

Fig. 3 薬物の作用部位の確定

刺激位置を赤丸、波形取得領域を中抜き丸で示した。スケールバー:500 μm

- A. 被験物質の投与前 10 フレーム(10 分間)の平均画像
- B. 被験物質投与終了前後 5 フレーム(10 分間)の平均画像
- C. 差分画像(B-A)
- D. K=6 でクラスター分類し、投与前後で応答波形に差が見られた領域
- E. D で得られた領域を各フレームに当てはめ、領域内の平均波形を取得。興奮性応答は連続する 3 フレームを平均したもののうち、最も大きな値のものを採用した。抑制性応答は刺激後 300~349 ミリ秒の平均値を採用した。

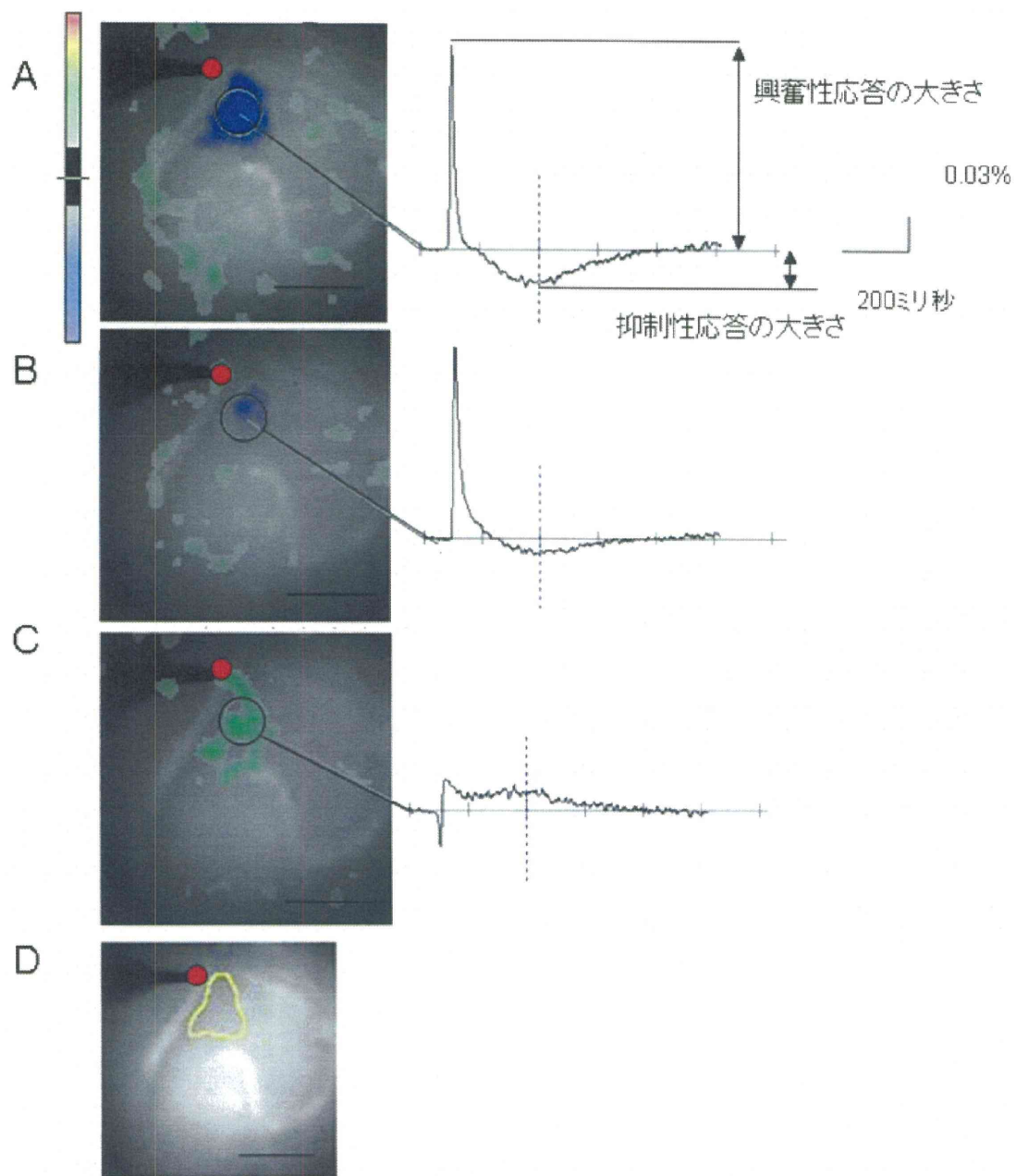


Fig. 4 マウス脳スライス標本への WIN55212-2 (1 μ M)の作用

刺激後 300 ミリ秒時点での画像と波形。刺激位置を赤丸、波形取得領域を中抜き丸で示した。スケールバー: 500 μ m

- A. WIN 投与前 10 分間の平均画像と波形
- B. WIN 投与開始後 25~35 分の平均画像と波形
- C. 差分(B-A)
- D. WIN 投与前後で応答波形に変化が生じた領域

