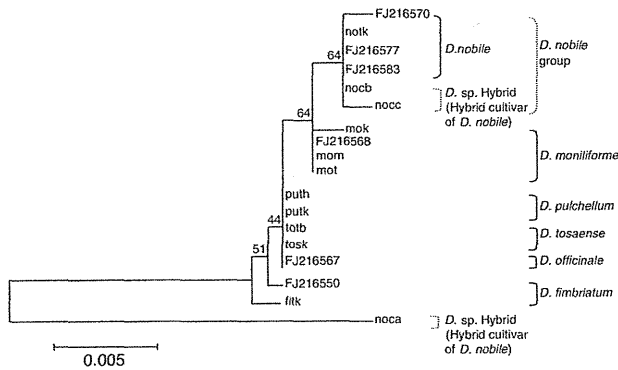


Fig. 4 Phylogenetic tree from partial *rbcL* (Nt. 1–697) of 18 strains of six *Dendrobium* species. Bootstrap values (%) are shown on each branch. The indicated scale represents 0.005 nucleotide substitution per site

Discussion

Our study showed that species identification of *Dendrobium* plants was possible using phylogenetic analyses constructed from *matK* sequences. Using the 3'-half of *matK* sequences (Nt. 944–1616), which is comparable to that of the full-length sequences, also had species discrimination power. Thus, as suggested by Lahaye et al. [14], the 3'-half of the *matK* sequence alone was useful for species identification of *Dendrobium* plants.

As shown in Fig. 1, among the species found in Honshu, Japan, *D. moniliforme* and *D. tosaense*, which seemed to have diverged later in time, were found as distinctive species in different clades. The closest species to these two species was the nobile group, although *D. nobile* formed a distinctive clade from the two species. *D. fimbriatum* and *D. pulchellum* which are morphologically categorized in the *Holochrysa* Section [1], are considered to be apart from the above three species, *D. moniliforme*, *D. tosaense*, and

D. nobile. These three species are categorized in the *Dendrobium* Section [1]. *D. fimbriatum* and *D. pulchellum* also formed distinct clades from each other. These results demonstrate that a phylogenetic analysis using the *matK* sequence is a useful tool for the species identification of five *Dendrobium* plants.

In contrast to using the *matK* sequence, the phylogenetic tree from *rbcL* sequences had less species discrimination power. It was not possible to distinguish between *D. tosaense* and *D. pulchellum* (Fig. 3). These two species are classified as species in different sections, those of *Dendrobium* and *Holochrysa*, respectively [1]. The failure of species discrimination with the *rbcL* sequence could be due to its slow nucleotide substitution rate in comparison with other nuclear genes leading to a functional constraint that reduces the evolutionary rate of nonsynonymous substitutions [26]. From Fig. 1 and 3, we concluded that the *matK* sequence alone is probably sufficient to distinguish among these five species.

We also conducted a phylogenetic analysis of *D. officinale* and *D. tosaense* and the results pointed to the high likelihood of their being in the same clade (Fig. 2). *D. officinale* is one of the most popular and rare medicinal *Dendrobium* species in China [27], and *D. tosaense* was thought to be distributed mainly in Japan and Taiwan [28]. Based on morphological and biogeographic information, some researchers have regarded them as two different species [6, 28, 29], while Wood saw them as a common species [1]. Our phylogenetic analysis using *matK* data showed that the two species were positioned within a common clade (Fig. 2). The latest morphological and biogeographic information (refer to [2, 6, 30]) show that these two species seem to be identical and our results did not contradict this. Further sequencing of numerous data samples collected from various regions and data from traditional approaches, could finally confirm their common identity. As a whole, species identification by molecular phylogenetic analysis will help resolve the ambiguity of plant origins of crude drugs.

Regarding the *rbcL* sequence, the phylogenetic tree from the *rbcL* data showed that the hybrid cultivar, noc-a, was distantly positioned from the clade of *D. nobile* group (Fig. 3). This strain is a hybrid derived from *D. nobile* and is considered to have undergone many hybridization events, which may have caused this positioning on the phylogenetic tree.

