

るものであった。このことより、注意深い条件を選択するならば、SOMにより合理的な Profiling ができることが示された。覚せい剤密造ルート識別の結果、Emde method が 10 試料、Nagai method が 5 試料、Reductive amination 法が 7 試料、Leuckart method が 8 試料であった。北朝鮮港仕出しの覚せい剤は、麻黄由来の Ephedrine が用いられ、Emde 法で合成されていることが推定された。

E. 結論

覚せい剤の Profiling に関するこれまでの基礎研究を近年押収された覚せい剤結晶において検証してみたところ、様々な密造法で作られたと推定される覚せい剤が日本で流通していることが確認された。原料の Ephedrine も合成品のみではなく天然品も使用されていることが推測される。しかし、日本で流通している覚せい剤はすべて密輸入品であり、その仕出し地を推定するには、関係国での密造法についての動向を的確に把握することが必要であると同時に新たな分析法を開発し、Profiling の精度を向上させていかなければならない。本年度新たに検討した炭素・窒素安定同位体比分析や Kohonen 自己組織化ニューラルネットワーク法 (SOM) は非常に有効な Profiling 法となることが期待できる。今後、更に多面的な手法を組み合わせ、世界各地から覚せい剤結晶を集め Profiling を行い、実証的な検討を進めていく予定である。

次年度には、実証的研究を国内外の関係試験機関と協力し発展させるため、ATS Profiling に関する会議を UNDCP 主催で開催できるよう支援していく予定である。

分担研究報告書

—フェネチルアミン系乱用薬物の Profiling Analysis に関する基礎研究—

分担研究者 長野 哲雄 東京大学大学院 薬学系研究科 教授
 研究協力者 浦野 泰照 東京大学大学院 薬学系研究科 助手

研究要旨 世界各国で流通している覚せい剤の Profiling Analysis を行い、その化学的特徴を把握することの意義は大きい。我々はこれまでに、押収 Methamphetamine 中に含まれる代表的、特徴的な不純物の構造を、GC/MS データおよびその標品の合成から決定してきた。その結果、代表的な合成法と考えられている4つの合成ルートに特徴的な不純物候補の策定に成功し、Naphthalene 化合物及び Aziridine 化合物の有無により、4合成法の識別が可能であることを見出した。今回さらに詳細な Profiling を可能とする新たな方法として、押収 Methamphetamine 中に含まれる炭素、窒素原子の同位体比を測定する方法を検討し、その有用性を明らかにした。例えば、Nagai 法で合成されたと推定される Methamphetamine であれば、その中に含まれる窒素原子の同位体比を測定することで、その原料 Ephedrine が天然物由来なのか、化学合成品由来なのかを、高い精度で推定することが可能である。以上の結果から、Methamphetamine の Profiling Analysis をさらに詳細かつ正確に行うことが可能となった。

A. 研究目的

不法 Methamphetamine(MA)合成ルートとして、Fig 1 にあげる数種の方法がこれまでに報告されている。押収品の合成ルートを特定することは捜査上非常に有用であることから、筆者らは、MA の Profiling Analysis を主眼として研究を行ってきた。その結果、昨年度までに、各合成ルートの特徴づける不純物を見出すことに成功した。すなわち、最も代表的な4種の合成法(Nagai、Leuckart、Emde、Reductive amination)による MA の合成を実験室内で行い、生じる不純物を別途化学合成した標準品と GC/MS を用いて比較することにより、Naphthalene 化合物、および 1,2-Dimethyl-3-phenylaziridine(以下 Aziridine と略す)化合物が重要なマーカー化合物となることを示してきた。本

年度はさらに、原料化合物に関する有用な情報を与える方法として、押収 MA 中の炭素、窒素原子の同位体比に着目した研究を行った。また同時に、さらなる詳細な Profiling を可能とする不純物の発見を目指し、UNDCP と協同して特徴的なピーク候補化合物の合成も行った。

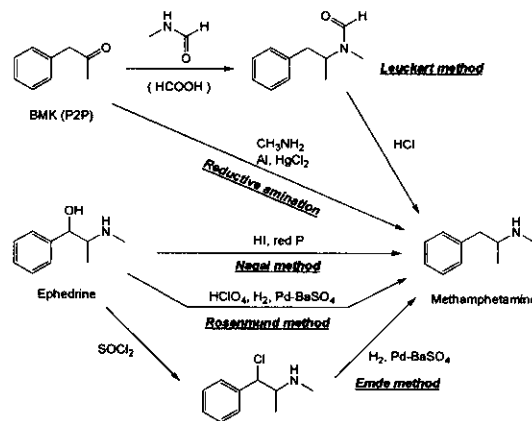


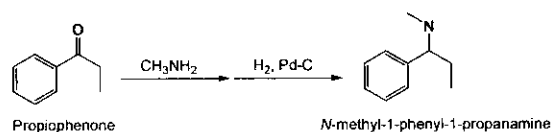
Fig. 1. 主な Methamphetamine の密造合成法

B. 方法

1. 不純物標品の合成

本年度は下記の不純物標品を合成した。

- ・ *N*-methyl-1-phenyl-1-propanamine



- ・ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3/TMS) (δ): 0.81 (3H, t, $J=7.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1.56-1.84 (2H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 2.28 (3H, s, N- CH_3), 3.36 (1H, dd, $J=5.9, 7.5$ Hz, Benzyl-H), 7.21-7.35 (5H, m, Ph)
- ・ MS (EI+): 149, 120(basepeak), 91, 77, 42

2. Nagai 法により生成する MA、原料 Ephedrine の炭素、窒素同位体分析

Fig 1 に示した合成ルートの中で、東南アジアでは Ephedrine を原料とする密造の占める割合が高いと推定されている。このため原料 Ephedrine に関しては、Fig.2 に示した合成ルート識別法以上に詳細な Profiling Analysis が求められている。MA 自身の同位体比に、原料 Ephedrine の同位体比特徴が残存すれば、実現可能でありかつ有効な Profiling 法として用いることが可能となる。そこで実際に、それぞれを出発原料とした Nagai 法による MA 合成を実験室で行い、単離生成した MA 中の炭素、窒素同位体存在比を原料 Ephedrine のそれと比較することを試みた。天然の麻黄由来の Ephedrine は国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験所との共同研究の一環として、同試験場が収集したものの中から選び、麻黄を 50°C で乾燥後、ミルで粉碎後、定法によりエーテルにて抽出した。合成の Ephedrine は市販品を用いた。実験条件は以下の通りである。

< Nagai 法 >

・ *d*-Pseudoephedrine 0.5 g に Hydroiodic acid (55~58%) 1.5 mL と赤リン 75 mg を加え、3 時間還流した(温度 140°C)。反応液を室温まで冷却後、2N NaOH aq. で pH12 とし、塩化メチレンで抽出。抽出した塩化メチレン層を 2N HCl aq. で振り取り、塩酸層を 2N NaOH aq. で pH12 とした後、再び塩化メチレン抽出を行った。(この操作は不純物である Naphthalene 類を完全に除くために行った。)無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒を留去し、ここに HCl 飽和エーテル (1N, Aldrich) を加えて塩酸塩として析出させ、これを濾過により集め、減圧下乾燥した。炭素、窒素同位体分析は、関税中央分析所との共同研究の一環として、関税中央分析所で行った。

