

調製したゲノムDNAについては、ヒナゲシ特異的な鑑別には威力を発揮するものの、FTAカードを反応液に直接加えるようなPCR条件には対応できないようであった。

今後、PCR条件やPCR酵素などを最適化することにより、より正確性の高い植物種鑑別が可能になると考えられる。

E. 結論

植物種が近縁であり、形態による識別が難しいケシ属植物の種子、1粒を検体としてケシ、アツミゲシ、そしてヒナゲシの各植物種の鑑別が可能な手法の開発に成功した。また、食品用途のケシ種子の植物種鑑別にも成功した。これらの手法は、実際に発芽させ植物の形態を確認することが困難なケシ属植物の、植物種鑑別に威力を発揮するものと期待される。

また、フィールドでの簡便なDNA検体の採集、ならびに室温での検体の保管が可能な、FTAカードで採集した核酸試料を検体とした植物種鑑別法について検討した。その結果、8ヶ月を超える期間、室温で保存したFTAカードを検体として、規制対象植物である、アツミゲシ、ケシの特異的検知が可能であることが示された。本手法は、フィールドでの試料採取から保管まで、冷蔵施設等を必要とせず、実用性が非常に高いシステムと考えられる。

以上のように、形態や含有成分の情報を用いた識別に依存していたケシ属植物の鑑別について、遺伝子情報を用いることにより、より客観的かつ迅速、簡便に行えることが示された。さらに、麻薬性化合物等の標品を使用しない、簡便に実施可能な実用的鑑別法として整備することに成功した。

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)

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23年度総括・分担研究報告書, pp. 99-109, 平成24年3月

(文献4)

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

1) 河野徳昭, 吉松嘉代, 川原信夫, 合田幸広, ケシ属植物の実用的遺伝子鑑別法の開発, 日本薬学会第133年会(2013年3

月，横浜)

I. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

(図表)

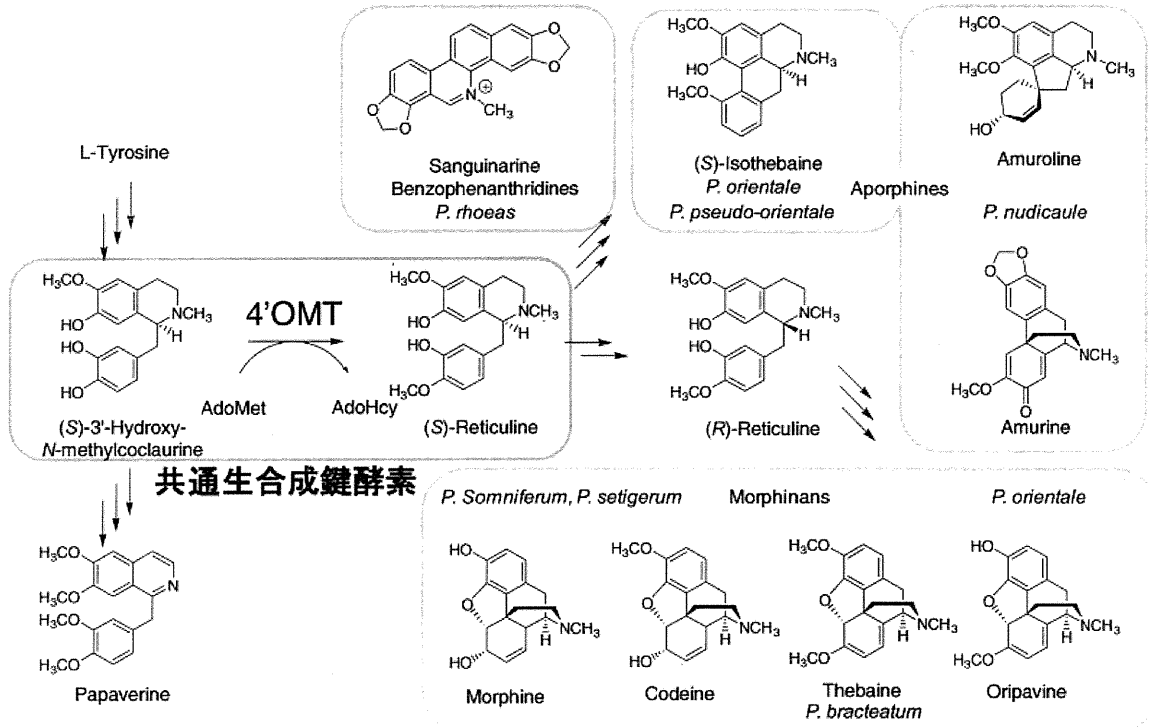


図1. ケシ属植物に広く存在するアルカロイド生成経路の共通鍵酵素4'OMT

ケシ属植物種識別用プライマーセットの選択

プライマーセット	ケシ	アツミゲシ	ヒナゲシ	その他
ケシ・アツミゲシプライマー Pseti21S + A	+	+	-	-
ヒナゲシプライマー Pr21S + A	-	-	+	-
アツミゲシプライマー 134-10r-Srev2 + Arev	-	+	-	-

その他: オニゲシ、プソイドオリエンターレ、ハカマオニゲシ、シベリアヒナゲシ
+:PCR陽性、 -:PCR陰性

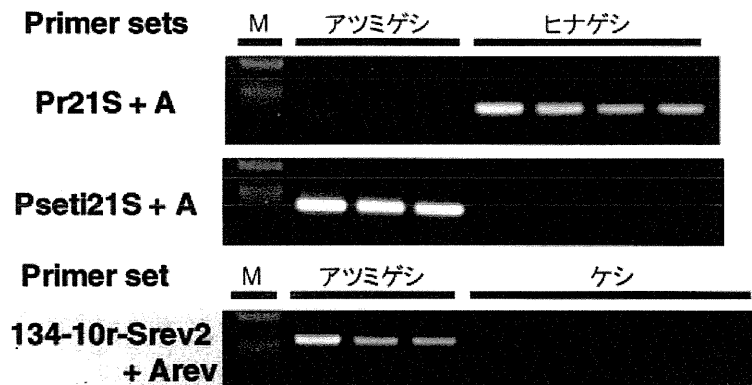


図2. ケシ属植物識別用プライマーとそのPCR識別結果

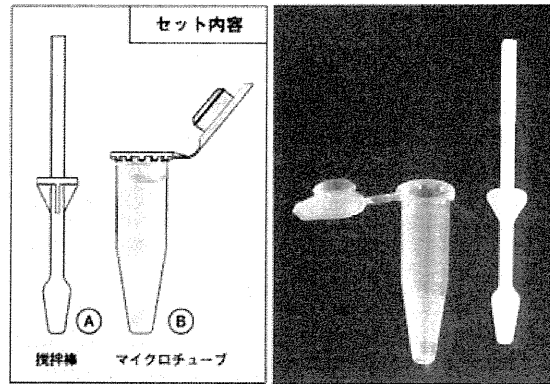


図3. ケシ属植物種子の破碎に使用したバイオマッシャーII (nippi)

