

Fig. 2 Chemical structures of 9 compounds analyzed in this study: (A) psychotropic substances detected in the products, (B) *N*-(4-hydroxypentyl) and oxidative-dehalogenated putative metabolites of MAM-2201 and (C) medicines prescribed before death.

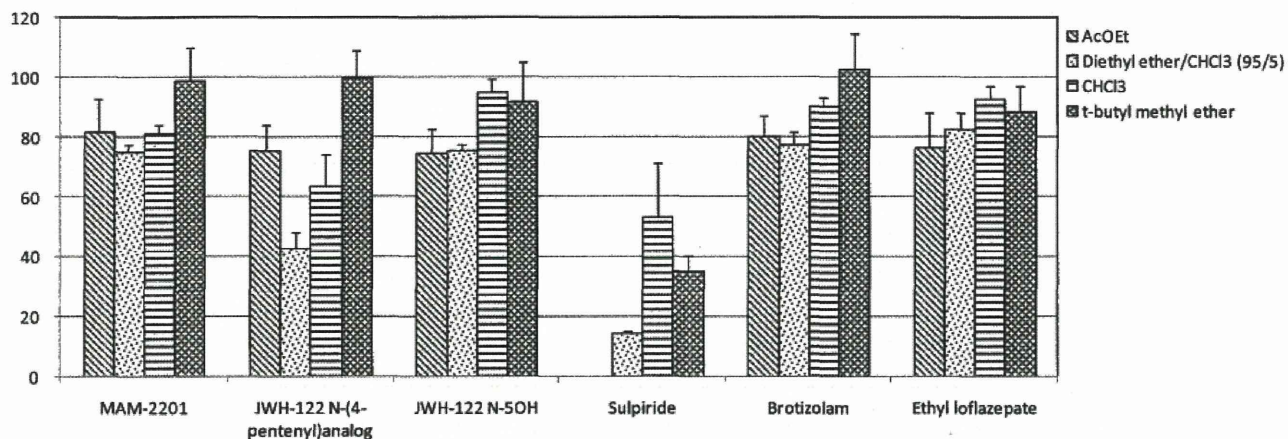


Fig. 3 Extraction efficiency of the targeted compounds from standard solutions (pH 10, the final concentration of each was 50 ng/mL) using different liquid-liquid extraction methods.

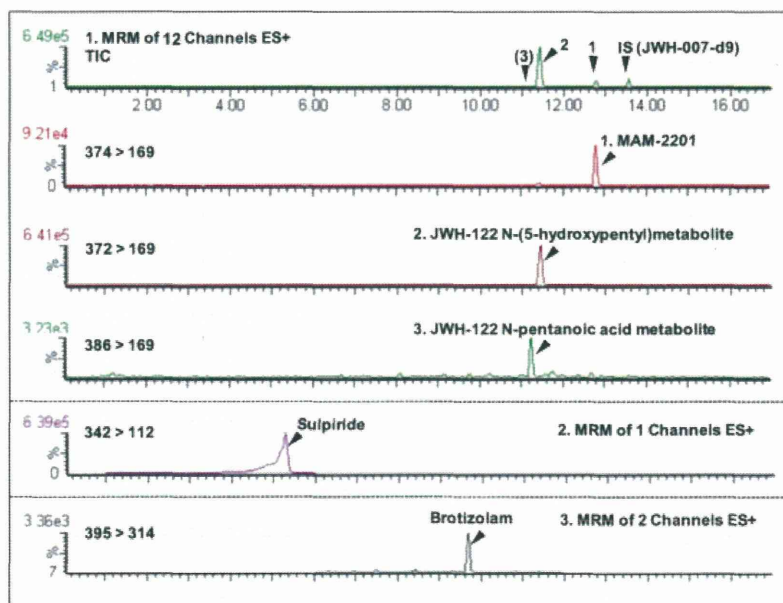


Fig. 4 UPLC-MS/MS MRM chromatograms of the extracts from the serum sample collected during the emergency medical treatment

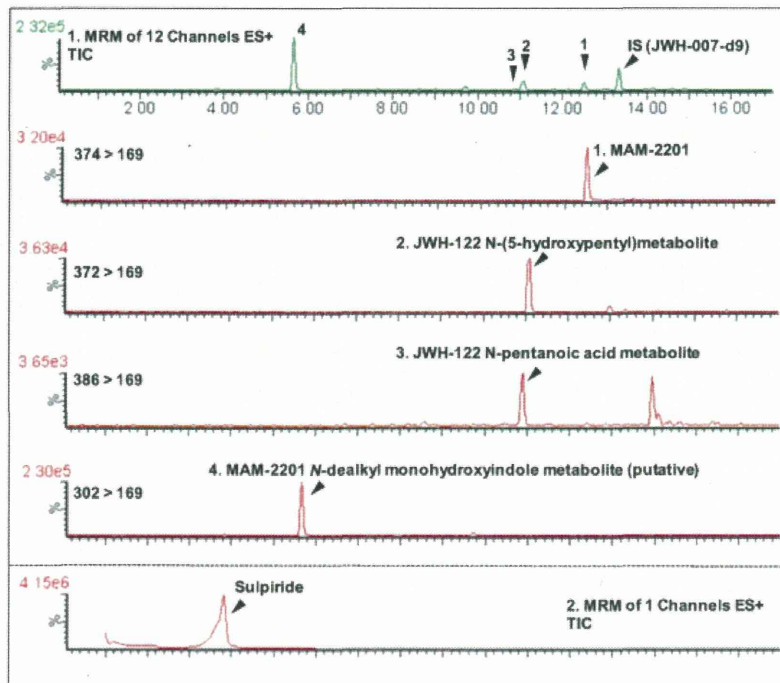


Fig. 5 UPLC-MS/MS MRM chromatograms of the extracts from the urine sample (untreated with β -glucuronidase) collected during the postmortem examination

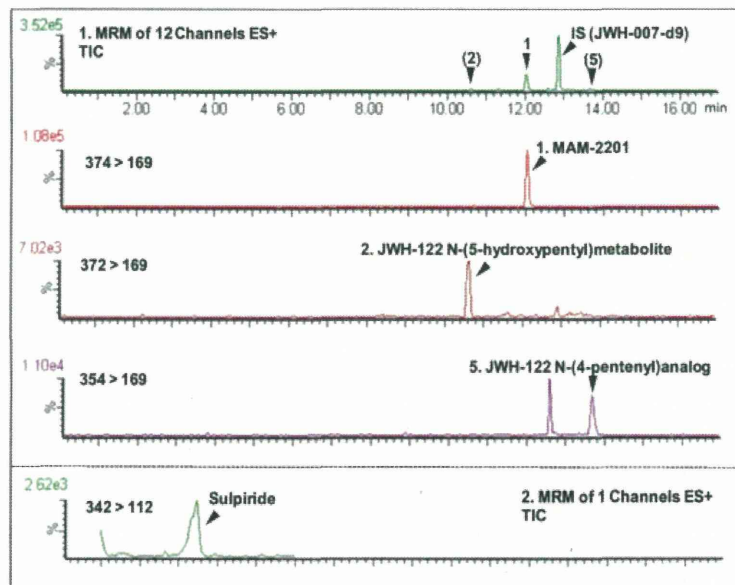


Fig. 6 UPLC-MS/MS MRM chromatograms of the wash solvent of the hair sample collected during the postmortem examination

