

Fig. 5 酸素条件下におけるNaOHアルカリ溶液(pH 9~10)中のN-OH MDMAおよびN-OH MDAのESRスペクトル

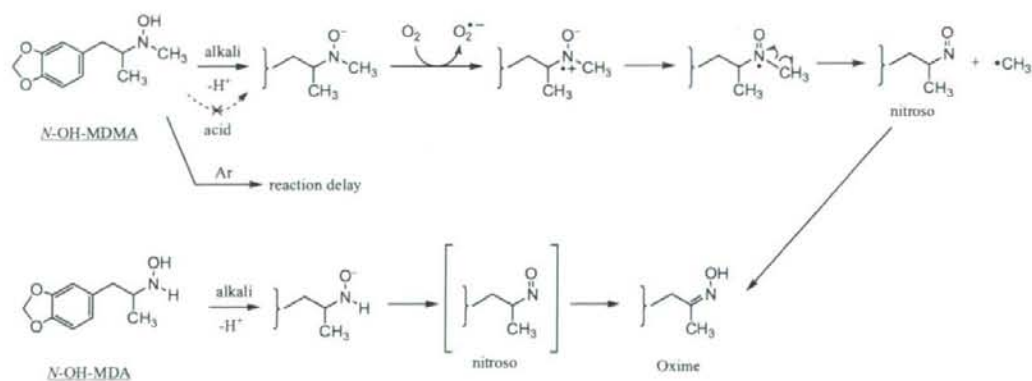


Fig. 6 アルカリ溶液中におけるN-OH MDMA および N-OH MDA の推定反応経路

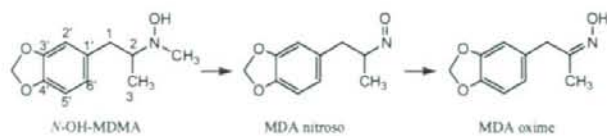


Table 1. NMR Data of *N*-OH-MDMA and its reactive products in D₂O with 40% NaOD (pH 10)^a

| No. | <i>N</i> -OH-MDMA | | | MDA Nitroso | | | MDA Oxime | | |
|----------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|
| | ¹³ C | ¹ H | HMBC ^b | ¹³ C | ¹ H | HMBC ^b | ¹³ C | ¹ H | HMBC ^b |
| 1 | 40.7 | 2.60, 1H, brs | | 42.0 | 3.00, 2H, m | 2 | 44.3 | 3.49, 2H, s | 2, 3, 1', 2', 6' |
| 2 | 68.4 | 3.17, 2H, brs | | 75.0 | 4.42, 1H, m | | 160.2 | - | - |
| 3 | 20.8 | 1.12, 3H, d, <i>J</i> =6.2 Hz | 1, 2 | 21.7 | 1.50, 3H, d, <i>J</i> =6.5 Hz | 1, 2 | 15.8 ^c | 1.74, 3H ² , s | 1, 2 |
| 3' | - | - | - | - | - | - | 21.7 ^c | 1.76, 3H ² , s | - |
| 1' | 136.0 | - | - | ? | ? | ? | 135.8 | - | - |
| 2' | 112.9 | 6.92, 1H, d, <i>J</i> =1.0 Hz | 1, 4', 6' | ? | ? | ? | 112.3 | 6.89, 1H, d, <i>J</i> =1.4 Hz | 3', 6' |
| 3' | 150.2 | - | - | ? | - | - | 148.6 | - | - |
| 4' | 148.5 | - | - | ? | - | - | 150.2 | - | - |
| 5' | 111.5 | 6.94, 1H, d, <i>J</i> =7.9 Hz | 1', 3' | ? | ? | ? | 111.5 | 6.95, 1H, d, <i>J</i> =7.9 Hz | 1', 4' |
| 6' | 125.6 | 6.85, 1H, dd, <i>J</i> =7.9; 1.0 Hz | 1, 2', 4' | ? | ? | ? | 125.0 | 6.86, 1H, dd, <i>J</i> =7.9, 1.4 Hz | 1, 2', 3', 5' |
| <i>N</i> -Me | 46.6 | 2.80, 3H, s | 2 | - | - | - | - | - | - |
| -OCH ₂ O- | 104.0 | 6.02, 2H, s | 3', 4' | 103.9 | 6.02, 2H, s | ? | 103.9 | 6.02, 2H, s | 3', 4' |

^a Recorded at 600 MHz (¹H) and 150 MHz (¹³C), respectively; data in δ ppm (*J* in Hz). ^b *J*=8 Hz. The proton signal correlated with the indicated carbons. ^c syn- or anti-form.

分担研究課題：違法ドラッグ製品の分析法の開発、成分分析、分析標準品の調製
研究分担者：花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

—*N*-OH-MDMA 投与ラットにおける生体試料中薬物の UPLC-MS/MS を用いた
分析法について—

研究要旨：近年違法ドラッグ市場において広く流通が認められている
N-hydroxy-MDMA (*N*-OH-MDMA) は、麻薬成分 (MDMA, MDA 及び *N*-OH-MDA)
の構造類似体で、乱用による健康危害・社会的危害が懸念される。本研究では、生体
試料中の同成分の分析法を検討すると共に、薬物投与ラット血漿、尿、毛髪中の挙動
を検討した。茶褐色体毛を有する DA ラットに、*N*-OH-MDMA を 5 mg/kg ずつ 10 日間
連続して腹腔内投与し、血漿試料は初回投与後 360 分まで、尿試料は最終投与後 72 時
間まで、毛髪試料は初回投与後 28 日間に新たに生えてきたものを採取した。各試料を
固相抽出カラムで精製し、0.1% HCOOH 及び CH₃CN のグラジエント条件下で、
UPLC-MS/MS (Scan モード及び MRM モード) により分析を行った。pH 3-9 のリン
酸緩衝液中で *N*-OH-MDMA の安定性を検討したところ、pH 5 以下の酸性条件下では安
定であったが、アルカリ条件下では速やかに分解した。一方、ラット尿中 (pH 8-9)
では、1M リン酸緩衝液 (pH 3) を加えて液性を pH 5 以下にし、4℃で保冷した条件で
最も安定であり、24 時間後の残存率は 90%以上であった。ラット毛髪からの各薬物の
抽出条件を検討した結果、MeOH/5M HCl (20:1) 溶液を用いた条件下で安定な抽出が
可能であった。*N*-OH-MDMA を投与したラット血漿及び尿中からは、主に脱水酸化体・
N-脱メチル化体である MDMA 及び MDA が検出され、共に血漿中では 360 分後まで、
尿中では 72 時間後まで検出された。また、ラットにおいては、投与薬物の 99%以上が
MDMA 及び MDA として尿中に排泄されることが明らかとなった。*N*-OH-MDMA 及び
N-脱メチル化体である *N*-OH-MDA は、血漿中では 30 分後まで、尿中では 10~24 時間
後までわずかに検出された。ラット毛髪中においても MDMA, MDA が主に検出され、
N-OH-MDMA 及び *N*-OH-MDA も微量であるが検出された。

研究協力者

河村麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部

A. 研究目的

近年、日本の違法ドラッグ市場において流通が
認められている *N*-(1-(3,4-methylenedioxy
phenyl)propan-2-yl)-*N*-methylhydroxylamine

(*N*-OH-MDMA) は、すでに麻薬として規制さ
れている 3,4-methylenedioxymethamphetamine
(MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine
(MDA) 及び *N*-hydroxy-1-(3,4-methylenedioxy
phenyl)-2-amino propane (*N*-OH-MDA) の構造類
似化合物である (図 1)。*N*-OH-MDMA に関す
る学術的報告は少ないが、1996 年に Noggle ら

が FLEA の名称でストリートドラッグとして米国において流通していることを報告している¹⁾。厚生労働省が行っている違法ドラッグ製品の全国買い上げ調査においても、平成 18 年度、19 年度に流通が認められている²⁾。我々は、本化合物及び *N*-OH-MDA について、GC-MS により分析を行うと、未変化体は検出されず、主に脱水酸化体である MDMA 及び MDA が検出されることを報告している³⁾。Noggle らの論文においても、*N*-OH-MDMA は GC-MS 分析時に熱により分解し、MDMA 及び MDA 等が検出されることが報告されており¹⁾、MDMA 及び MDA の *N*-水酸化体は、そのままでは GC-MS 分析には不適であると考えられている。一方、Clark らは、*N*-OH-MDA について、塩基性条件下で速やかに分解し、オキシム体になることを報告している⁴⁾。さらに、*N*-OH-MDA 投与ラット肝切片、血漿、尿中において、速やかに脱水酸化体である MDA に代謝され、親化合物や特徴的な代謝物が検出されないことも報告している⁵⁾。*N*-OH-MDMA の溶液中及び生体内での挙動については報告がないが、*N*-OH-MDA と同様、塩基性条件下で容易に分解し、また、生体内では脱 *N*-水酸化体 MDMA が生成することが考えられる。そのため、本化合物の摂取は、麻薬である MDMA 摂取と混同されやすく、分析鑑定上問題となる恐れがある。本研究では、生体試料中の *N*-OH-MDMA 及び *N*-脱メチル化体・脱水酸化体 *N*-OH-MDA、MDMA、MDA について、Ultra Performance LC - タンデム質量分析 (UPLC[®]-MS/MS) を用いた高感度迅速同時分析法を検討すると共に、*N*-OH-MDMA 投与ラット血漿、尿、毛髪中の挙動を検討した。さらに毛髪分析による、*N*-OH-MDMA と MDMA の摂取識別の可能性について検討を加えた。