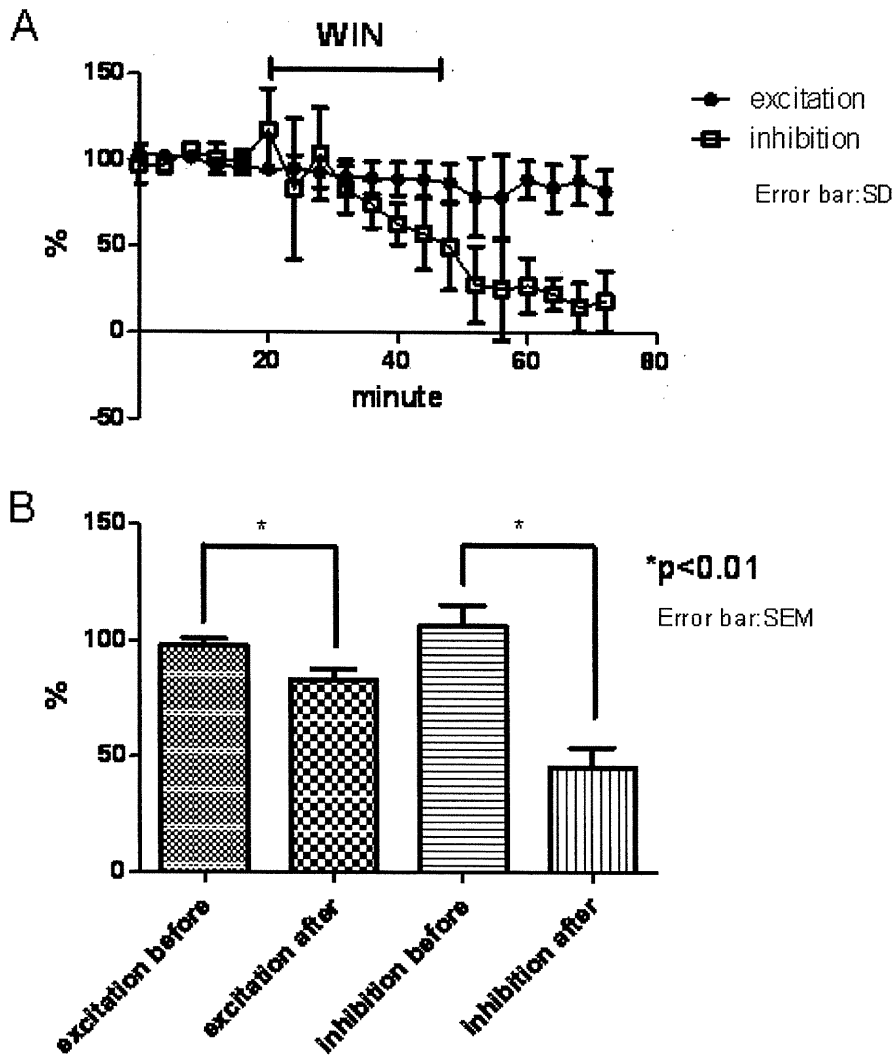


Fig. 5 スライス標本への WIN55212-2(1 μ M)投与による興奮性応答、抑制性応答の経時変化

A. 応答波形の経時変化。投与開始前 20 分間の平均値を 100%とし、時間毎の反応の大きさを示した。

B. 興奮性応答、抑制性応答の比較。投与開始前 10 分間の平均値と、投与終了前後(投与開始後 25 分~35 分)の 10 分間の平均値とを比較した。

WIN55212-2 の投与により、LA 領域において投与開始後 30 分後の抑制性応答の強さが、投与前 $106.3 \pm 9.03\%$ (mean \pm SEM ; n=7)から投与後 $45.7 \pm 8.47\%$ (n=7)に有意に減少した。(P<0.0001)興奮性応答の強さも $98.0 \pm 3.22\%$ (n=7)から投与後 $84.3 \pm 4.48\%$ (n=7)に有意に減少した(P=0.0034)が、抑制性応答と比べるとその程度は小さかった。

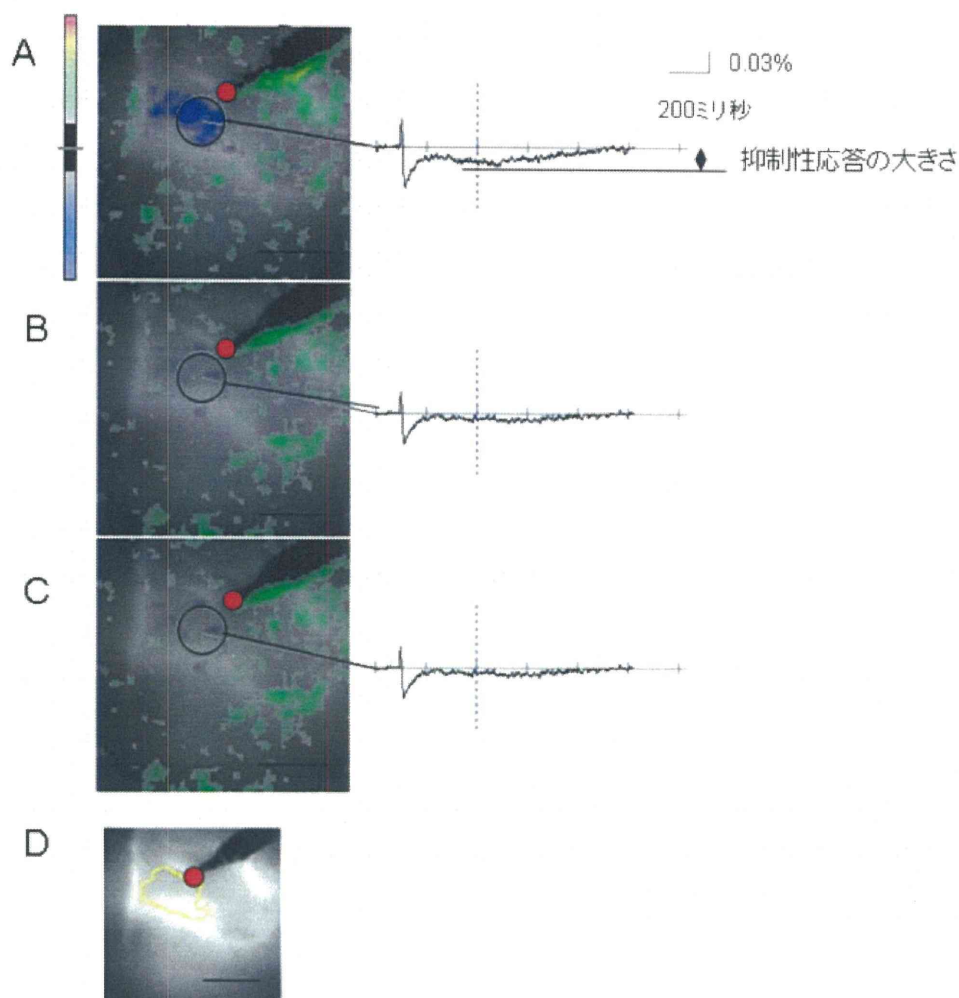


Fig. 6 スライス標本への AP5(50 μ M)、CNQX(10 μ M)による興奮性入力阻害下での WIN55212-2 (1 μ M)の作用

グルタミン酸受容体のアンタゴニストである AP5、CNQX を投与して興奮性入力を阻害した。刺激電極を動かし、抑制性応答が発生する場所を探した。その上で WIN55212-2 を投与した。

刺激後 300 ミリ秒の画像と波形

刺激位置を赤丸、波形取得領域を中抜き丸で示した。スケールバー: 500 μ m

A. WIN 投与前 10 分間の平均画像と波形

B. WIN 投与開始後 25~35 分の平均画像と波形

C. 差分(B-A)

D. WIN 投与前後で応答波形に変化が生じた領域

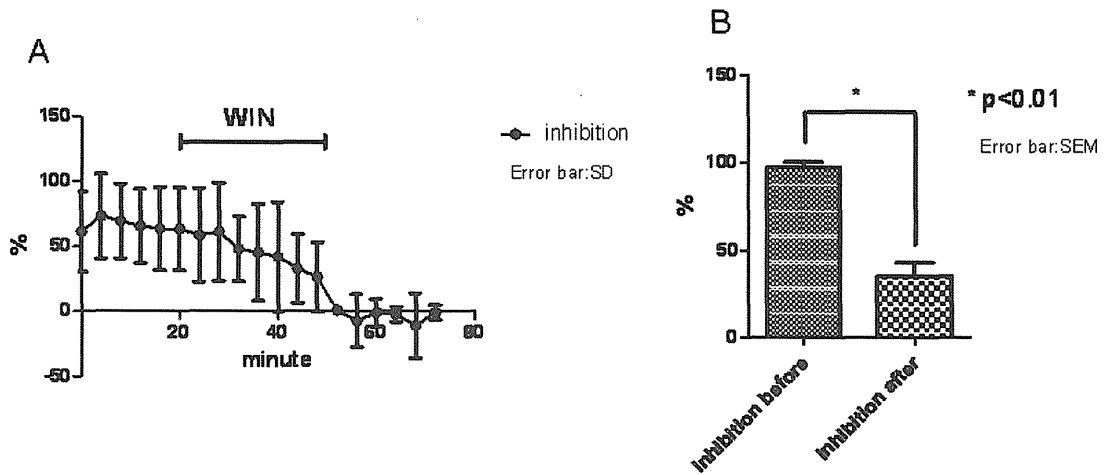


Fig. 7 スライス標本への AP5 (50 μ M)、CNQX (10 μ M)による興奮性入力阻害下での WIN55212-2 (1 μ M)の作用

A. 応答波形の経時変化。投与開始前 20 分間の平均値を 100%とし、時間毎の反応の大きさを示した。

B. 抑制性応答の比較。投与開始前 10 分間の平均値と、投与終了前後(投与開始後 25 分~35 分)の 10 分間の平均値とを比較した。

CNQX、AP5 の投与で興奮性入力を抑えた上で WIN55212-2 を投与したことにより、LA 領域において投与開始後 30 分後の抑制性応答の強さが、投与前 97.3 \pm 3.11 % (n=11)から投与後 35.3 \pm 7.65 % (n=11)に有意に減少した。(P<0.0001)

