

Salvia divinorumの識別方法に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2015-11-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高井, 理恵 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/50391

Salvia divinorum の識別方法に関する研究

2014年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(岐 阜 大 学)

高 井 理 恵

Salvia divinorum の識別方法に関する研究

高 井 理 恵

目次

序章		3 頁
第 1 章	SNPs マーカーを用いた幻覚性サルビア (<i>Salvia divinorum</i>) の判別方法の開発	25 頁
第 2 章	葉緑体 DNA の TrnL-TrnF spacer 領域を用いた サルビア属の識別	35 頁
総合考察		51 頁
結論		56 頁
謝辞		57 頁
引用文献		58 頁

序章

現代社会において、犯罪は時代や場所によって色を変えながら常に横行し、悪質・巧妙化、広域化及びスピード化は絶えることなく、犯罪者の組織化、国際化および匿名化も進んだ。そして、今もなお、犯罪捜査を取り巻く状況はあらゆる面において変化し続けている。平成 8 年から 7 年連続で戦後最多の記録を更新し続けた刑法犯認知件数は、14 年をピークに減少を続けているものの、銃器を使用した凶悪事件や街頭における無差別殺傷事件が続発するなど、犯罪情勢は依然として予断を許さない。また、地域社会の脆弱化と人間関係の希薄化は「人からの捜査」を困難に、経済のグローバル化等による物流の活発化は「物からの捜査」を困難にし、携帯電話とインターネットの普及は生活に大きな利便を与える一方で犯罪の温床となるなど、社会構造の変化に伴う捜査環境の変化も著しい。こうした中、警察の捜査は第一線の捜査員等が地道な活動を積み重ね、捜査力を強化し、緻密かつ適正に捜査するために変革を続けながら犯人を検挙し、個人の生命、身体および財産を保護し、公共の安全と秩序を維持するという警察の責務を遂行している。

さらに、匿名性の高い犯罪の出現や裁判員制度の導入により、従来にも増して客観的証拠の収集が必要とされていることから、警察では科学技術を活用した犯罪捜査を強化している。

科学技術の急速な発展、情報化社会の著しい進展等は、犯罪の質・量の両面に大きな影響を与えている。このような情勢の変化に的確に対処するためには、捜査における科学の活用を推進し、犯罪捜査を高度化していくことが必要不可欠であり、警察ではこれまで最先端の科学技術を鑑識技術へ導入するなど、科学捜査力の強化を図ってきた。

最新の科学技術を駆使した捜査が望まれる中、警察では、DNA 型検査法を導入し犯人特定に大きく貢献している。

かつては、個人識別法の科学的手段としては ABO 式血液型を主とする血液型、血清型等による鑑定が主流であった。しかし、1985 年、アレック・ジェフリーズによる DNA フィンガープリンティング法が発表されて以降、急速に DNA 型鑑定は発展してきた。日本の警察では、科学

警察研究所がこの発表以降、研究に着手し、平成元年には実用化が始まり、各都道府県の科学捜査研究所にも DNA 型鑑定が導入されるようになった。

さらに、平成 15 年 8 月から導入した、9 座位の STR 型および性別に関するアメロゲニン座位の型を検出する STR 型検査法では、日本人で最も出現頻度が高い DNA 型の組み合わせの場合で約 1100 万人に 1 人という確率で個人識別を行うことが可能となった。18 年 11 月には新たに 6 座位を追加して 15 座位の STR 型とアメロゲニン座位の型を検出する STR 型検査法を導入し、現在日本人で最も出現頻度が高い DNA 型の組み合わせの場合で約 4 兆 7 千億人に 1 人という確率で個人識別を行うことが可能となっている。また、遺留資料 DNA 型情報検索システムを導入し、迅速な犯罪捜査や再犯防止に役立てていくデータベースも構築された。さらに、21 年 5 月に裁判員制度が導入され、科学捜査による客観的立証は裁判員の的確な心証形成にも大きく資することが期待され、今後も科学捜査力の強化を推進していく必要がある。

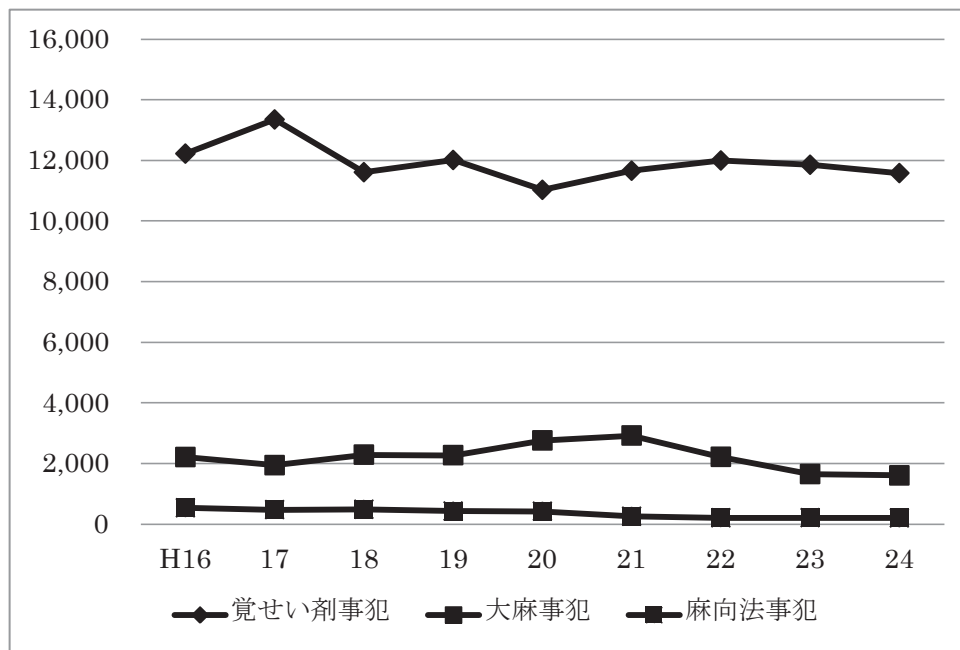
ところで、現代の様々な犯罪の中に、覚せい剤等の薬物事案がある。世界保健機関(WHO)によれば、薬物の乱用とは、「医学的な常識を故意に逸脱した用途、あるいは用法により薬物を多量に摂取する行為」とある。当然、医師の処方の下で治療薬として使用する場合は何ら問題はないが、爽快感、多幸福感、幻覚などを求めて、あるいは軽率な好奇心で一度でも使用すれば乱用に当たる。

薬物乱用は、乱用者自身の精神、身体をむしろむしばみばかりではなく、幻覚、妄想等により、乱用者が殺人、放火等の凶悪な事件や重大な交通事故等を引き起こすこともあるほか、薬物の密売が暴力団等の犯罪組織の資金源となっていることから、薬物乱用は社会の安全を脅かす重大犯罪である。ここに、近年の薬物事案の検挙人員の推移をグラフに示した(Fig1-1~4)。覚せい剤取締法違反の検挙人員は薬物事犯全体の9割近くであり、検挙人員としては横這いもしくは減少傾向にはあるが、依然として厳しい状況にある。また、再犯者の占める割合が高いことが伺え、この他にも暴力団構成員等が多く占めていることがわかっている。また、大麻事

犯の検挙人員としては、減少傾向にあるものの依然として高水準である。また、覚せい剤事犯とは異なり、初犯者や20歳以下の若年層の占める割合が高いことが挙げられる。

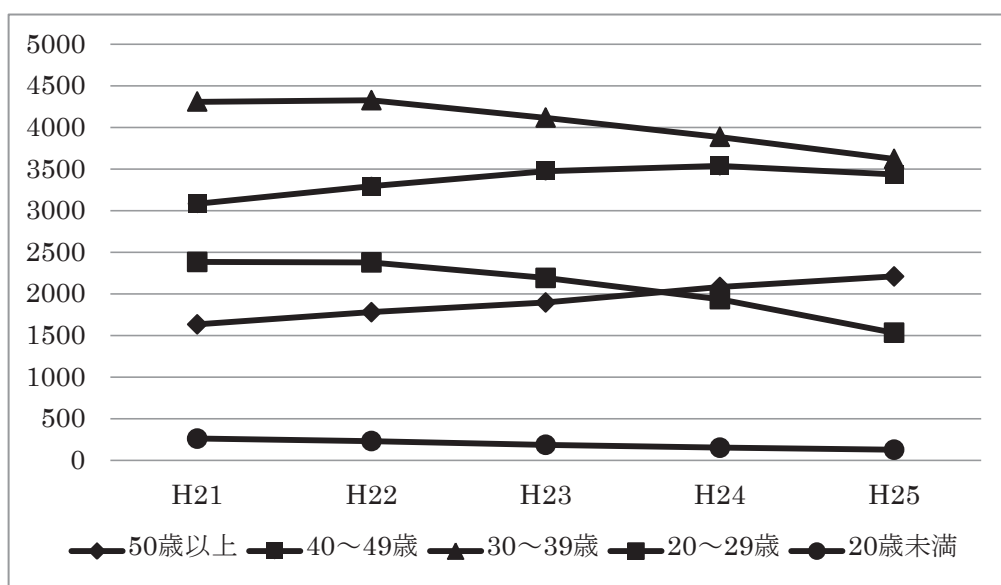
さらに、近年、いわゆる脱法ドラッグと呼ばれる、覚せい剤・大麻に化学構造を似せて作られた物質などが添加された薬物が流通している。これらは合法ハーブやお香などと称して店舗・インターネット等で公然と販売され、若者を中心に乱用がみられている。合法などという言葉で気軽に使用出来てしまうことから、麻薬等の乱用への入門薬となる恐れがあり、また、その後の健康被害の発生も懸念される。実際、いわゆる脱法ドラッグ使用者が関与している可能性のある事案が発生している。死亡事案では、男性が路上で暴れて保護されたのち死亡し、その際にいわゆる脱法ドラッグとみられる液体を所持していた事案、部屋で暴れた男が死亡、部屋から乾燥した植物片が発見された事案、いわゆる脱法ドラッグを吸引した女性が意識を失った後死亡した事案が発生している。さらに交通事故事案としては、いわゆる脱法ドラッグを吸引して車を運転した男が商店街を暴走し女性をひき逃げした事案、同じく吸引して車を運転した男が高校生をはねて死亡させた事案が発生している。さらに心身に異常を来して救急搬送されたり、不審行動をおこしたりする事案が相次いで発生している。警察では、使用者を危険運転致傷罪等により検挙するとともに脱法ドラッグの販売業者に対する指導・警告、悪質な販売業者の薬事法違反による検挙等に努めている。さらに、新しい脱法ドラッグが次々に出現していることを踏まえ、25年2月には、麻薬や指定薬物に化学構造が類似する特定の物質群が薬事法における指定薬物として包括的に指定され、所持、使用、購入、譲り受けも含め規制対象となった。これにより、平成24年4月の時点で指定薬物は68物質であったのが、平成25年9月には881物質になった。

このような薬物事案の検挙に際し、事案に対応する薬物鑑定を行っている。現在警察で行っている薬物事案に対する鑑定は、ガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィー、赤外吸収スペクトル等の機器分析で物質を特定し、それらの結果を基に検挙に至る。覚せい剤は、我が国ではアンフェタミン、メタンフェタミンがほとんどであり、この2種類はともに化学合成物質で



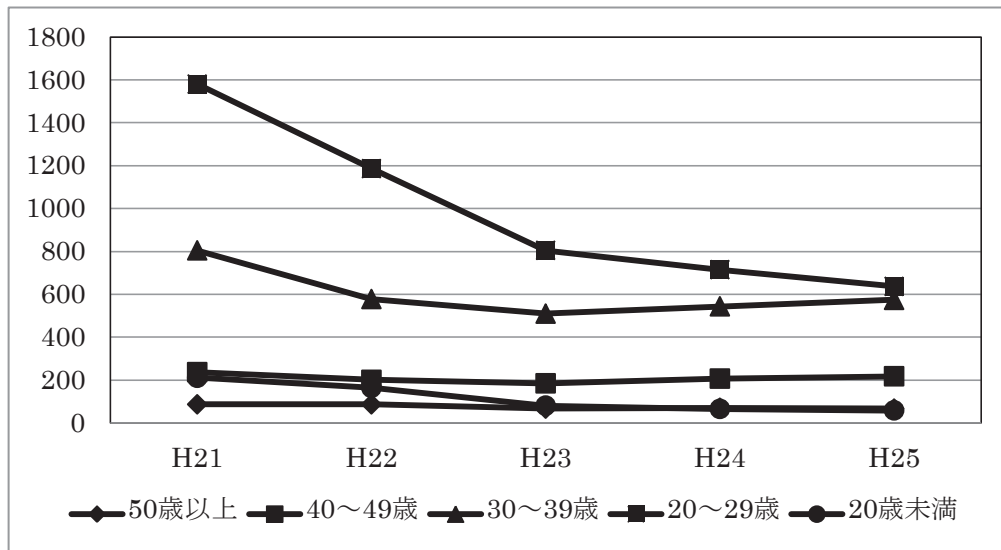
			年次	H16	17	18	19	20	21	22	23	24
覚醒剤事犯	検挙人員(人)			12,220	13,348	11,806	12,009	11,025	11,655	11,993	11,852	11,577
		粉末(kg)		406.1	118.9	126.8	339.3	397.5	356.3	305.5	338.8	348.5
		錠剤(錠)		366	26,402	56,886	4,914	22,371	12,799	8	39	223
大麻事犯	検挙人員(人)			2,209	1,941	2,288	2,271	2,758	2,920	2,216	1,648	1,603
		乾燥大麻		606.6	643.1	225.8	437.8	375.1	195.1	144.9	134.7	301.8
		大麻樹脂		294.5	230.5	96.7	20.1	33.1	17.2	8.8	28.0	41.7
麻薬及び 向精神薬 事犯	MDMA等合成麻薬	検挙人員(人)		417	403	370	296	281	107	61	77	81
		押収量(錠)		469,126	571,522	186,226	1,233,883	217,172	85,688	17,326	26,288	3,674
	コカイン	検挙人員(人)		76	36	72	99	98	116	105	82	61
		押収量(kg)		85.4	2.9	9.8	18.5	5.5	11.3	6.9	28.7	6.6
	ヘロイン	検挙人員(人)		13	21	22	13	13	15	17	18	30
		押収量(kg)		0.03	0.10	2.3	1.8	1.0	1.2	0.3	3.5	0.1
	向精神薬	検挙人員(人)		29	15	21	19	30	17	23	31	28
		押収量(錠)		7,583	19,287	17,311	13,072	48,031	2,918	17,524	11,039	263
	あへん事犯	検挙人員(人)		59	12	27	41	14	28	21	12	6
		押収量(kg)		1.7	1.0	17.2	19.4	6.6	3.2	3.7	7.6	0.2

