

ただし、*Psilocybe fasciata* の配列については、一部の遺伝子領域の増幅が困難であり、この種について決定できた配列は4,200 bp 程度であった。これらキノコの分子系統樹を図に示した。

D. 結論

今回のシーケンス解析により、従来明らかでなかった遺伝子領域約3700 bp を新たに決定することができた。*Psilocybe fasciata* については一部領域につき配列を決定できなかったが、これはサンプルが古くDNA の剪断が起こっているためと考えられる。なお、今回決定した遺伝子領域は18S、25Sのほぼ全領域、およびintergenic transcribed spacer、5S の全領域であり、そのうち本研究で新しく決定できたのは18S 全領域、および25S の後半部領域である。これら領域については現在のところデータが非常に少ないためキノコの分子系統学的分類にはまだ利用できる段階ではない。しかし、近い将来にこれら部位の配列の情報も蓄積されることにより、現状よりも詳細に幻覚性キノコの分類、同定を行えるようになるものと期待できる。

E. 参考文献

1. Moncalvo, J. M., et al., One hundred and seventeen clades of euagarics. *Mol. Phylogenet. Evol.* **23** 357-400 (2002).
2. Maruyama, T., et al., Phylogenetic relationship of psychoactive fungi based on the rRNA gene for a large subunit and their identification using the TaqMan assay. *Chem. Pharm. Bull.* **51** 710-714 (2003).

研究協力報告書

N,N-ジメチルトリプタミンを含有する植物の分析

研究協力者 木本 茂 厚生労働省近畿厚生局麻薬取締部 鑑定官

研究要旨 主に南米アマゾン川流域で因習的に用いられるアヤワスカ(*ayahuasca*)と呼ばれる幻覚性植物は麻薬である N,N-ジメチルトリプタミン(DMT)と MAO 阻害剤との相乗効果を利用したもので、我が国でもインターネットを介して盛んに販売され、乱用されている。本年度薬物関連事件で押収されたアヤワスカの原料植物であるチャクルーナ(*Psychotria viridis*)、チャクロバンガ(*Diplopterys cabrerana*)及びハルマラ(*Peganum harmala*)を液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)により分析した結果、DMT がチャクルーナ及びチャクロバンガの各乾燥葉中にそれぞれ 0.025%及び 0.026%含有されており、ハルマラ種子中には MAO 阻害剤であるハルマリン及びハルミンがそれぞれ 2.1%及び 1.5%含まれていた

A. 研究目的

ジメチルトリプタミン(DMT)は LSD やメスカリンと同様に、眩暈・散瞳・血圧上昇などの身体作用をもたらし、幻視等の精神作用も併せ持つ。これは南米の *Anandeanthera peregrine* (マメ科)、*Psychotria viridis*(アカネ科)、*Mimosa hostilis*(マメ科)など多くの植物に含まれ、原住民らが因習的に幻覚飲料として用いている¹⁾。我が国では、DMT を麻薬に指定し、厳しく取り締まっているが、これを含有する植物は規制対象外である。このため、インターネット上でこれら DMT 含有植物が大々的に販売され、乱用が増加して健康被害が危惧されている。DMT は筋肉注射及び吸煙で精神作用があるが、経口摂取では消化管で分解するため、効果がないとされている。よって、DMT 含有植物単独では用いずにその分解を抑える MAO 阻害剤とともに飲食するのが一般的である(これをアヤワスカ

と称する)^{2,4)}。

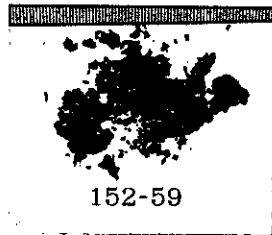
自然界に存在する MAO 阻害剤としては、*Banisteriopsis caapi* や *Peganum harmala* 等の植物中に含まれるハルミン及びハルマリンがあり^{1,3)}、これらの植物も DMT 含有植物とともに販売されている。

DMT 類縁体である麻薬サイロシビン及びサイロシンを含有する幻覚性キノコも、以前は植物体が規制されていなかったが、その乱用拡大の結果、平成 14 年 6 月に麻薬原料植物に指定され、規制対象になった。DMT 含有植物も今後の乱用状況次第で何らかの規制が行われる可能性がある。本研究は植物中の DMT、ハルミン等幻覚成分分析方法を検討し、アヤワスカの成分組成を明らかにすることを目的とする。

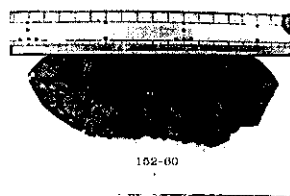
B. 研究方法

1. 実験試料

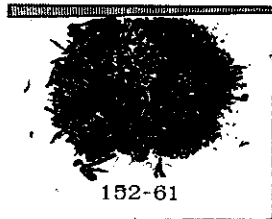
本年、近畿厚生局麻薬取締部が大麻取締法違反で摘発した被疑者がアヤワスカとして持っていた植物葉4種(写真1~4)と植物種子1種(写真5)を試料とした。



No.1 植物名不明



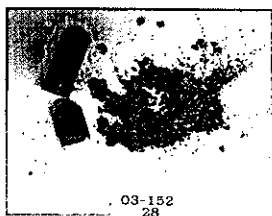
No.2 チャクロハンカ



No.3 植物名不明



No.4 チャクルナ



No.5 植物種子(粉碎)

2. 試薬

メタノール、アセトニトリルは和光純薬製のHPLC級、酢酸アンモニウム、ハルミン、ハルマリンは和光純薬製の特級を購入した。DMTは研究用麻薬を用いた。

3. 装置及び分析条件

① HPLC 島津製作所製 SCL-10A

カラム Zorbax Extend C18

4.6×250mm, 5μm

移動相 10mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH8)/アセトニトリル(70/30)

恒温槽温度 40℃

検出器 紫外可視分光光度計(279nm)

② GC/MS 日本電子製 GCmate II

カラム HP-5(0.32mmx 0.25μm x 30m)

オープン 初期温度 60℃(10min. hold)

昇温速度 5℃/min.

最終温度 280℃(10min. hold)

注入口温度 250℃(split)

キャリアーガス He 1ml/min.(定流量)

イオン化エネルギー 70eV

4. 試料の前処理

各植物試料を乾燥させ、乳鉢内で均一に粉碎細末化した。試料 No.1 176mg、No.2 1,038mg、No.3 1,120mg、No.4 584mg、No.5 452mg をそれぞれ共栓付三角フラスコに入れ、メタノール 15ml を加えた。これを密栓して 2 時間超音波処理(28kHz)し、1 晩静置した。ろ過後、ろ液を 20ml にメスアップし、試料液とした。各試料の試料液濃度は、No.1 8.8mg/ml、No.2 51.9mg/ml、No.3 56.0mg/ml、No.4 29.2mg/ml、No.5 22.6mg/ml である。

C. 結果及び考察

1. HPLC による幻覚成分一斉分析

前記条件により DMT、ハルマリン及びハルミンの各標準品メタノール溶液を HPLC に注入したところ、図 1 のとおり、各成分の良好な分離が得られ、保持時間は、DMT 7.6 分、ハルマリン 8.2 分、ハルミン 22.8 分であった。

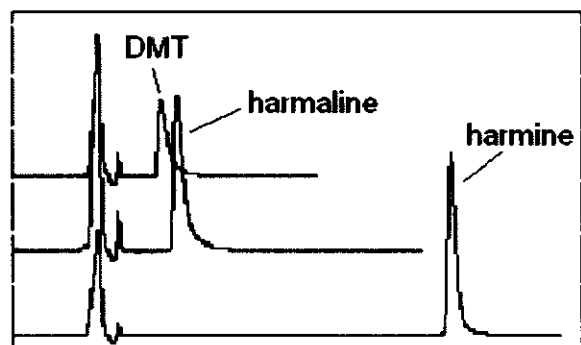


図 1. 各標準品の HPLC クロマトグラム

2. 検量線の作製

DMT 標準品のメタノール溶液を 40、20、10、5 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度に調製し、研究方法の項に示した分析条件でそれぞれ HPLC に 10 μL 注入した。その結果、5 $\mu\text{g/ml}$ まで良好な直線性を示した ($R^2=0.9994$)。また、ハルマリン及びハルミン標準品の各メタノール溶液を 100、50、20、10、5 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度に調製し同様に分析したところ、DMT と同じく 5 $\mu\text{g/ml}$ まで良好な直線性を示した(ハルマリン $R^2=0.9996$ 、ハルミン $R^2=0.999$)。

