

201132037A

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

法規制薬物の分析と鑑別に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

(H22-医薬-一般-016)

研究代表者 合田 幸広

平成24(2012)年3月

目 次

I. 総括研究報告書		
法規制薬物の分析と鑑別に関する研究		
合田 幸広	1
II. 分担研究報告書		
1. 法規制薬物（植物を含む）の分析と鑑別に関する研究		
合田 幸広		
大麻種子 1 粒を用いた産地特定のための 26S-18S rDNA IGS 領域の検討		
緒方 潤	13
大麻 DNA 上の THCAS 遺伝子の塩基配列の調査		
宮坂 一善	19
違法薬物の中樞神経作用の高感度検出系としての報酬系を利用した学習実験の有 用性に関する研究		
関野 祐子	27
2. 法規制薬物の分析と鑑別に関する研究		
合田 幸広・花尻 瑠理		
日本国内で押収された大麻の形態観察及び THC 含有量調査		
阿久津 守	33
日本国内で押収された錠剤型麻薬に含有される薬物の分析		
津村 ゆかり	49
電子レンジを用いた尿中大麻代謝物の迅速トリメチルシリル誘導体化最適条件の 検討		
藤井 広志	55
3. 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究		
花尻 瑠理		
ラット生体試料中合成カンナビノイド JWH-018 及び代謝物の分析について-2-		
花尻 瑠理	65
The First International Multidisciplinary Forum on New Drugs 参加報告		
花尻 瑠理	79
4. 法規制薬物の分析・鑑別に資する化合物の合成とメタボロミクス研究		
福原 潔		
¹ H-NMR を利用した薬物鑑定法の開発		
福原 潔	81

5. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の鑑別に関する研究 河野 徳昭 99
6. 法規制薬物の分析に関する研究 代田 修	
植物系薬物の分析に関する研究 代田 修 111
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 117

法規制薬物の分析と鑑別に関する研究

研究代表者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

本研究では、法規制薬物の内、麻薬・向精神薬取締法及びあへん法など関連 4 法で厳しく規制される薬物及び、今後これらの法律により規制される可能性の高い薬物を対象とし、同薬物の分析と鑑別に関する研究を行う。

分析的な面で考えると、麻薬や覚せい剤の場合、使用罪が問われるため、生体による代謝物を事前に明らかにして、これらの化合物についての的確に分析できることが重要となる。また、法規制薬物の場合、現場では様々な使用形態があるため、それぞれの使用形態に対応した分析法が重要となる。また、ケシ属植物では、法規制される植物が種により決められている一方、マジックマッシュルームの場合、麻薬成分を含む種の範囲が現段階では不明確である。さらに、大麻では、栽培品種により含有成分が大きく異なることが知られている。従って、各植物において、種や栽培品種の簡便で、厳密な鑑別法の確立が有効な規制を行うために重要な課題となっている。一般的には、植物の鑑定は開花時でないとなし。そのため、種子の段階での鑑別法ができず、種を間違えて観賞用に法規制植物であるアツミゲシ (*Papaver setigerum*) が大量に栽培された例(小貝川フラワーフェスティバル)は記憶に新しい。

本研究は、このような厳しく規制される法規制薬物(植物を含む)において、現在の分析上の隘路となっている代謝物の問題と植物鑑別の問題を解決するため行われる。本年度は、デキストロメトルファン (DEM) /レボメトルファン(LEM)投与のラット尿について NMR を利用したメタボロミクスのアプローチを実施し、スペクトルを多変量解析することにより、全ての尿を薬物と尿の採取時間の違いによって統計学的に別々の群として分類することが可能となった。また、JWH-018 投与ラット尿及び毛髪を分析し、代謝物の経時変化を実測した結果、尿からは、主に *N*-dealkyl 6-OH indole 体が検出される一方、毛髪においては、主に JWH-018, *N*-pentanoic acid 及び *N*-dealkyl 6-hydroxyindole 体が検出される事が判明した。さらに、薬物報酬系では、学習が成立したマウスについて、向精神薬 MK-801 を投与すると、行動量が増加して正答率が低下、メタンフェタミンでは、行動量が低下して正答率が低下する一方、合成カンナビノイドである WIN55212-2 では、鎮静効果により行動に時間がかかるようになるものの正答率は変わらないことが判明した。さらに、日本で押収された錠剤型麻薬に含有される薬物分析を行った。一方、植物関連では、大麻 DNA 上

の THCAS 遺伝子の塩基配列の調査を行った。さらに、大麻種子 1 粒を用いた産地特定のための 26S-18S rDNA IGS 領域の検討を実施した結果、IGS の長さ、構造に多型が生じていることが判明し、IGS 内の単純反復配列を利用した PCR 法による大麻の種内変異の分析法を確立した。また、国内押収大麻の形態観察及び THC 含有量を調査し、高 THC 含有大麻の国内流通を確認した。さらに、マイクロ波による大麻代謝物の簡易誘導体化法を検討し、尿中代謝物の微量定量を実施した。また、ケシについては、ハカマオニゲシ (PB) として収集した種子について、4' OMT 遺伝子の塩基配列を決定、*Papaver pseudo-orientale* (PPO) 特異的プライマーを用い PCR を実施、同プライマーが PB, PPO 等の近縁植物間の識別に利用可能であること明確にした。さらに、ケシ、アツミゲシ、ヒナゲシ間の識別プライマー及び PCR 条件を検討、識別特異性の向上を達成した。また、幻覚性サルビアの幻覚性分であるサルビノリン A (SalA) を迅速に分析可能なイムノクロマトストリップを構築した。さらに、カートに含有される麻薬成分であるカチノンについてハプテンを合成し、抗カチノン抗体を取得、本品を利用したカチノン検出競合的 ELISA を開発した。

分担研究者

花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長

代田 修 徳島文理大学香川薬学部準教授

福原 潔 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部室長

河野徳昭 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部研究員

A. 研究目的

研究代表者らは、従来より、法規制薬物の代謝物に関する研究を行い、直近では、麻薬化合物レボメトルファンと光学異性体の医薬品では、毛髪中の代謝物が異なることを明らかにし、注目を浴びている。また、植物の鑑別に関する研究では、大麻種子の発芽能力の迅速鑑別法を確立し、鑑定官に対し研修指導を行うなど、取締まりの現場に直接貢献する研究を行っている。このように本研究は、現在厳しく法規制されている薬物及び今後同様に法規制される可能性の高い薬物について、監視・指導麻薬対策

課、地方厚生局麻薬取締部等と連絡をとりながら現場の諸問題に対応できるように、実態に即した研究を行う点に特徴があり、日本の法規制薬物行政に直接的に貢献することを目的としている。

