

改良 PCR-RFLP 法による Kratom 製品の識別

緒方 潤,* 河村麻衣子, 袴塚高志, 花尻(木倉)瑠理

Discrimination of Kratom Products by an Improved PCR-RFLP Method

Jun Ogata,* Maiko Kawamura, Takashi Hakamatsuka, and Ruri Kikura-Hanajiri

Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences;
3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan.

(Received July 14, 2020; Accepted September 8, 2020)

In Japan, mitragynine, 7-hydroxymitragynine and *Mitragyna speciosa* KORTH. (*M. speciosa*, “Kratom”) were controlled as Designated Substances under the Pharmaceutical and Medical Device Act from March 2016. In this study, the origins of 16 Kratom products obtained from the illegal drug market in Japan were investigated by DNA analyses and LC-MS analyses. When the PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) was performed using the restriction enzyme XmaI (as reported by Sukrong *et al.* to be able to distinguish *M. speciosa*), the same DNA fragment patterns were obtained from all 16 products. On the other hand, as a result of the identification of the plant species of each product by nucleotide sequence analyses, the sequences of *M. speciosa* were detected in only 14 products. Despite the facts that mitragynine and 7-hydroxymitragynine were detected also in the other two products by the LC-MS analyses, *M. speciosa* DNAs were not amplified from these products by the PCR. Moreover, the DNA amplicons of the other psychotropic plant (*Mesembryanthemum* sp., e.g. “Kanna”) were detected. This plant PCR amplicon has the restriction site for the XmaI at the same position of the *M. speciosa* PCR amplicon and it is difficult to distinguish “Kratom” and “Kanna” by the conventional PCR-RFLP. When the restriction enzyme XhoI was used simultaneously with the XmaI, the specific DNA fragment was only observed from the *M. speciosa* amplicon and it was possible to distinguish both species using this improved PCR-RFLP method. This method is useful to identify the origin of Kratom products distributed in the illegal drug market.

Key words—*Mitragyna speciosa*; kratom; mitragynine; PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method; *Mesembryanthemum*

緒 言

アカネ科に属する *Mitragyna speciosa* KORTH. (*M. speciosa*) は東南アジアなど熱帯地方に自生する 4–16 m ほどの常緑樹である。伝統的に、東南アジアの特定の地域で、新鮮な葉や乾燥した葉を噛んだりお茶にしたりして、長時間労働の疲労回復に使用されている。^{1–3)} 葉を乾燥させたものは Kratom や Biak-Biak と呼ばれ、伝統医学やアヘンの代用薬として用いられている。^{1–4)} これまでに *Mitragyna* 属植物の様々な部位から多くのアルカロイドが同定^{1,5)} されているが、その中でも主に葉から検出される Mitragynine (1) 及び 7-Hydroxymitragynine (2) (Fig. 1) は精神賦活作用を有するアルカロイ

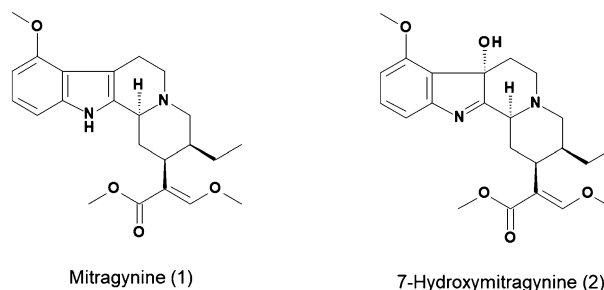


Fig. 1. Chemical Structures of the Alkaloids Investigated in This Study

(1) Mitragynine; (2) 7-Hydroxymitragynine.

ドであり、*Mitragyna* 属の中でも *M. speciosa* からのみ検出が報告されている。³⁾ 両成分はオピオイド受容体アゴニスト作用を有し、アヘンのような中枢抑制作用やコカのような興奮作用により中毒性があるとされる。^{1–5)}

Kratom 製品の濫用は世界的にもみられ、欧州薬

国立医薬品食品衛生研究所生薬部

*e-mail: ogata@nihs.go.jp

物・薬物依存監視センター (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; EMCDDA) による 2008 年と 2011 年のインターネット調査によれば, kratom は最も広く供給されている新規精神賦活物質 (New psychoactive substances) の 1 つであった.⁶⁾ いくつかの国では規制対象であるが, 現在でもインターネット上に多くの販売サイトが存在しており, 葉を粉碎し固めた錠剤, カプセル, 又は抽出物として販売されている. 米国では, 近年, kratom の乱用が著しく増加している.⁷⁾ 日本では 2000 年代頃から「お香」などとして危険ドラッグ市場に流通し, 濫用が危惧され, 2016 年 3 月, Mitragynine, 7-Hydroxymitragynine, 及びそれら成分を含有する植物 *M. speciosa* (*Mitragyna* 属に属する他の種との交雑種を含み, 直ちに人の身体に使用可能な形状のものに限る) は, 医薬品医療機器等法において指定薬物として規制された. 指定薬物として規制された植物としては *Salvia divinorum* に続き 2 例目である.