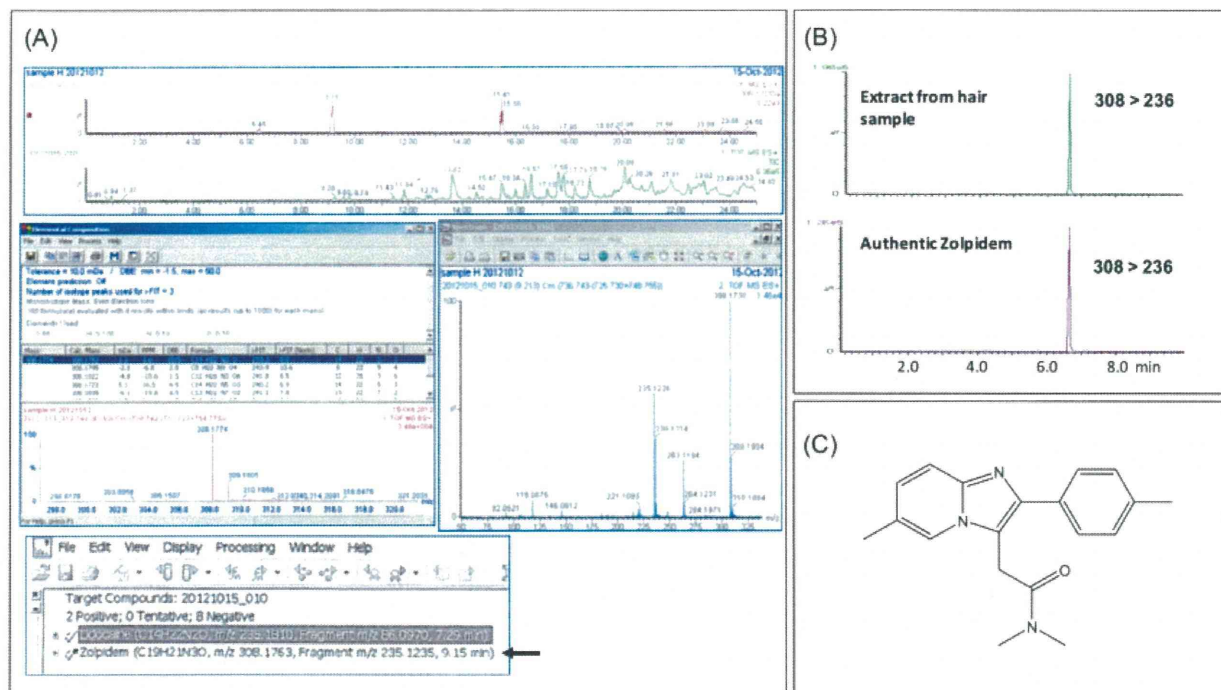


Fig. 7 Another psychotropic substance detected in the biological samples:

- (A) UPLC-QTOF analysis of the extracts from the hair sample for screening for other psychotropic substances, (B) UPLC-MS/MS analysis for the confirmation of zolpidem detected as a result of the screening analysis and (C) the chemical structure of zolpidem.

分担研究報告書

分担研究課題 法規制薬物の分析・鑑別に関する化合物の合成とメタボロミクス研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長 福原 潔
合成カンナビノイド類の簡易検出法の検討

研究要旨 平成 25 年 3 月 22 日に施行される包括指定する指定薬物は、(1H-インドール-3-イル)(ナフタレン-1-イル)メタノン骨格を共通の構造としている。本研究では、今回包括指定される薬物の簡易検出法の開発を目的として、本骨格を有する代表的な合成カンナビノイドである JWH-018 に対して特異的に呈色反応を示す試薬の検討を行った。包括指定される構造に共通するカルボニル基に対して 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの反応を試みたが、反応は全く進行しなかった。インドール骨格に対してはトリプトファンの呈色試薬である 1,4-ジケトン類およびジメチルアミノベンズアルデヒドとの反応を試みたが、どちらも予想される反応物は生成せず、色の変化はみられなかった。一方、インドール骨格を酸化分解させた後、生成するケトンに対しての呈色反応を試みたところ、色の変化はみられたが複数の化合物が生成していることがわかった。インドール構造とカルボニルの同時検出法としては、アミノアセトアルデヒドジメチルアセタールとの反応による 5H-pyrido[4,3-b]indole 骨格の形成反応を現在検討中である。

また、本研究ではヨーロッパで死亡例がいくつか報告されており、我が国では平成 24 年 12 月 17 日に指定薬物に指定された 1-(1H-インドール-5-イル)プロパン-2-アミン (5-IT)の標品の合成を行い、200mg 提供した。

研究協力者

大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 主任研究官

正田 卓司 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 主任研究官

A. 研究目的

近年、多くの薬物が法規制されるに伴い、新しい合成品が多く出回るようになった。特に JWH-018 に代表される合成カンナビノイド類の構造を少し変化させることで法の網をすり抜けたドラッグが社会的問題を引き起こしている。このような状況下、JWH-018 の基本骨格であるインドールとナフタレンがカルボニルを介して結びついた、(1H-インドール-3-イ

ル)(ナフタレン-1-イル)メタノンを有する化合物が包括規制されることとなり（平成 25 年 3 月 22 日施行）、2 月 20 日時点では本骨格を有する 851 物質が指定薬物となる。包括規制によって非常に多くの化学物質が規制の対象となると、不正薬物の所持・使用を取り締まる捜査現場においても、従来の検出法に加えて、不正薬物の基本骨格を簡便かつ確実に判定できる検出法の開発が強く望まれる。そこで本研究では指定薬物の包括指定に伴い、その基本骨格の検出法について検討を行った。

また、インドール骨格を有する 1-(1H-インドール-5-イル)プロパン-2-アミン (5-IT)は、ヨーロッパで死亡例がいくつか報告されており、我が国では平成 24 年 12 月 17 日に指定薬物に指

定された。本研究では 5-IT の標品を合成し化合物のスペクトルデータを明らかにした。

B. 研究方法

1. 合成カンナビノイド類の簡易検出法

JWH-018 との反応を以下の条件で行った。反応の進行は HPLC で確認した。

装置 ; Shimadzu 社製 HPLC system

HPLC column ; Senshu Pak NH₂ column
4,6 φ × 150mm

移動相 ; CH₃CN – CH₃OH (0min; 0 %
→ 50 min; 50%)

流速 ; 1 ml / min

検出 ; UV 254nm (photo diode array)

1) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンとの反応

JWH-018 と 1.2 当量の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを 10%硫酸水溶液中に溶解した後、加温した。また、JWH-018 と 1.2 当量の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンをアセトニトリルに溶解後、0.2 当量の p-トルエンスルホン酸を加えて加温した。

2) アセトニルアセトンとの反応¹⁾

JWH-018 と 1.2 または 1.5 当量のアセトニルアセトンを 10M 塩酸または 20%硫酸溶液中に溶解した後、室温および加熱条件下で撹拌した。

3) 2,5-ジメトキシテトラヒドロフランとの反応

JWJ-018 と 1.2 または 1.5 当量の 2,5-ジメトキシテトラヒドロフランを 20%硫酸溶液中に溶解後、室温および加熱条件下で撹拌した。

4) 4-ジメチルアミノベンズアルデヒドとの反応²⁾

10M 塩酸または 20%硫酸溶液中に JWH-018 と 0.5 当量の 4-ジメチルアミノベンズアルデヒドを溶解した後、室温および加熱条件下で撹拌した。

5) ガルビノキシラジカルとの反応

JHW-018 のアセトニトリル溶液に 1 および 2 当量のガルビノキシラジカルのアセトニト

リル溶液を添加した後、10 分間加熱撹拌した。さらに 2 当量のジニトロフェニルヒドラジンと 0.2 当量の p-トルエンスルホン酸のアセトニトリル溶液を添加して 10 分間加熱撹拌した。

2. 5-IT の合成

インドール 5-カルボキシアルデヒド 2.9 g (20 mmol) を 11.5 ml (160 mmol) の 2-ニトロエタンに溶解後、酢酸アンモニウム 0.51 g (6.7 mmol) を加えて 80°C で加熱撹拌した。3 時間後、過剰の 2-ニトロエタンを減圧留去した後、析出した黄色固体を冷水で洗浄し風乾させた。さらに固形物を冷却したメタノールで洗浄した後、減圧乾燥させて 2-ニトロプロペニル誘導体を 3.8 g (収率 94 %) 得た。

