

Fig. 1. (Continued) Structures of tested synthetic cannabinoids (29-57)

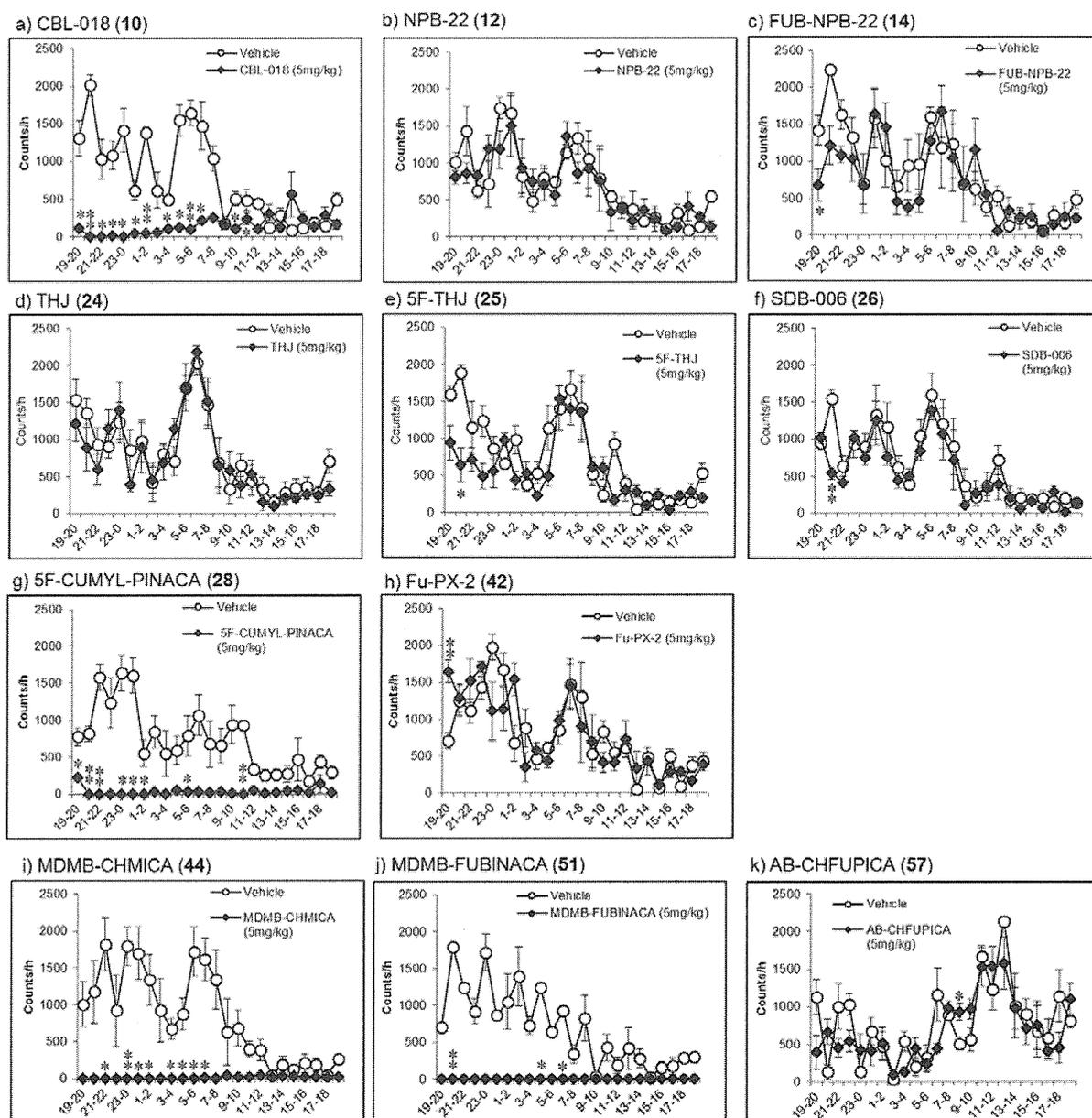


Fig. 2 Time courses of the locomotor activity after i.p. injections of 11 compounds at 5 mg/kg in mice (a-k). Each value is shown as the locomotor count for 1 h. Values are means \pm SEM ($n = 4$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, significantly difference from the vehicle injection.