M. speciosa の DNA を用いた分析法としては, Sukrong らが *Mitragyna* 属植物 4 種 (*speciosa*, *diversifolia*, *hirsuta* 及び *rotundifolia*) における *speciosa* の PCR-制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) を用いた識別法を報告している.⁸⁾ また, Maruyama らは本法を国内危険ドラッグ市場に流通している *M. speciosa* 含有製品分析に適用し, その有効性について報告している.⁹⁾ さらに, Kikura-Hanajiri らがそれら製品中に含有される Mitragynine 及び 7-Hydroxymitragynine, またその他インドールアルカロイド 3 成分の定量分析を報告している.¹⁰⁾

本研究では, 2015 年から 2016 年に危険ドラッグとして流通していた植物含有製品のうち, Mitragynine が検出された 16 製品を用い, 製品中の Mitragynine 及び 7-Hydroxymitragynine の定量分析を行うとともに, DNA 塩基配列を用いた植物種の同定を行った. また, 従来の PCR-RFLP 法による *M. speciosa* 識別法において誤判定を引き起こす可能性が示唆される植物種を検出したので, その判定法を検討した.

研究 方 法

1. 試料及び試薬 2015 年から 2016 年に入手

した危険ドラッグ製品のうち, Mitragynine が検出された 16 製品 (No. 1–16) を試料とした. 16 製品の製品形態は, 乾燥植物粉末 13 製品 (No. 1–13), カプセル剤 3 製品 (No. 14–16 うち No. 15, 16 は同一の紫色のカプセル) であり, カプセル 3 製品の中身も植物の粉碎物であった. 分析用標品として, Mitragynine を Cayman Chemicals (Ann Arbor), 7-Hydroxymitragynine を Cerilliant Corporation (Round Rock), 定量分析における内標準物質の Betamethasone valerate を富士フィルム和光純薬株式会社より購入した. 抽出溶液の膜ろ過には, Ultrafree-MC (0.45 μ m filter unit, Merck Millipore, Bedford) を用いた. その他の試薬及び LC-MS 移動相溶媒は HPLC グレードを用いた.

植物試料の粉碎は, MM-300 (Qiagen, Venlo) を用いて行った. 各試料からの DNA の抽出・精製には, Maxwell 16 Tissue DNA purification kit 及び Maxwell 16 (Promega, Madison) を用いた. PCR 酵素として TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (Takara Bio, Kusatsu), PCR 反応試薬として Amp-direct[®] plus (Shimadzu, Kyoto) を用いた. シークエンス反応には BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham) を使用した. 制限酵素 XmaI, XhoI は New England Biolabs (Ipswich) から購入した.

2. Mitragynine, 7-Hydroxymitragynine の定量

2-1. 試料の調製 植物粉末 20 mg を量り取り, 内標準物質として Betamethasone valerate (20 μ g/mL) を添加した 80% メタノール水溶液を 4 mL 加えた. 試料溶液を 1 時間超音波抽出後一晩静置し, フィルターろ過を行い LC-MS 測定用溶液とした.

2-2. LC-MS 分析条件 装置: [UPLC] ACQUITY UPLC / [MS] Single Quadrupole Detector 2 (Waters, Milford), カラム: Atlantis dC18 (2.1 \times 150 mm, 5 μ m, Waters), 移動相 A: 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液, 移動相 B: メタノール, グラジエント条件: A/B 80/20–30/70 (35 min, 10 min hold), 流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 2 μ L, 検出: ダイオードアレイ検出器 (モニタリング波長 UV 254 nm) 及び質量検出器.

質量分析条件 イオン化: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法, ポジティブモード, 脱溶媒ガス流量: N₂ 800 L/h, 脱溶媒ガス温度: 400°C,

コーン電圧：30 V，キャピラリー電圧：2500 V，測定範囲： m/z 150–600.

