

違法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究

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:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—植物系危険ドラッグ製品のメタノール抽出残渣からの基原植物種の同定—

研究要旨:いわゆる“脱法ハーブ”と称する危険ドラッグ製品のメタノール抽出残渣からの DNA 塩基配列を指標とした基原植物の同定を行った。メタノール抽出残渣試料からの植物種の同定は可能であるが、これら製品群の特徴でもある複数種の植物の混合物という点では、主要な(植物材料として多く用いられている)植物種が優位に検出される傾向にあり、微量、少量の混入植物種の判定は困難であることが示唆された。

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

まずは有機溶媒等で製品に含まれる合成化合物を抽出、分析し、その残渣(植物片)から DNA を抽出、分析という手段も必要となる。そこで今回、その検討を行った。

A. 研究目的

危険ドラッグ市場では、2008 年頃から「Spice」をはじめとして植物の乾燥物、粉砕物に、合成カンナビノイド等を添加し「お香」と謳い販売する「脱法ハーブ」が社会問題化し、ニュースや事件として連日報道されている。本研究機関ではこれまで違法ドラッグ対策を目的として、継続的に化学的¹⁻⁴⁾、分子生物学的⁵⁾手法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として、DNA 塩基配列を用いた植物種の同定を行い、大麻(*Cannabis sativa* L.)、指定薬物であるサルビア・ディビノラム(*Salvia divinorum*)、幻覚性植物であるクラートン(*Mitragyna speciosa*)の混入を確認している⁵⁾。依然として危険ドラッグ市場において流通量の多い脱法ハーブ製品の実態調査として、DNA 塩基配列を用いた製品中の植物片の基原種の調査を行っているが、分析試料が少量であった場合、

B. 研究方法

1. 実験材料

危険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「脱法ハーブ」製品 1 製品(植物体乾燥(刻み)品)を使用した。植物形態に違いが見られるが、無視し、一定量を粉砕し、100%メタノールで成分分析用として抽出した残渣を乾燥させた試料とした。

2. 実験方法

試料(約 20 mg)を液体窒素で凍結させた後、再度 MM-300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した試料は Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega) 内の溶出液に溶解し、Maxwell 16 (Promega)を用い DNA を抽出・精製した。回収 DNA 溶液、200 μ L 中の 1 μ L を PCR 反応に用いた。これを鋳型として葉緑体 DNA 上の *rbcL*, *matK*, *trnL-trnF*, *psbA-trnH* および、核リボゾーマ

ル 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⁶⁻⁸⁾を用い、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). アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認後、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿を行い、ダイレクトシークエンスを行った。また、PEG 沈殿後の一部は、Mighty TA-cloning Kit(Takara)を用い、ベクターライゲーション後、再度、無作為に各クローンの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'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3',

matK forward primer;

5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3

;', *matK* reverse primer;

5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTT

C-3', *trnL-trnF* forward primer;

5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3',

trnL-trnF reverse primer;

5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3',

ITS forward primer;

5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',

ITS reverse primer;

5'-CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG-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 4 領域および核ゲノムの ITS 領域を植物共通プライマーを用い増幅後、各増幅産物の塩基配

列を決定し、国際塩基配列データベース(DDBJ/EMBL/GenBank)に登録されている配列と比較した。

図 1 に各領域における PCR 産物の電気泳動図を示した。各領域ともに産物の確認は可能であるが、どれも明確なバンドはなく通常の露光時間(図 1(上))より伸ばすことで確認できる程度であった(図 1(下))。

各プライマーによる産物を PEG 沈殿後、シークエンスを行った。各領域で得られた配列を検索した結果、*trnL-trnF* 領域では配列類似性が最も高い種として、*Rubus idaeus* 421/432(97%)、*psbA-trnH* 領域では *Trifolium pretense* 377/378(99%)、*matK* 領域では *Rubus idaeus* 661/661(100%)、*rbcL* 領域では *Rubus idaeus* 470/472(99%)、ITS 領域では *Rubus idaeus* 470/495(95%)が検出された。

次に、各領域をサブクローニング(図 2)し、各クローンの塩基配列を決定した。その結果を表 1 に示す。多くのクローンで、ラズベリーおよびアカクローバーの配列が検出された。*rbcL* および ITS 領域において、イラクサ科イラクサ属セイヨウイラクサ *Urtica dioica* が検出された。また、*rbcL* 領域においてバラ科キジムシロ属エゾツルキンバイ *Potentilla egedei* のそれと類似性の高い配列が検出された 546/551(99%)。

D. 考察

危険ドラッグ市場に流通するいわゆる脱法ハーブと称する製品中の植物片の基原種同定を行った。今回は微量分析系として、製品の化学分析を行った後のメタノール抽出残渣を試料とした。ダイレクトシークエンス、サブクローニング後のクローン・シークエンスにおいてもラズベリー、アカクローバーが検出されている。このことは本製品の構成植物種としてこの 2 種が主に使用されることが考えられる。この 2 植物種はこれまでの本研究事業の報告書にも記載しているが、複数の製品から検出される植物種である^{5,9,10)}。

一方で、*psbA-trnH* 領域においてダイレクトシーケンスで、アカローバーの配列が検出され、クローニング後のシーケンスにおいてもアカローバーのみが検出されており、ラズベリーの配列は検出されなかった。このことは、用いたプライマーが植物種すべてに有効であるというわけではないことを示唆しており、このことは本年度の報告書である分析依頼を受けた植物種の分析でも述べており¹¹⁾、植物種の同定には複数の DNA 配列を解析し、総合して判断する必要があると思われる。また、得ようとする DNA の抽出試料における植物種の構成量も問題となる。当然であるが、構成比率の多い植物種の DNA が優先的に PCR 産物として得られることになる。また、試料が、葉と根では同じ重量であっても、得られる DNA 量は葉の方がはるかに多くなる。この点を踏まえると、製品中の形態による分類は必要になると思われる。

サブクローニングによって検出された植物種としてイラクサ、エゾツルキンバイがある。イラクサはこれまでも製品中に検出される植物種であり、今回も 2 つ領域で検出されており、製品中の混入は高いと思われるが、これら危険ドラッグに用いられる植物種は海外のハーブ（健康食品的取り扱い）店などからの輸入したものといわれており、そのハーブ採集時、製品化時に混入したものとも考えられる。今回は植物形態による分類を行わなかったため、このような点は明確に判断することが困難である。エゾツルキンバイに関しては 1 領域で 1 クローンしか得られておらず判定はできないと判断した。

E. 参考文献

- 1) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., Haishima, Y., Goda, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 439-441 (2009).
- 2) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Ogata, J., Goda, Y., *Forensic Science International*, **198**, 31-38 (2010).