分担研究課題:違法ドラッグ成分の脳波による作用評価

分担研究者:裏出 良博(財)大阪バイオサイエンス研究所分子行動生物学部門・研究部長

研究協力者:内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—麻薬成分ケタミン誘導体:メトキセタミンのラット脳波に及ぼす作用に関する研究—

研究要旨:我々は、違法ドラッグ成分の中枢神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚等の作用を検出する方法として、動物実験用脳波解析システムを用いて、動物の脳波の変化から薬物の薬理学的効果を判定する方法を検討している。今回、平成 23 年度に新規流通違法ドラッグ成分として検出された methoxetamine について検討を行った。Methoxetamine は、麻酔薬である ketamine (麻薬)の誘導体であることから、ketamine をポジティブコントロールとした。なお、methoxetamine は平成 24 年 7 月に指定薬物として規制される予定である。両化合物(10 mg/kg)をそれぞれラットの腹腔内に投与し、脳波および自発運動量の変化について検討を行った。その結果、methoxetamine はラットの自発運動量を有意に増加させるとともに、ラットの脳波に有意な変化を与えた。一方、ketamine はラットの自発運動量に有意差は見られなかったが、脳波に対しては有意な変化が認められた。従って、methoxetamine は興奮作用を示す化合物である可能性が示された。また、methoxetamine は、自発運動量に対する作用と脳波に対する作用の発現時間にはある程度の相関が認められたが、ketamine には相関が認められなかった。さらに、今回測定した麻酔薬 ketamine 及び methoxetamine、主に鎮静性指定薬物である合成カンナビノイド: cannabicyclohexenol (CCH) 及び JWH-018、興奮性指定薬物: 4-fluoroamphetamine (4-FMP)の脳波パターンを比較した結果、薬物の種類によって脳波のパターンにある程度共通した傾向がみられた。

A. 研究目的

乱用が懸念される違法ドラッグを迅速に規制するためには、その有害性を的確に把握し評価することが重要である。しかし、現状では違法ドラッグに関する科学的知見は少なく、また作用についても不明な点が多い。これまで我々は、違法ドラッグ成分の中枢神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚作用を検出する方法として、動物実験用脳波解析システムを導入し、動物の脳波の変化から薬物の薬理学的効果を判定する方法を検討している¹⁻⁴⁾。

平成 23 年度の違法ドラッグ製品買い上げ調査

により、麻薬成分 ketamine の誘導体である methoxetamine が検出された (Fig. 1)。製品中の本化合物の分析データ及び流通実態については、本報告書で別途報告した^{研究報告 1, 2)}。また、本化合物は既に欧州や米国での流通が認められており、その健康被害についても報告されている⁵⁻⁸⁾。Methoxetamine は、麻酔薬として使用されている ketamine の誘導体であることから、NMDA 受容体のアンタゴニスト作用及びモノアミン再取り込み阻害作用を有する可能性が考えられるが、詳細な薬理作用の報告はほとんどない。そこで本研究では、methoxetamine 及び麻薬 ketamine を用いて、ラッ

トの脳波に対する変化を検討した。なお、methoxetamine は、平成 24 年 7 月に新たな指定薬物として規制される予定である。

B. 研究方法

【使用動物】Sprague-Dawley ラット(オス, 生後 8 週, 体重 290-350g)を日本エスエルシー株式会社より購入した。

【飼育方法】ラットは防音チャンバー内に設置したアクリル製ゲージで個別に管理した。12 時間ごとの明暗周期(午前 8 時より明期開始)下で, ラット用固形飼料を与え, 飼料と水を自由に摂取させた。

【脳波・筋電位測定用電極の処理手術と測定装置への接続】ラットに脳波・筋電位測定用の電極の留置手術を実施し, 回復用チャンバーに 10 日間おいて回復させた。その後, 記録用チャンバーに移して電極に測定用ケーブルを接続し, 4 日間順応させた。

【薬物投与】各薬物を生理食塩水の溶媒に溶解させ, SD ラットに腹腔内投与 (intraperitoneal administration: i.p.)した。投与は 19:00(暗期開始時刻)に行い, 1 日目は溶媒単独のコントロールとして, Vehicle(溶媒)のみを投与し, 2 日目に薬物を投与した(n = 5)。Ketamine は麻薬指定以前に和光純薬から購入したものを使用し, methoxetamine は LGC 社から購入した。各薬物は 10 mg/kg ずつ投与した。

【脳波・筋電位の記録と解析】脳波および筋電位は増幅(脳波:0.5-35 Hz, 筋電位:16-128 Hz)後, サンプリング速度:128 Hz でデジタル化して記録した。解析は脳波記録ソフトウェア'Sleep Sign'(キッセイコムテック社製)を用いて, 10 秒間のデータを 1 エポックとし, 脳波と筋電位の周波数成分・波形について, 投与後 24 時間にわたる脳波データを解析した。また, 脳波のパワースペクトルの FFT (Fast Fourier Transform) 解析を行い, 0.5 時間毎の各段階における周波数 (0.5 - 34.5 Hz) の強度について, 1 日目のコントロールを 100 %として

相対強度を算出し, 各薬物を比較した。

【自発運動量測定】自発運動量の測定は, 脳波・筋電位の測定と同時に行い, 赤外線センサーによりラットの行動量を測定した。投与後 24 時間にわたるデータを解析し, 0.5 時間毎の自発運動量を算出した。

(倫理面の配慮)

動物実験は, 大阪バイオサイエンス研究所の「動物実験に関する指針」を厳守し, 動物福祉の観点に基づいて, 適切な実験計画, 実験手技のもとで実施した。

C. 研究結果および考察

【自発運動量に及ぼす作用】各薬物を 10 mg/kg 投与した場合の自発運動量の経時変化を, Fig. 2A, 2B に示した。Methoxetamine を投与した場合, 投与 1 時間後まで有意に自発運動量は増加した (Fig. 2A)。一方, ketamine を投与した場合, 自発運動量に有意差は見られなかった (Fig. 2B)。次に, 各薬物の投与 0.5, 1.5, 3, 4.5, 6 時間後のラットの合計自発運動量を比較した (Fig. 2C)。縦軸は, 1 日目のコントロールの合計運動量を 100 %として算出した相対合計運動量を示す。Methoxetamine は, 投与 0.5, 1.5, 3, 4.5 時間後まで有意に合計運動量を増加させた。特に, 投与 3 時間後までは約 300%の増加がみられた。一方, ketamine では, 合計運動量に有意差は見られなかった (Fig. 2C)。Ketamine は NMDA 受容体のアンタゴニストであり, 且つモノアミン再取り込み阻害作用を有する麻酔薬であるが, 本測定では自発運動量には有意差は認められなかった。

以上の結果から, methoxetamine は ketamine と異なり, ラットの自発運動量を有意に増加させることが示されたことから, methoxetamine は興奮作用を示す化合物である可能性が示唆された。

【各周波数における脳波のパワースペクトル変化】

次に, 各薬物投与後の脳波の各周波数における強度変化を検討した。1 日目のコントロールの各周波数強度を 100 %とした時の薬物投与後の値を相対強度として算出し, 各周波数における比較