B. 研究方法

1. 実験材料

N-OH-MDMA シュウ酸塩、*N*-OH-MDA 塩酸塩、MDMA 塩酸塩、MDA 塩酸塩及び内標準物質 (IS) methamphetamine-d4 塩酸塩 (MA-d4) は過去に当研究室において合成し、NMR, MS 及び HPLC により構造及び純度を確認したものを使用した。固相抽出カラムは Bond Elut Plexa (60 mg/3 mL, Varian) を使用した。UPLC-MS/MS に使用したアセトニトリルは HPLC グレードを、その他の試薬は特級品相当を使用した。標準溶液として *N*-OH-MDMA、*N*-OH-MDA、MDMA、MDA 及び MA-d4 の 1 mg/mL メタノール溶液を調製し、適宜希釈して使用した。ただし、*N*-OH-MDMA 及び *N*-OH-MDA については、用事調製した。

2. 動物実験

動物は日本エスエルシー (株) より購入した濃茶褐色の体毛を有する Dark-Agouti (DA) ラット (♂, 5 週令) を使用した。ラット 1-3 に *N*-OH-MDMA シュウ酸塩 5 mg/kg (塩基として換算) を 10 日間連続して腹腔内投与した。薬物投与前にあらかじめラット背部の毛を動物用電気バリカンで刈り取り、これをコントロール毛髪試料とした。初回投与 28 日後、毛を刈り取っておいた部位に新たに生えてきた毛を採取して毛髪試料とした。血漿試料は、薬物の初回投与後、5, 15, 30, 60, 120, 360 分後にラット眼窩静脈叢よりヘパリン処理済ガラス細管を用いてヘパリン入りプラスチックチューブに採血し、直ちに 3 分間 10,000 rpm で遠心分離して調製した。得られた血漿試料は分析まで -20°C で保存した。血中濃度時間曲線下面積 (AUC_∞) 値は台形法により算出した。尿試料は、最終投与後、代謝ケージに入れて、投与後 0-10, 10-24, 24-34, 34-48, 48-72 時間の尿を採取し、分析まで -20°C で保存した。なお採尿は、*N*-OH-MDMA の分解を防ぐため、採尿ビンにあ

らかじめ 1 M リン酸緩衝液 (pH 3) 1 mL を入れておき、保冷ボックスを用いて 4°C 下で行った。

(倫理面の配慮)

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による倫理審査の承認を経て、当所動物管理室の協力を得て、動物福祉・愛護の精神に基づいて、適切な実験計画及び適正な実験手技のもとで実施した。

3. UPLC-MS/MS 分析条件

<システム> UPLC-MS/MS : Acquity UPLC / Quattro premier XE (Waters)

<UPLC 条件>

カラム : ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm , 2.1 x 100 mm (Waters), 移動相 : 0.1% Formic acid / CH₃CN with 0.1% Formic acid 90:10 (0 min) - 70:30 (8 min), 流速 : 0.3 mL, カラム温度 : 40°C, 注入量 : 2 μL

<質量分析条件>

Electrospray ionization : positive, Capillary : 3 kV, Source temp. : 120°C, Desolvation Temp. : 400°C, Cone Gas Flow : 50 L/hr, Desolvation Gas Flow : 800 L/hr, Collision energy : 20 V, Collision gas : 0.25 mL/min, Ar, Scan mode mass range : m/z 50-400, Cone voltage 及び Multiple reaction monitoring (MRM) 測定条件 : 表 1 参照

4. LC-MS/MS 測定用溶液中の安定性

UPLC-MS/MS 測定を行うにあたり、測定用溶液中の本化合物の安定性について 24 時間にわたり検討した。測定用溶液として、初期移動相 (0.1% 酢酸/10% アセトニトリル), 0.1% 酢酸, アセトニトリル, メタノール, メタノール・アセトニトリル混液 (1:1), 0.1% 酢酸/アセトニトリル, 2% 酢酸/メタノール (固相抽出溶媒) の 7 種類の溶液を用いて、IS (MA-d4) と N-OH-MDMA を 0.1 $\mu\text{g/mL}$ となるように加え、0, 1, 2, 4, 5, 24 hr 毎に一定量をサンプリングした。サンプリング溶液を直ちに UPLC-MS/MS

で分析し、各時間毎に N-OH-MDMA と MA-d4 との面積比を算出し、0 時間における比の値を 100% とした時の経時変化を求めた。

5. 各 pH 緩衝液中による N-OH-MDMA 及び N-OH-MDA の安定性

各 pH 緩衝液中における N-OH-MDMA 及び N-OH-MDA の安定性は以下の通り算出した。リン酸水素二カリウム及びリン酸二水素カリウムを用いて、リン酸もしくは水酸化カリウム水溶液により pH を調整して、pH 3 から 10 の 0.1 M リン酸カリウム緩衝液を調製した。N-OH-MDMA の 1 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液 100 μL を各緩衝液 900 μL に加え、MA-d4 の 1 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液を 50 μL 加えた。0, 1, 2, 4, 8, 24 hr ごとに 50 μL をとり、メタノール・アセトニトリル (1:1) 混液で 10 倍希釈し、UPLC-MS/MS の測定試料とした。MA-d4 のピーク面積に対する N-OH-MDMA のピーク面積の比を求め、0 時間における比の値を 100% とした時の経時変化を求めた。

6. 生体試料中薬物の固相抽出条件

固相抽出カラム Bond Elut Plexa (60 mg/3 mL, Varian) をメタノール 0.5 mL 及び水 0.5 mL で活性化した後、4 倍量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3) を加えた血漿、尿及び毛髪抽出試料溶液を吸着させる。その後、水 0.5 mL でカラムを洗浄し、2% 酢酸/メタノール溶液 0.5 mL で溶出して、直接 UPLC-MS/MS の分析試料とした。なお、必要に応じて、溶出液を窒素気流下で蒸発乾固して、少量のメタノール・アセトニトリル (1:1) 混液に溶解して濃縮試料とした。

7. 血漿及び尿中安定性

新鮮ラット尿 (pH 8-9) に N-OH-MDMA 及 MA-d4 を 1 $\mu\text{g/mL}$ となるように加え、下記 1)-7) に示した条件における N-OH-MDMA の安定性を検討した。0, 1, 2, 4, 8, 24 hr 毎に 100 μL (リン酸緩衝液入りは 200 μL) ずつサンプリングした。サンプリング溶液に 1 M リン酸緩衝液 (pH 3) を 1 mL 加え、固相抽出を行い、溶出液を窒素気流下で蒸

発乾固してメタノール・アセトニトリル混液(1:1) 100 μ L に溶解し UPLC-MS/MS の測定試料とした。

- 1) 薬物添加尿室温下放置
- 2) 薬物添加尿+1%フッ化ナトリウム
室温下放置
- 3) 薬物添加尿+1Mリン酸緩衝液(pH3) 1 mL
室温下放置
- 4) 薬物添加尿水中放置
- 5) 薬物添加尿+1Mリン酸緩衝液(pH3) 1 mL
水中放置
- 6) 尿を70°C 15分加熱後冷ました後に薬物を添加し、室温放置
- 7) 尿を70°C 15分加熱後冷ました後に1Mリン酸緩衝液(pH3) 1 mL 及び薬物を添加し、室温放置

一方新鮮ラット血漿においても、*N*-OH-MDMA 及び MA-d4 を 1 μ g/mL となるように加え、室温下、もしくは水中に放置し、0, 1, 2, 4 hr 毎に 100 μ L ずつサンプリングして、尿と同様に処理した。

8. 毛髪中薬物濃度分析法の検討

毛髪試料の最適な洗浄方法の検討は以下の通り行った。*N*-OH-MDMA 5 mg/kg を 10 日間連続して腹腔内投与した DA ラット毛髪 (Rat 3) について、以下の通り洗浄を行った。

- 1) 超音波下 1% SDS 溶液 1 分間×3 回、水 1 分間×3 回
- 2) 震盪しながら 1% SDS 溶液 1 分間×3 回、水 1 分間×3 回
- 3) 超音波下 水 1 分間×3 回
- 4) 超音波下 isoPrOH 1 分間×3 回
- 5) 震盪しながら isoPrOH 1 分間×3 回