2-3. 検量線の作成 検量線は，Mitragynine 標準溶液を 1–200 $\mu\text{g/mL}$ ，7-Hydroxymitragynine 標準溶液を 10–1000 ng/mL の範囲で調整し，内標準物質に対する化合物のピーク面積比から作成した．定量分析法の詳細については，文献¹⁰⁾に従った．

3. DNA 解析

3-1. DNA の抽出 各試料 (10 mg) を 5 mm ジルコニアビーズとともにエッペンドルフチューブ (2 mL) に入れ，液体窒素で凍結させた後に粉碎した．粉碎した各試料を Maxwell 16 Tissue DNA purification kit 内の溶出液に懸濁・溶解し，Maxwell 16 を用いて 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．

3-2. PCR-RFLP 法による *M. speciosa* の識別

Mitragynine が検出された 16 製品より調製した DNA 溶液を鋳型に用い，Sukrong らの方法に従い，ITS-1 領域を含む DNA 断片を増幅した．^{8,9)} PCR 反応液 7.0 μL を制限酵素 XmaI 10 unit で，37°C，4 時間処理し，72°C，10 分間加温し，酵素を失活させた．反応液全量を 2% アガロースゲル電気泳動に供し，DNA 断片の分離パターンを確認した．用いたプライマーを以下に示す．

ITS-1 primer; 5'-TCCACTGAACCTTATCATTTAG-3'

In-18S-25S-3'R primer; 5'-GACTCGATGGTTCCACGGGATTCT-3'

3-3. 各製品の DNA 塩基配列解析 各回収 DNA 溶液を鋳型として葉緑体 DNA 上の *trnL-trnF*，*rbc* の各領域，核 DNA 上の ITS 領域を，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¹¹⁾を用い，TaKaRa Ex Taq Hot Start Version 及び Ampdirect plus を使用し，添付の手順書通りに調製した．全量を 10 μL として以下のプログラムで PCR 増幅を行った (95°C 180 s; 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 90 s, 30 cycles; 72°C, 300 s)．1% 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沈殿を行い，ダイレクトシーケンシングを行った．シーケンシング反応には，BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用い，解析は Applied Biosystems 3500 (Thermo Fish-

er Scientific) を使用した．用いたプライマーを以下に示す．

trnL-trnF forward primer; 5'-CGAAATCGGTA GACGCTACG-3'

trnL-trnF reverse primer; 5'-ATTTGAACTGGT GACACGAG-3'

rbcL forward primer; 5'-ATGTCACCACAAAC AGAGACTAAAGC-3'

rbcL reverse primer; 5'-GTAAAATCAAGTCCA CCRCG-3'

ITS forward primer; 5'-CCTTATCATTTAGAG GAAGGAG-3'

ITS reverse primer; 5'-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3'

3-4. PCR-RFLP 法を用いた *M. speciosa* 及び *Mesembryanthemum* 属植物の解析 塩基配列解析の結果，*M. speciosa* と同定された製品 No. 1–4 と，*M. speciosa* とは異なる植物種が同定された製品 No. 15, 16 を，Sukrong らの方法の変法として，PCR 反応液 7.0 μL を制限酵素 XmaI (認識配列 CCCGGG) 及び XhoI (認識配列 CTCGAG) 各 10 unit で，37°C，4 時間処理し，72°C，10 分間加温し，酵素を失活させた．反応液全量を各々アガロースゲル電気泳動 (2% アガロース，100 V，15 min) に供し，DNA 断片の分離パターンを確認した．

研究結果・考察

1. 製品中の Mitragynine 及び 7-Hydroxymitragynine の定量分析 2015–2016 年に入手した植物系危険ドラッグ 16 製品 (No. 1–16) について，含有成分を LC-MS で分析した結果，16 製品すべてから Mitragynine (1) 及び 7-Hydroxymitragynine (2) が検出された (Fig. 2)．定量結果を Table 1 に示す．製品 No. 1–11 及び，カプセル剤 No. 14 については，葉の粉碎したものであると考えられ，その成分量は Mitragynine が 17–23 mg/g ，7-Hydroxymitragynine が 24–39 $\mu\text{g/g}$ 程度であった．この含有量は既報の結果と比較して，7-Hydroxymitragynine が 10 分の 1 程度の濃度であった．^{10,12)} また，製品 No. 1–9 は同一販売元の製品と考えられ，地名，色調が製品のパッケージに記載されていた．各製品の粉末の色調は若干異なっていたが，2 成分の含有量に差はほとんどみられなかった (Table 1)．色調と