- 3) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Toxicol.*, **29**, 25-37 (2011).
- 4) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 21-32 (2013).
- 5) Ogata, J., Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 33-41 (2013).
- 6) CBOL Plant Working Group, *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 12794 - 12797 (2009).
- 7) Stanford, M. A., Harden, R., Parks, C. R., *American Journal of Botany* **87**, 872-882 (2000).
- 8) Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., *Plant Mol. Biol.* **17**, 1105-1109 (1991).
- 9) 平成 24 年度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「違法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究」植物系違法ドラッグ製品の基原植物種の同定 緒方 潤
- 10) 平成 25 年度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「違法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究」植物系違法ドラッグ製品の基原植物種の同定 緒方 潤
- 11) 平成 26 年度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「違法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究」分析依頼を受けた植物片の基原植物種の同定 II 緒方 潤

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(学会発表)

なし

(論文)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

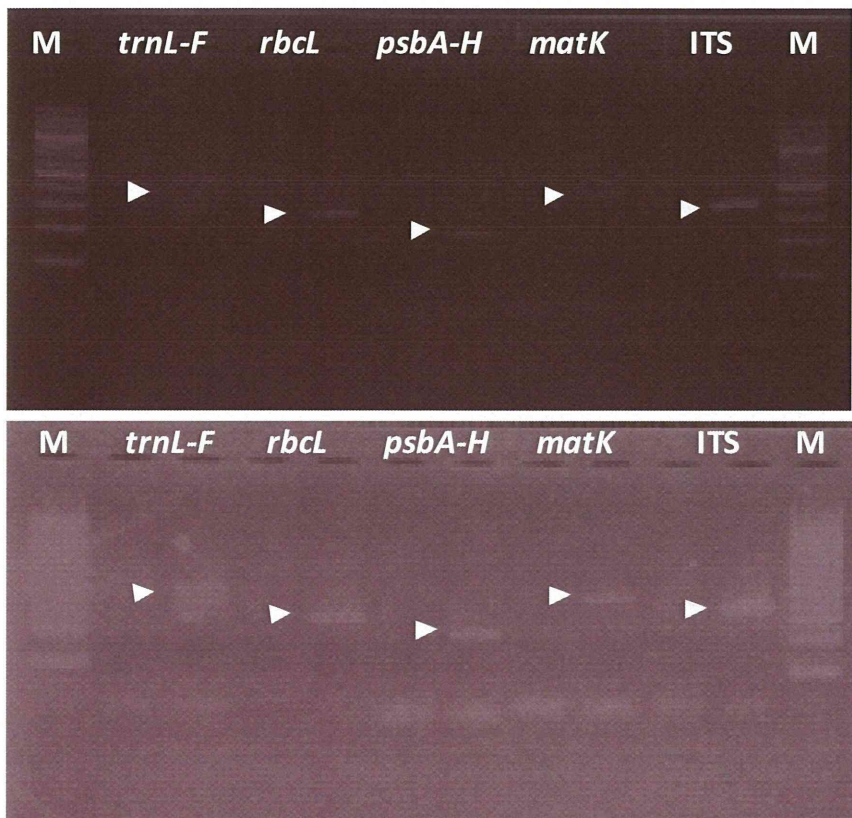


図 1. 各 DNA 領域 5 種の電気泳動図
 上下同一写真，各レーン左は negative control

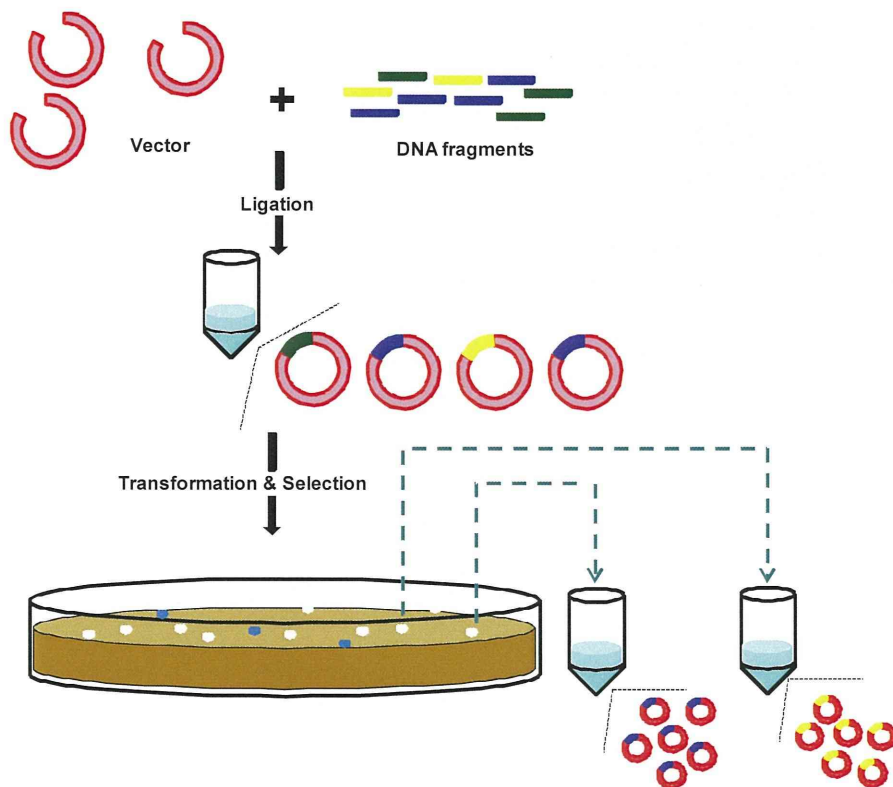


図 2. サブクローニングの模式図

表 1. サブクローニングで得られたクローンの塩基配列解析による配列類似性検索結果

Clone No.	Best similar sp. of sequence
<i>trnLF</i> clone1	<i>Trifolium pratense</i>
<i>trnLF</i> clone2	<i>Rubus idaeus</i>
<i>trnLF</i> clone3	<i>Rubus idaeus</i>
<i>trnLF</i> clone4	<i>Rubus idaeus</i>
<i>trnLF</i> clone5	<i>Trifolium pratense</i>
<i>trnLF</i> clone6	<i>Trifolium pratense</i>
<i>trnLF</i> clone7	<i>Rubus idaeus</i>
<i>trnLF</i> clone8	unknown
<i>trnLF</i> clone9	<i>Trifolium pratense</i>
<i>rbcL</i> clone1	<i>Urtica dioica</i>
<i>rbcL</i> clone2	<i>Rubus idaeus</i>
<i>rbcL</i> clone3	<i>Rubus idaeus</i>
<i>rbcL</i> clone4	<i>Potentilla egedei</i>
<i>psbAH</i> clone1	<i>Trifolium pratense</i>
<i>psbAH</i> clone2	<i>Trifolium pratense</i>
<i>psbAH</i> clone3	<i>Trifolium pratense</i>
<i>matK</i> clone1	<i>Trifolium pratense</i>
<i>matK</i> clone2	<i>Rubus idaeus</i>
<i>matK</i> clone3	<i>Rubus idaeus</i>
<i>matK</i> clone4	<i>Trifolium pratense</i>
ITS clone1	<i>Urtica dioica</i>
ITS clone2	<i>Trifolium pratense</i>
ITS clone3	<i>Trifolium pratense</i>
ITS clone4	<i>Rubus idaeus</i>
ITS clone5	<i>Rubus idaeus</i>
ITS clone6	<i>Rubus idaeus</i>
ITS clone7	<i>Trifolium pratense</i>