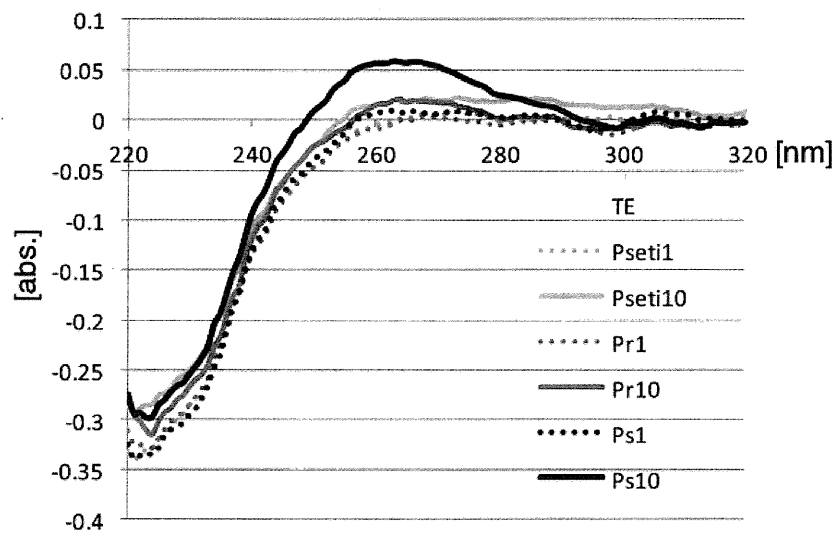


図4. ケシ属種子より調製したゲノムDNAの吸光スペクトル

TE: TE (pH 8.0) 溶出溶液、Pseti1: アツミゲシ1粒、Pseti10: アツミゲシ10粒、Pr1: ヒナゲシ1粒、Pr10: ヒナゲシ10粒、Ps1: ケシ1粒、Ps10: ケシ10粒、

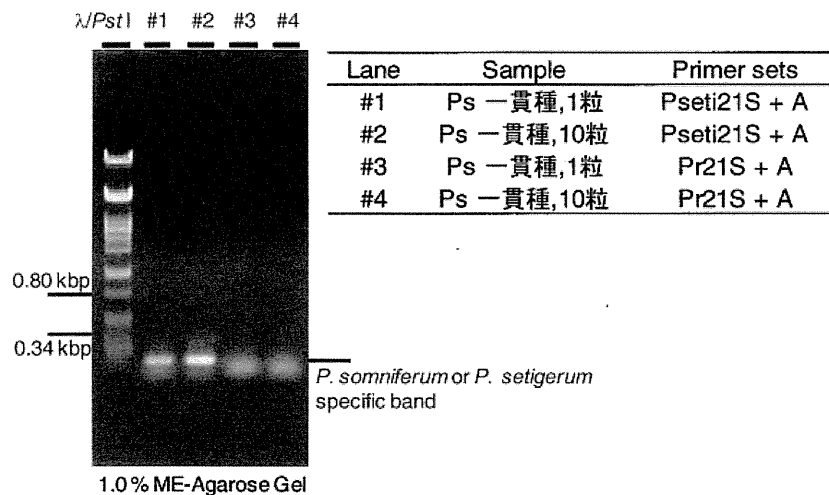


図5. ケシ(一貫種)種子より調製したゲノムDNAを鋳型としたPCR結果(予備実験)

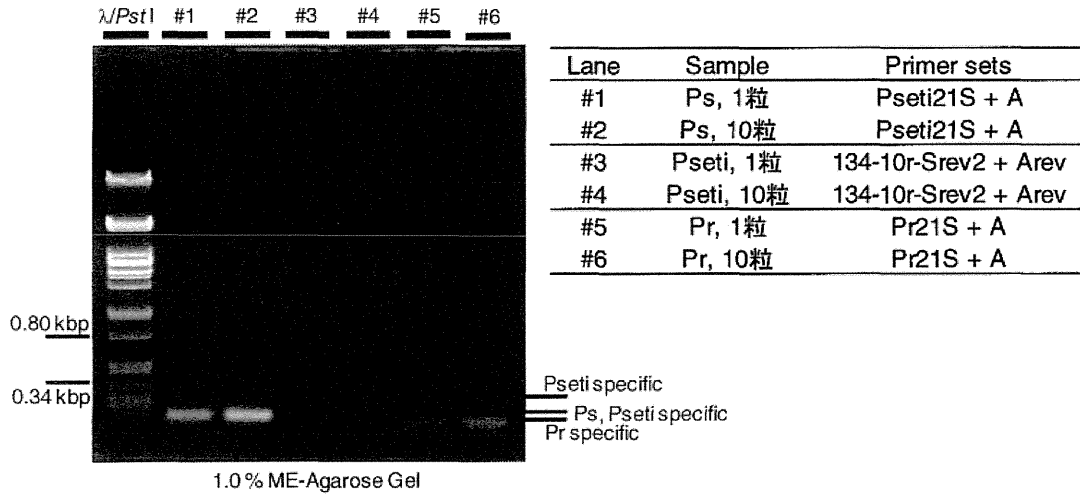


図6. ケシ属植物特異的プライマーによる検出 (GoTaq Green Master Mix, 30 cycle)

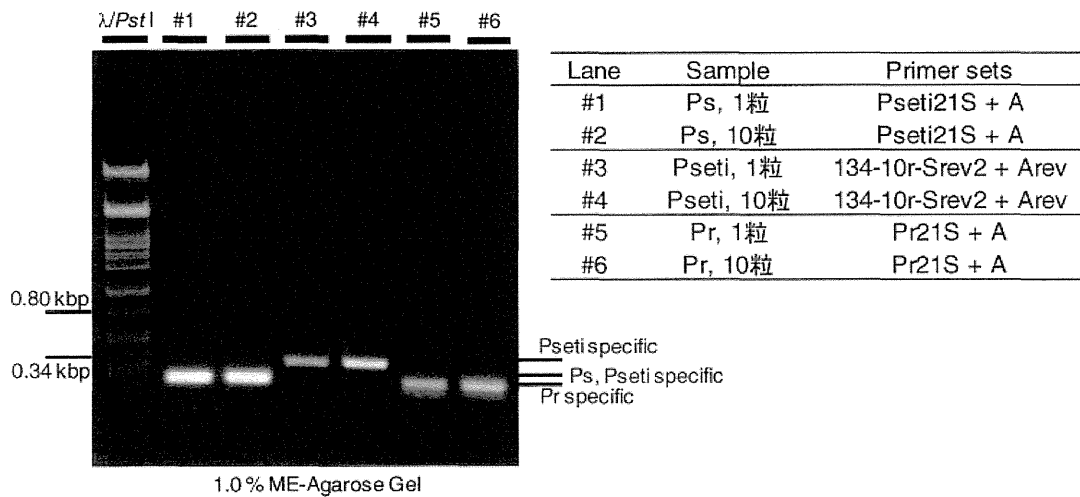


図7. ケシ属植物特異的プライマーによる検出 (Ampdirect Plus + NovaTaq, 40 cycle)

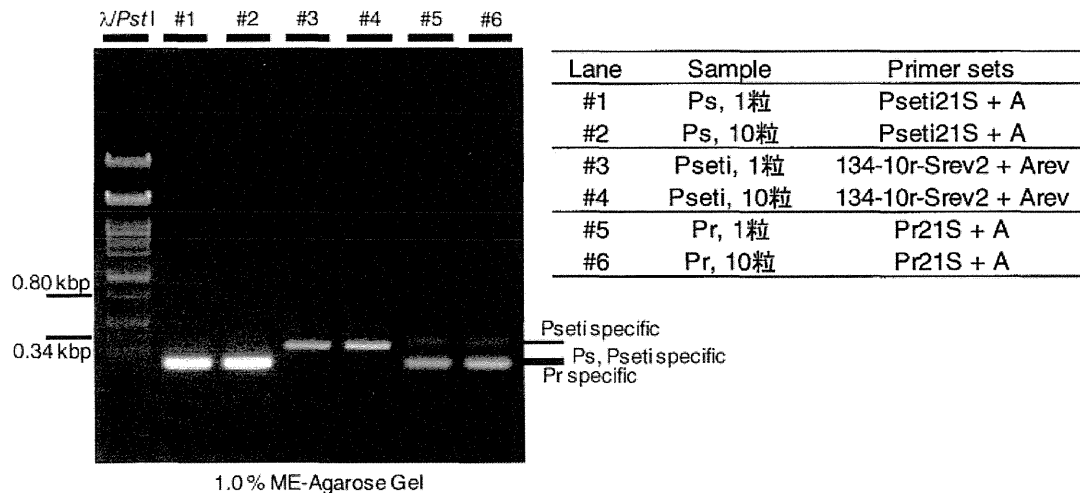


図8. ケシ属植物特異的プライマーによる検出 (GoTaq Green Master Mix, 40 cycle)