麻薬・向精神薬取締法等で厳しく規制される薬物は現在 250 種以上ある。一方で、この分野では法規制を逃れるため、常に新規に合成された類縁体や植物等が出回ることが続き、結果として、毎年新規な化合物が麻薬指定されることになる。他方、この様な化合物は、国民の健康被害や社会的弊害をなくす観点から、精神毒性・依存性・乱用のおそれ等の有害性が明らかになった段階で緊急に麻薬指定されるため、生体での代謝や代謝物について明確でない段階で指定される場合が多い。本研究では、このような薬物のうち、合成カンナビノイドについて、使用罪に対応するため代謝物を検討するとともに合成し、分析と鑑別方法等について検討を行う。また、ケシの様に天然物を種として法規制するには、植物や菌類の鑑別法が重要となる。

他方、植物（菌類）の場合、分類学的に形態で鑑別を行うには、経験が必要となる。従って、植物鑑定の未経験者でも、より客観性の高い鑑別が行えるように遺伝子情報を利用した鑑別法の確立が重要となる。本研究では、特に具体的な問題事例が存在した、けし属植物及び大麻について種子での鑑別法を確立すると共に、今後より厳しい法規制の可能性のあるサルビノリン A やカートの簡便な検出法の確立をはかる。さらに、マイクロ波を利用した違法薬物誘導体化条件の検討、押収大麻の形態観察及び THC 含有量調査、錠剤系麻薬の形態観察と薬物含有量調査など、取締まりの現場で直接貢献できる研究を行う。また、現実的な法規制を念頭にした、評価実験系の確立を図る。

B. 研究方法

B.1. $^1\text{H-NMR}$ を利用した薬物鑑定法の開発

尿試料は、以下のプロトコールで行われた動物実験から採取した尿を使用した。レボメトルファンおよびデキストロメトルファンをラット各 3 匹に 5 mg/kg ずつ 10 日間連続して腹腔内投与した。最終投与後、1 匹ずつ代謝ケージに入れて 0~24, 24~48, 48~72 時間の尿を採取し、分析まで -20°C で保存した。

NMR は、Varian 600 MHz NMR spectrometer に $^1\text{H-NMR}$ 専用コールドプローブを装備したものを使用し、Presaturation NOESY 法 (one dimensional $^1\text{H-NOESY}$ spectra, 298 K) により、積算回数 128 回で測定し、TSP のシグナルを -0.016 ppm としてケミカルシフトの補正を行った。

多変量解析は、以下の手順で実施した。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルについて、NMR SUITE 6.0 software (Chenomx 社製) で軽水の観測領域 (4.74-4.94 ppm) を除いた $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの 0.04-10.0

ppm を 0.04 ppm の幅でバケット積分を行い、ピークエリアリスト (Microsoft Excel format, *.xlt) を作成した。縮約した NMR データは SIMCA-P+ (Umetrix 社製) で主成分分析を行い、外れ値がないことを確認後、部分最小二乗法判別解析 (PLS-DA) を行った。PLS-DA で変動を示す軸については S プロット表示を行い、変動に寄与しているケミカルシフトを解析した。ケミカルシフトからの内因性代謝物の同定は NMR SUITE で行った。

B.2. ラット生体試料中の合成カンナビノイド及び代謝物の分析

茶褐色体毛を有する DA ラットに、JWH-018 を 5 mg/kg ずつ 10 日間連続して腹腔内投与し、尿試料は最終投与後 120 時間まで、毛髪試料は初回投与より 28 日間後に採取した。尿試料は β -glucuronidase 処理後、pH 5 の条件下において *t*-butylmethyl ether を用いて液-液抽出操作を行い、抽出液を窒素気流下で乾固後メタノールに溶解し測定試料とした。毛髪試料は洗浄後細片化し、アルカリ可溶化を行った後、尿試料と同様に処理を行い測定試料とした。LC-MS/MS 分析は、0.1% ギ酸及びアセトニトリルのグラジエント条件下で、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (2.1×100 mm, 1.7 μm) を用いて行った。

B.3. 薬物報酬系を利用した学習実験の有用性に関する研究

マウス用にタッチスクリーン認識学習装置 (Bussey-Saksida 型チェンバー) を用い視覚弁別試験を行った。マウスは、日本クレアで購入した 9 週令 C57BL/6N 雄マウスを用いた。飼育環境は室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 、明暗各 12 時間 (照明時間: 6 時~18 時) で、1 ケージ当たり 5 匹の群で飼育した。餌 (日本クレア CE-2)・水は自由摂取の条件下で購入後 1 週間

の馴致期間を経て、12-14 時間の給水制限を開始した。

まず、12 時間の飲水制限をした成熟雄マウスを用い、10%コンデンスミルクを報酬とした視覚弁別学習を行った。タッチスクリーンにランダムに映し出される画像を口あるいは前肢でタッチする事によって報酬が得られるトレーニングを1週間行ったところ、すべての個体で学習が成立することが確認できた。次いで、視覚弁別学習が成立したマウスに、向精神薬の1種である NMDA 型グルタミン酸受容体阻害薬の MK-801 (0.1 mg/kg および 0.3 mg/kg)、覚せい剤メタンフェタミン (1 mg/kg)、カンナビノイド作用薬である WIN55212-2 (1 mg/kg) を投与して、学習成立後の正答率への影響を検証した。

B. 4. 押収錠剤型麻薬に含有される薬物分析

錠剤型不正麻薬としては、昨年度と同じ 100 検体 (2009 年から 2010 年に札幌、東京、横浜、名古屋、大阪、神戸、福岡の各地方検察庁から国庫帰属品として厚生労働大臣に引き継がれたもの) を使用した。本年度は、市販錠剤及び不正麻薬錠剤に対してエフェドリン、メチロン、MDA, MDMA, MDEA を添加して回収試験を行った。分析条件は、昨年度検討したコンベンショナル HPLC のものに加え、粒子径 $1.8\mu\text{m}$ のカラムを用いる、より高分離の HPLC 条件について検討した。さらに、GC-MS により、麻薬・覚せい剤及びその他の成分の定性を行った。

B. 5. 大麻 DNA 上の THCAS 遺伝子の塩基配列の調査

関東信越厚生局麻薬取締部から研究目的で譲り受けた国庫帰属品の大麻 95 検体 (乾燥大麻 94 検体、樹脂 1 検体)、その中に混在していた大麻種子 5 検体及び (独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターより譲り受けたトチ

ギシロの種子 9 検体を実験に用いた。これら的大麻を用い、PCR 法により、tetrahydrocannabinolic acid synthase (THCAS) をコードする遺伝子を標的とする鑑定試験法及び新規の簡易試験試薬を開発するため、THCAS 遺伝子の塩基配列を詳細調査した。DNA 抽出の成否は葉緑体 DNA 上の ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcl*) 遺伝子の PCR 増幅産物の有無で判定した。

B. 6. 大麻種子 1 粒を用いた産地特定のための 26S-18S rDNA IGS 領域の検討

関東信越厚生局麻薬取締部より分与された大麻種子海外市場製品 (欧州販売品)、基盤研・薬植セ・筑波にて系統保存されているメキシコ産系統種子およびトチギシロ種子を用いた。