違法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究

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:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

－分析依頼を受けた植物片の基原植物種の同定 I－

研究要旨:メスカリンが検出された植物片の基原植物の同定を目的として、DNA 塩基配列を指標とした植物種の鑑定を行った。葉緑体 DNA 上の 3 領域(*matK*, *rpl16*, *trnL-trnF*)を分析した結果、サボテン科エキノプシス属 *Echinopsis pachanoi* (syn. *Trichocereus pachanoi*) “San Pedro”であることが強く示唆された。また、本植物種はメスカリンを含有する植物種として報告されている。

A. 研究目的

危険ドラッグ市場では、2008 年頃から「Spice」をはじめとして植物の乾燥物、粉碎物に、合成化合物等を添加した“いわゆる脱法ハーブ”が社会問題化し、ニュースや事件として連日報道されている。本研究機関ではこれまで危険ドラッグ対策を目的として、継続的に化学的¹⁻⁴⁾、分子生物学的⁵⁾手法を用いた製品分析を行っている。今回は、メスカリン(Mescaline;

3,4,5-trimethoxyphenethylamine)が検出された植物片として依頼を受けた製品に対して DNA 塩基配列を用いた製品中の植物片の基原種の調査を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

分析依頼のあった約 80 g 植物片 1 袋(図 1)から形態を観察し 10 検体を供試した。供試した 10 検体を図 2 に示す。1~4 は袋中の植物微細片をそのまま検体とした。また、4 は形態を無視し微細片の混合物とした。5~10 はそれぞれ植物片の一部を切り出し検体とした。

2. 実験方法

2 mL エッペンドルフチューブに 5 mm ジルコニアビーズとともに各試料(約 10 mg)を入れ、液体窒素で凍結させた後、MM-300 (Qiagen) により粉碎した。粉碎した各試料は Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega) 内の溶出液に溶解し、Maxwell 16 (Promega) を用い DNA を抽出・精製した。回収 DNA 溶液、各 200 μ L 中の 1 μ L を PCR 反応に用いた。

各回収 DNA 溶液を鋳型として葉緑体 DNA 上の *matK*, *rpl16*, *trnL-trnF* の 3 領域を、各領域で植物において保存性の高い配列を基にして作成されたユニバーサルプライマーを用い⁶⁻⁸⁾、Ex Taq (Takara) および Ampdirect plus (Shimadzu) を使用し PCR 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)。1%アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認後(図 3)、ダイレクトシーケンスを行った。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' -ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-
3' ,*rpl16* forward primer;
5' -
GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG-3' ,
rpl16 reverse primer;
5' -
CGTACCCATATTTTTCCACCACGAC-3' ,
trnL-trnF forward primer;
5' -CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' ,
trnL-trnF reverse primer;
5' -ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'

C. 研究結果

植物の鑑別・同定に用いられる葉緑体DNA上の3領域(*matK*, *rpl16*, *trnL-trnF*)を増幅後、各増幅産物の塩基配列を決定し、国際塩基配列データベース(DDBJ/EMBL/GenBank)に登録されている配列と比較した。

matK 領域について

供試した10検体すべてで増幅産物(バンド)が確認された(図3)。塩基配列を確認した結果、10検体の*matK* 塩基配列はすべて一致(同一)した(解析塩基数785)。*Echinopsis pachanoi* (HM041687)⁹⁾とは1塩基の違いであった(784/785)。

rpl16 領域について

供試した10検体すべてで増幅産物(バンド)が確認された(図3)。塩基配列を確認した結果、10検体の*rpl16* 塩基配列はすべて一致(同一)した(解析塩基数906)。*Echinopsis pachanoi* (HM041421)⁹⁾とも100%一致した(906/906)。

trnL-trnF 領域について

供試した10検体すべてで増幅産物(バンド)が確認された(図3)。塩基配列を確認した結果、10検体の*trnL-trnF* 塩基配列はすべて一致(同一)した(解析塩基数958)。*Echinopsis pachanoi*

(JQ779612)¹⁰⁾とは2塩基の違いであった(956/958)。

D. 考察

メスカリンが検出された植物片の鑑定として葉緑体DNAの3領域を分析し、塩基配列類似性を調査した。3領域ともにサボテン科エキノプシス属*Echinopsis pachanoi* (syn. *Trichocereus pachanoi*) “San Pedro”(和名なし)と高い類似性がみられたことから、本植物は上記植物であることが強く示唆された。また、本植物はメスカリン含有植物であることが知られている¹¹⁾。

今回の分析では、各領域の電気泳動図で、いずれも単一のバンドが確認されている点(図3)、塩基配列の波形データにおいてピークの重なりなどが見られない点(図4)において、上記植物以外の植物種のDNAは増幅されなかったと考えられたことから、上記植物のみで構成されている製品(袋)であることも示唆された。

E. 参考文献

- 1) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., Haishima, Y., Goda, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 439-441 (2009).
- 2) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Ogata, J., Goda, Y., *Forensic Science International*, **198**, 31-38 (2010).
- 3) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Toxicol.*, **29**, 25-37 (2011).
- 4) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 21-32 (2013).
- 5) Ogata, J., Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 33-41 (2013).
- 6) CBOL Plant Working Group, *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 12794 - 12797 (2009).
- 7) Jordan W. C., Courtney, M. W., Neigel, J. E.,

- Am. J. Bot.* **83**, 430–439 (1996).
- 8) Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J.,
Plant Mol. Biol. **17**, 1105–1109 (1991).
- 9) Hernandez-Hernandez, T., Hernandez, H. M.,
De-Nova, J. A., Puente, R., Eguiarte, L. E.,
Magallon, S., *Am. J. Bot.* **98**, 44-61 (2011).
- 10) Schlumpberger, B. O., Renner, S. S., *Am. J.*
Bot. **99**, 1335-1349 (2012).
- 11) Armijos, C., Cota, I., González, S., *Journal of*
Ethnobiology and Ethnomedicine **10**, 26 (2014).

F. 健康危険情報

なし.