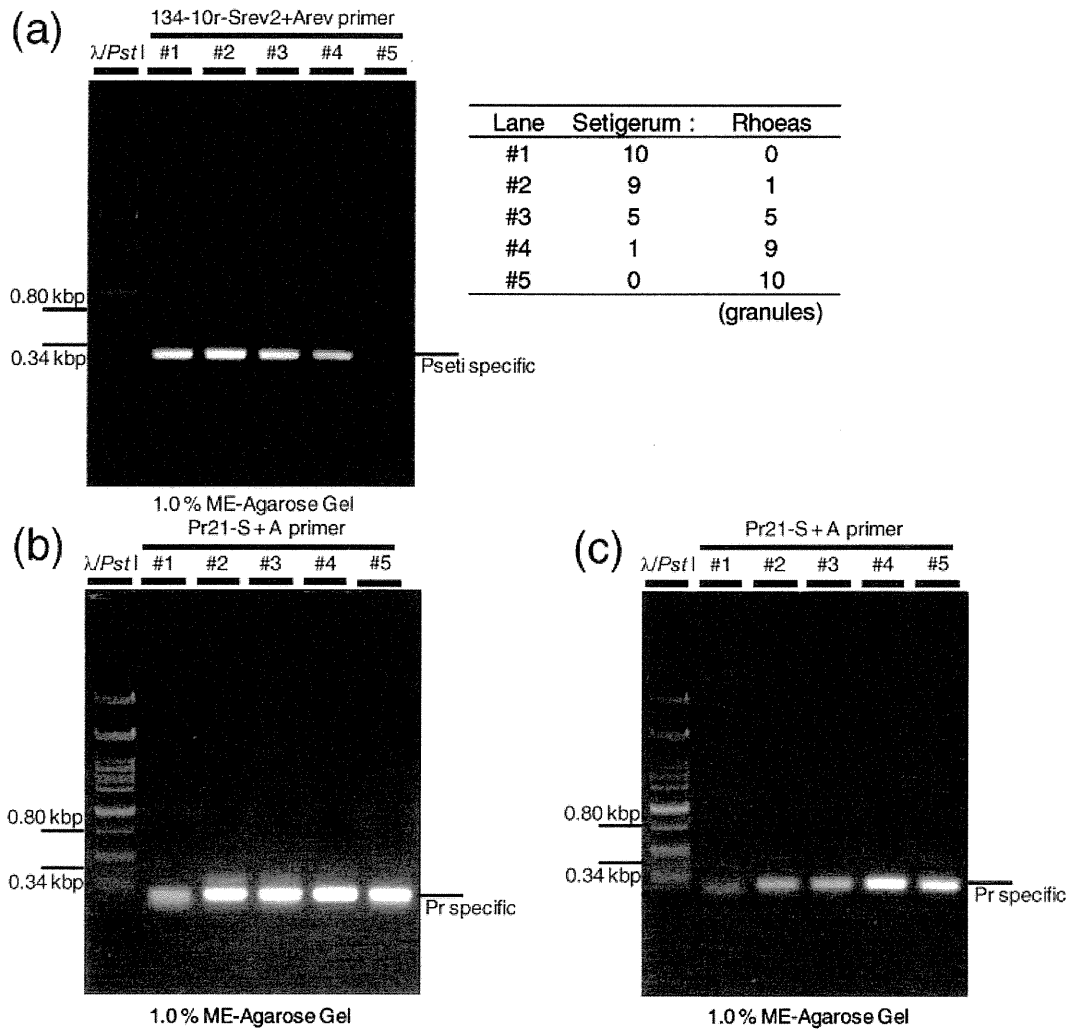


図9. ヒナゲシ、アツミゲシ混合種子検体に対するPCR法による植物種特異的検知結果
 (a) アツミゲシ特異的プライマー (PCR: 40 cycle), (b) ヒナゲシ特異的プライマー (PCR: 40 cycle), (c) ヒナゲシ特異的プライマー (PCR: 35 cycle)

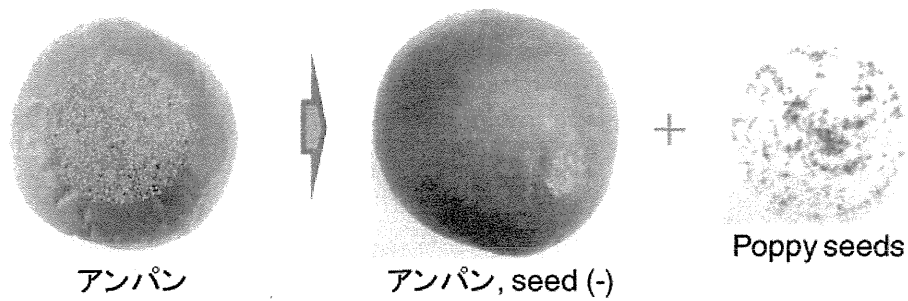


図10. 食品用罂粟種子検体の市販アンパンからの採取

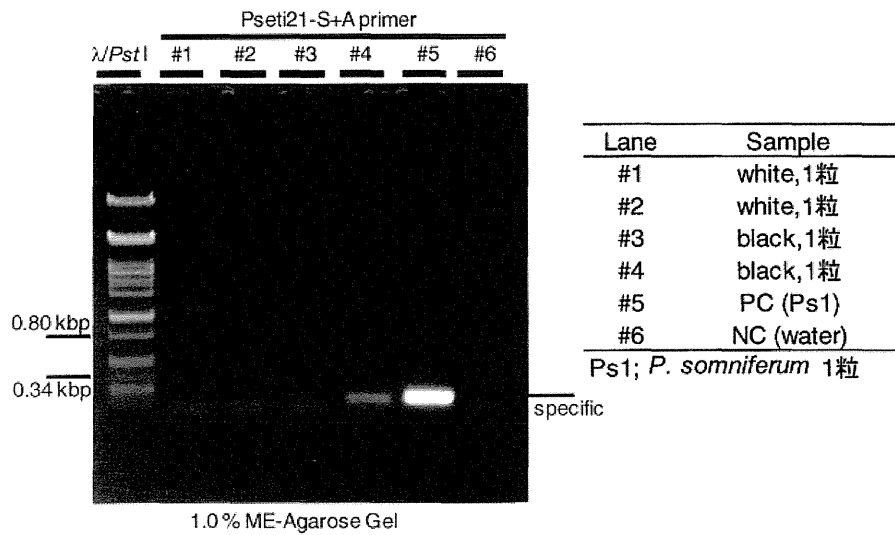


図11. アンパンより採取した罂粟種子1粒より調製したゲノムDNAを鋳型としたPCRの結果

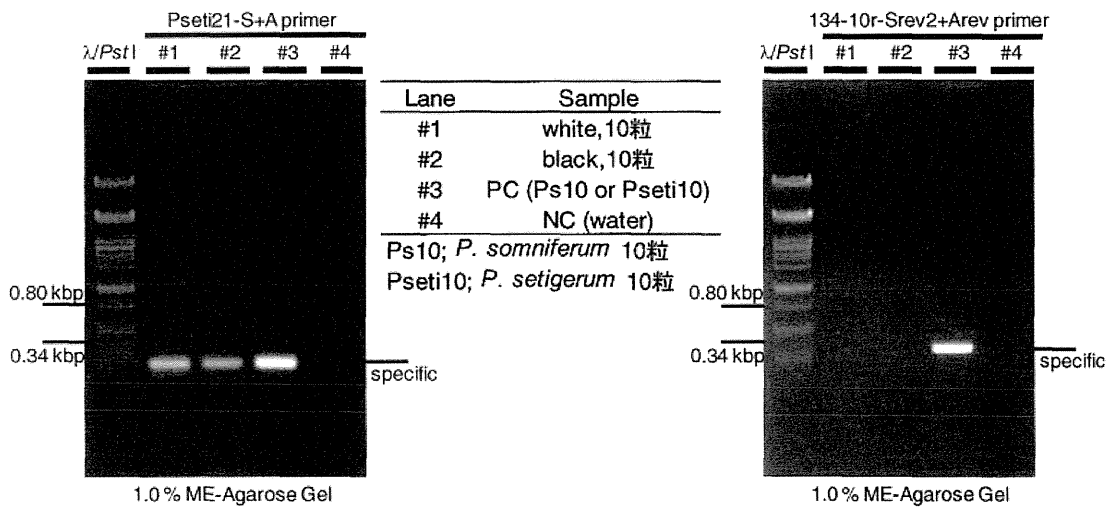


図12. アンパンより採取した種子10粒より調製したゲノムDNAを鋳型としたPCRの結果
罂粟、アツミゲシ共通プライマー(左)ではPs10を、アツミゲシ特異的プライマー(右)では
Pseti10を陽性対照とした。