B. 7. 国内押収大麻の形態観察及び THC 含有量調査

当該事件の裁判が終了して札幌・仙台・東京・横浜・名古屋・大阪・神戸・広島・高松・福岡・那覇の地方検察庁から各地区麻薬取締部を経由して厚生労働大臣に引継がれた証拠品の大麻 (国庫帰属品) を調査対象とした。引継量が少なく、分析可能件数に余裕がある場合は、各地区の判断で地検支部からの引継物件も対象とした。調査期間は 2010 年 4 月から 2011 年 3 月までの引継分とした。ただし仙台地方検察庁からの引継分については 2010 年 10 月から調査を開始し、全数でなく後述する条件で選定した定量用の検体のみを対象とした。

また、鑑定嘱託された大麻の全数について重量または本数の記録及び形態観察を行った。調査期間は 2010 年 6 月から 2011 年 3 月までとした。ただし東海北陸厚生局麻薬取締部鑑定分については 2010 年 12 月から開始した。

カンナビノイド試験法は、国連薬物犯罪事務所 (UNODC) の推奨大麻試験法に準拠した。定量

は、GC-FID により行った。

B. 8. マイクロ波を利用した違法薬物誘導体化の検討

家庭用電子レンジを用いた尿中大麻代謝物 11-nor- Δ 9-テトラヒドロカンナビノールカルボキシリックアシッド(11-nor- Δ 9-THCCA)のトリメチルシリル(TMS)誘導体化反応条件の迅速・最適化を検討した。マイクロ波発生には、家庭用電子レンジ(発振周波数 2.45 GHz マイクロ波出力 2 段切り替え)を使用した。TMS 誘導化の内部標準物質としては、直鎖飽和炭化水素ヘプタコサン(C27)を使用した。TMS 誘導体化剤は「BSTFA + TMCS, 99:1 (SylonBFT)」(Sylon)を使用した。測定機器にガスクロマトグラフ質量分析装置を使用し、選択イオンモニタリングモードで定性・定量を行った。

B. 9. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の識別法

本研究で解析対象としたケシ属植物は、ケシ *Papaver somniferum* 系統(あへん法で規制)、オニゲシ *P. orientale* (P0) 系統(一般栽培が可能)、ハカマオニゲシ *P. bracteatum* (PB) 系統(麻薬原料植物)、*P. pseudo-orientale* (PP0) 系統(ハカマオニゲシとオニゲシの中間的な外部形態をもつ)である。

昨年度までに、PP0 特異的と考えられるプライマーセット、並びに、ケシ、アツミゲシそしてヒナゲシの 3 植物種を識別可能と考えられるプライマーセットをそれぞれ設計した。今年度は、これらプライマーについて、植物種識別への利用、識別確度の向上を目的として、(1) PP0 特異的と期待されるプライマーセットを用いた PB または PP0 様の形態を示す植物の植物種識別に関する検討、(2) ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシの植物種間の識別が可能なプライマーセットの再設計及び識別確度の向上に関

する検討を行った。

B. 10. 免疫化学的分析手法による Salvinorin A (Sal A) 検出法の開発

昨年度作製したサルビノリン類を認識するモノクローナル抗体(MAb)を用いて、常法に従いイムノクロマトストリップを構築した。

B. 11. 抗カチノン抗体の取得と競合的 ELISA の開発

抗カチノン(CA)抗体を得るために用いたハプテンは、カチノンから化学誘導した。免疫源は、カルボジイミド法によりハプテンと牛血清アルブミン(BSA)を結合し、CA-Suc-BSA コンジュゲートとして合成した。これを免疫原として 5 週齢、オスの BALB/c マウス腹腔に 4 度感作した。感作マウスから採血し、血中抗体価の測定を行い、その結果、十分な血中抗体価が得られた段階で、脾臓を摘出し、脾細胞を調製後、ミエローマ細胞との細胞融合を行った。ELISA により精査することで、抗 CA MAb 産生ハイブリドーマを見出し、その後クローニングを行なった。クローニングの完了したハイブリドーマを無血清培地中で培養することで、抗 CA MAb を含んだ培養上清を得た。本上清を Protein G セファロースカラムに付し、抗 CA MAb を精製した。

<倫理面への配慮> 動物実験は、実施研究者の所属する組織の動物実験委員会等による倫理審査の承認を経て、動物福祉・愛護の精神に基づいて、適切な実験計画及び適正な実験手技のもとで実施した。

C. 結果と考察

C. 1. ¹H-NMR を利用した薬物鑑定法の開発

不正薬物の摂取証明への NMR の有用性を検討することを目的として、麻薬として規制されているレボメトルファンと一般用医薬品である

光学異性体のデキストロメトルファンを投与した尿の ¹H-NMR を測定して統計解析を行い、両薬物に特徴的な代謝変動を解析した。レボメトルファンとデキストロメトルファンを投与した尿は非常に類似した ¹H-NMR スペクトルを示すが、スペクトルを多変量解析することにより、全ての尿を薬物と尿の採取時間の違いによって統計学的に別々の群として分類することができた。この結果は、両薬物が内因性代謝物に与える影響は異なること、また、その影響は時間経過とともに変化し、長時間継続していることを示している。従って、尿の ¹H-NMR スペクトルについて多変量解析を行い、統計学上の群に分布しているかを特定することによって、摂取被疑者の薬物依存状態を予測できる可能性が示された。

レボメトルファンとデキストロメトルファンによる直接影響と考えられる、投与後 24 時間以内に変動する内因性代謝物として、エネルギー代謝に関するクエン酸、2-オキソグルタル酸、クレアチニンおよびコリンの分解産物であるジメチルグリシンの尿中濃度がレボメトルファンで高く、デキストロメトルファンで低くなることがわかった。また、投与後 48~72 時間に採取した尿では馬尿酸、トリゴネリンの濃度がレボメトルファンで大きく低下していることがわかった。この結果は馬尿酸とトリゴネリンがレボメトルファンとデキルストロメトルファンの摂取識別に有効なバイオマーカーとして利用可能なことを示している。また、脂質は 48 時間まで殆ど変化がないが、48~72hr 尿で大きく増加した。この結果は両化合物の反復投与によって低下していた脂質の生合成が投与終了して 48 時間経過後に回復が始まることを示唆している。従って、48~72hr の脂質濃度に両薬物で大きな差が見られたことは、脂質

も摂取識別に有効なバイオマーカーとして利用可能なことを示唆している。以上、長時間経過しても変動がみられる内因性代謝物は薬物依存性を診断する上で重要なバイオマーカーになると考えられる。