In this investigation, the relationship between five medicinal *Dendrobium* species based on phylogenetic tree analyses constructed from *matK* and *rbcL* genes was clarified. With regard to species discrimination, *matK* rather than *rbcL* offered a higher resolution and was better suited in identifying medicinal *Dendrobium* species. Although phylogenetic analysis is a brief and rapid method, and a

powerful tool for species identification, there were still some ambiguities. Nevertheless, using a large sample of sequence data accumulated from a wide range of regions can improve the significance of the results. Overall, the use of the *matK* sequences as barcodes for the first identification process was confirmed to be very efficient. Combining data from phytochemical analysis could help standardize the species identification process of medicinal *Dendrobium* plants.

Acknowledgments We are grateful to Dr. Setsuko Sekita of Pharmaceutical Sciences at Kagawa Campus, Tokushima Bunri University for her helpful comments. We thank Dr. Li Heng of Kunming Institute of Botany and Dr. Kohji Karasawa for their advice on Orchid taxonomy. We also thank Dr. Masayuki Hatta of Ochanomizu University for his help in interpreting the phylogenetic trees. Our thank goes to Dr. Yuko Shimamura of Ochanomizu University for her technical advice. We appreciate the kind sample offering from Mr. Toraiichiro Seki and The Hiroshima Botanical Garden. Part of this research was financially supported by the Ministry of Health, Labor and Welfare.

References

- Wood HP (2006) *The Dendrobiums*. Gantner Verlag, Ruggel
- Baker MLB, Charles O (1996) *Orchid species culture: Dendrobium*. Timber Press, Portland
- Bao XS, Shun QS, Chen LZ (2001) *The medicinal plants of Dendrobium (Shi-hu) in China*. Shanghai Medicinal University Press and Fudan University Press, Shanghai (in Chinese)
- Lin P, Bi Z, Xu H, Wang Z, Xu L (2003) *Advances in studies on pharmacology of plants from Dendrobium Sw*. Chin Tradit Herb Drugs 34(11)Suppl.:19–22 (in Chinese)
- Chinese Pharmacopoeia Committee of People's Republic of China (ed) (2005) *The Pharmacopoeia of the People's Republic of China: I*. Chemical Industry Press, Beijing (in Chinese)
- Tsi Z, Chen S, Luo Y, Zhu G (eds) (1999) *Flora, Reipublicae Popularis Sinicae. Angiospermae, Monocotyledoneae, Orchidaceae (3)*, Tomus 19. Science Press, Beijing (in Chinese)
- Institute of Botany, Academy of Science (ed) (1976) *Iconographia Cormophytorum Sinicorum Tomus V*. Science Press, Beijing (in Chinese)
- Hilu K, Liang H (1997) *The matK gene: sequence variation and application in plant systematics*. Am J Bot 84:830–839
- Wilson CA (2004) *Phylogeny of Iris based on chloroplast matK gene and trnK intron sequence data*. Mol Phylogenet Evol 33:402–412
- Kress WJ, Erickson DL (2007) *A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region*. PLoS ONE 2:e508
- Hasebe M, Omori T, Nakazawa M, Sano T, Kato M, Iwatsuki K (1994) *rbcl gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns*. Proc Natl Acad Sci USA 91:5730–5734
- Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SCH (2008) *Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well*. PLoS ONE 3:e2802
- Steven GN, Subramanyam R (2009) *Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical Acacia (Mimosoideae, Fabaceae)*. Mol Ecol Res 9(Suppl. 1):172–180
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V (2008) *DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots*. Proc Natl Acad Sci USA 105:2923–2928
- CBOL Plant Working Group (2009) *A DNA barcode for land plants*. Proc Natl Acad Sci USA 106:12794–12797
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) *Biological identifications through DNA barcodes*. Proc Biol Sci 270:313–321
- Vogler AP, Monaghan MT (2007) *Recent advances in DNA taxonomy*. J Zool Syst Evol Res 45:1–10
- Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurti RP, Haidar N, Savolainen V (2005) *Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 360:1889–1895
- Topik H, Yukawa T, Ito M (2005) *Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): insights from plastid matK and nuclear ribosomal ITS sequences*. J Plant Res 118:271–284
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res 22:4673–4680
- Saitou N, Nei M (1987) *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol Biol Evol 4:406–425
- Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) *Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method*. Proc Natl Acad Sci USA 101:11030–11035
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) *MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0*. Mol Biol Evol 24:1596–1599
- Felsenstein J (1985) *Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap*. Evolution 39:783–791
- Suzuki H, Keimatsu S, Ito K (1934) *Nachtrag zum "Chin-Shih-Hu"*. Yakugakuzasshi 54(9):820–823 (in Japanese)
- Wolfe KH, Li WH, Sharp PM (1987) *Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs*. Proc Natl Acad Sci USA 84:9054–9058
- Ding G, Zhang D, Feng Z, Fan W, Ding X, Li X (2008) *SNP, ARMS and SSH authentication of medicinal Dendrobium officinale KIMURA et MIGO and application for identification of Fengdou drugs*. Biol Pharm Bull 31(4):553–557
- Kimura K (1936) *Pharmacological study of Dendrobinae plants as the Chinese drug shih-hu*. J Shanghai Sci Inst Sect III 3(Suppl. 1):1–60 (in Japanese)
- Kimura K, Migo H (1936) *New species of Dendrobium from the Chinese drug shih-hu*. J Shanghai Sci Inst Sect III 3:121–124
- Karasawa K (2003) *Species Orchidacearum I* text. Japan Broadcasting Publishing, Tokyo (in Japanese)