Fig1-1. 薬物事犯の年次推移



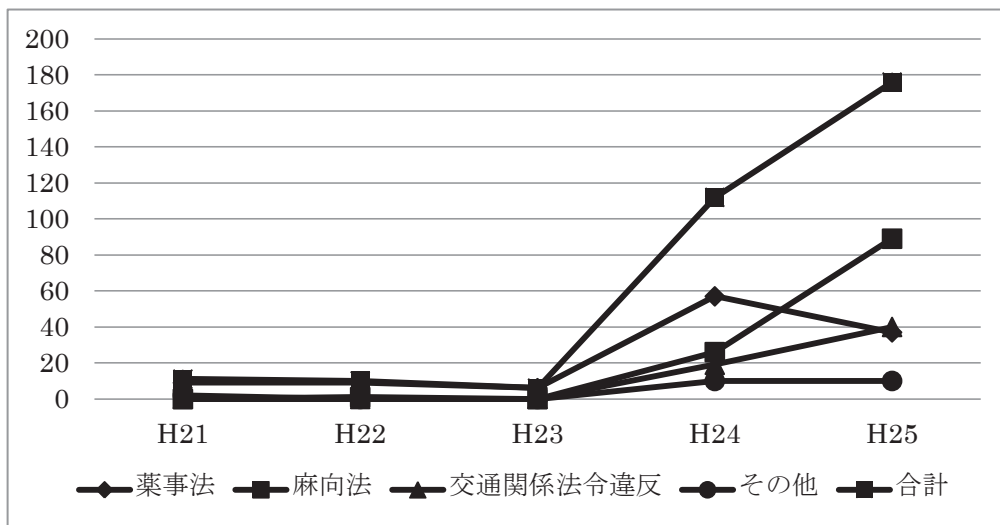
	H21	H22	H23	H24	H25
検挙人員	11655	11993	11852	11577	10909
うち初犯者数	4890	4879	4814	4461	4010
50歳以上	1630	1776	1893	2079	2206
40～49歳	3080	3290	3473	3533	3430
30～39歳	4308	4324	4115	3884	3619
20～29歳	2380	2375	2188	1933	1530
20歳未満	257	228	183	148	124

Fig1-2. 覚せい剤法違反者数の年齢別年次推移



	H21	H22	H23	H24	H25
検挙人員	2920	2216	1648	1603	1555
うち初犯者数	2475	1803	1323	1292	1208
50歳以上	87	87	67	71	67
40～49歳	237	201	185	207	218
30～39歳	805	578	510	544	574
20～29歳	1580	1186	805	715	637
20歳未満	211	164	81	66	59

Fig1-3. 大麻取締り法違反者数の年齢別年次推移



検挙人員	H21	H22	H23	H24	H25
薬事法	9	9	6	57	37
麻向法	0	1	0	26	89
交通関係法令違反	0	0	0	19	40
その他	2	0	0	10	10
合計	11	10	6	112	176

Fig1-4. 脱法ドラッグにおける検挙事案別年次推移

あり、天然には存在していない。一方で大麻はアサ科の植物で、天然に存在しているものである。大麻取締法でいう大麻とは、植物として的大麻草およびその製品を意味し、布・ロープ等に利用される茎皮の繊維ならびに小鳥の飼料として利用される種子は規制の対象外である。この大麻に含有されるカンナビノイドを検出することにより大麻の同定を行い検挙に至るのであるが、しばしば、大麻草の栽培目的に大麻種子を所持している事案がある。種子はカンナビノイドを含有しておらず、規制の対象外であるが、明らかな栽培目的である場合は罰せられる。しかし、この種子が大麻かどうかを鑑定するには、実際に発芽させ栽培してからの検出・同定という工程を踏まなくてはならない。しかしそれは煩雑な工程と時間が必要であり、それを迅速にする方法として、また、微量大麻等の鑑定についても考慮も含め、大麻草の DNA 解析による同定・推定を行う検査の研究が行われてきている(室ら, 2010)。

また、人体に健康被害を及ぼす可能性のある麻薬成分などを含む植物は、ケンおよびアツミゲシがあへん法により、ハカマオニゲシ、コカ、ジャワコカ、幻覚成分を含有するキノコ(いわゆるマジックマッシュルーム)が麻薬及び向精神薬取締法によりそれぞれ規制されている。これらは規制されていない同じ仲間の植物と外観がよく似ている場合が多いため、正しく見分ける必要がある。

さらに、かつて脱法ドラッグとして流通していた、薬事法で指定薬物として規制されることになった幻覚性植物サルビア・ディビノルム(*Salvia divinorum*)がある。*Salvia divinorum*はシソ科の多年草であり、原産地はメキシコ合衆国オアハカ州シエラマサテコであり、標高 300m から 1800m の山峡やその他の湿潤な範囲といった、ごく限られた地域でしか生育していない(Valdés, Leander J. et al., 1983)。草丈は 1m 以上に達し、葉は先端がとがった卵形で鋸歯があり、葉長は 15cm に達する。中空で角型の茎をもち、花は紫色の萼を伴った白色の S 字状、形態は総状花序である(Marushia R., 2003)。

花の形態や容量、花蜜の成分から、ハチドリを対象とした鳥媒花であると推測されているが、野生では一例のみが観察されるにとどまっている。また *Salvia divinorum* は冷涼で湿潤かつ

日陰の場所で生育するが、花芽形成は日光によって促進される。花芽形成時期も10月から5月の間であればいつでも可能であるため、花芽形成は散発的に起こる。開花時期がそろわず、開花場所もそろわないことから、現在では受粉による繁殖は付随的ないしは痕跡的なものであると考えられている。温室内での人工受粉実験では自家受粉で3%、他家受粉でも28%程度の小堅果形成率しかないこともこの推測を裏付けている。また花粉も5割程度しか受精能力を持たないことが判明している(Valdés III, L.J. et al., 1987)。そのため *Salvia divinorum* はおもに匍匐芽によって繁殖を行い、自然状態での種の形成は確認されていない。

Salvia divinorum は1939年にマサテコ族のシャーマニズムについて研究を行っていた人類学者 Roberto Weitlaner によって初めて西欧の記録に登場した。しかし記録自体は *Salvia divinorum* の幻覚作用を用いた宗教的側面を記録したものであり、具体的に植物が同定されたのは1962年、Gordon Wasson 及び Albert Hoffman による記録である。

マサテコ族はメキシコ合衆国オアハカ州北東部の山岳地帯及び高原地帯を拠点とする少数民族である。マサテコ族社会において *Salvia divinorum* は重要な宗教的地位を占めている。現地名で *Salvia divinorum* は”ska Maria”ないしは”ska Pastora”と呼ばれており、聖母マリアの化身であると考えられている。このような宗教的側面から英語圏では“Sage of the Seers”(予言者のセージ)や“Diviners’ Sage”(占い師のセージ)と呼ばれる(Ott, J., 1996)。また、非常に神聖視されているため、その栽培場所は秘匿されており、近代に至るまで西欧の記録に載らなかった理由の一つとなっている。しかしながら *Salvia divinorum* の起源については明らかではない。スペイン人による征服以前からマサテコ族が現地に居住していたことは確認されているが、*Salvia divinorum* がそれ以前から自生していたのか、あるいは人為的に交配されたものなのであるかは判明していない。しかしながら伝統的に *Salvia divinorum* の使用を行っているのはマサテコ族のみであるため、マサテコ族ないしは滅亡したアステカ族がその起源に深くかかわっていると推測される。また前述した通り、*Salvia divinorum* は受粉による栽培が難しいため、マサテコ族は株分けによって *Salvia divinorum* を栽培しており、マサ

テコ族がもつ *Salvia divinorum* はすべてクローン個体である(Valdes III, L.J. et al., 1983). また野生とされる *Salvia divinorum* もすべてマサテコ族の旧居住地近くから発見されていることから, *Salvia divinorum* が栽培種であるという仮説も提唱されている.

マサテコ族における *Salvia divinorum* の利用は医療目的と宗教的目的であるがその区別はあいまいである. 例えば *Salvia divinorum* の葉を 5 枚ほど手ないしは石臼で刻み、水に浸したものを経口摂取することで頭痛の解消や、リュウマチ症状の緩和を行う万能薬として利用する(Valdés III, L.J. et al., 1987). 一方で敵対する呪術師が『腹に石を詰め込む』呪いをかけてきた場合の対抗手段として、聖母マリアの化身である *Salvia divinorum* を摂取することで『腹に詰め込まれた石を取り除く』ことができるとも考えられている. また *Salvia divinorum* の葉 50 枚分を病人に摂取させることで、幻覚症状を惹起しその病気の原因について患者自身に語らせるないしは、呪いをかけている敵について語らせるという方法もとられる(Valdes III, L.J., 2001).

また、*Salvia divinorum* はシャーマンの宗教的訓練の入門として利用されることもある. マサテコ族のシャーマンは 2 年以上に及ぶ宗教的訓練を行うが、『天国の風景を見る』ために幻覚性の植物を用いる. *Salvia divinorum* や幻覚性マッシュルーム、幻覚性アサガオ(*Rivea corymbosa* (L.), Hallier, f.)の種などが用いられるが、このうち最も効果が軽い *Salvia divinorum* が最初の訓練に用いられる. このような訓練を行うことで、聖母マリアやその他の聖人の知恵を授かることができると考えられている.

Salvia divinorum には salvinorin B・I salvidivin A・D salvinicin A・B divinorin A-E などの様々な成分が含まれているが、幻覚症状を引き起こすことが判明しているのは salvinorin A のみである(Cunningham CW, et al., 2011). salvinorin A は *Salvia divinorum* の乾燥葉に 0.89-3.70 mg/g (Gruber JW, et al., 1999) 含有されている. しかしながら salvinorin A の含有量はたとえ遺伝的に同一の植物体であっても非常に幅が広い. 実際、*Salvia divinorum* の乾燥葉に 3.2-5.0 mg/g 含有(Tsujikawa K, et al., 2008) や、

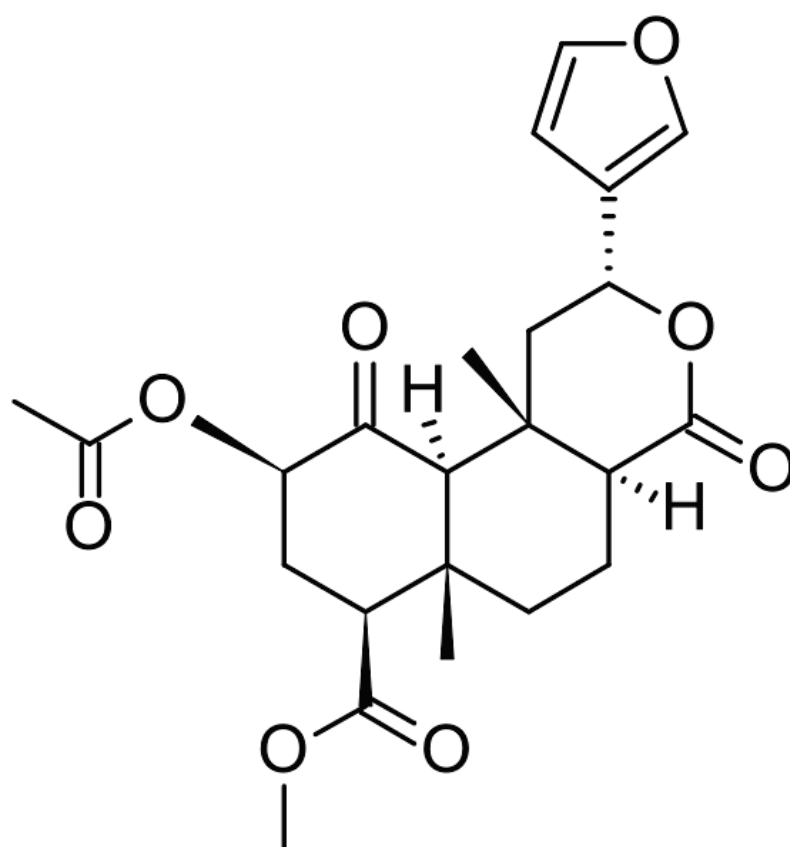


Fig1-5. Salvigorin A



Fig1-6 *Salvia divinorum* の花



Fig1-7 乾燥状態の *Salvia divinorum*

7.6-7.2 mg/g 含有 (Medana C, et al., 2006) といった報告もなされている。また Wolowich らが市場に出回っている *Salvia divinorum* の濃縮物を調査したところ、5-20 倍濃縮とされるもので 0.126 - 0.951 mg/g であったが (Wolowich WR, et al., 2006) , 2-25 倍濃縮とされるものでは 4.1-38.9 mg/g (TsujiKawa K, et al., 2008) といった結果も出ている。そのため葉の量や、濃縮倍率などから実際の摂取量を推定することは困難である。

salvinorin A は人体内で選択的に κ -オピオイド受容体に結合することで幻覚作用を発揮するが、*Salvia divinorum* の成分のうちこのような作用を持つものは salvinorin A のみである。また salvinorin A は既知の化合物の中で唯一の非含窒素 κ -オピオイド受容体アゴニストである。salvinorin A に既知の植物性幻覚剤との構造類似性が見られないものの、合成 κ -オピオイド受容体アゴニストであるエナドリノールと構造類似性を有する (Roth BL, et al., 2002)。

salvinorin A は κ -オピオイド受容体とは高い親和性を持つものの、その他の受容体、イオンチャンネルなどとの親和性は無視できる程度である。これは LSD やジメチルトリプタミン、シロシビン、メスカリンといった他の植物性幻覚剤が μ -オピオイド受容体、 δ -オピオイド受容体、シグマ受容体、グルタミン酸受容体といった受容体をターゲットとしていることと対照的である。

しかしながら salvinorin A は κ -オピオイド受容体との結合のみでその幻覚作用を示すわけではない可能性が示唆されている。放射性炭素を導入した [11C] salvinorin A をヒビに投与し、PET を用いてイメージ化したところ、オピオイド受容体の非選択的阻害剤であるナロキソンを投与しても脳内の [11C] salvinorin A 分布に差がないことが判明した (Hooker JM, et al., 2008)。また salvinorin A は κ -オピオイド受容体が豊富に存在する中脳灰質といった部位だけではなく、 κ -オピオイド受容体がほとんど存在しない視床下部といった部位のグルコース代謝活性を上げることも判明している (Hooker JM, et al., 2009)。そのため salvinorin A は κ -オピオイド受容体との直接的な相互作用だけではなく、その周辺組織とも複雑な相互作用をしているものと推測される。また現時点では salvinorin A が κ -オピオイド受容体以外の分子タ

ーゲットと相互作用している可能性も否定できない。

salvinorin A はほとんど粘膜吸収されない。そのため salvinorin A 4 mg を舌下投与してもなんらの幻覚性も示さない (Mendelson JE, 2011)。しかし蒸気を吸引させる方法で salvinorin A を投与すると体重 1kg あたり 6 μ g という微量でも幻覚性を示す。また幻覚の強度は投与量に比例することも判明している (MacLean KA, et al., 2013)。