2-ニトロプロペニル誘導体 1.0g (5.0 mmol) を 5.0 ml の dry THF に溶解させた溶液を、アルゴン気流下、1.1 g の LiAlH₄ を懸濁させた dry THF 10 ml 溶液中に 30 分かけて滴下した。反応溶液を 4 時間、加熱還流させた後、室温に冷却し、過剰の LiAlH₄ を 1 ml の 25% THF 水溶液と 1 ml の 15 % 水酸化ナトリウム溶液をゆっくり滴下して分解させた。室温で撹拌した後、析出した不溶物をセライトで濾過し、50 ml の THF と酢酸エチルで洗った。溶液を全て合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル/n-ヘキサンで再結晶を行い、5-IT を 679 mg (収率 78 %) 得た。IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3408, 3357, 3124, 3020, 2958, 2903, 1581, 1474, 1455, 1432, 1343, 1275, 1260; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ_{H} 1.15 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.24 (br s, 2H), 2.58 (dd, $J = 8.4, 13.4$ Hz, 1H), 2.84 (dd, $J = 5.0, 13.4$ Hz, 1H), 3.20 (m, 1H), 6.49 (m, 1H), 7.02 (dd, $J = 1.4, 8.4$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J = 2.6, 2.6$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 8.54 (br s, 1H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ_{C} 23.9, 47.1, 49.2, 102.4, 111.2, 121.2, 123.8, 124.8, 128.4, 131.2, 134.9; HR-MS calcd for

C₁₁H₁₅N₂ [M + H]⁺, 175.1230; found 175.1233.

C. 研究結果・考察

1. 合成カンナビノイド類の簡易検出法

包括指定の対象となる(1H-インドール-3-イル)(ナフタレン-1-イル)メタノン骨格に特異的に反応して発色する試薬として、カルボニル構造およびインドール構造の検出試薬を取り上げ、JWH-018 との反応性について検討を行った。カルボニル基の検出試薬である 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンはカルボニルと反応してヒドラゾン形成し、黄色を呈する。そこで JWH-018 との反応を硫酸酸性溶液中で行った (Figure 1)。しかし反応は室温下でも加熱しても進行しなかった。反応をアセトニトリル溶液中、酸触媒として p-トルエンスルホン酸を用いて行ってみたが、同様に反応は進行しなかった。JWH-018 のカルボニルを介してインドール骨格とナフタレンが結合していることから、立体障害によって 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの反応性が低下していることが考えられた。

そこで次に JWH-018 のインドール骨格の検出反応として、トリプトファンの定性反応の利用を試みた。トリプトファンの定性反応としてはインドール骨格とアミノ基を同時に検出するピクテ・スペングラー反応³⁾、およびフェニルグリオキサールとの反応⁴⁾があるが、インドール骨格を特異的に検出する方法としては 1,4-ジケトン類による環形成反応を用いた蛍光法やアルデヒドとの反応による呈色法がある。そこでインドール骨格の特異的検出反応を JWH-018 で試みた。1,4-ジケトン類としては、アセトニルアセトンおよび反応性の高いスクシニルアルデヒドのアセタール体である 2,5-ジメトキシテトラヒドロフランを用いて、塩酸および硫酸酸性溶液中で行った (Figure 2)。その結果、どちらのケトンに対しても JWH-018 は速やかに反応し、HPLC で新しいピークが観測

された。しかし、塩酸と硫酸水溶液のどちらで反応を行っても発蛍光はみられなかった。インドール骨格が 1,4-ジケトン類との環形成によって生成するベンツピロコリンは酸性溶液中、強力な蛍光を示すことが報告されている。JWH-018 との反応では、1,4-ジケトンがインドール骨格の窒素原子と反応した後、2位の炭素との環形成反応が3位のカルボニル基の電子吸引性の効果によって進行しない為、ベンツピロコリン骨格が形成されないことが考えられた。

ジメチルアミノベンズアルデヒドはトリプトファン 2 分子と酸性条件下で反応させると、無色の状態から青色へと溶液が変化する。そこで同様の反応を JWH-018 でも試みた (Figure 3)。その結果、反応は進行して複数の生成物が HPLC で確認されたが、十分な呈色は見られなかった。トリプトファンは 2 分子がアルデヒドと反応することにより青色の呈色を示すが、JWH-018 の場合、おそらくナフタレン骨格の立体障害によって 1 分子のみの反応で停止していることが考えられた。さらに反応を進行させるため加熱を試みたところ、分解反応が進行してしまい、トリプトファンと同様の呈色は示さなかった。

トリプトファンは生体ではインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼによって N-ホルミルキヌレニンへと酸化代謝されるが、同様のインドール骨格の開裂反応は一電子酸化剤によっても容易に進行する^{5,6)}。JWH-018 と 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンとの反応は、カルボニル基がインドール骨格とナフタレンとの立体障害の影響を受けて進行しなかった。しかし、インドール骨格を酸化分解したときに生成するカルボニルは立体障害が少なくヒドラゾン結合を形成する可能性がある。そこで、一電子酸化剤としてガルビノキシラジカルを用いて JWH-018 の酸化反応をアセトニトリル中で加熱攪拌して行った後、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンとの反応を酸触媒として p-トルエ

ンスルホン酸を加えて加熱攪拌して行った (Figure 4). 酸化反応が進行するとガルビノキシラジカルの黄色溶液は無色に変わるが、同様の色調の変化は JWH-018 との反応でも認められたことから、一電子酸化反応が進行していることが確認された。その後、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを加えて加熱攪拌すると、反応溶液はヒドラゾン特有の黄色～黄橙色にはならず、褐色を呈した。呈色反応を示したことからヒドラゾン構造を有する生成物が一部存在している可能性があるが、HPLC で複数の生成物がみられたことから JWH-018 に特徴的な呈色反応として利用する為には一電子酸化剤の種類や反応条件をさらに検討する必要がある。

以上、合成カンナビノイドの部分構造を特異的に認識する検出法について検討を行った。今後はインドール骨格とカルボニルの反応性を同時利用した新しい環構築反応についても検討する必要がある。例えば、アミノアセトアルデヒドのジメチルアセタール体との反応で 5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole が生成すれば、インドール構造とカルボニルの同時検出が可能であり、またナフタレン骨格との共鳴によって合成カンナビノイドに特徴的な発色が見られる可能性がある (Figure 5)。本反応が確立できれば、対象化学物質を TLC 展開した後、アミノアセトアルデヒドジメチルアセタールのアルコール溶液を分霧した後、塩酸溶液を分霧して加熱する。TLC スポットに合成カンナビノイドが含まれていれば、アセタールが加水分解したアミノアセトアルデヒドによる特徴的な呈色反応が進行する。包括指定する指定薬物に対する選択的な呈色反応として、今後の検討課題とした。

2. 5-IT の合成

Knoevenagel 縮合反応を利用して市販のインドール 5-カルボキシアレヒドにニトロエ

タンを酢酸アンモニウム存在下、80°C で 3 時間加熱することにより、2-ニトロプロペニル誘導体を収率 94% で合成した。さらに dryTHF 中、リチウムアルミニウムヒドリドで還元反応を加熱還流して行うことにより、二重結合とニトロ基を還元された目的とする 5-IT を収率 78% で合成した (Figure 6)。5-IT の構造は MS, ¹H NMR, ¹³C NMR および IR スペクトルで確認した。5-IT は酢酸エチル/*n*-ヘキサンで再結晶した後、標品として 200mg を提供した。

