

200940018A

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

乱用薬物の分析・同定に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

(H19-医薬-一般-024)

研究代表者 合田 幸広

平成22(2010)年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

乱用薬物の分析・同定に関する研究

合田 幸広 ..... 1

## II. 分担研究報告書

### 1. 薬物の分析と同定に関する研究

花尻 瑠理

毛髪を中心としたラット生体試料中 dextromethorphan 及び levomethorphan  
の LC-MS/MS を用いた光学異性体分析について

花尻 瑠理 ..... 11

ラット毛髪を中心としたクエン酸フェンタニル及びその代謝物であるノルフェンタ  
ニルの UPLC-MS/MS を用いた生体試料中の分析法

最所 和宏 ..... 27

覚せい剤中毒患者頭髪中薬物の分析事例について

花尻 瑠理 ..... 37

蛍光誘導体化試薬を用いる尿中薬物の迅速確認法の検討

津村 ゆかり ..... 43

液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計及びデータベース検索ソフトを用いる尿中  
薬物スクリーニング法の検討

高木 敏之 ..... 51

違法ドラッグ製品から検出された大麻成分及び合成カンナビノイド等の分析

菊地 博之・内山 奈穂子 ..... 63

### 2. 薬物の分析と同定に関する研究

合田 幸広

ケシ属植物種子の発芽能力鑑定法の確立

緒方 潤 ..... 69

沖縄県自生きのこの基原種鑑別

緒方 潤 ..... 75

幻覚性サボテンの基原種について

丸山 卓郎 ..... 83

遺伝子情報を利用したケシ属植物の識別法に関する研究

河野 徳昭 ..... 91

### 3. 植物系薬物の調査と分析及び代謝物の合成に関する研究

代田 修

.....101

4. 代謝物の合成に関する研究 福原 潔	.....117
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	.....131

## 乱用薬物の分析・同定に関する研究

主任研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

平成 18 年、薬事法改正により指定薬物制度が出来、日本における乱用薬物規制は、麻薬・向精神薬取締法（及びあへん法など関連 4 法）による規制、薬事法上の指定薬物による規制、薬事法の「専ら医薬品」による規制の三層構造を持つことになった。平成 19 年 4 月より 31 品目の化合物と 1 品目の植物が指定薬物となったが(平成 21 年 3 月現在 39 化合物 1 植物)、これらのうち、有害性（精神毒性・依存性・乱用のおそれ等）の強さが示されたものは、順次麻薬・向精神薬指定される（平成 19 年以降 3 化合物が指定薬物より移行）。麻薬に指定された場合、単純所持・施用まで法律違反となる。他方、向精神薬や指定薬物の場合には、製造、輸入、販売等の流通は規制されるが、単純所持や使用は禁止されていない。

分析的な面で考えると、麻薬の場合、向精神薬や指定薬物とは異なり使用罪が問われるため、生体による代謝物を事前に明らかにして、これらの化合物についての的確に分析できることが重要となる。また、麻薬の場合、罪が重いため、複数の原理による分析法での同定が必須とされる。さらに、植物として規制される場合には、その規制する種の範囲を厳密に規定するとともに、遺伝子情報を利用した分析法が必要となる。このような状況を背景として、本研究は、①既に麻薬・向精神薬取締法（及びあへん法など関連 4 法）で規制されている化合物や植物（菌類を含む）について、薬物の乱用に的確に対応するため、代謝物を検討するとともに合成し、毛髪や尿からの代謝物まで含めた分析と同定方法等について確立する；②新たに麻薬・向精神薬指定される蓋然性の高い薬物（植物を含む）について、指定後の迅速な取締り等に出来るよう、規制範囲の検討や分析法の確立等を行う；③また、麻薬・向精神薬成分を含有する可能性の高い植物について、今後の規制の範囲を検討するため、調査・分析を行うと共に鑑定法の確立を行う；④さらに、乱用薬物の取締りの現場での諸問題に対応が行えるよう、既存の麻薬・覚せい剤・大麻等について分析法の検討を行う等を目的として行われている。

本年度は、①として、麻薬であるシロシンのグルクロン酸抱合体 (PCG) および覚せい剤メタンフェタミンの代謝物である *p*-ヒドロキシメタンフェタミングルクロン酸抱合体 (*p*-OHMAG) について、これらの抱合反応を触媒する UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の同定を行った。さらに、*p*-OHMAG 及びヒトにおいて尿中に排泄されるメタンフェタミン代謝