3. 植物試料中の幻覚成分定量

前記 5 種類の植物(植物名記載のものは所有者の供述による)について HPLC により DMT、ハルマリン及びハルミンの一斉定量を行った。その結果は表 1 のとおりである。

| 成分名 検体名 | DMT | ハルマリン | ハルミン |
|--------------|-------|-------|------|
| No.1 不明植物 | N.D. | N.D. | N.D. |
| No.2 チャクロバンガ | 0.026 | N.D. | N.D. |
| No.3 不明植物 | 0.020 | N.D. | N.D. |
| No.4 チャクルーナ | 0.025 | N.D. | N.D. |
| No.5 ハルマラ | N.D. | 1.50 | 2.10 |

表 1. 各種植物の定量結果
(単位は乾燥重量%、N.D.は検出せず)

No.2、No.3 及び No.4 の植物にはほぼ同程度の DMT が含まれ、No.5 にはハルマリンとハルミンがかなり高濃度含有されていた。また、No.1 にはこれら 3 化合物はいずれも含有されておらず、アヤワスカとは関係のない植物と思われる。押収植物全体の DMT 含有量をこの定量値

から計算すると、No.2 チャクロバンガが 1.77mg、No.4 チャクルーナが 1.6mg であり、DMT の幻覚発現量とされている 50-60mg から考えれば、かなり少量である。(幻覚を得るのに約 200g の乾燥植物を摂取しなければならない)

DMT の安定性や本定量法における抽出効率等に関しては検討しておらず、今後の課題である。

No.2(チャクロバンガ葉片)と No.5(ハルマラ種子)の HPLC クロマトグラムを図 2 に示す。

4. ガスクロマトグラフィー質量分析による成分確認

各植物の試料液についてガスクロマトグラフィー質量分析を行い、質量スペクトルによる含有成分の確認を行った。その結果、No.2、No.3 及び No.4 に DMT、また、No.5 にハルマリン及びハルミンが含有されていることを確認した。No.2(チャクロバンガ)及び No.4(チャクルーナ)のトータルイオンクロマトグラムを図 3 に、その他の植物試料のトータルイオンクロマトグラムを図 4 に示す。

チャクロバンガとチャクルーナのクロマトグラム・ピークパターンには差違が

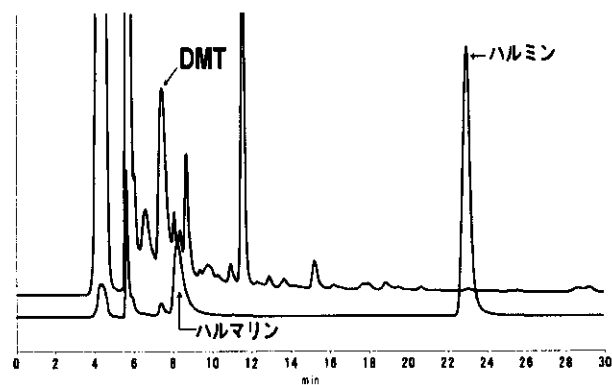


図 2. No.2(チャクロバンガ、上段)と No.5(ハルマラ種子、下段)の HPLC クロマトグラム

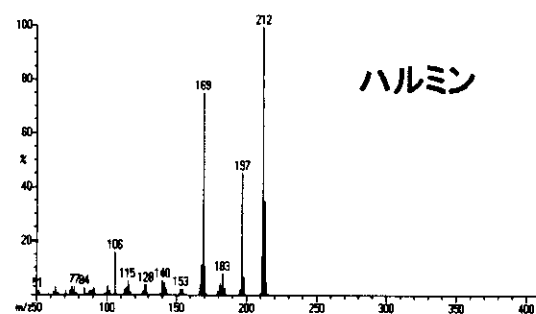
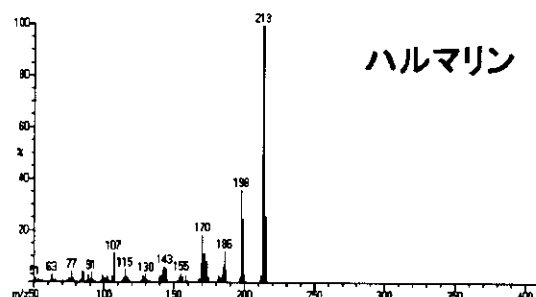
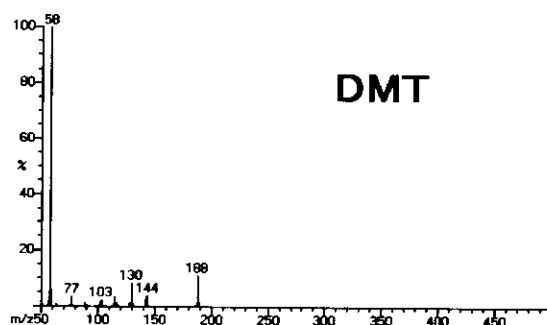
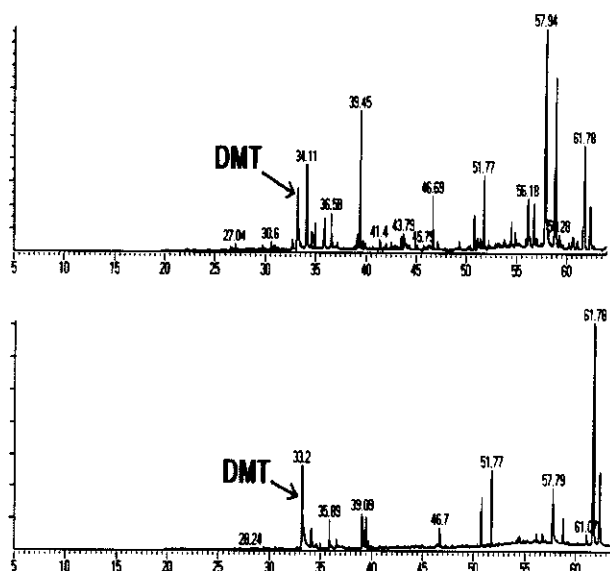


図5 チャクロバンガ(上段)及びチャクルーナ(下段)のGC/MSによるTIC

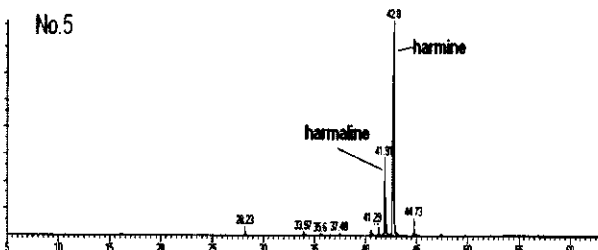
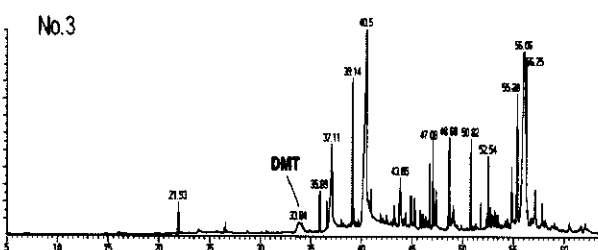
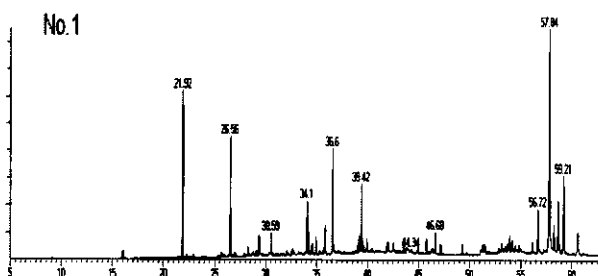