< 同位体分析条件 >

装置：安定同位体比質量分析計

ThermoQuest DELTA^{PLUS}

元素分析装置：

ThermoQuest Flash EA 1112

燃焼炉酸化試薬：

CrO_3 , $(\text{Co}_3\text{O}_4)\text{Ag}$ 及び O_2 ガス

燃焼炉温度： 1020°C

還元炉還元試薬：Cu

燃焼炉温度： 680°C

He flow：1 mL/min

分離カラム：HayeSep

(Length 2m, I.D. 5mm)

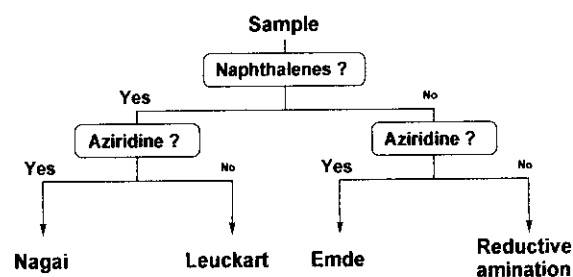


Fig.2 合成ルート識別のためのフローチャート

C. 研究結果

Ephedrine の炭素・窒素安定同位体比の測定結果は Table 1. に示す。

Table 1. Ephedrine の炭素・窒素安定同位体比

Ephedrine 試料	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
富士薬品製(合成)	-29.2	-10.5
丸石製薬製(合成)	-28.4	-10.5
大日本製薬製(天然)	-26.0	+3.8
Ephedra sinica より	-29.7	+5.7
Ephedra distachya より	-31.3	+12.0
Ephedra intermedia より	-29.2	+4.6

麻黄由来及び市販品の Ephedrine を出発原料とし、Nagai 法により実験室で合成した MA 中の炭素、窒素同位体存在比を原料 Ephedrine のそれと比較したところ Table 2. の結果が得られた。

Table 2. 原料 Ephedrine と合成 MA の炭素・窒素安定同位体比

試料	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Ephedra intermedia	-29.2	+4.6
上記から合成した MA	-29.5	+3.9
富士薬品 Ephedrine	-29.2	-10.5
上記から合成した MA	-29.2	-11.1
大日本製薬 Ephedrine	-26.0	+3.8
上記から合成した MA	-26.1	+4.4

また、国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験所で栽培した麻黄 12 試料とモンゴル産の麻黄 8 試料を粉末にして、安定同位体測定を行った結果は、筑波薬用植物栽培試験所産は $\delta^{15}\text{N}$ (‰) 値が +1.3 ~ +4.2 で、モンゴル産は +3.1 ~ +6.6 であった(詳細略)。

D. 考察

Nagai 法及び Emde 法の原料は

Ephedrine であるが、同じ Ephedrine であっても天然物由来のものと化学合成品では含まれる窒素の同位体比が異なり、天然品はプラスの値に、合成品ではマイナスの値であることが明らかとなった。また、国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験所で Ephedrine を抽出した麻黄と得られた Ephedrine での炭素・窒素安定同位体比は Table 3. に示すとおりであり、Ephedrine の $\delta^{13}\text{C}$ 値と $\delta^{15}\text{N}$ 値は、起源の麻黄の値をある程度反映していた。

Table 3. 麻黄と Ephedrine の炭素・窒素安定同位体比

試料	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Ephedra sinica	-26.6	2.1
上記麻黄から抽出した Ephedrine	-29.7	+5.7
Ephedra distachya	-27.1	9.6
上記麻黄から抽出した Ephedrine	-31.3	+12.0
Ephedra intermedia	-25.9	2.9
上記麻黄から抽出した Ephedrine	-29.2	+4.6

また、麻黄生薬 20 試料はいずれも $\delta^{15}\text{N}$ (‰) 値が + であり、麻黄由来の Ephedrine にその傾向が継承されていることが確認できた。

出発原料 Ephedrine とそれを用いて Nagai 法で合成された MA での安定同位体比は、ほぼ完全に一致した。これは、Nagai 法の反応条件下では、原料 Ephedrine 中の炭素、窒素原子は保持されることを意味しており、ヨウ素化、還元による MA 生成反応の特徴、すなわち外部由来の炭素、窒素原子が導入されない Nagai 法の特徴が良く表れた結果である。

さらに原料の窒素原子の同位体比は、合成された MA に保持されていた。この結果は、窒素の同位体比分析法は、原料

Ephedrine の出自を知る非常に強力な方法であることを示しており、今後の Profiling において重要な役目を果たすことが期待される結果である。

炭素原子の同位体比は、原料 Ephedrine から MA へと保持されるものの、Ephedrine が天然物由来か、合成品由来かを推測することは出来ないとの結果であった。窒素原子との差は、分子中に窒素原子は1つであるのに対し、炭素原子は10個含まれるため、特徴的な同位体比が平均化されてしまうためと考えられる。

本結果は、押収 MA 中に残留する Ephedrine を分析することでその原料が天然物由来か、合成品由来かを特定できることを示しており、膨大な Ephedrine を原料とする押収品を細分化して捉えることを可能にする。

D. 今後の予定

本年度の実験から、Fig 2 に示した不純物分析による合成ルート推定に加えて、MA の同位体分析により原料 Ephedrine の Profiling が可能であることが示された。特に窒素原子の同位体比は、原料 Ephedrine が天然物由来か合成品由来かまで正確に推定することが可能であるため、非常に強力な Profiling 法となることが期待できる。今後これらの手法を組み合わせ、より詳細な、より正確な Profiling 手法を確立していく予定である。

研究協力報告書

フェネチルアミン系乱用薬物(ATS)の Profiling Analysis —化学成分に関する研究—

研究協力者 太田 茂 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨 本研究はフェネチルアミン系乱用薬物中に含まれる化学成分の内代表的なものを GC/MS、HPLC を用いて一斉分析を行い、ロットごとの特徴を把握し不正流通薬物密造ルート解明の一助とすることを目的としている。本年度は押収起源の異なる 100 種類のフェネチルアミン系乱用薬物錠剤を用いて化学成分の定性分析と定量分析を行い、代表的な成分の分布等を明らかにした。

A. 研究目的

フェネチルアミン系乱用薬物の流通経路解明のためには、世界各地から押収されたサンプルを正確に分析し、特徴のあるパターンを把握する事が重要である。今回は日本で押収された錠剤に焦点を絞り、6 種類の化合物の検出を行うことで本方法論が Profiling Analysis 法として有用であることを示すことが目的である。

B. 研究方法

錠剤は関東信越厚生局麻薬取締部で研究者用麻薬として交付を受けた日本で押収された 100 種類のフェネチルアミン系錠剤(Amphetamine- Type Stimulant Tablet)について、それぞれ乳鉢で粉体とし、10 mg 採取してリン酸緩衝液 (pH 7.0) 8 mL と 5 分間攪拌することで溶解した。その後 10 分間 3500 回転で遠心し、上清 100 μ L は HPLC 用に、4 mL は塩基性化合物 (エフェドリン、MDA、MDMA 等) 検出用に、残りは中性化合物 (カフェイン) 検出用に用いた。塩基性化合物の抽出は 1 mL の炭酸ナトリウム(10%)を加えた後クロロホルム 3 mL を用いて行った。

中性化合物はそのままクロロホルム 3 mL を用いて抽出した。試料の調製及び測定は関東信越厚生局麻薬取締部で実施した。分析条件は下記の通りである。

分析機器：

GC/MS：JEOL Mstation(二重収束質量分析計)/GC(HP 6890N)

カラム：Ultra-2 (30m x 0.2mm x 0.33 μ m)

キャリアガス：He

オープン温度:50 $^{\circ}$ C(1min) to 300 $^{\circ}$ C(4min),
at 10 $^{\circ}$ C/min.