洗浄後、毛髪試料をデシケーター中で乾燥させ、はさみにより 0.5 mm 程度に細片化した。細片化した各試料 10 mg に、MA-d4 を 10 ng/mg となるように添加し、メタノール・5M 塩酸混液 (20:1) を 1.5 mL 加え、1 時間超音波下抽出を行い、一晚放置した。抽出溶液をろ過後、ろ液

について、窒素気流下蒸発乾固し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3) で溶解して、固相抽出を行った。UPLC-MS/MS で *N*-OH-MDMA, *N*-OH-MDA, MDMA 及び MDA の測定を行い、別途作成しておいた各化合物の標準希釈メタノール溶液による検量線から簡易的に各化合物濃度を算出した。

一方、毛髪からの薬物の抽出中における *N*-OH-MDMA の安定性を検討するために、ラットコントロール毛髪 10 mg に、*N*-OH-MDMA 及び MA-d4 を 10 ng/mg となるように添加し、上述した方法で抽出を行った。UPLC-MS/MS で測定を行い、*N*-OH-MDMA と MA-d4 の面積比を同濃度の標準希釈メタノール溶液における面積比と比較して、*N*-OH-MDMA の残存率を算出した。

9. 分析法の精度

検量線は、ラットコントロール毛髪試料 10 mg を測りとり、*N*-OH-MDMA 及び *N*-OH-MDA は 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 ng/mg, MDMA 及び MDA は 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 ng/mg となるようにそれぞれの薬物の標準溶液及び MA-d4 メタノール溶液 (2 μ g/mL) 50 μ L を加え、前述した方法で分析操作を行い、IS に対する薬物のピーク面積比から作成した。精度 (相対標準偏差) はラットコントロール毛髪試料 10 mg に標準溶液を 0.01, 0.05, 0.5 ng/mg (*N*-OH-MDMA, *N*-OH-MDA) 及び 1, 5, 50 ng/mg (MDMA, MDA) の 3 濃度になるように添加し、分析法の全操作を各濃度 5 回ずつ繰り返し測定した結果から評価した。同様に、血漿及び尿試料 (コントロール血漿 50 μ L もしくは尿 100 μ L に IS 水溶液 (2 μ g/mL) 50 μ L) についても検量線 (0, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 ng/mL), 精度 (0.5, 50, 500 ng/mL) を検討した。尿試料については、コントロール尿に 1M リン酸緩衝液 (pH 3) を加え、液性を pH4-5 程度に調整したものを使用した。

C. 研究結果

1. LC-MS/MS 測定用溶液中の安定性

UPLC-MS/MS 測定を行うにあたり、実験方法に記載した7種類の測定用溶液中の本化合物について24時間にわたる安定性を検討した。その結果、メタノール・アセトニトリル(1:1)混液を使用した場合が最も安定でピーク形状が良かったため、以下の実験においてUPLC-MS/MS測定試料は、本溶媒に溶解もしくは同液で希釈した。

2. 各pH緩衝液中安定性

N-OH-MDMAの保存溶液中での安定性を検討するために、*N*-OH-MDMA シュウ酸塩の1 mg/mL水溶液及びメタノール溶液について、4℃保存下における2週間後までの残存率を測定した(図2)。その結果、両溶液ともに残存率は85%以上であり、少なくとも2週間は分析用として使用可能であると思われた。

一方、各pHの緩衝液中における*N*-OH-MDMAの安定性を検討した結果、*N*-OH-MDMAは、pH5以下では安定であるものの、pH6の緩衝液中では24時間後の残存率は60%程度、pH7では10%程度であった。特にpH8以上の緩衝液中では、24時間後にはほとんど未変化体は検出されず、*N*-OH-MDAのオキシム体と思われるピークが主に検出された(図3)。Clarkらも、本化合物の脱*N*-メチル体である麻薬成分*N*-OH-MDAについて、同様に塩基性条件下で速やかに分解し、オキシム体になることを報告している⁹⁾。*N*-OH-MDAと同様、*N*-OH-MDMAも塩基性の緩衝溶液中では極めて安定性が悪いことが明らかとなった。

3. 固相抽出法の検討

上述した通り、*N*-OH-MDMAは塩基性条件下で容易に分解する。そのため、製品や生体試料中からの化合物の抽出は、液性を塩基性にして適当な有機溶媒により液-液抽出を行うことが困難である。そこで、通常MDMAの抽出に使用

される市販されている固相抽出カラム Bond Elue Certify (Varian), Bond Elut Plexa, Bond Elut Plexa PCX (Varian), Oasis HLB (Waters) を用いて、塩基性条件を用いない最適な抽出法を検討した。検討の結果、Bond Elut Plexa を用いて、実験方法に記載されている方法で抽出を行った際に、*N*-OH-MDMA, *N*-OH-MDA, MDMA, MDA 及び4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA, MDMAの主代謝物のひとつ)の5化合物について共に回収率が85%以上を示し、良好な結果が得られた(図4)。

3. 血漿及び尿中安定性(図5)

N-OH-MDMAは塩基性条件下で容易に分解することから、弱塩基性である尿中(ラット尿pH8-9)における安定性も悪いことが予想される。そこで、様々な条件下における血漿中及び尿中における*N*-OH-MDMAの安定性を検討した。*N*-OH-MDMAを添加した血漿(1 µg/mL, pH7程度)を室温下及び水中に放置したところ、少なくとも共に2時間後までは深刻な分解は認められなかった。

N-OH-MDMAを添加した尿(1 µg/mL, pH8-9)は、水中では4時間後で80%、24時間後でも50%程度が残存したが、室温下では4時間後で20%程度、24時間後ではほとんど*N*-OH-MDMAは認められなかった。また、酵素及び細菌類の影響を除くために、尿にNaFを添加した試料(pH8-9)、一度尿を70℃15分間加熱して放冷した試料についても*N*-OH-MDMAを添加し室温下で安定性を調べたところ、無処理尿と同様に24時間後には未変化体はほとんど認められなかった。一方、尿に1Mリン酸緩衝液(pH3)を加え、液性をpH4-5程度にした試料は、水中では24時間後の残存率は95%程度、室温下でも85%程度と安定であった。

以上の結果より、無処理で試料を採取すると、採尿中に*N*-OH-MDMAの分解がおこり、正しい濃度が測定できないことが示された。また、

尿中での分解は、酵素的反応ではなく、もっぱら液性によるものと考えられた。酸性条件下では *N*-OH-MDMA は安定であるため、採尿時の分解を防ぐためには、尿を pH4 程度にするために採尿ビンにあらかじめ酸性緩衝液を一定量入れておき、低温下で採取する必要がある。一方、血漿中では少なくとも採血し血漿を分離して冷凍保存するまでの短時間では、低温に保てば深刻な分解はおこらないと思われた。

4. 毛髪洗浄法及び抽出法

分解がおこらない最も効率のよい毛髪の洗浄法及び薬物の抽出法を検討した。

通常、毛髪からの薬物の抽出法としては、メタノール等の有機溶媒、酸性溶液、緩衝液等を用いた抽出、アルカリ処理、タンパク質分解酵素処理、そして超臨界抽出法等様々な方法が報告されている。*N*-OH-MDMA はアルカリ溶液中で極めて不安定なため、アルカリ処理法やタンパク質分解酵素処理 (PH 7 以上) では処理が困難である。そこで、我々が通常、毛髪中覚せい剤や MDMA の抽出に用いるメタノール・5 M 塩酸混液 (20:1) を用いた抽出法について、抽出時の *N*-OH-MDMA の安定性の検討を行った。まずコントロール毛髪に *N*-OH-MDMA を添加し、実験方法に記載されている抽出操作を行い、最終的な *N*-OH-MDMA の残存率を検討した。その結果、本抽出法では、*N*-OH-MDMA の分解はほとんど抑えられることが示された。

一方、毛髪に付着する糞尿や脂等を除去するために、分析に先立ち、毛髪試料を適当な溶媒で洗浄する必要がある。現在までに有機溶媒や界面活性剤、水等を組み合わせた様々な洗浄法が報告されているが、我々は過去に超音波下 0.1 % SDS 及び水で 3 回ずつ洗浄することにより外部汚染の影響が少なくなることを明らかにしている。今回、洗浄中に毛髪中 *N*-OH-MDMA の最も分解が抑えられる条件を検討するために、*N*-OH-MDMA 5 mg/kg を 10 日

間連続して腹腔内投与した DA ラット毛髪 (Rat 3) について、実験方法に示した 6 方法で洗浄を行い、メタノール・5 M 塩酸混液 (20:1) で薬物を毛髪から抽出し、毛髪中薬物濃度を検討した。その結果、純水で 1 分間、超音波下で 3 回洗浄を行う方法において、最も *N*-OH-MDMA の分解が抑えられ高い濃度検出された (図 6)。