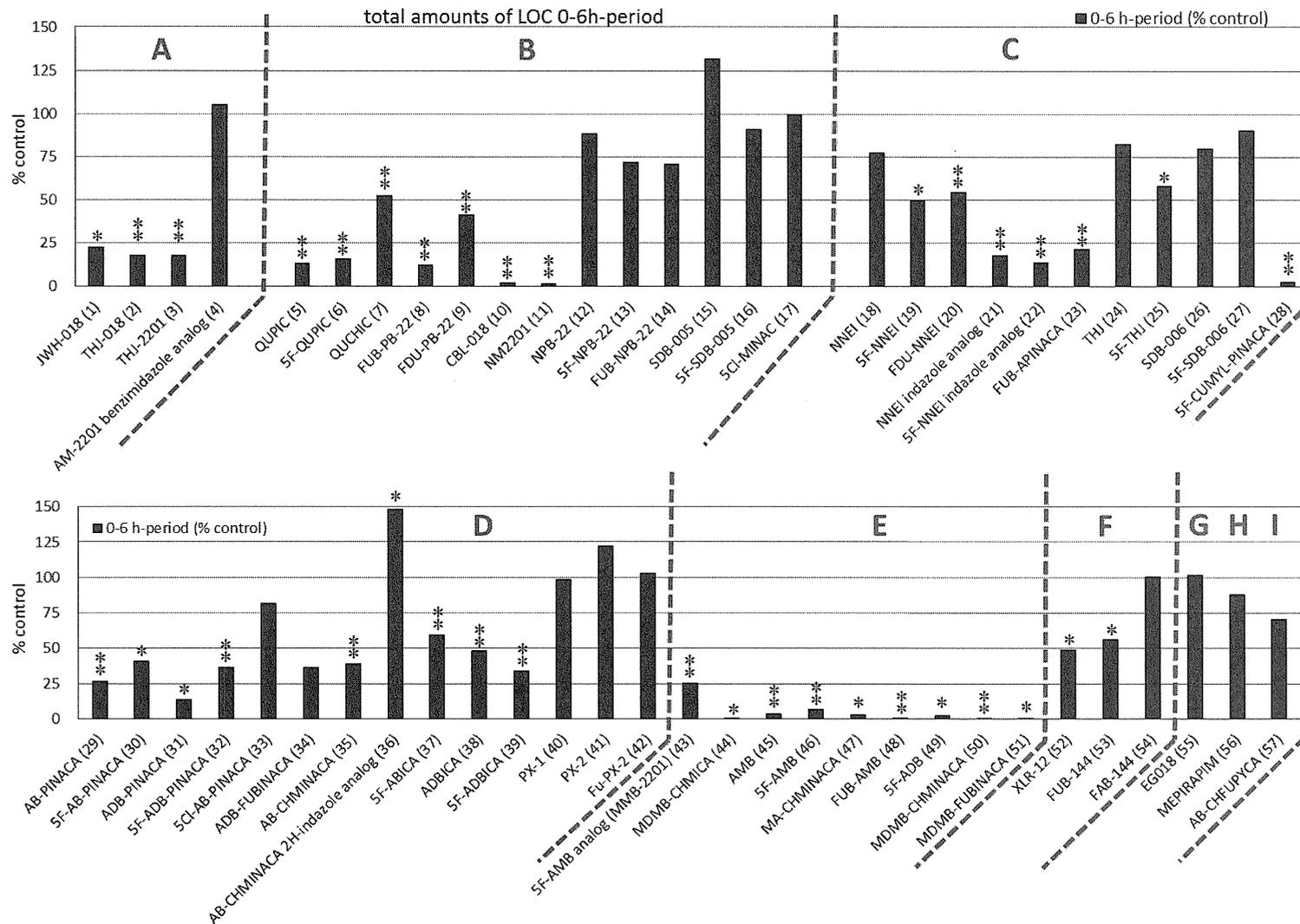


Fig. 3 Total amounts of locomotor activity during a 0-6-h after injections of synthetic cannabinoids (1–57) at 5 mg/kg in mice. Each value is shown as percentage of the control value in animals treated with vehicle. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, significantly difference from the vehicle injection.

分担研究課題:違法ドラッグ成分の脳波による作用評価

研究分担者:裏出 良博 筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構 (IIS) 教授

—新規麻薬 25I-NBOMe のマウス脳波に及ぼす作用—

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

研究要旨:我々は、危険ドラッグ成分の中樞神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚等の作用を検出する方法として、動物実験用脳波解析システムを用いて、脳波の変化から薬物の薬理学的効果を判定する方法を検討している。今回、平成27年11月に指定薬物から新たに麻薬となった25I-NBOMe及び陽性対照2CI(麻薬)を、マウスの腹腔内に投与し、脳波および自発運動量の変化について検討を行った。その結果、本化合物は投与30-50分後までマウスの自発運動量を有意に減少させ、その抑制作用の持続時間は2CIと同じであった。さらに、25I-NBOMe及び2CIはマウスの脳波パターンに変化を与えたが、両化合物の脳波スペクトルに明らかな共通パターンはみられなかった。また、両化合物ともに、それぞれ自発運動量の抑制作用と脳波の周波数変化の発現時間に明らかな相関はみられなかった。また、既報から、ラットの場合、類似構造をもつ薬物群によって、ある程度共通した脳波パターンの変化を起こすと考えられたが、マウスの場合、類似の脳波パターンはみられなかった。従って、今後詳細な解析、検討が必要であると考えられる。

研究協力者

有竹浩介 筑波大学国際統合睡眠医科学研究
機構 (IIS) 准教授

A. 研究目的

乱用が懸念される危険ドラッグを迅速に規制するためには、その有害性を的確に把握し評価することが重要である。しかし、現状では危険ドラッグに関する科学的知見は少なく、また作用についても不明な点が多い。これまで我々は、危険ドラッグ成分の中樞神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚作用を検出する方法として、動物実験用脳波解析システムを導入し、動物の脳波の変化から薬物の薬理学的効果を判定する方法を検討してきた[1-10]。

本研究では、平成27年度に指定薬物から新規

麻薬として規制された25I-NBOMe及び陽性対照2CI(麻薬)(Fig. 1)を、マウスの腹腔内に投与し、脳波および自発運動量の変化について検討を行った。なお、25I-NBOMe及び2CIはセロトニン5HT_{2A}受容体に対する親和性を持ち、幻覚作用をもたらすと考えられる化合物である。

B. 研究方法

【使用動物】C57BL/6系雄性マウス(9週齢、体重21-24g)を日本エスエルシー株式会社より購入した。

【飼育方法】マウスは防音チャンバー内に設置したアクリル製ゲージで個別に管理した。12時間ごとの明暗周期下で、飼料と水を自由に摂取させた。

【脳波・筋電位測定用電極の処理手術と測定装置

への接続】マウスに脳波・筋電位測定用の電極の留置手術を実施し、回復用チャンバーに10日間おいて回復させた。その後、記録用チャンバーに移して電極に測定用ケーブルを接続し、4日間順応させた。

【薬物投与】25I-NBOMeはCayman chemical社製を使用し、2CIは国立衛研で調製したものをを用いた。各薬物は、生理食塩水に溶解させ、それぞれ2.5 mg/kg ずつマウスに腹腔内投与(intraperitoneal administration: i.p.)した。投与は19:00に行い、1日目は溶媒単独のコントロールとして、Vehicle(溶媒)のみを投与し、2日目に薬物を投与した(n=3~4)。

【脳波・筋電位の記録と解析】脳波および筋電位は増幅(脳波:0.5-35 Hz, 筋電位:16-128 Hz)後、サンプリング速度:128 Hzでデジタル化して記録した。解析は脳波記録ソフトウェア'Sleep Sign®'(キッセイコムテック社製)を用いて、10秒間のデータを1エポックとし、脳波と筋電位の周波数成分・波形について、投与後24時間にわたる脳波データを解析した。また、脳波のパワースペクトルのFFT(Fast Fourier Transform)解析を行い、1時間毎の各段階における周波数(0.5 - 34.5 Hz)の強度について、1日目のコントロールを100%として相対強度を算出し、各薬物を比較した。