G. 研究発表

(学会発表)

なし

(論文)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

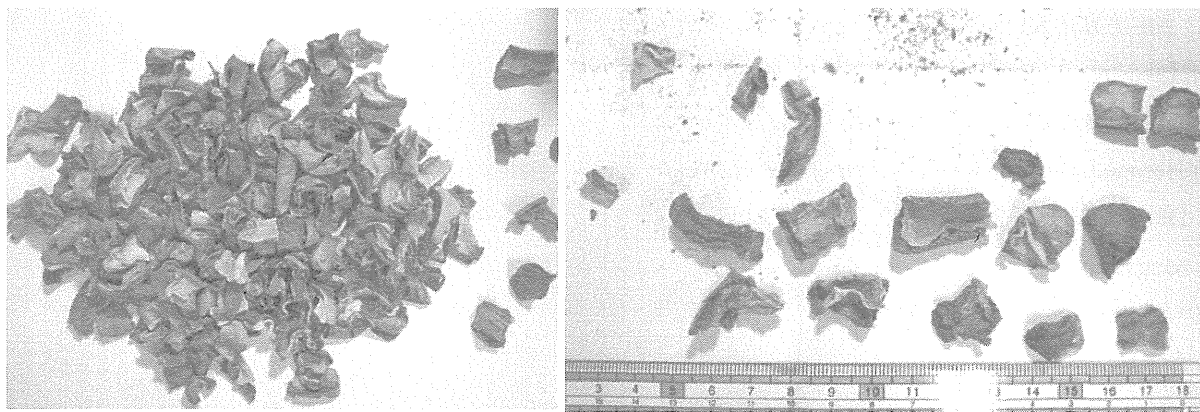


图 1. 分析依頼品

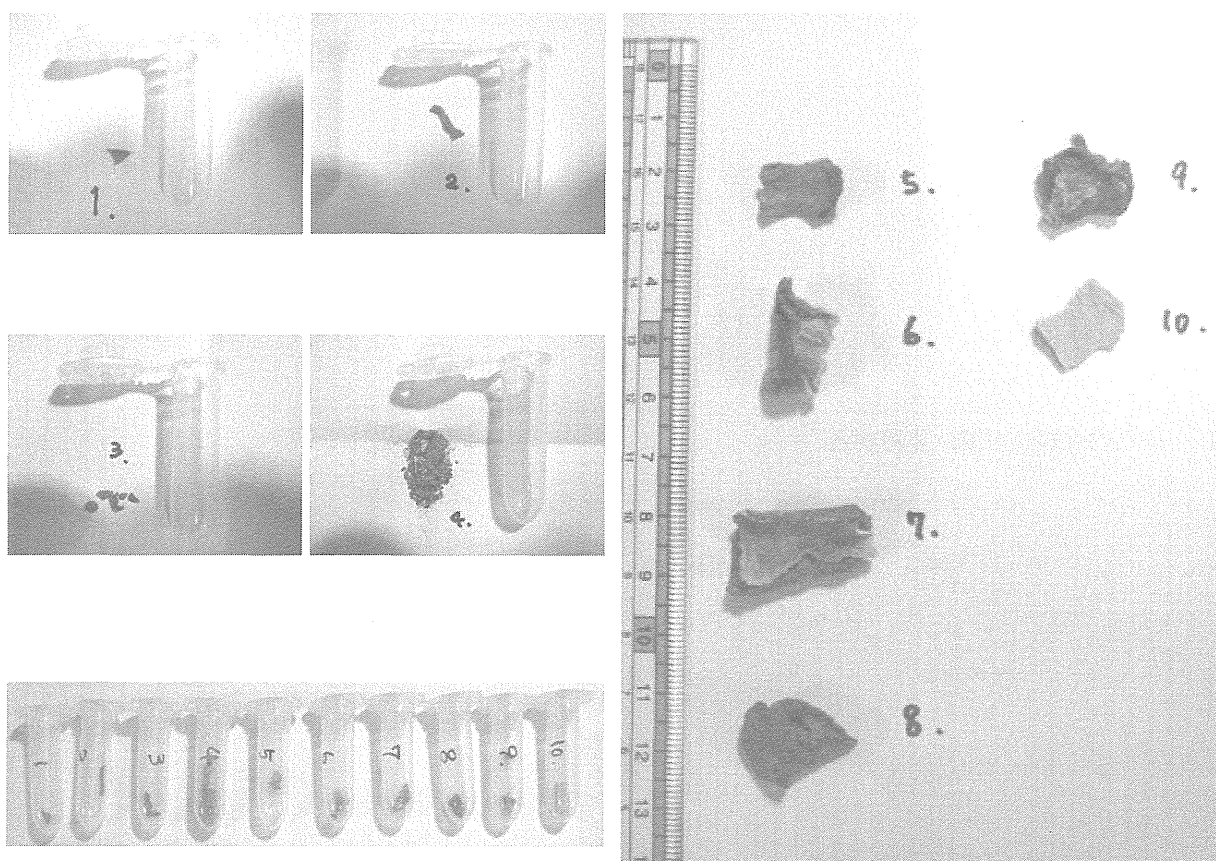


图 2. 分析 10 検体

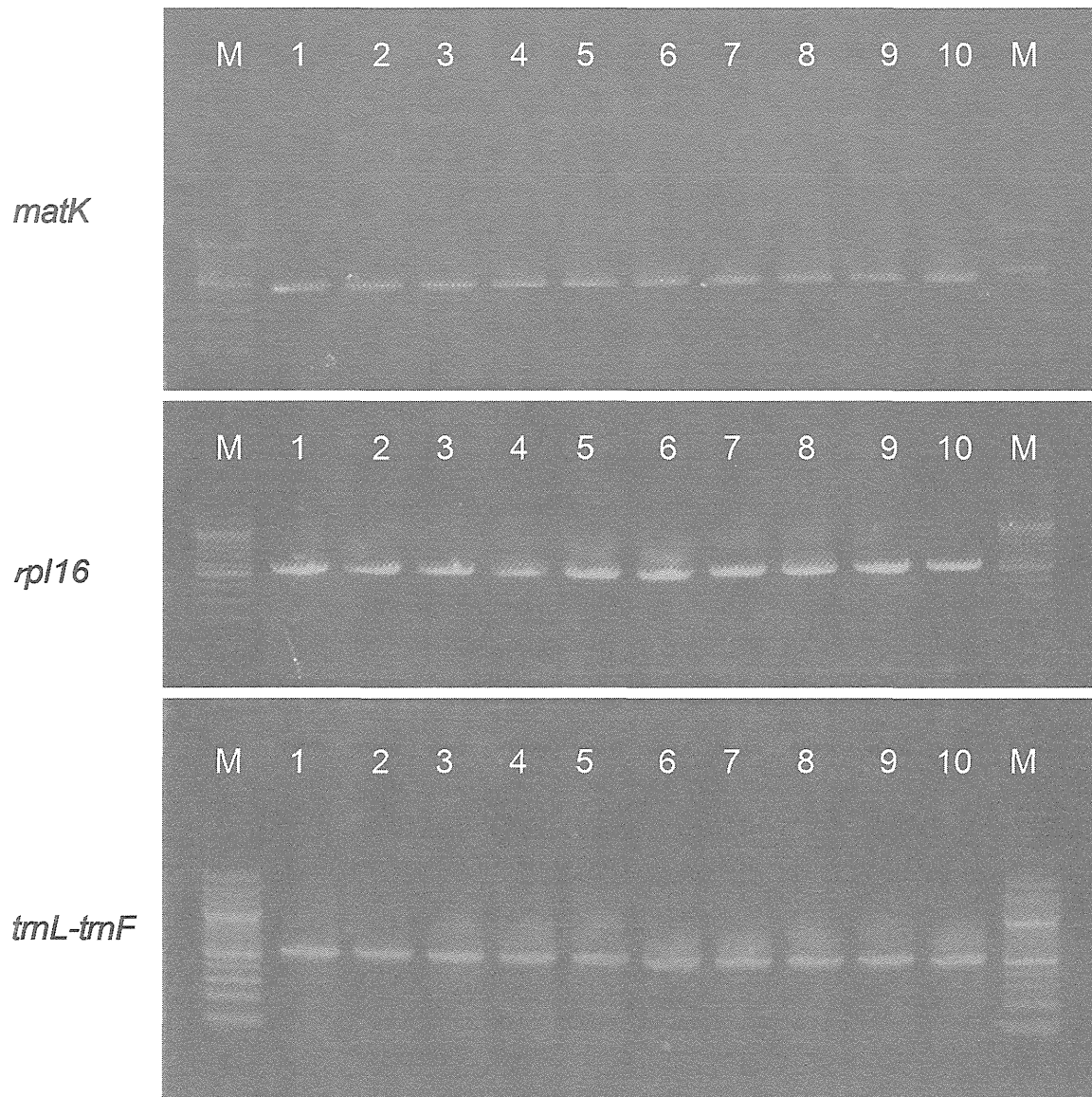


図 3. 分析を行った各 DNA 領域の電気泳動図

違法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究

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:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

－分析依頼を受けた植物片の基原植物種の同定 II－

研究要旨:DMT が検出された植物片の基原植物の同定を目的として, DNA 塩基配列を指標とした植物種の鑑定を行った. 葉緑体 DNA 上の3領域(*trnL-trnF*, *rbcL*, *matK*)および核リボソーム DNA 上の ITS 領域を分析した結果, マメ科オジギソウ属 *Mimosa tenuiflora* “Jurema”およびアカネ科ポチヨウジ属(サイコトリア属) *Psychotria viridis* “Chacruna”であることが強く示唆された. また, 本植物種は DMT を含有する植物種として報告されており, 南米の幻覚性伝統薬“Ayahuasca”アヤワスカの原料として知られている.

A. 研究目的

危険ドラッグ市場では, 2008 年頃から「Spice」をはじめとして植物の乾燥物, 粉碎物に, 合成化合物等を添加した“いわゆる脱法ハーブ”が社会問題化し, ニュースや事件として連日報道されている. 本研究機関ではこれまで危険ドラッグ対策を目的として, 継続的に化学的¹⁻⁴⁾, 分子生物学的⁵⁾手法を用いた製品分析を行っている. 今回は, ジメチルトリプタミン(DMT, *N,N*-dimethyltryptamine)が検出された植物片として依頼を受けた2製品に対してDNA塩基配列を用いた製品中の植物片の基原種の調査を行った.

B. 研究方法

1. 実験材料

分析依頼のあった植物片(図1)から10検体を供試した. 供試した10検体を図2に示す. 1~4は同一製品(A)と思われる2袋から「植物繊維様片」および「植物微細片(粉末)」, 各1種類, 計4種を検体とした. 5~10は製品(B)の植物片(葉

の一部を切り出し検体とした. また, 10は袋中の微細片(粉末)を検体とした.

2. 実験方法

2 mL エッペンドルフチューブに5 mm ジルコニアビーズとともに各試料(約20 mg)を入れ, 液体窒素で凍結させた後, MM-300 (Qiagen)により粉碎した. 粉碎した各試料はMaxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega)内の溶出液に溶解し, Maxwell 16 (Promega)を用いDNAを抽出・精製した. 回収DNA溶液, 各200 µL中の1 µLをPCR反応に用いた.

各回収DNA溶液を鋳型として葉緑体DNA上の*trnL-trnF*, *rbcL*の2領域および*matK*領域(製品(A)), 核DNA上のITS領域(製品(B))を, 各領域で植物において保存性の高い配列を基にして作成されたユニバーサルプライマーを用い⁶⁻⁸⁾, Ex Taq (Takara)およびAmpdirect plus (Shimadzu)を使用しPCR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). 1%アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認後(図3),