C.2. ラット生体試料中の合成カンナビノイド及び代謝物の分析

昨年度我々は、指定薬物 JWH-018 について、JWH-018 及び 11 種類の推定代謝物

(alkylcarboxy, terminal alkylhydroxy, indolehydroxy 及び *N*-dealkylated indolehydroxy 代謝物) を分析対象とし、各化合物をラット尿、毛髪試料に添加して、抽出法及び UPLC-MS/MS を用いた分離分析法を検討した。今年度は、実際に本化合物を投与したラット尿及び毛髪試料を用いて、各生体試料中に排泄される未変化体及び代謝物量について検討を行った。

検討の結果、薬物投与ラット尿中では、主に *N*-dealkyl 6-OH indole 体が検出された。その他尿中からは *N*-dealkyl 7-OH indole, *N*-pentanoic acid, 6-OH indole 及び *N*-(5-hydroxypentyl) 体が検出されたが、JWH-018 は 0-24 時間尿において痕跡量検出されたのみであった。一方、毛髪においては、JWH-018 (1.49-2.77 ng/mg), *N*-pentanoic acid (5.32-9.63 ng/mg) 及び *N*-dealkyl 6-hydroxyindole 体 (0.91-1.63 ng/mg) が主に検出された。今回の研究では、*N*-alkyl 側鎖及び indole 環上の一水酸化体及びカルボン酸化体しか分析対象にはしておらず、また、ヒトとラットでは薬物動態に差がある。しかし、本化合物を摂取したヒト尿中からも *N*-pentanoic acid 体は主に検出されることが報告されていることから、ヒトにおいても毛髪中の JWH-018 及び *N*-pentanoic acid 体は、JWH-018 使用の

有用なマーカーになる可能性が示唆された。

C. 3. 薬物報酬系を利用した学習実験の有用性に関する研究

MK-801 (0.1 mg/kg) では、変化が見られなかった。MK-801 (0.3 mg/kg) では、行動量が増加して正答率が低下した。従って、MK-801 は高濃度で典型的な hyperlocomotion, stereotypies を誘発することが判明した。メタンフェタミンでは、行動量が低下して正答率が低下した。WIN55212-2 では鎮静効果により行動に時間がかかるようになるものの正答率は変わらなかった。

各薬物投与の次の試行では何も投与せず、あるいは生理食塩水を投与して行った結果、動物の正答率、30 トライアル完了時間はもとのレベルに回復しており、各薬物の単回投与の影響が一過性である事が分かった。

本研究で用いたタッチスクリーンを用いた視覚刺激の弁別学習装置は、刺激や報酬がコンピュータにあらかじめプログラムされたスケジュールによって全自動で提示され、かつスクリーンタッチやトレイへの nose-poking をはじめとする動物の行動も時系列に従って記録してくれるものである。そのプログラムに従えば特に経験と熟練を要せずにマウスを効率良く視覚弁別の学習を獲得させる事ができる。いったん学習を獲得した動物に対して中枢神経作用薬を投与することで、その正答率への効果のみならず、それぞれの薬物に応じて特徴のある行動様式の変化を観察できることが分かった。薬物の1回投与で行動変化が観察されるが、翌日には行動や正答率が回復しており、同一個体を利用して、濃度の異なる薬物投与や、薬物の種類を変えて効果を確認出来ることが判明した。あらかじめ学習を成立させたマウスを用意しておくことで、迅速に薬物の中枢神経作用を

検出することが可能である。また、トレーニング前に薬物を投与することで、慣れの成立への影響を調べることができる。もしも慣れの成立に要する日数が、向精神薬、麻薬、覚せい剤などにより影響されれば、必ずしも視覚弁別学習の成立を待つ必要はなく、中枢神経作用をさらに迅速かつ簡便に検証できる試験法となる。

C. 4. 押収錠剤型麻薬に含有される薬物分析

錠剤に対する薬物の添加回収実験を行う中で、薬物標準品として用いた BZP (水溶液) の HPLC におけるピーク高さが経時的に減少することが判明した。本研究において、BZP 以外の薬物は塩酸塩または硫酸塩 (いずれも結晶) を標準品として使用したが、BZP は遊離塩基 (液体) を使用した。このために BZP だけ異なる挙動を示した可能性がある。各種溶液中での標準品の安定性は、司法鑑定の上からも重要であることから、今後 BZP の塩酸塩を入手して検討する予定である。

添加回収結果は、昨年度検討した4種類の薬物と同様、今年度の5種類の薬物でも、緩衝液 (pH3) を用いた場合に、水及び緩衝液 (pH7) を用いた場合より高いことが判明した。

粒子径 1.8 μm のカラムを用いる HPLC においても、収集した錠剤に含まれる薬物 13 化合物が良好に分離された。

GC-MS 分析により、麻薬及び覚せい剤成分を確認した。引継時に示された成分以外のピークが検出された場合、錠剤中 MDMA として 1% 以上に相当する大きさのものについてマススペクトルを検討したが、新規乱用薬物成分と考えられるものはなかった。100 検体中 24 検体の錠剤にカフェインが含まれており、また、マススペクトルから脂肪酸またはそのエステルやアミド、滑剤と推定されるものが検出された。

C. 5. 大麻 DNA 上の THCA 遺伝子の塩基配列の

調査

rbcl 遺伝子の増幅産物が確認された大麻から抽出した DNA については 92 検体中 75 検体で、大麻種子から抽出した DNA については全て増幅産物が確認された。トチギシロの種子から抽出した DNA については 9 検体中 1 検体でのみ増幅産物が確認された。

THCAS 遺伝子の増幅産物が確認された大麻 75 検体中 20 検体及びトチギシロの種子 1 検体については全長にわたってシーケンス波形が乱れ、複数の遺伝子の混在を示唆する結果となり、解析不能であった。残る大麻 55 検体及び大麻種子 5 検体については、一部検体でプライマーのアニーリング部位の下流領域でシーケンス波形が乱れて解析が困難なものがあったが、111bp から 1500bp までの 1390bp は解析可能であった。解析の結果、大麻 55 検体及び大麻種子 5 検体の塩基配列は既報³⁾のアサの“drug type”の遺伝子 (Acc. No. AB212834) 又は“fiber type”の遺伝子 (Acc. No. AB212836) あるいはそれらのハイブリッドと高い相同性を示したが、互いに 100%の相同性を示すものは存在しなかった。

Acc. No. AB057805 中の *THCAS* をコードしている部位 1635bp と上記 60 検体の塩基配列とを比較した結果、998 箇所では置換等の変異が認められた (98/1390, 7%)。

今回の調査の結果、現在報告されているプライマーは一部の大麻に対応しないことが判明したため、*THCAS* 遺伝子を標的とする DNA 解析の手法を鑑定に導入するには、新たなプライマーを追加設定する必要があることが明らかとなった。他方、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) プライマーの設定に適した相同性が高い領域が判明したので、LAMP 試薬を用いた新規の簡易試験試薬の開発が可