【自発運動量測定】マウスは動物行動量測定用チャンバー内の個別のケージに入れ、行動量測定を行った。行動量は、動物から放出される赤外線を検出するセンサー(Biotex Japan社)とソフトウェアBiotex 16CH Act Monitor BAI2216(Biotex Japan社)を用いて1分毎の行動量を48時間記録した。自発運動量は、投与後10分毎及び1時間毎の累積量と、各投与0-3時間後の累積量を1日目のコントロールを100%として算出し、化合物投与後のそれぞれの累積値と比較した。

(倫理面の配慮)

動物実験は、筑波大学の動物実験委員会「動物実験に関する指針」、文部科学省のガイドラインおよび動物の愛護および管理に関する法律(第

105号)を厳守し、動物福祉の観点に基づいて、適切な実験計画、実験手技のもとで実施した。

C. 研究結果および考察

【自発運動量に及ぼす作用】25I-NBOMe, 2CIをそれぞれ2.5 mg/kg投与後1時間毎の自発運動累積量の経時変化を、Fig. 2a, 2bに示し、10分毎の180分後までの経時変化をFig. 2a', 2b'に示した。

その結果、25I-NBOMe, 2CI何れを投与した場合においても、投与後1時間毎の累積自発運動量に有意な差はみられなかった(Fig. 2a, 2b)。そこで、投与10分毎の運動量を調べたところ、25I-NBOMeは投与10分後まで有意に運動量は増加したが、その後、投与30-50分後まで有意に運動量が減少した(Fig. 2a')。また、陽性対照である2CIは、投与30-50分後まで有意に運動量が減少した(Fig. 2b')。また、投与後の行動を観察したところ、両化合物ともに、投与20-30分後に無動状態がみられた。

次に、各薬物の投与0-3時間後のマウスの累積自発運動量を比較した(Fig. 3)。縦軸は、1日目のコントロールの累積運動量を100%とした化合物投与後の相対累積運動量を示す。25I-NBOMe及び2CIは、コントロールと比較して累積自発運動量を減少させる傾向はあるものの有意な差はみられなかった(Fig. 3)。

【各周波数における脳波のパワースペクトル変化】

次に、各薬物投与後の脳波の各周波数における強度変化を比較した。1日目のコントロールの0-35 Hzの0.5 Hz毎の各周波数強度を100%とした薬物投与後の値を相対強度として算出し、各周波数における比較を行った。投与20分毎の投与80分までの周波数強度率の経時変化をFig. 4a-4dに示した。

25I-NBOMe投与群では、投与0-20分後まで周波数8.0 - 9.0 Hzの強度がコントロールに比べて約130%増加した(Fig. 4a)。また、投与20-40分後では、周波数3.5 - 4.0 Hzの強度に180%程度

の増加がみられた (Fig. 4b). 一方, 2CI 投与群では, 投与 0-20 分後まで周波数 6.0 - 6.5 Hz の強度がコントロールに比べて約 170%増加した (Fig. 4a). また, 投与 40-60 分後, 60-80 分後では, 特徴的な周波数変化はみられなかった (Fig. 4c, 4d). 脳波のスペクトルパターンの明らかな変化は 25I-NBOMe は, 投与 20-40 分後, 2CI は投与 0-20 分後であり, 自発運動量の抑制作用と脳波の周波数変化の発現時間に相関はみられなかった (Fig. 2, 4). また, 両化合物の脳波スペクトルに明らかに共通したパターンはみられなかった.

一方, これまで我々が報告した通り, 合成カンナビノイド類やアンフェタミン類をラットに投与した場合, 各化合物群の間で類似のスペクトルパターンを示した [1, 3, 6, 9]. しかし, マウスに投与した場合, Fig. 4 に示した通り, 脳波スペクトルパターンに明らかな共通パターンはみられず, ラットの場合とは異なる結果となった. 現時点では, この理由は不明であるが, 今後詳細に検討する予定である.

D. 結論

本研究では, 平成 27 年度に新たに麻薬となった 25I-NBOMe 及び陽性対照 2CI (麻薬) をマウスに投与した結果, 本化合物はマウスの自発運動量を有意に減少させた. さらに, 25I-NBOMe 及び 2CI はマウスの脳波パターンに変化を与えたが, 両化合物の脳波スペクトルに明らかな共通パターンはみられなかった. さらに, 両化合物ともに, それぞれ自発運動量の抑制作用と脳波の周波数変化の発現時間に相関はみられなかった. また, 既報から, ラットの場合, 類似構造を持つ薬物群により, ある程度共通した脳波パターンの変化を起こすと考えられたが [1, 3, 6, 9], マウスの場合, 類似の脳波パターンはみられなかった. 従って, 今後詳細な解析, 検討が必要であると考えられる. また, 今後も引き続き, 興奮薬, 鎮静薬, 幻覚薬等の中枢神経作用薬に関して脳波測定を実施し, 薬物の中枢作用評価法を確立すべく検討を行う

予定である.

E. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究補助金 (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) 「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究」平成 19 年度研究分担報告「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 2) 厚生労働科学研究補助金 (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) 「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究」平成 20 年度研究分担報告「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用および血漿中薬物濃度に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 3) 厚生労働科学研究補助金 (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) 「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 21 年度研究分担報告「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 4) 厚生労働科学研究補助金 (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) 「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 22 年度研究分担報告「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究 (2)」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 5) 厚生労働科学研究補助金 (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) 「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 23 年度研究分担報告「麻薬成分ケタミン誘導体: メトキシセタミンのラット脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 6) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Matsumoto N., Huang Z.L., Urade Y., Goda Y. Effects of synthetic cannabinoids on electroencephalogram power spectra in rats. *Forensic Sci.*

Int. (2012) 215:179-183.

- 7) 厚生労働科学研究補助金(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)「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」平成 24 年度研究分担報告「カチノン系化合物 α -PVP 及び合成カンナビノイド MAM-2201 のラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 8) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Aritake K., Goda Y., Urade Y. Effects of MAM-2201 and α -PVP on electroencephalogram power spectra and locomotor activity in rats. SOFT2013 (2013.10)
- 9) 厚生労働科学研究補助金(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)「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」平成 25 年度研究分担報告「新規流通合成カンナビノイド QUPIC, 5-Fluoro-QUPIC 及び NNEI indazole analog のラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 10) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「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」平成 26 年度研究分担報告「新規流通合成カンナビノイドの 5-Fluoro-ADB のマウス脳波に及ぼす作用」(裏出良博, 内山奈穂子)

F. 健康危険情報

特になし.