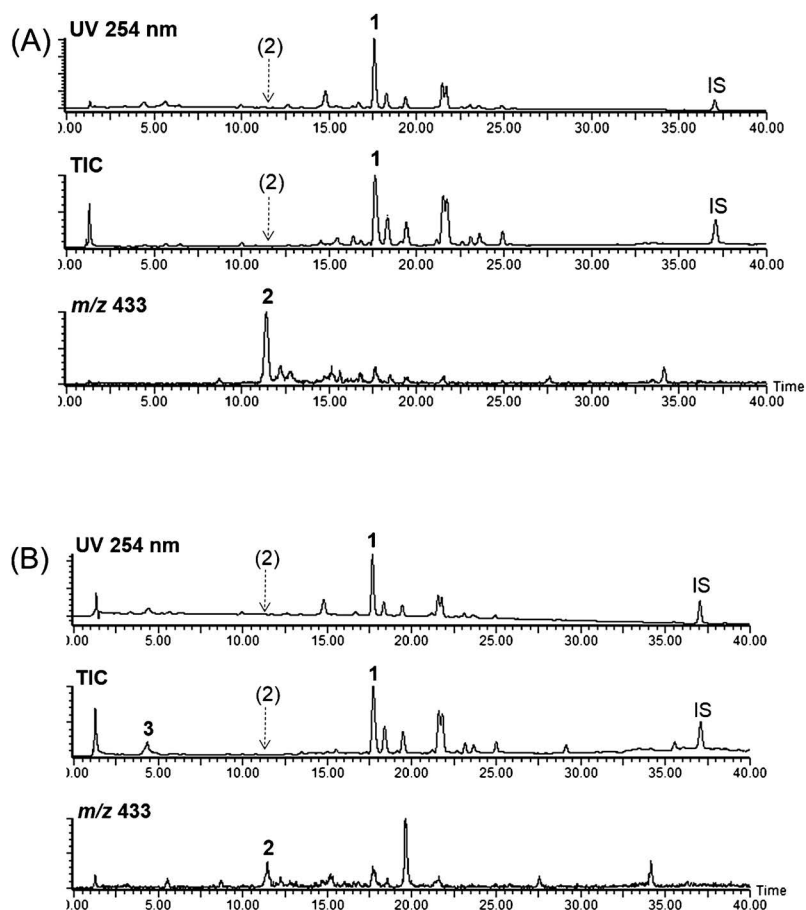


Fig. 2. UV Chromatograms, Total Ion Chromatograms, and Mass Chromatograms of the Extracts from (A) Product 1 and (B) Product 15

1, Mitragynine (m/z 399 $[M+H]^+$); 2, 7-Hydroxymitragynine (m/z 415 $[M+H]^+$ and 433 $[M+H+18]^+$); 3, Mesembrine (m/z 290 $[M+H]^+$).

成分量に関しては、上記2成分以外のアルカロイド成分の含有比に、葉脈の色調によって違いがみられるとの報告がある。¹³⁾ 一方、製品 No. 12, 13 は、他製品よりも2成分の含有量が多く検出された。特に No. 13 の製品中 7-Hydroxymitragynine は、137 $\mu\text{g/g}$ と他製品の約4倍と高含量であり、抽出物などを葉の粉末に別途添加した製品の可能性が考えられたが、いずれも製品 No. 1–11 及び、カプセル剤 No. 14 と同じく葉の粉碎したものと考えられたが、成分の季節変動や、カプセルに入れるなど加工度も様々で、成分量について明確な結論は導き出せなかった。また、No. 15, 16 の製品では、両成分ともに含有量は少なかった。本製品も No. 14 同様、カプセルの中身は植物の粉碎物であったが、他製品に比べ、黄色味が強い粉末であったことから、別の器官や組織、他の植物種の可能性が示唆された。

2. PCR-RFLP 法による *M. speciosa* の識別 Mitragynine 及び 7-Hydroxymitragynine が検出さ

れた全16製品よりDNA抽出を行った。いずれも植物粉末で、市販のDNA抽出キットを用いた抽出法で十分にDNAが得られる試料であった。Sukrongらの用いたプライマーを用いPCR増幅を行い、制限酵素 *Xma*I による制限酵素処理を行った。全製品から約300 bp 及び100 bp のDNA断片が検出され、既報^{8,9)}と同様の結果が得られたことから、上記成分結果 (Table 1) も含めて、いずれの製品も *M. speciosa* であると推定した。

3. 各製品の塩基配列解析 植物の鑑別・同定に用いられる葉緑体DNA上の *trnL-trnF*, *rbc*, 核DNA上のITS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。