能であると考えられた。

塩基配列を解析したもの (大麻 55 検体及び大麻種子 5 検体) と Acc. No. AB057805 の配列を比較したところ、1390bp の内 98 箇所では変異が確認され、“drug type”と“fiber type”の配列に分かれる部位、これらの“hetero type” (各 type と hetero type のキメラも含まれるものと考えられる) となる部位、一塩基置換のある部位が確認された。解析した領域の 7% で変異が確認されたことから、*THCAS* 遺伝子は変異頻度の高い遺伝子であることが判明した。この変異頻度の高さを考慮すると、上述のプライマーが機能しなかった検体についてはアニーリング部位に何らかの変異があることが示唆される。

C. 6. 大麻種子 1 粒を用いた産地特定のための 26S-18S rDNA IGS 領域の検討

すべての大麻種子 1 粒から DNA の抽出が可能であり、PCR による IGS 領域の増幅も可能であった。IGS 領域の PCR 産物はすべて 3,500~4,000bp 付近にバンドが確認され、トチギシロ IGS は全長 3,608bp であった。市場品 1 製品、トチギシロ、メキシコ産系統種子由来の IGS 領域を比較した結果、26S 側から 1.5kbp 付近に市場品に対してトチギシロでは 132bp の欠失、メキシコでは 198bp の欠失が見られた。また、66bp の反復配列の回数は、市場品で 5 回、トチギシロ 3 回、メキシコ産 2 回であった。上記結果に基づき、欠失領域を挟むようにプライマーを設計し、各種子より得られた DNA を用い PCR によるバンドの確認を行った。その結果、24 欧州市場品 (種子) 中、2 製品でトチギシロと同一の約 600bp の大きさのバンド (塩基配列 595bp) が確認された。また、メキシコ産系統種子と同一のバンドは製品中に確認されなかった。今回実験を行った市場品は、欧州で栽培

されている大麻であるが、本結果は、これらの大麻が、メキシコ産のものとは明らかに異なることを示している。また、これらの大麻は、交配の結果得られた高濃度の THC を蓄積する栽培種であるものと推定されるため、バンドが画一化したものと考え、合理的に説明可能となる。また、ヨーロッパの気候や室内環境下での栽培を考慮して、メキシコ産などの栽培種は、交配親として利用されていないとも考えられた。

今回、PCR によるバンド比較に用いた領域は 66bp の反復配列であり、一般にミニサテライトと呼ばれる領域である。今後は、マイクロサテライト領域をさらに詳細に検討することで、より明確に PCR による判定が可能になると考えられる。

C.7. 国内押収大麻の形態観察及び THC 含有量調査

2010 年 4 月から 2011 年 3 月に全国麻薬取締部を経由して地方検察庁から厚生労働大臣に引き継がれた大麻 9072 検体中、6376 検体 (286.6kg) が乾燥大麻であった。そのうち検体数で 65.2%、重量で 73.0%が、いわゆるシンセミアの可能性のある種のない花穂であった。1g 以上の乾燥大麻 1115 検体を分析した結果、THC の酸化生成物であるカンナビノール (CBN) の含有量が高いものが多く、保存中に THC が減少していると考えられた。そこで、比較的新鮮と考えられる CBN/THC が 0.1 以下のものについて集計した結果、種のない花穂 (335 検体) の THC 含有量平均値は 11.2%、最大値は 22.6%であった。1970 年に厚生省が実施した調査結果によれば、国産の大麻の THC 最高含有量は栃木県産のもので 4%、次いで北海道産の野生のもので 3.4%、最低は九州産のもので 0.1%であり、平均すれば我が国の大麻草に含有される THC

は 1%程度とされている。今回の報告は我が国における不正大麻に関する初の実態調査であるが、今回得られた THC 含有量は、諸外国で「高まった」とされる THC 含有量に匹敵するものであり、高 THC 含有大麻の流通実態がわが国にもあることが推定された。

C.8. マイクロ波を利用した違法薬物誘導体化の検討

昨年度の研究結果に基づき直鎖飽和炭化水素ヘプタコサン (C27) を内部標準物質として、尿中 11-nor- Δ 9-THCCA のマイクロ波照射による TMS 誘導体化最適条件を検討したところ、用いた電子レンジの設定範囲で 750 ワット (W) 10 秒の照射が最も TMS 誘導体化生成率が高いことが判明した。この迅速誘導体化条件で尿中 11-nor- Δ 9-THCCA の定量を行うため、重水素標識の内部標準物質 (11-nor- Δ 9-THCCA-d9) を用い検量線を作成したところ、0.5~50ng/ml の範囲で相関係数の二乗が 0.9996 と良好な直線性を示し、定量下限値は 0.5ng/ml であった。濃度 0.5、10 及び 50ng/ml での変動係数はそれぞれ 7.9、1.3 及び 3.2% (n=5) で、日間変動 (濃度 10ng/ml で測定) は 5.7% (n=5) であった。電子レンジとヒートブロック加熱 (80°C 15 分) での TMS 誘導体化を比較すると、電子レンジを使用した場合、ヒートブロックと比べ生成率は 95.2%で、殆ど生成率に変化はなかった。よって、電子レンジにより誘導体化時間が 1/90 に短縮できるメリットがあることが明らかとなった。

C.9. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の識別法

医薬基盤研薬用植物資源研究センターの種子交換事業により海外の植物園等から PB として種子を導入したものについて、PP0 と特異的に反応する可能性の高いプライマーセットを

適用し、その反応性を検討した。その結果、PBの特徴を示す系統については、PCR産物は得られず、PPO様の特徴を示す系統がPCR産物を与えた。このPCRの結果は、形態の差異とよく合致しており、PCRで陰性となった系統のみが、真のPBであり、PCR陽性の系統はPPOまたは、PPOとPB等の交雑種である可能性が高いことが判明した。また、以上の結果は、ケシ属植物の植物種の識別に本プライマーが有用であることを示すものであると考えられる。なお、本プライマーがすべてのPPOと反応するものか、例外が存在する可能性は否定できない。今後、種子交換で収集したケシ属植物を中心に、さらに試料の範囲を広げ、交叉反応性について検討を進める予定である。

ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシの3植物種の識別が可能な各プライマーセットの交叉反応性確認では、ヒナゲシ特異的プライマーセットで交叉反応性の確認を行った際に、目的の増幅産物のほかに、プライマーダイマーまたは非特異的増幅産物と考えられるバンドが現れた。そこで、プライマーの濃度について検討したところ、プライマーの濃度を1/4濃度に変更することにより、改善されることが判明した。また、アツミゲシ特異的プライマーがヒナゲシ(シャーレーポピー)を鋳型とした場合、薄いバンドではあるが増幅産物を与えることが判明した。そこで、あらためて、識別対象領域として用いるヒナゲシ(シャーレーポピー)の4' OMTgの塩基配列を精査したところ、本プライマーセットのセンスプライマーがヒナゲシの配列と一致することが判明した。そこで、センスプライマーを再設計したところ、交叉反応による増幅産物を与えることはなくなった。以上のように、プライマーの濃度の変更及び再設計により、ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシの遺伝子識別の精

