

B. 研究方法

4'OMT遺伝子ゲノムDNA配列によるケシ属植物種判別

4'OMTは、モルヒネ、パパベリン、サンギナリンといった、レチクリンを生合成中間体とする経路によって生合成される、ベンジルイソキノリンアルカロイドを生産するオウレン属やケシ属植物に特徴的な二次代謝酵素のひとつである(図1)。本研究において植物種判別のために解析の対象として考えられるケシ属植物は、その生産する化合物から、4'OMTを共通に発現していると考えられ、その遺伝子構造の多型による植物種の判別が可能と予想された。

また、これまでの知見から、ケシ *Papaver somniferum* L. のゲノムDNA上の4'OMTのORFにはイントロンが1ヶ所のみ存在することが明らかになっているが、高等植物の二次代謝に関わる酵素遺伝子においては、そのゲノム構造(エキソンに挿入されるイントロンの位置)は植物種を越えてよく保存されている傾向があることが知られており、4'OMTのゲノム構造もケシ属植物間で保存されていると考えられる。本研究においては、タンパク質をコードしないため、とくに種間変異に富むと期待されるイントロン配列を含む4'OMTゲノムDNA部分配列(以下、4'OMTg)をPCRにより増幅・クローニングし、塩基配列解析及び、多型データの集積を行い、植物種判別に利用可能か否かの検討を行い、昨年度までに、PPO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、上記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、以下の検討を行った。

1. PPO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PPO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。

本研究で解析対象としたケシ属植物

本研究で遺伝子解析等に供したケシ属植物は表1及び図2、3に示すものである。

表1の植物は、ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシの3種の植物間の識別用プライマーの設計並びに交叉反応性確認に使用した。

図2、3の植物は、種子交換事業により、センターにハカマオニゲシ(PB)種子として導入されたもので、PPO特異的プライマーを用いた植物種識別法の検討のために使用した。

ゲノムDNA調製には、(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部圃場で栽培したもの、及び試験管培養物または温室内で栽培したものを材料とした。

ゲノムDNAの調製

ゲノムDNAの調製にはDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を使用した。新鮮葉約100 mgを、2 ml 容アシストチューブに径4.8 mmステンレスボール2個及びキットのAPIバッファー500 µlを入れ、破砕機MS-100 (TOMY)で4,500 rpm、1分間、2回粉碎を行い、以後キットのプロトコルに従った。

ケシ属植物の遺伝子識別用プライマー

本研究で使用した、PPO特異的プライマー(文献1)、または、ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシ識別用プライマー(文献2)は、各植物種または系統について縮重入りプライマーを使用したdegenerate PCR法により塩基配列が未知の4'OMTgのクローニングを行い、塩基配列のアラインメント解析により、植物種間の変異点を抽出することにより設計した。

PPO特異的プライマーを用いた*P. bracteatum* 種子交換導入系統の植物種識別

主に2000年に種子交換事業によりセンターに導入された*P. bracteatum* (全12系統の一部)についてPPO特異的と考えられるプライマーを使用しPPO由来の遺伝子型の存否を解析した。

PCR酵素には、GoTaq Green Master Mix

(Promega)を使用した。使用プライマーは前年度設計したPPO特異的と考えられる4OMTg-A13-7F-S1 + 4OMTg-A13-7F-A1のセットを使用した。

PCR条件を下記に示す。

Primer set: 4OMTg-A13-7F-S1 + 4OMTg-A13-7F-A1

PCR reaction mixture: GoTaq Green Master Mix 3.0 µl, primer sense & antisense (10 pmol) 1.0 µl each, genome DNA template 1.0 µl

PCR condition: 95°C 5 min. - (95°C 30 sec. - 58°C 30 sec. - 72°C 60 sec.) x 30 - 72°C 10 min. - 4°C ∞

Instrument: GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)

PCR産物の全量を電気泳動解析に用いた。電気泳動は1.0% ME-agarose (Takara Bio)、TAE bufferを用い、30-40 min (100 V)の泳動時間で行った。

ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシ間における遺伝子識別

ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシの3植物種については、これまで、アツミゲシ及びケシに反応性を示すプライマーセット(Pseti21S + A)、ヒナゲシ特異的にPCR産物を与えるプライマーセット(Pr21S + A)、そしてケシとアツミゲシの識別が可能なプライマーセット(134-10r-S2rev + Arev)をそれぞれ設計済みであった。今回、これらのプライマーを用い、表1に示すケシ属植物に対し、交叉反応性の確認を行った。

交叉反応性の確認に先立ち、ヒナゲシ特異的プライマーセットを用いたPCRの際に、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ることが問題であったので、非特異的増幅産物を減少させるため、プライマーの濃度について検討を行った。

プライマー濃度は、最終濃度1.67 µMから、0.83 µM、そして0.42 µMと、非特異的なバンドの出現の有無について検討した。

PCR条件を下記に示す。

Primer set for *P. rhoeas* specific identification:

Pr21S + Pr21A

PCR reaction mixture: GoTaq Green Master Mix 3.0 µl, primer sense & antisense (10 pmol) 0.25 µl, 0.5 µl, or 1.0 µl each, genome DNA template 1.0 µl (reaction volume: 6.0 µl)

PCR condition: 95°C 5 min. - (95°C 30 sec. - 58°C or 62°C 30 sec. - 72°C 60 sec.) x 30 - 72°C 10 min. - 4°C ∞

Instrument: GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)

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、ヒナゲシの4'OMTgの塩基配列の再精査を行い、プライマーの再設計を行った。プライマー濃度は前実験で最適化した最終濃度0.42 µMを採用した。

PCR条件を下記に示す。*印が再設計プライマーである。

Primer set for *P. setigerum* (and *P. somniferum*) specific identification: Pseti 21S + Pseti21A

Primers for *P. setigerum* specific identification: *134-10r-Srev2 + 134-10r-Arev

PCR reaction mixture: GoTaq Green Master Mix 3.0 µl, primer sense & antisense (2.5 pmol) 1.0 µl each, genome DNA template 1.0 µl (reaction volume: 6.0 µl)

PCR condition: 95°C 5 min. - (95°C 30 sec. - 58°C 30 sec. - 72°C 60 sec.) x 30 - 72°C 10 min. - 4°C ∞

Instrument: GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)

各植物試料由来のゲノムDNAの品質は、葉緑体DNA *rpl16-rpl14*領域の増幅の有無により確認した(文献3)。プライマー配列及びPCR条件は下記のとおりである。

Primers for *rpl16-rpl14* amplification:

A-primer: 5'-aaa gat cta gat ttc gta aac aac ata gag gaa gaa-3'