イオン源温度：300 $^{\circ}$ C

注入口温度：250 $^{\circ}$ C Splitless mode

イオン化モード：Electron-impact

イオン化エネルギー：70 eV

イオン化電流：300 μ A

HPLC：Shiseido Nanospace series

Column：ODS-type (CAPCELL PAK C18
UG 120 S5, 250 mm x 1.5 mm
I.D.)

Mobile phase：

For ephedrine, MDA, MDMA, ketamine
methamphetamine and MDEA:5 mM SDS
in 20 mM KH₂PO₄-CH₃CN(65: 35). 50 $^{\circ}$ C

For caffeine:H₂O-methanol(7:3), 35°C

Flow rate : 0.1 mL/min.

Monitoring wavelength : For ephedrine, MDA, MDMA, methamphetamine, ketamine, and MDEA : 210 nm

For caffeine : 254 nm

C. 研究の結果

今回検討した100錠の中で68錠からはMDMAのみが有効成分として検出され、5錠からはMDAのみが検出され、1錠からMDEAのみが検出された。残り26錠からは2から4種の成分が検出された。MDA類以外の活性成分としてはエフェドリン、カフェイン、ケタミン及びメタンフェタミンが検出された。MDA等含有成分の定性分析はGC/MSとHPLCにて標準品との比較で行った。Fig.1にHPLCのクロマトグラムの一例を示す。検出された化合物(エフェドリン、メタンフェタミン、カフェイン、MDA、MDMA、MDEA)の定量分析はHPLCにて行うこととし、標準品を用いての添加

回収実験を行ったところ、Table 1.に示す良好な結果が得られた。検量線は0.2~0.8 mg/mLの範囲で直線性を示した($r^2=0.996\sim 0.999$)。定量結果は、有効成分としてMDMAのみが検出された68錠の含有量は塩酸塩として54~189 mg/錠であった。MDA錠剤(5検体)の一錠あたりの含有量は塩酸塩として68~87mgであった。MDEA錠剤(1検体)の一錠あたりの含有量は塩酸塩として89mgであった。カフェインとMDMAを含有する錠剤が9錠あり、カフェインの含有量は4~48mg/錠であった。エフェドリンとMDMAを含有する錠剤が6錠あり、エフェドリンの含有量は3~28mg/錠であった。MDA、エフェドリンと覚せい剤メタンフェタミンを含有する錠剤が3錠あり、メタンフェタミン含有量は塩酸塩として17~34mg/錠であった。ケタミンとMDMAを含有する錠剤が1錠あり、ケタミンの含有量は53mg/錠であった。

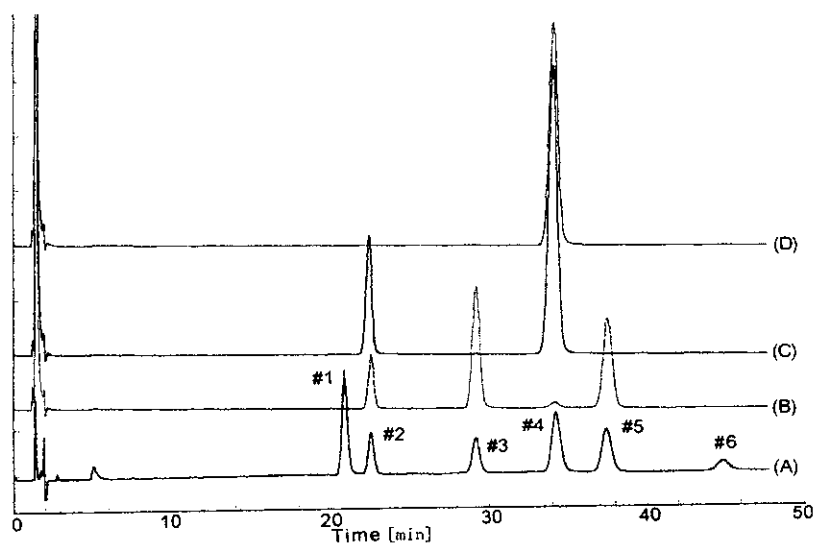


Fig. 1 Chromatograms of tablets by HPLC. (A) Mixture of standard substances. The peaks correspond to #1 = pseudoephedrine, #2 = ephedrine, #3 = MDA, #4 = MDMA, #5 = methamphetamine, #6 = MDEA. (B) "T" (23), (C) "no logo" (70), (D) "Butterfly" (58).

Table 1. Recovery of 6 Standard samples in spiked powder of tablet

Compound	Concentration Added (mg)	Mean (mg)	RSD (%)	AC (%)
Caffeine	4.0	4.0	5.0	0.7
	6.0	6.0	3.3	-0.2
Ephedrine	4.0	4.1	4.7	3.0
	6.0	5.8	2.6	-2.9
MDA	4.0	3.9	3.9	-2.6
	6.0	6.1	1.0	2.2
MDMA		4.0	4.2	4.2 5.1
	6.0	5.9	2.7	-1.8
Methamphetamine		4.0	4.1	4.51.6
	6.0	5.8	2.6	-3.7
MDEA		4.0	4.1	4.53.7
	6.0	5.8	2.5	-3.5

(n=5)

D. 考察

今回検討した錠剤の中からいくつか選り、MDMA 錠剤の含有率の比較を Table 2 に示す。同一事犯で押収された同じロゴ同じ色の錠剤(Double stack HQ(1) や CU (62))はほぼ含有率が同一であった。しかしながら同じロゴ同じ色の錠剤であっても異なる事犯における MDMA 量は様々であった。従って、同じロゴ同じ色の錠剤であるだけで流通経路の推定は危険であると考えられる。また、100錠中 MDMA を含有するものが 92錠あり、やはり主成分は MDMA であるといえる。その濃度も最高 189 mg/錠で、一錠あたり MDMA を 100 mg 以上含有していた錠剤が 45 錠あり、日本で乱用されている "Ecstasy" には、高濃度のものがあることが明らかとなった。なお英国で押収された錠剤中に含まれていた MDMA は 88-140mg/錠であったとの報告がある¹⁾。

2成分以上を含む複合錠剤が 26 錠体あった。そのうち、MDA 類以外の活性成分として、エフェドリン、メタンフェタミン、カフェイン、ケタミンを含有していた錠剤が 19 錠体であった。MDA 類の人への作用としては、アンフェタミン類似の覚せい作用とメスカリン類似の幻覚作用を併せ持っていると報告されている²⁾。ケタミンやカフェイン等が添加された複合成分による作用の特異性については今後の課題であるが、ヨーロッパでは "Ecstasy" による死者も出ており、我が国でもその危険性があり、注意が必要である。