G. 研究発表

特になし.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.

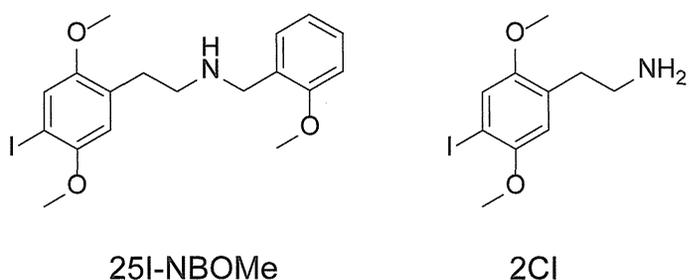


Fig. 1. Structures of synthetic compounds

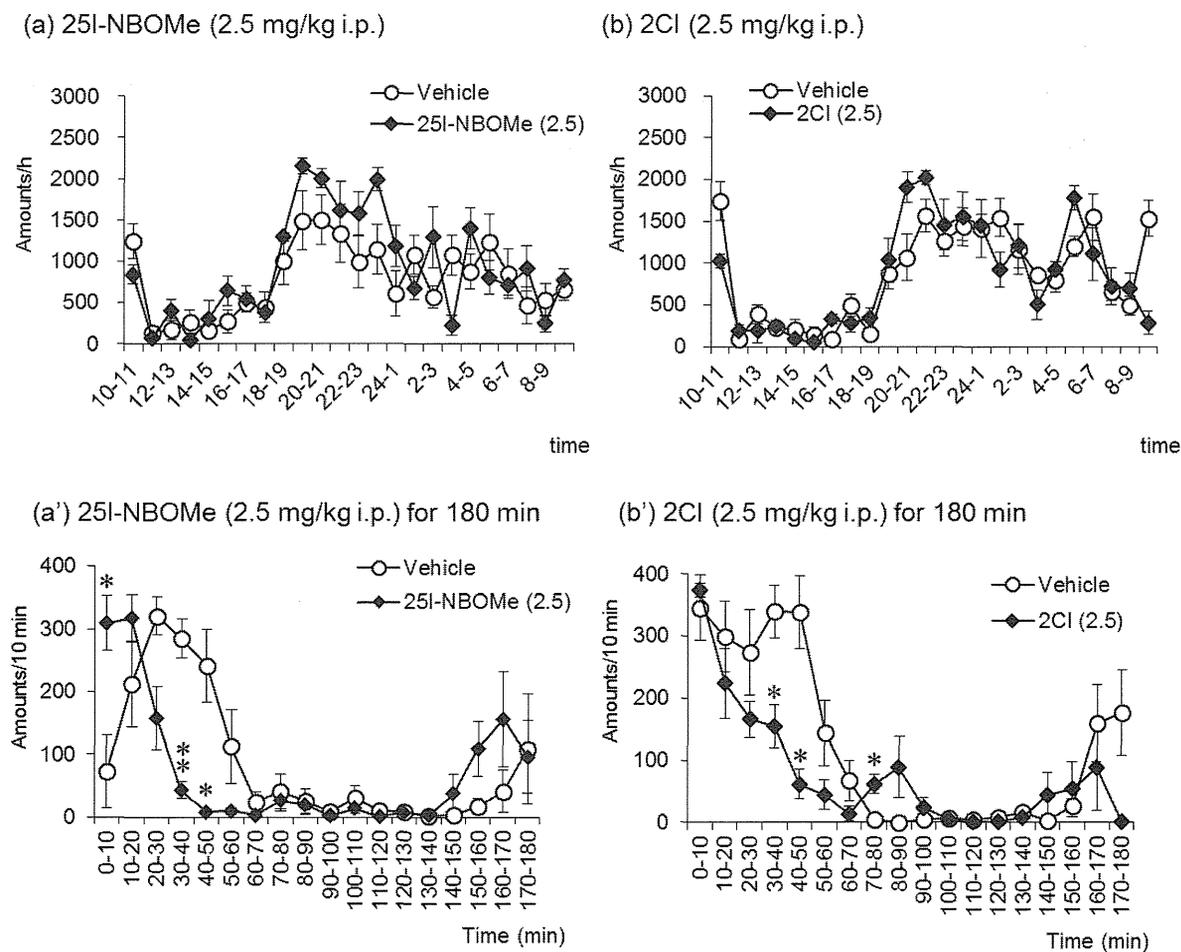


Fig. 2 Time courses of the locomotor activity after i.p. injections of 25I-NBOMe and 2CI at 2.5 mg/kg in mice. Each value is shown as the locomotor count for 1 h (a, b) or 10 min (a', b'). Values are means \pm SEM ($n = 3-4$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, significantly difference from the vehicle injection.

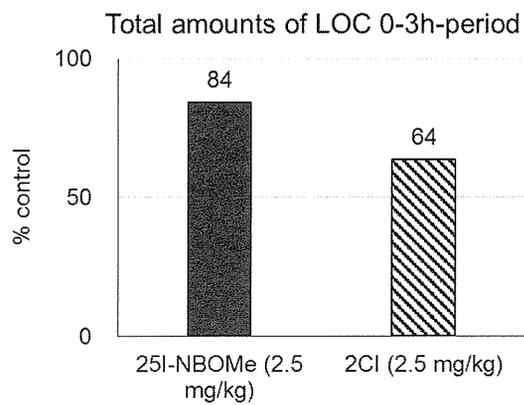


Fig. 3. Total amounts of locomotor activity during a 0-3-h period after injections of 25I-NBOMe and 2CI at 2.5 mg/kg in mice.

Each value is shown as percentage of the control value in animals treated with vehicle. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, significantly difference from the vehicle injection.