製品 No. 1–14 は *M. speciosa* であることが強く示唆された。*trnL-trnF* 領域 (分析塩基数 882), *rbcL* 領域 (分析塩基数 509) において、14 製品す

Table 1. Concentrations of Mitragynine and 7-Hydroxymitragynine in Commercial Kratom Products

Product No.	Forms	Mitragynine (mg/g)	7-Hydroxymitragynine (μ g/g)
1	powdery dried leaves	18.0 \pm 0.14	25.4 \pm 2.20
2	powdery dried leaves	22.2 \pm 0.09	34.2 \pm 2.44
3	powdery dried leaves	21.5 \pm 0.16	33.0 \pm 2.78
4	powdery dried leaves	20.7 \pm 0.45	33.7 \pm 3.16
5	powdery dried leaves	18.0 \pm 0.07	26.7 \pm 1.84
6	powdery dried leaves	19.2 \pm 0.10	29.7 \pm 2.09
7	powdery dried leaves	20.4 \pm 0.14	34.6 \pm 2.54
8	powdery dried leaves	18.7 \pm 0.10	29.4 \pm 2.39
9	powdery dried leaves	19.6 \pm 0.16	32.5 \pm 1.24
10	powdery dried leaves	17.3 \pm 0.01	38.7 \pm 1.79
11	powdery dried leaves	18.8 \pm 0.11	24.7 \pm 1.23
12	powdery dried leaves	51.2 \pm 0.71	74.5 \pm 6.92
13	powdery dried leaves	59.3 \pm 0.88	137.1 \pm 19.16
14	capsule	17.7 \pm 0.16	31.4 \pm 2.70
15	capsule	9.2 \pm 0.16	6.2 \pm 0.27
16	capsule	9.4 \pm 0.15	6.4 \pm 0.59

 \pm S.E., $n = 3$.

べてで一致し、データベース上の *M. speciosa* 登録配列 (Acc. No. KC737823, KC737719) と 100% 一致した。また、ITS 領域 (分析塩基数 734) では、14 製品中 13 製品で一致し、データベース登録配列 (Acc. No. JF412826, JF412827) とは 2 塩基の違いがみられた。製品 No. 11 のみデータベース登録配列と 4 塩基の違いを有する塩基配列が確認されたが、14 製品のいずれの配列もデータベース上の *M. speciosa* と最も高い配列類似性を示した (Table 2)。また、近縁種である *M. parvifolia* (Acc. No. JX856480), *diversifolia* (Acc. No. AB249646), *hirsuta* (Acc. No. AB249647) とは、それぞれ 10 塩基以上の違いがみられた。製品の一部には「産地(地名)」や「色 (色調)」が記載されているものもみられたが、今回解析した塩基配列からは、その差異はみられなかった。

タイの Chulalongkorn 大学の研究グループによって国際塩基配列データベース上には *M. specio-*

sa に関して 2 種類の ITS 領域が報告されている。

M. speciosa “red-veined variety” (Acc. No. JF412826), *M. speciosa* “white-veined variety” (Acc. No. JF412827) である。この 2 つの変種から単離された ITS 領域の配列 744 塩基は 100% 一致している。

一方、製品 No. 15, 16 では、両製品とも *M. speciosa* の配列は検出されず、*Mesembryanthemum* (*Me.*) 属植物と高い配列類似性を示す配列が検出された。*trnL-trnF* 領域では *Me. tortuosum* (Acc. No. AJ558063) 及び *Me. ladismithiense* (Acc. No. AM161449) と 1 塩基の違いであった (892/893)。ITS 領域では *Me. ladismithiense* (Acc. No. AJ582938) と 5 塩基 (585/590), *Me. tortuosum* (Acc. No. AM162402) と 3 塩基の違いであった (325/328)。*rbcL* 領域では *Me. crystallinum* (Acc. No. KM016695) と 100% 一致した (522/522) (Table 2)。以上の結果から、同製品に含まれる主要植物種は *Mesembryanthemum* 属植物 (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。特に、*trnL-trnF* 領域や ITS 領域に存在する、一般に種間でも変異が多くみられるイントロンやスパーサー部位における配列類似性の高さや、系統樹解析の結果から、本製品の植物種は *Me. tortuosum*, *Me. ladismithiense* 若しくはその近縁種であることが示唆された。しかし、国際塩基配列データベース上に公開されている上記植物種 (属) の DNA 配列情報が乏しく、*Me. tortuosum*, *Me. ladismithiense* の *rbcL* 領域の配列情報も現時点で公開されていないことなどから、種の特定には至らなかった。*Mesembryanthemum tortuosum* L. [= *Sceletium tortuosum* (L.) N.E.Br.^{14,15}] “Kanna” は、南アフリカ原産の多肉植物であり、古くから鎮痛効果など薬用植物として利用されている。また、セロトニン再取り込み阻害、PDE4 阻害活性を有する Mesembrine (3) 型アルカロイドを含有する植物^{16,17)}として知られており (Fig. 1), LC-MS 分析において、本製品からも Mesembrine (3) が検出されている [Fig. 2(B)]。また、製品 No. 15, 16 からは Mitragynine 及び 7-Hydroxymitragynine が検出されたにもかかわらず *M. speciosa* の DNA 配列が検出されなかったことから、本製品は、別途 *M. speciosa* の抽出物若しくは両成分を添加したもので