度の向上が達成された。本研究で設計したケシ、アツミゲシ及びヒナゲシ間の識別用プライマーの特異性は高く、これらを組み合わせることにより、3植物種間のPCR法による簡便な識別が可能となった。

C. 10. 免疫化学的分析手法による Salvinorin A (Sal A) 検出法の開発

作製したイムノクロマトストリップを用いて50 μ g/mlのSalA溶液を分析した。その結果、ターゲットゾーンのスポットの消失が確認でき、本法を用いることでSal Aを短時間(分析時間10分)で分析できることを確認した。続いて、各種シソ科植物メタノールエキスを分析した結果、*Salvia divinorum*のみが陽性となる結果を得た。本法を用いることで簡便に幻覚性サルビアを鑑別できることを明らかにした。

C. 11. 抗カチノン抗体の取得と競合的 ELISA の開発

作製したCA-Suc-BSAコンジュゲートをマウスに4度免疫感作した段階で血中抗体化を測定した結果、十分な血中抗体価を得ることができた。続いて、常法により細胞融合を実施し、融合後のハイブリドーマの選抜を行うことで、最終的にCA-Suc-BSAを認識するMAbを産生するハイブリドーマ1種を樹立した。続いて、樹立したハイブリドーマを大量培養の後、培地中に分泌されたMAbの精製を行った。精製した抗CA MAbのアイソタイプはIgGタイプの抗体で、サブタイプは2a、軽鎖は κ 鎖であった。

抗CA MAbを活用した競合的ELISAを確立するために、まず最適一次抗体濃度の検討を行った。3種の固相化抗原をイムノプレートに固相化した後、ブロッキングを行い、続いて種々の濃度に調製した抗CA MAbをプレートに分注

した。二次抗体反応，基質溶液の添加の後，得られた吸光度を測定したところ，一次抗体の濃度に依存して吸光度の上昇が認められ，十分な発色が得られた条件を，競合的 ELISA に用いる最適一次抗体濃度と決定した。次に，先に決定した最適濃度の一次抗体を用いて間接競合法による CA の検出を試みた。その結果，CA を直接キャリアータンパクに結合した固相化抗原を用いた場合に，CA を検出可能な最も感度の高い競合的 ELISA の開発に成功した。

D. 結論

本研究は，厚生労働省の乱用薬物行政と乱用薬物取締りに直接貢献することを目的に遂行されている。麻薬指定される化合物は，本研究で事前に分析法が確立されることで，指定後の迅速な取締りが行われることになる。また，代謝物の合成と生体試料からの分析が遂行されることで，使用罪に対し始めて対応することが可能となる。さらに，今後対応が必要とされる植物系乱用薬物について，本研究で事前にその規制の範囲が検討され，分析，鑑定法が確立されることで，適切な規制を行うことが出来る。また，大麻や麻薬含有植物では，栽培事犯が増加しているが，本研究の結果，簡便正確な鑑定法が確立することで，迅速な取締りが行われることになり，国民の危機リスクを低減させることになる。

特に，本年度の研究では，デキストロメトルファンとその光学異性体レボメトルファン（麻薬）の直接代謝物及び，内因性代謝物の尿内変動を NMR で直接観測し，多変量解析することで，両者が識別可能であるばかりでなく，その依存度についても推定できる可能性が示唆された。また，大麻種子 1 粒により，その大麻の産地を予測できる方法が示された。さらに，本研究で

行った不正大麻に関する実態調査は，日本初のものであり，日本でも，THC 高含有大麻が流通していることを示した。ケシについても，近縁な植物種と考えられ，形態による識別が難しいケシ属植物，*Papaver pseudo-orientale* (PPO) について，一般栽培が可能なオニゲシ (PO)，法規制植物であるハカマオニゲシ (PB) と，PCR により容易に区別できることが示された。また，同様ケシ，アツミゲシ，ヒナゲシ間においても識別が可能なプライマーが設計され，形態や含有成分からの識別に依存していたケシ属植物の識別が，遺伝子情報を用いることにより，より客観的かつ迅速，簡便に可能となることが明らかになった。従って，今後，PPO について，現実的に本種を規制していく可能性を考えることが出来るようになったものと言える。さらに，*Salvia divinorum* やカートといった乱用の可能性のある植物体の迅速確認法が確立されつつある等，本研究は，今後の乱用薬物取り締まりに直接的に貢献できるものと言える。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表等

論文発表等

- 1) Tsumura, Y., Aoki, R., Tokieda, Y., Akutsu, M., Kawase, Y., Kataoka, T., Takagi, T., Mizuno, T., Fukada, M., Fujii, H., Kurahashi, K., "A survey of the potency of Japanese illicit cannabis in fiscal year 2010", *Forensic Sci. Int.*, on line available. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.04.005
- 2) Madan Kumar Paudel, Osamu Shirota, Hiroyuki Tanaka, Satoshi Morimoto, Setsuko Sekita, "Development of an immunochemical differentiation method for *Salvia divinorum* using

- anti-salvinorin A monoclonal antibody,” *Analytica Chimica Acta*, submitted.
- 3) Sogawa, C., Sogawa, N., Ohyama, K., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Sora, I., Kitayama, S., “Methylone and Monoamine Transporters: Correlation with Toxicity.” *Current Neuropharmacology* **9**, 58-62 (2011).
 - 4) Shoda, T., Fukuhara, K., Goda, Y., Okuda, H., “Enzyme-assisted synthesis of the glucuronide conjugate of psilocin, a hallucinogenic component of magic mushroom.” *Drug Testing and Analysis* **3**, 594-596 (2011).
 - 5) Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Miyajima, A., Sunouchi, M., Goda, Y., “Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LCMS/MS.” *Analytical & Bioanalytical Chemistry* **400**, 165-174 (2011).
 - 6) Kawamura, M., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., “Simple and rapid screening for methamphetamine, MDMA and their metabolites in urine using DART (Direct Analysis in Real Time)-TOFMS.” *Yakugaku Zasshi* **131**, 827-833 (2011).
- 3) Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Shoda, T., Fukuhara, K., Okuda, H., Goda, Y. “Determination of a synthetic cannabinoid, JWH-018, and its metabolites in rat urine and hair samples using UPLC-MS/MS” 2011 Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) & The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), Sep. 2011, San Francisco, USA.
 - 4) Madan Kumar Paudel, 田中宏幸, 森元 聡, 代田 修, 関田節子, Development of immunoassays using anti-salvinorin A monoclonal antibody, 日本生薬学会第58回年会, 2011年9月, 東京.
 - 5) 藤井広志, 緒方 亮, 電子レンジを用いた尿中大麻代謝物の迅速トリメチルシリル誘導体化最適条件の検討, 日本薬学会第132年会, 2012年3月, 札幌.
 - 6) 内山奈穂子, 大久保敬, 花尻 (木倉) 瑠理, 福原 潔, 福住俊一, 合田幸広, N-OH-MDMA のアルカリ溶液中における分解反応機構について, 日本薬学会第132年会, 2012年3月, 札幌.
 - 7) 緒方 潤, 阿久津守, 花尻 (木倉) 瑠理, 合田幸広, 大麻における 26S-18S nrDNA IGS 領域による系統解析, 日本薬学会第132年会, 2012年3月, 札幌.