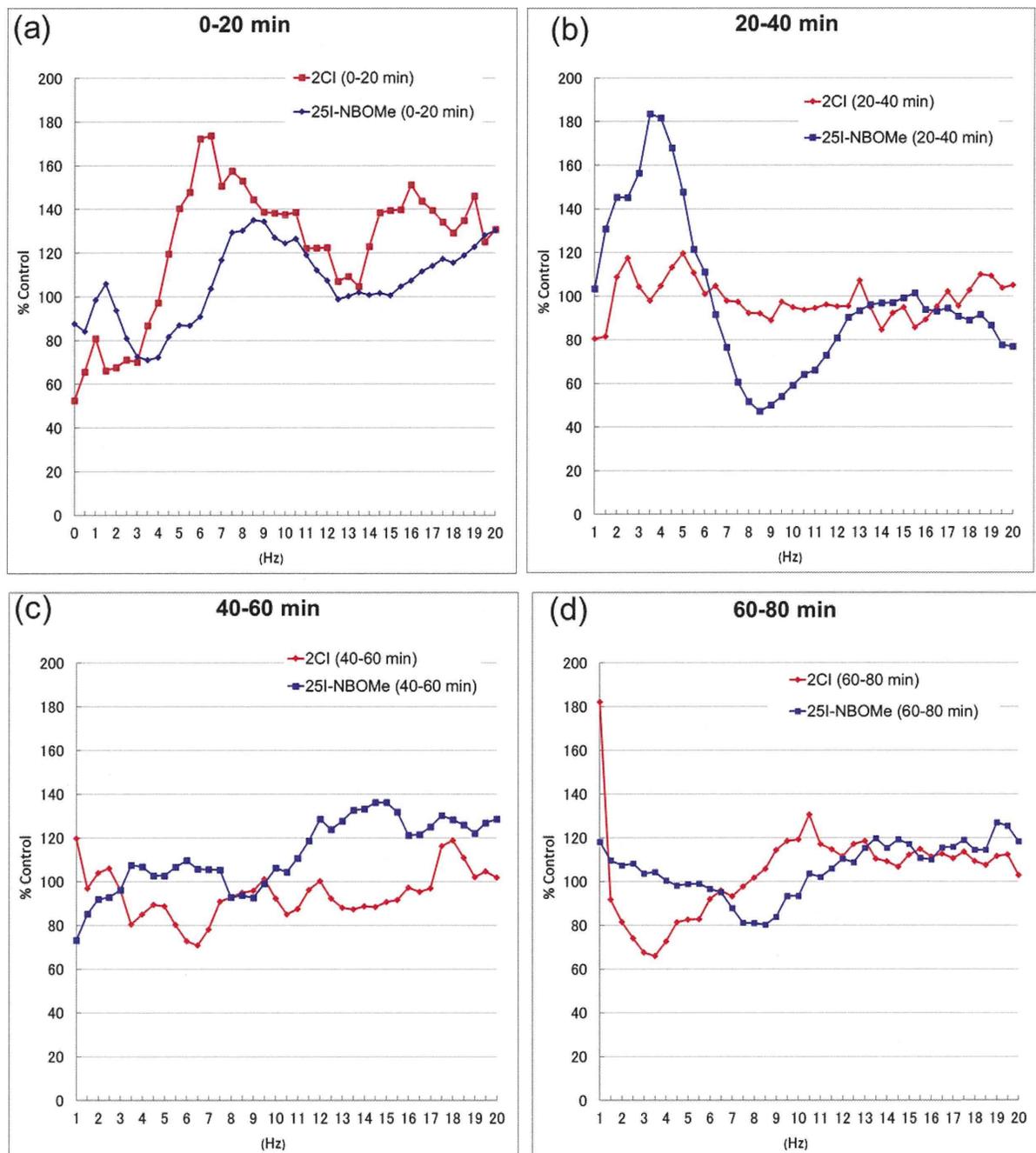


Fig. 4. Time course of changes in EEG power density after i.p. injection of 25I-NBOMe and 2CI at 2.5 mg/kg during a 0-20 min, 20-40 min, 40-60 min and 60-80 min-period, respectively, in mice (a-d). Each value is shown as percentage of the control value in animals obtained with the vehicle treatment.

分担研究課題:植物系危険ドラッグの基原種の特定等に関する研究

研究分担者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—危険ドラッグ製品に含まれる植物片の基原植物種の同定 (1)—

研究要旨: 危険ドラッグ製品中の「土」と称する粉末の同定を目的として, DNA の抽出をおよび 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 2 領域 (*rbcL*, *psbA-trnH*) および核ゲノム上の ITS 領域を分析した結果, ミソハギ科シコウカ属 *Lawsonia inermis* “ヘンナ(ヘナ)”であることが強く示唆された.

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, 植物片とは異なり, 「土」と称して, 販売されている褐色の細粉について分析を行ったので報告する.

B. 研究方法

1. 実験材料

危険ドラッグ製品(図 1)から 10 mg を供試した (n=2). 供試した各 10 mg 試料から DNA を抽出し, 分析に用いた.

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(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 *rbcL*, *psbA-trnH*, の 2 領域, 核ゲノム上の 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^{6,7)}, 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, 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. ダイレクトシーケンスによって配列が解析できないものは, PCR 産物を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, 再度, 無作為に各クローンの塩基配列を決定した. 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',

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・同定に用いられる上記3領域を増幅後、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。各試料ともにDNAは良好に抽出・精製された。

*rbcL*領域について

供試した2検体で増幅産物(バンド)が確認された。塩基配列を確認した結果、2検体の*rbcL*塩基配列は一致した(解析塩基数 448)。 *Lawsonia inermis* (GQ436549)とは2塩基の違いであった。

psbA-trnH 領域について

供試した2検体で増幅産物(バンド)が確認されたが、そのバンドは単一のものではなかった。ダイレクトシーケンスの結果も判別不能であったためサブクローニングを行った。無作為に抽出したクローンにおいて、2つのクローンで *Lawsonia inermis* (GQ435226)と100%一致した(336/336)。また、1つのクローンで *Convolvulus arvensis* と3塩基の違いであった(215/218)。

ITS 領域について

供試した2検体で増幅産物(バンド)が確認されたが、そのバンドは単一のものではなかった。ダイレクトシーケンスの結果ではピークの重なりが見られ、判別不能であったためサブクローニングを行った。無作為に抽出した3クローンにおいて、 *Lawsonia inermis* (FJ980380)と3塩基の違いであった(697/700)。

D. 考察

「土」と称する細粉の鑑定として葉緑体DNAの2領域と核ゲノム上の1領域を分析し、塩基配列類似性を調査した。DNAの抽出効率、PCR産物の検出感度から、本試料は土ではなく植物の細粉であることが考えられた。