Table 2. The Best Matched Species in the BLAST Search Results of the *trnL-trnF*, *rbcL* and ITS Regions for the Plant Species for Which the Corresponding Sequences are Published in the GenBank

Product No.	<i>trnL-trnF</i>	<i>rbcL</i>	ITS
1	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
2	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
3	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
4	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
5	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
6	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
7	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
8	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
9	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
10	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
11	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
12	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
13	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
14	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>
15	<i>Mesembryanthemum tortuosum</i>	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	<i>Mesembryanthemum tortuosum</i>
16	<i>Mesembryanthemum tortuosum</i>	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	<i>Mesembryanthemum tortuosum</i>

ITS-1	1:TCCACTGAACCTTATCATTTAG-----	22
No.1-4	1:TCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC	50
No.15,16	1:TCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC	50
In-18S-25S-3'R	0:-----	0
ITS-1	22:-----	22
No.1-4	51:GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTTGTCGAATCCTGCAAAAC-GCACGA	99
No.15,16	51:GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTTGTCGAAAACTGCCTAGCAGAACGA	100
In-18S-25S-3'R	0:-----	0
ITS-1	22:-----	22
No.1-4	100:CC-GTGAACCCGTGTTAAAC- CCCGGG -CGTCGGGTGGCCGTGGAGACT	145
No.15,16	101:CCCGTGAACACGTTTACAAAC- CCCGGG GGGACGCGTGGCGCTCGCTGC-	149
In-18S-25S-3'R	0:-----	0
Xmal		
ITS-1	22:-----	22
No.1-4	146:AAGCCCTCCCTTCCCTCCGGCG-CTCCCGCGCGCTAGTCGCGCGGAAA	194
No.15,16	150:ATGCCCTCCCGCGCGCGGGGGCGCTCCTAGCGGGCGGCCTCCGGCGA	199
In-18S-25S-3'R	0:-----	0
ITS-1	22:-----	22
No.1-4	195:ACGTAACCTAAACCCGGCGCGGAACGCGCAAGGAAAACCTCAATAGGACT	244
No.15,16	200:AAC-AACG-AACCCGCGCGGACTGCGCCAAGGAACA-TGAACA--AAT	244
In-18S-25S-3'R	0:-----	0
ITS-1	22:-----	22
No.1-4	245:GCCAAACCCCGGATGCCCGGTTTCGCGGTGCG- CTCGAG GGTGCTGCGGCG	294
No.15,16	245:AGCGTGCCCCCGCGCGCGGTTTCGCCG-GCGCGCGGTGCTGGCACCTGT	293
In-18S-25S-3'R	0:-----	0
XhoI		
ITS-1	22:-----	22
No.1-4	295:CCTGTCTAATCCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC	344
No.15,16	294:CCA-TATTATTAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC	342
In-18S-25S-3'R	0:-----	0
ITS-1	22:-----	22
No.1-4	345:GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCG	394
No.15,16	343:GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCG	392
In-18S-25S-3'R	1:-----AGAAATCCCG	9
ITS-1	22:-----	22
No.1-4	395:TGAACCATCGAGTC	408
No.15,16	393:TGAACCATCGAGTC	406
In-18S-25S-3'R	10:TGAACCATCGAGTC	23

Fig. 3. The Sequence Alignments of the ITS-1 Region of Products Nos. 1-4 (*Mitragyna speciosa*) and Products Nos. 15 and 16 (*Mesembryanthemum* sp.)

The square boxes are the restriction enzyme sites. The ITS-1 is the forward primer; The In-18S-25S-3'R is the reverse primer.