図5. 各幻覚成分の質量スペクトル

ーンを示したので、これらとは別の種類の植物と思われる。

チャクロバンガ(No.2)、チャクルーナ(No.4)及びNo.3から得られたDMT、並びにNo.5(ハルマラ)から得られたハルマリン及びハルミンの質量スペクトルは図5のとおりである。

図6 No.1、No.3、No.5のTIC

あり、この二つの植物種は異なることが示された。またもう一種のDMTを含む植物であるNo.3は、これら二つのものとはまた違うクロマトグラム・パタ

D. 結論

麻薬として規制されるN,N-ジメチルトリプタミン(DMT)を含有する植物(アヤワスカ)が我が国でも脱法ドラッグとして売買されており、そのうちのチャクロバンガ、チャクルーナについてDMT含有率を求めたところ、0.025

～0.026%であった。この値が乱用DMT植物の一般的な成分的特徴を代表するものであるかどうかは、植物中のDMTの安定性や、植物前処理方法の検討を詳細に行ったうえで、さらに多くの試料で分析データを集積し、考察する必要がある。なお、アヤワスカの原料として必要なMAO阻害剤については、今回の分析の結果、カプセル入りの種子(試料No.5)からハルマリン(2.10%)及びハルミン(1.56%)を検出したので、これがMAO阻害剤として、DMT含有植物と共に摂取されている可能性が高い。

E. 参考文献

1. 植木昭和、西岡五夫 *医学の歩み*, 112,904-909 (1980).
2. R.D.Blackledge, C.M.Taylor *Microgram J.*,1,18-22 (2003).
3. A. Hoffer, H. Osmond, THE HALL UCINOGENS Academic Press, 472-480 (1967).
4. J.F.Casale, J.E.Koles, *Microgram*,28, 296-299 (1995).

分担研究報告書

現場における簡易かつ精度の高い薬物試験に関する研究

分担研究者 山田英之 九州大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨 不正流通薬物の簡便、特異的分析方法の構築を目指して、 γ -hydroxybutyric acid (GHB)、psilocin、cocaine および fenfluramine (Fen) 分析法に関する検討を行い、以下の成果を納めた。

- 1) GHB のケイ光誘導体化について、dansyl chloride(DNC)およびカルボン酸誘導体化剤である 3-bromomethyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-1,2-dihydroquinoxaline-2-one (Br-DMEQ)による反応を検討した。その結果、GHB の酸処理によって生成する γ -butyrolactone は、hydrazone としたのち、DNC と反応させることによってケイ光体に変換できることが確認された。GHB と Br-DMEQ との反応では、18-crown-6 およびカリウム塩の存在下に反応を行うことにより、ケイ光誘導体化物が生成されることが確認された。カリウム塩として K_2CO_3 および KCl を用いた場合には反応状況が異なり、前者では複数のカルボン酸化合物が誘導体化されるのに対し、後者では GHB のみしか反応しなかった。従って、KCl 存在下での Br-DMEQ による反応は、GHB の簡便、特異的な分析方法となる可能性が示唆された。
- 2) 幻覚性キノコ中の幻覚成分である psilocin を認識するモノクローナル抗体を作製し、免疫学的測定法の確立を試みた。その結果、psilocin の3位のジメチルアミノエチル側鎖を認識するモノクローナル抗体を得ることができ、さらに psilocin を識別可能なイムノクロマトグラフィー法の確立に成功した。
- 3) 磁性ラテックスを用いる凝集阻止反応試験法(latex agglutination inhibition reaction test: LAIRT)の cocaine のスクリーニング法への応用について検討した。その結果、低濃度 cocaine (5 あるいは 25 ng/ml)の存在下にハプテン化抗原・抗体凝集阻止が目視され、本法の有用性が確認された。
- 4) 痩身用健康食品に違法に含まれる未承認医薬品の Fen および *N*-nitrosofenfluramine (*N*-Fen) の分析方法開発とその有用性評価のため、Fen およびその主要代謝物である ノルフェンフルラミン (Norf) を対象とする毛髪分析を検討した。分析には、ラベル化試薬として、4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)-benzoyl chloride(DIB-Cl)を用いる HPLC-ケイ光定量法を用いた。Fen あるいは *N*-Fen を単回投与後のラット体毛から Fen および Norf が検出され、黒毛と白毛の間でそれぞれの濃度に大きな相違は見られなかった。*N*-Fen の摂取被疑者毛髪からも Fen および Norf が検出され、セグメント分析の結果、約1年間にわたる摂取の経過を推定することができた。これらのことから、DIB-Cl を用いる分析方法の有用性が確認された。

研究協力者

吉田 武美 昭和大学薬学部 教授
北條 博史 昭和薬科大学 教授
中島 憲一郎 長崎大学大学院
医歯薬学総合研究科 教授

A. 研究の目的

薬物乱用の多様化に対応するために、薬物検査の簡便性や特異性の向上を実現することは重要な課題である。本研究では、新興薬物を中心に不正流通薬物の分析方法を構築する目的で、 γ -hydroxybutyric acid (GHB)、psilocin、cocaine および fenfluramine (Fen) 分析法に関する検討を行った。

B. 研究の方法

1. GHB 分析に関する検討

γ -Butyrolactone (GBL) hydrazone 水溶液に DNC 試薬を加えて反応させたのち、反応液を直接薄層クロマトグラフィー (TLC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) あるいは HPLC-マススペクトル (LC-MS) により分析した。また、GHB を 18-crown-6、Br-DMEQ 及びカリウム塩 (K_2CO_3 ないし KCl、未溶解) と共に acetonitrile 1ml 中で加熱後、反応液を TLC 及び LC-MS に付して分析を行った。

2. Psilocin 簡便分析法に関する検討

Psilocin のカルボン酸誘導體 (PSI-COOH) を合成し、キャリアタンパク質である keyhole limpet hemocyanin (KLH) または bovine serum albumin (BSA) に結合させた。これを抗原として、抗 psilocin 抗体を産生するハイブリドーマ細胞 PSI CA231 株を樹立した。本細胞が生産する psilocin 抗体および PSI-COOH 結合 BSA を固相化したプレートを用い

て ELISA を行い、薬物に対する特異性を検定した。また、ニトロセルロース膜の第 1 捕捉帯部位に PSI-COOH 結合 BSA を、また第 2 捕捉帯部位に抗マウス IgG ヤギ抗体をそれぞれ塗布し、これをトレーに装着したものを作成した。薬物含有試料と psilocin 抗体が吸着した金コロイドを反応させたのち、これを上記のトレーに注入し、2つの捕捉帯に結合する金コロイドの量を目視観察することにより、psilocin の有無を判定した。

3. Cocaine のラテックス凝集阻止反応試験法 (LAIRT) に関する検討

磁性ラテックスに結合させた抗 cocaine 抗体 [抗 benzoylecgonine (BE)-BSA 抗体] とラテックス結合抗原を cocaine 含有試料の存在下および非存在下に反応させ、抗原・抗体反応に基づく凝集像の程度を観察した。凝集の透過率による評価では、試料溶液と磁性ラテックス結合抗体を反応させ、マグネットでラテックス粒子を回収濃縮した。これに、ハプテン化抗原を反応させたのち、反応上清の透過率を測定することにより薬物依存的な凝集阻止の定量性を検討した。

4. Fen の分析方法に関する検討

Zucker および Wistar ラットに Fen (5 mg/kg) および N-Fen (25 mg/kg) を単回投与後、体毛を採取した。ヒト毛髪及びラット体毛は 0.1% SDS、水で洗浄し、乾燥して使用した。毛髪中の薬物をメタノールで抽出し、これを DIB-Cl により誘導體化後、ケイ光 HPLC を用いて分析した。