学会発表等

- 1) 阿久津 守, 青木力也, 時枝良夫, 川瀬泰治, 片岡 正, 高木敏之, 津村ゆかり, 水野智海, 深田真功, 藤井広志, 倉橋利実, 日本国内で押収された大麻の特徴, 日本法中毒学会第30年会, 2011年6月, 長崎.
- 2) Takagi, T., Aoki, R., Tokieda, Y., Akutsu, M., Kawase, Y., Kataoka, T., Tsumura, Y., Mizuno, T., Fukada, M., Fujii, H., Kurahashi, K., “Potency of illicit cannabis in Japan” 2011 Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) & The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), Sep. 2011, San Francisco, USA.

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)
分担研究報告書

分担研究課題 法規制薬物(植物を含む)の分析と鑑別に関する研究

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長
研究協力者 緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

大麻種子1粒を用いた産地特定のための26S-18S rDNA IGS領域の検討

研究要旨 アサ科アサ属の大麻 *Cannabis sativa* L. は世界中に多様な変異系統の存在が認められている。このような種内変異を DNA 塩基配列情報を用い明かにすることは、摘発大麻の由来を解明する上で重要と考えられる。本研究では、品種間解析に利用される rDNA 上の遺伝子間スペーサー領域に焦点をあて解析を行った。大麻の IGS 領域は全長約 4kb で、大麻種内間での反復配列の回数、位置に違いがあり、そのため IGS の長さ、構造に多型が生じていることが明らかとなった。そこで、IGS 内の単純反復配列を利用した PCR 法による大麻の種内変異の分析法の1つを確立した。今後は、マイクロサテライト等の解析を行い、より精度の高い解析法の確立が必要である。

研究協力者
阿久津 守 関東信越厚生局麻薬取締部
鑑定課 課長

A. 研究目的

アサ科アサ属アサ(以下、大麻) (*Cannabis sativa* L.)、大麻は大麻取締法において「大麻草およびその製品」と規定され、大麻取扱者(大麻栽培者および大麻研究者)以外の所持、栽培等は法律によって規制されている。また、発芽能力を有する大麻種子を輸入することも関税法によって規制されているが、不正に日本国内に持ち込まれ、栽培し検挙される事犯が増えている¹⁾。また、近年、大麻の主要幻覚性成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノールを高濃度で含有

する大麻栽培種を交配する品種改良が行われているとも言われている。これら不正に国内に流通する大麻種子の来歴(産地、栽培(品)種)の特定が可能になることは、不正輸入品か否か等、新たな規制方法の確立につながる。そこで、大麻種子1粒からのDNAを用いた鑑別法の確立を目的として、違法に輸入された大麻種子のDNA塩基配列の調査を行っている。昨年度までに、一般的なDNA鑑別法に数多く利用される葉緑体DNA領域を含む4領域(*trnH-psbA*, *matK*, *trnL-trnF*, ITS)を検討した。それぞれの領域において1塩基から数塩基程度の配列に違いが見られたが、それぞれの配列領域で2つの型に分類されるのみであった。そこで、これまでの領域より進化速度が速く、変異に富むことが知られ

ている 26S-18S rDNA のスペーサー領域 (IGS; Intergenic pacer)^{2,3)} (図 1) を調査し, PCR による簡便で明確な鑑定法の確立を試みた。

B. 研究方法

1. 試料

関東信越厚生局麻薬取締部より分与された大麻種子海外市場製品 (製品: No.1~24), 基盤研・薬植セ・筑波にて系統保存されているメキシコ産系統種子 (Mexico (X)) およびトチギシロ (Tochigi-shiro (T)) 種子を用いた。

2. 実験方法

各種子 1 粒を液体窒素で凍結させた後, MM-300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した各試料より DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を取扱説明書通り用いて DNA を抽出し, 回収 DNA 溶液各 50 μ L 中の 1 μ L を PCR 反応に用いた。プライマー (26S-IGS (forward) primer:

5'-GGATTGTTACCCACCAATAGGG AACGTGAGCTG-3', 18S-IGS (reverse) primer:

5'-GAGACAAGCATATGACTACTGGC AGGATCAACCAG-3')^{2,3)}を用い, 反応溶液として, 酵素には PrimeSTAR GXL DNA polymerase (Takara) 0.4 μ L, PCR 反応試薬にはプライマー各 0.5 μ L (10 μ M), DNA 溶液 1 μ L とし, 全量 20 μ L で以下の 2step PCR プログラムで反応を行った (95°C 3min; 98°C 10sec, 68°C 4min, 30cycles)。PEG 沈殿後, ダイレクトシーケンシングおよびプライマーウォーキング法により PCR 産物の全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。

IGS 領域を用いた PCR による系統判別法として, 大麻種子 1 粒より得られた DNA 溶液を用いプライマー CS-IGS-F1 primer (5'-AGAGTGTGTGCACATTGGACTAAGAGTGGG-3') および CS-IGS-R1 primer (5'-ACTTGGTGGATTTCCACGAGTGC GCAC-3') を用い, 反応溶液として, 酵素には EX Taq (Takara) 0.1 μ L, PCR 反応試薬にはプライマー各 0.5 μ L (10 μ M), DNA 溶液 1 μ L とし, 全量 20 μ L で以下の 2step PCR プログラムで反応を行った (95°C 3min; 98°C 10sec, 68°C 1min, 30cycles)。

C. 研究結果

すべての大麻種子 1 粒から DNA の抽出が可能であり, PCR による IGS 領域の増幅も可能であった。

IGS 領域の塩基配列解析

PCR を行った結果, 3,500~4,000bp 付近にバンドが確認された(図 2)。トチギシロ IGS は全長 3,608bp であった。市場品 1 製品(No.1), トチギシロ, メキシコ産系統種子由来の IGS 領域を比較した結果, 26S 側から 1.5kbp 付近に市場品に対してトチギシロでは 132bp の欠失, メキシコでは 198bp の欠失が見られた (66bp の反復配列の回数; 市場品 (No.1) 5 回, トチギシロ 3 回, メキシコ産 2 回) (図 3)。

PCR を用いた系統判別法

上記結果より、欠失領域を挟むようにプライマーを設計し、各種子より得られたDNAを用いPCRによるバンドの確認を行った(図4)。その結果、24市場品(種子)中、2製品(No. 4, 13)(種子)でトチギシロと同一の約600bpの大きさのバンド(塩基配列595bp)が確認された。また、メキシコ産系統種子(X)と同一のバンドは製品中に確認されなかった(塩基配列529bp)。