D. 結論

平成 25 年 3 月 22 日に施行される包括指定する指定薬物は、(1*H*-インドール-3-イル)(ナフタレン-1-イル)メタノン骨格を共通の構造としている。本研究では、今回包括指定される薬物の簡易検出法の開発を目的として、本骨格を有する代表的な合成カンナビノイドである JWH-018 に対して特異的に呈色反応を示す試薬の検討を行った。包括指定される構造に共通するカルボニル基に対して 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンとの反応を試みたが、反応は全く進行しなかった。インドール骨格に対してはトリプトファンの呈色試薬である 1,4-ジケトン類およびジメチルアミノベンズアルデヒドと反応を試みたが、どちらも予想される反応物は生成せず色の変化はみられなかった。一方、インドール骨格を酸化分解させた後、生成するケトンに対しての呈色反応を試みたところ、色の変化はみられたが複数の化合物が生成していることがわかった。本反応を呈色反応として利用するためにはさらに条件検討する必要がある。

また、本研究ではヨーロッパで死亡例がいくつか報告されており、我が国では平成 24 年 12 月 17 日に指定薬物に指定された 1-(1*H*-インドール-5-イル)プロパン-2-アミン (5-IT) の標品の合成を行い、200mg 提供した。

E. 参考文献

- 1) Robinson R, Saxton JE: A synthesis of substituted 2,3-benzopyrrocolines. *J Chem Roc.* (1950) 3136-40.
- 2) DasGupta BR: Interference by hydrogen peroxide in the assay for tryptophan with p-dimethylaminobenzaldehyde by the method of Spies and Chambers. *Anal Biochem.* (1969) 30, 284-7.
- 3) Denckla WD, Dewey HK: The determination of tryptophan in plasma, liver and urine. *J Lab Clin Med.* (1967) 69, 160-9.
- 4) Kojima E, Kai M, Ohkura Y: Determination of tryptophan in human serum by high-performance liquid chromatography with precolumn fluorescence derivatization using phenylglyoxal. *J Chromatogr.* (1993) 612, 187-90.
- 5) Drsata J: Tryptophan metabolism via transamination. In vitro aminotransferase assay using dinitrophenylhydrazine method. *Adv Exp Med Biol.* (2003) 527, 511-7.
- 6) Itakura K, Uchida K, Kawakishi S: Selective formation of oxindole- and formylkynurenine-type products from tryptophan and its peptides treated with a superoxide-generating system in the presence of iron(III)-EDTA: a possible involvement with iron-oxygen complex. *Chem Res Toxicol.* (1994) 7, 185-90.

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

特になし

論文発表

1. Ohno A, Kikura-Hanajiri R, Fukuhara K, Goda Y, Kurihara M: A metabolic study on the biochemical effects of Levomethorphan /Dextromethorphan in rats using ¹H-NMR spectroscopy. *Yakugaku Zasshi*, submitted.