E. 結論

今回の検討によって数種の化合物の Profiling Analysis を行うことで、流通経路についてある程度の推定が可能であることが示された。今後は世界各地から入手

Table 2. Tablet Comparison

Logo	Weight (mg)	mg MDMA/tablet	%MDMA/tablet
Double stack HQ(1)	343	158	46
Double stack HQ(1)	317	152	48
Double stack HQ(1)	315	145	46
Double stack HQ(1)	328	144	44
Double stack HQ(1)	314	135	43
SD	12.3	9.0	1.9
RSD	3.8	6.1	4.3
CU (62)	305	161	53
CU (62)	305	165	54
CU (62)	306	165	54
CU (62)	303	165	55
CU (62)	308	170	55
SD	1.8	3.2	0.8
RSD	0.6	1.9	1.5
Butterfly (55)	283	164	58
Butterfly (84)	247	163	66
Butterfly (6)	320	160	50
Butterfly (98)	253	159	63
Butterfly (19)	300	156	52
Butterfly (58)	320	154	48
Butterfly (49)	280	148	53
Butterfly (63)	255	148	58
Butterfly (3)	314	138	44
Butterfly (10)	318	134	42
Butterfly (21)	290	131	45
Butterfly (51)	262	76	29
RN (94)	290	136	47
RN (59)	296	112	38
RN (31)	249	97	39
RN (71)	273	139	51

The figure in parentheses is ID number

したサンプルで今回のような Profiling Analysis を行い、流通経路解明の一助にしたいと考えている。また、様々な薬物の添加された複合活性成分を含む錠剤の乱用による深刻な問題の発生も懸念されるので、継続的に関係機関では成分のモニターをしてほしい。

F. 参考文献

- 1) Wolff, K., Hay, A.W.H., Sherlock, K. and Conner, M. (1995) Contents of "ecstasy". *LANCET*, **346**, 1100.
- 2) Harold Kalant, H., (2001) The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. *CMAJ*, **165**, 917-28

研究協力報告書

覚せい剤の Profiling への非線形分類法・ 非線形要因解析法の応用

研究協力者 高木達也 大阪大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 本研究では、乱用薬物の Profiling への新しいデータマイニング手法による、視覚的 Profiling を試みてきた。過去には、主成分分析、カテゴリカル主成分分析 (CATPCA)、多次元尺度構成法 (MDS)、Kohonen 自己組織化ニューラルネットワーク法 (SOM) をヘロイン、コカイン等の Profiling に適用し、相応の結果を得ることができた。また、昨年度は、メタアンフェタミンの Impurity Analysis に、独立成分解析法を応用し、有用な結果を得た。今年度は、Impurity Analysis において利用するピークを絞り、実際の未知情報を分類した。適用した要因解析法は、PCA (主成分分析法)、クラスター分析法 (Ward 法)、Kohonen 自己組織化ニューラルネットワーク法である。

A. 研究目的

乱用薬物の Impurity Analysis による Profiling には、主成分分析法などの代表的な線形要因抽出法では不十分であり、非線形手法を用いる必要がある。このため、昨年度、比較的近年用いられるようになった非線形要因解析法である、Kohonen 自己組織化ニューラルネットワーク法 (SOM)¹⁾、5層砂時計型ニューラルネットワーク法 (HNN)²⁾ に加えて、Oja³⁾ による、Hebbian 学習型ニューラルネットワーク法を用いた独立成分解析法に幾つかの改良を加え、当研究グループで開発された HEP ネット法を用い、メタアンフェタミンの Profiling を行った。その結果、HEP ネット法が有用な結果を与えることが示された。本年度は、過去重要視しなかった階層的クラスター分析法も、比較的良好的な結果が得られることが多い Ward 法を取り入れ、他の3種の分類法の参考にするために取り上げた。また、口述のように昨年度と異なり、今年度は、

SOM 法が比較的良好な結果を納めることができたため、主として SOM により、未知データの分類を試みた。その結果、両法でほぼ一致する結果を得ることができたばかりでなく、合成法から想定される不純物の分布とも相応する結果を得ることができた。

B. 研究方法

1. 使用したハードウェア

計算には、CPU に AMD Athlon 2400+ を用いた自作の Windows XP Professional マシンを主として用い、随時、大阪大学遺伝情報実験センターの UNIX WS Fujitsu S-7/7000 Um600、Linux WS を用いた。

2. 使用したソフトウェア

プログラムは PCA に関しては、SPSS for Windows version 11.5J 及び、MS Excel XP for Windows を用いた。

SOM は、開発者の Kohonen 自身によるプログラム、SOM_PAK[1] および

LVQ_PAK[2]を用い、MS Excel および Delta Graph でグラフ化した。

3. データ

データは、世界各地で押収されたメタアンフェタミンを牧野らが GC-MS により測定した各種成分(不純物)ピーク面積を用いた。この過程で、合成後の混合物と考えられるものはデータから除去した。ピーク面積は不純物の量やサンプルの量に敏感なため、以下のような処理を施した。

- 1) 成分列ごとに標準化を行う
- 2) サンプル列ごとに標準化を行う
- 3) その上で、0-10 の範囲にカテゴリー化する。

と言う処理を行った。

4. アルゴリズム

PCAについては省略するが、SOMについてはまだなじみが薄いため、今一度簡単に解説しておく。

SOM では、図1のごとく、誤差逆伝播型のニューラルネットワーク法とは異なる

り、教師信号のようなものはない代わりに、類似したデータが類似した位置に発火するようにネットワークの重みを学習することにより、次元の圧縮を行う。今回は、種々の条件を試した後、最も分離がよいと思われる条件として、近隣関数として Gaussian 関数を用い、25 X 25の2次元格子点上をもちいる条件を選択した。

5. Ward 法による階層的クラスタ分析

Ward法は他の階層的クラスタ分析法と異なり、単純なクラスタ間距離(最小距離法、最大距離法、群間平均法(UPGMA法))などとなり、クラスタが形成された時の群内平方和の増加量が最も小さいものを先に併合する。例えば、図2のような場合、最小距離法では p_2 と 1 が先にクラスタを形成する場合でも、群内分散が小さな併合クラスタのほうを優先する。従って、非階層的クラスタ分析に比較的近い結果を得ることができる。