B-primer: 5'-atc tgc agc att taa aag ggt ctg agg ttg aat cat-3'

PCR reaction mixture: GoTaq Green Master

Mix 3.0 μ l, primer sense & antisense (2.5 pmol)
1.0 μ l each, genome DNA template 1.0 μ l
(reaction volume: 6.0 μ l)

PCR condition: 95°C 5 min. - (95°C 30 sec. -
58°C 30 sec. - 72°C 60 sec.) x 30 - 72°C 10 min.
- 4°C ∞

Instrument: GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)

C. 研究結果

PPO特異的プライマーを用いたPB種子交換導入系統の植物種識別

前年度までに設計を行った、PPO特異的にPCR産物を与えると考えられるプライマーセットを用い、PBの種子として導入された植物の遺伝子識別を試みた。その結果、図2に一部の写真を示すが、PBとして導入された系統のうち、花の直下にハカマ（苞葉）がある、花卉の色が深紅、花卉の基部に黒紫色の斑点がある、つぼみの表面の毛は寝ているといったPBの特徴をよく示す系統(86-00)については、本プライマーセットは増幅産物を与えなかった（図3）。

一方、PBの特徴を示さない、明るいオレンジ色の花卉を有する等PPOに類似した形態を有する系統に対しては増幅産物を与えることが明らかになった（図3）。

以上の結果は、本プライマーが、PBに反応せず、PPOまたはPPOとPB等の交雑種である可能性のある植物に対して反応していることを示すものであり、本プライマーが植物種識別に有用であることを示唆するものである。

ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシ間における遺伝子識別

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において、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（図4）。

そこで、プライマーの濃度について検討し

たところ、最終的に、プライマーの濃度を1/4濃度（最終濃度0.42 μ M）に変更することにより、改善されることが判明した（図4）。このヒナゲシ特異的プライマーセット用いた場合の交叉反応性を図5に示す。

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、図6レーン#1のように増幅産物を与えることが判明した。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、図7(D)のように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を達成した。

各プライマーセットの、ケシ属植物各種との交叉反応性を図7にまとめた（一部データは図5と重複する）。

D. 考察

今回、当センターの種子交換事業により海外の植物園等からPBとして種子で導入したものについて、PPO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。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

る必要がある。

また、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。今後は、種子の識別についても検討したい。

次年度以降は、ベンジルイソキノリンアルカロイド生成経路鍵酵素、4'OMT遺伝子のゲノムDNA配列の種間多型を利用した、ケシ属植物の判別法の開発を引き続き行う予定であり、種子交換により収集したケシ属植物種子について育成を行い、形態等の観察を行うとともに、葉よりゲノムDNAをサンプリングし、これまでに作製した植物種特異性の高いと考えられるプライマーセットの特異性、交叉反応性についてさらなる検討を進めたいと考えている。

また、FTAカード(Watman)等の簡易ゲノムDNA抽出キットと、PCR阻害物質の影響を受けにくいPCRシステム、Ampdirect plus (島津製作所)などを組み合わせた、ケシ属植物の簡便な遺伝子識別法や、種子を試料とした遺伝子識別法についても検討したい。

E. 結論

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)、オニゲシ*P. orientale* (PO)、ハカマオニゲシ*P. bracteatum* (PB)間の遺伝子鑑別に利用可能と期待される、PPO特異的に反応する可能性が高いプライマーセットを用い、センターにPBとして種子で導入された系統について、プライマーの反応性を確認した。その結果、本プライマーセットは、導入系統のうち、PBの形態的特徴を示さないPPO様の植物においてPCR産物を与え、植物種の遺伝子鑑別に利用できることを示唆する結果が得られた。

また、ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシ間の識別が可能なプライマーについては、プライマー配列及びPCR条件を精査し、より植物種識別の確度を向上させることに成功した。

以上の結果は、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を示すものである。

F.参考文献

(文献1)

研究代表者 合田幸広, 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 「乱用薬物の分析・同定に関する研究」 (H19-医薬-一般-024), 平成21年度総括・分担研究報告書, pp. 91-100, 平成22年3月

(文献2)

研究代表者 合田幸広, 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」 (H22-医薬-一般-016), 平成22年度総括・分担研究報告書, pp. 97-105, 平成23年3月

(文献3)

Nakamura I., Kameya N., Kato Y., Yamanaka S., Jomori H., and Sato Y. "A Proposal for Identifying the Short ID Sequence Which Addresses the Plastid Subtype of Higher Plants." *Breeding Sci.* 47, 385-388 (1997)

G.健康危険情報

なし。

H.研究発表

論文発表

なし。

学会発表

なし。

I.知的財産権の出願・登録状況

なし。

(図表)