3領域ともにミソハギ科シコウカ属 *Lawsonia inermis* “ヘンナ(ヘナ)”と高い配列類似性がみられたことから、本細粉は上記植物であることが強く示唆された。本植物は草木染めなどに利用される植物で、髪の毛のトリートメント剤⁸⁾やヘナタトゥー⁹⁾と呼ばれるファッション(ボディアート)などに利用される植物であり、それを代用して危険ドラッグ製品に用いたものと考えられる。ヘナは熱帯乾燥地域で栽培されており、上記のトリートメント剤、タトゥーなどに利用される製品は粉末で国内に流通しており、本試料もその粉末であったと考えられる。

今回の分析では、*rbcL*領域においてはピークの重なりが一部見られるものダイレクトシーケンスにおいて配列の解析は可能であった(図2)。*psbA-trnH* 領域ではサブクローニングの結果、ヒルガオ科セイヨウヒルガオ属セイヨウヒルガオ *Convolvulus arvensis* が検出された。雑草として国内を問わず海外でも広く分布することから¹⁰⁾、採取時の混入とも考えられたが、その詳細は本研究では明らかにできなかった。また、*psbA-trnH* 領域配列が、 *Lawsonia inermis* が約100bp長いことから、シーケンスの後半部分で *Lawsonia inermis* の配列を確認することができた(図3)。

ITS領域においては無作為抽出の全3クローンで *Lawsonia inermis* が検出された。上記3領域の分析結果から、本製品は粉末化されているため量的な割合は明確にはできないが、主要な植物として *Lawsonia inermis* が使用されていることが示唆された。また、製品中に土が実際に使用されているのかは明らかにできなかった。

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) 塩田鹿納命, 美髪再生－髪にやさしいヘンナをはじめましょう, メタモル出版, (2008)
- 9) Ulaya Gadalla / Margot Ibrahim 共著, 手塚千史 訳 Henna-Tattoos はじめてのヘナタトゥー, 岳陽舎, (2002)
- 10) 国立環境研究所 侵入生物データベース
<http://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/>

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. 分析試料

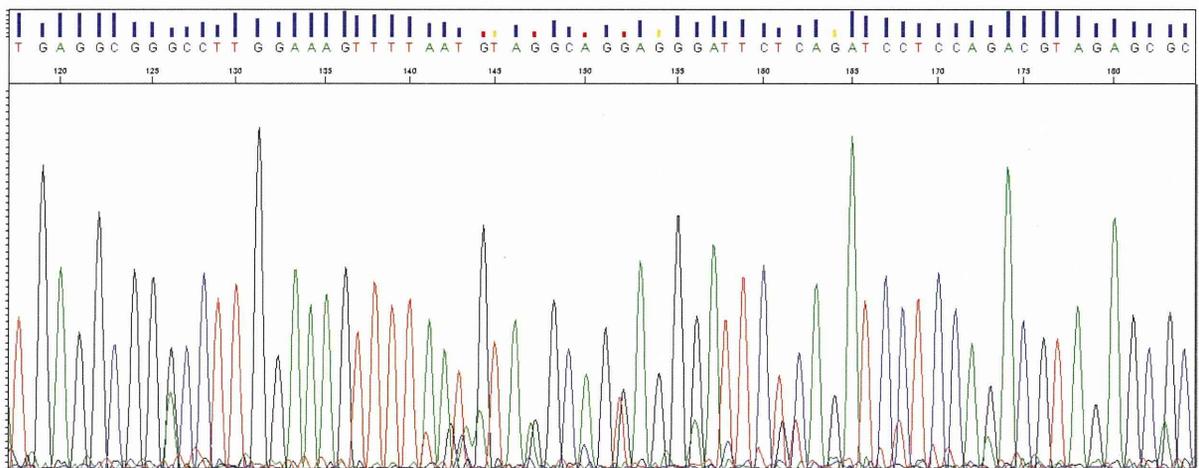


図 2. *rbcL* 領域におけるダイレクトシーケンシングの波形データ

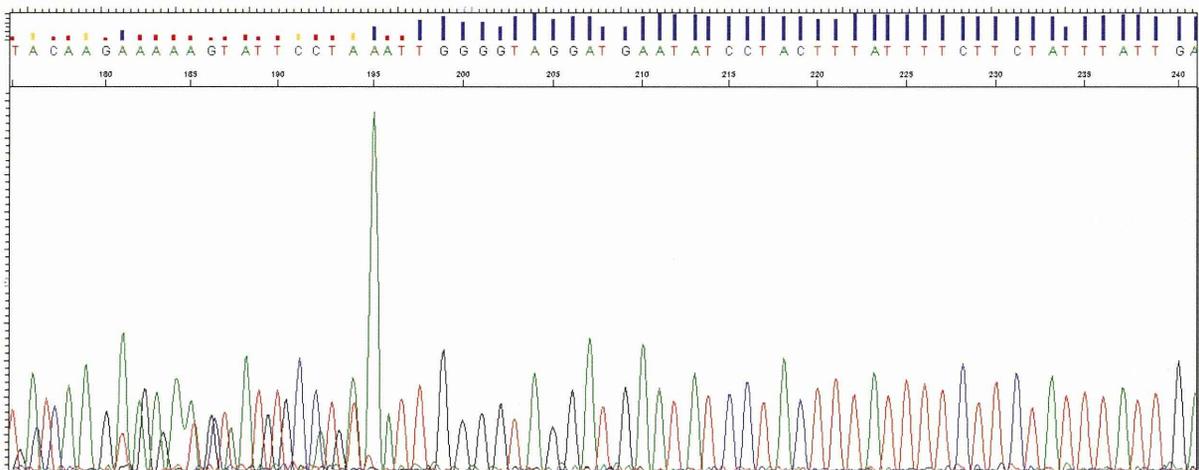


図 3. *psbA-trnH* 領域におけるダイレクトシーケンシングの波形データ

分担研究課題:植物系危険ドラッグの基原種の特等に関する研究

研究分担者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—危険ドラッグ製品に含まれる植物片の基原植物種の同定 (2)—

研究要旨:危険ドラッグ製品の基原植物の同定として、カプセル剤 2 製品、植物細片 1 製品を分析した。カプセル剤の内容物はいずれも植物の微細片であり、1 製品は種名を同定することはできなかったが、ハマミズナ科メセンブリアンテマム属植物であることが示唆された。また 1 製品は *Argyrea nervosa* “ハワイアンベイビーウッドローズ”であることが示唆された。また、植物細片 1 製品は *Humulus lupulus* ホップであることが示唆された。本研究機関で危険ドラッグ製品からホップが検出されたのは初めてであった。