C. 結果

1. GHB のケイ光誘導體化

GHB は分子内縮合によって GBL に変換しやすいことから、GHB 簡便分析

方法構築のための前段階として、GBL のケイ光誘導体化の検討を行った。GBL を一旦 hydrazone 誘導体に変換後、導入されたアミノ基を dansyl chloride と反応させる方法を検討した結果、GBL hydrazone は DNC 誘導体化によりケイ光体に変換し得ることが示唆された。

K₂CO₃ 存在下に Br-DMEQ による誘導体化を行った反応液を直接 TLC に付した結果、myristic acid ないし GHB を加えて反応を行った場合には、対照には認められないスポットが検出され、これらのカルボン酸は Br-DMEQ との反応によって、ケイ光誘導体化物に変換されることが示唆された。一方、Br-DMEQ との反応を KCl 存在下に行った場合には、GHB のみが生成物スポットを与え、他の 3 種のカルボン酸(propionic acid、myristic acid および stearic acid)では誘導体化物が検出できなかった。これらの結果より、GHB はカリウム塩および 18-crown-6 の存在下に Br-DMEQ によってケイ光誘導体化物に変換されることが明らかとなった。

2. Psilocin 検出キットの構築

抗 psilocin 抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を樹立し、ELISA 法により抗体の特性を検定した結果、psilocin および dimethyltryptamine でのみ抗体に対する反応性が認められ、4-hydroxyindole、tryptamine および tryptan では反応性は認められなかった。抗 psilocin 抗体を用いたイムノクロマトグラフィー法の確立を目指して、ニトロセルロース膜の異なる領域に PSI-COOH 結合 BSA と抗マウス IgG ヤギ抗体を結合させ、これを装着したトレーを作成した。抗 psilocin 抗体を吸着させた金コロイドを試験溶液と反

応させたのち、これを上記のトレーに注入した結果、psilocin および dimethyltryptamine を用いた場合には 10 分以内に第 1 及び第 2 捕捉帯に金コロイドが吸着し、その他の化合物では第 1 捕捉帯にのみ金コロイドが吸着した。これらのことから明らかなように、本研究により psilocin スクリーニングに使用できる簡便分析法を作成することに成功した。

3. LAIRT 法による cocaine のスクリーニング

用いた抗 cocaine (BE) 抗体の抗体価を ELISA 法にて確認した結果、cocaine 8 pg ~ 25 ng/well を検出でき、高感度に測定できることが確認された。次に、磁性ラテックス結合抗体とラテックス抗原との結合による凝集塊の生成に及ぼす薬物の添加効果を観察した。その結果、cocaine 最終濃度 0 ~ 25 ng/ml の条件で経時的に凝集像の観察をした場合、反応 5 分後には cocaine 非添加および 0.05 ng/ml の添加濃度でラテックス粒子が結合した凝集塊が認められた。反応時間の経過に伴い、反応 10 分後には 0.5 および 2.5 ng/mL にも凝集像が認められたが、5 および 25 ng/mL の用量では凝集像は認められず、cocaine の用量依存的に凝集阻害が生じることが確認できた。従って、本法は cocaine のスクリーニングに適用可能であることが確認された。しかし、反応上清の透過率を測定した結果、cocaine の添加濃度依存的な変化は認められず、定量的 LAIRT 法を確立するまでには至らなかった。

4. 毛髪中 Fen および Norf のケイ光-HPLC による分析

毛髪中の Fen および Norf の HPLC-蛍光法について検討した結果、これらの 2

種を他の毛髪成分ピークから十分に分離することができた。検量線を作成した結果、ヒトでは 36 pg/mg-144 ng/mg (Fen) および 16 pg/mg-127 ng/mg (Norf)、ラットでは 50 pg/mg -144 ng/mg (Fen) および 30 pg/mg-127 ng/mg (Norf) の濃度範囲で良好な直線関係が得られた($r>0.999$)。ヒト毛髪の添加試料の検出下限は $S/N=3$ の場合、Fen および Norf でそれぞれ 36 pg/mg および 16 pg/mg であった。また、ラットでは 50 pg/mg および 30 pg/mg となり、いずれの試料でも高感度に検出することができた。

N-Fen が含まれる痩身用健康食品を摂取したことが疑われている 6 名の人の毛髪試料を分析した結果、Fen および Norf はそれぞれ 43-1389 pg/mg および 18-680 pg/mg であった。3 例 (Case I, II, III) についてフラグメント分析を行った結果、使用暦が推定できる結果も得られた。

Fen (5mg/kg) あるいは N-Fen (10, 25 mg/kg) をそれぞれ単回投与した場合、Zucker ラットの黒毛および白毛のいずれからも Fen および Norf が検出された。また、Fen および N-Fen を連続投与した場合、白毛と黒毛間にそれらの濃度に差は見られなかった。

D. 考 察

GBL はこれを一旦 hydrazone 誘導体にしたのち、更に DNC で誘導体化することにより、TLC や HPLC にて高感度に検出できる物質に変換できることを明らかにすることができた。ただし、GBL hydrazone 生成に用いる hydrazine が最終の DNC 反応を妨害することから、本法を実用に供するには、GBL hydrazone の生成ののち、反応液中の hydrazine を除

去する必要がある。一方、GHB は Br-DMEQ によってケイ光体に変換されることが確認された。本誘導体化には、層間移動触媒である 18-crown-6 と共にカリウム塩が必要である。これに関し、 K_2CO_3 と KCl の違いによって反応状況が大きく変化するという興味ある結果を得た。KCl 存在下での反応は GHB に特異的な検出手段になる可能性が期待された。

Psilocin のイムノスクリーニングによる検討から、今回調製したモノクローナル抗体はインドール骨格には反応せず、インドール骨格 3 位のジメチルアミノエチル基を含めた分子構造を認識するため、psilocin を含むきのこの識別に有用な抗体であることが示唆された。今回の研究ではさらに迅速な psilocin 測定法として、この抗体を利用したイムノクロマトグラフィ法を構築した。このイムノクロマトグラフィ法では第 2 捕捉帯の金コロイドバンドの出現により psilocin の存在を推定することが可能であった。また、予備的な実験ではマジックマッシュルームも識別可能であった。今後、多くのキノコに適用し、その正確性や精度について詳細に検討することが必要と思われる。

Cocaine の LAIRT 法による分析に関しては、過去の凝集板での感度は 0.1 mg/ml であったのに対し、今回は 0.5 ng/ml まで検出可能となり、検出感度を大きく改善することができた。しかし、定量的なスクリーニング法の開発を目的として、透過率の測定を行った結果、cocaine の添加濃度依存的な変化は認められず、定量的 LAIRT 法を確立するには至らなかった。この理由としては、反応時間や cocaine 添加濃度の不適切さなどが考えられた。今後、これらの条件を検

討することにより、改善できるものと思われる。定量的 LAIRT 法では 96 穴のマイクロタイタープレートを用いて一度に多数の検体を処理できること、また測定に要する時間が GC/MS などと比較して極端に短縮できるという利点があることから、高感度の cocaine 検出に向けた改良が望まれる。

DIB-Cl 誘導体化による分析により、Fen および N-Fen を投与したラットの体毛から、Fen およびその代謝物である Norf が検出され、これらのいずれの薬物からも Norf が生成することが明らかとなった。黒毛と白毛が混在する Zucker ラットを用いて検討した結果、体毛中の色素(メラニン)の有無に関係なく Fen と Norf が同レベルで検出された。また、N-Fen 摂取が疑われる同一被疑者の黒髪と白髪中で、ラットと同様に色素と濃度に関係なく検出されたことから、両化合物はメラニンが関係しない機構で毛髪に取り込まれる可能性が示唆された。類似の構造を有する methamphetamine や amphetamine はメラニンに依存する取り込みが主であると考えられており、Fen および Norf は対照的な結果を示した。開発した毛髪分析法は非常に高感度であり、微量の Fen を十分追跡できると思われる。

E. 結 論

GBL hydrazone は DNC によって、ケイ光誘導体化物に変換できることが明らかになった。従って、GHB の GBL への変換と hydrazine 処理による GBL hydrazone 生成を組み合わせた方法によって、GHB の高感度化分析が可能となることが期待された。また、GHB は