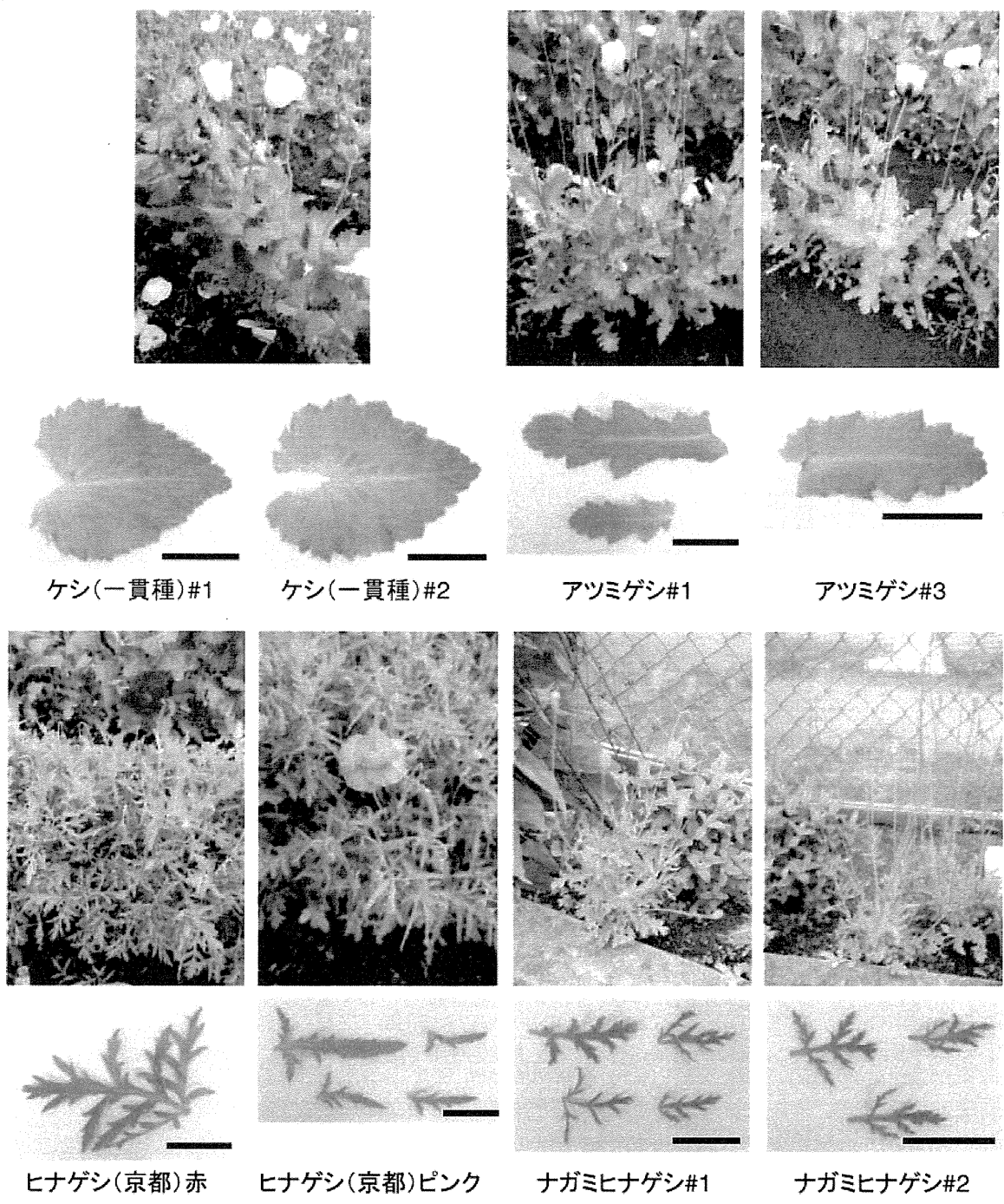


図13. FTAカードを用いた植物種鑑別の検討に用いたケシ属植物
 ケシ(一貫種)の全体写真は代表的な株のもの。その他の写真は試料採取株のもの。
 (bar: 5 cm)

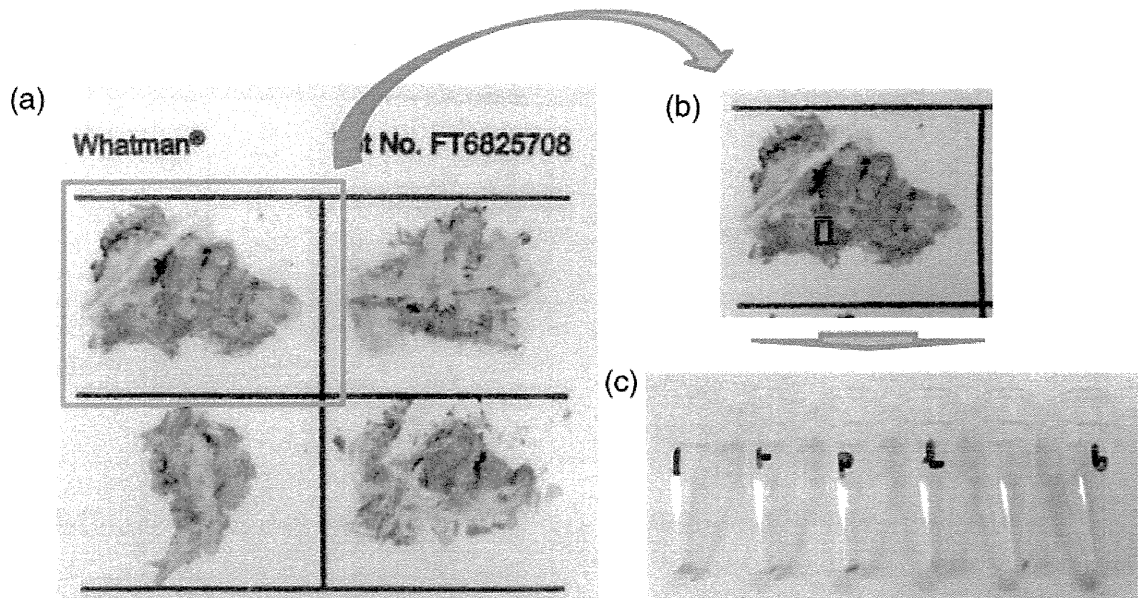


図14. FTAカードを用い保存した検体の切り出し、PCRチューブへのサンプリング
 (a)FTAカードでの保存状態、(b)メスで切り出した部分(枠囲み部分)、(c)約1 mm 角の切片をPCRチューブへ添加。