を行った。投与 3 時間後までの 30 分毎の周波数強度率の経時変化を Fig. 3 に示した。

Methoxetamine 投与ラットでは、投与 2.0 時間後まで周波数 2.5~3.5 Hz 付近に共通して強度率の増加がみられた。しかし投与 0~0.5 時間後と 1.0~1.5 時間後では、周波数 9.0~17.0 Hz 付近に強度率の減少がみられた (Fig 3A)。また、特に、投与 1.0~1.5 時間後において、周波数 2.5 Hz ではコントロールに対する相対強度が約 180%と顕著に増加した (Fig 3A)。しかし、投与 2.5~3.0 時間後では周波数パターンが異なり、周波数 8.5~19.5 Hz 付近に共通して約 140%程度の強度率の増加がみられた。次に ketamine を投与した場合、投与 0~0.5 時間後と 1.0~1.5 時間後の周波数強度率のパターンは類似しており、methoxetamine の結果とも類似の傾向がみられた。即ち、周波数 3.5~4.5 Hz 付近に共通して強度率の増加がみられ、逆に、9.5~17.0 Hz 付近では強度率の減少がみられた (Fig 3B)。また、投与 0.0~0.5 時間後において、周波数 4.0~4.5 Hz ではコントロールに対する相対強度が約 200%増加した (Fig 3B)。しかし、投与 0.5~1.0 時間後と 2.5~3.0 時間後では、周波数パターンが異なり、周波数 6.5 Hz 以降に強度率の増加がみられた (Fig 3B)。なお、0.65~4.0 Hz 付近の周波数は、一般的に δ 波といわれるノンレム睡眠時に増加する帯域であった。以上の結果から、methoxetamine は、自発運動量に対する作用と脳波に対する作用の発現時間にはある程度の相関が認められたが、ketamine には相関が認められなかった (Fig. 3)。

次に、これまでに測定した化合物投与後のラットの各脳波パターンの比較を行った (Fig. 4)。今回測定した麻酔薬 ketamine 及び methoxetamine、主に鎮静性指定薬物である合成カンナビノイド: cannabicyclohexenol (CCH) 及び JWH-018、興奮性指定薬物: 4-fluoroamphetamine (4-FMP) の脳波パターンを Fig. 4 に示した。前述の通り、methoxetamine 及び ketamine は周波数 2.5~4.5 Hz 付近に強度率の増加がみられたが、CCH 及

び JWH-018 は周波数 5.5 Hz 付近に強度率の増加がみられ、4-FMP は、周波数 8.0 Hz 付近に強度率の増加がみられた。なお、4.0~8.0 Hz 付近の周波数は、一般的に θ 波といわれるレム睡眠(夢を見る睡眠)時に増加する帯域である。従って、薬物の種類によって脳波のパターンにある程度共通した傾向があると考えられた。

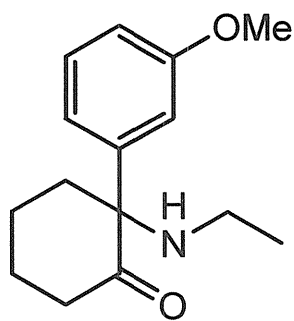
D. 結論

本研究により、麻酔薬 ketamine (麻薬) の誘導体 methoxetamine は、ラットの自発運動量を有意に増加させるとともに、ラットの脳波に有意な変化を与えた。一方、ketamine はラットの自発運動量に有意差は見られなかったが、脳波に対しては有意な変化が認められた。従って、methoxetamine は興奮作用を示す化合物である可能性が示された。また、麻酔、鎮静、興奮など薬物の種類によって、ある程度共通した脳波パターンがあると考えられた。今後も引き続き、興奮薬、鎮静薬、幻覚薬等の中枢神経作用薬に関して脳波測定を実施し、薬物の中枢作用評価法を確立すべく検討を行う予定である。

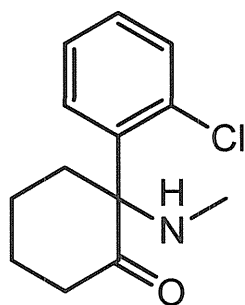
E. 参考文献

1. 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究」平成 19 年度研究分担報告「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用」
2. 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究」平成 20 年度研究分担報告「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用および血漿中薬物濃度に関する研究」
3. 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

- 「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 21 年度研究分担報告「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
4. 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 22 年度研究分担報告「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究(2)」(裏出良博, 内山奈穂子)
5. EMCDDA, Briefing paper “Online sales of new psychoactive substances / 'legal highs': summary of results from the 2011 multilingual snapshots”(November 2011)
6. Hofer KE, Grager B, Müller DM, Rauber-Lüthy C, Kupferschmidt H, Rentsch KM, Ceschi A. Ketamine-like effects after recreational use of methoxetamine. *Ann Emerg Med*(2012)in press.
doi:10.1016/j.annemergmed.2011.11.018.
7. Wood DM, Davies S, Puchnarewicz M, Johnston A, Dargan PI. Acute toxicity associated with the recreational use of the ketamine derivative methoxetamine. *Eur J Clin Pharmacol*(2011)in press. doi:10.1007/s00228-011-1199-9
8. Ward J, Rhyee S, Plansky J, Boyer E. Methoxetamine: a novel ketamine analog and growing health-care concern. *Clin Toxicol*(2011) 49(9):874-875.
- F. 健康危険情報:特になし.
- G. 研究発表
1. 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 23 年度研究分担報告「平成 23 年度新規流通違法ドラッグ成分の同定(2)ーカチノン誘導体及びその他含有化合物の同定」(内山奈穂子)
2. 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 23 年度研究分担報告「平成 21 年度～平成 23 年度買い上げ違法ドラッグ製品の流通実態調査ー違法ドラッグの規制と流通の変化ー」(花尻(木倉)瑠理, 内山奈穂子).
- H. 知的財産権の出願・登録状況:特になし.