また摂取された salvinorin A は速やかに脳に達することが知られている。放射性炭素を導入した [11C] salvinorin A による脳 PET イメージングでは、ヒビに摂取後 40 秒で [11C] salvinorin A の集積は最大となり、その量は投与量の 3.3 % に相当した。この速度はおおよそコカインと同等である。しかし脳からの消失も同様に素早く、半減期は 8 分である。なお、In vitro 実験の結果から、ヒトでは他の薬物代謝と同様に、水酸化酵素ファミリーであるシトクロム P450 によるグルクロン酸抱合が salvinorin A の代謝にかかわっていると推測されている (Teksin ZS, et al., 2009)。

salvinorin A の化学的全合成は 2008 年、Nozawa らによって Wieland-Miescher ケトンを出発物質とした 20 ステップの多段階合成により達成されている (Nozawa M1, et al., 2008)。しかしながら多段階の合成であるため、現時点では *Salvia divinorum* からの salvinorin A 精製に比べて経済的に優れた方法ではない。ただし κ -オピオイド受容体と相互作用しない部分に官能基を導入し、難代謝性や膜透過性を付与することで、経口摂取で十分な効果が得られるより手軽な salvinorin A 派生物が市場に出回る可能性は存在する。実際、消化管の痛みを解消する目的で経口投与可能な salvinorin A アナログ (2-O-cinnamoylsalvinorin B) の開発が進んでおり、モデルマウスでの薬効が確認されている (Salaga M, et al., 2014)。

現在のところ salvinorin A の官能基導入には *Salvia divinorum* から精製した salvinorin A を用いたセミ合成が主流である。そして salvinorin A に官能基を導入することで、受容体とのアフィニティが顕著に変化することが判明している (Polepally PR1, et al., 2013)。例えば

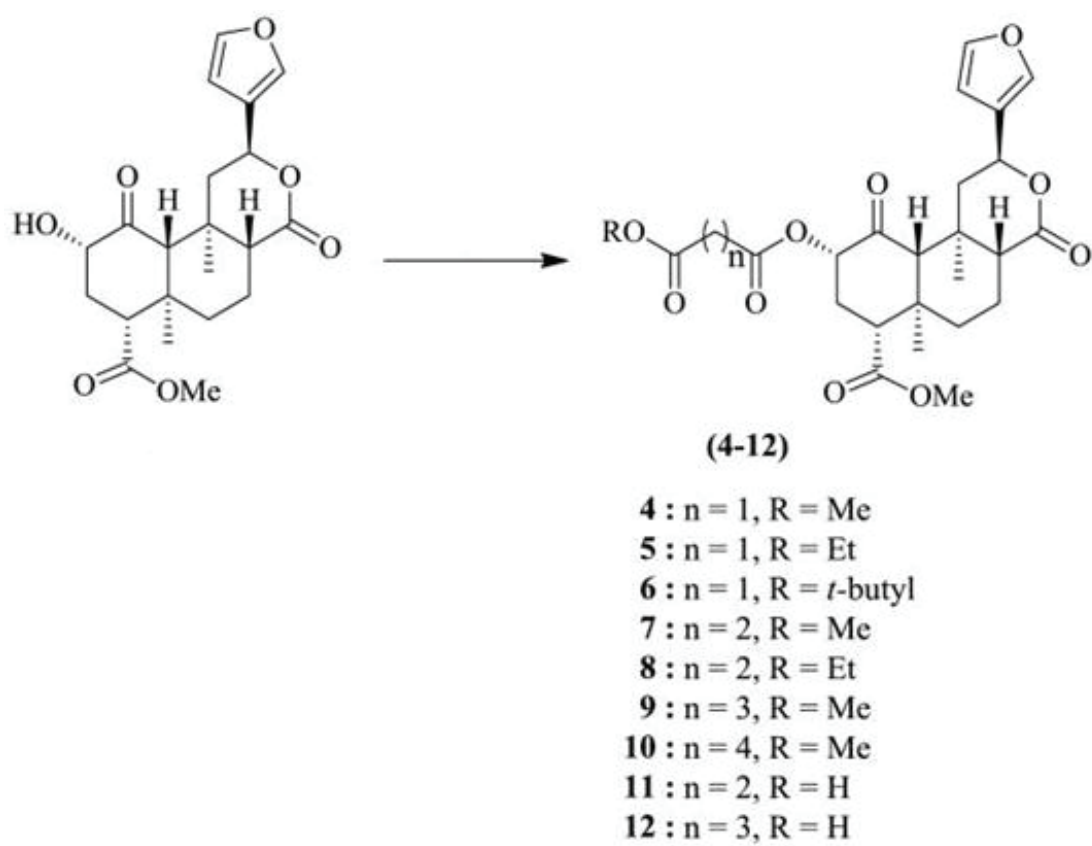


Fig1-8 salvinorin A に対する官能基導入

salvinorin A の 22 位にエステルを導入する(Fig.1-8 の 4)ことで、通常の κ -オピオイド受容体に対するアフィニティ($K_i = 6.2 \pm 2.2$ nM)を 3 倍程度高めることができる($K_i = 2.0 \pm 0.3$ nM). また μ -オピオイド受容体ともある程度のアフィニティ($K_i = 711 \pm 134$ nM)を有する構造も発見されている. このことは salvinorin A の効果を増大したり、モルヒネのターゲット受容体である μ -オピオイド受容体を同時に刺激することで新たな幻覚症状を引き起こしたりといったドラッグデザインが可能であることを示唆している. またこの官能基導入は salvinorin A の水酸化を除けば 1 ステップの合成であり、収率も多いものでは 70 % 近くあるなど経済的に引き合う可能性が高いことも指摘したい.

アカゲザルを用いた動物実験で salvinorin A は眼瞼下垂、顔面弛緩を引き起こすことが判明している (Butelman ER, et al., 2009). またラットに salvinorin A を投与して 5-選択反応時間課題(ケージの前方に 5 つの穴が開いており、その上部にはそれぞれライトがついている。短時間(通常 0.5-1 秒間)ライトがついているうちに正しい穴にラットが鼻先を入れると後方の給餌カゴにエサが入られる仕組みとなっている。ライトが短時間しかつかないため、常にライトを見ていないと正解できない。そのため注意力の評価が可能となる。またライトがついていないときに鼻先を入れてもえさは出ないため、鼻先を入りたい衝動を抑える必要があることから衝動性も評価可能)を行わせたところ、モチベーションの低下が見られることも判明している (Nemeth CL, et al., 2010). またラットにおいて、salvinorin A は短期記憶には影響しないものの、空間記憶、長期記憶、エピソード記憶を損なうことが判明している (Braidia D, et al., 2011). そのほかにも salvinorin A は報酬系の主たるホルモンである細胞外ドーパミンレベルを下げることをラットを用いた in vivo 実験において判明している (Carlezon WA Jr, et al., 2006). そしてこのドーパミンレベルの低下が salvinorin A 誘導性神経不安症を誘発していると推定されている (Grilli M, et al., 2009).

ヒトにおいても salvinorin A は様々な精神作用が報告されている. 肯定的な効果と否定的

な効果を以下に列記する(Zawilska JB1, et al., 2013)。

肯定的(ないしは目的とする)効果

- ・リラクゼーションと気分の改善
- ・落ちついた気分になる
- ・強烈だが短時間のサイケデリック感覚
- ・意識の変成
- ・極彩色の光景が見える
- ・幻聴
- ・夢の中にいるような感覚
- ・思考の深化
- ・分離感覚ないしは個人認識、リアリティの喪失
- ・官能性及び美的評価能力の向上
- ・浮いている感覚
- ・共感覚
- ・自己肯定感の向上
- ・洞察力の向上
- ・霊的な体験

否定的(ないしは目的としない)効果

- ・体性感覚の喪失
- ・統合失調
- ・取り留めのない思考
- ・精神的疲労感、肉体的疲労感、眠気

- ・めまい
- ・イライラ感、不安感、恐怖感、パニック感
- ・神経不安、身体違和感
- ・急性パラノイア
- ・神経運動性の興奮
- ・一時的な発話困難
- ・記憶喪失
- ・運動困難
- ・大量の発汗
- ・寒気や鳥肌
- ・吐き気、嘔吐、腹部不快感

これらの作用は *salvinorin A* 摂取後 1 分以内に現れ、15 分程度持続する。

このほかにもいわゆる幽体離脱の感覚 (Kelly BC. 2011.)、特定の方向に押される感覚、体がねじられたり、伸ばされたりする感覚、まわりの風景がマンガのように見える感覚などが報告されている。しかし心拍数の上昇や、血圧の上昇は観察されない。

インターネット上には *Salvia divinorum* の危険性を明確に示す科学的データが少ないことを逆手にとって、*Salvia divinorum* の使用は安全であると主張するサイトも存在する (Hoover V, et al., 2008)。しかし実際には複数の事故例が報告されている。例としては *Salvia divinorum* とマリファナの使用歴がある 15 歳の少年が、急性のパラノイア症状、思考障害、既視感によって緊急搬送され、その後 3 日間症状が継続した例 (Singh S. 2007.) や、*Salvia divinorum* の吸入直後に急性パラノイアに襲われた 21 歳の男性が、病院への緊急搬送中に車両から飛び降りる (Przekop P, et al., 2009) といった例が報告されている。さらに *Salvia divinorum* の慢性毒性についても注意を払う必要がある。報告例は少ないものの一日あたり *Salvia divinorum* のタバコを 3~5 本、4 ヶ月程度連用した 51 歳の白人女性が、消

化管の不快感から嘔吐，下痢を訴えたという報告もある(Travis CR, et al., 2012)。

また一般的に κ -オピオイド受容体アゴニスト系の薬物は依存性が低いものの，salvinorin A は肯定的効果が摂取量と比例するのに対して，否定的効果が摂取量とあまり比例しないという特徴から，利用者は摂取量を増大させがちであるという指摘もなされている。

Salvia divinorum の乱用は先進諸国で顕著である。アメリカ合衆国においては”マジックミント”，”レディ・サリー”，”サリーD”といったストリートネームで呼ばれており，”Purple Sticky”というブランドまで確立している(Lange JE, et al., 2008)。Fordらの報告(Ford JA, et al., 2011)によればアメリカ合衆国における *Salvia divinorum* の使用履歴をもつ人口割合は，12-17 歳の少年集団で 1.66 %，18-34 歳の青年集団で 5.08 %に達するとされている。この値はアメリカ合衆国において近年上昇傾向にあり，166,453 人を対象とした国勢調査で，それまでの人生で一度でも *Salvia divinorum* の使用を行った割合は 2006 年 0.7 % だったものが 2008 年には 1.3 %に上昇している。(Wu L-T, et al., 2011)カナダでも同様に 12-17 歳の少年 42,179 人を調査したところ，3.8 %が直近 1 年間で *Salvia divinorum* を使用しており，6.3%がそれまでの人生の中で一度は使用したことがあるという結果が報告されている(Currie CL, 2013)。ヨーロッパ諸国でも *Salvia divinorum* の蔓延は深刻である。2008 年～2010 年にかけてヨーロッパ 7 カ国で 2 年間にわたりインターネット上行われた調査では，30 品目のレクリエーションドラッグのなかで最も人気のドラッグが *Salvia divinorum*であった(Deluca P, Davey Z, et al., 2012)。同様に英国においても *Salvia divinorum* は合法ドラッグ市場において一番人気となっている(Schmidt MM, et al., 2011)。

Salvia divinorum の摂取方法は水パイプを用いた蒸気の吸入が主であり，マリファナ吸引と同様である。一回の平均使用量は葉 0.25 g - 0.75 g であり，これを平均 24 秒間かけて吸入する。より長い効果を得るために，口の中で葉を噛む摂取方法もあるがあまり一般的ではない。

Salvia divinorum の使用者はアルコール，タバコ，マリファナ，LSD，ヘロイン，コカインな

どを嗜好する傾向にある(Nyi PP, et al., 2010). そのため *Salvia divinorum* の使用者は他のドラッグも併用している確率が高い(Perron BE, et al., 2012). 実際の犯罪捜査では *Salvia divinorum* の摘発が他のハードドラッグ摘発にも貢献する可能性が高いと考えられる. さらに *Salvia divinorum* の使用者は違法薬物を販売したり, 窃盗を行うといったリスクテイク行為を行う者の中に多いことから, 治安維持の観点からも *Salvia divinorum* の摘発が望まれる.

また *Salvia divinorum* の蔓延として注目すべきは, その使用目的である. 意識変性を体験したい, 単純に楽しみたいといった使用理由のほかにスピリチュアリズムの実践のため, 自己理解のため, 霊的体験をしたい, 精神世界の問題を解決したいといった理由が使用者からは聞かれる(Sumnall HR, et al., 2012). *Salvia divinorum* の起源がアマゾンの少数民族であり, シャーマニズムとのつながりも強い天然ハーブということから *Salvia divinorum* のスピリチュアリズムとの親和性は高い. そのため, アメリカ合衆国のヒッピー文化とマリファナの関係のように, 日本においてもスピリチュアリズムの隆盛とともに *Salvia divinorum* の使用がさらに爆発的に増加する可能性も考えられる. 実際に 219 人の *Salvia divinorum* 使用者を対象にインターネット調査を行うと, 21 歳以下では単純な好奇心が使用理由の 1 番に挙がるのに対して, 22 歳以上ではスピリチュアルな効果を狙ったというのが使用理由の 1 番である. またスピリチュアルな効果を狙う使用者ほど, 繰り返し *Salvia divinorum* の使用を行うといった傾向も見逃すべきではない.