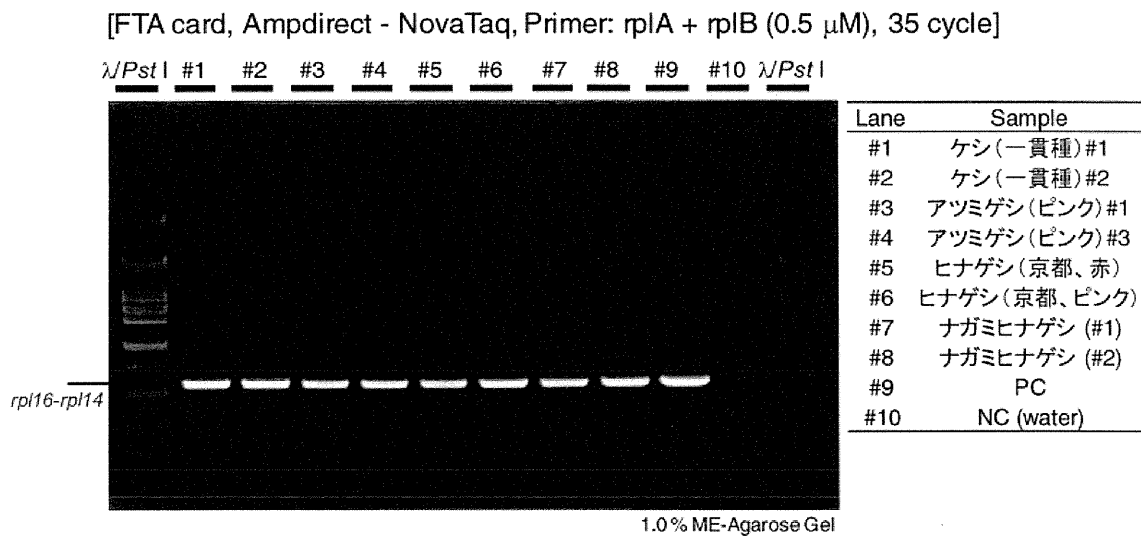


図15. FTAカード保存試料を検体とする葉緑体DNA *rpl16-rpl14*領域のPCR増幅結果

[FTA card, Ampdirect - NovaTaq, Primer: 134-10r-Srev2 + Arev (0.5 μ M), 40 cycle]

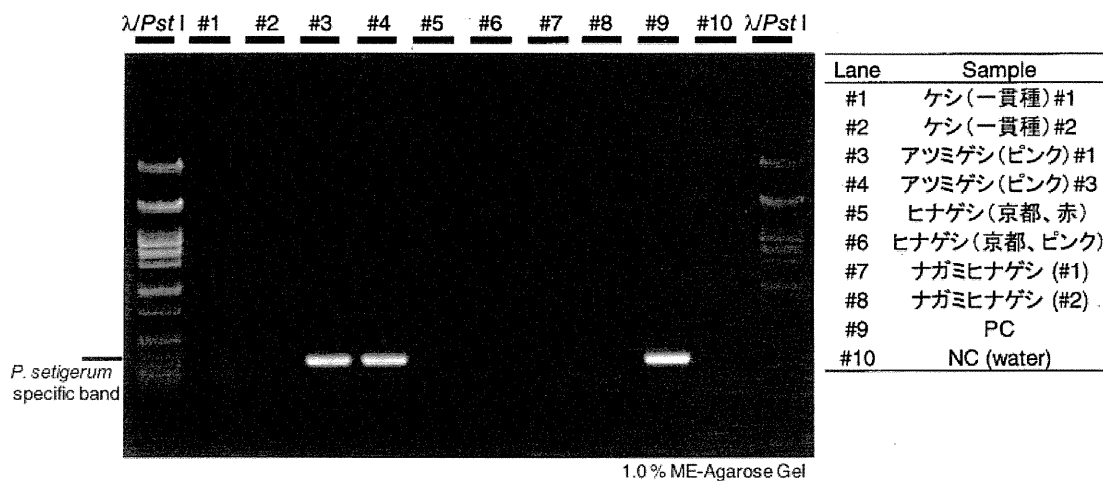
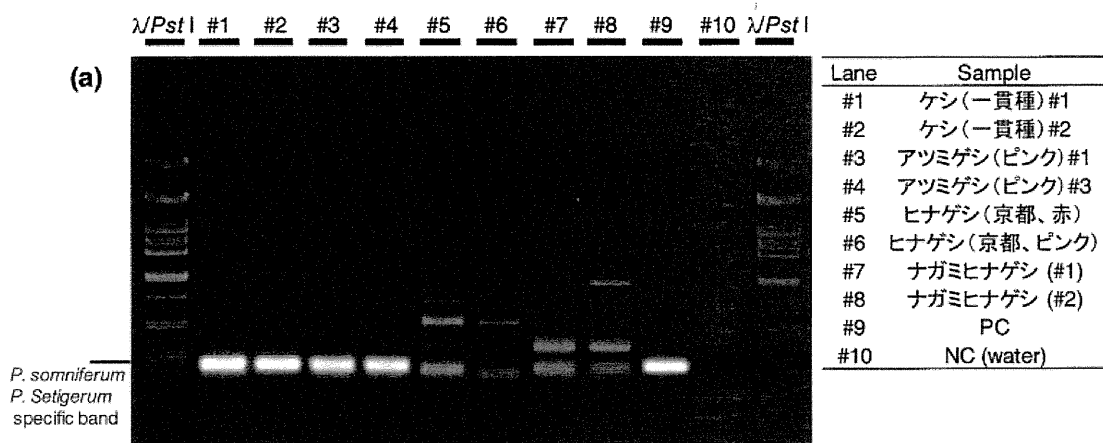


図16. FTAカード保存試料を検体とするアツミゲシのPCRによる特異的検出結果

[FTA card, Ampdirect - NovaTaq, Primer: Pseti 21S + 21A (0.5 μ M), 35 cycle]



[FTA card, Ampdirect - NovaTaq, Primer: Pseti 21S + 21A (0.125 μ M), 35 cycle]

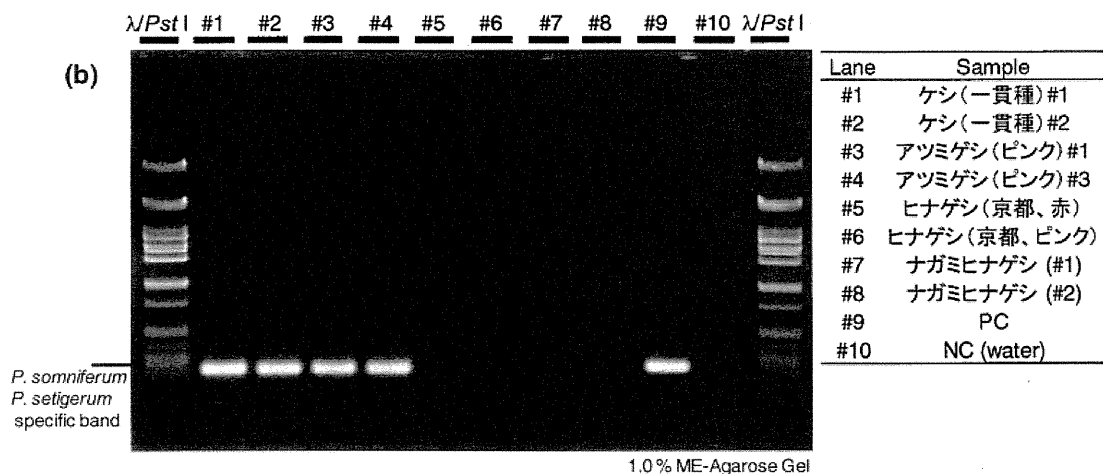


図17. FTAカード保存試料を検体とするケシ及びアツミゲシのPCRによる特異的検出結果
(a)プライマー濃度0.5 μ Mでの増幅結果, (b)プライマー濃度0.125 μ Mでの増幅結果