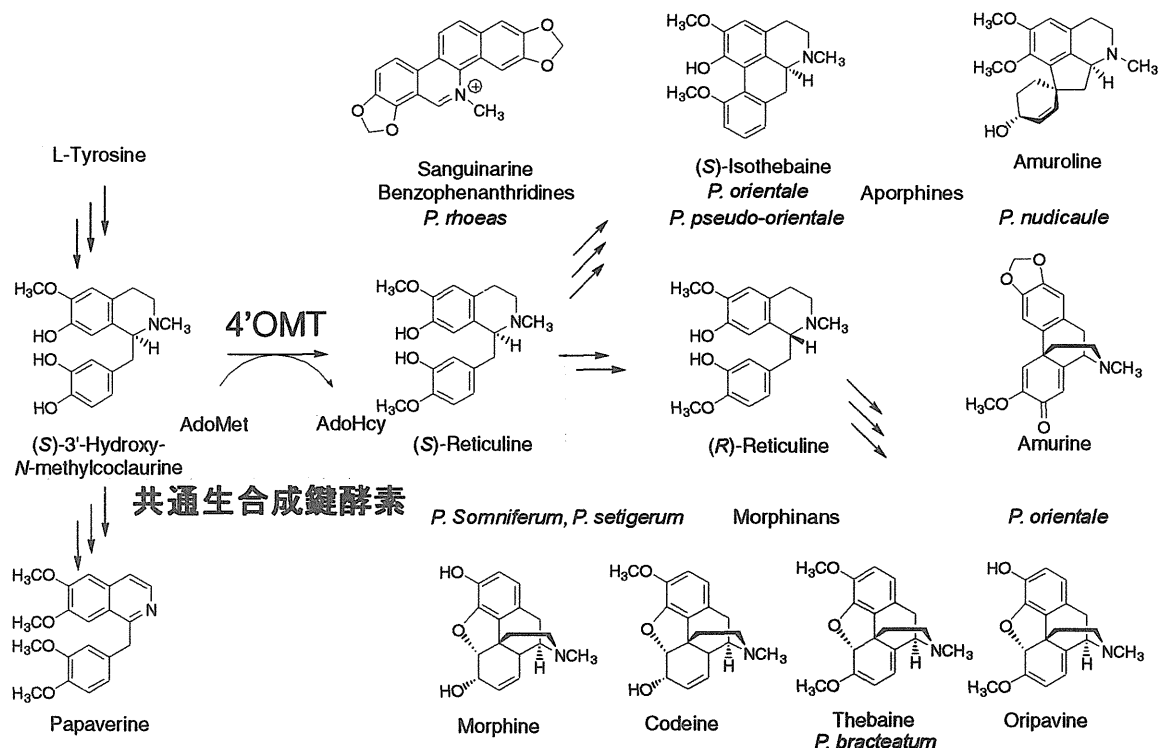


図1. ケシ属植物に広く存在するアルカロイド生合成経路の共通鍵酵素4'OMT

表1. ケシ、アツミゲシ、ヒナゲシ識別用プライマーの交叉反応性確認に用いたケシ属植物試料

試料コード	和名	学名
アツミゲシ 1016seti2 seti27 pink *1	アツミゲシ	<i>Papaver setigerum</i> DC.
アツミゲシ setigerum K3 (190-00)	アツミゲシ	<i>P. setigerum</i> DC.
アツミゲシ setigerum 朱 L4 #134 *1	アツミゲシ	<i>P. setigerum</i> DC.
ヒナゲシ 京都, 081017 tube#1	ヒナゲシ	<i>P. rhoeas</i> L.
ヒナゲシ シャーレーポピー, 081002 tube#2 *1	ヒナゲシ	<i>P. rhoeas</i> L.
ヒナゲシ 岐阜 #132 2001年産	ヒナゲシ	<i>P. rhoeas</i> L.
ヒナゲシ グビジン混合 (H1)090310 tube #2 デンマーク	ヒナゲシ	<i>P. rhoeas</i> L.
ケシ PsIK 一貫種 (tube #52)	ケシ	<i>P. somniferum</i> L.
ケシ Ps France	ケシ	<i>P. somniferum</i> L.
ケシ PsMY (tube # 1) 0046-03	ケシ	<i>P. somniferum</i> L.
60イラン2	ケシ	<i>P. somniferum</i> L.
66インド6	ケシ	<i>P. somniferum</i> L.
5南広5号	ケシ	<i>P. somniferum</i> L.
31ローマ3号	ケシ	<i>P. somniferum</i> L.
36愛知白	ケシ	<i>P. somniferum</i> L.
51トルコ2-3	ケシ	<i>P. somniferum</i> L.
69インド9	ケシ	<i>P. somniferum</i> L.
81ビリー203	ケシ	<i>P. somniferum</i> L.
ハカマオニゲシ PB E1	ハカマオニゲシ	<i>P. bracteatum</i> Lindl.
ハカマオニゲシ PB F1	ハカマオニゲシ	<i>P. bracteatum</i> Lindl.
オニゲシ POL1 (23 tube #11)	オニゲシ	<i>P. orientale</i> L.
オニゲシ POL2 (in vitro 060117)	オニゲシ	<i>P. orientale</i> L.
プソイドオリエンターレ PPO A1 (488-90)	プソイドオリエンターレ	<i>P. pseudo-orientale</i> (Fedde) Medw.
プソイドオリエンターレ PPO C1 (130-95)	プソイドオリエンターレ	<i>P. pseudo-orientale</i> (Fedde) Medw.
アイランドポピー G5 オランダ	シベリアヒナゲシ	<i>P. nudicaule</i> L.

*1: 縮重入りプライマーにより4'OMTgのPCRクローニングを行い、プライマー設計に使用した系統

74-00 #1



74-00 #3



86-00 #2



89-00 #1



89-00 #5



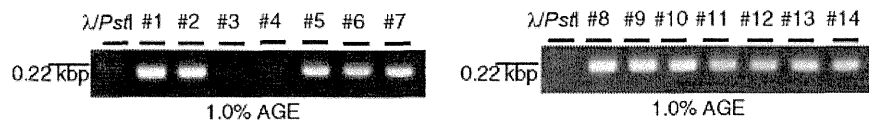
89-00 #6



106-00 #1



図2. ハカマオニゲシ種子として導入した系統（一部）の形態



Lane	導入番号	導入国名	個体番号	形態	花色	PCR result
1	74-00	Germany	1	PPO, 苞葉なし	明るいオレンジ	positive
2			3	PPO, 苞葉あり	明るいオレンジ	positive
3	86-00	Slovenia	1	PB	深紅	negative
4			2	PB	深紅	negative
5	106-00	Germany	1	PPO, 苞葉あり	明るいオレンジ	positive
6			2	PPO, 苞葉あり		positive
7	488-90	England		primer設計株		positive
8	89-00	Lithuania	1	PPO, 苞葉あり	明るいオレンジ	positive
9			2	PPO, 苞葉稀にあり	明るいオレンジ	positive
10			3	PPO, 苞葉なし	明るいオレンジ	positive
11			4		未開花	positive
12			5	PPO, 苞葉あり	明るいオレンジ	positive
13			6	PPO, 苞葉なし	明るいオレンジ	positive
14	488-90	England		primer設計株		positive

図3. PPO特異的プライマーとPB種子導入系統との反応性

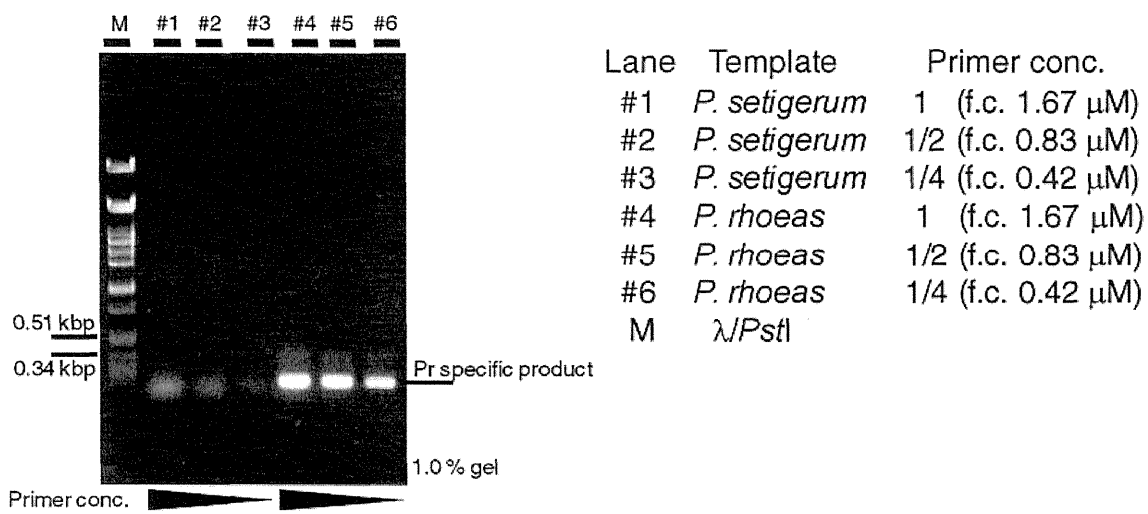
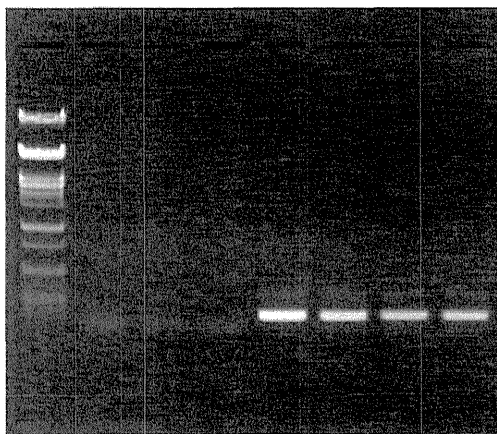