現段階での市販ドラッグ製品からの鑑定方法は, TLC 法, HPLC-PDA 法および HPLC-MS 法が報告されている. これらの検査には幾つかの手順を踏む必要がある. また, 化学系薬物と異なり, 植物成分の検査は夾雑物が多いので, これらを除く前処理を行わないと正しい結果が得られない. また同時に, 陽性か陰性かあるいは擬陽性かの判断なしにやみくもに機器分析装置にかけると, 植物に含まれる夾雑物により短時間で HPLC カラム, GC カラムあるいは MS イオン源を汚し, 機器の劣化を招くことになる. さらに, GC-MS スペクトルにお

いて、含有量が低い場合、標準品がないとその確認は難しくなる。

Salvia divinorum の使用はマサテコ族の伝統と結びついており、その歴史は長いといえる。また覚せい剤やコカインと比較して依存性が低く、リラクゼーション作用や運動機能の抑制といった作用をもついわゆるダウナー系のドラッグであるためその潜在的危険度は低いとの指摘もありうるだろう。

しかしながら *Salvia divinorum* の使用は先進諸国では始まったばかりであり、他のハードドラッグの使用とも密接に結びついている。またリラクゼーション作用とは別の副作用として、急性のパラノイア症状を呈することがあり、病院搬送中の車両から飛び降りるといった重大な事故も起きている。脱法ドラッグを服用し、車を運転するといった昨今の状況をかんがみるに *Salvia divinorum* の使用はいささかも安全とはいえない。また脱法ドラッグの特徴として、複数の薬物を混合して使用するというものがある。*Salvia divinorum* が他の薬物と併用された場合の効果についてはほとんど分かっておらず、危険性の評価は困難である。

また *Salvia divinorum* の幻覚成分である salvinorin A は既知の化合物の中で唯一の非含窒素 κ -オピオイド受容体アゴニストであるという顕著な特徴を持っている。そのため今後、いわゆるデザイナードラッグの基本骨格として利用されうる。日本の脱法ドラッグ市場において、官能基の変更による規制逃れは常態化しており、新たな基本骨格の出現によってその状況が加速する可能性も高い。salvinorin A はすでに全合成が達成されているが、合成ステップが多段にわたり収率が悪いこと、salvinorin A は *Salvia divinorum* の中に比較的少量に含まれることを考えると、デザイナードラッグを経済的に合成するためには、抽出した salvinorin A の官能基を保護し、特定の官能基を導入するセミ合成の手法が用いられる可能性が高い。この観点からも出発物質の原料となる *Salvia divinorum* の検出を容易にし、摘発を行いやすくする手法の確立が望まれる。ところで、*Salvia* 属植物は、中南米や地中海沿岸、東アジア地域を中心に約900種類以上が分布し、その花は非常に多くの形態や色をもつことから観賞用として多くの品種が流通している。また、セージと呼ばれるような薬用に利用される品種もある。

このように *Salvia* 属が多く種の有する中で、*Salvia divinorum* が流通している品種に混在していないことの確認や、*Salvia divinorum* と一般に売られているような観賞用のサルビアを間違えて規制してしまわないよう、*Salvia divinorum* を区別する方法の研究が求められる。

しかしながら *Salvia divinorum* の規制には困難が予想される。*Salvia divinorum* の葉は大麻のような特徴的な外観を有しておらず、形態学的な識別が困難である。乾燥させて刻んだ葉となるとその判別はさらに飛躍的に困難となる。さらに、化学系薬物にはない植物成分由来の薬物のデメリットを改善するためにも、*Salvia divinorum* の形態、乾燥状態、部位にかかわらず判別が行える DNA を用いての判別手法の確立が急務である。摘発の観点からは幸いなことに、*Salvia divinorum* の受粉による繁殖は非常に困難であり、栽培はもっぱら株分けによる。そのため市場に出回っている *Salvia divinorum* は事実上クローン個体であり、その遺伝子はほぼ均一であると推定される。そのため DNA を用いての判別手法が、*Salvia divinorum* の交配による遺伝子座の変異により急速に陳腐化することは考えにくい。また DNA 型解析手法は法科学分野で長年の使用実績がある手法であり、実際の運用方法も確立している。

以上のことから *Salvia divinorum* の DNA による判定方法の確立が急務であると判断し、研究を行った。

第 1 章

SNPs マーカーを用いた幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) の判別方法の開発

1. 緒言

近年, 薬物を容易に入手できる状況, 好奇心やファッション感覚から, 若年層への汚染が浸透し, 覚せい剤をはじめとする種々の薬物が乱用され, 大きな社会問題となっている. 特に, 脱法ドラッグは, 服用すれば多幸感や快感が得られ, かつ法律に触れないことから, 安易に流通している. 幻覚成分サルビノリンAを含有する幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) も, 以前は脱法ドラッグとして流通していたが, 平成 19 年からは規制の対象となり, 一般的な観賞用サルビアと, 幻覚性サルビアの識別法の開発が求められている. 葉緑体 DNA 中の RubisCO (リブローズ二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ) は, 多くの植物で最も塩基配列データの解析が進んでおり^{2), 3)}, 中でも RubisCO 大サブユニットの遺伝子 (*rbcL*) は, 植物の系統解析によく利用されている⁴⁾. 本研究は, *rbcL* の一塩基多型部位を選出し, SNPs タイピングによる幻覚性サルビアと観賞用サルビアの判別について検討したので報告する.

2. 実験材料及び実験方法

(1)検査試料

幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) と観賞用サルビア 29 種の合計 30 種を試料とした (Table2-1). 各試料を -80°C で凍結させた後, 磨碎し, QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出した.

(2)テンプレートの DNA 増幅

RubisCO の大サブユニットの部分配列の増幅には, 吉田ら (2006) のプライマー (F: 5'-GG ACTTACCAGTCTTGATCG-3', R: 5'-TCACATGTACCTGCAGTAGC-3') を用いた. 反応条件は, $95^{\circ}\text{C} \cdot 90$ 秒のプレヒートに続き, $95^{\circ}\text{C} \cdot 30$ 秒, $58^{\circ}\text{C} \cdot 30$ 秒, $72^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 分を 35 サイクルの条件で行った.

得られた PCR 増幅産物について, 1.5% アガロースゲルでの電気泳動により増幅を確認後, PCR 増幅産物に ExoSAP-IT (usb 社) を用いて, 残存したプライマーと dNTP を除去し PCR 増幅産物を精製した.

(3)マルチプレックス塩基伸長反応

SNPs 部位の選択は, *Salvia divinorum* の既知の塩基配列を基準とし, 日本 DNA データベース (DDBJ) を利用して, 相同性検索を行い, 相同性の高い種においても一塩基違いのある部位を 4カ所選択した. それら 4カ所をタイピングするための 4種類の SNPs タイピングプライマー (SNPsal-1, SNPsal-2, SNPsal-3, SNPsal-4) は, SNPs 部位が 3'末端にくるようにデザインし, 3種類にはそれぞれ断片長が異なるよう 5'側に PolyT を設定した (Table2-2).

精製した PCR 増幅産物を鋳型とし, SNPs タイピングプライマーおよび SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems 社) を用いて, マルチプレックス塩基伸長反応を行った⁶⁾. 反応後の残存 ddNTP は, Shurimp Alkaline Phosphatase (usb 社) を用いて除去した. なお, タイピングプライマーの混合比は, SNPsal-1, SNPsal-2, SNPsal-3, SNPsal-4 をそれぞれ 2:1:4:3 で行った.

Table2-1. 実験に用いたサルビア属の植物

<i>Salvia divinorum</i>
<i>Salvia azurea</i>
<i>Salvia blepharophylla</i>
<i>Salvia bulleyana</i>
<i>Salvia chamaedryoides</i>
<i>Salvia coahuilensis</i>
<i>Salvia discolor</i>
<i>Salvia elegans</i> Honey melon sage
<i>Salvia elegans</i> Pineapple sage
<i>Salvia greggii</i>
<i>Salvia guaranitica</i>
<i>Salvia indigo</i> spires
<i>Salvia Jamensis</i>
<i>Salvia leucantha</i>
<i>Salvia madrensis</i>
<i>Salvia microphylla</i> Hot lips
<i>Salvia microphylla</i> Pink Blush
<i>Salvia nemorosa</i>
<i>Salvia nemorosa</i> Rosenwein
<i>Salvia nemorosa</i> Schneehugel
<i>Salvia patens</i>
<i>Salvia pratensis</i> Rose Rhapsody
<i>Salvia pratensis</i> Sweet Esmeralda
<i>Salvia pratensis</i> Swan lake
<i>Salvia pratensis</i> Twilight serenade
<i>Salvia sclarea</i> Vatican white
<i>Salvia semiatrata</i>
<i>Salvia sinaloensis</i>
<i>Salvia uliginosa</i>
<i>Salvia x superb</i>

(4)SNPs 解析

マルチプレックス塩基伸長反応で得られた反応液を, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystem)で電気泳動し, GeneMapper ID(Applied Biosystems 社)で解析を行った.

なお, GeneMapper ID を用いて解析を行うために, SNaPshot Primer Focus Kit (Applied Biosystem 社)を用い, 設計したタイピングプライマーの移動度を確認し, GeneMapper ID を用いての解析に必要な Panel と Bin を作成した.

Table2-2. SNPs タイピングプライマー

SNP マーカ- (bp)	プライマーの塩基配列
SNPsal-1(20)	5'-AATGTATTTGGATTCAAAGC-3'
SNPsal-2(28)	5'-T ₈ TGGAAGATCTGCGAATTCCT-3'
SNPsal-3(36)	5'-T ₁₆ CGGGCCTTGGAAGTTTTAA-3'
SNPsal-4(44)	5'-T ₂₄ TTCACCTGTTTCAGCCTGTG-3'

3. 結果と考察

幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) およびその他の観賞用サルビア 29 種について、*rbcL* 領域を PCR 増幅した産物をアガロースゲル電気泳動した結果、全ての試料において目的とする塩基長である 500bp 付近にそれぞれ1本のバンドが確認された (Fig2-1)。

増幅確認ができた PCR 産物を用いて、4種のタイピングプライマーによる一塩基伸長反応を行った結果、それぞれから Bin に相当するピークが得られた (Fig2-2)。*Salvia divinorum* から検出された塩基は、マーカの順に、T, A, T, Aであった。これらは、DDBJ に登録されている *Salvia divinorum* と同じ塩基であり、また、その他の *Salvia* 属においても DDBJ に登録されているものにおいては、同じ塩基が検出されており (Table2-3)、それぞれのマーカにおいて SNPs を正しく検出されているものと考えられた。

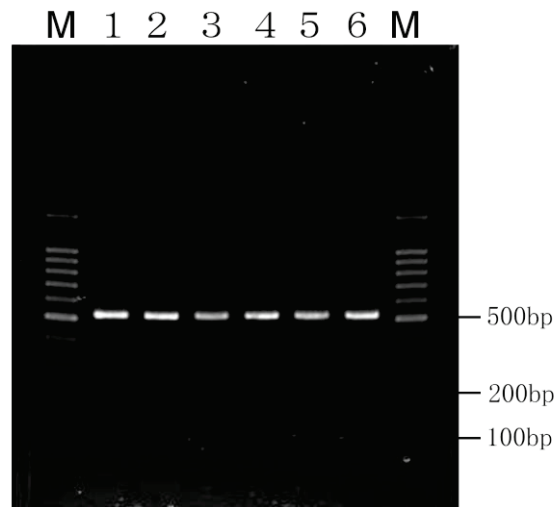
さらに、マーカにおける *Salvia divinorum* の塩基の組み合わせは、今回試料に供した他の *Salvia* 属 29 種の塩基の組み合わせとは異なっており、幻覚性サルビアを区別することができた。特に、SNPsal-2 マーカは、*Salvia divinorum* においてのみ A を検出しており、SNPsal-2 マーカが幻覚性サルビアと観賞用サルビアの判別に重要であると考えられた。

植物の品種識別に関しては、ナシの SNP マーカやキウイフルーツの SSR マーカなど各品種間での識別が可能となっており (木村ら, 2004) (保坂ら, 2009)、ニンニクの STS マーカでは産地の判別も可能になっている (谷本ら, 2007)。本研究において、4種類の SNPs マーカを用いることによって、*salvia* 属 30 種を6グループに分類されたことから、前述のような品種鑑別への応用の可能性が考えられた (Table2-3)。

今回作成した4種の SNPs マーカを用いたマルチプレックス一塩基伸長反応では、4種類の SNPs マーカを同時に検出でき、それらの組み合わせによって幻覚性サルビアと観賞用サルビアとを区別することが可能となり、さらに観賞用サルビアのグループ分けも可能であったことから、法科学分野への利用が可能な有用な SNPs マーカが開発できたと考えられた。

今後は、さらに幅広い品種の検討、SNPs マーカのさらなる設計を行うことにより、幻覚性

サルビアの識別だけでなく、サルビアの品種識別、さらに個体識別も可能と考えられる.



1: *Salvia bulleyana* ; 2: *Salvia chamaedryoides* ;

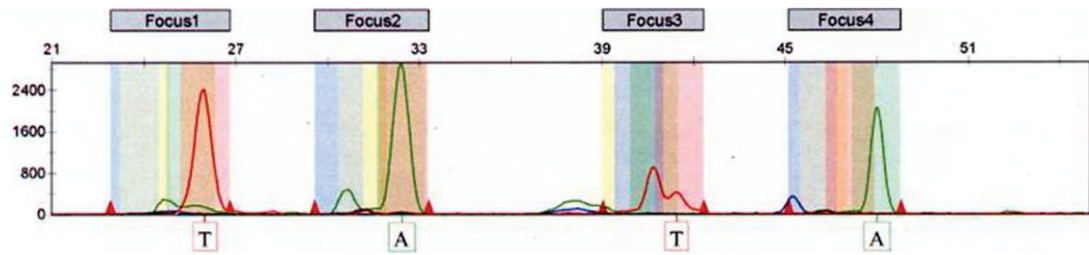
3: *Salvia x superba* ; 4: *Salvia semiatrata* ;

5: *Salvia madrensis* ; 6: *Salvia divinorum* ;

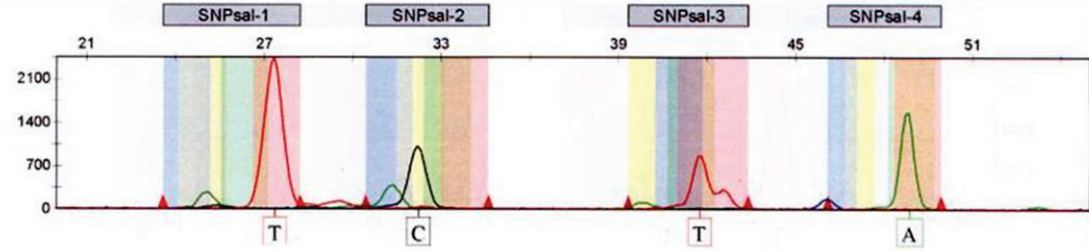
M: 100bp ラダーマーカー

Fig1-1. 主要なサルビア属の PCR 増幅産物の泳動結果

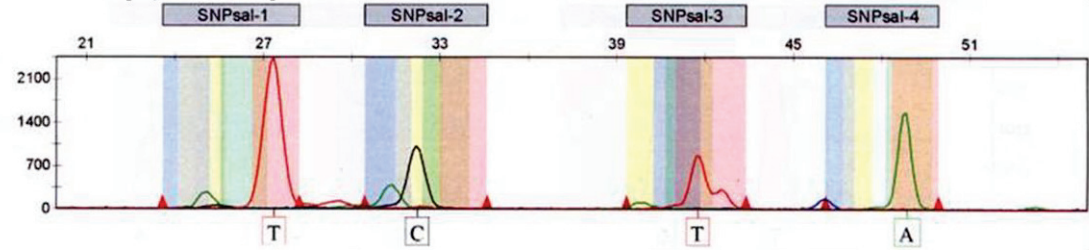
Salvia divinorum



Salvia discolor



Salvia microphylla Hot Lips



Salvia nemorosa Schneehugel

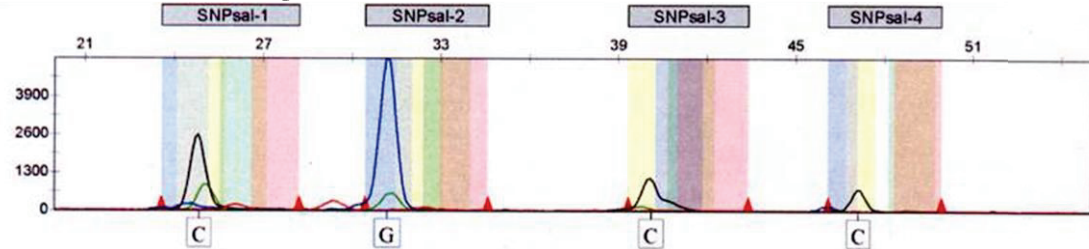


Fig2-2. 主要なサルビア属の SNPs タイピング解析結果

Table2-3. 4種類の SNPs マーカーから検出された塩基の種類

種名	SNPsal-1	SNPsal-2	SNPsal-3	SNPsal-4
<i>Salvia divinorum</i>	T	A	T	A
<i>Salvia azurea</i>	T	G	T	A
<i>Salvia blepharophylla</i>	T	G	T	A
<i>Salvia chamaedryoides</i>	T	G	T	A
<i>Salvia coahuilensis</i>	T	G	T	A
<i>Salvia greggii</i>	T	G	T	A
<i>Salvia guaranitica</i>	T	G	T	A
<i>Salvia madrensis</i>	T	G	T	A
<i>Salvia microphylla Hot lips</i>	T	G	T	A
<i>Salvia microphylla Pink Blush</i>	T	G	T	A
<i>Salvia semiatrata</i>	T	G	T	A
<i>Salvia patens</i>	T	C	T	A
<i>Salvia discolor</i>	T	C	T	A
<i>Salvia sinaloensis</i>	T	C	T	A
<i>Salvia bulleyana</i>	C	G	C	C
<i>Salvia Jamensis</i>	C	G	C	C
<i>Salvia nemorosa</i>	C	G	C	C
<i>Salvia nemorosa Rosenwein</i>	C	G	C	C
<i>Salvia nemorosa Schneehugel</i>	C	G	C	C
<i>Salvia pratensis Rose Rhapsody</i>	C	G	C	C
<i>Salvia pratensis Sweet Esmeralda</i>	C	G	C	C
<i>Salvia pratensis Swan lake</i>	C	G	C	C
<i>Salvia pratensis Twilight serenade</i>	C	G	C	C
<i>Salvia sclarea Vatican white</i>	C	G	C	C
<i>Salvia x superba</i>	C	G	C	C
<i>Salvia elegans Pineapple sage</i>	T	C	T	C
<i>Salvia elegans Honey melon sage</i>	T	C	T	C
<i>Salvia uliginosa</i>	T	C	T	C
<i>Salvia indigo spires</i>	T	G	C	A
<i>Salvia leucantha</i>	T	G	C	A