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、カプセル剤(2製品)とこれまでとパッケージや記載内容は同様であるが、植物片の形状が異なる植物細片 1 製品について DNA 塩基配列を用いた基原植物の同定を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 実験材料

3 製品(図 1:カプセル剤)を供試した(褐色カプセル剤(a)、白色カプセル剤(b)、植物細片(c))。カプセル剤はカプセルから内容物を取り出し計量した。

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 *rbcL*, *matK*, *trnL-trnF*, *psbA-trnH* および ITS 領域、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、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。

rbcL forward primer;

ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC,

rbcL reverse primer;

GTAAAATCAAGTCCACCRG,

matK forward primer;
CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG,
matK reverse primer;
ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC,
psbA-trnH forward primer;
CGAAGCTCCATCTACAAATGG,
psbA-trnH reverse primer;
ACTGCCTTGATCCACTTGGC,
trnL-trnF forward primer;
CGAAATCGGTAGACGCTACG,
trnL-trnF reverse primer;
ATTTGAACTGGTGACACGAG,
ITS forward primer;
TCCTCCGCTTATTGATATGC,
ITS reverse primer;
CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG.

C. 研究結果

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。

(a) 褐色カプセル剤について

matK 領域を除く 4 領域で明瞭な増幅産物 (バンド) が確認された (図 2)。ITS 領域では *Sceletium strictum* (AJ582938) と 590 塩基中 585 塩基で一致した (99%)。 *psbA-trnH* 領域では *Mesembryanthemum haeckelianum* (KP071047) と 99% (440/424) の一致であった。 *trnL-trnF* 領域では *Sceletium exalatum* (AM161446) と 921 塩基中 911 塩基で一致した。 *rbcL* 領域は *Mesembryanthemum crystallinum* (KM016695) と 598 塩基中 601 塩基が一致した。

(b) 白色カプセル剤について

分析した 5 領域すべてで明瞭な増幅産物 (バンド) が確認された (図 2)。 *matK* 領域では *Argyrea nervosa* (KF242477) と 887 塩基中 884 塩基で一

致した (99%)。 *psbA-trnH* 領域では *Argyrea nervosa* (KF242477) と 99% (252/255) の一致であった。 *trnL-trnF* 領域では *Argyrea nervosa* (KF242477) と 833 塩基中 834 塩基で一致した。 *rbcL* 領域は *Argyrea nervosa* (KF242477) と 598 塩基中 599 塩基が一致した。

(c) 植物細片について

分析した 5 領域すべてで明瞭な増幅産物 (バンド) が確認された。 *matK* 領域では *Humulus lupulus* (KT266264) と 100% 一致した (528/528)。 *psbA-trnH* 領域では *Humulus lupulus* (KT266264) と 98% (301/306) の一致であった。 *trnL-trnF* 領域では *Humulus lupulus* (KT266264) と 100% 一致した (496/496)。 *rbcL* 領域は *Humulus lupulus* (KT266264) と 100% 一致した (537/537)。 ITS 領域では *Humulus lupulus* (EF136401) と 522 塩基中 525 塩基で一致した (99%)。

D. 考察

危険ドラッグ製品 3 製品について DNA を分析し塩基配列類似性を調査した。

(a) 褐色カプセルは植物種の同定が明確にできなかった。 *Sceletium* 属は現在 DNA 分類学において *Mesembryanthemum* 属に統一 (改変) され、現在、同属と見直され、種名も一部変更しつつある^{9,10} (ex. *Sceletium strictum* → *Mesembryanthemum ladismithiense*, *Sceletium exalatum* → *Mesembryanthemum exalatum*)。いずれにしても、今回、高い配列類似性を示した植物はハマミズナ科メセンブリアンテマム属の植物であることが示唆された。この属の植物において幻覚性植物として知られている種は *Sceletium tortuosum* → *Mesembryanthemum tortuosum* “Kanna” である^{11,12}。アルカロイドであるメセンブリンを含む植物として知られている¹³。本製品に含まれる植物が Kanna であるかどうかは、データベース上の塩基配列情報が 2 領域と少なく、分析塩基数が少ないことより、明確にはできなかったが、成分分析としてメセンブリンの存在は調査する必

要があると思われる。また、本製品はミトラギニンの含有が同研究部の分析により示されているが、*Mitragyna speciosa* のDNAは検出されなかった。これは本製品が製品名“○○○X”として流通しており、それとは別に、“○○○”は *Mitragyna speciosa* のエキス剤として流通していることから本製品にはエキスのみが利用されているとも考えられた。

(b) 白色カプセル剤は塩基配列の結果から、*Argyrea nervosa* ヒルガオ科の“ハワイアンベイベーウッドローズ”であることが示唆された。カプセルの内容物も白色であり、種子の粉碎物であると考えられた。また、本製品は同研究部の分析によりハワイアンベイベーウッドローズが含有するリゼルグ酸アミドが検出されている。

(c) 植物細片は塩基配列の結果から、*Humulus lupulus* アサ科ホップであることが示唆された。危険ドラッグにホップが検出されたのはこれが初めてであった。

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) Klak C, Bruyns P, Hedderson T. *Taxon* **56**, 737–756 (2007).
- 10) Klak C and Bruyns PV. *Bothalia* **43**, 197–206. (2013).
- 11) Schultes, R. E., Hofmann, A., Rättsch, C. PLANT OF THE GODS, Healing Arts Press (2001)
- 12) EROWID <https://www.erowid.org/splash.php>
- 13) Roscher, J., Posch, T. N., Pütz, M., Huhn, C., *Electrophoresis*, **33**, 1567–70 (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。