5. 尿、血漿及び毛髪中薬物測定における検量線及び分析精度

ラットコントロール血漿、尿及び毛髪に標準薬物溶液を添加し、抽出、分析操作を行い、本分析における直線性の範囲及び精度を検討した。その結果、尿及び血漿中では 4 化合物ともに 0.5-500 ng/mL、また毛髪中では *N*-OH-MDMA、*N*-OH-MDA 0.01-0.75 ng/mg、MDMA、MDA 1-50 ng/mg の濃度範囲で直線性 ($R^2 > 0.981$) が得られ、生体試料中の常在成分による妨害は UPLC-MS/MS のクロマトグラム上では認められず、良好なピークが得られた。また、その範囲内での相対標準偏差 ($n = 5$) は、血漿中 *N*-OH-MDA 及び尿中 MDA で 1 濃度ずつ 26-27% のばらつきが認められたが、他は 20% 以下であった。各結果を表 2 に記載した。

6. 尿中濃度変化

N-OH-MDMA をラットに 5 mg/kg ずつ 10 日間腹腔内投与し、最終投与後 0-10、10-24、24-34、34-48、48-72 時間毎に採尿して、得られた尿中の薬物濃度を UPLC-MS/MS により測定した。尿試料は、*N*-OH-MDMA の分解を抑えるために、予め採尿ビンに 1 M リン酸緩衝液 (pH 3) 1 mL を入れておき、保冷バケツで 4°C に保ちながら採取した。図 7 にコントロール尿抽出物及び薬物投与後各時間の尿抽出物について、LC-MS scan モードで測定した時のトータルイオンクロマトグラム及びクロマトグラム上、時間経過によって増減の認められた 6 種類のピークのマススペクトルを示した。また、図 8 に薬物投与 0-10

時間後ラット3の尿抽出物LC-MS/MSクロマトグラム(MRMモード)を示した(図8では、*N*-OH-MDMAと*N*-OH-MDAのクロマトグラムをMDMA, MDAのクロマトグラムの5倍に拡大して記載。)なお、0-10, 10-24, 24-34時間尿中MDMA及びMDAの定量分析は、濃度が高すぎるために、pH4に調整したコントロール尿で100倍に希釈した試料を用いて別途行った。

定量分析の結果、薬物投与ラットの0-10時間尿において、*N*-OH-MDMAが痕跡量検出されたが、10時間以後では検出されなかった。また、*N*-OH-MDAについても、24時間後までしか検出されなかった。尿中では*N*-脱水酸化体のMDMA濃度が最も高く、0-10時間尿では63-76 µg/mLと極めて高濃度検出された。*N*-脱水酸化・脱メチル化体MDAについても、0-10時間尿で31-54 µg/mLと極めて高濃度検出され、MDMA及びMDAは最初の24時間までの尿に9割以上が排泄された(表3)。なお、各化合物の尿中濃度に各時間毎に採取した尿量を乗じ、72時間までに排泄された各化合物量を*N*-OH-MDMA量(モル当量)に換算したところ、今回測定した4化合物の72時間排泄総量は*N*-OH-MDMAの投与量にほぼ一致した。また、*N*-OH-MDMA量に換算した各化合物の72時間の総排泄量の割合(3匹の平均)は、*N*-OH-MDMA 0.01%、*N*-OH-MDA 0.16%、MDMA 58.5%、MDA 41.3%であり、ラットにおいては、99%以上がMDMA及びMDAとして排泄されることが明らかとなった(表4)。ヒトとラットでは投与形式も代謝・排泄も異なるが、ヒトにおいても、尿中からMDMA及びMDA以外の代謝物を検出するのは困難であることが予想された。

7. 血漿中濃度変化

N-OH-MDMAをラットに5 mg/kg腹腔内投与し、初回投与後360分間にわたり採血をして、得られた血漿中の薬物濃度をUPLC-MS/MSにより

測定した。図9に*N*-OH-MDMA、*N*-OH-MDA及びMDMA, MDAの血漿中濃度変化を示す。また、図10に、それぞれ薬物投与ラット(ラット3)の投与5分後の血漿抽出物のUPLC-MS/MS MRMクロマトグラムを示す。なお、血漿中MDMA及びMDAの定量分析は、コントロール血漿で5倍に希釈した試料を用いて別途行った。

血漿中においてもMDMA(最高血中濃度30分後970 ng/mL)及びMDA(最高血中濃度30分後410 ng/mL)が主代謝物として検出され、360分後でも両化合物とも50 ng/mL程度検出が可能であった。一方、未変化体*N*-OH-MDMA(最高血中濃度5分後130 ng/mL)は投与60-120分後までしか検出されず、*N*-OH-MDA(最高血中濃度5分後490 ng/mL)は360分後まで検出されたが、極少量であった。ラット血漿中AUC値を算出すると(表4)、MDMA及びMDAは*N*-OH-MDMAの110倍及び62倍もの値を示し、尿中と同様、血漿中においても*N*-脱水酸化体として主に存在することが明らかとなった。

8. 毛髪中濃度

N-OH-MDMA 5 mg/kgを10日間連続して腹腔内投与し、初回投与28日後に投与前に毛を刈り取っておいた部位に新たに生えてきた毛をラット背部から採取して、各薬物濃度をUPLC-MS/MSにより測定した。図11に薬物投与ラット(ラット3)の毛髪抽出物のUPLC-MS/MS MRMクロマトグラムを示す(図11では、*N*-OH-MDMAと*N*-OH-MDAのクロマトグラムをMDMA, MDAのクロマトグラムの100倍に拡大して記載)。なお、毛髪中MDMA及びMDAの定量分析は、*N*-OH-MDMA及び*N*-OH-MDA測定用の試料の1/4量を用いて別途行った。

薬物投与ラット毛髪中からは、*N*-脱水酸化体MDMAが極めて高濃度検出され、ラット3匹の平均濃度は148 ng/mgであった。また、*N*-脱

水酸化・脱メチル化体 MDA も 52 ng/mg と高濃度であった。一方、未変化体 *N*-OH-MDMA 及び *N*-OH-MDA はピコグラムレベルではあったが、検出が可能であり、UPLC-MS/MS のように高感度の測定機器を使用すれば、毛髪から代謝物と共に未変化体を検出することが可能であると考えられた (表 4)。

近年、長期の薬物使用情報を得る手段として毛髪試料が注目されている。一度毛髪に取り込まれた薬物は比較的安定なため、毛髪試料を用いた薬物分析では、血液や尿など他の生体試料中から完全に薬物が消失した後でも、長期にわたる薬物検出が可能である。そのため、様々な薬物について毛髪中薬物の分析法の検討を行うことが求められている。しかし、特に乱用薬物の場合、薬物によっては症例数が少なくヒト試料を得ることは困難である。そのため、まずは、動物実験モデルにより、どういう薬物が毛髪から検出されやすいのか、どのように分析を行えば良いのか等の基礎的検討を行うことが必要となる。今回、動物実験により、尿中では 10 時間後までしか検出されなかった未変化体 *N*-OH-MDMA が、低濃度ながら、薬物投与後に生育した毛髪試料から検出された。ヒトとラットでは投与形式も代謝・排泄も異なるが、ヒトにおいても、毛髪中の未変化体を検出することにより、*N*-OH-MDMA と MDMA の摂取を識別できる可能性が示された。

E. 結論

近年違法ドラッグ市場において広く流通が認められている *N*-OH-MDMA は、麻薬成分 (MDMA, MDA 及び *N*-OH-MDA) の構造類似体で、乱用による健康危害・社会的危害が懸念される。本研究では、生体試料中の同成分の UPLC-MS/MS を用いた高感度迅速同時分析法を開発すると共に、*N*-OH-MDMA のラット生体内挙動について検討を行った。その結果、以下のことが明らかと

なった。

1. 血漿、尿中及び毛髪中の *N*-OH-MDMA, *N*-OH-MDA, MDMA 及び MDA の UPLC-MS/MS を用いた高感度迅速同時分析法を提示した。
2. *N*-OH-MDMA は塩基性緩衝溶液中では極めて安定性が悪く、尿中 (pH 8-9) でも速やかに分解するが、酸性緩衝液をあらかじめ添加し低温下で採尿することにより、*N*-OH-MDMA の分解が抑えられた。
3. *N*-OH-MDMA 投与ラットにおいて、*N*-OH-MDMA 及び *N*-OH-MDA は速やかに尿中から消失し、モル濃度に換算した各化合物の 72 時間の総排泄量の割合は、*N*-OH-MDMA 0.01%, *N*-OH-MDA 0.16%, MDMA 58.5% 及び MDA 41.3% であり、99% 以上が *N*-脱水酸化体 MDMA 及び MDA として排泄された。
4. *N*-OH-MDMA 投与ラットにおいて、*N*-OH-MDMA は速やかに血漿中から消失し、AUC 値の比は、*N*-OH-MDMA : *N*-OH-MDA : MDMA : MDA (1 : 6 : 109 : 62) であった。
5. 薬物投与ラット毛髪中から MDMA 及び MDA が高濃度検出され、未変化体 *N*-OH-MDMA 及び *N*-OH-MDA も極少量ではあったが検出が可能であった。一度毛髪に取り込まれた薬物は血漿中や尿中と比較して安定であることを考慮すると、毛髪試料は摂取後時間を経ても未変化体が確認しやすく、本法のような高感度分析法を用いることにより、*N*-OH-MDMA と MDMA の摂取識別が可能となると考えられた。