第 2 章

葉緑体 DNA の TrnL-TrnF spacer 領域を用いたサルビア属の識別

1. はじめに

昨今の薬物を容易に入手できる状況は、覚せい剤をはじめとする種々の薬物が乱用される事態を招き大きな社会問題を生んでいる。この社会状況の中で、好奇心やファッション感覚から、容易に違法薬物に関わる犯罪に手を染めやすい若年層が関係する事犯も助長される傾向にある。いわゆる脱法ドラッグの流通は、この状況に拍車をかけている。脱法ドラッグは多くの死亡事案が生じているように極めて危険であるが、法律に触れないため多くの若者が安易に使用し、違法薬物犯罪に手を染めるきっかけとなることが危惧されている。この問題に関しては、違法とする化合物の範囲を見直すなど、取り締まりの枠組み自体を見直す等の対応が進められている。一方、従来から違法薬物常用の契機とされている大麻などの幻覚性物質を含む植物の使用が若年層に浸透している状況も、極めて危機的な状況にある。実際、平成 24 年における大麻に関わる事犯での検挙者数は、20 歳代が最も多く、30 歳代がそれに続き、未成年も含めると 20 歳代以下の検挙者数が、全体の半数に迫る危機的な状況となっていた。脱法ドラッグの取り締まりに加えて、違法な幻覚性植物の使用を食い止めることが、若年層を薬物犯罪から守るために重要な課題となっている。

大麻などの違法な幻覚性植物に関する事案に関する問題は、インターネットなどを利用して不正に海外から入手した種子を自ら栽培し、乾燥させた葉を吸引して使用する等、犯罪が密室化していることである。鑑識科学の立場からは、感度が高い鑑定法により所持品に付着する微量な“大麻”を検出する方法を確立することは、これを抑止するための有力な手段と考えられている。一般に、微細な試料からの成分分析は困難であり、PCR を用いた高感度な種・系統識別技術を利用した鑑定方法を確立することが期待されている。実際、大麻草においては DNA 鑑定に関する基盤技術が確立されている (Linacre et al.,1998) (Tsai et al.,2006)

(室ら, 2010). このような方法を, 他の幻覚性違法植物で開発することは, 犯罪鑑識における重要な課題である. 本研究で対象とする, 幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) は, 従来は脱法ドラッグとして流通した歴史を持つが, 幻覚成分サルビノリン A を含有するため平成 19 年から大麻と同様な規制 (所持することが犯罪となる規制) の対象となっている. この場合も大麻と同様に自家栽培も可能なことから密室化による若年層への浸透が同様に危惧され, 高感度の鑑定方法を確立することの重要性は高い.

筆者らは, このような背景から, 幻覚性サルビアの DNA 鑑定法の開発に取り組み, *rbcL* (*Ribulose 1-5 biphosphate carboxylase Large subunit*) の一塩基多型部位の SNPs タイピングにより, 幻覚性サルビアが識別できることを報告した. この方法は, 葉緑体 DNA 上の多型をターゲットにすることから微細試料に適用可能で, 保存性が極めて高い *rbcL* 上の多型を利用することにより幻覚性サルビアを近縁種と区別できる精度を持つことから, DNA 鑑定技術として優れた特性を持つと判断できた. しかし, 実際の証拠品を対象にする鑑別では, 未知の試料から植物種を同定することが求められ, 複数の DNA 領域を利用した検査を組み合わせることが必要となる. 実際, 大麻草の DNA 鑑別では, RAPD 法や核 DNA の ITS 領域, 葉緑体 DNA の *trnL-trnF* 領域の特異的な塩基配列を利用した検査法が確立し, これらを組み合わせることにより鑑別精度が向上することが確かめられている.

先に述べたように, *rbcL* の SNPs 解析はサルビア近縁種を区別できる精度を持ち, サルビア属を同定する技術と組み合わせれば, 鑑別方法の基盤となる特性をもっている. 一般に, 属レベルの識別を行う場合には, *rbcL* よりも多様性が大きい領域が使用され, 大麻草の場合も核ゲノムにコードされる 18S リボゾーマル RNA 遺伝子の ITS 領域や, 葉緑体ゲノム上の *trnL-trnF* 領域の有用性が示されている. そこでこの研究では, 先に確立した *rbcL* と同様に, 微細サンプルの解析に適した葉緑体ゲノム上に存在する, *trnL-trnF* 領域を対象に, 幻覚性サルビア及びその近縁種 (サルビア属) の特定方法を検討した. その結果, この多型に基づい

て設計した PCR プライマーにより他の植物種と、サルビア属が区別できることが確かめられた.

2. 材料及び方法

(1)植物材料及び DNA 抽出

幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) と、現在国内で栽培・流通するサルビア属 30 種は、従来の *rbcL* に基づく鑑別方法を確立した研究と同じものを用いた。一方、模擬的な未知試料として、乾燥品が流通しているハーブ類と、同様に乾燥した状態で流通することがある数種類の食用作物を材料とした (Table 3-1)。それら材料 18 種は、オリーブ (*Olea europaea*)、ペパーミント (*Mentha x piperita* L), ハイビスカス (*Hibiscus rosa-sinensis*)、ルー (*Ruta graveolens*)、カラミント (*Calamintha nepeta*)、日々草 (*Catharanthus roseus*)、コリウス (*Solenostemon scutellarioides*)、ルッコラ (*Eruca vesicaria*)、アンゲロニアブルー (*Angelonia angustifolia*)、レモンマリーゴールド (*Tagetes lemmonii*)、ホワイトプリンセス (*Jasminum officinale*)、パセリ (*Petroselinum crispum*)、ラミウム (*Lamium purpureum*)、アメリカンブルー (*Evolvulus pilosus*)、エルサレムセージ (*Phlomis fruticosa*)、しそ (*Perilla frutescens*)、ししとう (*Capsicum annuum var angulosum*)、トマト (*Solanum lycopersicum*) を用いた。各試料の乾燥葉を磨砕し、NucleoSpin Plant II (マッハライ・ナーゲル社, Germany) を用いて DNA を抽出した。抽出手順は添付のプロトコールに従った。

(2)trnL-trnF spacer 領域の DNA 配列解析と系統解析

抽出した DNA 試料を鋳型として、trnL-trnF spacer 領域を増幅できるユニバーサルプライマー (F : 5' - GGTTCAAGTCCCTCTATCCC - 3' , R : 5' - ATTTGAACTGGTGACACGAG - 3') (Taberlet et al., 1991) を用いて PCR 増幅した。この増幅産物の塩基配列を、BigDye Terminator V3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) と 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、ダイレクトシーケンス法により解析した。

決定した配列は、DDBJ 上の Clustal W を用いて MJ 法による系統解析を行い、その結果

を Tree View で表示した. なお, 系統樹の信頼区間はブートストラップ検定法(1000反復)により算出した.

Table3-1. 実験に供したサンプル

<i>Salvia divinorum</i>	<i>Salvia blepharophylla</i>
<i>Salvia azurea</i>	<i>Salvia bulleyana</i>
<i>Salvia chamaedryoides</i>	<i>Salvia coahuilensis</i>
<i>Salvia discolor</i>	<i>Salvia elegans Honey melon sage</i>
<i>Salvia elegans Pineapple sage</i>	<i>Salvia greggii</i>
<i>Salvia guaranitica</i>	<i>Salvia indigo spires</i>
<i>Salvia jamensis</i>	<i>Salvia leucantha</i>
<i>Salvia madrensis</i>	<i>Salvia microphylla Hot lips</i>
<i>Salvia microphylla Pink blush</i>	<i>Salvia nemorosa</i>
<i>Salvia nemorosa Rosenwein</i>	<i>Salvia nemorosa Schneehugel</i>
<i>Salvia patens</i>	<i>Salvia pratensis Rose rhapsody</i>
<i>Salvia pratensis Sweet esmeralda</i>	<i>Salvia pretensis Swan lake</i>
<i>Salvia pratensis Twilight serenade</i>	<i>Salvia csclarea Vatican white</i>
<i>Salvia semiatrata</i>	<i>Salvia sinaloensis</i>
<i>Salvia uliginosa</i>	<i>Salvia x superb</i>
<i>Evolvulus pilosus</i>	<i>Olea europaea</i>
<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	<i>Calamintha nepeta</i>
<i>Solenostemon scutellarioides</i>	<i>Angelonia angustitolia</i>
<i>Jasminum officinale</i>	<i>Mentha x piperita L</i>
<i>Ruta graveolens</i>	<i>Catharanthus roseus</i>
<i>Eruca vesicaria</i>	<i>Tagetes lemmonii</i>
<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Perilla frutescens</i>
<i>Lamium purpureum</i>	<i>Capsicum aunuum</i>
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Phlomis fruticosa</i>

Table3-2. 設計したプライマー

Sequences(5' to 3')	
trnL-SF	TCCTGTAATTTCAATCAATG
trnL-SR	TTTTTCCACGGAACTTTAGAAA

(3)trnL-trnF spacer 領域多型に基づく PCR 法による識別

サルビア属特異的プライマーとして葉緑体 trnL-trnF spacer 領域を選択し、サルビア属のシーケンスを行った情報および GenBank の塩基配列情報を基に Clustal W 解析を用いてアライメントを行った。このアライメントを利用し、サルビア属特異的プライマーを設計した (Table3-2)。さらに、設計したプライマーを DDBJ の BLAST 解析を行って、特異性を検討した。このプライマー [trnL-SF (5' - TCCTGTAATTTCAATCAATG - 3'), trnL-SR (5' - TTTTCCACGGAAGTTTAGAAA - 3')] を用いて、PCR (95°C・90 秒のプレヒートに続き、95°C・30 秒, 58°C・30 秒, 72°C・1 分を 35 サイクル) 増幅し、1.5% アガロースゲルでの電気泳動により解析した。

3. 結果と考察

違法な幻覚性サルビアは乾燥葉として使用されるのが一般的であるため、今回供した識別対象の異種植物 (Table3-1) は、ハーブ (香草類) や乾燥品として市場に流通する食品 (トマト等) を材料とした。これらの DNA を鋳型とすると、従来から知られるように、trnL-trnF spacer 領域のユニバーサルプライマーにより PCR で増幅断片を得ることができた。従来の研究でも用いた、観賞用サルビアでも同様な増幅が確認され、増幅部分の多様性を検討することが可能であった。この増幅部分の DNA 配列解析を行ったところ、過去の報告と同様に多様性が確認できた。図1に示す代表的な配列比較からもわかるように、サルビア属間では配列の置換、挿入等が数塩基程度なのに対し、サルビア属以外のサンプルでは大きく異なる配列や、置換、挿入、欠失等が複数検出され、近縁性に応じた多様性が生じていると考えられた。実際に、系統樹を作成して増幅部分の配列を比較すると、幻覚性サルビアと観賞用サルビアは同じ枝にグループ化され、他の植物種とは明確に区別できることが明らかとなった (Fig3-2)。この時、*Perilla frutescens* 等のシソ科に属する識別対象の植物種は、十分な多様性を持つことも確認できた。

この結果を基に、この領域を対象にサルビア属を PCR により識別する方法の検討を行った。前述の解析により得られた配列を比較してサルビア属で保持され、異種で保存性が低い部分にプライマーを設計した (Fig3-3A)。この配列 (trnL-SF, trnL-SR) を GenBank を対象とする blast-n 検索したところ、サルビア属以外の植物で、両方のプライマー部分が完全に一致するものは認められず、サルビア属を識別できる配列であると考えられた。実際に、このプライマーを用いて、18 種の異種植物とサルビアで PCR を行った状況を Fig3-3B に示す。

サルビア属特異的プライマーとして設計した trnL-SF, trnL-SR は、全てのサルビア属サンプルで約 500bp の断片を増幅させた。一方、その他 18 種では、先に示したようにユニバーサルプライマーでは増幅するものの、このプライマーでは増幅断片が得られなかった。このことから、今回設計したプライマーを用いれば、trnF-trnL 領域の多様性を利用して、サルビア属の

みを検出することが可能であることが確認できた. この方法は, 先に確立した *rbcL* 多型を検査する方法と同様に, 葉緑体ゲノム DNA をターゲットとするため, 大麻草識別の実績からも微細試料の分析に有効であると考えられる.

実際に微細試料が持ち込まれ, それが幻覚性サルビアかどうかを判別するにあたっては, 今回設計したプライマーを用いてサルビア属か否かの絞り込み, さらに従来の方法で *Salvia divinorum* であることを特定することが想定される. 従来の方法は, 4 か所の SNPs 多型をマルチプレックス塩基伸長反応で検出する方法で, 総計 2 回の PCR で 1 回の検査が実施できる. この双方の組み合わせは, 微量試料の分析として許容できる DNA 量で実施できるものである. 証拠品鑑定では, 極めて高い厳密性が求められることから, さらに正確性を向上させる検討は加える必要があるが, DNA 多型を用いた幻覚性サルビアの鑑定の基盤は整ったと考えている.