ダイレクトシーケンスを行った。 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。

trnL-trnF forward primer;

5' -CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' ,

trnL-trnF reverse primer;

5' -ATTTGAACTGGTGACACGAG-3' ,

rbcL forward primer;

5' - ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC

-3' ,*rbcL* reverse primer;

5' - GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3' ,

ITS forward primer;

5' - CCTTATCATTAGAGGAAGGAG-3' ,

ITS reverse primer;

5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

matK forward primer;

5' -CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3'

matK reverse primer;

5' -ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'

C. 研究結果

植物の鑑別・同定に用いられ3領域(*trnL-trnF*, *rbcL*, ITS)を増幅後, 各増幅産物の塩基配列を決定し, 国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に登録されている配列と比較した。

trnL-trnF 領域について

供試した10検体すべてで増幅産物(バンド)が確認された(図3)。1~4の検体の *trnL-trnF* 塩基配列はすべて一致(同一)した(解析塩基数 1012)。また, *Mimosa tenuiflora* (AF522943)と100%一致した。5~10の検体の *trnL-trnF* 塩基配列はすべて一致(同一)した(解析塩基数 911)。また, *Psychotria* sp.(KJ805542)⁹⁾と99%の高い類似性を示した。

rbcL 領域について

供試した2, 4を除くすべてで増幅産物(バンド)が確認された(図3)。塩基配列を確認した結果, 1, 3の検体の *rbcL* 塩基配列はすべて一致(同一)した(解析塩基数 514)。また, *Mimosa* 属植物 (JQ591939, JQ591929, JQ591933, JQ591925)と95%以上の高い類似性を示した。5~10の検体の *rbcL* 塩基配列はすべて一致(同一)した(解析塩基数 501)。また, *Psychotria racemosa* (JQ593828)および *Psychotria marginata* (GQ981857)¹⁰⁾と100%一致した。

ITS 領域について

供試した6検体すべてで増幅産物(バンド)が確認された(図3)。5~10の検体の ITS 塩基配列はすべて一致(同一)した(解析塩基数 624)。また, *Psychotria viridis* (FJ208620)¹¹⁾と100%一致した。

matK 領域について

供試した4検体すべてで増幅産物(バンド)が確認された(data not shown)。1~4の検体の *matK* 塩基配列はすべて一致(同一)した(解析塩基数 808)。また, *Psychotria viridis* (AF274120)¹²⁾と1塩基の違いであった。