methoxetamine



ketamine

Fig. 1. Structures of methoxetamine and ketamine

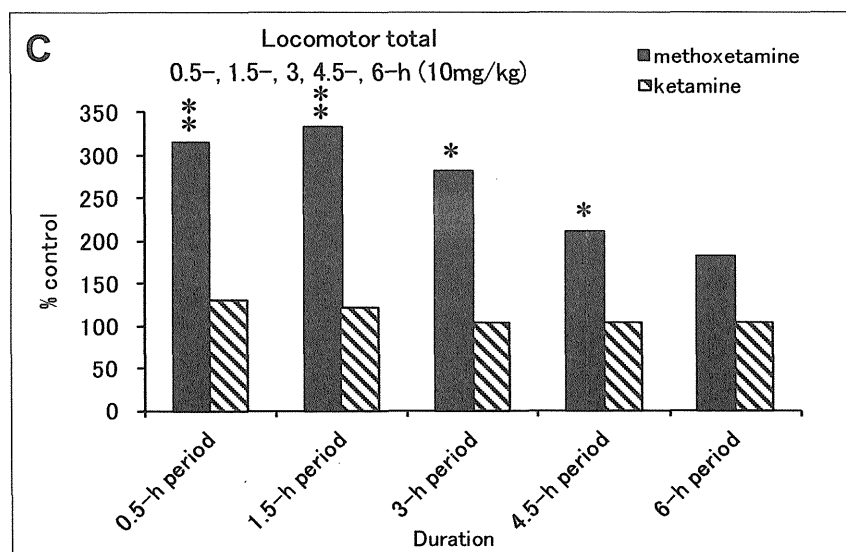
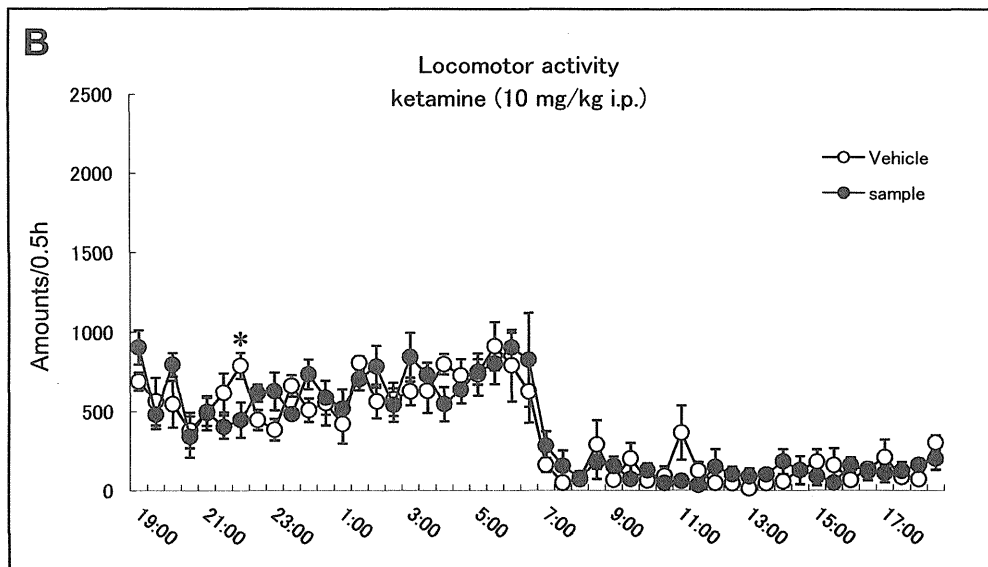
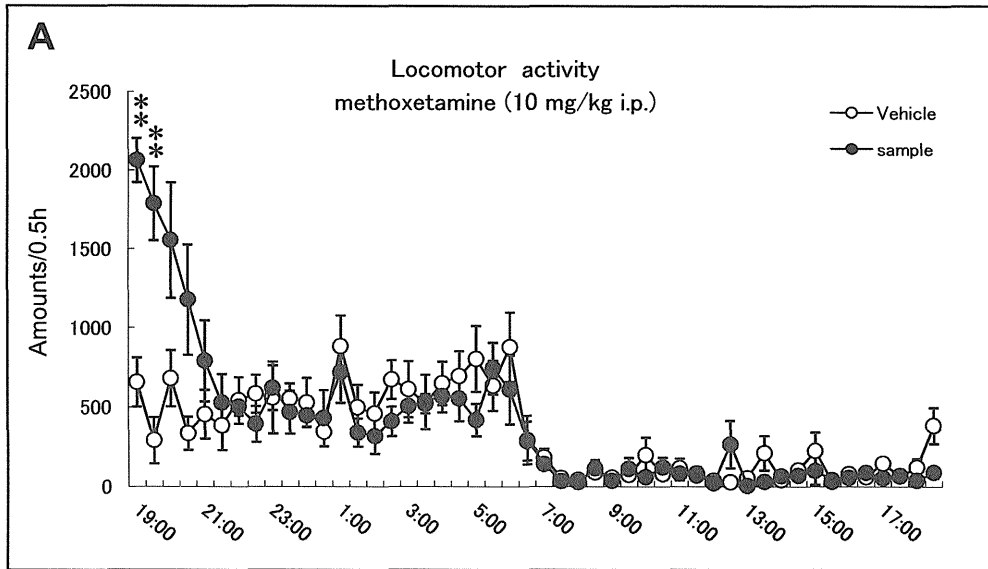


Fig. 2 薬物投与後のラットの自発運動量の経時変化(A: methoxetamine, B: ketamine) 及び薬物投与0.5, 1.5, 3, 4.5 時間後の各薬物におけるラットの相対合計自発運動量(C)

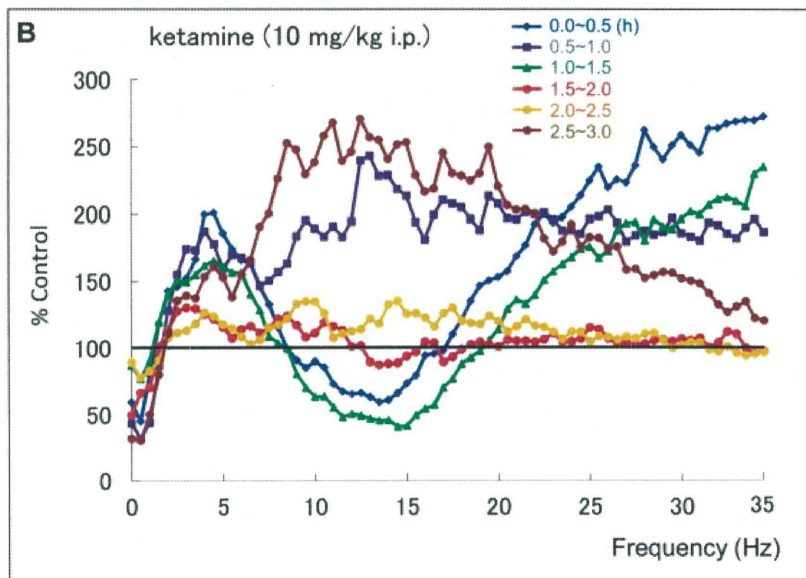
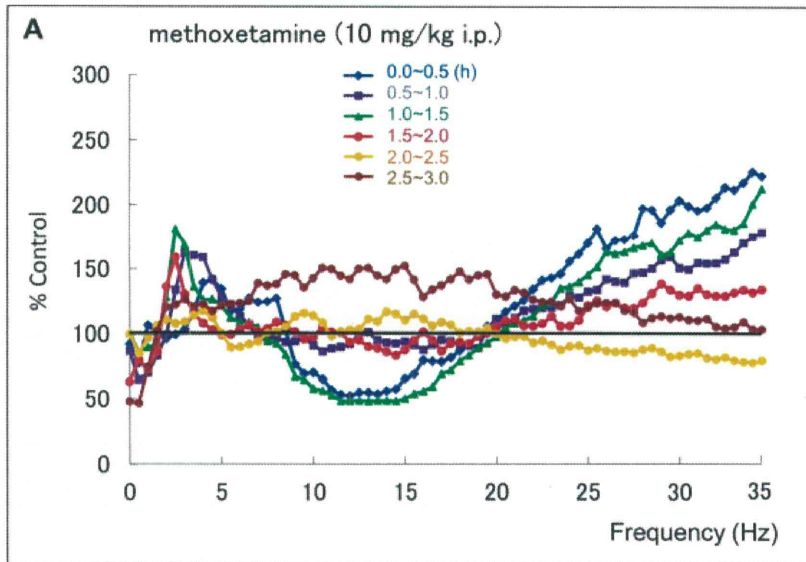


Fig. 3 薬物投与後ラットの各周波数での脳波のパワースペクトル変化 (A: methoxetamine, B: ketamine)

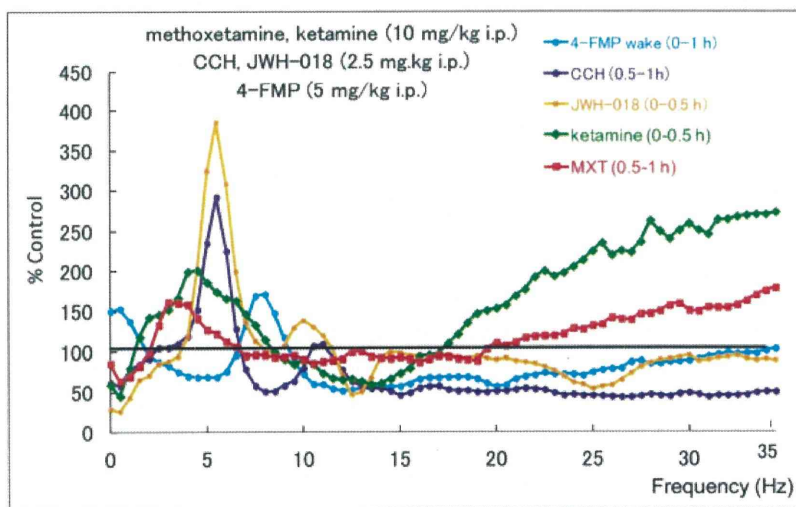


Fig. 4 薬物投与後ラットの各周波数での脳波のパワースペクトル変化 (methoxetamine, ketamine, CCH, JWH-018, 4-FMP)