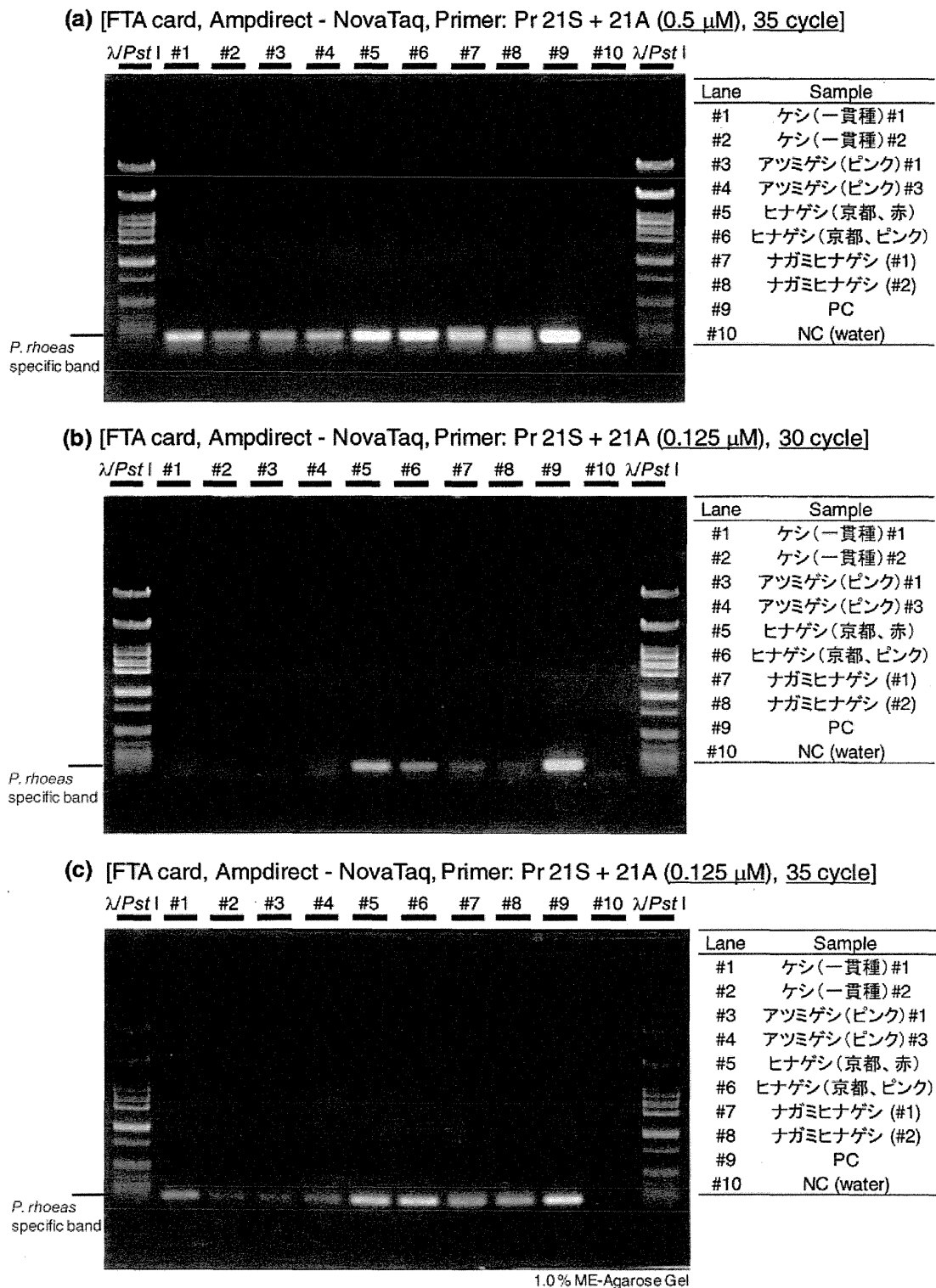


図18 . FTAカード保存試料を検体とするヒナゲシのPCRによる特異的検出結果
 (a)プライマー濃度0.5 μ M、35 cycleでの増幅結果, (b)プライマー濃度0.125 μ M、30 cycleでの増幅結果,
 (c)プライマー濃度0.125 μ M、35 cycleでの増幅結果