図4. ヒナゲシ特異的プライマー(Pr21S + A)のPCR反応液中の濃度による非特異的増幅産物量への影響 (f.c.: final concentration of primers)

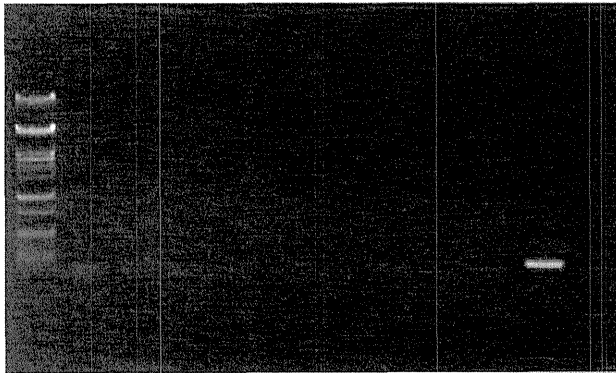
λ /PstI #1 #2 #3 #4 #5 #6 #7



1.0 % gel

Lane	Template
1	アツミゲシ seti27 pink
2	アツミゲシ setigerum K3 (190-00)
3	アツミゲシ setigerum 朱 L4 #134
4	ヒナゲシ シャーレーポピー#2
5	ヒナゲシ 京都081017 tube#1
6	ヒナゲシ 岐阜 #132 2001年産
7	ヒナゲシ グビジン混合 (H1)090310 tube #2

λ /PstI #1 #2 #3 #4 #5 #6 #7 #8 #9 #10 #11



1.0 % gel

Lane	Template
1	ケシ PsiK (tube #52) 0656-79
2	ケシ PsFrance (tube #23) 0374-04
3	ハカマオニゲシ PB E1
4	ハカマオニゲシ PB F1
5	オニゲシ POL1(23 tube #11)
6	オニゲシ POL2(in vitro 060117)
7	プソイドオリエンターレ PPO A1(488-90)
8	プソイドオリエンターレ PPO C1(130-95)
9	アイスランドポピー G5 P. nudicaule オランダ
10	PC: ヒナゲシ1002sherley#2
11	NC: no template (DEPC water)

図5. ヒナゲシ特異的プライマー(Pr21S + A)の交叉反応性

λ /PstI #1 #2 #3 #4 #5 #6 #7 #8 #9 #10 #11



1.0 % gel

Lane	Template
1	ヒナゲシ シャーレーポピー#2
2	ヒナゲシ 京都081017 tube#1
3	ハカマオニゲシ PB E1
4	ハカマオニゲシ PB F1
5	オニゲシ POL1(23 tube #11)
6	オニゲシ POL2(in vitro 060117)
7	プソイドオリエンターレ PPO A1(488-90)
8	プソイドオリエンターレ PPO C1(130-95)
9	アイスランドポピー G5 P. nudicaule オランダ
10	PC: アツミゲシ setigerum 朱 L4 #134
11	NC: no template (DEPC water)