D. 考察

DNA塩基配列を基にした産地特定のための大麻種子のDNA鑑別を行った。

今回検討したIGS領域は、一般的な植物のDNA鑑定領域であるITS(ITS1-5.8S-ITS2)領域(植物で約650~700bp)に比べ圧倒的に長く(植物で一般的に3,000bp以上)、進化速度が速く、変異に富むということから品種間(種内変異)差を見ることに利用されている³⁻⁵⁾。一方で、同一IGS領域内にも複数の重複配列が散見され、トチギシロIGS中においても複数の重複配列が観察され、50bpに配列を区切って比較しても7か所で95%以上の相同性を有する重複配列が観察された(全体の約20%)。これらの結果はシーケンスをする際のプライマー設計を困難にさせている。一方で、縦列(単純)反復配列(タンデムリピート)⁵⁾と呼ばれる同じ配列が同じ向きに隣り合って存在する配列も確認された。今回、PCRによるバンド比較に用いた領域は66bpの反復配列であり、一般にミニサテライトと呼ばれる領域を用いた(図3)。

今回用いた市場大麻種子は関東信越

厚生局麻薬取締部の収蔵品であり、製品(種子)の包装から欧州で多く販売されている製品であった。今回のPCRの結果を比較したところ、トチギシロと同一のバンドは2種子製品のみ確認されたのみで、22製品が同一か若干の差であった。さらに、メキシコ産と同一のバンドがまったく確認されなかった(図4)。これらの結果は、欧州で栽培されている大麻が、アジア、ヨーロッパの流れを組む大麻であること、高濃度のTHCを蓄積する栽培種に交配が集中していることなどが考えられ、そのことがバンドの画一化につながったのではないかと考えられる。また、ヨーロッパの気候や室内環境下での栽培を目的とするためにメキシコ産などの栽培種は交配親として利用されていないとも考えられた。

今後は、マイクロサテライト領域をさらに詳細に検討することで、より明確にPCRによる判定が可能になると考えられる。

E. 参考文献

- 1) 警察庁組織犯罪対策部薬物銃器対策課, 平成22年中の薬物・銃器情勢, <http://www.npa.go.jp/sosikihanzai/yakubutuhyuuki/yakujyuu/yakujyuu1/h22yakujyuu.pdf>
- 2) Joongku, L., Bruce, G. B., Gottlieb, L. D. Phylogeny of *Stephanomeria* and related genera (Compositae-Lactuceae) based on analysis of 18S-26S nuclear rDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany* **89**, 160-168 (2002)

- 3) Baldwin, B. G. and Markos, S. Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: Congruence of ETS and ITS trees of *Calycandenia* (Compositae). *Mol., Phyl., Evol.* **10**, 449-463 (1998)
- 4) Murakami, A. Structure differences in the intergenic spacer of 18S-26S rDNA and Molecular phylogeny using partial external transcribed spacer sequence in Hop, *Humulus lupulus*. *Breeding Science* **51**, 163-170 (2001)
- 5) Linder, C., R., Goertzen, L., R., Heuvel, B., V., Francisco-Ortega, J., Jansen, R., K. The complete external transcribed spacer of 18S-26S rDNA: amplification and phylogenetic utility at low taxonomic levels in asteraceae and closely allied families. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **14**, 285-303 (2000)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし.

F. 健康危険情報
なし.

G. 研究発表
論文発表
なし.

学会発表
緒方 潤, 阿久津 守, 花尻 (木倉) 瑠理, 合田幸広, 大麻における 26S-18S nrDNA IGS 領域による系統解析, 日本薬学会第 132 年会 (北海道 2012 年 3 月発表予定)

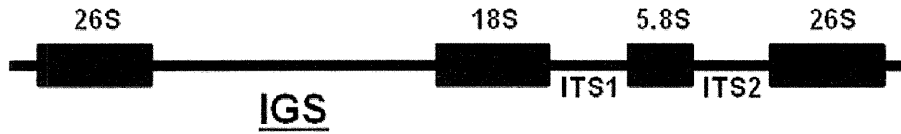


図 1. rDNA 上の Intergenic spacer (IGS)

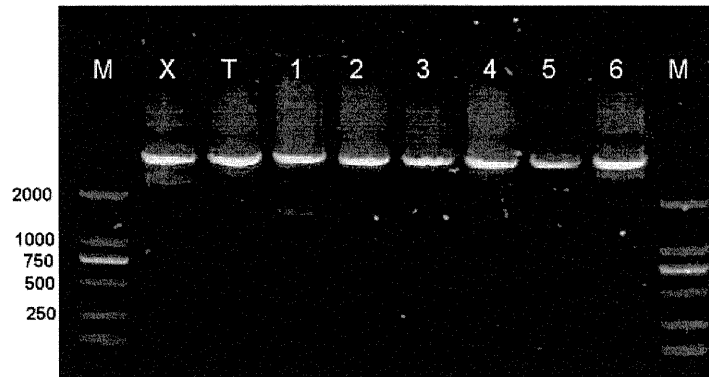


図 2. PCR による IGS 領域の確認

M; マーカー, X; メキシコ産系統種子, T; トチギシロ種
1-6; 海外市場製品 (大麻種子) 0.7% agarose gel

```

No.1 : TAACAGAGGCCCTTGTTCCTCGGTGCACTAAGAGTGT
Tochigi: TAACAGAGGCCCTTGTTCCTCGGTGCACTAAGAGTGT
Mexico : TAAGAGAGGCCCTTGTTCCTCGGTGCACTAAGAGTGG

No.1 : GTGCACAGTGCAC
Tochigi: GTGCACAGTGCACCCCTCAAGTGAGGATAAAGAGAGGCCCTT
Mexico : GTGCACAGTGCAC-----

No.1 : 
Tochigi: GTTGTGCCTTGGTGCCTAAGAGTGGGTGCACAGTGCAC-
Mexico : -----

No.1 : CTCAAGTGAGGATAAAGAGAGGCCCTTGTTCCTCGGTG
Tochigi: -----
Mexico : -----

No.1 : CACTAAGAGTGGGTGCACAGTGCAC
Tochigi: -----
Mexico : -----

No.1 : 
Tochigi: -----
Mexico : -----

No.1 : AAGCAACGCCCGGGCAAAACTTTGAATTT
Tochigi: -----AAGCAACGCCCGGGCAAAACTTTGAATTT
Mexico : -----AAGCAACGCCCGGGCAAAACTTTGAATTT

No.1 : ATCCATGAGATTTTGCACAGTGCCTTAGACACATTAAAAA
Tochigi: ATCCATGAGATTTTGCACAGTGCCTTAGACACATTAAAAA -132bp
Mexico : ATCCATGAGATTTTGCACAGTGCCTTAGACACATTAAAAA -198bp

```

図 3. 大麻 IGS 上の 66bp の単純反復配列