D. 考察

DMT が検出された植物片の鑑定として葉緑体 DNA の3領域, 核 DNA の1領域を分析し, 塩基配列類似性を調査した。

検体1~4については総合的に判断してマメ科オジギソウ属 *Mimosa tenuiflora* “Jurema”ジュレマであることが強く示唆された。また, *rbcL* 領域でバンドが確認されなかった理由として DNA が回収できていないこと, 夾雑物による DNA 増幅阻害によるものが考えられた。分析検体(2 および 4)が植物微碎片(粉末)であることから植物表皮のポリフェノール類による PCR 阻害の影響が考えられ, また, *trnL-trnF* 領域ではバンドが確認できることから *rbcL* プライマーの特異性が低いことも考えられる。Nested PCR や DNA の濃縮法, フェノ

ール・クロロホルム精製などによりバンドの検出は可能ではあるとも考えられるが、今回は検討しなかった。また、*psbA-trnH* の領域は検出できなかった。本件に関してはプライマーの設計の必要があると思われる。データベース上に *Mimosa tenuiflora* の *rbcL* 領域の配列の報告は現時点で行われていない。

検体 5~10 については総合的に判断してアカネ科 ボチョウジ属(サイコトリア属) *Psychotria viridis* “Chacruna”チャクルーナであることが強く示唆された。*trnL-trnF* 領域でエキストラバンドが確認されるがダイレクトシーケンスにおいて塩基配列の解読を不能とさせる要因ではないためサブクローニングによる検討は行わなかった。また、データベース上に *Psychotria viridis* の *trnL-trnF*, *rbcL* 両領域の配列の報告は現時点で行われていない。

両植物種ともに DMT の含有が報告されている植物であった^{13, 14)}。また、これら製品は“Ayahuasca”アヤワスカと呼ばれる南米の先住民の幻覚性のある伝統薬の材料として知られており、これら植物種とモノアミノキナーゼ阻害物質を含む植物種と混合して用いられる^{15, 16)}。また、*Mimosa tenuiflora* で使用される部位は root bark と記載されており、今回分析した試料も根皮であると示唆された。

E. 参考文献

- 1) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., Haishima, Y., Goda, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 439-441 (2009).
- 2) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Ogata, J., Goda, Y., *Forensic Science International*, **198**, 31-38 (2010).
- 3) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Toxicol.*, **29**, 25-37 (2011).
- 4) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Science International*,

227, 21-32 (2013).

- 5) Ogata, J., Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 33-41 (2013).
- 6) CBOL Plant Working Group, *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 12794 - 12797 (2009).
- 7) Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., *Plant Mol. Biol.* **17**, 1105-1109 (1991).
- 8) Stanford, A. M., Harden, R. Parks, C. R., *American Journal of Botany* **87**, 872-882 (2000).
- 9) Razafimandimbison, S. G., Taylor, C. M., Wikstrom, N., Pailler, T., Khodabandeh, A., Bremer, B., *Am. J. Bot.* **101**, 1102-1126 (2014).
- 10) Kress, W. J., Erickson, D. L., Jones, F. A., Swenson, N. G., Perez, R., Sanjur, O., Bermingham, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 18621-18626 (2009).
- 11) Paul, J. R., Morton, C., Taylor, C. M., Tonsor, S. J., *Am Nat.* **173**, 188-199 (2009).
- 12) Miller, J. T., Bayer, R. J., *Am. J. Bot.* **88**, 697-705 (2001).
- 13) Gaujac, A., Aquino, A., Navickiene, S., de Andrade, J. B., *J Chromatogr B* **881-882**, 107-110 (2012).
- 14) Callaway, J. C., Brito, G. S., Neves, E. S., *J Psychoactive Drugs* **37**, 145-150 (2005).
- 15) Gaujac, A., Navickiene, S., Collins, M. I., Brandt, S. D., de Andrade, J. B., *Drug Test Anal.* **4**, 636-648 (2012).
- 16) Riba, J., McIlhenny, E. H., Valle, M., Bouso, J. C., Barker, S. A., *Drug Test Anal.* **4**, 610-616 (2012).

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(学会発表)

なし
(論文)
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし.