なお、本化合物については、平成 20 年 12 月 17 日に麻薬、麻薬原料植物、向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令の一部を改正する政令 (政令第 385 号) が公布され、平成 21 年 1 月 16 日より麻薬として規制された。

謝辞

本研究の動物実験において、ラット血液試料の採取にご協力くださいました国立医薬品食品衛生研究所毒性部動物管理室の児玉幸夫室長に感謝致します。

E. 参考文献

- 1) F. T. Noggle, C. R. Clark, J. DeRuiter and P. Cain, *MICROGRAM*, Vol. XXIX, No. 1, 10-21 (1996).
- 2) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課 無承認無許可医薬品情報 <http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyounin.html>
- 3) 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総合研究事業 (H19-医薬-一般-024) 「乱用薬物の分析・同定に関する研究」平成 20 年度分担研究報告 (花尻瑠理)
- 4) A. K. Valaer, W. R. Ravis and C. R. Clark, *J. Chromatogr. Sci.* 28, 482-486 (1990).
- 5) W. R. Ravis, A. K. Valaer, D. Brzozowski and C. R. Clark, *Life Sciences*, 54(26), 519-524 (1994).

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

1. 花尻 (木倉) 瑠理, 河村麻衣子, 内山奈穂子, 最所和宏, 宮島敦子, 簾内桃子, 合田幸広: *N-OH-MDMA* 投与ラットにおける生体試料中薬物の UPLC-MS/MS を用いた分析法について, 日本薬学会第 129 年会 (京都, 2009.3.26-28)

表1 UPLC-MS/MS MRM 測定条件

| | Retention time min | Parent m/z | Cone Voltage V | Daughter m/z | Collision Energy eV |
|----------|-----------------------|---------------|-------------------|-----------------|------------------------|
| N-OHMDMA | 4.5 | 210.2 | 20 | 163.2 | 15 |
| N-OHMDA | 3.9 | 196.2 | 20 | 163.2 | 10 |
| MDMA | 3.3 | 194.3 | 20 | 163.2 | 15 |
| MDA | 2.9 | 180.2 | 20 | 163.2 | 10 |
| MAd4(IS) | 3.1 | 154.2 | 20 | 92.1 | 15 |

表2 尿、血漿及び毛髪中 N-OH-MDMA 及び代謝物の分析における直線性の範囲及び相対標準偏差 (n=5)

| Urine | | | | | |
|-----------------|--------------------|------------------------------------|-------------|---------------|--|
| sample | linear range | Calibration curves* | Conc. Added | Precision (%) | |
| N-OH MDMA | 0.5-500 ng/ml | $y=0.8636x+0.2218$ $r^2=0.9981$ | 0.5 | 5.5 | |
| | | | 50 | 2.2 | |
| | | | 500 | 2.2 | |
| N-OH MDA | 0.5-500 ng/ml | $Y=0.3836x-0.0111$ $r^2=0.9983$ | 0.5 | 6.8 | |
| | | | 50 | 2.7 | |
| | | | 500 | 1.1 | |
| MDMA | 0.5-500 ng/ml | $y=0.4741x+0.2510$ $r^2=9920$ | 0.5 | 6.9 | |
| | | | 50 | 2.5 | |
| | | | 500 | 16 | |
| MDA | 0.5-500 ng/ml | $y=0.5269x+0.2294$ $r^2=9812$ | 0.5 | 27 | |
| | | | 50 | 4.9 | |
| | | | 500 | 2.1 | |
| *Weighting: 1/x | | | | | |
| Plasma | | | | | |
| sample | linear range | Calibration curves* | Conc. Added | Precision (%) | |
| N-OH MDMA | 0.5-500 ng/ml | $y=0.5979x+0.1111$ $r^2=0.9988$ | 0.5 | 17 | |
| | | | 50 | 2.4 | |
| | | | 500 | 4.3 | |
| N-OH MDA | 0.5-500 ng/ml | $y=0.4413x+0.0647$ $r^2=0.9983$ | 0.5 | 26 | |
| | | | 50 | 3.7 | |
| | | | 500 | 4.6 | |
| MDMA | 0.5-500 ng/ml | $y=1.2243x+0.2837$ $r^2=0.9984$ | 0.5 | 7.1 | |
| | | | 50 | 2.3 | |
| | | | 500 | 2.3 | |
| MDA | 0.5-500 ng/ml | $y=1.2047x+0.2660$ $r^2=0.9994$ | 0.5 | 17 | |
| | | | 50 | 1.8 | |
| | | | 500 | 1.8 | |
| *Weighting: 1/x | | | | | |
| Hair | | | | | |
| sample | linear range | calibration curves* | Conc. Added | Precision (%) | |
| N-OH MDMA | 0.01-0.75 ng/mg | $y=4.8339-0.0019$ $r^2=0.9900$ | 0.01 | 4.6 | |
| | | | 0.05 | 7.1 | |
| | | | 0.5 | 2.3 | |
| N-OH MDA | 0.01-0.75 ng/mg | $y=2.3578-0.0056$ $r^2=0.9892$ | 0.01 | 4.3 | |
| | | | 0.05 | 5.7 | |
| | | | 0.5 | 2.6 | |
| MDMA | 1-50 ng/mg | $y=3.2766+0.8837$ $r^2=0.9953$ | 1 | 2.5 | |
| | | | 5 | 2.4 | |
| | | | 50 | 1.5 | |
| MDA | 1-50 ng/mg | $y=2.4426+0.2389$ $r^2=0.9980$ | 1 | 2.5 | |
| | | | 5 | 1.9 | |
| | | | 50 | 1.2 | |
| *Weighting: 1/x | | | | | |

表3 *N*-OH-MDMA (5 mg/kg, i.p.) 投与ラットにおける *N*-OH-MDMA と代謝物 (*N*-OH-MDA, MDMA, MDA) の尿中への排泄量

| | | Concentrations in urine ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|-------|-------------------|--|---------|---------|---------|---------|
| | | 0-10hr | 10-24hr | 24-34hr | 34-48hr | 48-72hr |
| Rat 1 | <i>N</i> -OH MDMA | 0.05 | TR | TR | TR | TR |
| | <i>N</i> -OH MDA | 0.34 | 0.04 | TR | TR | TR |
| | MDMA | 75.3 | 12.4 | 1.97 | 0.68 | 0.17 |
| | MDA | 53.6 | 13.0 | 2.09 | 0.53 | 0.18 |
| | Volume (ml) | 2.5 | 5.3 | 2.8 | 3.6 | 6.2 |
| Rat 2 | <i>N</i> -OH MDMA | TR | TR | ND | ND | ND |
| | <i>N</i> -OH MDA | 0.16 | 0.01 | TR | TR | TR |
| | MDMA | 63.4 | 7.35 | 1.79 | 0.73 | 0.36 |
| | MDA | 42.8 | 7.69 | 1.64 | 0.72 | 0.39 |
| | Volume (ml) | 2.7 | 4.3 | 3.0 | 3.6 | 6 |
| Rat 3 | <i>N</i> -OH MDMA | TR | TR | TR | ND | ND |
| | <i>N</i> -OH MDA | 0.16 | 0.03 | TR | TR | TR |
| | MDMA | 69.9 | 12.5 | 3.43 | 0.64 | 0.66 |
| | MDA | 31.3 | 13.4 | 2.51 | 0.51 | 0.51 |
| | Volume (ml) | 3.5 | 3.8 | 3.0 | 2.8 | 3.7 |

TR: < 10 ng/mL (urine)

N.D.: not detected

表4 *N*-OH-MDMA (5 mg/kg, i.p.) 投与ラットにおける *N*-OH-MDMA と代謝物 (*N*-OH-MDA, MDMA, MDA) の尿中総排泄量 (0-72 hr)、血漿中 AUC 及び毛髪中濃度

| | | Total excretion into urine (μg , 0-72 hr) | Plasma AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$) | Concentrations in hair (ng/mg) |
|-------|-------------------|---|--|--------------------------------|
| Rat 1 | <i>N</i> -OH MDMA | 0.1 | 1.1 | 0.03 \pm 0.004 |
| | <i>N</i> -OH MDA | 1.1 | 7.2 | 0.07 \pm 0.004 |
| | MDMA | 263.0 | 149.6 | 163.3 \pm 17.3 |
| | MDA | 211.8 | 74.0 | 48.7 \pm 0.7 |
| Rat 2 | <i>N</i> -OH MDMA | 0.0 | 1.4 | 0.02 \pm 0.003 |
| | <i>N</i> -OH MDA | 0.5 | 7.5 | 0.08 \pm 0.000 |
| | MDMA | 212.9 | 130.9 | 117.6 \pm 17.6 |
| | MDA | 158.8 | 77.6 | 41.4 \pm 1.7 |
| Rat 3 | <i>N</i> -OH MDMA | 0.0 | 1.4 | 0.03 \pm 0.006 |
| | <i>N</i> -OH MDA | 0.7 | 10.2 | 0.23 \pm 0.02 |
| | MDMA | 306.7 | 143.2 | 164.5 \pm 11.1 |
| | MDA | 171.5 | 89.0 | 66.3 \pm 1.4 |