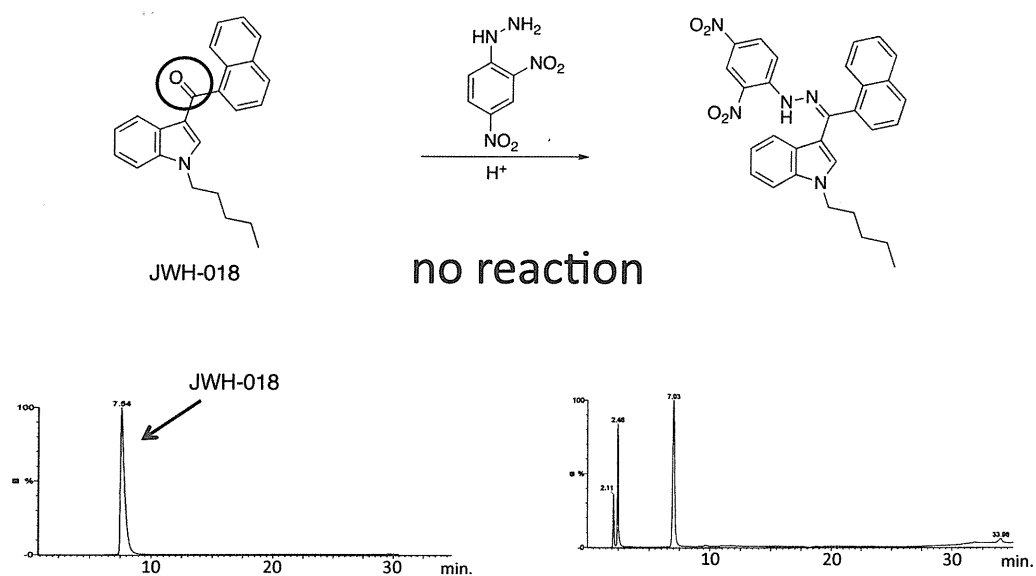


Figure 1. カルボニル基の検出：2,4-ジニトロフェニルフィドラジンとの反応

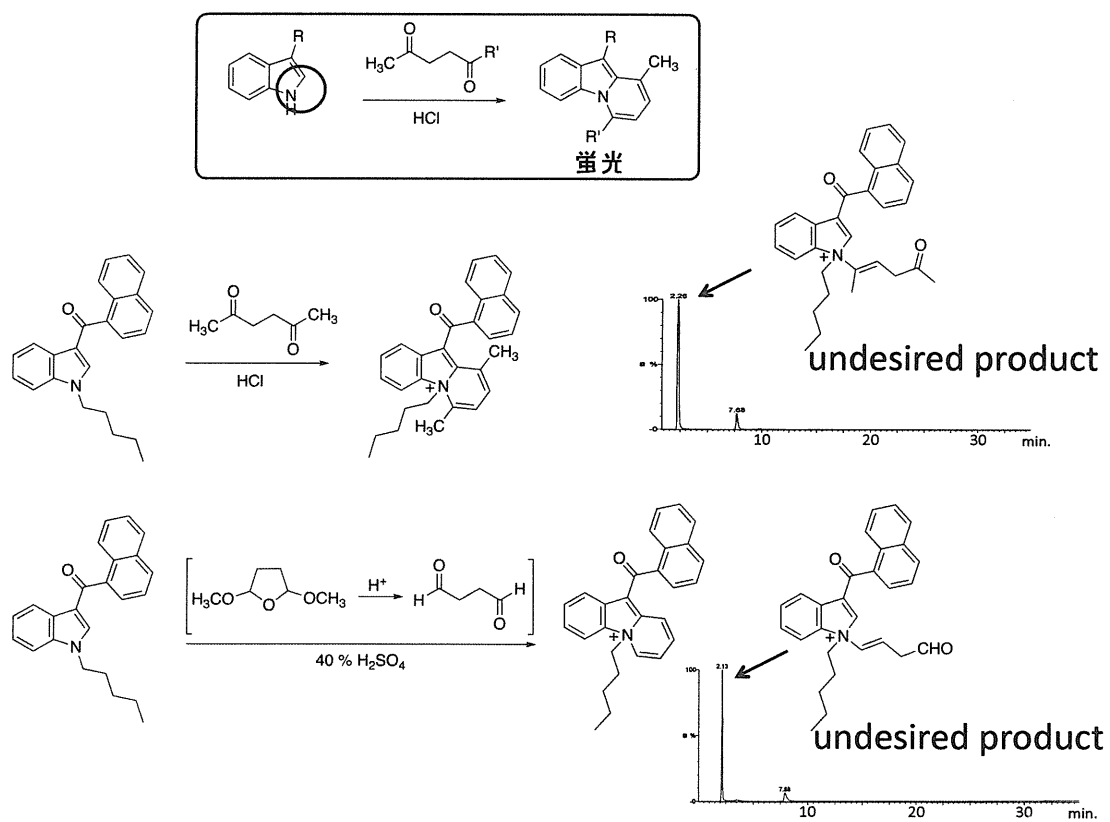


Figure 2. インドール骨格の検出：1,4-ジケトンとの反応

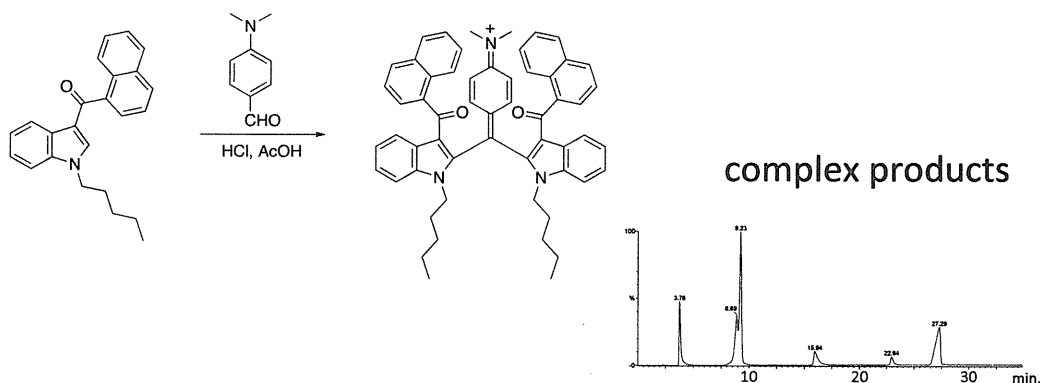
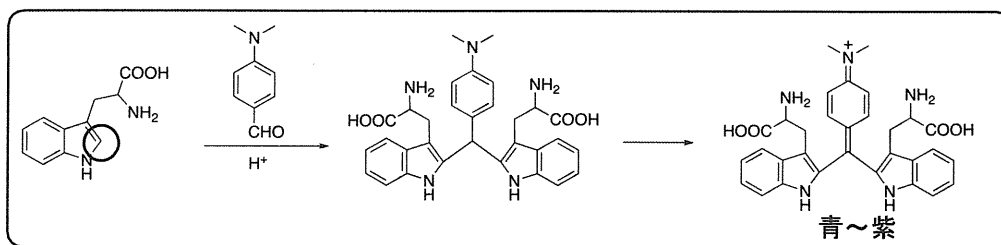


Figure 3. インドール骨格の検出：アルデヒドとの反応

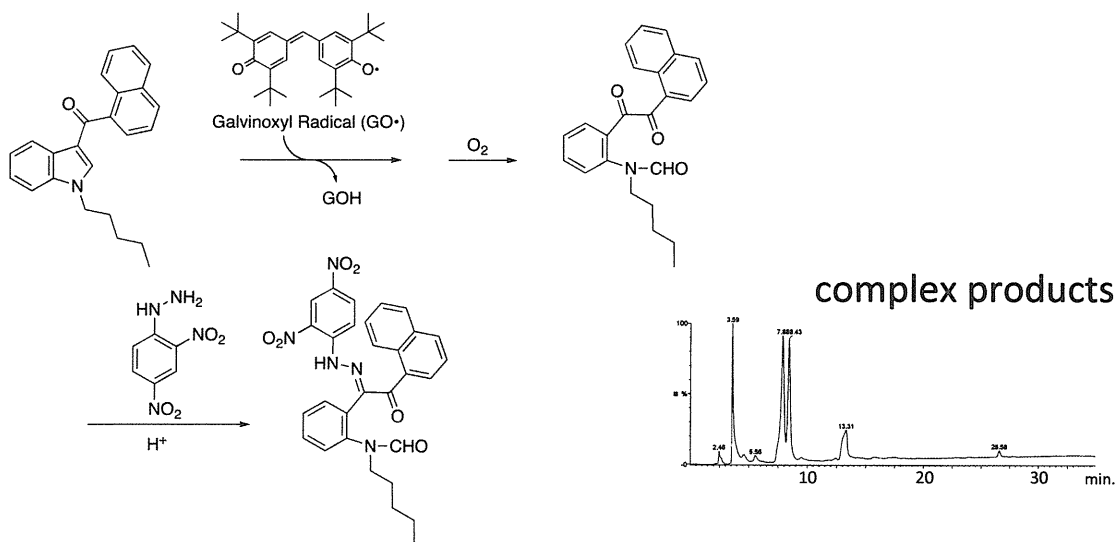
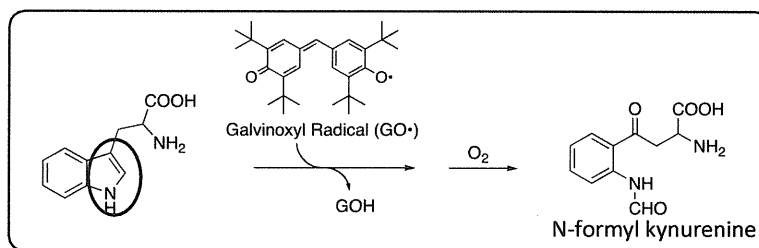


Figure 4. インドール骨格の検出：キヌレニンへの酸化と2,4-ジニトロフェニルヒドラジンとの反応

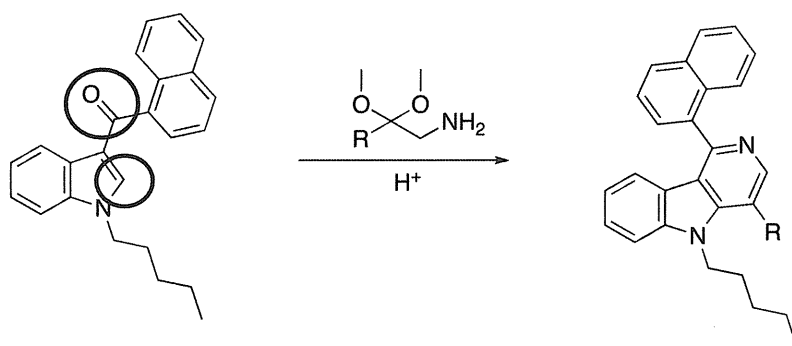
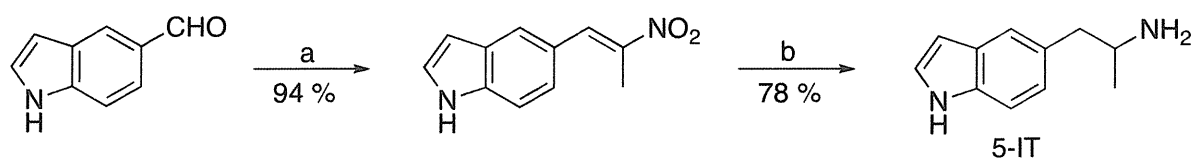


Figure 5. 3-カルボニルインドール骨格の検出：5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole 構造の構築



a) $C_2H_5NO_2$, CH_3COONH_4 , 80 °C, 3 hr, b) LAH, anhydrous THF, reflux, 4 h

Figure 6. 5-(2-Aminopropyl)indole (5IT)の合成

分担研究課題 遺伝子情報を利用したケシ属植物の鑑別法に関する研究

分担研究者

河野徳昭（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 主任研究員

研究要旨 ケシ属植物は、類似した形態を有し、栄養繁殖期における植物種、系統間の鑑別には経験を要する。本研究においては、ケシ属植物のアルカロイド生産に関わる二次代謝酵素遺伝子の鍵酵素のひとつと推定される(S)-3'-hydroxy-N-methylcoclaurine-4'-O-methyltransferase (4' OMT)のゲノムDNA部分配列(4' OMTg)の多型情報を用いた植物種、系統の迅速かつ簡便な鑑別法の確立について検討を進めている。今年度は、昨年度までに開発したケシ*P. somniferum* (Ps)、アツミゲシ*P. setigerum* (Pseti)及びヒナゲシ*P. rhoeas* (Pr)間の鑑別が可能なプライマーを用い、種子を検体とした植物種鑑別法、並びに核酸調製・保存資材(FTAカード)を用いた植物種鑑別法について検討した。その結果、ケシ属植物種子1粒を検体とした植物種の鑑別、並びにFTAカードで調製・保管した核酸試料を検体とした植物種の鑑別にそれぞれ成功した。以上の成果は、ケシ属植物の実用的鑑別法確立の基盤となるものである。