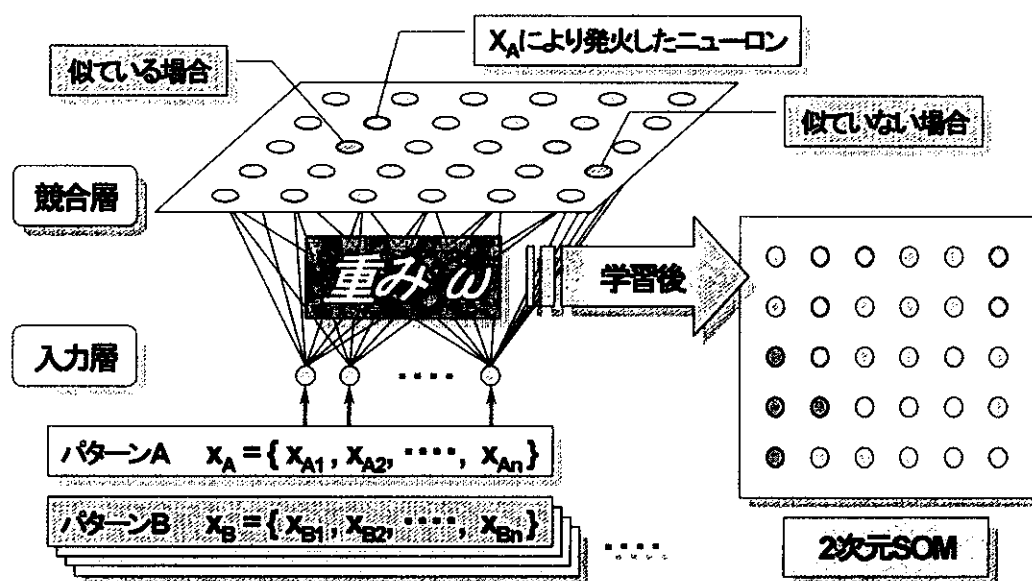
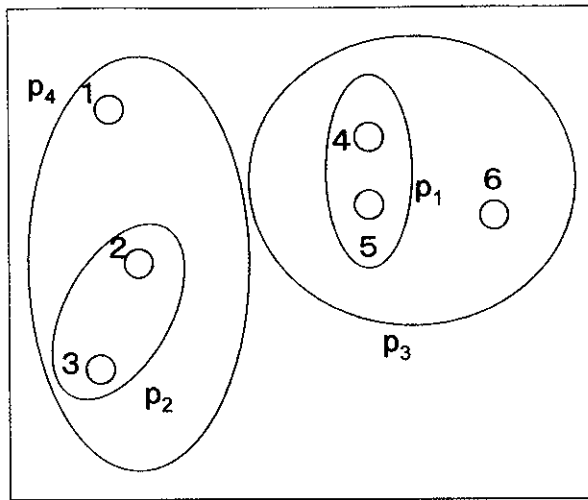


図1 Kohonen 自己組織化ニューラルネットワーク(SOM)のアルゴリズム



併合クラスターをpとすると、
pの郡内分散、

$$V_{ij}^{(p)} = \frac{1}{n_p} \sum_{i>j}^{n_p} (x_i - x_j)^2$$

が最も小さくなるように、
クラスターを併合する。左図
の場合、p₂と1を併合する
より、p₁と6を併合するほう
が、群内分散が小さいので、
先にこちらを併合する。

図2 Ward法によるクラスター分析の概念図

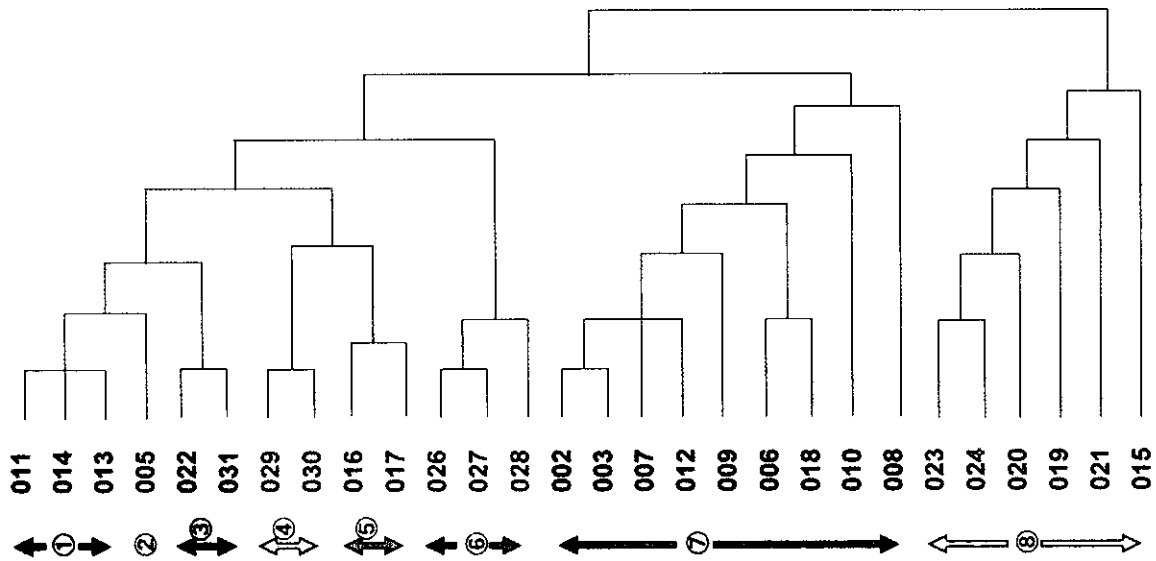


図3 Ward法を用いたクラスター分析による押収覚せい剤のProfiling Analysis

C. 研究結果と考察

1. クラスター分析の結果

Ward法によるクラスター分析の結果を図3に示した。最小距離法などを利用したときのような鎖状効果なども見られず、健全なデンドログラムが得られている。得られたデンドログラムから、今回は図3のように凡そ8個のクラスターに分類した(Ward法では縦軸はあまり意味を持たない)。詳細は他の手法の結果を援用する必要がある。

2. PCAの結果

クラスター分析に利用したデータのうち、No.15(上記クラスター分析で最後に併合されたデータ)に関しては、他のデータと大きく異なるため、これを含めて主成分分析(PCA)を行うと、No.15だけが大きく離れた点にプロットされ、他のデータの差異は隠れてしまう。このため、No.15を除いてPCAを適用した。しかしそれでもPCAでは第3主成分までとっても30%程度の累積寄与率しか示せず、こ

のデータの線形的解析が困難であることを示している(図4、上：第1主成分と第2主成分、下：第2主成分と第3主成分の得点プロット)。事実、

図4ではNo.20,21,23,24の分離が確認できるのみで、その他の情報は得られない。

3. SOMの結果

これに対し、以下、SOMの結果は有益な情報を与えてくれる。図5の各番号は、Ward法によって得られたグループ(図3参照)を示している。すべてが線形分離可能であり、全く異なる方法により同様な分類が行いうるという事実は、この結果の確実性を示しているといえよう。更に、図6には、Naphthalene類を含むサンプル

の点を、ピンク色で囲んだ。この結果によれば、囲まれたサンプルは凸型分離可能であり、長野ら³⁾により考察された合成法からのプロファイリングと、ほぼ一致した結果が得られる可能性が示されている。

E. 結論

1. 今年度は方法論を絞ってPCA、WARD法によるクラスター分析、SOMの3種類の方法により未知データの分類を試みた。
2. PCAは3成分でも40%程度の累積寄与率しか得られず、線形手法の限界を露呈した。