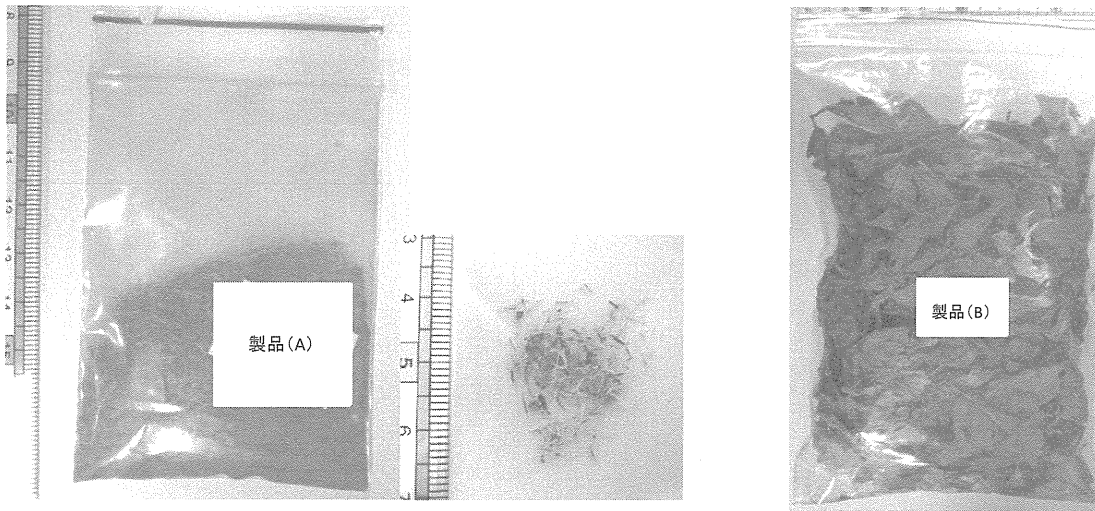


図1. 分析依頼製品

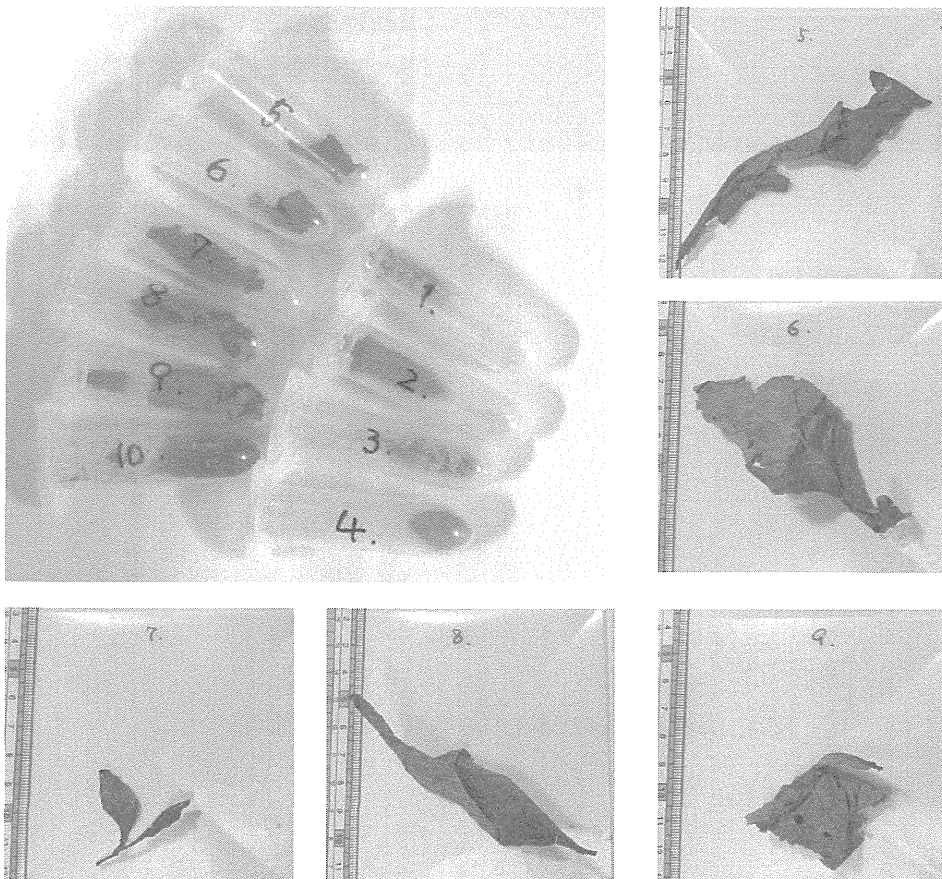


図2. 分析サンプル10検体

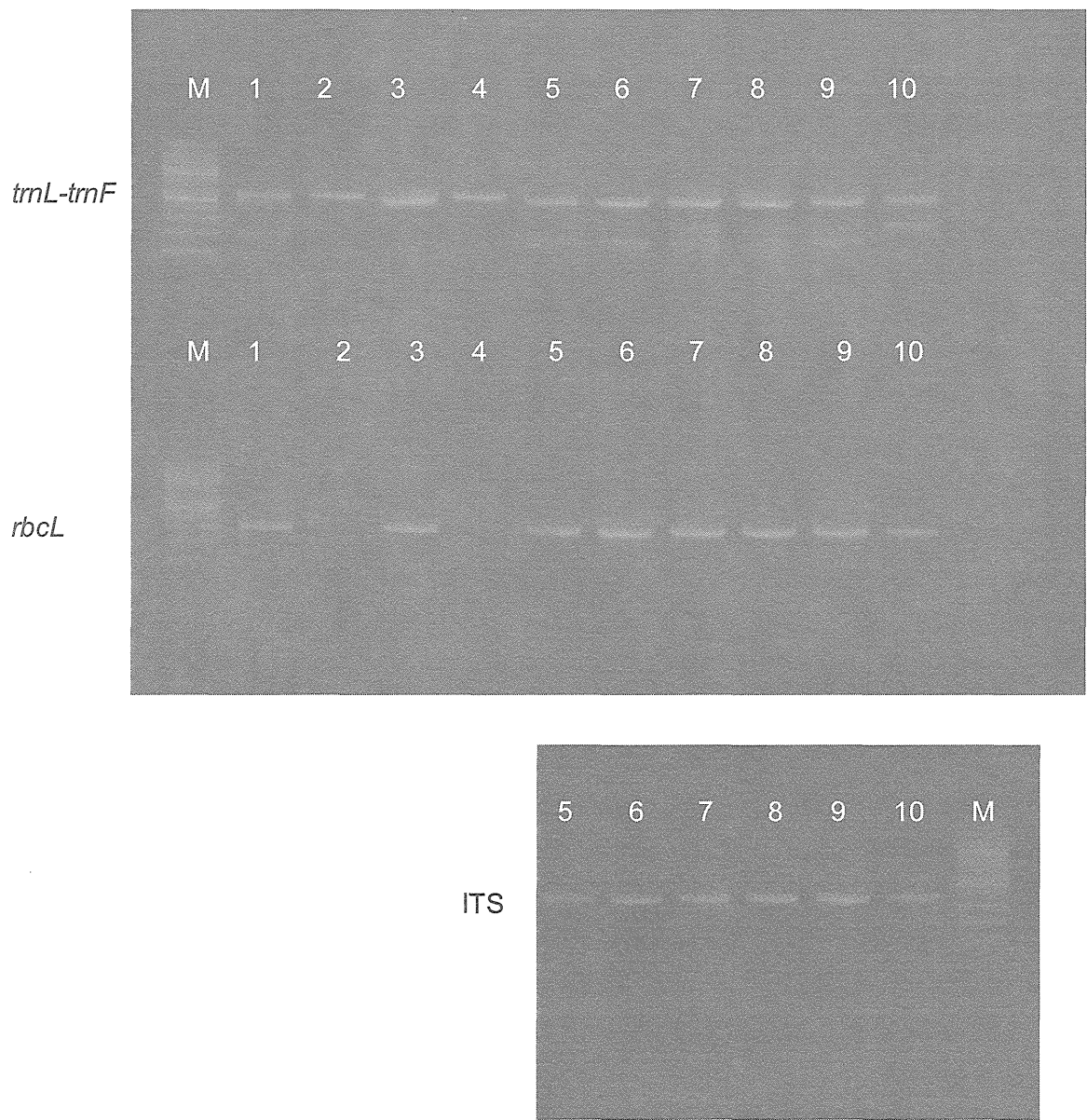


図3. 分析を行った各 DNA 領域の電気泳動図

違法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究

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:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

－分析依頼を受けた植物片の基原植物種の同定 III－

研究要旨:リゼルグ酸アミドが検出された植物片の基原植物の同定を目的として, DNA 塩基配列を指標とした植物種の鑑定を行った. 葉緑体 DNA 上の 4 領域 (*trnL-trnF*, *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*) および核リボソーマル DNA 上の ITS 領域を分析した結果, ヒルガオ科オオバアサガオ属 *Argyreia nervosa* (Hawaiian baby woodrose, Elephant creeper, ギンバアサガオ) であることが強く示唆された. また, 本植物種子は LSA を含有する植物種として報告されている.