A. 研究目的

ケシ属植物は種間で類似した形態を有し、とくに、栄養繁殖期における識別には経験を要する。本研究においては、遺伝子レベルでのケシ属植物各種の判別利用可能なゲノムDNA配列の相違点を見出し、迅速かつ簡便な判別法を確立することを目的とする。本研究の成果として、ケシ属植物の簡便な判別法が確立されれば麻薬植物の監視行政への多大な貢献が期待される。

また、本研究では、植物種の判別法として、植物をはじめとする生物全般に普遍的に存在する遺伝子、たとえば、核リボソームDNAのITS領域、葉緑体DNAの遺伝子、*matK*遺伝子、*rbcL*遺伝子の塩基配列の変異(多型)を進化遺伝学的に解析し、分類するという手法を用いるのではなく、有用物質生産に関わる二次代謝酵素遺伝子群のうち、とくに鍵酵素と予

想される反応段階に関わる酵素遺伝子について、塩基配列の種間、系統間変異のデータを集積し、それらの多型情報による植物種、系統の同定が可能か否かを検討する。本手法により、遺伝子レベルの情報と、薬用植物の品質の主体である有用物質の組成、含有量との相関について直接的な議論が可能になると考えられ、他の薬用植物等への応用や有用物質高生産株の育種マーカーとしての利用も期待され、その意義は大きい。

本研究においては、昨年度までに、ケシ*P. somniferum* (Ps)、アツミゲシ*P. setigerum* (Pseti)及びヒナゲシ*P. rhoeas* (Pr)間の植物種鑑別が可能なプライマーの開発に成功しているが、本年度は、ケシ属植物の種子を検体とした植物種鑑別法、並びに核酸調製・保存資材(FTAカード)を用いた植物種鑑別法について検討した。

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鑑別

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鍵酵素のひとつである(図1)。本研究において植物種鑑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鑑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、植物種鑑別に利用可能か否かの検討を行い、昨年度までに、*Papaver pseudo-orientale*特異的と考えられるプライマーセット(文献1)、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(文献2及び3)。

今年度は、上記のうち、ケシ、アツミゲシ、ヒナゲシの3植物種を鑑別可能なプライマーセット(図2)について、実用的

なケシ属植物鑑別法の確立を目標とし、以下の検討を行った。

1. ケシ属植物種子を検体とした植物種鑑別法の開発。
2. 簡便な核酸の採集・保管システムであるFTAカード(GE Healthcare社)を使用したケシ属植物の簡便な鑑別法の開発。

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下記のとおり。

ケシ: *P. somniferum* L. 「一貫種」(PsIK)

アツミゲシ: *P. setigerum* DC. 「27 セチゲルムピンク」(27seti pink 1992)

ヒナゲシ: *P. rhoeas* L. 「京都」(Pr)

ナガミヒナゲシ: *P. dubium* L. (筑波圃場)

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を材料とした。

また、ケシ属植物の種子の供試系統は下記のとおり。

ケシ: *P. somniferum* L. 「一貫種」(H13年優良株)

ヒナゲシ: *P. rhoeas* L. 「サカタシャーレーポピー」(317654)

アツミゲシ: *P. setigerum* DC. (27seti pink 1992)

新鮮葉からのゲノムDNAの調製

新鮮葉からのゲノム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AP1バッファー500 µlを入れ、破砕機MS-100 (TOMY)で3,000 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。最終溶出はAEバッファー100 µlで行った。

ケシ属植物の遺伝子鑑別用プライマー

本研究で使用した、ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシ識別用プライマー(文献2

及び3) 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。

以下にその配列を示す。

Primers for *P. setigerum* (and *P. somniferum*) specific identification:
Pseti21S:

5' -ctgttccaagtgtcaagttc-3'

Pseti21A: 5' -gtccagtcagcaagacgc-3'

Primers for *P. rhoeas* specific identification:

Pr21S: 5' -catgttattgccaactctcgc-3'

Pr21A: 5' -ggtaatctctgaaagagtacttg-3'

Primers for *P. setigerum* specific identification:

134-10r-Srev2: 5' -ctatgatcttccacatgttattt-3'

134-10r-Arev: 5' -gtctcttccggtattgcctg-3'

また、供試検体のゲノムDNAの品質確認のため行った葉緑体DNA *rpl16-rpl14*領域のPCR増幅確認には文献4に基づき、下記のプライマーセットを使用した。

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'

以下、これらのプライマーセットを使用し各種条件でPCRを行った。

ケシ属植物種子からのゲノムDNAの調製

ケシ属植物種子からのゲノムDNAの調製にはGM quicker 2 (ニッポンジーン)を使用した。種子の粉碎には、ディスパーザブルホモジナイザー バイオマッシャーII (nippi)を使用した(図3)。

種子1粒または10粒をバイオマッシャ

ーIIに入れ、付属のペッスルで30秒間すりつぶしたのち、GE1 buffer 250 ml、Proteinase K 10 ml、RNase A 5 mlを加え、以後キットのプロトコルに従い調製を行い、最終的に30 mLのDNA溶液を得た。このDNA溶液の2 mlを使用し、分光光度計ND-1000 (Thermo)を用い、吸光スペクトルの測定を行い品質及び濃度の確認を行った。

ケシ種子より調製したゲノムDNAに対するPCR増幅試験

予備実験として、上記GM quicker 2を用いケシ(一貫種H13年優良株)種子1粒または10粒より調製したゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。

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

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: iCycler (BioRad)

Primer sets: Pseti21S + Pseti21A, Pr21S + Pr21A

反応液全量をアガロース電気泳動に供し、増幅産物を解析した。

ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシ間における遺伝子鑑別

ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシの3植物の種子1粒または10粒よりGM quicker 2を用いて調製したゲノムDNAについて、特異的プライマーセットを用いた、各植物種の鑑別が可能か検討した。PCR条件、使用したプライマーセットは下記のとおり。

GoTaq Green Master Mixを使用する場合

PCR reaction mixture: GoTaq Green Master Mix (Promega) 3.0 ml, primer sense & antisense (2.5 pmol) 1.0 ml

each, genome DNA template 1.0 ml (reaction volume: 6.0 ml)

PCR condition: 94°C 5 min. - (94°C 30 sec. - 58°C 30 sec. - 72°C 60 sec.) x 30 or 40 cycles - 72°C 10 min. - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

Primer sets: Pseti21S + Pseti21A, Pr21S + Pr21A, 134-10r-Srev2 + 134-10r-Arev

Ampdirect Plus + NovaTaqを使用する場合

PCR reaction mixture: Milli-Q water 7.4 ml, 2X Ampdirect Plus 10 ml, primer sense & antisense (10 pmol) 1.0 ml each, NovaTaq Hot Start DNA Polymerase 0.1 ml, genome DNA template 0.5 ml (reaction volume: 20 ml)

PCR condition: 95°C 10 min. - (94°C 30 sec. - 58°C 60 sec. - 72°C 60 sec.) x 40 cycles - 72°C 7 min. - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

Primer sets: Pseti21S + Pseti21A, Pr21S + Pr21A, 134-10r-Srev2 + 134-10r-Arev

GoTaq Green Master Mixを使用した場合は反応液6.0 mlの全量を、Ampdirect Plus + NovaTaqを使用した場合は反応液の5.0 mlをアガロース電気泳動に供し、増幅産物の解析を行った。

ケシ属種子混合物に対する検知実験

ヒナゲシとアツミゲシの種子を混合し、識別用プライマーで検知を試みた。ヒナゲシに対し、アツミゲシの混入比率100%、90%、50%、10%、0%で検討するため、ヒナゲシとアツミゲシの種子を0:10、1:9、5:5、9:1、10:0 (粒) それぞれ混合し、GM quicker 2でゲノムDNAを調製した。

PCRは特異的識別実験で明瞭な検知バ

ンドを与えたAmpdirect Plus + NovaTaqの系を適用し、PCRサイクル数は40サイクルまたは35サイクルで行った。PCR反応液の5.0 mlをアガロース電気泳動に供し、増幅産物の解析を行った。