図6. アツミゲシ特異的プライマー(134-10r-S2rev + Arev)の交叉反応性

#1 ヒナゲシ シャーレーポピー#2を鋳型とした場合、陽性となる。

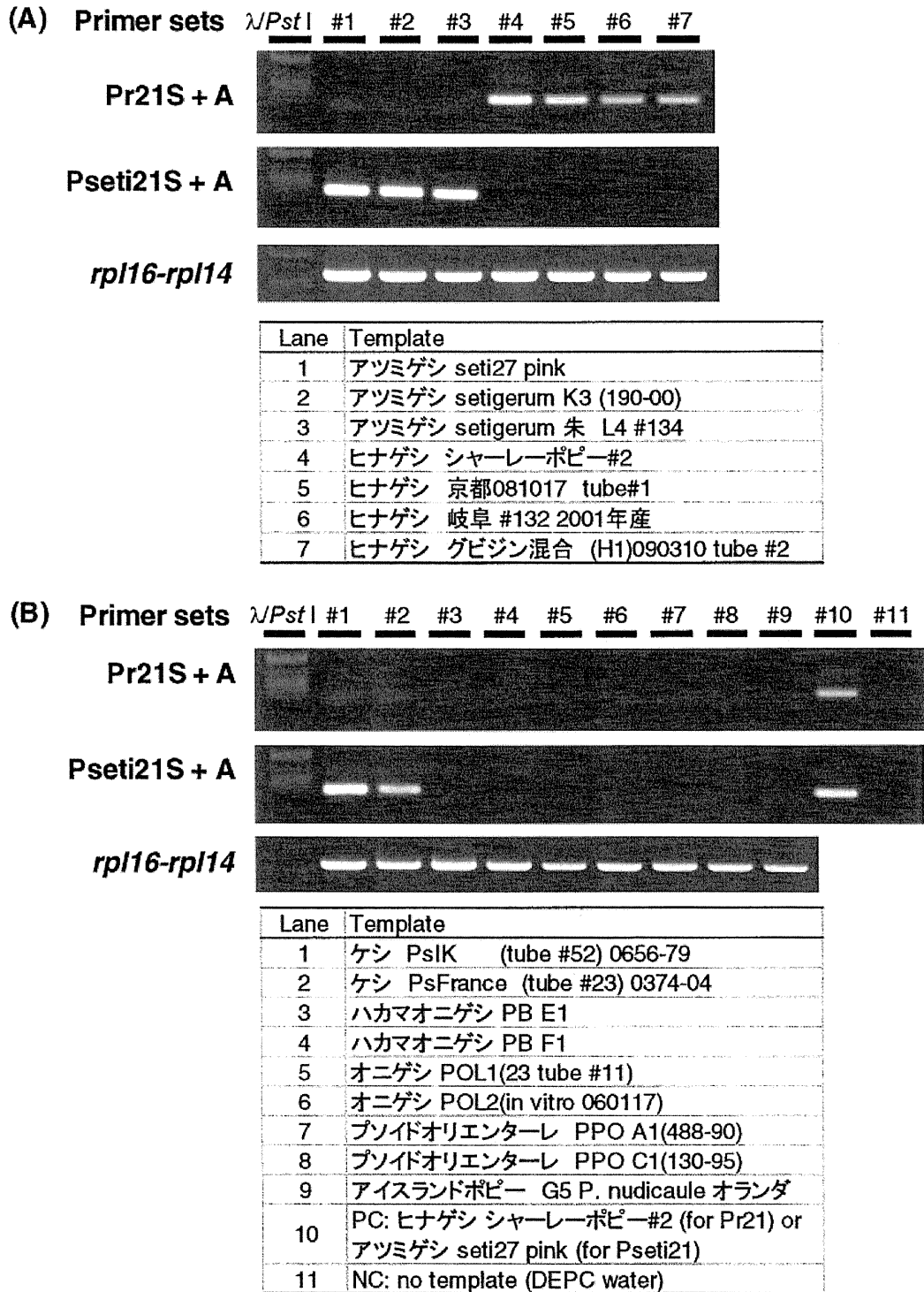


図7. ケシ、アツミゲシ、ヒナゲシ特異的プライマーの交叉反応性
 Pr21S + A: ヒナゲシ特異的プライマー。Pseti21S + A: ケシまたはアツミゲシ特異的プライマー。
 葉緑体DNA *rpl16-rpl14*領域の増幅は鋳型DNAの品質確認のために行った。
 PC: Pr21プライマーに対してはヒナゲシ (シャーレーポピー#2) を、
 Pseti21S+Aプライマーに対してはアツミゲシ (seti27 pink) を陽性対照とした。

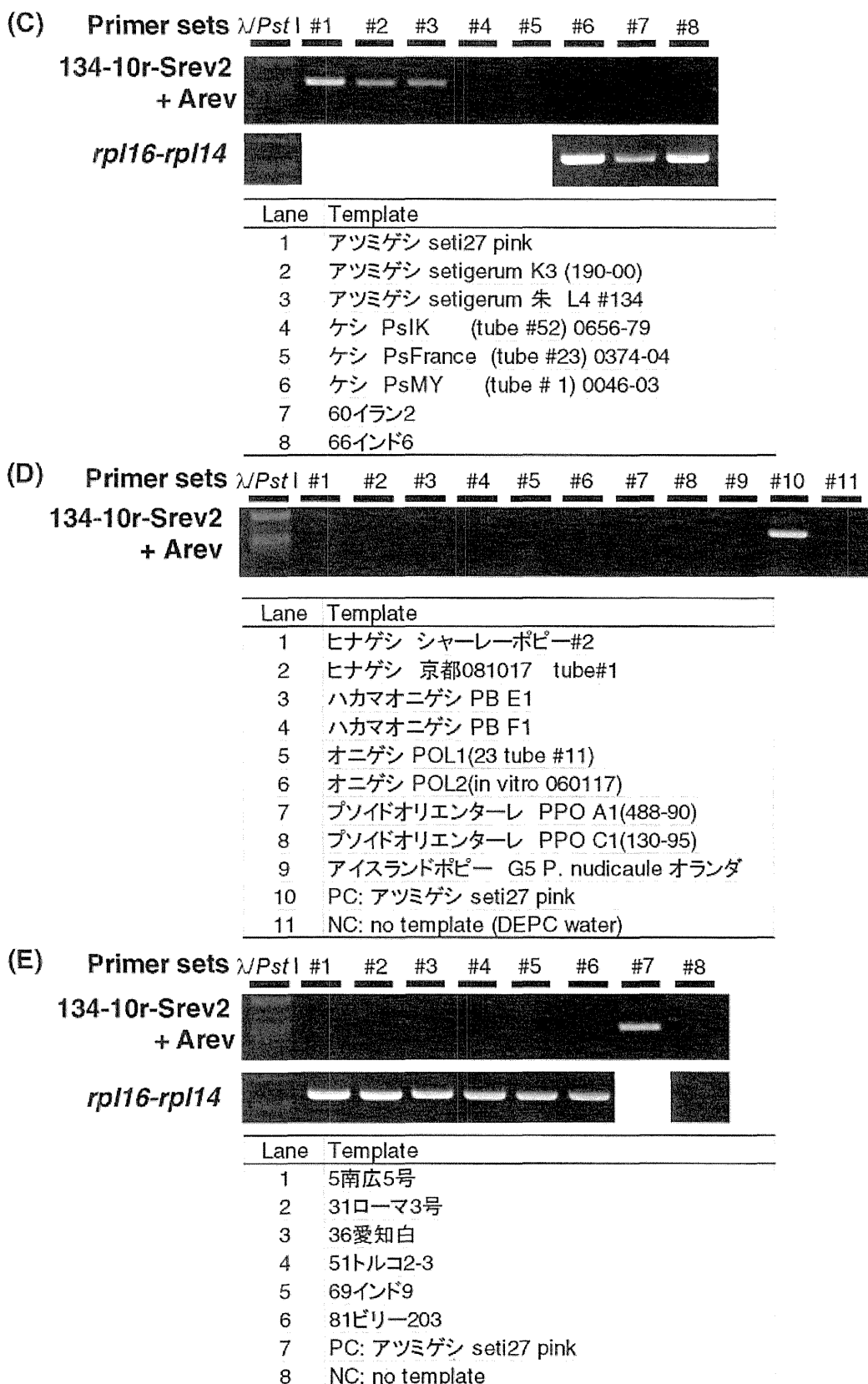


図7. (続き) ケシ、アツミゲシ、ヒナゲシ特異的プライマーの交叉反応性
 134-10r-Srev2 + Arev: アツミゲシ特異的プライマー。
 葉緑体DNA *rpl16-rpl14*領域の増幅は鋳型DNAの品質確認のために行った。

分担研究課題 法規制薬物の分析に関する研究

分担研究者 徳島文理大学香川薬学部 准教授 代田 修

植物系薬物の分析に関する研究

要旨 昨年度作成した幻覚性サルビアの幻覚性分であるサルビノリンA (SaIA) に対する抗 SaIA MAb を用いて、金コロイドを用いたイムノクロマトストリップによる SaIA の簡易検出手法の確立を検討した。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、抗カチノン抗体の取得を試みた。