18-crown-6 およびカリウム塩の存在下、Br-DMEQ によってケイ光誘導体化物に変換できることが明らかとなった。KCl を用いる反応は、GHB に特異的な簡便法として有用である可能性が示唆された。

抗 psilocin モノクローナル抗体を用いた psilocin の簡便分析方法構築と、そのキット化を実現した。本キットは psilocin と dimethyltryptamine のみに反応性を示し、他の類似薬物には反応しないことから十分実用に供し得るものと考えられた。

磁性ラテックスを用いる LAIRT 凝集阻止反応試験法による cocaine のスクリーニング法について検討した。その結果、低濃度 cocaine の存在下にハプテン化抗原・抗体凝集阻止が目視され、本法の有用性が確認された。

Fen および N-Fen の使用歴を解明する手段として、毛髪中の Fen および Norf をマーカーとする DIB-Cl 誘導体化に基づく分析が有用であることを明らかにすることができた。また、本研究ではメラニンを介さない毛髪への薬物移行機構の存在を示唆することができた。

分担研究報告書

γ -Hydroxybutyric acid のケイ光誘導体化に基づく簡易分析法

分担研究者 山田英之 九州大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨 γ -Hydroxybutyric acid (GHB)の簡易分析法構築を目的として、本薬物のケイ光誘導体化について検討を行った。ケイ光誘導体化は、dansyl chloride(DNC)およびカルボン酸誘導体化剤である 3-bromomethyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one(Br-DMEQ)による反応を検討した。GHB の酸処理によって生成する γ -butyrolactone は、hydrazone としたのち、DNC と反応させることによってケイ光体に変換できることが確認された。GHB と Br-DMEQ との反応では、18-crown-6 およびカリウム塩の存在下に反応を行うことにより、ケイ光誘導体化物が生成されることが確認された。反応生成物の構造はマススペクトルによって確認した。カリウム塩として K_2CO_3 および KCl を用いた場合には反応状況が異なり、前者では複数のカルボン酸化合物が誘導体化されるのに対し、後者では GHB のみしか反応しなかった。従って、KCl 存在下での Br-DMEQ による反応は、GHB の簡便、特異的な分析方法となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

γ -Hydroxybutyric acid (GHB) は神経伝達物質である γ -aminobutyric acid の代謝物として生産される常在性物質である一方¹⁾、米国を中心として乱用薬物としての使用が増加しつつある。例えば、成長ホルモンの分泌促進を目的としてボディビルダーの間で流行し、「デートレイブドラッグ」としてレイブ目的などの犯罪に悪用される事例が多く報告されている²⁾。死亡例を含む GHB の健康被害が多数報告されたため、米国食品医薬品局(FDA)は 1990 年に製造販売を禁止し、我が国においても 2001 年 11 月より麻薬として規制されるようになっていく。乱用薬物として歴史が浅いこともあって、GHB の鑑定法や尿中または血液中からの分析法についての報告は少なく、その

ほとんどがガスクロマトグラフィー-マススペクトル(GC/MS)を用いる方法である³⁾。すなわち、尿中または血液中の GHB を 6N HCl 存在下で加熱処理したのち、分子内のカルボキシル基と水酸基の分子内エステル化反応によって生成する揮発性 γ -butyrolactone(GBL)をヘッドスペース法による GC/MS で分析するという方法である(Fig. 1 参照)。しかし、簡便で、特異性と再現性が高く、高感度な GHB の簡易分析法は報告されておらず、GHB の乱用増加が予想される状況下、そのような分析法を開発することは重要な課題であると考えられる。

本研究では、GHB の簡易分析法として、GHB の蛍光誘導体化とその分析方法の検討を行った。蛍光誘導体化試薬として dansyl chloride(DNC)及び 3-bromo-

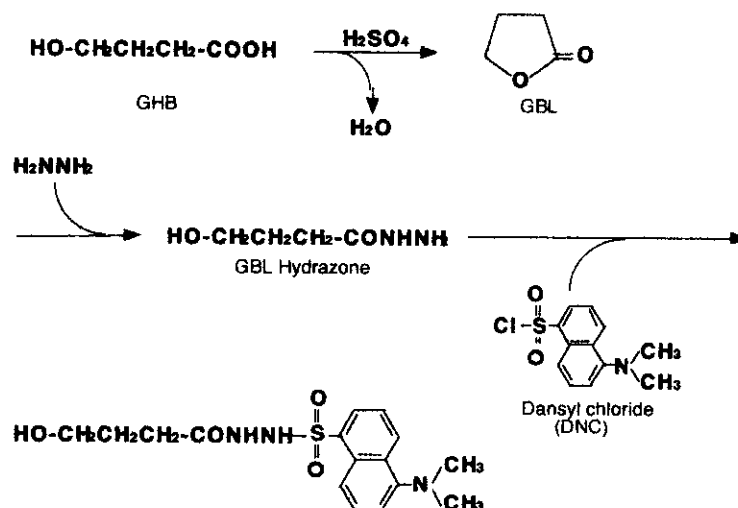


Fig. 1. Derivatization of GHB to fluorescent by hydrazine and dansyl chloride

methyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-1,2-dihydro quino-xaline-2-one(Br-DMEQ)を用いた分析方法について検討を行った。

B. 方法

1. GBL hydrazone の合成

GBL 1 g の ethanol 溶液にモル比として 4 倍過剰の hydrazine hydrate を加え、90 °C で 60 分撹拌した。冷後析出した結晶を吸引ろ取し、真空乾燥した。得られた結晶の electron-impact マススペクトルを測定した結果、m/z 119 に GBL hydrazone の分子量 +1 の分子イオンピークが検出された。また、m/z 101 には分子イオンから H₂O が離脱した質量に相当するフラグメントイオン、さらに m/z 87 には分子イオンから H₂NNH₂ が離脱した質量に相当するフラグメントイオンが検出された。このスペクトルデータより、得られた結晶は GBL hydrazone であることが確認された。

2. GBL hydrazone の DNC による誘導体化

100 μg/ml の GBL hydrazone 水溶液 1 ml に DNC 試薬を 6 ml 加え、遮光下

45 °C で 60 分インキュベートした。DNC 試薬は 1 mM DNC の acetone 溶液を等容量の 10 mM 炭酸ナトリウム (pH 9) と混合して調製した。反応液の一部を直接薄層クロマトグラフィー (TLC) にスポットして分析を行った。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) あるいは液体クロマトグラフィー-マススペクトル (LC-MS) の実験を行う場合は、反応液に 8 ml の水を加え、Sep-Pak C18 カートリッジに通して、DNC 誘導体化物をカートリッジに付着させた。次に、10 ml ずつの水と 20% acetone で洗浄後、5 ml の methanol で DNC 誘導体化物を溶出し、HPLC に注入して分析を行った。また、溶出液を窒素ガスで濃縮・乾個し、残渣を LC-MS に付した。

3. GHB の Br-DMEQ による誘導体化

0.95 mM GHB、0.2 mM 18-crown-6、0.95 mM Br-DMEQ および 723.5 mM カリウム塩 (K₂CO₃ ないし KCl、未溶解) を acetonitrile 1 ml 中で、密封、遮光下 80 °C で 20 分加熱した。冷却後、反応液の一部を直接 TLC にスポットして分析

を行った。また、反応液の溶媒を窒素ガスにより留去し、残渣を LC-MS に付して分析を行った。

C. 結果

1. GBL hydrazone の dansyl chloride によるケイ光誘導体化の試み

GHB は分子内縮合によって GBL に変換しやすいことから、GHB 簡便分析方法構築のための前段階として、GBL のケイ光誘導体化の検討を行った。今回は、GBL を一旦 hydrazone 誘導体に変換後、導入

されたアミノ基を dansyl chloride と反応させる方法を検討した (Fig. 1)。実験方法に記載の手順に従って、GBL hydrazone を DNC と反応させ、反応液を直接 TLC に付した結果を Fig.2 に示す。GBL Hydrazone を DNC と反応させたサンプルにのみ、Rf 0.63 にケイ光スポットが検出され、GBL hydrazone は DNC 誘導体化によりケイ光体に変換し得ることが示唆された。

反応生成物を逆相系カートリッジによってクリーンアップしたものを HPLC

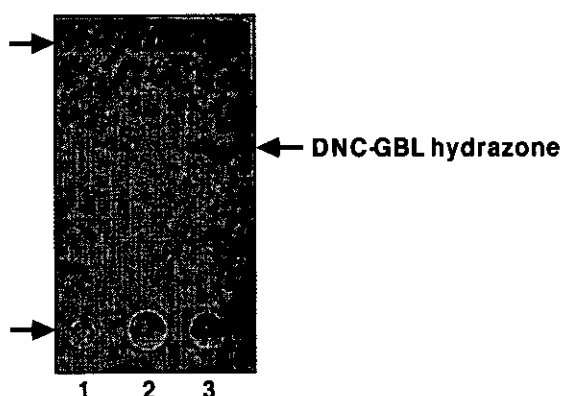


Fig. 2. TLC of GBL hydrazone derivatized with DNC.