食品用ケシ種子の植物種鑑別の試み

加熱処理済みとされる、市販のアンパンに使用されているケシ種子について植物種の鑑別が可能か検討した。アンパンよりケシ種子を黒色のものと白色のものに分けて採取した。採取した種子は1.5 mL容エッペンドルフチューブに入れ、500 mlの70%エタノールを加えて30秒間転倒混和したのち洗浄液を除き風乾した。黒色種子、白色種子それぞれ1粒または10粒よりGM Quicker 2を用いゲノム DNAを調製した。

PCRはAmpdirect Plus + NovaTaqの系で、Pseti21S + Pseti21A, 134-10r-Srev2 + 134-10r-Arevの2種のプライマーセットを用い、40サイクルで行った。PCR反応液のうち5.0 mlをアガロース電気泳動に供し、増幅産物の解析を行った。

FTAカードを使用したケシ、アツミゲシ、そしてヒナゲシの植物種鑑別の試み

ケシ、アツミゲシ、そしてヒナゲシについては、各植物種由来の植物種特異的な4' OMTgクローンについて設計したプライマーを用い、PCR法により識別できることをこれまでに報告している。今回、ゲノムDNAを植物から抽出・精製することなく、簡便かつ迅速に両植物の識別を行う方法として、FTAカードの使用を検討した。

GE Healthcare社製FTA® Plant Card (FTAプラントセーバーカード、以下FTAカード) は植物の新鮮組織を、直接ろ紙状のカード表面で圧力をかけ組織の破碎と同時に破碎物 (ホモジネート) の吸着を行う製品であり、押し花のような簡便な操作でPCRの鋳型として使用可能な品質の核酸の収集・室温保存が可能とされ

るものである。

今回、FTAプラントセーバーカードとPCR反応を阻害する狭雑物の影響に耐性が高いとされるPCR用バッファー Ampdirect Plus (島津製作所) 及びPCRポリマーゼNova Taq Hot Start DNA Polymerase (EMD Millipore社)を併用した、ケシ、アツミゲシ、そしてヒナゲシの迅速かつ簡便な植物種鑑別法について検討を行った。

FTAカードを用いた植物試料の核酸の抽出

FTAカードはGE Healthcare社の取扱説明書に示された使用法に準拠し使用した。まず、FTAカードの表紙(カード1枚4サンプル区画)にサンプルIDを記録し、FTAカードを付属のカッティングマットに乗せた。各植物より収穫した植物試料(新鮮葉)を葉の表面(上面)を上にしてカードに配置し、その上にサランラップを2枚重ねにしてサンプルにかぶせ、丸底のコーニングチューブの底を使いFTAカードの試料位置の中心に押しつけるようにしてすり潰した。(サランラップは1サンプルごとに廃棄、交換する。)その後、カードを自然に乾燥させた。以上の操作で、抽出された核酸がFTAカードに吸着し、安定に保存される。

Ampdirect Plusを使用したPCR法による植物種識別

約8ヶ月、室温にて保管したFTAカードから、清拭したメスを用い、ホモジネーターが乾燥した緑色の部分をおよそ1 mm角に切りだした。

この切片をPCR反応チューブに入れ、PCR反応液(下記)を加えピペッターでよく攪拌したのちPCR反応を開始した。

以下に標準としたPCR反応液組成及び、PCR条件を示す。場合によって、プライマーの濃度、PCRサイクル数を変更した。

PCR反応液組成(以下は、10サンプル用

のマスターミックスの組成を示す) :
ddH₂O 79 ml, 2x Ampdirect Plus 100 ml, NovaTaq Hot Start DNA Polymerase 1 ml, primer sense & antisense (10 mM) 10 ml each, Total 200 ml to 20 ml x 10 aliquots (reaction volume: 20 ml)

PCR conditions: 95°C 10 min. - (94°C 30 sec. - 58°C 1 min. - 72°C 1 min.) x 40 - 72°C 7 min. - 4°C ∞

PCR primer sets:

For *P. somniferum* and *P. setigerum* specific detection: Pseti-21S + Pseti-21A

For *P. rhoeas* specific detection: Pr40MT-21S + Pr40MT-21A

For *P. setigerum* specific detection: 134-10r-Srev2 + 134-10r-Arev

For *rpl16-rpl14* amplification: A-primer + B-primer

GoTaq Green Master Mixを使用する場合は下記のPCR条件で行った。

For genome DNA from fresh leaves:

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

PCR condition: 94°C 5 min. - (94°C 30 sec. - 58°C 30 sec. - 72°C 60 sec.) x 30 cycles - 72°C 10 min. - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

Primer set: Pr21S + Pr21A

For FTA card:

PCR reaction mixture: GoTaq Green Master Mix (Promega) 12 ml, primer sense & antisense (2.5 pmol) 4.0 ml each, water 4.0 ml (reaction volume: 24 ml)

PCR condition: 94°C 5 min. - (94°C 30 sec. - 58°C 30 sec. - 72°C 60 sec.) x 35 cycles - 72°C 10 min. - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

Primer set: Pr21S + Pr21A

いずれもPCR反応液20 mlのうち5 mlをアガロースゲル電気泳動(1.0% アガロースゲル) による解析に供した。

C. 研究結果

1. ケシ属植物種子を検体とする植物種鑑別法開発

ケシ属植物種子からのゲノムDNA調製法

ケシ種子からのゲノムDNAの調製にバイオマッシャーIIとGM quicker 2を利用した場合、その吸光スペクトルから収率、純度は低いことが明らかになった(図4)が、以後のPCR実験ではその品質はPCRの鋳型として問題ないことが示された。

ケシ種子より調製したゲノムDNAに対するPCR増幅試験

予備実験として、GM quicker 2を用いケシ(一貫種H13年優良株)種子1粒または10粒より調製したゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った結果、ケシ及びアツミゲシ特異的プライマーセットPseti21S + Pseti21Aでpositive、ヒナゲシ特異的プライマーセットPr21S + Pr21Aではnegativeとなり、鑑別が可能なが確認された。ただし、非特異的増幅産物やprimer dimerとみられるバンドも認められた(図5)。

ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシ間における遺伝子識別

予備実験で使用したGoTaq Green Master MixをPCR酵素に使用し、30 cycleでPCR行った場合、アツミゲシ(Pseti) 1粒より調製したゲノムDNAを鋳型とした反応系でnegativeとなり検知できず、10粒でかすかにpositiveとなった(図6)。また、ヒナゲシ(Pr)についても増幅効率は低かった。そこで、Ampdirect Plus + NovaTaqの系に変更し、PCRサイクル数を40サイクルに変更したところ、各検体1

粒より調製したゲノムDNAを鋳型とした場合においても明瞭なバンドが検出されるようになった(図7)。再び、PCR酵素をGoTaq Green Master Mixに変更し、サイクル数を40サイクルとしてPCRを行ったが、いずれの検体においても目的のバンドの上部に非特異的増幅が認められた(図8)。

以上のように、Ampdirect Plus + NovaTaqを使用し、40サイクルでPCRを行った場合にもっとも明瞭なバンドが検出されることが判明した。

ケシ属種子混合物に対する検知実験

アツミゲシ特異的134-10r-Srev2 + Arevプライマーセットを使用した場合、アツミゲシ0%以外は全てpositiveとなり、良好に識別ができた(図9a)。一方、ヒナゲシ特異的Pr21S + Pr21Aプライマーセットを使用した場合、40サイクルでは、非特異的増幅産物のバックグラウンドが高い(図9b)ため、35サイクルに減らしたところ、非特異的増幅産物は減少し改善された(図9c)。