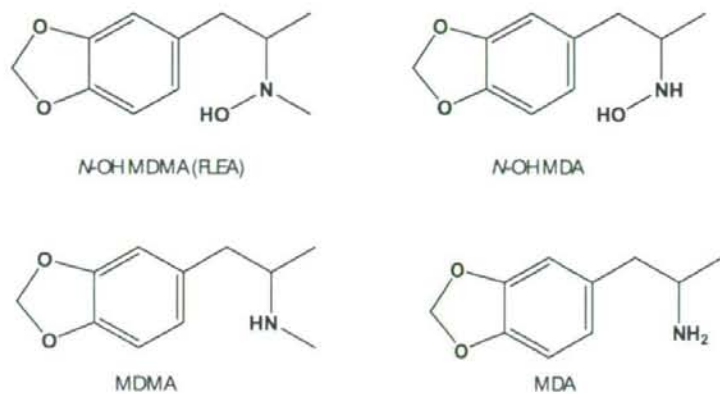


図1 *N*-OH-MDMA 及び構造類似麻薬 *N*-OH-MDA, MDMA, MDA の構造

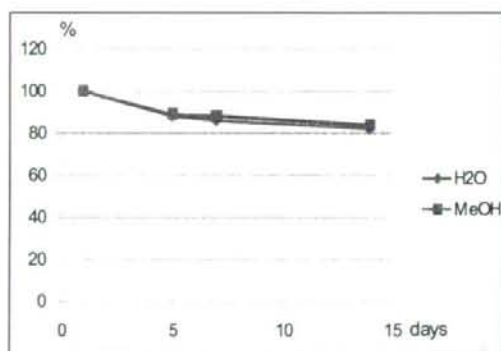


図2 保存溶液（純水及びメタノール，1 mg/mL）中の *N*-OH-MDMA の安定性

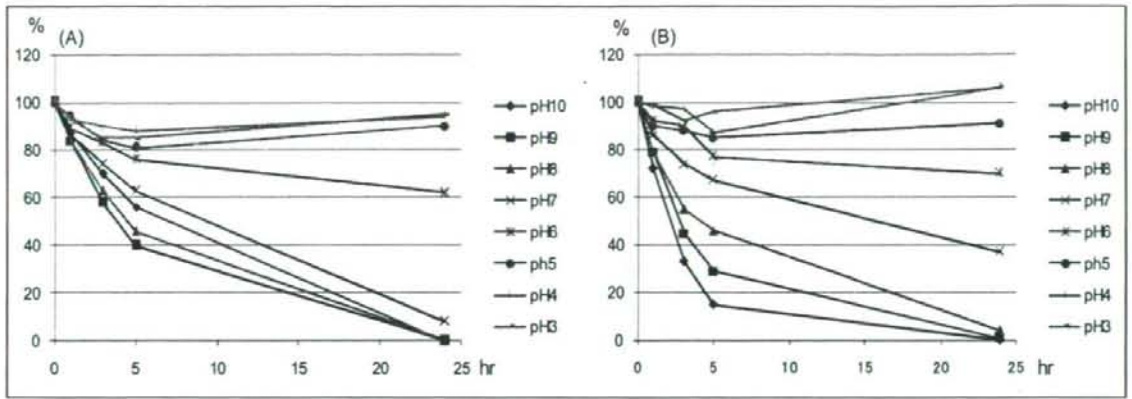


図3 各 pH 緩衝液中の(A) N-OH-MDMA 及び(B) N-OH-MDA の安定性

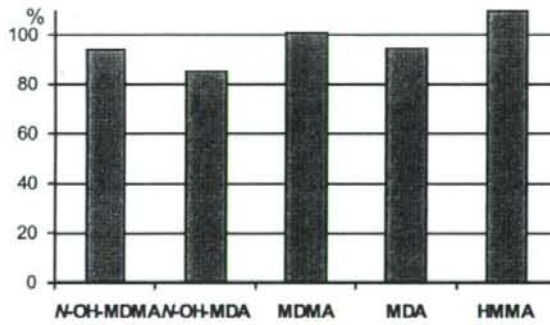


図4 固相抽出 (Bond Elut Plexa) における N-OH-MDMA 及び代謝物 (N-OH-MDA, MDMA, MDA, HMMA) の回収率

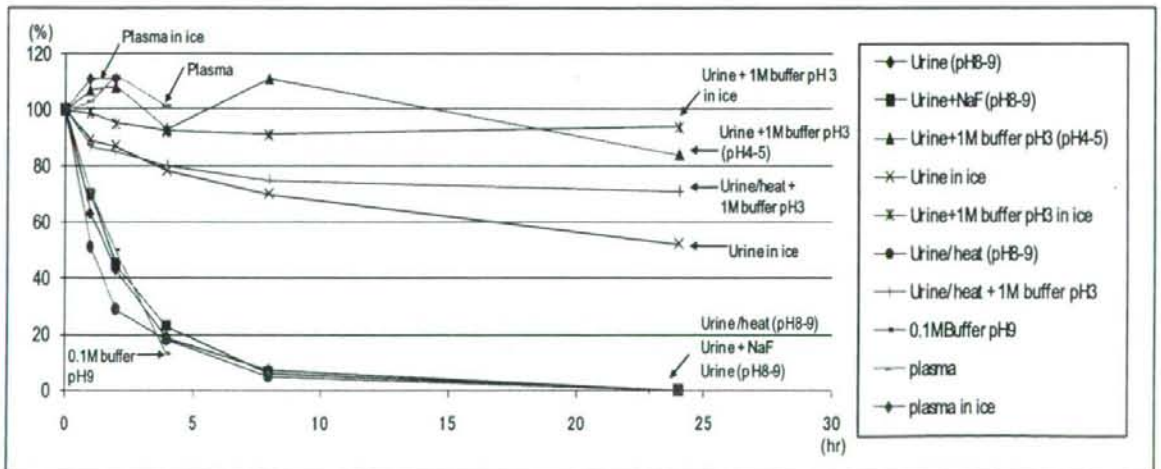


図5 各条件下による尿中及び血漿中 N-OH-MDMA の安定性-

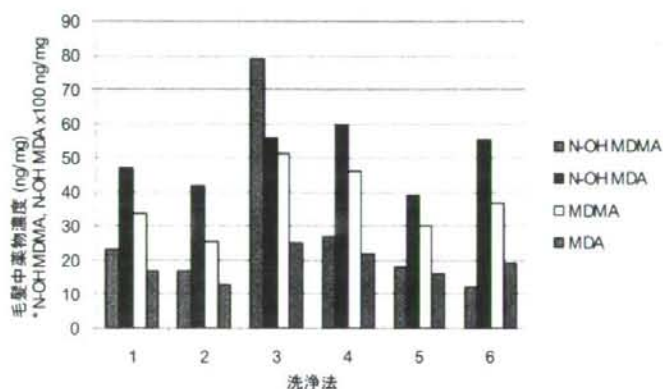


図6 ラット毛髪洗浄法6方法におけるラット毛髪抽出物中薬物濃度

1: SDS x 3+ H₂O x 3/ ultrasonic, 2: SDS x 3+ H₂O x 3/ vortex, 3: H₂O x 3/ ultrasonic, 4: CH₂Cl₂ x 3,
5: isoPrOH x 3/ ultrasonic, 6: isoPrOH x 3/ vortex