研究協力者

田中宏幸 九州大学大学院薬学研究院薬用
資源制御学分野 准教授

A. 研究目的

「違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）」には、麻薬等の化学構造を部分的に変化させた新たな化合物（デザイナーズドラッグ）や、幻覚性植物に由来するものがある。これらの使用は、乱用者自身の健康被害発生にとどまらず、麻薬や覚せい剤などの乱用の切っ掛け（ゲートウェイ）となることも懸念される。幻覚性植物由来の違法ドラッグの一つであったマジックマッシュルームが麻薬原料植物として規制され、幻覚物質であるサルビノリンAを含有するメキシコ原産の幻覚性サルビア（*Salvia divinorum*）が薬事法の指定薬物に指定されたことは、まだ記憶に新しい。その他にも、アフリカ原産のカート（チャット、khat；*Catha edulis*）の新鮮葉にはアンフェタミンに類似する覚醒作用を示す麻薬であるカチノンが含まれており、飲酒が禁じられているイスラム世界の人々は伝統的にこの葉を噛んで使用してきた。現在、アフリカからの移民などによりヨーロッパ経由でアメリカにもカート（チャット）が広がっており、欧米では規制の対象となっている。これら現在社会的問題となっている乱用薬物などを迅速・簡便に分析する手法は、これら薬物の鑑別を行う現場において希求されている。本研究では、これら植物系違法ドラッグの監視・取締に役立つような新しい分析法の開発、新規な鑑別法の確立を目指し、免疫化学的分析手法による簡便で多検体同時分析可能な

鑑別法を構築することを目的としている。

昨年度には、抗体 SaIA モノクローナル抗体 (MAb) を独自に作製した後、本 MAb を活用した ELISA の開発を行った。今年度は、この抗 SaIA MAb を用いたイムノクロマトストリップ法の開発を試みた。さらにカチノンに対する選択性の高いモノクローナル抗体 (MAb) を作製し、免疫化学的鑑別法を構築することを目指した。

B. 研究方法

1. サルビノリンA (SaIA) 検出用イムノクロマトストリップの構築

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、イムノクロマトストリップを構築した。イムノクロマトストリップ作製用キット（ミリポア製）に含まれているニトロセルロース膜ストリップに SaIB-HSA タンパク質複合体 (1 mg/ml, 10 μ l) を塗布し、乾燥した後、スキムミルク溶液でブロッキングを行った。抗 SaIA MAb (10 μ g) は、金コロイド溶液 (1 ml) (田中貴金属製) と混和し、25 $^{\circ}$ C で 15 分間静置することで標識化を行った。その後 1%BSA で処理することで金コロイド表面のブロッキングを施した。金コロイド標識抗 SaIA MAb を吸着させたコンジュゲートパッドを準備し、続いて SaIB-HSA を塗布したニトロセルロース膜と図1のように組み合わせることでイムノクロマトストリップを構築した。

2. 抗 CA MAb の作製と ELISA の開発

2-1. ハプテンの合成

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することとした。まず、(-)-ノルエフェドリンのアミノ基を Boc 保護し、二酸化マンガンを用いてベンジル位ヒドロキシ基を酸化後、塩酸にて処理することによりカチノン塩酸塩を得た。次に、トリエチルアミン存在下、無水コハク酸と作用させることによりカチノンハプテン (CA-Suc) を調製した。(図 2)

2-2. 免疫原の調製と免疫感作

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 コンジュゲートを合成した。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。一次免疫ではフロイント完全アジュバントを用いてエマルジョンを調製し、1 匹当たり 50 μ g 投与した。二次免疫ではフロイント不完全アジュバントを用いてエマルジョンを調製し、1 匹当たり 50 μ g 投与した。三次免疫以降はリン酸緩衝生理食塩水に溶解したものを 100 μ g 投与した。

2-3. 細胞融合と抗 CA MAb 産生ハイブリドーマの確立

感作したマウスから採血し、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。PEG を用いた手法により融合を行った後、2 週間培養することでハイブリドーマの出現を確認した。各ウェル中のハイブリドーマの産生する MAb を 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。

2-4. 抗 CA MAb の精製

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。

2-5. 競合的 ELISA の確立

各種固相化抗原を調製し、抗体の反応性を調査した。CA-Suc-ヒト血清アルブミン (HSA)、CA-卵白アルブミン (OVA)、CA-BSA を 50 mM 炭酸緩衝溶液 (pH 9.6) で希釈して、イムノプレ

ートに 100 μ l/well 分注、1 時間インキュベートし、抗原をプレートに固相化した。3 回洗浄後、ブロッキング溶液を 300 μ l/well 分注し、1 時間インキュベートし、再び 3 回洗浄した。段階希釈した遊離抗原溶液 (CA 標準品、試験サンプル)、最適濃度に調製した MAb の順にそれぞれ 50 μ l/well 分注し、1 時間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄後、二次抗体溶液 (100 μ l/well) を加え、1 時間インキュベートし、再び 3 回洗浄した。基質溶液 (100 μ l/well) を添加し、15 分間インキュベートし、405 nm における吸光度を測定した。

C. 研究結果

1. サルビノリン A 検出用イムノクロマトストリップの構築

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 溶液を分析した結果を図 1 に示す。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、図 3 に示すように *Salvia divinorum* のみが陽性となる結果を得た。

2. 抗 CA MAb の作製と ELISA の開発

2-1. 抗 CA MAb の作製

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価を測定した結果、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 の精製を行なった。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。

2-2. 抗 CA MAb を活用した競合的 ELISA の確立

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なった。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、十分な発色を得られた条件を、競合的 ELISA に用いる最適一次抗体濃度と決定した (図 4)。

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 (図 5)。

D. 考察

本研究では、幻覚成分である 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。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。また、チャットの幻覚成分であるカチノンの免疫化学的分析法の確立を目指し、抗 CA MAb の作製を行った。その結果、CA 並びに関連化合物を特異的に認識する MAb を得ることができた。現在、本 MAb の大量調製を行っている段階にあり、今後詳細な特徴付けを実施する計画である。その後、本抗体を活用した間接競合法による ELISA、イムノクロマトストリップ、Eastern blotting の開発を行い、カートの簡便、高感度な鑑別法として活用する計画である。

E. 参考文献

1) Hiroyuki Tanaka, Osamu Morinaga, Takuhiro Uto, Shunsuke Fuji, Frederick Asare

Aboagye, Nguyen Huu Tung, Xiao Wei Li, Waraporn Putalun, and Yukihiko Shoyama, "Application of Monoclonal Antibodies against Bioactive Natural Products: Eastern Blotting and Preparation of Knockout Extract" Int. J. Anal. Chem. **2012**, Article ID 260425, 10 pages, (2012).