201132021B

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)

麻薬・向精神・指定薬物等の乱用
防止に関する研究 国際的調和を
踏まえた麻薬代替としての
薬用植物等に関する研究

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 佐竹 元吉

平成 24 (2012)年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書	
「麻薬・向精神・指定薬物等の乱用防止に関する研究 国際的調和を 踏まえた麻薬代替としての薬用植物等に関する研究」・・・	1
研究代表者 佐竹 元吉	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	8

研究成果の刊行物・別刷

I. 総合研究報告書

麻薬・向精神・指定薬物等の乱用防止に関する研究 国際的調和を踏まえた麻薬代替としての薬用植物等に関する研究

研究代表者 佐竹 元吉 お茶の水女子大学 客員教授

研究要旨 薬物乱用防止対策においては乱用者の摘発や薬物による病的症状の治療で需要を断つと同時に、密造原料規制や密輸・密売の取締まりにより供給遮断が重要である。本研究班は、供給遮断による薬物乱用防止対策の観点で重要な課題である、密造用原料植物の不正栽培や原料物質の不正流通防止に役立つ下記4テーマで、関係国との連携を強化しながら推進し、東南アジアを主な対象とした国際的な乱用薬物拡散防止の一翼を担う成果を得た。

1) けし代替植物の大量栽培指導と生産物の評価

国際的な代替植物栽培支援対策にもかかわらず、現在もケシ栽培とアヘン生産が継続されているインドシナ半島において、薬用植物栽培の推進による伝統医療振興による住民の正規の収入源確保により、不正麻薬原料植物生産防止を目指した。現地で、ソバ、紅花、ブドウ、モモ、チャノキの大量栽培の基盤を作った。更に、日本向け薬用植物の栽培を漢方薬企業と共同で行った。ミャンマーの伝統生薬の品質確保に必須の生薬局方の作成を支援し、生薬20種類の規格作成し、保健省から研修生を受け入れ、局方づくりに必要な技術指導を行った。ミャンマー・チン州で薬用ラン等の野生薬用植物の調査及び栽培指導を行った。

2) 覚せい剤等ATSの原料物質に関する研究

覚せい剤の供給遮断に役立つ化学情報の獲得用プロファイリング研究において、押収例が増えている高純度結晶に微量含まれると想定されるエフェドリンやプソイドエフェドリン及びクロル中間体のHPLC及びLC/MSによる検出法を確立した。覚せい剤押収品25試料についての炭素・窒素・水素の安定同位体比を3次元のグラフで可視的に表すことにより、密造原料エフェドリン類の製造法推定を可能にした。オーストラリアの研究所とデータ交換をし、両国の覚せい剤密造原料の起源についての傾向をとらえることができた。異なる3地域で生育していた麻黄の安定同位体比測定をし、プロファイリング用基礎データを得た。国際的な技術支援として、インドネシアBNNの法化学研究所からの要請にこたえ、相互訪問しドラッグプロファイリングの技術指導研修を行った。更に、AFSNの会議にて、関係国の担当者に覚せい剤のプロファイリングに関する最新の技術を紹介した。

3) ミャンマー薬用植物の有用性に関する研究

麻薬代替植物の導入にあたり、現地の植物の利用を目的に有用植物の探索を行った。熱帯感染症の病原であるリーシュマニア原虫に抗活性が認められた*Diospyros burmanica* Kurz.の材、*Tectona grandis* Linn.の葉について分画を行い、前者から14種の