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

—植物系違法ドラッグ製品の基原植物種の同定—

研究協力者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨:植物系違法ドラッグ製品 15 製品について DNA 塩基配列を指標とした基原植物の特定を行った。ダミアナ(*Turnera diffusa*)を混入する製品が多数(15 製品中 8 製品)検出された。一方で、大麻 (*Cannabis sativa*), クラートン(*Mitragyna speciosa*)を検出する製品もあり、今後も製品の分析を行う必要があると考えられた。

研究協力者

内山奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

A. 研究目的

違法ドラッグ市場では、「Spice」をはじめとして植物の樹脂片や乾燥物、粉碎物に、合成カンナビノイドを添加し「お香」と謳い販売する「ブレンドハーブ」が社会問題化している。これら製品は「合法ハーブ」としてメディアにも多く取り上げられ、吸引した者の救急搬送事例などのニュースも連日報道されている。本研究機関では数年前から違法ドラッグ対策を目的として、継続的に化学的¹⁻³⁾、分子生物学的手法^{4,5)}を用いた製品分析を行っている。これまでに、分子生物学的手法を用いた解析では一昨年には大麻 (*Cannabis sativa* L.)の混入を確認し、昨年は指定薬物であるサルビア デイビノラム (*Salvia divinorum*)の混入を確認している。今年度もブレンドハーブ製品の流通実態調査として、製品中の植物基原種の調査を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

違法ドラッグ市場品としてインターネット上で販売されている「ブレンドハーブ系」製品 15 製品(植物体乾燥(刻み)品)を使用した。

2. 実験方法

製品に混入されている植物片を目視により、同一器官、組織に外観の形状から分類可能なものについては分離した。収量の少ない分離組織片については、DNA 抽出において、最終溶出溶液を加減(20~50 μ L で溶出。通常は 100 μ L)して DNA 溶液の希釈を抑えた。

各試料を液体窒素で凍結させた後、MM-300 (Qiagen) により粉碎した。粉碎した各試料より DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出した。これを鋳型として葉緑体 DNA 上の *rbcL*, *matK* および核リボゾーム DNA 上の ITS 領域を、各領域で保存性の高い配列を基にしたプライマーを用い^{6,7)}、Ex Taq (Takara)および Ampdirect plus (Shimadzu)を使用して PCR によって各領域の増幅を以下のプログラムで行った(95°C 180sec; 94°C 30sec, 52°C 30sec, 72°C 90sec, 35cycle; 72°C, 300sec)。

ポリエチレングリコール沈殿後, Mighty TA-cloning Kit を用い, pMD20-T ベクターに PCR 増幅断片をライゲーションし, サブクローニングを行った. 挿入 PCR 断片の有無をコロニー PCR で確認し, 塩基配列を決定した. Cycle Sequence 反応には, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い, 解析は ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI) を使用した. 用いたプライマーを以下に示す.

rbcL forward primer;

5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3', *rbcL* reverse primer;

5'-GTAAATCAAGTCCACCRCG-3', *matK* forward primer;

5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3', *matK* reverse primer;

5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3', ITS forward primer;

5'-CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG-3', ITS reverse primer;

5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

3. 大麻特異的プライマーを用いた大麻由来 DNA の確認

trnL 領域植物共通プライマーである C, D primer⁸⁾ および, 大麻特異的プライマーである Can primer⁹⁾ を用い大麻由来 DNA の確認を行った. PCR 反応は上述の通りで行った. 以下にプライマーの塩基配列を示す.

C forward primer;

5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3',

Can forward primer;

5'-GAGTTGGCTGCGTTAATCCG-3',

D reverse primer

5'-GGGATAGAGGGACTTGAAC-3'

C. 研究結果

1. 塩基配列解析

植物の鑑別・同定に使われる葉緑体 DNA 上

の *rbcL* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Large subunit) および *matK* (maturase K) 領域を PCR を用い増幅し, これらの配列を国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) および BOLD systems (http://www.boldsystems.org/views/idrequest_plants.php) に登録されている配列と比較した.

全製品 (分離したものを含む) において本研究で用いた抽出キットで DNA の抽出は可能であり, 植物組織片の主なものは, 葉, 茎, 花弁であった. 両領域で配列が検出された植物種, 一方の領域ではあるが相同性が極めて高く, もしくは 2 塩基以下の違いが見られるもののみを記載した (植物種により塩基の長さは異なるが *rbcL*: 600 塩基対, *matK*: 800 塩基対程度である). データベースに存在する配列と相同性が低い (95%以下) ものは除外した.

今回の分析で製品より同定された植物種を表 1 に示す. 過去 2 年の傾向と比較して, スペインカンゾウ (*Glycyrrhiza glabra*), キバナオウギ (*Astragalus membranaceus*) など以前は頻繁に検出されていた植物種が検出されなかった. 以前から検出はされていたが, ダミアナ (*Turnera diffusa*) がより高い頻度で製品から検出された. また, 種が同定できないもの (表 1, 属名 sp. で記載), 属が同定できないもの (表 1, 科名記載) も見られた.

製品 No.1 からカンナビノイド化合物であるカンナビジオール (CBD) が検出されたため, 製品中の大麻 DNA の検出を行った (図 1). 大麻特異的プライマーである Can primer を用いた結果, C-D 領域では, No.1 および N1 (植物系違法ドラッグ別製品) では, 植物種混合品であるため複数のバンドが確認されるが, Can-D 領域では No.1 にのみバンドが確認された. また, 本バンドの配列を解析した結果, DNA データベース上の大麻 *trnL* 領域の塩基配列 (AY958396) と 100% 一致した (図 2). これらの結果から, CBD 成分の由来は, 大麻植物体の混入による可能性が強く

示唆された。また、高上馬らの drug type, fiber type の分析用プライマーを用いた PCR⁹⁾ では、バンドは検出されなかった(データ未掲載)ことから、本製品に混入されている大麻は fiber type であることが示唆された。

製品 No. 15 は、昨年度サルビア デイヴィノラム (*Salvia divinorum*) を検出した同一製品および改変製品(〇〇および〇〇 progress; 〇〇は製品名)であるが、いずれも、アルカロイドであるミトラギニン(Mitragynine)が検出されている。そこで、本製品にミトラギニン含有植物であるクラートン(*Mitragyna speciosa*)の混入の有無を調査した。matK 領域プライマーの PCR によって得られたバンドから *Mitragyna rubrostipulata* (AY538390) と最も相同性の高い(780/798 (98%)) 配列が得られた。*Mitragyna speciosa* の matK 配列データはデータベースに登録されていない。rbcL 領域プライマーの PCR では、*Mitragyna inermis* (AJ346986), *Mitragyna speciosa* (AJ346988), *Mitragyna rotundifolia* (AJ346987) は同一の塩基配列であり、すべての配列で 5 塩基の変異が見られた(568/573 (99%))。そこで、種を明確にするために、核リボゾーム DNA 上の ITS 領域を調査した。その結果、*Mitragyna speciosa* (JF412827, AB249645) ともっとも高い相同性を示した(732/734, 606/608 (99%)) (図 3)。以上の結果から、本製品には *Mitragyna speciosa* が混入されていることが強く示唆された。