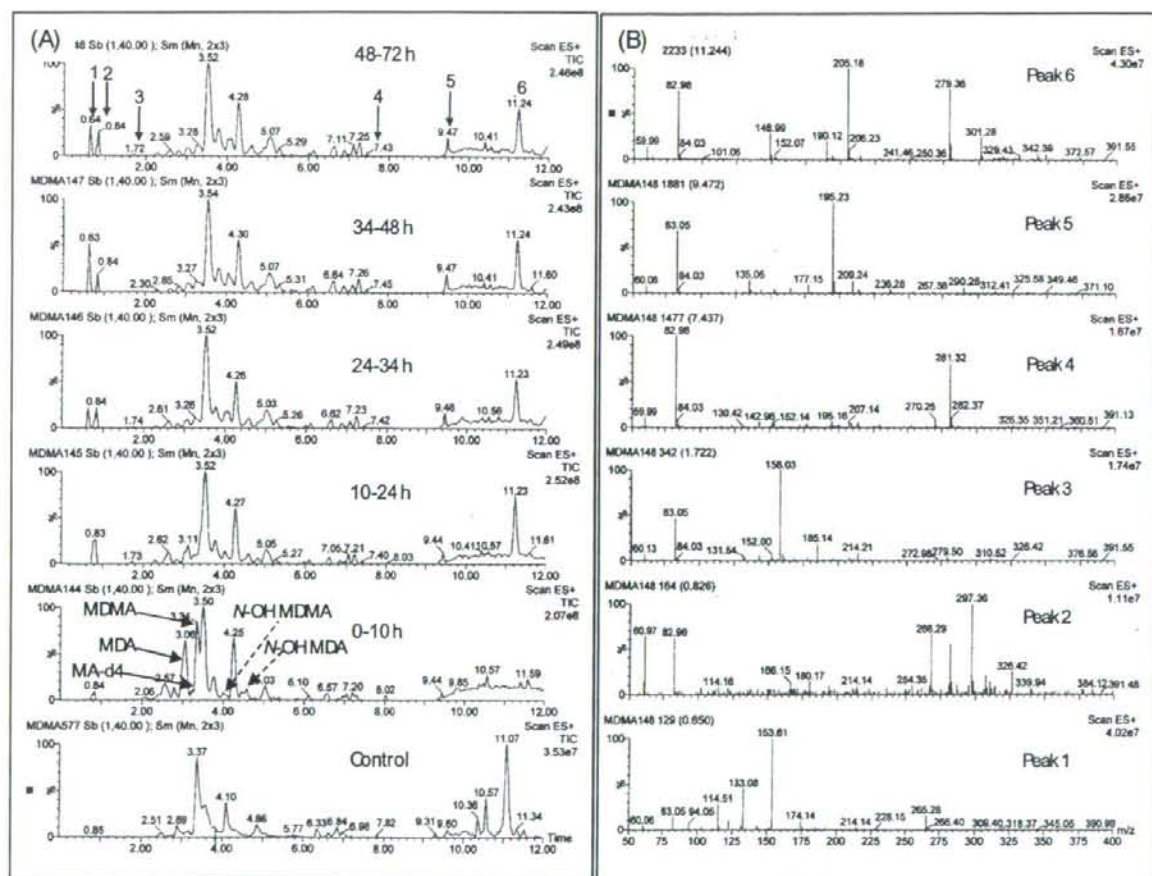


図7 コントロール及びN-OH-MDMA (5 mg/kg, i.p.) 投与後ラット尿抽出物 (投与後0-10, 10-24, 24-34, 34-48, 48-72時間尿) のLC-MS トータルイオンクロマトグラム (Scanモード) 及びマススペクトル

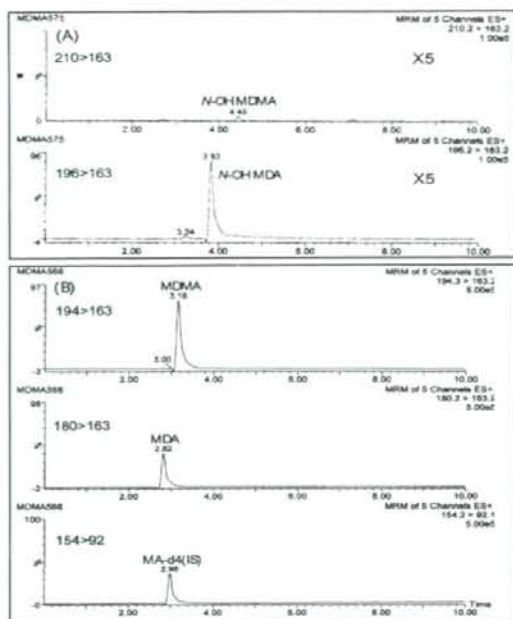


図8 *N*-OH-MDMA (5 mg/kg, i.p.) 投与ラット尿抽出物 (投与0-10時間後) のLC-MS/MSクロマトグラム

* (B) は(A)の1/100量の尿を使用, ラット3使用

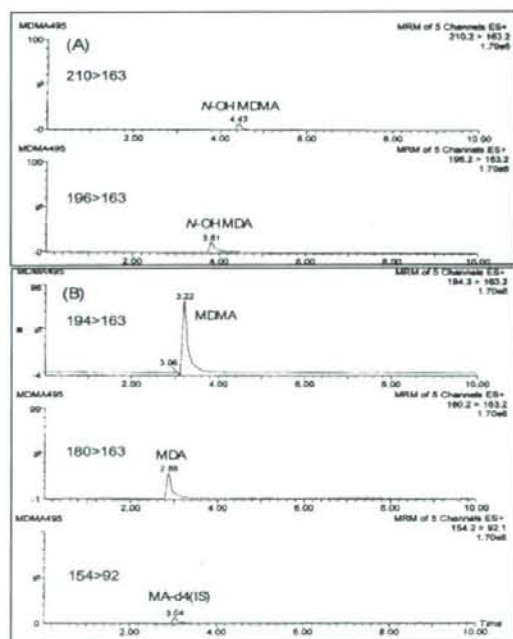


図10 *N*-OH-MDMA (5 mg/kg, i.p.) 投与ラット血漿抽出物 (投与5分後) のLC-MS/MSクロマトグラム

* (B) は(A)の1/5量の血漿を使用, ラット3使用

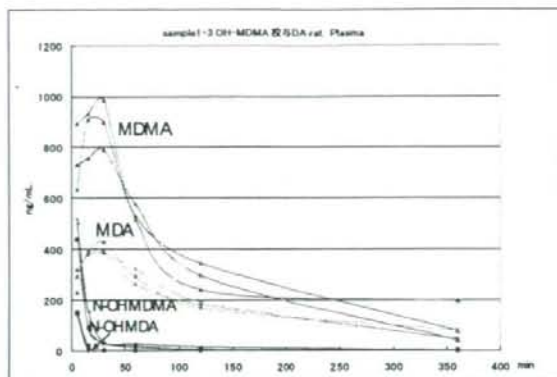


図9 *N*-OH-MDMA (5 mg/kg, i.p.) 投与ラット血漿中 *N*-OH-MDMA 及び代謝物 (*N*-OH-MDA, MDMA, MDA) の濃度変化 (n=3)

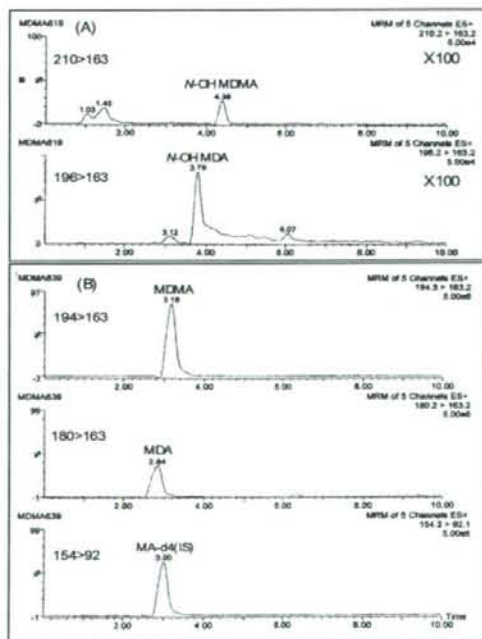


図11 *N*-OH-MDMA (5 mg/kg, i.p. x 10) 投与ラット毛髪抽出物のLC-MS/MSクロマトグラム

* (B) は(A)の1/4量の毛髪を使用, ラット3使用

分担研究課題：違法ドラッグ製品の分析法の開発、成分分析、分析標準品の調製
研究分担者：花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

－*N*-OH-MDMAのヒト肝における代謝に関する研究－

研究協力者：宮島敦子 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 主任研究官
研究協力者：簾内桃子 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 主任研究官

研究要旨 *N*-OH-MDMAは、麻薬成分 (MDMA, MDA および *N*-OH-MDA) と類似構造をもつ違法ドラッグ成分である。ヒト肝細胞および肝組織画分を用いて *N*-OH-MDMA の代謝について検討したところ、*N*-OH MDMA は Ms 画分の酵素により *N*-OH MDA, MDMA および MDA に代謝されることを明らかとした。ヒト肝における *N*-OH MDMA の *N*-脱メチル化反応には CYP 分子種が関与しており、*N*-脱水酸化反応はヒト CYP 分子種および P450 reductase 以外の Ms 画分中の還元酵素によることが推察された。