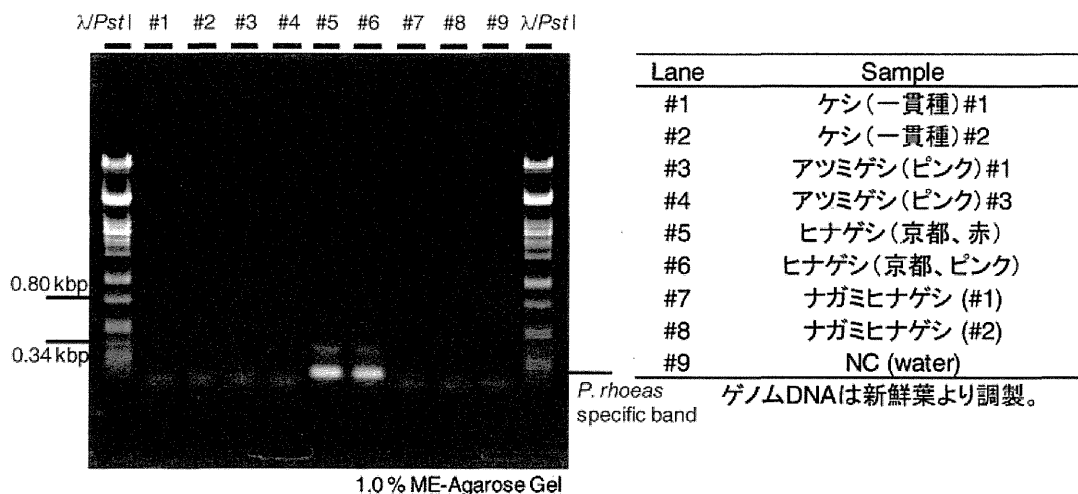


図19. 新鮮葉抽出DNAを検体とするヒナゲシのPCRによる特異的検出結果

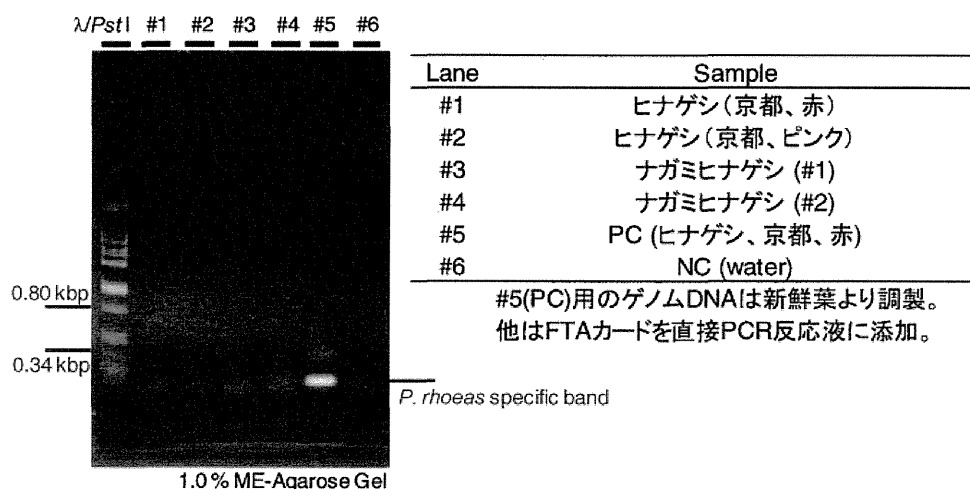


図20. FTAカード保存試料を検体とするヒナゲシのPCRによる特異的検出結果

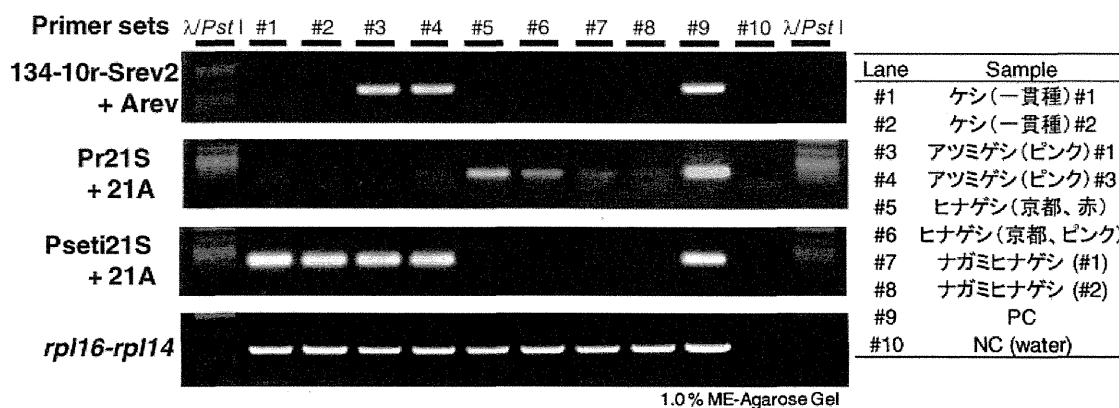


図21. FTAカード保存試料を検体とするケシ属植物のPCRによる鑑別結果(まとめ)

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

免疫化学的手法による幻覚性サルビアならびにチャット鑑別法の開発

要旨 幻覚性サルビアの幻覚成分であるサルビノリン A (SalA) に対する抗 SalA MAb の高機能化を目的に、抗 SalA MAb 産生ハイブリドーマを用いて組換え抗体の作成を試みた。また、昨年度に作製したカートに含有される麻薬成分であるカチノンに対する抗 CA MAb を用いた ELISA についてより詳細な検討を行った。

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

麻薬や覚醒剤などは法律により厳しく規制される一方、幻覚性植物がそれらの代用としてお香（スモークインセンス）や植物標本、観賞用植物などの名目で法律や監視の目を潜り抜けて売られてきた。これらはいわゆる「違法ドラッグ」であり、含有される成分が麻薬や覚せい剤、医薬品などの化合物とその構造が類似するものも多い。これら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、また、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記憶に新しい。また、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。

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、現在乱用が危惧されている幻覚性サルビア並びにチャットの鑑別を目的として、含有成分であるサルビノリン A (SalA)、カチノン (CA) に対する選択性の高い抗体を作製し、免疫化学的鑑別法を構築することを目的としている。

本年度は、既に作製している抗 SalA monoclonal antibody (anti-SalA MAb) 産生ハイブリドーマを材料として、より安価に調製可能で、高機能化が可能な組換え抗体の作製を試みた。さらに、昨年度作製した抗 CA MAb を用いた ELISA についてもより詳細に検討を加えた。

B. 研究方法

1. サルビノリン A (SalA) に対する組換え抗体の作製

1-1. SalA に対する antigen-binding fragment (Fab) 遺伝子の作製

SalA を認識する Fab を作製するために、既に作製している抗 SalA モノクローナル抗体 (MAb) 産生ハイブリドーマから mRNA を得、続いて cDNA の調製を行った。続いて、VH-CH1、軽鎖をコードする遺伝子を増幅し、増幅した遺伝子の配列が正しいことを確認した。得られた遺伝子について配列の解析を行い、抗体の可変部をコードしていることを見極めた。

1-2. 抗 Sal A Fab の大量発現

各種抗体遺伝子を発現用ベクター pET28a(+) に導入したのち、大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。形質転換体を培養し、IPTG を添加することで組換えタンパク質の発現誘導を行った。次に、封入体に発現した各々の組換え抗体をニッケルキレートクロマトグラフィーにより VH-CH1、軽鎖を精製した。

精製した VH-CH1、軽鎖を同濃度で混和したのち、透析法による巻き戻しを行った。続いて、抗 SalA MAb との比較を行うことで、調製した Fab の反応性、特異性について、その有用性を見極めた。

2. 抗 CA MAb を活用した直接的 ELISA の開発

2-1. 抗 CA MAb の作製

ノルエフェドリンからアミノ基の保護、ベンジル位ヒドロキシ基の酸化、そして脱保護により CA を得た後、リンカーとしてスクシニル基をアミノ基に導入しハプテンを合成した。続いて、カルボジイミド法により牛血清アルブミン (BSA) とハプテンを結合することで CA-BSA コンジュゲートを合成した。本タンパク複合体を抗原として、マウスに免疫感作を行い、十分な血中抗体価が得られた段階で、脾臓を摘出し、脾細胞を調製した後、ミエローマ細胞との細胞融合を行い、続いて、アミノプテリンを含んだ培地で融合細胞を培養することで、選択的にハイブリドーマを得た後、CA 並びに関連化合物を認識する抗体を産生するハイブリドーマのみを選抜した。その後、クローニングによりクローン細胞を得た後に、大量培養を行い、続いて、大量培養した後の培養上清をプロテイン G カラムに付すことで純度の高いモノクローナル抗体を調製した。

2-2. ELISA の構築

各種濃度の CA 溶液に水溶性カルボジイミドと *N*-ヒドロキシコハク酸イミドを加え活性化し、さらに BSA と反応させることで CA-BSA コンジュゲートを合成した。反応溶液をイムノプレートに分注し、CA-BSA を固相化した後、抗 CA MAb と反応させた。続いて、二次抗体による抗原-抗体複合体の酵素標識を行い、最後に基質を加えて発色させた。

C. 研究結果

1. サルビノリン A (SalA) に対する組換え抗体の作製

抗 SalA MAb の可変領域の遺伝子を解析した結果、**図 1** に示すようなアミノ酸配列をコードしていることが判明した。VH, VL 各断片には 3 つの CDR 部位が含まれており、さらにマウスの IgG の可変領域に特徴的な配列を確認することができた。CH1, CL の配列は、該当するマウスの定常領域の配列と完全に一致したことから、目的とする抗体遺伝子のクローニングに成功したものと判断した。

各々の組換え抗体が抗原認識能を有することを確認するために、Fab 遺伝子を大腸菌発現

用ベクター pET28a(+) に組み込み、その後大量発現用大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。形質転換体を培養後、IPTG 添加による組換えタンパク質の誘導を行ったところ、予想通り不溶性画分に大量に発現していることを確認した。不溶性画分を 8M 尿素溶液で可溶化後、His タグ融合組換えタンパク質をニッケルキレートクロマトグラフィーにより実施した。その結果、**図 2** に示すように単一バンドにまで精製することができた。収量は、十分高く (VH-CH1: 19.4 mg/L LB 培地、軽鎖: 1.9 mg/L LB 培地)、本手法により抗 SalA 組換え抗体の大量調製法を構築することができた。

不溶性画分に発現したタンパクは不活性な状態で発現するため、巻き戻しが必要となる。本実験では、様々な巻き戻し法の中から効率的な再生が期待できる透析法を採用した。Fab の巻き戻しについては、VH-CH1, 軽鎖を等量混和した後、巻き戻しを実施した。

巻き戻しの完了した Fab について SalA-HSA (ヒト血清アルブミン) を固相化抗原とした ELISA を行った。その結果、固相化抗原に対する反応性を確認することができなかった。

2. 抗 CA MAb の作製と 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。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 を直接カルボジイミド法により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 を検出可能な感度の高い ELISA の開発に成功した (検量域: 0.078~10 μ g/ml) (**図 3**)。

本研究成果により、簡便高感度なチャット (*Catha edulis*) 鑑別法の構築が可能と考えられる。

D. 考察

現在、抗 SalA 組換え抗体の大量調製法の構築に成功しているものの、抗原認識能を確認することが出来ていない現状にある。今後、組換え抗体の巻き戻しについて詳細な解析を行う