あると考えられた。これまでに“Kanna”においては、大麻や他の精神活性成分と組み合わせた使用（乱用）も報告¹⁷⁾されている。また、インターネット上の海外販売サイトでも本植物の粉末や抽出物が多数みられており、今後、日本国内での乱用目的の流通が危惧される。なお、本植物の抽出物は、南アフリカのメーカーからストレス緩和や認知機能を高めるサプリメントとして市販されている。¹⁸⁾

4. PCR-RFLP 法を用いた *M. speciosa* 及び *Mesembryanthemum* 属植物の解析 上記の成分分析、塩基配列解析の2つの実験結果において、製品 No. 15, 16 は Sukrong らの PCR-RFLP 法では *M. speciosa* であることが示唆されたが、塩基配列解析結果では *M. speciosa* の DNA は検出されていない。そのため、PCR-RFLP 法における結果は、製品 No. 15, 16 で、制限酵素 *Xma*I により切断されないか、切断されてもサイズが異なるバンド（多型）が出現すると推察された。そこで、PCR-RFLP に用いる各製品から得られた PCR 産物の塩基配列を詳細に解析した（Fig. 3）。その結果、両植物種の PCR 産物における DNA 配列のほぼ同じ位置（*Mesembryanthemum* sp. 122–127 bp, *M. speciosa* 119–124 bp）に制限酵素 *Xma*I の認識配列 CCCGGG が存在することが明らかとなり、PCR-RFLP 法で、両植物種で同様の結果が得られることが明らかとなった [Figs. 4(A) and (B)]。また、国際塩基配列データベース上に公開されている *Me. tortuosum* (= *Sceletium tortuosum*) を含む近縁種の多くもまた *M. speciosa* から得られる PCR 産物と同様に、ほぼ同じ位置に CCCGGG の配列を保持している。そこで両植物種の配列解析結果を基に、*M. speciosa* 特異的制限酵素切断部位を調査し、従来の制限酵素 *Xma*I に、制限酵素 *Xho*I を同時添加する手法を作成した [Fig. 4(C)]。その結果、制限酵素 *Xho*I の認識配列 CTCGAG は、*M. speciosa* の 273–282 bp の位置にのみ存在するため、*M. speciosa* の配列のみ制限酵素 *Xma*I と合わせて2ヵ所で切断され、*Mesembryanthemum* (*Sceletium*) sp. との識別が可能となった [Fig. 4(C)]。

今回の事例は、*M. speciosa* の含有成分である Mitragynine 及び 7-Hydroxymitragynine が検出され、なおかつ従来の PCR-RFLP 法によって *M. speciosa* であると判定されるにもかかわらず、塩基

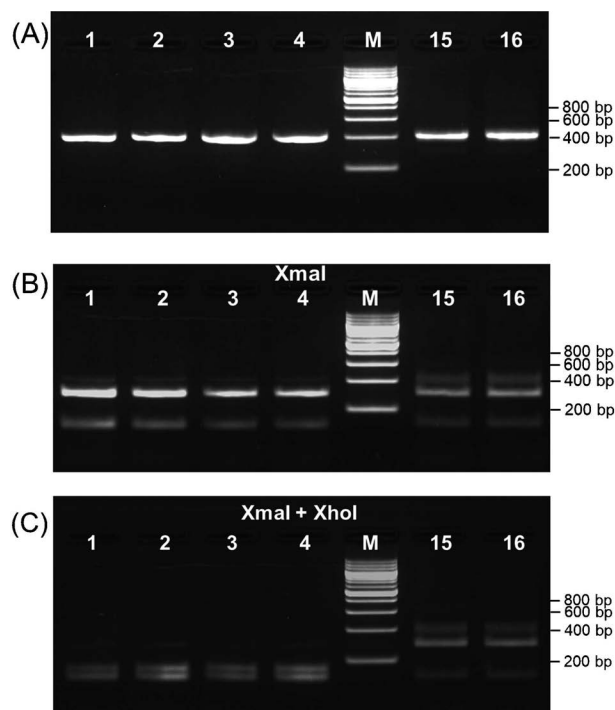


Fig. 4. Gel Electrophoresis in the PCR-RFLP Assay

(A) Agarose gel electrophoretogram of the PCR products. (B) Agarose gel electrophoretogram of the digested PCR products at the *Xma*I. (C) Agarose gel electrophoretogram of the digested PCR products at the *Xma*I & *Xho*I. Lane Nos., products Nos. 1–4, 15, 16; Lane M, 200 bp DNA ladder marker.