以上のように、アツミゲシとヒナゲシの種子の混合物において、それぞれ10%の混入を検知できることが示された。

食品用ケシ種子の植物種鑑別の試み

アンパンに用いられているケシの実(図10)、黒色または白色のもの各1粒よりGM quicker 2で調製したゲノムDNAを鋳型としてケシまたはアツミゲシを認識するPseti21S + Pseti21AプライマーセットでPCRを行ったところ、黒色の1つのみバンドが得られた(図11)。なお、陽性対照としてケシ(一貫種)種子1粒より調製したゲノムDNAを用いた。

続いて、白色種子、黒色種子各10粒より調製したゲノムDNAを鋳型として同様にPCRを行ったところ、両者ともバンドが検出された(図12左)。さらに、アツミゲシ特異的プライマーを用いPCRを行っ

たところ、アンパンのケシ種子検体由来のDNAについては増幅産物を与えなかった(図12右)。以上の結果から、本検体が*P. somniferum*の種子であることが示唆された。なお、ここではアツミゲシ(seti pink 27)種子10粒より調製したゲノムDNAを陽性対照とした。

以上のように、食品のケシ種子について植物種の鑑別を行う場合は1粒では検知確率が25%と低いが、10粒を検体とすれば高い確率で植物種の鑑別が可能であると考えられる。

2. FTAカードを用いたケシ属植物の鑑別法開発

FTAカードを用いたケシ属植物の鑑別

ケシ属植物試料(図13)より、FTAカードにサンプリングし、室温(約20-25°C)で約8ヶ月保存したFTAカードの約1 mm角切片を、PCR反応液に添加し(図14)、植物種特異的プライマーセットを適用しPCRを行うことにより、植物種特異的に増幅産物が得られ、植物種の鑑別が可能か検討した。

はじめに、*rpl16-rpl14*領域のPCR増幅を行ったところ、いずれの試料について約550 bpの増幅産物が得られ、FTAカード上でDNAの品質は保持されていることが確認された(図15)。

アツミゲシ特異的プライマーセット(134-10r-Srev2 + Arev)を適用した場合は、アツミゲシを試料とした場合のみ特異的増幅産物のバンドを与え、アツミゲシ特異的な検知ができることが示された(図16)。

ケシ・アツミゲシ共通プライマーセット(Pseti 21S + 21A)では、プライマー濃度0.5 mM(最終濃度)では、ヒナゲシ、ナガミヒナゲシについて非特異的と考えられる増幅産物が認められたが(図17(a))、プライマー濃度を0.125 mM(最終濃度)に下げることによって、ケシ及びアツミゲシを試料とした場合にのみ、

特異的増幅産物のバンドが得られ、両植物種の特異的な検知ができることが示された(図17(b))。

ヒナゲシについては、ヒナゲシ特異的プライマーセット(Pr21S + 21A)を用い、はじめに、プライマー濃度0.5 mM(最終濃度)、PCRサイクル数35サイクルでPCRを行ったところ、すべてのケシ属植物試料について同様のサイズのPCR産物を与え、植物種の鑑別が不可能であった(図18(a))。

そこで、プライマー濃度を1/4の0.125 mM(最終濃度)に下げ、PCRサイクル数を30サイクルに減らし、同様にPCRを試みたところ、ケシ及びアツミゲシについて増幅産物は認められなくなったが、ナガミヒナゲシについてはかすかに増幅産物が認められ、ヒナゲシとナガミヒナゲシ両植物種間の鑑別ができなかった(図18(b))。また同プライマー濃度で、サイクル数を35サイクルとすると、プライマー濃度0.5 mM(最終濃度)の結果と同様に、すべてのケシ属植物試料について同様のサイズのPCR産物が認められた(図18(c))。

ヒナゲシ特異的プライマーについて特異性を改めて確認するために、ヒナゲシ及びナガミヒナゲシ両試料の新鮮葉から調製したゲノムDNAを鋳型として、PCR酵素にGoTaq Green Master Mixを用いPCRを行ったところ、このプライマーはヒナゲシのゲノムDNAを鋳型としたときのみPCR産物を与え、すなわち、ヒナゲシ特異的であることが示された(図19)。

そこで、PCR酵素にGoTaq Green Master Mixを用い、反応液にFTAカード片を添加し、PCRを試みたが、35サイクルのPCRで増幅産物は認められなかった(図20)。

以上のように、FTAカードを用い採取・保存したケシ属植物のDNA検体について、ケシ及びアツミゲシの植物種特異的な鑑別、検知が可能であることが示された。一方、ヒナゲシについては、FTAカードで

採集した試料について、ヒナゲシ特異的な植物種の鑑別は達成できていないが、新鮮葉を試料とする場合は確実に鑑別が可能なことが示された。以上のケシ属植物の鑑別結果について図21にまとめた。

D. 考察

ケシ属植物種子からのゲノムDNA調製法

ケシ属植物種子よりバイオマッシャーIIとGM quicker 2を用い調製したゲノムDNAの収率、純度は低かったが、PCRの鋳型としてのゲノムDNA調製法としては、効率的であり、十分実用レベルであることが示された。

ケシ属植物種子1粒を検体とする検知、植物種鑑別法

上記DNA調製法によって得られたゲノムDNAを鋳型として、植物種特異的プライマーを用いPCRを行ったところ、各植物種子1粒より調製したゲノムDNAを鋳型とした場合においても、Ampdirect Plus + Nova Taqを使用し、40サイクルでPCRを行った場合それぞれ明瞭な特異的バンドが得られることが示された。一方、アツミゲシとヒナゲシ種子を混合し、それぞれの検知を行った場合、Ampdirect Plus + Nova Taq、40サイクルでPCRを行うとアツミゲシ特異的プライマーではすべての混合比率において

非特異的バンド等は出現しなかったが、ヒナゲシ特異的プライマーを使用した場合は、ヒナゲシ0%の場合も交叉反応に因ると考えられる偽陽性バンドが出現し、このバンドはPCRサイクル数を35に減らすことで改善されることが判明した。したがって、未知試料を検体としてヒナゲシ特異的プライマーを用い、Ampdirect Plus + Nova Taqの系でPCRを行う場合、PCRサイクル数は35サイクルで実施することが望ましいと考えられる。

食品用ケシ種子の植物種鑑別の試み

食品用途のケシ種子について、本研究で開発したプライマーを適用し植物種鑑別を試みたところ、白色種子、黒色種子それぞれ1粒2検体について検討した場合は、そのうち黒色種子の一方のみ検知され、検知の確率は25%であった。これは、加熱処理によりDNAが分解されているためと考えられる。種子10粒より調製した場合は植物種の鑑別が可能であり、実際の食品用ケシ種子の鑑別では実用レベルではないかと考えられる。

以上のように、ケシ属植物種子については、市販のディスプレイホルモジナイザーと遺伝子調製キットを使用することにより、種子1粒を検体とした場合でも、良好に植物種鑑別が可能なことが示された。本手法は、栽培が厳しく規制されている植物種を含むケシ属植物の植物種鑑別が、未発芽の種子の段階で可能であることから、非常に有用であると考えられる。また、試料を混合した場合についても10%の混入を検知できることから、市販の植物種子中の違法ケシ種子の混入等の検知にも応用可能と期待される。

FTAカードを用いた植物種鑑別

FTAカードを用いた植物種鑑別については、ヒナゲシの植物種鑑別に不確実な部分が残るものの、アツミゲシ及びケシの鑑別には成功した。ヒナゲシについてはFTAカード上でDNAの分解が生じ、定性的な増幅ができなくなっている可能性もあるが、約550 bpの葉緑体DNAの増幅結果から、FTAカード上でのDNAの劣化はPCRレベルでは問題ないと見られる。

NovaTaqとGoTaq Green Master Mixを比較すると、NovaTaqはAmpdirect plusとの併用によりFTAカード試料を鋳型とした、夾雑物の多い条件で直接増幅ができるメリットがあるが、特異性が低い傾向が認められた。またGoTaq Green Master Mixについては、特異性は高く、新鮮葉より