A. 研究目的

近年違法ドラッグ市場において広く流通が認められている、

N-(1-(3,4-methylenedioxyphenyl) propa*N*-2-yl)-*N*-methylhydroxylamine (*N*-OH MDMA)は、麻薬成分 3,4-methylenedioxy methamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxy amphetamine (MDA)および *N*-hydroxy-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-aminopropane (*N*-OH MDA)と類似構造をもつ化合物であり、健康危害が懸念される (Fig. 1)。

医薬品および化学物質の有効性・安全性評価において、近年、実験動物を用いた試験法の限界が指摘され、ヒトにおける有効性・安全性を評価するため様々な試験系が用いられている。特にヒトの肝細胞を用いた試験系は、薬物動態を総合的に評価できることから有用視されている。ヒトの肝組織画分、ミクロソームやサイトソルなどを用いた実験系は、

従来ヒト肝における薬物代謝活性を評価する方法として用いられてきた。ヒトにおいて薬物や化学物質の代謝に関わる主要な薬物代謝酵素としては cytochrome P450(CYP)である。ヒトにおいては CYP1A, 1B, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 3A など様々な分子種が存在し、それぞれ基質特異性を有している。近年では、分子生物学的手法により、ウイルスを用いたヒト CYP 遺伝子発現系を用いて、各分子種の代謝への関与について詳細な検討を行うことが可能となった。

本研究所生薬部において、*N*-OH MDMA を投与したラットの尿中に MDMA および MDA が主に検出されることが見出された。そこで、本研究では *N*-OH MDMA 摂取により、実際にヒト生体内において脱水酸化体である麻薬成分 MDMA が生成するか確認することを目的として、凍結ヒト肝細胞および肝組織画分を用いて *N*-OH MDMA の代謝について検討した。

また、併せて *N*-OH MDA のヒト肝における代謝についても検討した。

B. 研究方法

1. 試料

N-OH MDMA, *N*-OH MDA, MDMA, MDA / Kpi buffer 溶液, methamphetamine-d4 (MA-d4) / acetonitrile 溶液は本研究所生薬部より提供を受けた。ヒト凍結肝細胞は XenoTech (Lenexa, KS, USA)より購入したものを使用した。Pooled human liver microsomes (Ms), Pooled human liver cytosol (Cs), ヒト CYP および P450 reductase を発現させた baculo virus 昆虫細胞発現系由来 SUPERSOMES は、BD Gentest (Woburn, MA, USA)より購入したものを使用した。

Williams'E medium は GIBCO (Carlsbad, CA, USA)製を用いた。その他、用いた試薬は市販されている最上級および LC-MS グレードのものを使用した。

2. 凍結ヒト肝細胞を用いた、*N*-OH MDMA および *N*-OH MDA の代謝の検討

XenoTech 社より購入したヒト凍結肝細胞 (Lot No. 580, Male, 77 years, Caucasian)は、 8×10^4 cells /200 μ L Williams'E medium /well (48-well plate)を 200 μ M *N*-OH MDMA または *N*-OH MDA と 37°C, 5% CO₂-95% air 条件下で 0, 1, 2, 4 時間インキュベートした。反応停止は等量の氷冷 20 μ M methamphetamine-d4(MA-d4, 内標準物質) / acetonitrile 溶液添加により行った。同時に、コントロールとして、基質 200 μ M / Williams'E medium によりインキュベーション中の分解について確認した。回収した反応液は、4°C 下、3500 rpm にて 5 分間遠心分離し、上清を -80°C で保存した。UPLC-MS 測定前に、上清を膜ろ過し (Ultrafree-MC, 0.45 μ m, Millipore)試料とした。

3. ヒト肝組織画分を用いた、*N*-OH MDMA および *N*-OH MDA の代謝の検討

ヒト肝 Ms 画分および Cs 画分 0.2 mg / 200 μ L in 2.0 mL tube を 100 μ M *N*-OH MDMA または *N*-OH MDA と共に 37°C で、0, 15, 30, 60 分間インキュベートした。

反応溶液は、NADPH generating system (1.3mM NADP, 3.3mM G6P, 0.4U/mL G6PDH, 3.3mM MgCl₂) を含む 0.1M Kpi buffer (pH 7.4) を用いた。反応停止は等量の氷冷 50% acetonitrile-50% methanol 溶液添加により行った。回収した反応液は、4°C 下、3500rpm にて 5 分間遠心分離し、上清を -80°C で保存した。上清は膜ろ過し、UPLC-MS/MS の 測定試料とした。

4. Baculo virus ヒト CYP 発現系を用いた、*N*-OH MDMA の代謝の検討

Baculo virus を用いたヒト CYP 発現系は、BD Gentest 社の Human CYP + P450 Reductase + b₅ SUPERSOME を用い、CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 について検討をした。反応は、10 pmol CYP/ 200 μ L in 2.0 mL tube を用い、ヒト肝組織画分を用いた代謝と同じ条件で行った。Negative control として、空ベクターを発現させた control SUPERSOME を用いた。また、Human P450 Reductase + b₅ SUPERSOME を用いて、*N*-OH MDMA の代謝に対する P450 Reductase の関与について検討した。

5. UPLC-MS/MS による *N*-OH MDMA, *N*-OH MDA, MDMA およびの定量

試料は Waters 社の Ultra performance liquid chromatography (UPLC) - mass spectrometry (MS) / MS (ACQUITY Ultra Performance LC / Quattro Premier XE)(Milford, MA, USA)により以下の条件で測定した。

<UPLC 条件>

Column: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 x 100 mm, 1.8 μ m, Waters)

Mobile phase: A 0.1% formic acid, B 0.1% formic acid / acetonitrile

A:B 90:10 (0 min) - 70:30 (8 min)

Flow : 0.3 mL/min, Column temp.: 40°C, Injection vol.: 2 μ L

<MS/MS 条件>

Ionization: Electrospray ionization, positive,

Capillary voltage: 3 kV, Source temp.: 120°C,

Desolvation temp.: 400°C, Desolvation Gas flow: 800 L/hr, Cone Gas

flow: 50 L/hr, Collision gas flow: Ar 0.25 mL/min, MRM mode

定量値は、1– 200 μ M の濃度に調製した分析対象化合物と内標準物質(MA-d4)の 似分子イオン[M+H]⁺のピーク面積比から検量線を作成して算出した。N-OH MDMA : Parent m/z 210.2, Daughter m/z 163.2 (4.5 min), N-OH MDA : Parent m/z 196.2, Daughter m/z 163.2 (3.9 min), MDMA Parent m/z 194.3, Daughter m/z 163.2 (3.3 min), MDA : Parent m/z 180.2, Daughter m/z 163.2 (2.9 min), MA-d4 : Parent m/z 154.2, Daughter m/z 92.1 (3.1 min)

(倫理面への配慮)

本研究に使用したヒト肝臓細胞はXenoTech社、肝組織画分はBD Gentestから購入したものを使用している。これらの試料はドナーより同意を得て取得した試料を各社が市販しているもので、各社の倫理委員会の承認を得ている。いずれの試料も、ドナーを特定するような情報は一切消去され、個人を特定することは出来ないようにされており、提供者の人権を損害する危惧はない。また本研究所の倫理委員会においても必要に応じて審査を受け、承認を受けて研究を行っている。

C. 研究結果

1. 凍結ヒト肝細胞を用いた、N-OH MDMA および N-OH MDA の代謝の検討

N-OH MDMA をヒト凍結肝細胞と 37°C, 5% CO₂-95% air 条件下で 0, 1, 2, 4 時間インキュベートし、反応上清を UPLC-MS/MS により scan mode で解析した結果を Fig. 2 に示した。ヒト凍結肝細胞では、反応時間に伴って脱水酸化体である MDMA および脱水酸化・脱メチル化体である MDA の生成が認められ、MDMA が主要生成物であった。Table 1 および 2 に、N-OH MDMA および N-OH MDA を基質として、ヒト凍結肝細胞と各時間インキュベートし、反応上清中の N-OH MDMA, N-OH MDA, MDMA, MDA の濃度を測定した結果を示した。また、併せて各基質を培地のみとインキュベートし、反応液中の基質の分解について確認した。N-OH MDMA をヒト凍結肝細胞とインキュベートした結果、反応 2 時間目における MDMA および MDA の生成量はそれぞれ約 10% および 3% であった。培地の場合には、反応 4 時間目でも MDMA は検出されず、MDA の濃度も反応開始時とほとんど変わらなかった。N-OH MDA については、培地の場合には、反応 4 時間目まで濃度が変化しなかったが、ヒト肝細胞とインキュベートした結果、その濃度は 5 μ M 程度まで減少した。N-OH MDA をヒト凍結肝細胞とインキュベートした場合にも、反応時間に伴って脱水酸化体である MDA の生成が認められ、その生成量は反応 2 時間で約 20% であった。また、培地の場合には、反応 4 時間目でも MDA の濃度は、反応開始時とほとんど変わらなかった。

2. ヒト肝組織画分を用いた、N-OH MDMA および N-OH MDA の代謝の検討

ヒト肝細胞により、N-OH MDMA から