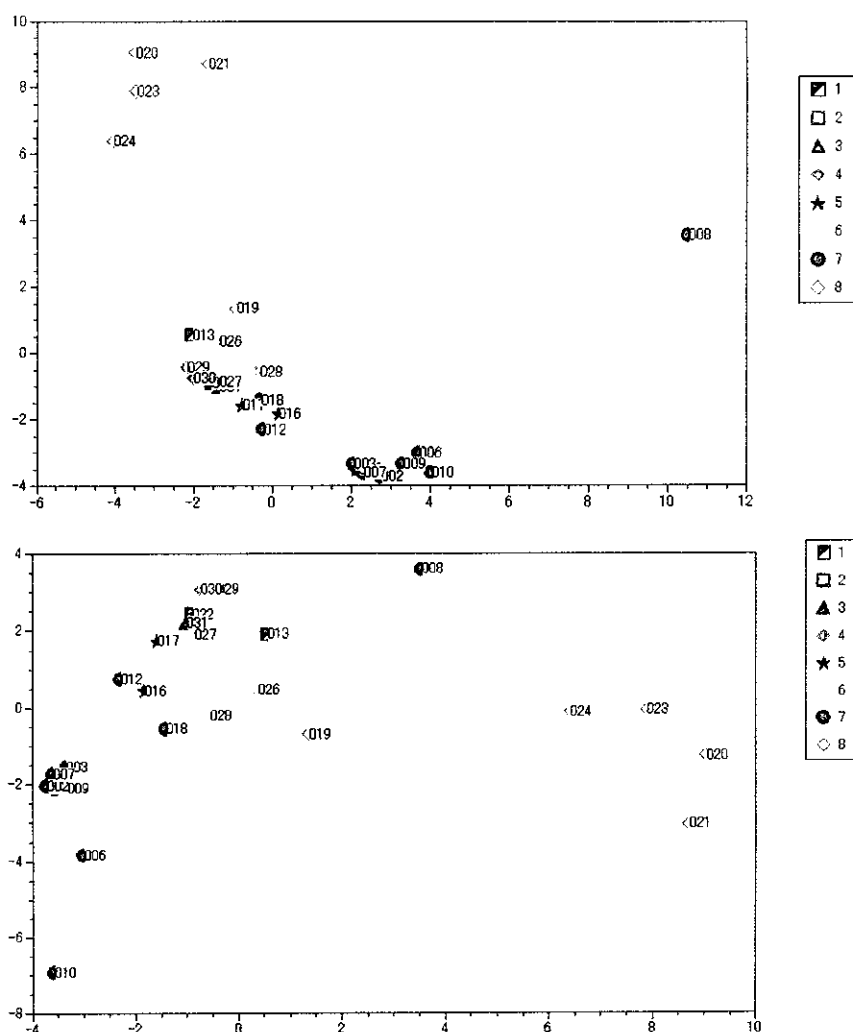


図4 主成分分析による押収覚せい剤の Profiling Analysis

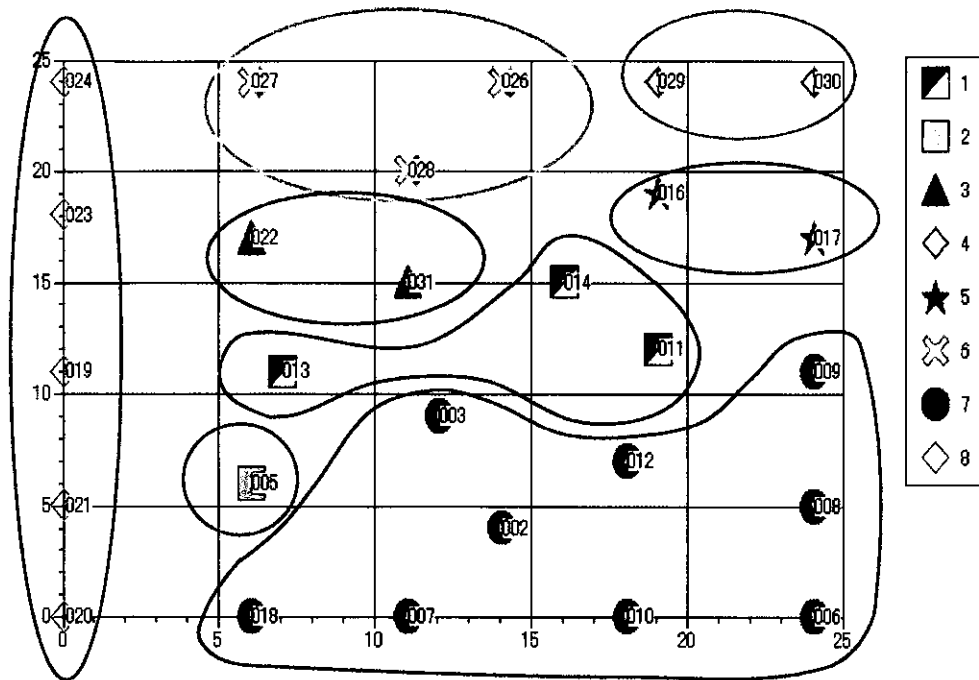


図5 自己組織化ニューラルネットワーク法により得られた押収覚せい剤の Profiling(Ward 法の結果との対比)

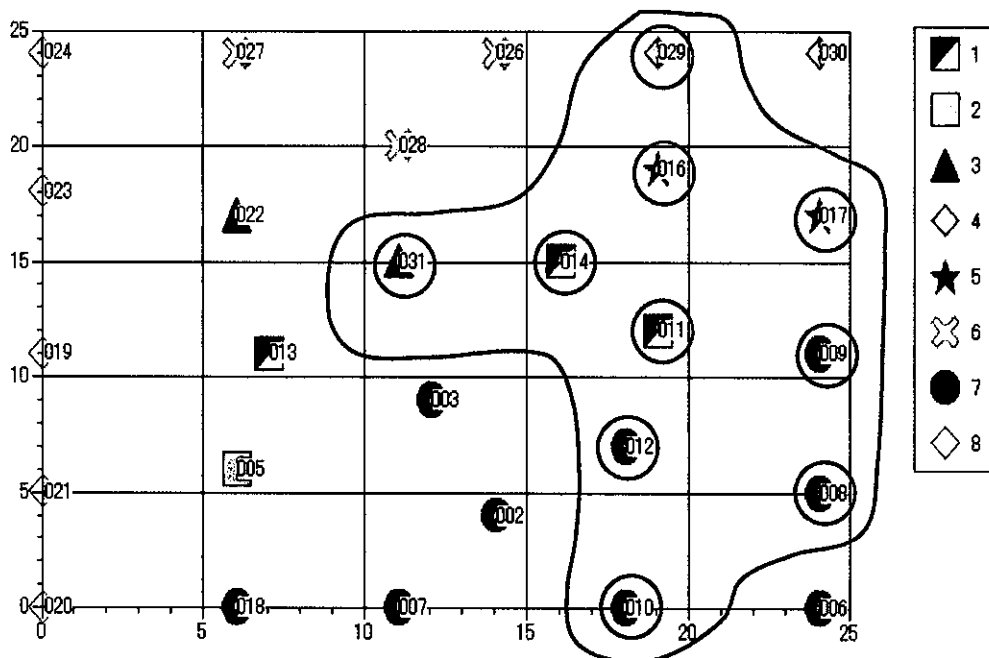


図6 自己組織化ニューラルネットワーク法により得られた押収覚せい剤の Profiling (Naphthalene 類を含むサンプルを強調したもの)

3. WARD 法によるクラスター分析は、比較的首肯できる結果を示した。

4. SOM 法は WARD 法によるクラスター

分析の結果とほぼ類似の結果を示しただけでなく、合成手法からの Profiling の結果を裏付ける結果を示した。このこ

とより、注意深い条件を選択するならば、SOMにより合理的な Profiling ができることが示された。

F. 研究発表

1. 田中優子・岡本晃典・松本朋子・黒川 顕・安永照雄・○高木達也、「Hebbian 学習型ニューラルネットワーク法を用いた非線形主成分分析法の改良と薬学関連分野への応用」第30回構造活性相関シンポジウム、K05、2002年11月(豊橋)。

G. 参考文献

1. Kohonen, T., http://www.cis.hut.fi/research/som_pak/
2. Kohonen, T., http://www.cis.hut.fi/research/lvq_pak/
3. 長野哲雄、平成13年度厚生科学研究経費補助金研究報告書、pp.61-64 (2002).