Salvia divinorum GGTTCAGTCCCCTCTATCCCCAAAAA----GCCT-----ATTTTACCCCTAAA-ATATTACCTATCCCCCCT-TTTC

Salvia blepharophylla ----... ----... G. -..... C. CC.

Eruca vesicaria CCCTACTC. . . AAAA. G. C. GTTGAC. CC-, -----, . C. . -T-T. -, --

Tagetes lemmonii TTGACTC. . . ----A. . . C. TTAT. GT. TC-CT. . . GATT. -T-T. -, ...

Salvia divinorum GTTAGGGTTCCAA-ATTCCTTATCTTTCT-GATTCTTTG-----ACAAAAGCATTGGGTGTAAATGACTTTC

Salvia blepharophylla -..... G-. -..... -.....

Eruca vesicaria -. . . . TTA. . . -. . G. A. . . A. T. TC. . . A. CCGAAACT-TTT. . . ------AC. AG. . -. TT. -. . T

Tagetes lemmonii C. . . . -. . -. AGTA. -C. . . AC--TACTCTTTAT. . . . T. G. . C. . A. C. G. . --ATG. A. .

Salvia divinorum TCTTATCTTAT---CACACGTG--ATAT---AGAAGACACATTGCAAATGA-----AGCAAGGAATGCCGATATG

Salvia blepharophylla -..... -G. . . -..... -..... T. . ----

Eruca vesicaria TA. . . ACAAGT. TT. . . GG. . . ATC---. T. . . . -A. ------GA. . . A. . AT. . . T. .

Tagetes lemmonii A. A. G. . AC. . ----GTA. . ----. . . ATG---. T. . TG. -A. ACATCTTTG. ------

Salvia divinorum AATGA-----ATACCATTG-----ATTGAAA-TTACAGGA-----CTTGGA-

Salvia blepharophylla -. . . . -..... -..... -..... -..... -.....

Eruca vesicaria -. . T. TTTAGAATCT. . . T. . . . TTTCA-TTC. A. . . C. . . G. AAGTCTTCTTTTCGAAGATCCAAGAAATTC-CC. . TC

Tagetes lemmonii -----C. . . . T

Salvia divinorum -GAAA-CTT-TGTAATCCCCC-----GTGTCCCTTTAATTGACATCAACTCCAGCCATCTAATAAAATGAG

Salvia blepharophylla -. . . . -. . -. -..... -..... C.

Eruca vesicaria CA. . . CT. . T-T. C. -----TTTACTACTTTTGC. . T. . TT. . -. AG. . CTA. . T. . . . C.

Tagetes lemmonii -. . GGCT. . G-. . . . ------AC. . G. . C. AG. . C. AC. TTC. . . G. A

<i>Salvia divinorum</i>	GTGG--GATGCTACATTGGAAATGGTCGGGATAGCTCAGCTG-GTAGAGCAGAGGACTGAAAAATCCTCGTGCCACCAGTTCAAAA
<i>Salvia blepharophylla</i>	--.....-.....T.....
<i>Eruca vesicaria</i>	AA..----..--..T.C..T....C.....TG.AG---.....
<i>Tagetes lemmonii</i>	AA..AGG-...AG....CA.G...A.....T.-.....C-.....

Fig3-1. 代表サンプルのシーケンス結果

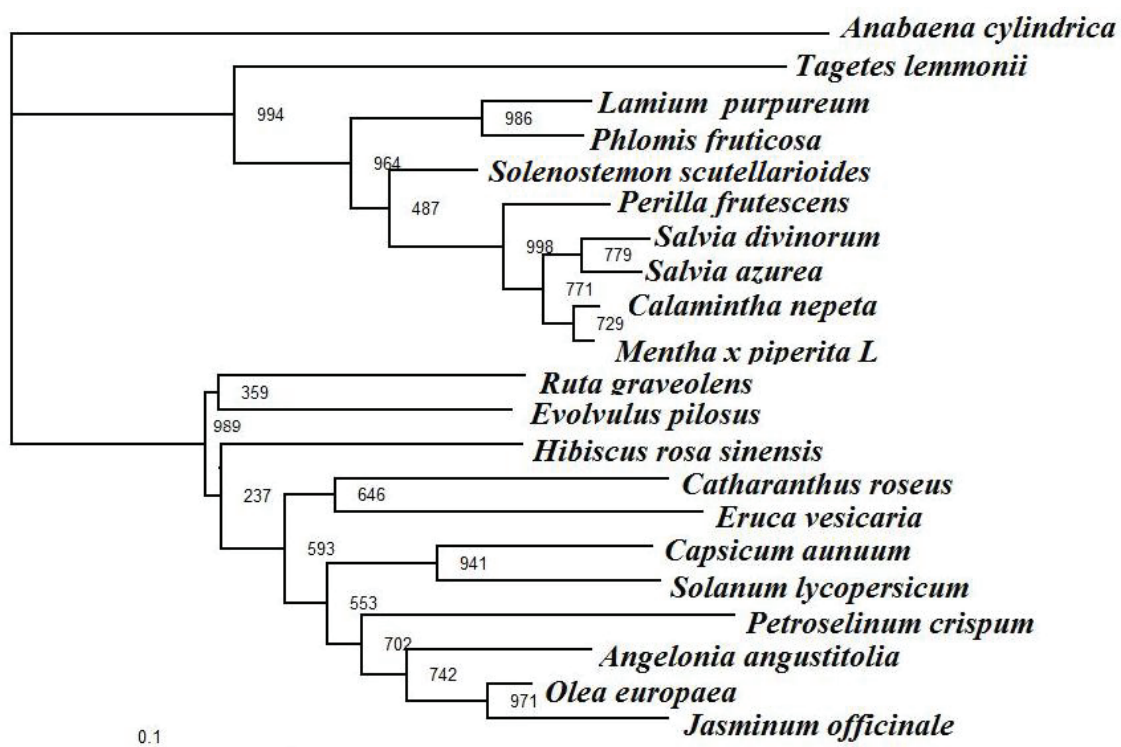


Fig3-2. trnL-trnF spacer 領域における系統樹

MJ 法による系統解析を行った. 系統樹の数値はブートストラップ検定(1000 反復)で得られた確率を示す.

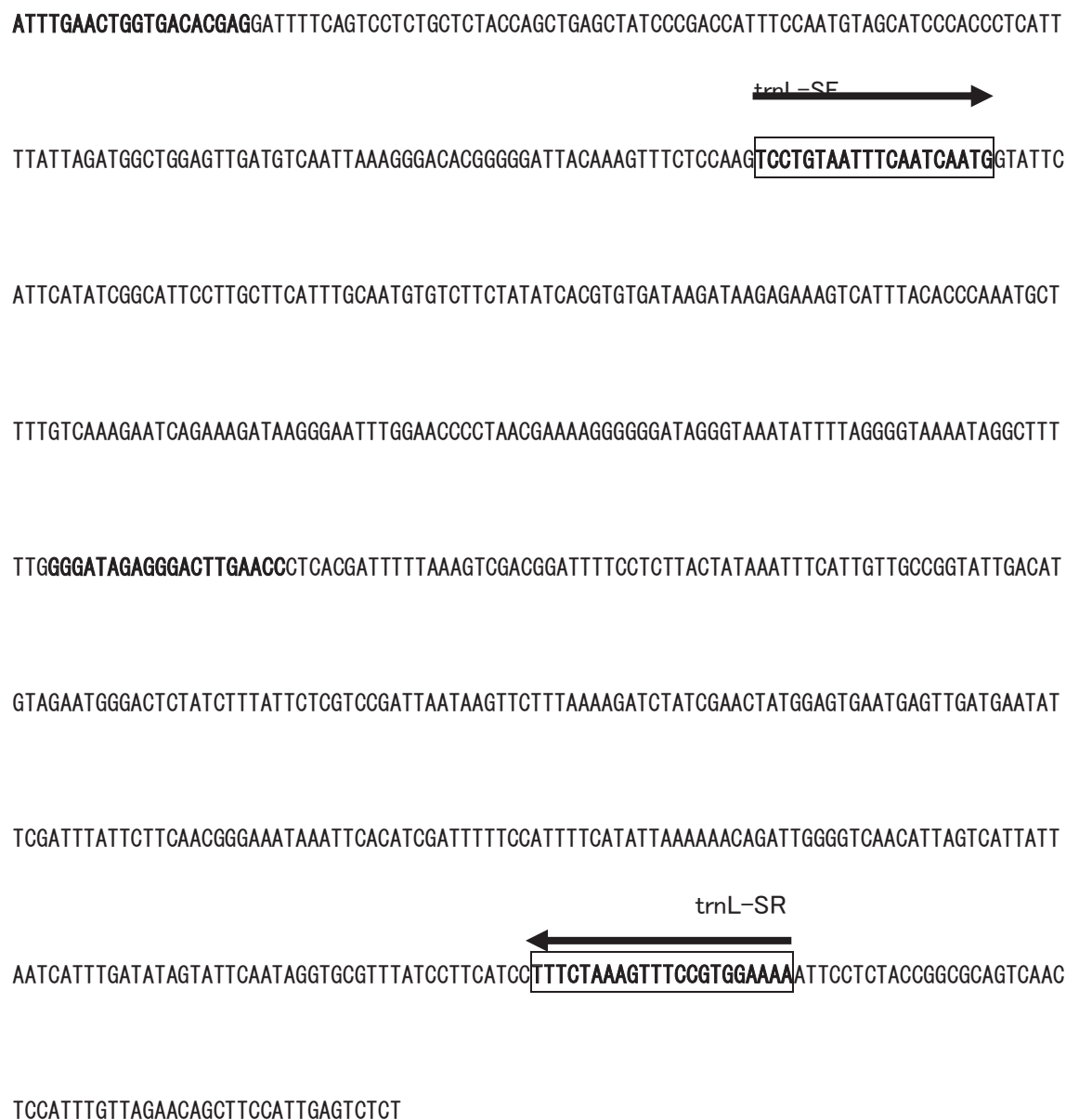


Fig3-3A. *Salvia divinorum* を例とした trnL-SF, trnL-SR のプライマー結合部分

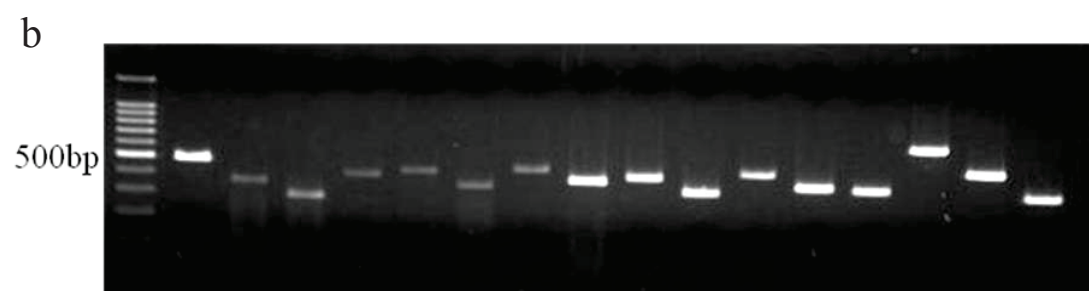
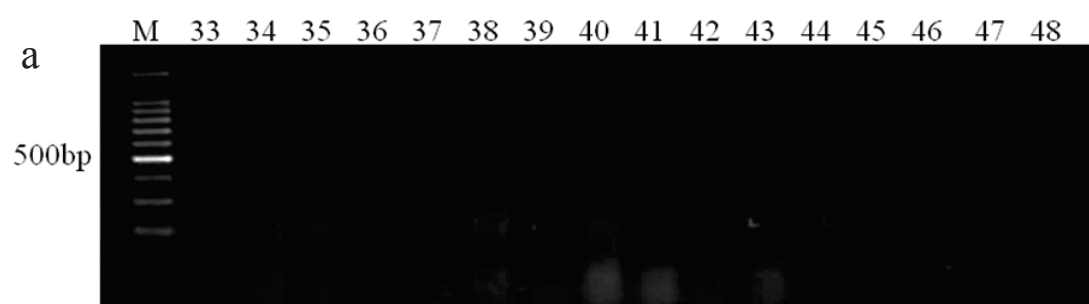
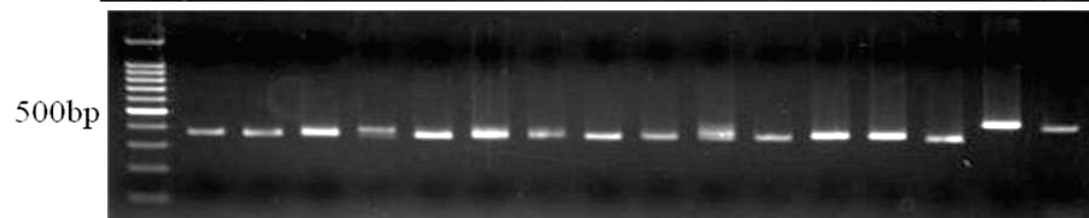
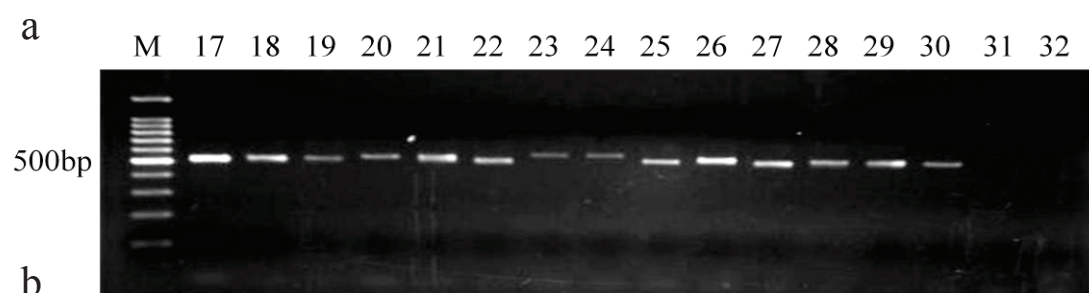
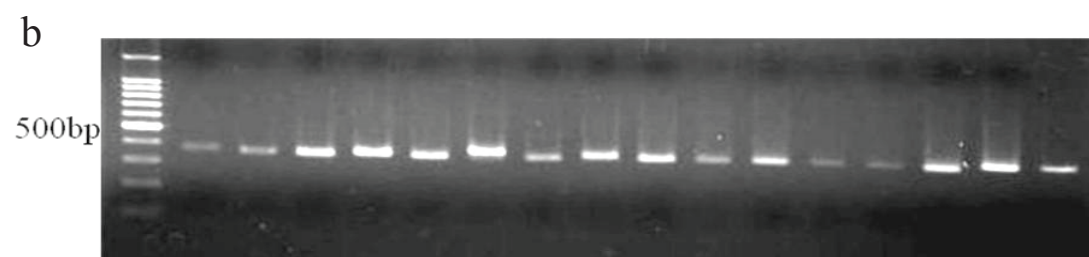
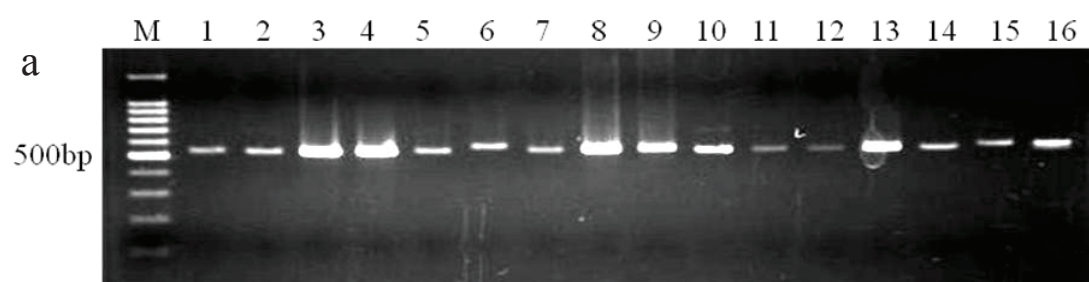