化合物、後者から13種の化合物を得た。これらの構造決定を行った後に活性の比較を行い、前者、後者それぞれの化合物のうちから3種、合計6種が活性化合物であることを明らかにした。また、ヒト骨肉腫オステオサルコーマMG63細胞に対してチン州ディーティンで採取した*Bistorta* sp.は増殖抑制を示さないものの細胞の形態変化を誘導した。

4) 大麻のDNA鑑定を目的としたゲノム多様性に関する研究

大麻の原植物であるアサは世界中に分布することから、多くの多様性が存在する。葉、茎、種子など様々な形態的特徴を系統ごとに調べた。またTHC含有率、THCA生合成酵素遺伝子型を調べた。THCA生合成酵素遺伝子の配列は、THC高含有系統のD型2種類と低含有系統のF型7種類の2タイプに分かれた。30系統の形態的特徴、THC含有率、THCA生合成酵素遺伝子型の各情報をもとにデータベースの構築を行った。アサのDNA鑑定精度の向上を目的として大麻の「生葉」、「乾燥葉」、「種子」の3種類の検体については、*rbcL*遺伝子及びドラッグタイプ型THCA生合成酵素遺伝子の2領域の検出実験を行い、3種類全ての分析試料において*rbcL*遺伝子、ドラッグタイプ型THCA生合成酵素遺伝子の2領域の検出が可能であることを明らかにした。

研究分担者

長野 哲雄

東京大学大学院薬学系研究科教授

関田 節子

徳島文理大学香川薬学部教授

高上馬希重

北海道医療大学薬学部准教授

A. 研究目的

本研究は、薬物乱用防止対策で重要な課題である密造用原料植物の不正栽培や原料物質の不正流通防止をめざし、国際的な観点から、約6年間継続して代替植物栽培、伝統的生薬の成分、密造原料に関する化学情報、大麻に関する生物学的鑑定法等多面的な研究を行ってきた。不正取引を目的としたケシ栽培とアヘンの生産が依然として継続されている覚せい剤等ATSの密造所は世界の様々な国に拡散傾向にある。覚せい剤の密造阻止を目的に、化学情報の検討を10余

年にわたり検討し、安定同位体分析や対象を絞った有機不純物分析手法は国内の関係機関の実務をリードし、国際的に評価されるデータの獲得に寄与を目指した。植物の栽培は、気候、土質調査、灌水、等の調査、技術が重要である。麻薬代替植物の導入にあたり、これらの点を克服し易い現地の植物の利用を考え、熱帯周辺の88ヶ国に患者が報告されている感染症リーシュマニア症の治療薬開発を目的に、ミャンマーに生育する植物を対象にした。

多様性の存在が知られている大麻については、形態的特徴や麻薬成分、DNA情報などを総合的に関連付けた情報が大麻鑑定の効率化と精度向上に役立つと考え、アサ30系統の葉、茎、種子の形態的特徴やTHC含有率、THCA生合成酵素遺伝子型を調べ、これらの情報を一つに関連させたデータベースの構築を行うことを目指した。違法大麻事犯などで

の大麻 DNA 鑑定精度の向上を目的として大麻の「乾燥葉」および「種子」を試料として DNA 分析手法の開発を行った。

B. 研究方法

1) けし代替植物の大量栽培指導と生産物の評価

ミャンマー連邦山間地にあるカチン州ミッチーナ、プタオ及びチン州北部で、薬用植物の栽培指導、沈香栽培による精油生産、生薬市場調査をした。プタオでの薬用植物の生育環境解明のため、水生昆虫、野生生物の調査を行った。地元生育の薬用ランや日本産のランをピンウーリンにて栽培を試みた。動物性生薬であるタケバチの成分研究を行った。ミャンマーやカンボジアで、伝統医療の普及に役立つシンポジウムの開催や生薬薬局方作成の支援をし、日本で研修生を受け入れ、人材育成をした。ASEAN 伝統薬会議に出席し、伝統薬規格の重要性について講演し、アセアンの伝統薬振興に関する技術支援を進めた。