研究協力報告書

日本で押収された覚せい剤の Profiling Analysis

研究協力者 牧野 由紀子 厚生労働省関東信越厚生局麻薬取締部 鑑定官

研究要旨 本研究は、国連薬物統制計画 (UNDCP) の研究室と協力し、密造された覚せい剤の不純物分析を行い、覚せい剤の密造法及びその合成原料に関する最新の動向を知ることを目的としている。本年度は、平成 11 年末より鑑定囑託された覚せい剤結晶についての光学異性体分析、エフェドリン類の分析、GC/MS による不純物分析等の結果を集計し検討した。その結果、覚せい剤の代表的な 4 合成法(Nagai method、Emde method、Reductive amination、Leuckart method)で密造されたと推定できるものが実際に流通していることが確認された。光学純度も様々で、右旋性のメタンフェタミンが 63%、左旋性のメタンフェタミンが 6%、右旋性と左旋性のメタンフェタミンが混在しているものが 31%であった。

A. 研究目的

本研究は、覚せい剤のもつ化学的特性から流通ルートの解明を目指すものである。本分担研究において、1996 年より UNDCP と協議しながら密造ルート解析に役立つ分析法について検討を続けてきた。これまでの検討で覚せい剤結晶の密造法の推定はある程度可能になっている。本年度は、実際に鑑定囑託された覚せい剤結晶について、のプロファイリング結果を検討し、日本で流通している覚せい剤結晶の密造法の推定を行い、その実態調査を試みた。

B. 研究方法

関東信越厚生局麻薬取締部で押収し鑑定囑託された覚せい剤結晶について、鑑定分析時に不純物分析及び光学異性体分析を実施できた試料のデータを用いた。光学異性体分析についてのデータは平成 11 年度に報告したキラルカラムによる HPLC 法で得たものを用いた。メタンフ

エタミンに微量含まれる原料物質エフェドリン類のデータは平成 12 年度に報告した ODS 系とキラルカラムを併用しての HPLC 法で行ったものを用いた。代表的な覚せい剤の 4 密造法については、平成 10 年度より検討してきたマーカー化合物の確認を GC/MS データを用いて行った。光学異性体分析の結果は 124 試料について、その他のプロファイリング結果は 30 試料についての結果を用いた。更に、税関で平成 9 年に摘発した北朝鮮の港から送られてきた覚せい剤 1 試料についてプロファイリングを行った。いずれのメタンフェタミン試料も融点及び赤外吸収スペクトルの測定による鑑定分析で、純度の高いものであることが確認されているものである。

C. 研究結果

31 の試料についてのプロファイリングデータの集計結果は Table 1 に示すとおりであった。124 試料の光学異性体分

析結果は、右旋性のメタンフェタミンが63%、左旋性のメタンフェタミンが6%、右旋性と左旋性のメタンフェタミンが混在しているものが31%であった。右旋性と左旋性の混在しているもののうち1試料は左旋性の方が多かった。

D. 考察

平成12年度の分担研究で提案した覚せい剤密造ルート識別フローチャート (Fig. 1)を用いて、密造法を推定すると Table 1.に示すようになり、Emde method によると推定されたのは10試料、Nagai method によると推定されたのは5試料、Reductive amination によると推定されたのは7試料、Leuckart method によると推定されたのは8試料であった。北朝鮮の港より送られてきた覚せい剤 (Table 1.中 No.31)は HPLC で *d*-pseudoephedrine と *l*-ephedrine が検出され、麻黄由来の Ephedrine が用いられていることが推定される。更に、Naphthalene 類が検出されず、Aziridine 類と Ephedrine が検出されたことから Emde method により合成されたと推定される。

この結晶の光学異性体分析の結果は純粋な *d*-体のみであった。

エフェドリン類の分析で、30中11試料から、エフェドリンとプソイドエフェドリンが同時に検出された。天然の麻黄由

来のエフェドリンが現在も使用されていることがうかがえる。また、鑑定分析時に多量にある結晶で、採取する場所によって光学異性体比が異なることが稀にある。光学異性体比の結果については、合成法又は合成後の後処理による差のみではなく、添加された可能性もあるので、その見分け方が今後の検討課題である。

E. 結論

覚せい剤のプロファイリング分析に関するこれまでの基礎研究を近年押収された覚せい剤結晶において検証してみたところ、様々な密造法で作られたと推定される覚せい剤が日本で流通していることが確認された。原料も合成エフェドリンのみが使用されているのではないことも推定される。しかし、日本で流通している覚せい剤はすべて密輸入品であり、その仕出し地を推定するには、関係国での密造法についての動向を的確に把握することが必要であると同時に新たな分析法を開発し、プロファイリングの精度を向上させていかなければならない。次年度には、我が国で押収された覚せい剤を対象とした実証的研究を国内外の関係試験機関と協力し発展させる予定である。

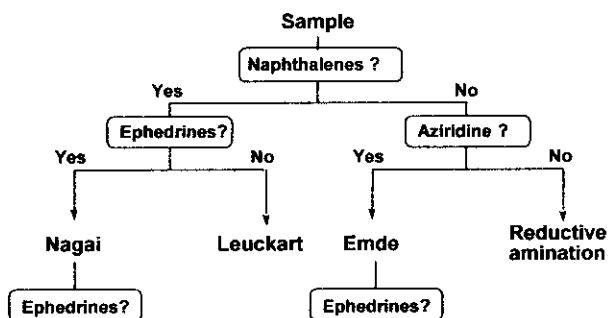


Fig.1 合成ルート識別フローチャート

Table 1. Profiling of methamphetamine crystals seized in Japan

No	<i>d</i> -pseudoephedrine	Eephedrines	Aziridine	Naphthalenes	推定合成法 ^{*1}	推定Precursor ^{*2}
1	無	無	無	無	RD	
2	無	無	無	無	RD	
3	有	有	無	有	Nagai	botanical
4	無	無	無	有	Leu	
5	無	無	無	有	Leu	
6	有	有	有	有	Nagai	botanical
7	無	無	無	有(trace)	Leu	
8	無	無	無	有	Leu	
9	有	有	有	無	Emde	botanical
10	無	無	無	無	RD	
19	有	有	有	無	Emde	botanical
23	無	有	無	有	Nagai	
11	有	有	有	無	Emde	botanical
12	無	有	有	無	Emde	
13	無	無	無	無	RD	
21	無	有	有	無	Emde	
22	無	無	無	有	Leu	
24	有	有	有	無	Emde	botanical
27	有	有	無	有	Nagai	botanical
14	有	有	有	無	Emde	botanical
15	有	有	有	無	Emde	botanical
16	無	無	有	有	Nagai	
17	無	無	無	無	RD	
18	無	無	無	無	RD	
20	有	有	有	無	Emde	botanical
25	無	無	無	有	Leu	
26	無	無	無	無	RD	
28	無	無	無	有	Leu	
29	無	無	無	有	Leu	
30	有	有	有	無	Emde	
31	有	有	有	無	Emde	botanical