褐色カプセル剤(a)とその内容物



白色カプセル剤(b)とその内容物

図1. 分析依頼製品

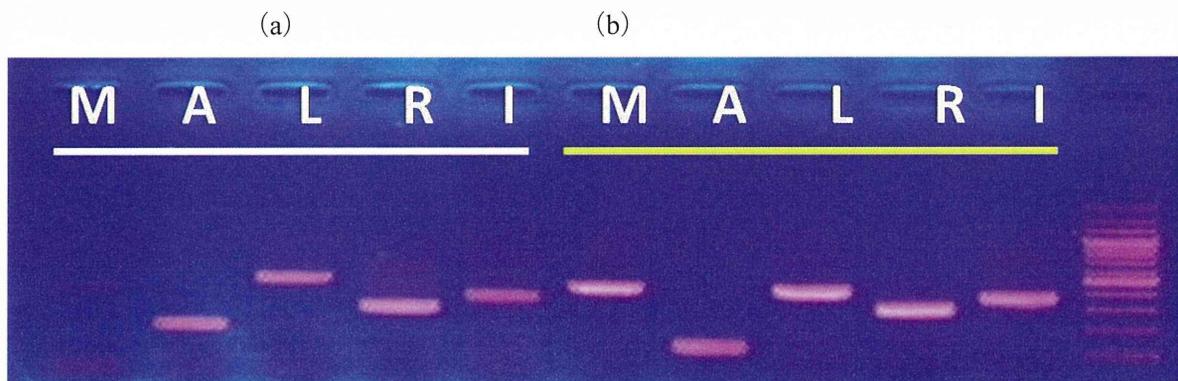


図2. カプセル剤(a, b)の電気泳動図

1%アガロースゲル, 200bp マーカー(右), M; *matK*, A; *psbA-trnH*, L; *trnL-trnF*, R; *rbcL*, I; ITS

分担研究課題:植物系危険ドラッグの基原種の特等に関する研究

研究分担者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—危険ドラッグ製品に含まれる植物片の基原植物種の同定 (3)—

研究要旨:危険ドラッグ製品中の合成化合物を含まないいわゆる幻覚性植物として流通している製品の DNA 分析を 7 製品を用いて行った. 各種 DNA 塩基配列解析の結果, *Turnera diffusa* (2 製品), *Calea ternifolia* (2 製品), *Nymphaea* sp. (2 製品), *Nelumbo nucifera* であることが示唆された. いずれも学術的情報は不明瞭な部分が多いが, いくつかの書物において幻覚性植物として紹介されている植物種であった.

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, 粉碎物に, 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. それ以前の危険ドラッグ市場では, 幻覚性植物として様々な植物が市場に流通していた. 形状は植物の乾燥物であるが, 合成化合物の添加は検出されず, 植物名が製品の包装に記載されているものであった. 今回, 分析を行った製品はそれら製品であったが, 危険ドラッグの取締り強化とともに流通が見られることから改めてそれら製品について 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ので報告する.

B. 研究方法

1. 実験材料

危険ドラッグ市場品, 「DA-1, Damiana」, 「DAMIANA LEAF」, 「DH-1, Calea Zacatechichi」, 「DH-X, Calea Zacatechichi」, 「WL-2, White Lotus」, 「BL-1, Blue Lotus」, 「PL-1, Pink Lotus」の 7 製品を分析試料とした.

2. 実験方法

各試料(約 20 mg)を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, 核リボソーム 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¹⁻³⁾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, ダイレクトシーケンシングを行った. 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.

rbcl forward primer;

ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC,

rbcL reverse primer;
GTAAAATCAAGTCCACCRCG,
matK forward primer;
CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG,
matK reverse primer;
ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC,
psbA-trnH forward primer;
CGAAGCTCCATCTACAAATGG,
psbA-trnH reverse primer;
ACTGCCTTGATCCACTTGGC,
trnL-trnF forward primer;
CGAAATCGGTAGACGCTACG,
trnL-trnF reverse primer;
ATTTGAACTGGTGACACGAG,
ITS forward primer;
TCCTCCGCTTATTGATATGC,
ITS reverse primer;
CCTTATCATTAGAGGAAGGAG.

C. 研究結果

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。

1) 「DA-1, Damiana」の解析

*rbcL*領域は *Turnera diffusa* (JQ593109)と533塩基中522塩基が一致した。*trnL-trnF*領域では *Turnera ulmifolia* (JQ771871)と96% (478/500)の一致であった。ITS領域では *Turnera diffusa* (AY973381)と522塩基中521塩基が一致した。*psbA-trnH*領域では *Turnera scabra* (HG963571)と79% (188/238)の一致であった。

2) 「DH-1, Calea Zacatechichi」の解析

*psbA-trnH*領域では *Calea ternifolia* (HG963527)と411塩基中410塩基で一致した。*Calea megacephala* (AY215519)とは98% (355/364)の一致であった。*rbcL*領域では *Calea*

megacephala (AY215089)と99% (540/545)一致した。*trnL-trnF*領域では *Calea megacephala* (AY216023)と100% (490/490)一致した。*matK*領域では *Calea megacephala* (AY215769)と99% (535/541)一致した。

3) 「WL-2, White Lotus」の解析

*matK*領域では *Nymphaea nouchali* (FJ597752)と532塩基中531塩基で一致した。*psbA-trnH*領域では *Nymphaea capensis* (FJ527756)と97% (413/426)の一致であった。ITS領域では *Nymphaea nouchali* (FJ198405)と100% (507/507)一致した。*trnL-trnF*領域では *Nymphaea micrantha* (FR717561)と489塩基中488塩基で一致した。*rbcL*領域は *Nymphaea nouchali* (FJ597747)と555塩基中554塩基が一致した。

4) 「DAMIANA LEAF」の解析

*rbcL*領域は *Turnera diffusa* (JQ593109)と547塩基中533塩基が一致した。*trnL-trnF*領域では *Turnera ulmifolia* (JQ771871)と94% (716/765)の一致であった。ITS領域では *Turnera diffusa* (AY973381)と606塩基中604塩基が一致した。*psbA-trnH*領域では *Turnera scabra* (HG963571)と82% (225/276)の一致であった。

5) 「DH-X, Calea Zacatechichi」の解析

*psbA-trnH*領域では *Calea ternifolia* (HG963527)と415塩基中414塩基で一致した。*Calea megacephala* (AY215519)とは98% (375/384)の一致であった。*rbcL*領域では *Calea jamaicensis* (JQ590577)と100% (552/552)一致した。*trnL-trnF*領域では *Calea megacephala* (AY216023)と100% (490/490)一致した。

6) 「PL-1, Pink Lotus」の解析

*trnL-trnF*領域では *Nelumbo nucifera* (KM655836)と100% (965/965)の一致であった。ITS領域では *Nelumbo nucifera* (DQ901015)と707塩基中704塩基が一致した。*psbA-trnH*領域では *Nelumbo nucifera* (KT865195)と99% (344/349)の一致であった。