2) 覚せい剤等 ATS の原料物質に関する研究

日本で押収された純度の高い結晶を含む覚せい剤試料について、炭素・窒素・水素の安定同位体比を安定同位体比質量分析(IR-MS)、汎用型 HPLC 及び LC/MS によるエフェドリン及びクロルエフェドリン類の簡便でかつ高感度な検出を試みた。更に、麻黄の水素、炭素及び窒素の安定同位体比測定を SI サイエンスの協力を得て行った。

3) ミャンマー薬用植物の有用性に関する研究

ミャンマー産の *D. burmanica* の材, *T. grandis* の MeOH エキスを作製し、各種

クロマトグラフィーにより分画、精製した。*D. Burmanica* の材から 4 新規化合物を含む 14 化合物を、*T. grandis* の葉から 2 新規化合物を含む 13 化合物を得、化学構造を決定した。構造決定は MS、NMR、X-Ray 等の機器解析により行った。生物活性は、*Leishmania major* を 10%FCS 入り Medium199 培地を用いて培養後調整した試料を加え、IC₅₀ を求めた。RAW264.7 細胞及び MG63 オステオサルコーマ細胞は、調整 DMEM 培地で培養、インキュベートした後 XTT 試薬 (Roche) を加え、マイクロプレートリーダーにより OD 値 (450-630nm) を測定した。

4) 大麻の DNA 鑑定を目的としたゲノム多様性に関する研究

人工気象条件下で 30 系統のアサを育成し、葉を通風乾燥後粉碎し分析試料とした。試料のエタノール抽出液を遠心分離し、HPLC で分析した。生薬から genomic DNA を得て、THCA 生合成酵素遺伝子を単離した。2 種類のプライマーを用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit で、フラグメント配列を決めた。DNA 分析手法の開発では、ドラッグタイプ型のアサの生薬、乾燥葉、と種子を試料とした。各 1 試料から QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit により DNA 抽出を行い、試料とした。*rbcL* 遺伝子及びドラッグタイプ型 THCA 生合成酵素遺伝子の 2 領域を検出対象とした。

C. 結果及び考察

1) けし代替植物の大量栽培指導と生産物の評価

カチン州プタオでの栽培薬用植物は、

生育状況は良好であったが、洪水被害を受けた。栽培地をメイミョウに移し16種類の漢方薬原料植物のうちボウフウ、サイコ、オウギは市場に出せる状態であった。ミャンマー産生姜のギンゲロールの含有量が多いことが判明し、大量栽培を計画できることになった。最終年度は、内戦中のカチン州の代わりに、チン州での栽培・調査を行った。チン州の高地ケネディーピークは、南東ヒマラヤに位置し、野生植物の宝庫であった。野生薬用植物としては、ミシマサイコ、イワオウギ、センブリ、トリカブトなど日本の漢方薬の生薬植物が生育していた。シャクナゲは種類が多かった。薬用ランの自生地および流通についての初踏査では、自生地で *Dendrobium longicornu* が観察された。タケバチの薬効成分については、ペプチド性成分の構造決定でき、薬効との関連付けを検討できるようになった。2009年からミャンマー保健省を支援し進めてきた生薬薬局方作りでは、作成委員会にて、相互に記載内容を検討し、初版収載する生薬20品目のモノグラフを完成できた。ミャンマーの麻薬地域カイン州と中央政府が平和協定をむすび、テイン・セイン大統領は彼らの経済支援のために、日本に対して、山間部での農業支援を要望してきている。本プロジェクトの薬草栽培の成果が重要な役割を担うことになると考える。

2) 覚せい剤等ATSの原料物質に関する研究

日本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を3次元のグラフで可視的に表すことにより、わかりやすい分類を可能とした。また、オーストラリ

アの研究グループからデータ提供を受け、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。HPLC及びLC/MSによる覚せい剤のプロファイリング検討では、エフェドリン類を煩雑な前処理操作せずに、クロル中間体及びエフェドリン類の高感度検出法を確立できた。密造品に含まれる多数の微量不純物から、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った。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、麻黄由来の原料の詳細なプロファイリングに生かしていく予定である。

3) ミャンマー薬用植物の有用性に関する研究

ミャンマーに自生する *Diospyros burmanica*, *Tectona grandis* は顕著な抗リーシュマニア活性を有していた。これらの活性化化合物は、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みなされる。*Bistorta* sp., *Cephalandra indica*, *Acacia concinna*, *Tectona hamiltoniana* は、抗リーシュマニ