A. 研究目的

危険ドラッグ市場では, 2008 年頃から「Spice」をはじめとして植物の乾燥物, 粉碎物に, 合成化合物等を添加した“いわゆる脱法ハーブ”が社会問題化し, ニュースや事件として連日報道されている. 本研究機関ではこれまで危険ドラッグ対策を目的として, 継続的に化学的¹⁻⁴⁾, 分子生物学的⁵⁾手法を用いた製品分析を行っている. 今回は, リゼルグ酸アミドが検出された種子として依頼を受けた 1 製品に対して DNA 塩基配列を用いた製品の基原種の調査を行った.

B. 研究方法

1. 実験材料

分析依頼のあった種子 1 粒 (0.1097 g) (図 1) を木槌で碎き, 完全には分離できなかったが, 1. 胚および貯蔵組織, 2. 種皮, 3. 1 および 2 の粉碎片, の 3 供試検体とし, その各検体より DNA の抽出をおこなった.

2. 実験方法

2mL エッペンドルフチューブに 5 mm ジルコニアビーズとともに各試料(約 15 mg)を入れ液体窒素で凍結させた後, MM-300 (Qiagen) により粉碎した. 粉碎した各試料は Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega) 内の溶出液に溶解し, Maxwell 16 (Promega) を用い DNA を抽出・精製した. 回収 DNA 溶液, 各 200 μ L 中の 1 μ L を PCR 反応に用いた.

各回収 DNA 溶液を鋳型として葉緑体 DNA 上の *trnL-trnF*, *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH* の 4 領域および核 DNA 上の ITS 領域を, 各領域で植物において保存性の高い配列を基にして作成されたユニバーサルプライマーを用い⁶⁻⁸⁾, Ex Taq (Takara) および Ampdirect plus (Shimadzu) を使用し PCR 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). 1% アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認後(図 2), ダイレクトシーケンズを行った. 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.

また、ITS 領域において、ダイレクトシーケンスではピークが不明瞭になる配列部位が存在したため、ポリエチレングリコール沈殿後、Mighty TA-cloning Kit (Takara) を用い、ベクターライゲーション後、ベクタープライマーを用い塩基配列を決定した。用いたプライマーを以下に示す。

trnL-trnF forward primer;

5' -CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'

trnL-trnF reverse primer;

5' -ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'

rbcL forward primer;

5' -

ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'

rbcL reverse primer;

5' -GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'

matK forward primer;

5' -CGTACAGTACTTTTTGTGTTTACGAG-3'

matK reverse primer;

5' -ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'

psbA-trnH forward primer;

5' -CGAAGCTCCATCTACAAATGG-3'

psbA-trnH reverse primer;

5' -ACTGCCTTGATCCACTTGGC-3'

ITS forward primer;

5' -CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG-3'

ITS reverse primer;

5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

C. 研究結果

植物の鑑別・同定に用いられ5領域(*trnL-trnF*, *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, ITS)を増幅後、各増幅産物の塩基配列を決定し、国際塩基配列データベース(DDBJ/EMBL/GenBank)に登録されている配列と比較した。

trnL-trnF 領域について

供試した3検体すべてで増幅産物(バンド)が確認された(図2)。1~3の検体の*trnL-trnF*塩基配列はすべて一致した(解析塩基数739)。また、

Argyrea nervosa (KF242477; 葉緑体DNA全配列登録データ)⁹⁾と100%一致した。

rbcL 領域について

供試した3検体すべてで増幅産物(バンド)が確認された(図2)。1~3の検体の*rbcL*塩基配列はすべて一致した(解析塩基数578)。また、*Argyrea nervosa* (KF242477)と100%一致した。

matK 領域について

供試した3検体すべてで増幅産物(バンド)が確認された(図2)。1~3の検体の*matK*塩基配列はすべて一致した(解析塩基数809)。また、*Argyrea nervosa* (KF242477)と100%一致した。

psbA-trnH 領域について

供試した3検体すべてで増幅産物(バンド)が確認された(図2)。1~3の検体の*rbcL*塩基配列はすべて一致した(解析塩基数235)。また、*Argyrea nervosa* (KF242477)と100%一致した。

ITS 領域について

供試した3検体すべてで増幅産物(バンド)が確認された(図2)。検出された配列は*Argyrea nervosa* (AF309153)と98%(解析塩基数585/595)の類似性であり、本植物種は最も配列類似性の高い植物種であった。また、相同性検索において、ガガイモ科オオカモメヅル属*Tylophora indica* (JQ230984, 論文報告なし, データベース登録のみ, Malik, S. and Babbar, S. B.)とも高い配列類似性を示した(98%)。しかし、*Tylophora indica psbA-trnH* (HE793895, Liede-Schumann, S., Kong, H.-H., Meve, U. and Thiv, M.)および*trnL-trnF* (FJ890345, Vadakan, S. A., Subramanian, R. B., Selvaraj, S. and Brangaza, V. J.)のそれぞれの配列とはまったく類似性を示さない(60%以下)ことから、*Tylophora indica* ITSは、誤同定による配列の登録であることが考えられた。

本配列の塩基配列解析において、突然ピークが重なり、配列の解読が困難になる部位が見られた(図3)。そこで、PCR産物をクローニングし、単一のバンドとし、アニーリング温度、伸長温度を

変え、ベクタープライマーからの再解読を行うことで解読が可能となった結果、当部位には相補的な inverted repeat (逆位反復配列)が存在し、その部位で hairpin 構造を取ることが予想され、配列の解読を困難にさせていることが明らかとなった(図4)。

D. 考察

LSA が検出された種子の鑑定として葉緑体DNA上の4領域、核DNA上の1領域を分析し、塩基配列類似性を調査した。

分析した種子は総合的に判断してヒルガオ科オオバアサガオ属 *Argyreia nervosa* (Hawaiian baby woodrose, Elephant creeper, Woolly morning glory, 銀葉朝顔(ギンヨウアサガオ, ギンバアサガオ), オオバアサガオ, オオバウラジロアサガオ)であることが強く示唆された。また、本植物はLSAを含有する植物として知られている¹⁰⁾。

E. 参考文献

- 1) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., Haishima, Y., Goda, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 439-441 (2009).
- 2) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Ogata, J., Goda, Y., *Forensic Science International*, **198**, 31-38 (2010).
- 3) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Toxicol.*, **29**, 25-37 (2011).
- 4) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 21-32 (2013).
- 5) Ogata, J., Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 33-41 (2013).
- 6) CBOL Plant Working Group, *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 12794 - 12797 (2009).
- 7) Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., *Plant Mol. Biol.* **17**, 1105-1109 (1991).

8) Stanford, A. M., Harden, R. Parks, C. R., *American Journal of Botany* **87**, 872-882 (2000).

9) Eserman, L. A., Tiley, G. P., Jarret, R. L., Leebens-Mack, J. H., Miller, R. E., *Am. J. Bot.* **101**, 92-103 (2014).

10) Paulke, A., Kremer, C., Wunder, C., Wurglics, M., Schubert-Zsilavecz, M., Toennes, S. W., *Forensic Sci. Int.* **242**, 62-71 (2014).

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(学会発表)

なし

(論文)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。