今回分析した 15 製品はすべて合成カンナビノイド添加製品であった。

D. 考察

違法ドラッグ市場に流通する数種の植物細片を混合した、いわゆるブレンドハーブ製品に含まれる植物種の同定を行った。

近年の傾向としてはダミアナ (*Turnera diffusa*) の混入が顕著であり、その傾向は増していた。一方で、種を同定できない配列がいくつ

か検出された。matK, rbcL の分析の組み合わせでは、いずれも ITS, trnL-trnF, trnH-psbA などのイントロンやスパーサー領域と異なり、両領域は構造遺伝子である点で変異に多様性が少なく、その点は種を明確にするには不利であると考えられた。また、種は明確にできなかったが、いくつかの配列で木本植物などと類似の配列が得られた。これまでのキバナオウギやモウズイカ (*Verbascum*), シソ科ハーブ (Lamiaceae) などの草本類、海外ではサプリメントハーブとして利用されていた種とは異なり、部分的に植物材料の「かさ増し」に利用されている植物(木本植物であるために葉や茎も大きく乾燥収量も多いと考えられる)の存在も示唆された。木本植物は塩基配列情報のデータベースの登録数が少ないこともあるが、今後は、イントロン、スパーサー領域を確認する必要があると考えられた。

E. 参考文献

- 1) N. Uchiyama *et al.*, Identification of a cannabinoid analog as a new type of designer drug in a herbal product. *Chem. Pharm. Bull.* 57: (2009) 439–441.
- 2) N. Uchiyama *et al.*, Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Science International* 198: (2010) 31–38
- 3) N. Uchiyama *et al.*, Identification and quantitation of two cannabimimetic phenylacetylindoles JWH-251 and JWH-250, and four cannabimimetic naphthoylindoles JWH-081, JWH-015, JWH-200, and JWH-073 as designer drugs in illegal products *Forensic Toxicol.* 29: (2011) 25–37
- 4) 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「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 21 年度研究分担報告「植物系違法ドラッグ製品いわゆる“ブレンド

ハーブ”の基原植物について」(緒方 潤)

- 5) 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「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 22 年度研究分担報告「植物系違法ドラッグ製品の基原植物調査について」(緒方 潤)
- 6) CBOL Plant Working Group, A DNA barcode for land plants *Proc Natl Acad Sci USA* 106: (2009) 12794 – 12797
- 7) Stanford, A. M. *et al.*, Phylogeny and biogeography of *Juglans* (Juglandaceae) based on matK and ITS sequence data *American Journal of Botany* 87: (2000) 872–882
- 8) Linacre, A. and Thorpe, J. Detection and identification of cannabis by DNA. *Forensic Sci. Int.* 91: (1998) 71-76
- 9) 室友紀ら, 葉緑体 DNA の *trnL* 領域の解析による大麻草の識別, 法科学技術 15: (2010) 143-149
- 10) Kojoma, M. *et al.*, DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in “drug-type” and “fiber-type” *Cannabis sativa* L. *Forensic Science International* 159: (2006) 132–140

F. 健康危険情報

なし.

G. 研究発表

なし.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

表 1 各種製品由来 DNA 配列から予想された植物種

Product No.	Plant species			
1	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Cannabis sativa</i>		
2	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Camellia</i> sp.		
3	<i>Turnera diffusa</i>			
4	<i>Salvia</i> sp.	<i>Calendula arvensis</i>	<i>Althaea officinalis</i>	
5	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Evolvulus</i> sp.	<i>Chamaecrista nictitans</i>	Fabaceae
6	<i>Centaurea nigra</i>	<i>Centaurea nigra</i>		
7	<i>Eucommia ulmoides</i>	Asteraceae	<i>Eucommia ulmoides</i>	
8	<i>Gossypium</i> sp.	<i>Cirsium</i> sp.		
9	<i>Rubus idaeus</i>			
10	<i>Collinsonia canadensis</i>	<i>Collinsonia canadensis</i>		
11	<i>Turnera diffusa</i>			
12	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Lantana rugosa</i>	<i>Acleisanthes longiflora</i>	
13	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Ayenia</i> sp.		
14	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Lantana rugosa</i>		
15	<i>Salvia divinorum</i>	<i>Passiflora speciosa</i>	<i>Mitragaina speciosa</i>	

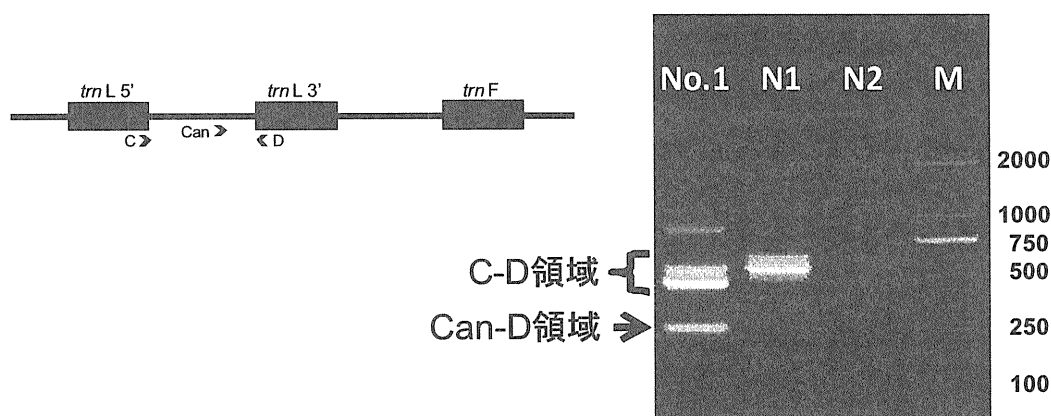


図 1. 大麻由来 DNA の解析領域と電気泳動図

No.1, 大麻の混入が疑われる製品; N1, ネガティブコントロール 1 (別製品); N2, ネガティブコントロール 2 (テンプレート DNA 無添加); M, マーカー

No.1	1	<u>GAGTTGGCTGCGTTAATCCGG</u> GATTTCTTTGATTTTTCATGAAAAATCAAAGAAATGTTTGT	60
AY958396	178	<u>GAGTTGGCTGCGTTAATCCGG</u> GATTTCTTTGATTTTTCATGAAAAATCAAAGAAATGTTTGT	237
Can primer			
No.1	61	GAATCAATTCTAAGTTGAAAAATGAATTGAATATTCAATTAACAATCATTTACTCCATC	120
AY958396	238	GAATCAATTCTAAGTTGAAAAATGAATTGAATATTCAATTAACAATCATTTACTCCATC	297
No.1	121	AAAATCTGATAGATTTTGTGAAGACTTGTATAAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCA	180
AY958396	298	AAAATCTGATAGATTTTGTGAAGACTTGTATAAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCA	357
No.1	181	TTCCACATGTC AATATCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAAATCCGTGACTTT	240
AY958396	358	TTCCACATGTC AATATCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAAATCCGTGACTTT	417
No.1	241	AAAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCC	273
AY958396	418	AAAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCC	450
D primer			