1, DNC; 2, control; 3, GBL hydrazone

Solvent: chloroform saturated with ammonia water

Detection: UV 366 nm

Arrow heads indicate the origin and solvent front.

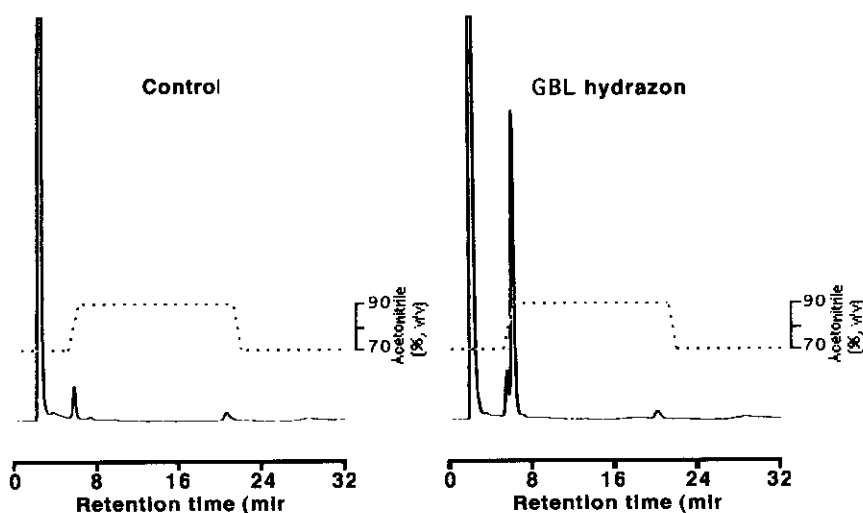


Fig. 3. HPLC of GBL hydrazone derivatized with DNC.

The conditions of HPLC were: column, Nova-PAK C18 cartridge (8 x 100 mm, particle size, 5 μ m); mobile phase, solvent A [acetonitrile - 1 mM imidazole (7 : 3, v/v)] for 0 - 5 min, change to solvent B [acetonitrile - 1 mM imidazole (9 : 1, v/v)] for 5 - 6 min, solvent B for 6 - 21 min, change back to solvent A for 21 - 22 min, solvent A for 22 - 32 min; flow rate, 1 ml/min; sample size, 20 μ l; detection, excitation at 335 nm, emission at 500 nm.

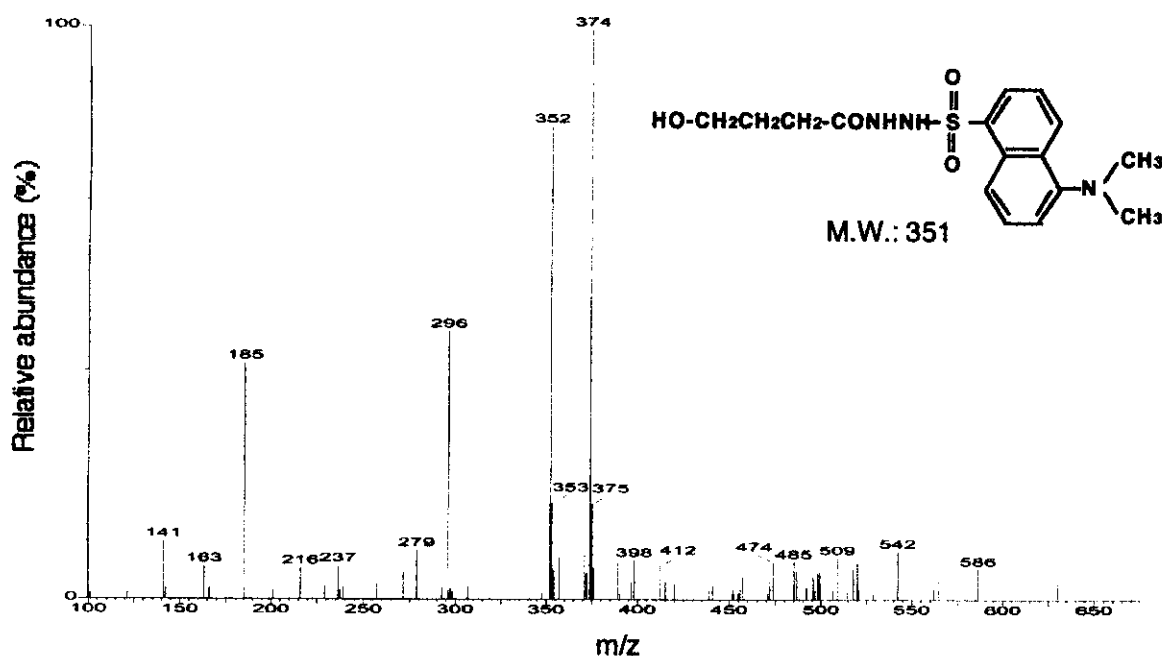


Fig. 4. Mass spectrum of GBL hydrazone derivatized with DNC

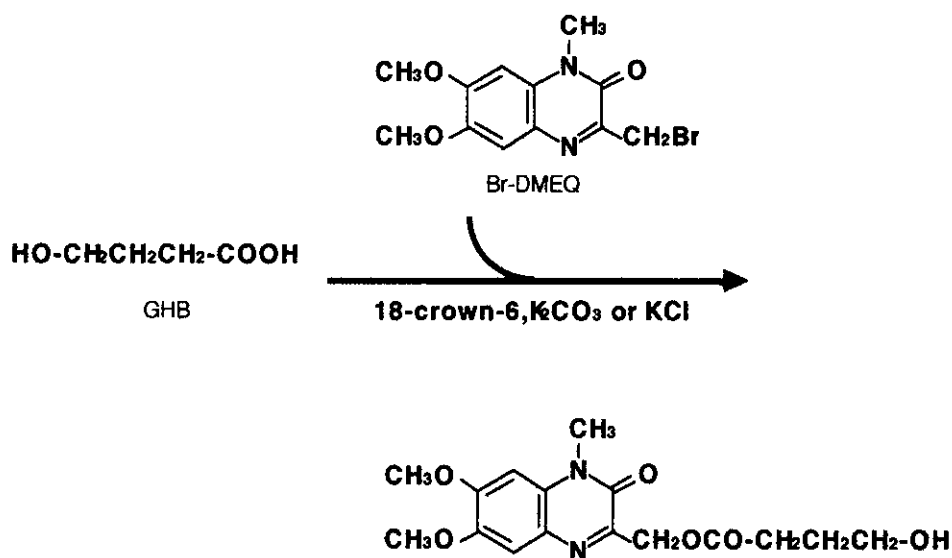


Fig. 5. Derivatization of GHB with Br-DMEQ.