必要がある。特に、正しいジスルフィド結合形成を促すために、巻き戻しの際に添加する還元剤、酸化剤の選定、濃度の調整は重要な検討課題といえる。大腸菌による活性を保持した組換え抗体の発現が困難な場合には、巻き戻しを必要としないカイコを用いた発現系を検討する計画である。カイコを用いた発現系で得られた組換え抗体についても活性が確認できない場合には、クローニングした遺伝子の再検討を進める必要がある。改めて、各可変領域の遺伝子の増幅を行い、正しい配列をもつ遺伝子を得るための実験を進める。

抗 CA MAb を用いた直接的 ELISA を開発し、チャットの鑑別に利用できる可能性を示すことができた。今後は、感度の向上を目指した分析法の改良を検討している。さらに、作製した抗 CA MAb は遊離の CA に対する反応性を示さないことから、抗体が反応性を有する CA 誘導体を見出し、誘導体をターゲットとした間接競合法による ELISA を構築していきたいと考えている。

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 Yukihiro 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

学会発表

- 1) ポウデル マダン クマル、田中宏幸、田畑香織、森元 聡、代田 修、関田節子、免疫化学的手法によるチャット鑑別法の開発、日本生薬学会第 59 回年会 (2012 年 9 月, 千葉) .
- 2) Paudel M. K., Shirota O., Sekita S., Tanaka H., Morimoto S., Development of an immunochemical differentiation method for *Salvia divinorum*, International Congress on Natural Products Research (2012 Aug., New York).

VH EVQVVESGGDLVKPGGSLKLSCAAS**GFTFSTYAM**SWVHQTP
 CDR-H1

KRLEWVAS**ISTGDNTYYPDSV**KGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYY
 CDR-H2

CAR**GDWAYYYGSR**SYWYFDVWGAGTTVTVSS (126AA)
 CDR-H3

VL DIQLTQSPASLSASVGETVTIT**CGASENIYGALN**WYQRKQGKSPQ
 CDR-L1

LLIY**GVTNLADG**MSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDV
 CDR-L2

ATYYC**QNVLSAPFT**FGSGTKLEIKR (108AA)
 CDR-L3

図 1 : 抗 SalA 抗体の変換領域のアミノ酸配列 (CDR:相補性決定領域)

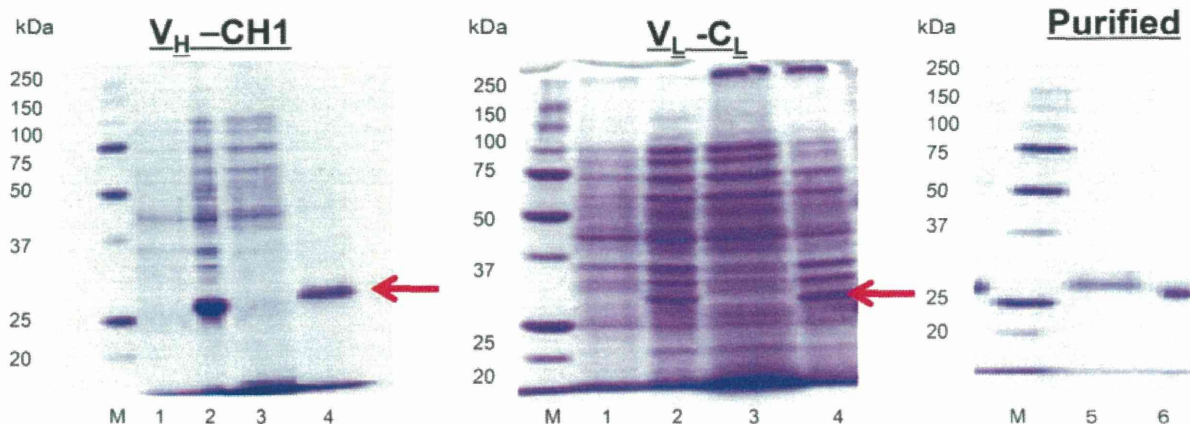


図 2 : SDS-PAGE による抗 SalA 組換え抗体の発現

M : 分子量マーカー ; Lane 1 : 発現誘導前 ; Lane 2 : 発現誘導後 ; Lane 3 : 可溶性画分 ; Lane 4 : 不溶性画分 ; 精製した組換え抗体 (Lane 5 : **VH-CH1** ; Lane 6 : **VL-CL**)

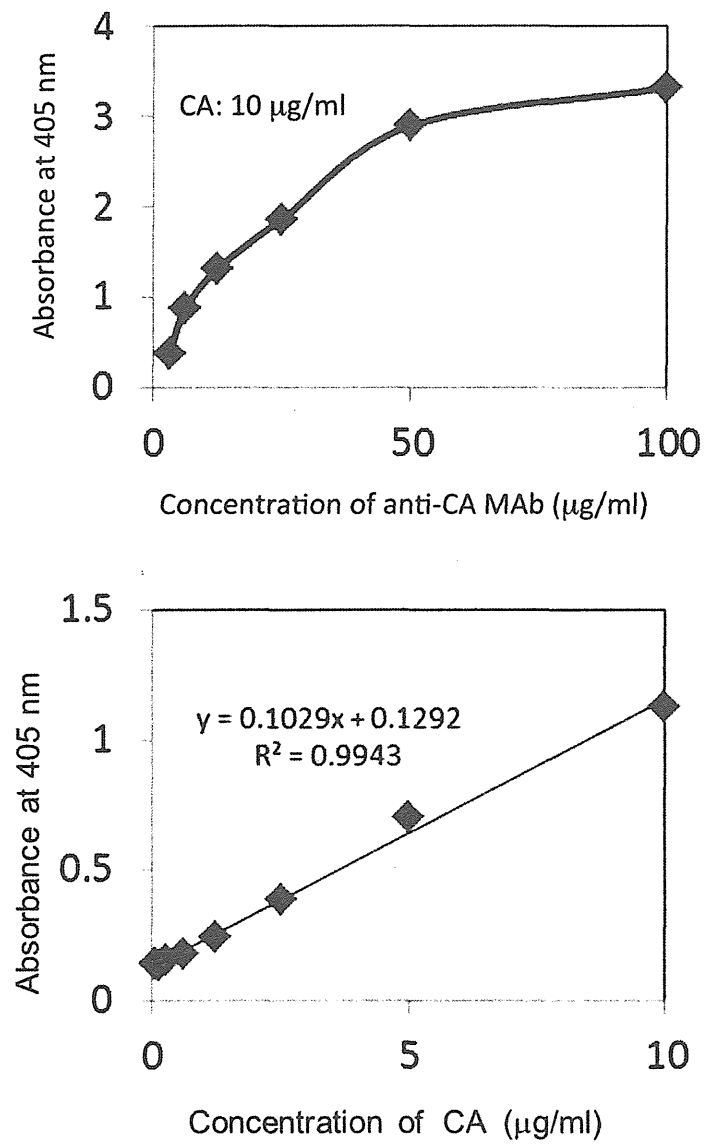


図3：直接的ELISAによるCA-BSAコンジュゲートの検出 抗CA MAb:10 [g/ml]

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

発表者氏名	タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Tsumura, Y.他	A survey of the potency of Japanese illicit cannabis in fiscal year 2010	Forensic Science International	221	77-83	2012
津村ゆかり	絶え間なく出現する違法ドラッグを化学の力で識別する	化学と教育	60(8)	348-349	2012
Kawano, N.他	Genetic and phenotypic analyses of a Papaver somniferum T-DNA insertional mutant with altered alkaloid composition	Pharmaceuticals	5	133-154	2012
Ohno, A.他	A metabolic study on the biochemical effects of Levomethorphan/Dextromethorphan in rats using ¹ H-NMR spectroscopy	Yakugaku Zasshi	submitted		

新聞報道

「危険性を増す大麻」	読売新聞朝刊	12月31日	2012
------------	--------	--------	------