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

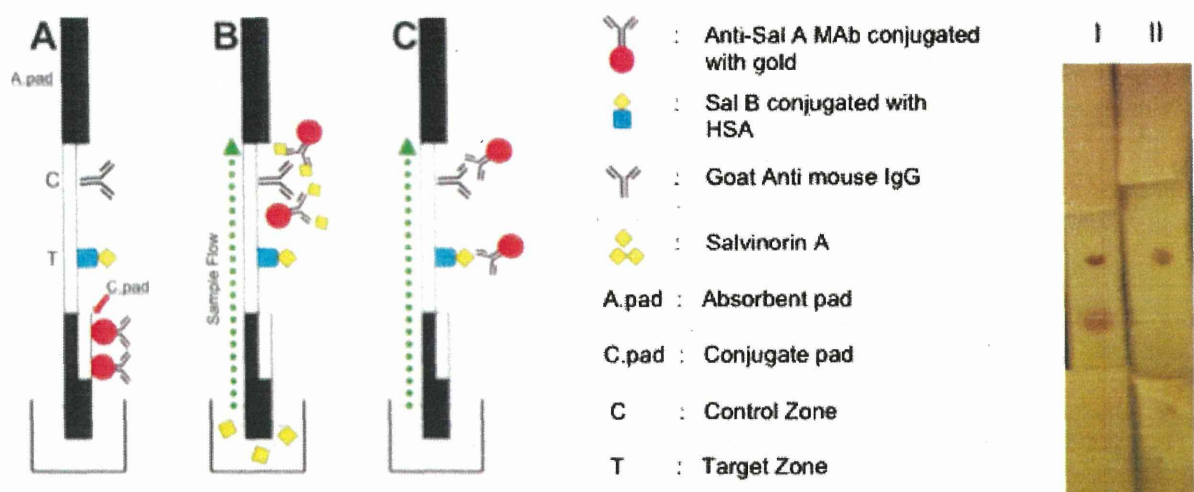
論文発表等

1) 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," submitted.

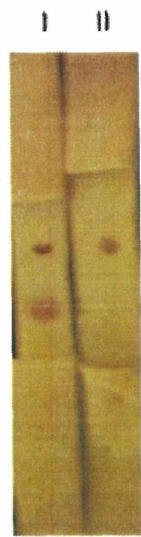
学会発表

2) 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 年会 (東京 2011) .

3) 田中宏幸, 代田 修, 森元 聡, 関田節子, 「抗 salvinorin A monoclonal antibody の作製と ELISA の確立」、日本薬学会第 131 年会 (静岡 2011) .



(A) The strip test is based on a competitive immunoassay methodology using anti-Sal A MAb as the detection reagent.
 (B) Color only appears in the C zone if a sample is positive for Salvinorin A
 (C) Color appears in both T and C zones if sample is free of Salvinorin A



I: 20% MeOH
 II: Sal A (50µg/mL)

図 1. Sal A 検出用イムノクロマトストリップの作製

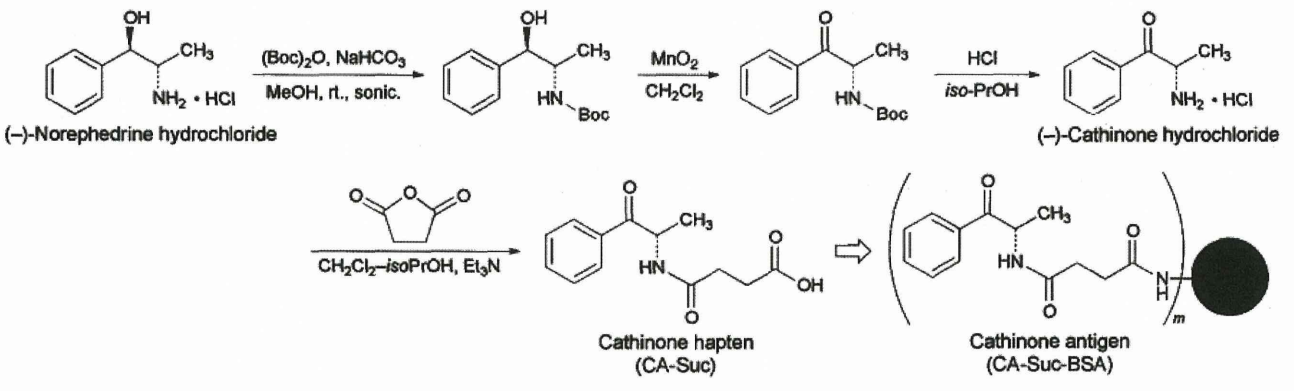
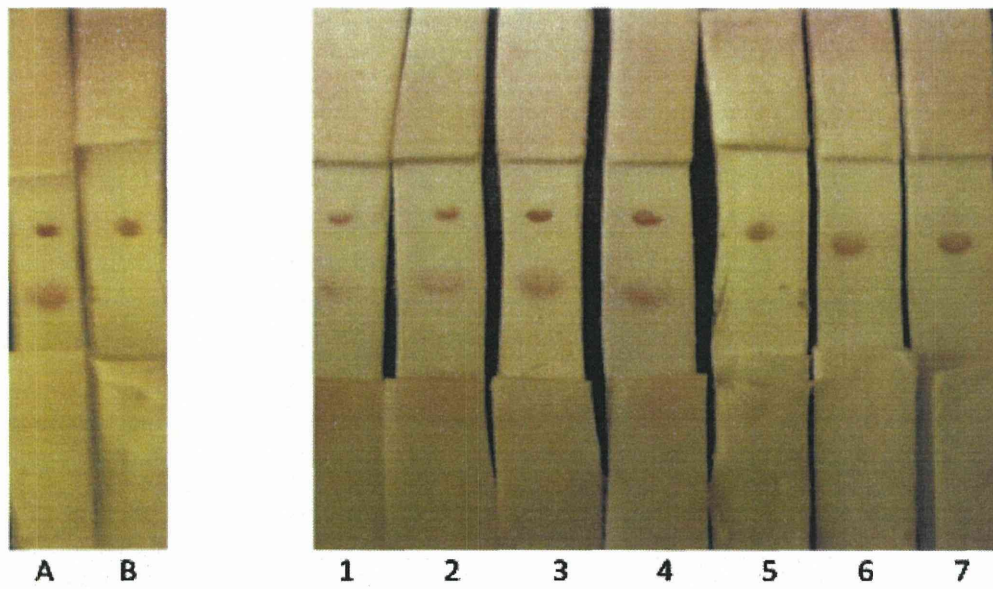


図 2. カチノンハプテン (CA-Suc) の合成



- (A) Negative control
 (B) Positive control
 (C) Lanes 1-4: *S. farinacea*, *S. patens*, *S. microphylla* and *Rosmarinus officinalis*
 (D) Lanes 5-7: *S. divinorum*.