に注入した結果を Fig. 3 示す。GBL hydrazone を反応液に添加した場合には、コントロールに認められないピークが保持時間 6 分付近に検出され、HPLC においても GBL hydrazone の DNC 誘導体化物の分析が可能であることが確認された。

GBL hydrazone の DNC 誘導体化物の LC-MS を行った結果 (Fig. 4)、m/z 374 に

GBL hydrazone の DNC 誘導体化物にナトリウムが付加した質量に相当するイオンピークが認められ、m/z 352 にはナトリウムが離脱した、GBL hydrazone の DNC 誘導体化物の分子量+1 のイオンも検出された。以上の結果より、GBL hydrazone の DNC 誘導体化の反応は期待どおりに進行していることが確認された。

2. GHB の Br-DMEQ によるケイ光誘導体化

前述の通り、GHB は比較的容易に分子内で縮合して GBL に変換する性質を有しており、特に酸性条件ではこの反応が優先するため、誘導体化試薬との反応が進行しないという困難な問題がある。事実、昨年度までの検討では、幾つかの誘導体化剤を用いて試みたが成功していない。今回は、Br-DMEQ による誘導体化 (Fig. 5) を試みた。K₂CO₃ 存在下に Br-DMEQ による誘導体化を行った反応液を直接 TLC に付した結果を Fig. 6 に示す。Myristic acid ないし GHB を加えて

反応を行った場合には、それぞれ Rf 値 0.84 および 0.56 に対照には認められないスポットが検出され、これらのカルボン酸は Br-DMEQ との反応によって、ケイ光誘導体化物に変換されることが示唆された。大変興味あることに、Br-DMEQ との反応を KCl 存在下に行った場合には、GHB のみが生成物スポットを与え、他の 3 種のカルボン酸 (propionic acid、myristic acid および stearic acid) では誘導体化物が検出できなかった (Fig. 7)。

K₂CO₃ 存在下に行った反応の内容物を HPLC により分析した結果 (Fig. 8)、GHB 非存在下で行った反応には殆ど認

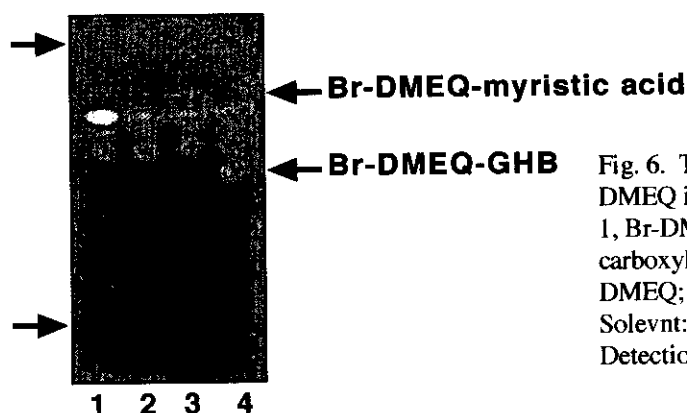


Fig. 6. TLC of GHB derivatized with Br-DMEQ in the presence of K₂CO₃
1, Br-DMEQ; 2, control (reaction without carboxylic acid); 3, myristic acid + Br-DMEQ; 4, GHB + Br-DMEQ
Solevnt: chloroform - methanol (9 : 1, v/v)
Detection: UV 366 nm

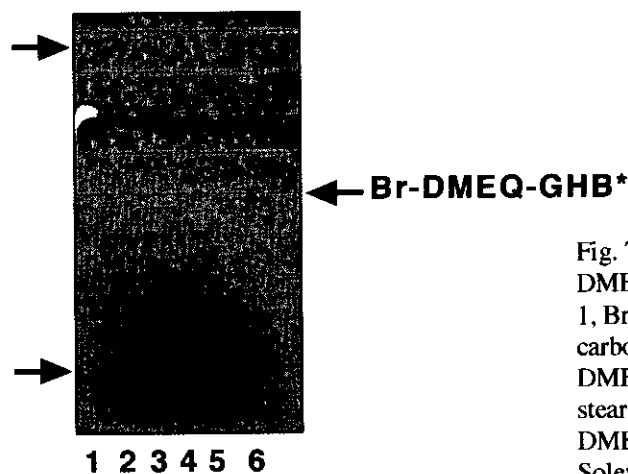


Fig. 7. TLC of GHB derivatized with Br-DMEQ in the presence of KCl
1, Br-DMEQ; 2, control (reaction without carboxylic acid); 3, propionic acid + Br-DMEQ; 4, myristic acid + Br-DMEQ; 5, stearic acid + Br-DMEQ; 6, GHB + Br-DMEQ
Solevnt: chloroform - methanol (9 : 1, v/v)
Detection: UV 366 nm

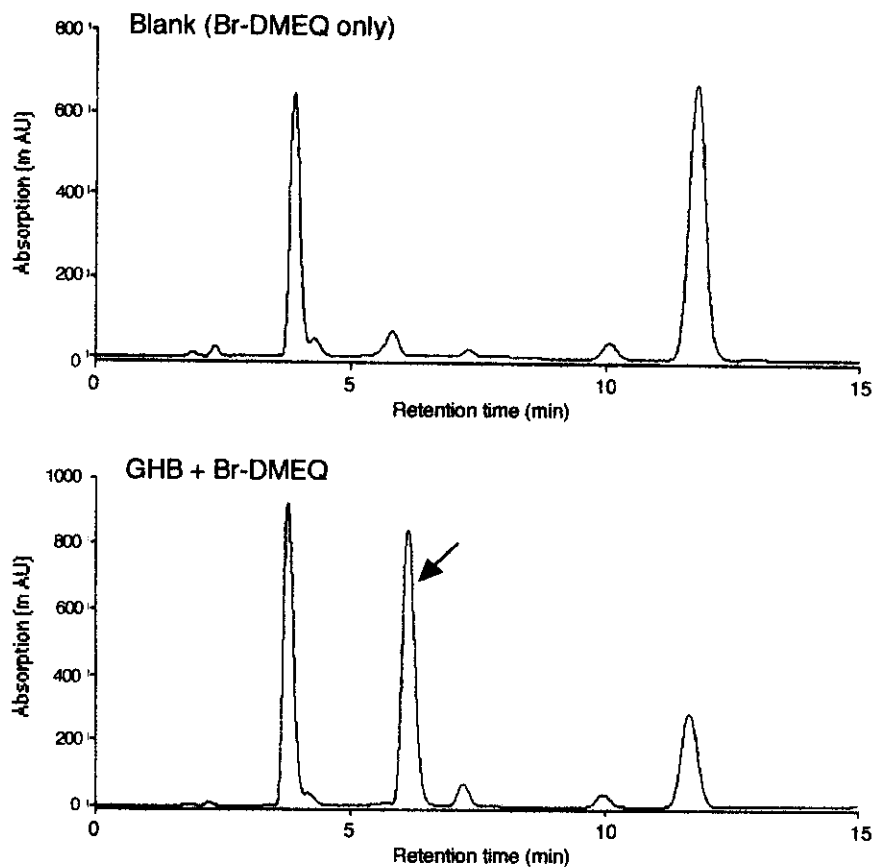


Fig. 8. HPLC of GHB derivatized with Br-DMEQ.
 Conditions of HPLC were: column, CAPCELLPAK C18 (4.6 x 150 mm); mobile phase: methanol-water = 3:5 (v/v); flow rate, 0.8 ml/min