図 2. 図 1 で得られた Can-D 領域 (No.1) の塩基配列と大麻 trnL 領域 (AY958396) の配列比較

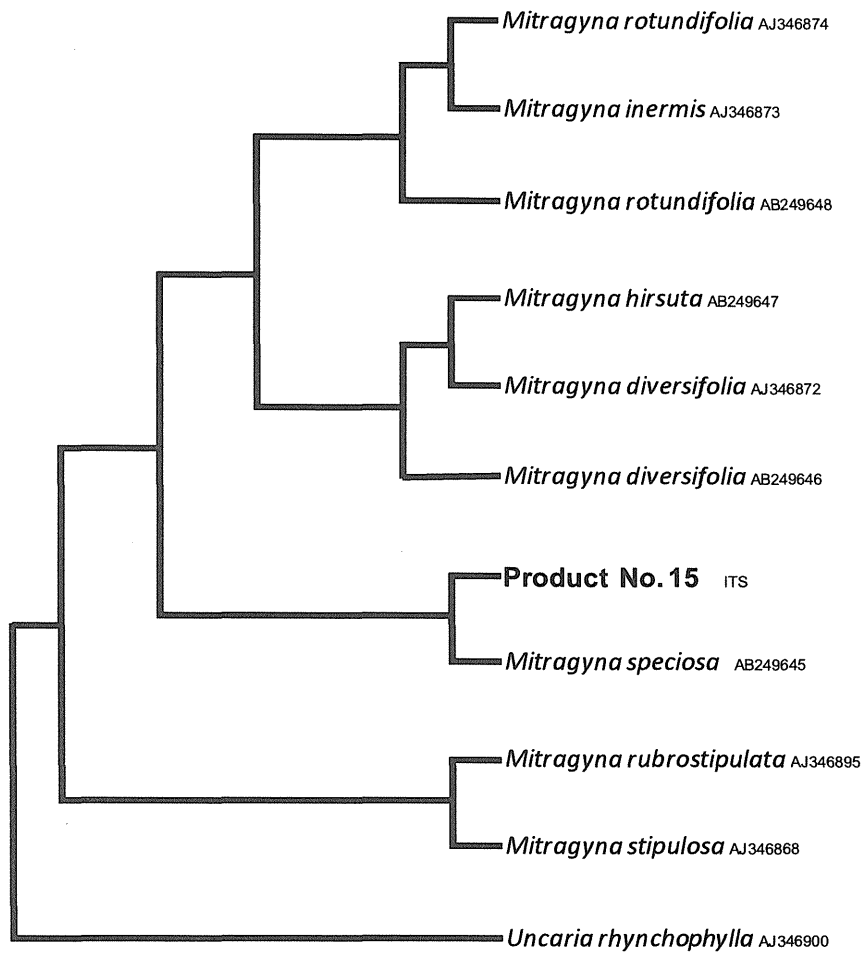


図 3. UPGMA 法を用いた ITS 領域におけるミトラガイナ属植物の系統解析

分担研究課題:植物系違法ドラッグ製品の基原種の特定

分担研究者:合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

—Coryphantha 属サボテンの DNA 塩基配列調査—

研究協力者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨:フェネチルアミン系アルカロイドである macromerine を含有すると推定されるサボテンと、その近縁種と考えられる Coryphantha 属サボテンの DNA 塩基配列調査と成分分析を行った。その結果、macromerine は園芸種の Coryphantha 属サボテンに検出されなかった。また、macromerine の検出されたサボテンは園芸種を含む Coryphantha 属サボテンと DNA 塩基配列に大きな違いがあることが示唆された。

研究協力者

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

杉村康司 医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター種子島研究部 研究員

内山奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬
部 主任研究官

A. 研究目的

フェネチルアミン系化合物である mescaline (図 1) は、人体に影響を及ぼす幻覚性成分として麻薬及び向精神薬取締法において規制されている。本化合物はサボテンの一部の種に存在することが知られている(ウバタマ(Peyote) *Lophophora williamsii* など)¹⁾。

本研究の調査対象である macromerine (図 1) は mescaline 同様、フェネチルアミン系の化合物であり、その効力は mescaline の 1/5 と言われているが、以前、本成分が違法ドラッグ製品から検出された²⁾。本成分は mescaline 同様、一部のサボテン(*Coryphantha macromeris*)に含有されている(macromerine および normacromerine)こと

が報告されており³⁻⁷⁾、違法ドラッグ市場には和名;大分丸としてサボテンそのものが販売されてもいる。本研究ではその基原植物の同定と近縁種の DNA 塩基配列調査および成分調査を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

違法ドラッグ市場(インターネット)で販売されている大分丸、園芸店から購入した *Coryphantha* 属サボテン園芸種、大祥冠、象牙丸、グリーンウッドイ(2 系統; 購入業者が異なる)、種子島研究部より種子交換にて収集した *Coryphantha cornifera* (Institute of Ecology and Botany Hungarian Academy of Sciences Botanical Garden, HUNGARIA), *Coryphantha sheeri* (Institute of Ecology and Botany Hungarian Academy of Sciences Botanical Garden, HUNGARIA), および *Coryphantha macromeris* の株(山陽カクタス) 7 種 8 系統を材料に用いた。(試料として用いたサボテンは和名、学名にアンダーラインを付して示す。)

2. 実験方法

2-1. DNA 塩基配列の決定

各サボテンの茎表面を 0.5mm 角程度に切り取り液体窒素で凍結させた後、MM-300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した各試料から DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出した。これを鋳型として葉緑体 DNA 上の *rpl16* intron および *matK* 両領域を、各領域で保存性の高い配列を基にしたプライマーを用い^{1,2)}、PrimeSTAR (Takara) を使用して PCR によって各領域の増幅を以下のプログラムで行った (95 °C 180sec; 98°C 5sec, 53°C 10sec, 72°C 90sec, 30cycle; 72°C, 300sec)。ポリエチレングリコール沈殿後、塩基配列を決定した。Cycle Sequence 反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、解析は ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI) を使用した。用いたプライマーを以下に示す。

matK forward primer;

5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3',

matK reverse primer;

5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC-3',

rpl16 forward primer;

5'-GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG-3',

rpl16 reverse primer;

5'-CGTACCCATATTTTCCACCACGAC-3'

2-2. macromerine, normacromerine の確認

GC-MS 用試料の調整は、試料 (20 mg) を粉砕後、1 mL メタノールで、10 分間超音波抽出を行い、Ultrafree-MC フィルター (0.45 μm, Millipore 社製) でろ過したものを用いた。GC-MS 条件は、装置: Agilent 社製 6890N GC 及び 5975 MSD, カラム: HP-1MS (30 m x 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent 社製), キャリアーガス: He, 0.7 mL/min, 注入法: スプリットレス, 注入量: 1 μL, 注入口温度: 200°C, カラム温度: 80°C (1 min hold) — 5°C/min — 190°C (5min hold), イオン化法: EI 法, 検出器温度: 280°C. Scan range:

m/z 40-550. 標準試料である (*R*)-macromerine, (*R*)-normacromerine は生薬部で単離したものを²⁾ 用いた。

C. 研究結果

1. 塩基配列解析

植物の鑑別・同定によく利用される葉緑体 DNA 上の *matK* (*maturase K*) 領域および *rpl16* intron 領域を PCR を用い増幅し (図 2), これらの配列を国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) および BOLD systems (http://www.boldsystems.org/views/idrequest_plants.php) に登録されている配列と比較した。

matK 領域において、違法ドラッグ市場に流通する 大分丸 はデータベースとの比較の結果、*Mammillaria sonorensis* (FN997579) と高い相同性 (98% (781/797)) を示し、大分丸 と相同性の高い属は *Coryphantha* 属ではなく *Mammillaria* 属であった (相同性検索上位 20 種はいずれも *Mammillaria* 属であった)。また、大分丸 の *matK* 領域には他属 (種) には見られない 9 塩基 (3 アミノ酸) のギャップが観察された。また、研究試料である *Coryphantha macromeris* は *Coryphantha ramillosa* (FN997283) と最も高い相同性を示し (99% (796/797)), 1 塩基の違いのみであった。図 3 にデータベースとの相同検索上位種との系統樹 (UPGMA 法による) を示す (カッコ内はデータベースの Acc. No.)。

rpl16 intron 領域では 大分丸 は *Ortegocactus macdougallii* 96% (921/955), *Neolloydia conoidea* 96% (926/958) と相同性を示した (200 塩基のギャップを含む)。

Coryphantha macromeris は *Coryphantha durangensis* と 99% (862/871) と高い相同性を示した。図 4 にデータベースとの相同検索上位種との系統樹 (UPGMA 法による) を示す (カッコ内はデータベースの Acc. No.)。

macromerine および normacromerine の含有を確認するために GC/MS 分析を行った結果、