配列解析では植物種が異なるという稀なケースであった。Sukrong らの手法は本来 *Mitragyna* 属植物 4 種を識別するために用いられる手法である。様々な植物種の混入がみられる危険ドラッグ市場製品¹¹⁾においては簡易判定法という位置づけで使用することは可能であるが、Sukrong らの手法と今回検討した制限酵素反応を組み合わせた二段階判定法は、より強固な *M. speciosa* 分析法として機能すると考えられた。

結 論

2015–2016 年に入手した植物系危険ドラッグ 16 製品 (No. 1–16) について、含有成分を LC-MS で分析した結果、すべての製品から、Mitragynine 及び 7-Hydroxymitragynine が検出された。また、既報に従い、PCR-RFLP 法を用いた DNA 分析を行った結果、これら 16 製品に含有される植物の基原種は、*M. speciosa* であると判定された。しかし、各製品中植物の葉緑体 DNA 上の *trnL-trnF*, *rbc*, 核 DNA 上の ITS 領域の解析を行った結果、2 製品において、*M. speciosa* ではなく異なる植物種

が検出され、DNA 塩基配列解析の結果、*Mesembryanthemum* 属植物であると示唆された。PCR-RFLP 法による誤判定の理由は、*Mesembryanthemum* 属植物の ITS-1 領域にも、*M. speciosa* DNA ITS-1 領域とほぼ同じ位置に XmaI による認識配列が存在することによるものであった。そこで、*M. speciosa* ITS-1 領域に特異的な配列を切断可能な XhoI の同時添加した結果、両種の識別が可能であった。従来の PCR-RFLP 法と本法を組み合わせることにより、より正確な *M. speciosa* の判別が可能になると思われる。

謝辞 本研究は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政策研究事業）で行われたものであり、関係各位に深謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Takayama H., Aimi N., Sakai S., *Yakugaku Zasshi*, **120**, 959–967 (2000).
- 2) Eastlack S. C., Cornett E. M., Kaye A. D., *Pain Ther.*, **9**, 55–69 (2020).
- 3) European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. “Kratom drug profile.”: https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/kratom_en, cited 4 November, 2020.
- 4) National Institute on Drug Abuse. “Drug facts Kratom.” April, 2019: <https://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/kratom>, cited 4 November, 2020.
- 5) Brown P. N., Lund J. A., Murch S. J., *J. Ethnopharmacol.*, **202**, 302–325 (2017).
- 6) Meireles V., Rosado T., Barroso M., Soares S., Gonçalves J., Luís Â., Caramelo D., Simão AY., Fernández N., Duarte A. P., Gallardo E., *Medicines* (Basel), **6**, 35 (2019).
- 7) Drug Enforcement Administration., U. S. Department of Justice, “Drugs of Abuse: A DEA Resource Guide, 2017 edition,” https://www.dea.gov/sites/default/files/drug_of_abuse.pdf, cited 4 November, 2020.
- 8) Sukrong S., Zhu S., Ruangrungrasi N., Phadungcharoen T., Palanuvej C., Komatsu K., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1284–1288 (2007).
- 9) Maruyama T., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Takayama H., Goda Y., *J. Nat. Med.*, **63**, 340–344 (2009).
- 10) Kikura-Hanajiri R., Kawamura M., Maruyama T., Kitajima M., Takayama H., Goda Y., *Forensic Toxicol.*, **27**, 67–74 (2009).
- 11) Ogata J., Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Goda Y., *Forensic Sci. Int.*, **227**, 33–41 (2013).
- 12) Lydecker A. G., Sharma A., McCurdy C. R., Avery B. A., Babu K. M., Boyer E. W., *J. Med. Toxicol.*, **12**, 341–349 (2016).
- 13) Boffa L., Ghè C., Barge A., Muccioli G., Cravotto G., *Nat. Prod. Commun.*, **13**, 1111–1116 (2018).
- 14) Klak C., Bruyns P. V., Hedderson T. A. J., *Taxon*, **56**, 737–756 (2007).
- 15) Klak C., Bruyns P. V., *Bothalia*, **43**, 197–206 (2013).
- 16) Gericke N., Viljoenb A. M., *J. Ethnopharmacol.*, **119**, 653–663 (2008).
- 17) Krstenansky J. L., *J. Ethnopharmacol.*, **195**, 10–19 (2017).
- 18) Dimpfel W., Franklin R., Gericke N., Schombert L., *J. Ethnopharmacol.*, **223**, 135–141 (2018).