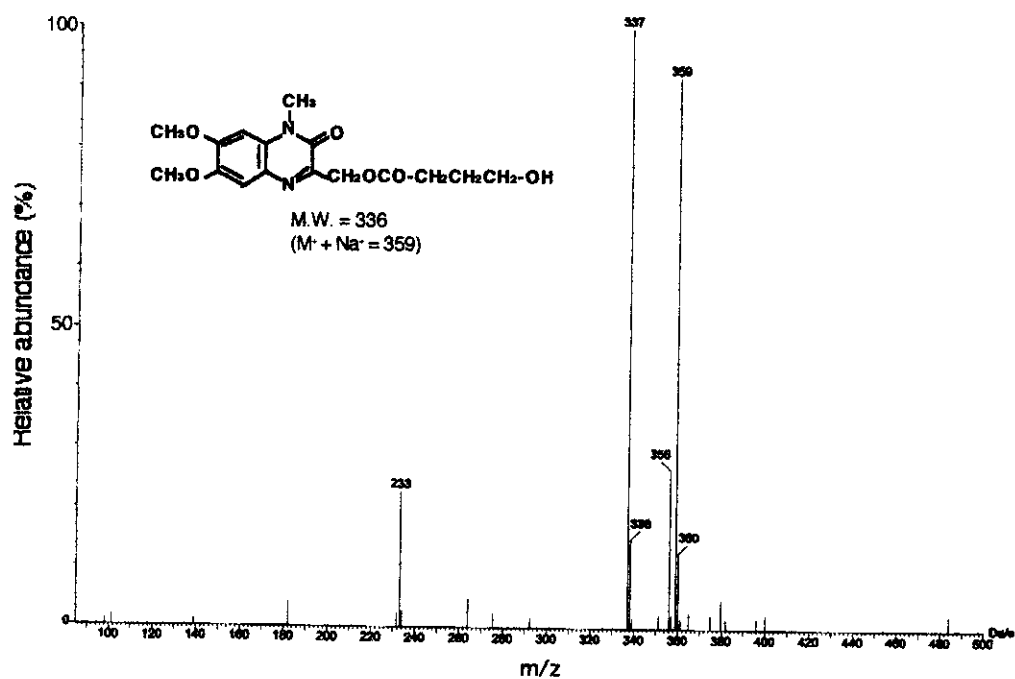


Fig. 9. Electrospray-MS spectrum of GHB derivatized with Br-DMEQ.

められなかったピークが保持時間6分付近に認められた。これの electrospray MS スペクトルを測定した結果、 m/z 337 に GHB の Br-DMEQ 誘導体化物の分子イオン + 1 に相当するピークが観察された。また、 m/z 359 には、 $M^+ + Na^+$ に相当するピークも認められた。 Na^+ 結合体が存在するのは、用いた GHB が Na 塩であることに起因するものと考えられた。この結果より、GHB はカリウム塩および 18-crown-6 の存在下に Br-DMEQ によってケイ光誘導体化物に変換されることが明らかとなった。

D. 考 察

GBL はこれを一旦 hydrazone 誘導体にしたのち、更に DNC で誘導体化することにより、TLC や HPLC にて高感度に検出できる物質に変換できることを明らかにすることができた。これを GHB の分析に適用するためには、酸処理による GBL の生成とこれの hydrazone 誘導体への変換の2ステップを追加しなければならない。データは割愛したが、これについても少し検討を加えた。その結果、GBL の hydrazone への誘導体化に使用する hydrazine が最終反応の際に DNC と反応し、分析を妨害する結果を得ている。従って、本法を実用に供するには、GBL hydrazone の生成ののち、反応液中の hydrazine を除去する必要がある。この点に関し、benzaldehyde 等を添加して、残存 hydrazine の不活性化を試みたが、成功しなかった。従って、GHB の DNC によるケイ光誘導体化は、今後この問題を解決する必要がある。

GHB が Br-DMEQ によってケイ光体に変換されることを TLC、HPLC および

MS スペクトルにより確認した。誘導体化反応に使用する 18-crown-6 は、有機溶媒(acetonitrile)に不溶性の反応促進因子である K^+ イオンを包摂することによって反応に供給する役目を果たす。従って、本反応には カリウム塩の存在が必須である。本研究では、 K_2CO_3 と KCl の違いによって反応状況が大きく変化するという興味ある結果を得た。すなわち、 K_2CO_3 では複数のカルボン酸が非特異的に誘導体化体を与えるのに対して、KCl では GHB のみが反応した。この違いは、更に多くのカルボン酸化合物を用いて、検証する必要があるが、KCl 存在下での反応は GHB に特異的な極めて有用な検出手段になる可能性がある。両カリウム塩が異なる効果を発揮する点の機構については、不明である。反応に使用した GHB が Na 塩であり、塩タイプのカルボン酸では KCl 存在下でも反応が進行するという単純な理由による可能性も残っている。

E. 結 論

1) GBL hydrazone は DNC によって、ケイ光誘導体化物に変換できることが明らかになった。従って、GHB の GBL への変換と hydrazine 処理による GBL hydrazone 生成を組み合わせた方法によって、GHB の高感度化分析が可能となるものと期待された。

2) GHB は 18-crown-6 およびカリウム塩の存在下、Br-DMEQ によってケイ光誘導体化物に変換できることが明らかとなった。KCl を用いる反応は、GHB に特異的な簡便法として有用である可能性が示唆された。

F. 参考文献

1. Bernasconi, R., Mathivet, P., Bischoff, S., Marescaux, C.; *Trends Pharmacol. Sci.*, **20** 135-141 (1999).
2. Nicholson, K.L., Balster, R.L.; *Drug and Alcohol Dependence*, **63** 1-22 (2001).
3. Ferrara, S.D., Tedeschi, L., Frison, G., Castagna, F., Gallimberti, L., Giorgetti, R., Gessa, G.L., Palatini, P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11** 483-487 (1993).

研究協力報告書

磁性ラテックスを用いた LAIRT 法によるコカインの定量法の開発

研究協力者 吉田 武美 昭和大学薬学部 毒物学教室 教授

研究要旨 当教室ではこれまでに依存性乱用薬物のラテックス凝集阻止反応試験法 (Latex agglutination inhibition reaction test: LAIRT)を用いたスクリーニング法を開発してきている。更に、この方法を発展させ、磁性ラテックスを用いることにより、大型機器等を使わずに簡便に試料の濃縮ができ、より定量的な結果が得られるコカインの LAIRT 法の開発を試みた。それに先立ち、用いた抗体の抗体価を ELISA 法にて確認した所、コカインの測定用量範囲は 8 pg - 25 ng/well であり、従来報告しているものと変わりなく、高感度に測定できるものと思われた。

定量的 LAIRT 法は検体と抗体(抗体は磁性ラテックス粒子に結合している)を反応させた後、磁石を用いて磁性ラテックスを集めると、検体に含まれる薬物は磁性ラテックス抗体と結合するので磁石を用いて磁性ラテックス粒子を集めて上清を除くと試料中に含まれる薬物は濃縮されることになる。残渣に抗原と結合させた青色ラテックス粒子を添加して凝集反応を起こさせるが、薬物存在下には抗原と結合した青色ラテックスは磁性ラテックスに結合することは出来ない。磁石で再度磁性ラテックスを集めてその上清の透過度を測定することにより標準曲線から検体中のその濃度を測定できるが、まず凝集板を用いて肉眼的に凝集像を観察し反応時間の検討を行った。反応時間5分では薬物非添加で凝集像が観察されたが、反応時間の経過に伴い、コカイン存在下ではその添加濃度に準じて凝集阻害が観察された。しかしながら、透過度を測定するにあたってはコカインの添加濃度依存的な変化は認められず、現段階で定量的 LAIRT 法を確立するまでには至っていない。

A. 研究目的

現在、麻薬、覚せい剤に代表される依存性乱用薬物の検査には主に血液や尿が用いられている。我々はすで特別な機器を必要としないラテックス凝集阻止反応試験(Latex agglutination inhibition reaction test: LAIRT)を尿中のメタンフェタミン(MA)、モルヒネ(MOR)、コカインのスクリーニング法として開発してきた^{1, 2, 3)}。この方法をさらに発展させ、磁性ラテックスを用いて大型機器等を使わずに簡便

に試料の濃縮ができ、より定量的な LAIRT 法の開発を試みた。抗体と磁性ラテックス粒子を結合させることにより、遠心機等の大型機器を利用せずに磁石を用いて試料中の薬物を簡易的に濃縮することが可能であり、また、試料中に薬物が存在する時に残存する薬物結合青色ラテックス粒子の透過率を測定することにより、定量的な薬物の測定が可能となった。そこで本研究では、着色ラテックス粒子とラテックス磁性粒子を用いたコカ