図3. 各種シソ科植物のイムノクロマトストリップによる分析

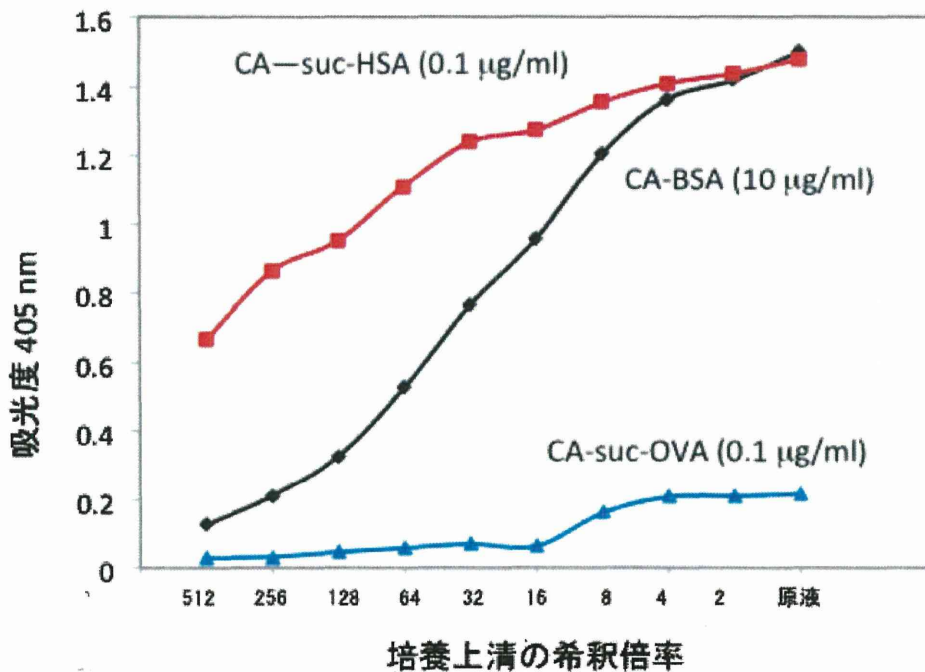


図4. CA-タンパク質複合体に対する抗CA MAbsの反応性 (直接的ELISAによる解析)

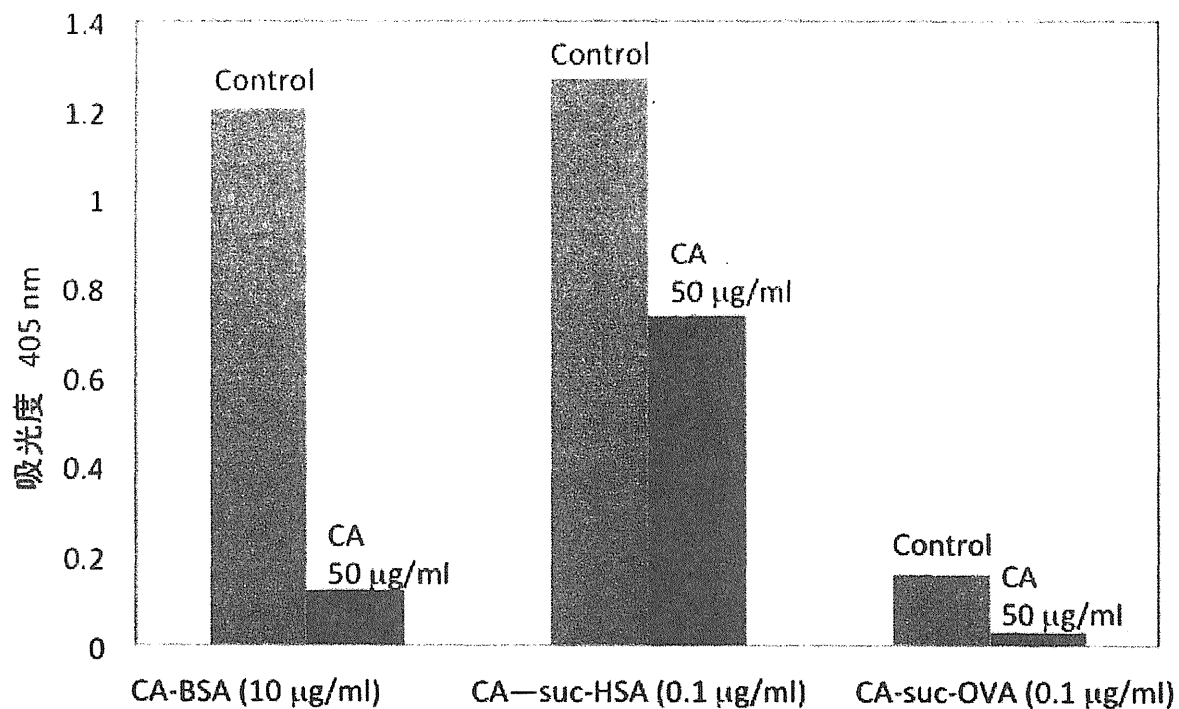


図5. CA に対する抗 CA MAb の反応性 (競合的 ELISA による解析)

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Sogawa, C. 他	Methylone and Monoamine Transporters: Correlation with Toxicity	Current Neuropharmacology	9(1)	58-62	2011
Shoda, T. 他	Enzyme-assisted synthesis of the glucuronide conjugate of psilocin, a hallucinogenic component of magic mushroom	Drug Testing and Analysis	3(9)	594-596	2011
Kikura-Hanajiri, R. 他	Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LCMS/MS	Analytical & Bioanalytical Chemistry	400(1)	165-174	2011
Kawamura, M. 他	Simple and rapid screening for methamphetamine, MDMA and their metabolites in urine using DART (Direct Analysis in Real Time)-TOFMS	Yakugaku Zasshi	131(5)	827-833	2011
Tsumura, Y. 他	A survey of the potency of Japanese illicit cannabis in fiscal year 2010	Forensic Sci. Int.	online available DOI:10.1016/j.forsciint.2012.04.005		2012
Madan Kumar Paudel 他	Development of an immunochemical differentiation method for <i>Salvia divinorum</i> using anti-salvinorin A monoclonal antibody	Analytica Chimica Acta	submitted		