Fig3-3B. 各プライマーで得られた PCR 増幅産物の電気泳動結果

M: 100bp DNA ladder, 1: *Salvia divinorum*, 2: *Salvia blepharophylla*, 3: *Salvia azurea*, 4: *Salvia bulleyana*, 5: *Salvia chamaedryoides*, 6: *Salvia coahuilensis*, 7: *Salvia discolor*, 8: *Salvia elegans Honey melon sage*, 9: *Salvia elegans Pineapple sage*, 10: *Salvia greggii*, 11: *Salvia guaranitica*, 12: *Salvia indigo spires*, 13: *Salvia jamensis*, 14: *Salvia leucantha*, 15: *Salvia madrensis*, 16: *Salvia microphylla Hot lips*, 17: *Salvia microphylla Pink blush*, 18: *Salvia nemorosa*, 19: *Salvia nemorosa Rosenwein*, 20: *Salvia nemorosa Schneehugel*, 21: *Salvia patens*, 22: *Salvia pratensis Rose rhapsody*, 23: *Salvia pratensis Sweet esmeralda*, 24: *Salvia pretensis Swan lake*, 25: *Salvia pratensis Twilight serenade*, 26: *Salvia sclarea Vatican white*, 27: *Salvia semiatrata*, 28: *Salvia sinaloensis*, 29: *Salvia uliginosa*, 30: *Salvia x superba*, 31: *Evolvulus pilosus*, 32: *Olea europaea*, 33: *Hibiscus rosa sinensis*, 34: *Calamintha nepeta*, 35: *Solenostemon scutellarioides*, 36: *Angelonia angustifolia*, 37: *Jasminum officinale*, 38: *Mentha x piperita L.*, 39: *Ruta graveolens*, 40: *Catharanthus roseus*, 41: *Eruca vesicaria*, 42: *Tagetes lemmonii*, 43: *Petroselinum crispum*, 44: *Perilla frutescens*, 45: *Lamium purpureum*, 46: *Capsicum annuum*, 47: *Solanum lycopersicum*, 48: *Phlomis fruticosa*

総合考察

幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) は、かつては脱法ハーブとして流通していたものであり、サルビノリンAという幻覚作用の強い物質を含んでいる。違法薬物として薬事法違反で取り締まられる対照植物であり、現在は機器分析によってサルビノリンAを検出することにより鑑定されている。しかし、覚せい剤等の合成系麻薬とは違い、天然物である幻覚性サルビアは、時に夾雑物を含み機器分析の妨げになることがある。また、機器分析の鑑定を行うだけの必要量の資料がないと鑑定自体行えない。そこで、DNAを利用しての鑑定をすることにより、このような問題点をクリアできるのではないかと本研究を行った。

本研究では、葉緑体のDNAを解析を行うターゲットとした。現場資料等において、必ずしも十分量の資料が存在しているとは限らない。そのような状況において鑑定を行い検出していくには、1細胞あたりのDNA量が核DNAと比較してより多いものである方がより鑑定において検出できる可能性が高まる。

そこでまず、葉緑体の遺伝子に存在する *rbcL* をターゲットとして選定した。*rbcL* はリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) の大サブユニットをコードする遺伝子であり、Rubisco はカルビン・ベンソン回路において炭素固定反応に関与する唯一の酵素であることがわかっており、植物に大量に含まれ地球上で最も多いたんぱく質といわれている。また、陸上高等植物、藻類、等真核生物のほかシアノバクテリア、嫌気性光合成細菌等多数の原核生物にも含まれている。多くの植物で塩基配列が決定されており、比較し易く、シングルコピーとして存在しており、進化速度は遅いが、同属でも変異が認められるなど、幅広いレベルの系統解析に用いることができる。さらに、保存性が高く属内で大きな置換がないことから、*rbcL* 領域において SNPs を利用しての検出方法を試みることとし、そのなかで数塩基の置換があるという場所をターゲットにすると SNPs の検出が出来る可能性があると考え、*rbcL* をターゲットにして研究を進めることとした。

rbcL のプライマーは吉田らの報告によるプライマーを利用した。ユニバーサルプライマーで

あるこのプライマーで *rbcL* 領域を PCR 増幅した結果、全ての試料において目的とする塩基長である 500bp 付近にそれぞれ1本のバンドが確認され、良好に *rbcL* 領域の増幅が出来たと考えられた。そこで次に、その増幅で得られた *rbcL* 領域の産物を用いて、SNPs の組み合わせによって、*Salvia divinorum* の識別を行うこととした。SNPs タイピングプライマーの設計にあたって、DDBJ のサイトにおいて既に登録済みである *Salvia divinorum* の *rbcL* のシーケンスデータを基準とし、このデータと他の登録済み *Salvia* 属のシーケンスデータを比較し、一塩基置換が起きているところをターゲットとしプライマーの設計を行った。この時、1カ所の一塩基多型では判別は困難と考え、4カ所の SNPs を利用することとした。しかし、一つ一つ検出する方法では煩雑な工程を踏んでしまうため、4カ所を同時に検出できるようマルチプレックス一塩基伸長反応を用いて検出することとし、同時に検出しても結果が分かるよう配慮してタイピングプライマーの設計を行った。また、このときのそれぞれのプライマーの混合比率は、等量では良好な結果が得られなかったため、結果と照らし合わせ混合比率を調整して決定した。

今回設計した SNPs 用にパネルと Bin を設定した GeneMapper ID で解析を行った結果、設定した Bin 部分にピークが検出され、設計したタイピングプライマーによる一塩基伸長反応は良好に行われたと考えられた。また、ここで検出された塩基については、プライマーを設計するにあたり基準とした *Salvia divinorum* の *rbcL* のシーケンスデータと一致していた。さらに、検査試料の一部は同様に DDBJ に *rbcL* のシーケンスデータが登録されており、それらにおいても検出された塩基と一致しており、それぞれのマーカーにおいて SNPs を正しく検出できたと考えられた。この4カ所の検出された塩基の組み合わせは、*Salvia divinorum* においてのみ組み合わせが異なっていた。従って、*Salvia* 属において、*Salvia divinorum* を識別することが可能であると考えられた。

また、本研究の *Salvia* 属試料において、4カ所の検出された塩基を元に分類すると、6グループに分類することが出来た。今回は *Salvia divinorum* を識別することが目的であったため、4種類のプライマーを設計することに留めたが、SNPs の検出個所を増やすことで、これまでに

も様々な植物の品種鑑別で用いられているように、*Salvia* 属の品種鑑別への応用の可能性も考えられる結果となった。

しかし、実際の証拠品においては、未知の試料から植物種を同定することが求められる。つまり、本研究の SNPs で *Salvia divinorum* を識別しようとする、*Salvia* 属内での識別のためすぐさま利用できるものではない。そこで、未知の植物試料から *Salvia* 属を同定する技術と、先の SNPs を用いた *Salvia divinorum* の識別方法を組み合わせれば、鑑別方法の基盤になると考えた。一般的には、属レベルの識別を行う場合、*rbcL* よりも多様性が大きい領域が使用され、例えば、核ゲノムにコードされる 18S リボゾーマル RNA 遺伝子の ITS 領域や、葉緑体ゲノムの *trnL-trnF* 領域などを利用した報告がある。そこで、微細試料にも対応していくために、葉緑体ゲノム上に存在する *trnL-trnF* 領域を対象とし、*Salvia* 属を同定する方法を検討した。

試料としては、先の研究同様 *Salvia* 属の 30 種を試料とし、その他の植物として 18 種の試料を使用した。*Salvia divinorum* は、乾燥状態で使用されることが一般的であるため、ハーブとして利用されるものや、乾燥状態としても流通するような食品等を材料とした。これらを既報の *trnL-trnF* spacer 領域のユニバーサルプライマーにより PCR 増幅し、良好に断片を得ることが出来、増幅部分の多様性の検討をすることが可能であった。そこでこの増幅部分の DNA 配列解析を行ったところ、多様性を確認することが出来た。これらの配列を比較すると、*Salvia* 属間では配列の置換や挿入等が数塩基で起きていることに対し、*Salvia* 属以外の試料では大きく異なる配列や、置換、挿入、欠失等が複数検出され、近縁性に多様性が生じていると考えられた。そこで、これらの配列を元に系統樹を作成したところ、*Salvia divinorum* とその他の *Salvia* 属は同じ枝にグループ化され、他の植物とは明確に区別できることが明らかであった。さらに、*Salvia* 属と同じシソ科である *Perilla frutescens* 等の植物種は十分な多様性を持つことも確認できた。

このように *trnL-trnF* spacer 領域の増幅が確認でき、多様性も確認できたことから、*Salvia*

属をPCRにより識別する方法の検討を行った。この領域において、*Salvia* 属で保持され、異種で保存性が低い部分選ぴプライマーを設計し、これらのプライマーを GenBank を対象とするblast-n 検索したところ、*Salvia* 属以外の植物では両プライマーが完全に一致するものは認められなかった。従って、このプライマーは *Salvia* 属を識別できる配列であると考えた。そこで、実際にこのプライマーを用いてPCR増幅を行ったところ、今回実験に供した *Salvia* 属30種全において、約 500bp に増幅断片を確認することが出来た。一方、その他18種では、ユニバーサルプライマーでは増幅断片が確認できるものの、この新たに設計したプライマーにおいて、増幅断片は確認されなかった。このことから、今回設計したプライマーを用いれば、*Salvia* 属のみを検出することが可能であると考えられた。

実際の鑑定において微細資料が持ち込まれ、それが幻覚性サルビアか否かを判別するにあたっては、現行では機器分析でサルビノリンAを検出することによって鑑定を行っている。しかし、微細資料となると、機器分析にかけるほどの量がなく鑑定できないという事態も起こり得る。そこで、今回の研究結果を用いると、葉緑体DNAをターゲットとしているのでDNAの収量が比較的多く取れ、微細資料からも鑑定が可能と考えられる。そのような試料をDNAを利用して鑑定するには、まず *Salvia* 属であるかどうかを識別するために、今回行った trnL-trnF spacer 領域で設計したプライマーを用いて *Salvia* 属であるということを絞り込み、さらに rbcL での SNPsを利用して *Salvia divinorum* の識別を行えばよい。

今回の研究においては、違法薬物である *Salvia divinorum* を識別することを目的として研究してきたが、このような手法を応用すれば、その他の植物でも応用が可能であると考えられる。例えば、コメの場合、ブランド米「コシヒカリ」とラベルされているにも関わらず、安いコメを混ぜて表示偽装する問題がしばしばおこっていたり、果物においてもブランド品種として流通しているものの偽装がおこっていたり、本県でいえば、2008年に牛肉のブランドの偽造が大きな社会問題になったりしている。そのような場合においてもDNA多型を利用でき、それぞれにおいて品種鑑定の研究が行われている。薬事法等で規制のある植物だけではなく、例えば現場

にある植物が何であるかなども将来的には鑑定していける可能性を見出せたのではないかと
思う.

結論

結論として、幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) およびその他の観賞用サルビア 29 種について、*rbcL* 領域を PCR 増幅した産物を用いて、4 種のタイピングプライマーによる一塩基伸長反応を行った結果、マーカーにおける *Salvia divinorum* の塩基の組み合わせは、今回試料に供した他の *Salvia* 属 29 種の塩基の組み合わせとは異なっており、幻覚性サルビアを区別することができた。

さらに、異種植物を加え、*trnL-trnF* spacer 領域を PCR 増幅した産物の DNA 配列解析を行ったところ、近縁性に応じた多様性が生じていると考えられた。この領域を対象にプライマーを設計した。サルビア属特異的プライマーとして設計した *trnL-SF*, *trnL-SR* は、全てのサルビア属サンプルで約 500bp の断片を増幅させた。一方、その他 18 種では、ユニバーサルプライマーでは増幅するものの、このプライマーでは増幅断片が得られなかった。このことから、今回設計したプライマーを用いれば、*trnF-trnL* spacer 領域の多様性を利用して、サルビア属のみを検出することが可能であることが確認できた。

以上、本研究では、*Salvia divinorum* を識別することを目的として行ってきたが、葉緑体ゲノムである *rbcL* および *trnF-trnL* spacer 領域を利用した検出方法を組み合わせることにより、本目的である *Salvia divinorum* の識別をすることが可能であった。しかしながら、更なる精査を加え、鑑識技術に用いることができるようにすることが必要である。

謝辞

今回の研究において、直接の御指導並びに貴重な御助言を頂きました岐阜大学応用生物科学部教授 小山博之博士に厚く御礼申し上げます。

また、研究を続けるにあたり、仕事のバックアップや研究の助言等をして頂いた科学捜査研究所所員の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究に使用した *Salvia divinorum* を提供して下さった東京都薬用植物園北川重美園長に厚く御礼申し上げます。

最後に、仕事をしながら研究を続ける母を応援し、一緒に頑張ってくれた娘と息子、叱咤激励してくれた主人、温かく応援してくれた両親に心から感謝いたします。

文献

- Baggott MJ, Erowid E, Erowid F, Galloway GP, Mendelson J. 2010. Use patterns and self-reported effects of *Salvia divinorum*: an Internet-based survey. *Drug Alcohol Depend* 111: 250–256.
- Braida D, Donzell A, Martucci R, Sala M. 2011. Learning and memory impairment induced by salvinorin A, the principal ingredient of *Salvia divinorum*, in Wistar rats. *Int J Toxicol* 30: 650–661.
- Butelman ER, Prisinzano TE, Deng H, Rus S, Kreek MJ. 2009. Unconditioned behavioral effects of the powerful κ -opioid hallucinogen salvinorin A in nonhuman primates: fast onset and entry into cerebrospinal fluid. *J Pharmacol Exp Ther* 328: 588–597.
- Casselman I, Heinrich M. 2011. Novel use of *Salvia divinorum*: unobtrusive observation using YouTube™. *J Ethnopharmacol* 138: 662–667.
- Carlezon WA Jr, Béguin C, DiNieri JA, et al. 2006. Depressive-like effects of the κ -opioid receptor agonist salvinorin A on behavior and neurochemistry in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 440–447.
- Cortes, J. (1979) La medicina tradicional en la Sierra Mazateca. Actes du XIIIe Congress, Paris, Societe' des Amer'canistes, 6, 349–356.
- Cunningham CW, Rothman RB, Prisinzano TE. 2011. Neuropharmacology of the naturally occurring κ -opioid hallucinogen salvinorin A. *Pharmacol Rev* 63: 316–347.
- Currie CL. 2013. Epidemiology of adolescent *Salvia divinorum* use in Canada. *Drug Alcohol Depend* 128: 166–170.
- Deluca P, Davey Z, Corazza O, et al. 2012. Identifying emerging trends in