*1 RD : Reductive amination、 Leu : Leuckart method、 Emde : Emde method、 Nagai : Nagai method

*2 botanical : ephedrine from an Ephedra plant

分担研究報告書

向精神作用を有する植物の分類と含有成分に関する研究

分担研究者 那須 正夫 大阪大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 向精神作用を有する天然物の乱用が社会問題になっているが、その中で麻薬原料植物として規制される幻覚性キノコ(俗称マジックマッシュルーム)の遺伝子配列を中心とした系統的分類と成分的特性検討を行った。その結果、既知の幻覚性キノコの遺伝子配列のうちRNAのintergenic transcribed spacer配列が分類に適することが判り、11種の幻覚性キノコ標本の遺伝子増幅による塩基配列決定を行った。また、日本で自生若しくは販売の幻覚性キノコ類の分布に関するデータベースを構築し、輸入販売キノコの出産地推定を行った。成分特性については、市場の食用キノコ48検体のLC/MS/MSによる成分微量分析を実施して、含有成分に関する幻覚性キノコとの差違を明らかにし、さらに、幻覚性キノコ特有成分であるシロシピン定量を簡便且つ正確に行えるイオンペア-LC法について検討した。

研究協力者

黒川 顕 大阪大学遺伝情報実験センター 助手

小川倫洋 日本学術振興会 リサーチアソシエイト

横山和正 滋賀大学教育学部 教授

加藤研治 塩野義製薬株式会社医薬研究開発本部 主管研究員

木本 茂 近畿厚生局麻薬取締部 鑑定官

般キノコと規制キノコとを判別するには植物形態学的分類と成分分析とを組み合わせた方法が繁用されているが、より迅速且つ正確な手法として分子生物学的同定法の確立が望まれる。また、我が国ではキノコを採取して食する習慣があり、食用キノコ中の幻覚成分の有無の確認、及び自生幻覚性キノコの分布調査が急務である。本研究は遺伝子を指標とする幻覚性キノコの系統的分類法の確立及び我が国における幻覚性キノコ分布に基づくデータベース作成、食用キノコ中の麻薬成分に関する調査とそれに必要なより精度の高い微量麻薬成分分析法の改良を目的とする。

A. 研究目的

Psilocybin、dimethyltryptamine等のインドール化合物を含有する植物類は催幻覚等の向精神作用があり、国際的に幅広く乱用され、我が国でも一部社会問題となっている。そのうちのマジックマッシュルームと呼ばれるシビレタケ属等の幻覚性キノコはPsilocybinまたはPsilocinを含有するものに限り、昨年6月に麻薬原料植物に指定され乱用物質としての規制対象となった。食用として流通している一

B. 研究方法

1. 遺伝子による幻覚性キノコ分類の最適プライマー領域探索のため、Genbankに公開されている幻覚性キノコのリボソームDNA配列105本を取得し、18S、its-1、

its-2、28S の各部位をソフトウェアで切り出し、CLUSTALW でマルチプライアメントした後、Neighbor-Joining 法で分子系統樹を構築した。

2. 幻覚性キノコのリボソーム its 領域の遺伝子配列を決定するため、幻覚キノコ 15 株を検体として、それぞれゲノム DNA を調製し、リボソーム its-1 及び its-2 の 2 領域を PCR で増幅した。

3. 幻覚性キノコ分布状況を明確にするため、1983 年 Guzmán、1996 年 Gerhardt のデータに滋賀大学横山和正教授が我が国で採取したキノコ標本データを加え、ソフトウェア「Filemaker Pro Ver.4」を用いてデータベースを作成した。

4. 食用として流通している一般キノコ中の psilocybin 及び psilocin 含有の有無を確認するため、農林水産省林野庁を通じ入手した食用キノコ 40 種 48 検体を分析試料として、HPLC で分析した。

5. イオンペアーHPLC による、より精度の高い psilocybin 定量法確立のため、移動相に四級アルキルアンモニウム酢酸塩を添加して検討を行った。得られた最適条件により、国内外で販売されていた幻覚性キノコにこの試験法を適用した。

C. 研究結果及び考察

1. 各種幻覚性キノコのリボソーム DNA 配列に基づいて、intergenic transcribed spacer 1 (its-1)、intergenic transcribed spacer 2(its-2)、28S rDNA(28S) 及び 18S rDNA(18S)の 4 領域につき系統樹を作成した結果、its-1 及び its-2 領域を用いると幻覚性キノコ近縁種間の分解能が他領域より高く、系統的分類に適していることが明らかとなった。また、DNA の PCR 増幅におけるプライマーとしては、its-1

を挟む 18SrDNA 及び 5.8SrDNA、並びに its-2 を挟む 5.8SrDNA 及び 28SrDNA の各保存領域対象のものが適していた。

2. *Panaeolus* 属 2 種 2 検体、*Psilocybe* 属 5 種 8 検体、*Amanita* 属 2 種 3 検体、*Lampteromyces* 属 1 種 2 検体の合計 15 検体につきゲノム DNA のリボソーム its-1 及び its-2 の 2 領域を PCR で増幅し、アガロースゲル電気泳動を行った結果、11 検体において DNA の増幅が確認された。これらについてシーケンス解析を行い、現在のところ、its-1 領域で 6 株、its-2 領域で 11 株の解析が完了し、分子系統樹を作成した。

3. 23 種類のマジックマッシュルーム類を調査したところ、我が国で自生するものが 18 種 (うち幻覚性 13 種)、自生していないものが 5 種であった。自生するものの分布様式は、コスモポリタン種 5 種、固有種 4 種、熱帯・亜熱帯種 3 種・北半球種 3 種、東南アジア・温帯・南アジアとの各共通種 1 種ずつで、日本のキノコの起源は多様である。自生しない種は、*Psilocybe tampanensis*、*Psilocybe cubensis*、*Psilocybe subcubensis*、*Psilocybe semilanceata*、*Psilocybe caerulescens* であるが、これらは海外から持ち込まれたものと思われる。

4. 日本各地から送付された食用キノコ 48 検体 (天然採取及び培養) について、LC/MS/MS による psilocybin、psilocin の微量分析を行ったところ、すべての検体からこれらの麻薬成分が検出されなかった (検出限界 0.1ng/29mg 乾燥キノコ重量)。

5. Psilocybin は逆相 HPLC 法による定量試験では溶出が早く、キノコの常在成分との分離が不十分で定量値が影響を受け