- recreational drug use; outcomes from the Psychonaut Web Mapping Project. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39: 221–226.
- Diaz, J.L. (1979) Ethnopharmacology and taxonomy of Mexican psychodysleptic plants. *Journal of Psychedelic Drugs* 11. 71--101. New York Emboden, W. *Narcotic Plants*, Revised edn., Macmillan Publishing Co., pp. 93--95, 190.
- 土井 裕輔, 山本 雄二, 稲垣 幸代, 小野俊明, 宮石 智, 石津 日出雄 (2001). SNaPshot Kit を用いた SNP 解析による新しい ABO 遺伝子型判定法. *DNA 多型*, Vol.9, 254-257.
- Ford JA, Watkins WC, Blumenstein L. 2011. Correlates of *Salvia divinorum* use in a national sample: findings from the 2009 National Survey on Drug Use and Health. *Add Behav* 36: 1032–1037.
- Giroud, C.; Felber F., Augsburg M. (2000). "*Salvia divinorum*: an hallucinogenic mint which might become a new recreational drug in Switzerland". *Forensic Science International* 112 (2): 143-150.
- Grilli M, Neri E, Zappettini S, et al. 2009. Salvinorin A exerts opposite presynaptic controls on neurotransmitter exocytosis from mouse brain nerve terminals. *Neuropsychopharmacology* 57: 523–530
- Gruber JW, Siebert DJ, Der Marderosian AH, Hock RS. 1999. High performance liquid chromatographic quantification of salvinorin A from tissues of *Salvia divinorum* epling and jativa-m. *Phytochem Anal* 10: 22–25.
- Hooker JM, Xu Y, Schiffer W, Shea C, Carter P, Fowler JS. 2008. Pharmacokinetics of the potent hallucinogen, salvinorin A in primates parallels the rapid onset, short duration of effects in humans. *NeuroImage* 41: 1044–1050..
- Hooker JM, Patel V, Kothari S, Schiffer WK. 2009. Metabolic changes in the

rodent brain after acute administration of salvinorin A. Mol Imaging Biol 11: 137-143.

保坂ふみ子, 寺上 伸吾, 西谷千佳子, 山口 郁子, 金 會澤, 今井 剛, 山本 俊哉(2009). SSR マーカーによるキウイフルーツの DNA 品種判別技術の開発. DNA 多型, vol.17, 71-79.

Hoover V, Marlowe DB, Patapis NS, Festinger DS, Forman RF. 2008.

Internet access to *Salvia divinorum*: implications for policy, prevention, and treatment. J Subst Abuse Treat 35: 22-27.

甲斐 元士, 渡辺 直樹, 高木 卓也, 福島久代(2007). 塩基配列情報を利用した植物種同定方法の検討. DNA 多型, vol.15, 114-117.

警察庁刑事局組織犯罪対策部薬物銃器対策課(2013)「平成24年中の薬物・銃器情勢」
警察庁(2012)「平成24年警察白書」

Kelly BC. 2011. Legally tripping: a qualitative profile of *Salvia divinorum* use among young adults. J Psychoactive Drugs 32: 46-54.

木村 鉄也, 伴 義之, 山本 俊哉, 林 建樹(2004). ナシ葉緑体 DNA *trnL-trnF* 遺伝子間領域の SNP マーカー. DNA 多型, vol.12, 48-50.

Kohjyuma M, Lee I. J, Iida O, Kurihara K, Yamada K, Makino Y, Sekita S, Satake M. (2000). Intraspecific variation in *Cannabis sativa* L. based on intergenic spacer region of chloroplast DNA. Biol. Pharm. Bull., 23, 727-730.

厚生労働省違約食品局長通知(2009)「薬食発 0228006 号」‘薬事法第2条第14項に規定する指定薬物及び同法第74条の4に規定する医療等の用途を定める省令の制定について’
厚生労働省(2012)「薬物乱用の現状と対策」

Lange JE, Reed MB, Croff JM, Clapp JD. 2008. College student use of *Salvia divinorum*. Drug Alcohol Depend 94: 263-266.

Li-Chin Tsai, Yung-Chien Yu , Hsing-Mei Hsieh , Jenn-Che Wang ,Adrian Linacre, James Chun-I Lee (2006). Species identification using sequences of the trnL intron and the trnL-trnF IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan. *Forensic Sci. Int.*, 164: 193-200.

Linacre, A. and Thorpe, J. (1998) ;Detection and identification of cannabis by DNA. *Forensic Sci. Int.*, 91, 71-76

MacLean KA, Johnson MW, Reissig CJ, Prisinzano TE, Griffiths RR. 2013. Dose-related effects of salvinorin A in humans: dissociative, hallucinogenic, and memory effects. *Psychopharmacol (Berl)* 226: 38–92.

Mark W. Chase, Douglas E. Soltis, Richard G. Olmstead, David Morgan, Donald H. Les, Brent D. Mishler, Melvin R. Duvall, Robert A. Price, Harold G. Hills, Yin-Long Qiu, Kathleen A. Kron, Jeffrey H. Rettig, Elena Conti, Jeffrey D. Palmer, James R. Manhart, Kenneth J. Sytsma, Helen J. Michaels, W. John Kress, Kenneth G. Karol, W. Dennis Clark, Mikael Hedren, Brandon S. Gaut, Robert K. Jansen, Ki-Joong Kim, Charles F. Wimpee, James F. Smith, Glenn R. Furnier, Steven H. Strauss, Qui-Yun Xiang, Gregory M. Plunkett, Pamela S. Soltis, Susan M. Swensen, Stephen E. Williams, Paul A. Gadek, Christopher J. Quinn, Luis E. Eguiarte, Edward Golenberg, Gerald H. Learn, Jr., Sean W. Graham, Spencer C. H. Barrett, Selvadurai Dayanandan and Victor A. Albert. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann Mo Bot Gard*, vol.80: 528-580

Marushia, Robin (June 2003). "*Salvia divinorum*: The Botany, Ethnobotany, Biochemistry and Future of a Mexican Mint" . *Ethnobotany*. Retrieved 2007-05-04.

Medana C, Massolino C, Pazzi M, Baiocchi C. 2006. Determination of

salvinorins and divinorins in *Salvia divinorum* leaves by liquid chromatography/multistage mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 20: 131–136.

Mendelson JE, Coyle JR, Lopez JC, et al. 2011. Lack of effect of sublingual salvinorin A, a naturally occurring kappa opioid, in humans: a placebo-controlled trial. Psychopharmacol 214: 933–939.

室 友紀, 今村 真二, 中村 博明, 長谷川 正紀, 湯浅 勲 (2010). 葉緑体 DNA の trnL 領域の解析による大麻草の識別. 法科学技術, 15(2), 143-149.

内閣府(2010)「青少年の薬物乱用に関する調査」

Nemeth CL, Paine TA, Rittiner JE, et al. 2010. Role of kappa-opioid receptors in the effects of salvinorin A and ketamine on attention in rats. Psychopharmacology 210: 263–274.

Nozawa M1, Suka Y, Hoshi T, Suzuki T, Hagiwara H.(2008)Total synthesis of the hallucinogenic neoclerodane diterpenoid salvinorin A.Org Lett. 2008 Apr 3;10(7):1365-8. doi: 10.1021/ol800101v. Epub 2008 Mar 1.

Nyi PP, Lai EP, Lee DY, Biglete SA, Torrecer GI, Anderson IB. 2010.Influence of age on *Salvia divinorum* use: results of an Internet survey.J Psychoactive Drugs 42: 385–392.

Ott, J. (1996). *Salvia divinorum* Epling et Jativa Eleusis, n. 4, pp. 31-39.

Perron BE, Ahmedani BK, Vaughn MG, Glass JE, Abdon A, Wu LT. 2012.Use of *Salvia divinorum* in a nationally representative sample. Am J Drug Alcohol Abuse 38: 108–113.

Peter M. Hollingsworth, Laura L. Forrest, John L. Spouge, Mehrdad

Hajibabaei, Sujeewan Ratnasingham, Michelle van der Bank, Mark W. Chase,

Robyn S. Cowan, David L. Erickson, Aron J. Fazekas, Sean W. Graham, Karen E. James, Ki-Joong Kim, W. John Kress, Harald Schneider, Jonathan van AlphenStahl, Spencer C.H. Barrett, Cassio van den Berg, Diego Bogarin, Kevin S. Burgess, Kenneth M. Cameron, Mark Carine, Juliana Chacón, Alexandra Clark, James J. Clarkson, Ferozah Conrad, Dion S. Devey, Caroline S. Ford, Terry A.J. Hedderson, Michelle L. Hollingsworth, Brian C. Husband, Laura J. Kelly, Prasad R. Kesanakurti, Jung Sung Kim, Young-Dong Kim, Renaud Lahaye, Hae-Lim Lee, David G. Long, Santiago Madriñán, Olivier Maurin, Isabelle Meusnier, Steven G. Newmaster, Chong-Wook Park, Diana M. Percy, Gitte Petersen, James E. Roth BL, Baner K, Westkaemper R, Siebert D, Rice KC, Steinberg S. 2002. Salvinorin A: a potent naturally occurring nonnitrogenous κ opioid selective agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11934–11939.

Przekop P, Lee T. 2009. Persistent psychosis associated with *Salvia divinorum* use. *Am J Psychiatry* 166: 832.

Polepally PR1, White K, Vardy E, Roth BL, Ferreira D, Zjawiony JK.(2013)Kappa-opioid receptor-selective dicarboxylic ester-derived salvinorin A ligands.*Bioorg Med Chem Lett.* 2013 May 15;23(10):2860-2. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.03.111. Epub 2013 Apr 4.

Richardson, Gerardo A. Salazar, Vincent Savolainen, Ole Seberg, Michael J. Wilkinson, Dong-Keun Yi and Damon P. Little. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:12569-7.

Reisfield, A. (1993). The Botany of *Salvia divinorum*(Labiatae). *SIDA* 15(3):349-366.

Saląga M, Polepally PR, Sobczak M, Grzywacz D, Kamysz W, Sibaev A, Storr M, Do Rego JC, Zjawiony JK, Fichna J.(2014)Novel orally available salvinorin A analog

PR-38 inhibits gastrointestinal motility and reduces abdominal pain in mouse models mimicking irritable bowel syndrome. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014 Jul;350(1):69-78. doi: 10.1124/jpet.114.214239.

Schmidt MM, Sharma A, Schifano F, Feinmann C. 2011. “Legal highs” on the net—evaluation of UK-based websites, products and product information. *Forensic Sci Int* 206: 92–97.

消費者庁(2013)「平成25年度版消費者白書」

Singh S. 2007. Adolescent salvia substance abuse. *Addiction* 102: 823–824.

Sumnall HR, Measham F, Brandt SD, Cole JC. 2012. *Salvia divinorum* use and phenomenology: results from an online survey. *J Psychopharm* 25: 1498–1507.

谷本 秀夫, 古川 真, 橋田 浩二, 西岡 輝美(2007). STS マーカーによる中国・国産ニンニクの判別. DNA 多型, Vol.15 , 148-150.

Teksin ZS, Lee IJ, Nemieboka NN, Othman AA, Upreti VV, Hassan HE. 2009. Evaluation of the transport, in vitro metabolism and pharmacokinetics of salvinorin A, a potent hallucinogen. *Eur J Pharm Biopharm* 72: 471–477.

Taberlet P, Gielly L, Pautou G (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*, 17(5), 1105–1109.

Travis CR, Ray GA, Marlowe KF. 2012. A report on nausea and vomiting with discontinuation of chronic use of *Salvia divinorum*. *Case Rep Med* 2012: 543747.

Tsai L. C, Hsieh H. M, Huang L. H, Wang JC, Linacre A, Lee JC. (2006). Cannabis seed identification by chloroplast and nuclear DNA. *Forensic Sci. Int.*, 158, 250–251

Tsujikawa K, Kuwayama K, Miyaguchi H, et al. 2008. Determination of salvinorin A and salvinorin B in *Salvia divinorum*-related products circulated in

Japan. Forensic Sci Int 180: 105–109.

Valdés, Leander J. III; Díaz, José Luis; Paul, Ara G. (May 1983). "Ethnopharmacology of ska María Pastora (*Salvia divinorum*, Epling and Játiva-M)". Journal of Ethnopharmacology 7 (3): 287-312.

Valdés III, L.J. G.M. HATFIELD, M. KOREEDA, and A.G. PAUL. (1987). Studies of *Salvia divinorum*(Lamiaceae), an hallucinogenic mint from the Sierra Mazateca in Oaxaca, Central Mexico. Economic Botany 41: 283-291.

Valdes III, L.J., L.J. Diaz, and A.G. Paul. (1983)Ethnopharmacology of ska Maria Pastora (*Salvia divinorum* Epling & Jativa-M). J. Ethnopharmacol. 7: 287-312.

Weitlaner, R.J. and Hoppe, W. (1964) The Mazatec In: R. Wauchope (Ed.), Handbook of Middle American Indians, Vol. 7, University of Texas Press, Austin, pp. 516--522

Valdés III, L.J. G.M. HATFIELD, M. KOREEDA, and A.G. PAUL. (1987). Studies of *Salvia divinorum*(Lamiaceae), an hallucinogenic mint from the Sierra Mazateca in Oaxaca, Central Mexico. Economic Botany 41: 283-291.

Valdes III, L.J (2001a) The Early History of *Salvia divinorum*. The Entheogen Review 10(2):73-75.

Wolowich WR, Perkins AM, Cienki JJ. 2006. Analysis of the psychoactive terpenoid salvinorin A content in five *Salvia divinorum* herbal products. Pharmacotherapy 26: 1268–1272.

Wu L-T, Woody GE, Yang C, Li J-H, Blazer DG. 2011. Recent national trends in *Salvia divinorum* use and substance-use disorders among recentand former *Salvia divinorum* users compared with nonusers. Subst AbuseRehabil 2011: 53–68.

矢野 博 (2010) . DNA 分析を用いた農産物・加工品の品種判別技術 .

<http://www.mac.or.jp/mail/100301/02.shtml>,

安田一郎(2007). 違法ドラッグの鑑定と流通品の推移 東京都健康安全研究センター研究年報第58号

吉田 和正, 香川 聡, 伊ヶ崎知弘, 西口 満 向井 譲(2006). 木材の部位、保存期間、熱処理が木材からの DNA 抽出効率と DNA の質に及ぼす影響. 森林総合研究所研究報告 5, N0.4(No.401), 289-298.

Zawilska JB1, Wojcieszak J.(2013)"*Salvia divinorum*: from Mazatec medicinal and hallucinogenic plant to emerging recreational drug"Hum. Psychopharmacol Clin Exp 2013; 28: 403–412.