物の一つである *p*-ヒドロキシメタンフェタミン硫酸抱合体 (*p*-OHMAS) を合成した。また、昨年度に引き続き麻薬であるクエン酸フェンタニル及びその代謝物であるノルフェンタニルの UPLC-MS/MS を用いたラット生体試料中の分析法を検討し、低濃度薬物投与群毛髪試料及び血漿試料についても分析を行った。さらに、近年乱用が報告されている医薬品デキストロメトルファンとその光学異性体である麻薬化合物レボメトルファンについて、毛髪を中心とした生体試料中の高感度識別法を検討した。また、これまで確立した方法を利用し、覚せい剤中毒患者頭髪中薬物の分析を行った。②については、シロシン、シロシビンを含む可能性のある沖縄県自生きのこについて基原種の鑑別を行うとともに、今後麻薬植物として規制される可能性のあるカートの活性本態であるカチノンについて、揮発性イオンペア試薬を用いた分析法の確立を検討すると共に、網羅的合成法によりカチノン類縁体の合成を試みた。③については、幻覚性サボテン *Lophophora* 属植物について、核 DNA, GBSSI 領域の塩基配列を行い、本遺伝子領域の幻覚性サボテンの鑑別に対する有用性を評価した。④では、ケシ属植物種子の発芽能力鑑定法を確立すると共に、遺伝子情報を利用したケシ属植物の識別法について検討した。さらに、幻覚性サルビアの主活性本態であるサルビノリン A に対するモノクローナル抗体の作成を検討した。また、LC-MS/MS 及びデータベース検索ソフトを用いる尿中薬物スクリーニング法を検討するとともに、蛍光誘導体化試薬を用いる尿中薬物の迅速確認法を検討した。さらに、違法ドラッグ製品から検出された大麻成分及び合成カンナビノイド等の定量分析を実施した。

分担研究者

花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長

代田 修 徳島文理大学香川薬学部準教授

福原 潔 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部室長

#### A. 研究目的

現在、麻薬・向精神薬取締法、あへん法、覚せい剤取締法等で厳しく規制されている薬物はすでに 250 種類以上もある。乱用薬物の世界では、その段階で法規制されていない新規に合成された類縁体や植物類（菌類を含む）などが順次出回ることが続いている。このような乱用薬物の多様化に伴い、年度毎に麻薬指定される化合物の数が増加しており、平成 14 年度から

の平成 18 年度までの 4 年間で、13 化合物が新規に麻薬指定され、別にモダニフィルが第一種向精神薬、サイロシン、サイロシビンを含むきのこ類が麻薬原料植物に指定され、さらに、平成 19 年度では、新たに 4 化合物が麻薬指定、平成 20 年度は、N-OH-MDMA が麻薬指定された。これらの薬物を麻薬指定するためには、事前に、分析法の開発、国内の流通実態調査、諸外国の法規制状況並びに実態の調査、鑑識用麻薬標準品の準備等が行われている。他方、国民の健康被害や社会的弊害をなくす観点から、新規薬物については精神毒性・依存性・乱用のおそれ等の有害性が明らかになった段階で緊急性に基づき引き続き麻薬指定されることになる。従って、生体での代謝や代謝物について明確でない段階で指定される場合が多く、必然的に、生体試

料についての分析・同定法は確立されていない場合がほとんどである。また、また、植物には様々な形で麻薬・向精神薬成分を含むものが知られているが、植物系薬物の場合、法規制する際には、規制の範囲をどのように設定し、どのような分析法で法規制と対応するかが非常に重要な問題となる。事実平成 18 年に出来た指定薬物制度では、様々な植物系乱用薬物中サルビア・ディビナムの 1 品目のみが指定されたが、これは天然物を法指定する困難さを端的に反映したものと見える。今後、随時、植物系の薬物が指定薬物に指定され、さらに精神毒性・依存性・乱用のおそれ等の有害性が明らかになった段階で、麻薬・向精神薬に再指定されることが予想されるため、規制の範囲と、規制範囲に対応した分析法の事前検討が課題となっている。

本研究では、このような背景の下、①既に麻薬・向精神薬取締法（及びあへん法など関連 4 法）で規制されている化合物や植物（菌類を含む）について、薬物の乱用に的確に対応するため、代謝物を検討するとともに合成し、毛髪や尿からの代謝物まで含めた分析と同定方法等について確立する；②新たに麻薬・向精神薬指定される蓋然性の高い薬物（植物を含む）について、指定後の迅速な取締り等に出来るよう、規制範囲の検討や分析法の確立等を行う；③また、麻薬・向精神薬成分を含有する可能性の高い植物について、今後の規制の範囲を検討するため、調査・分析を行うと共に鑑定法の確立を行う；④さらに、乱用薬物の取締りの現場での諸問題に対応が行えるよう、既存の麻薬・覚せい剤・大麻等について分析法の検討を行う等を目的として行われている。本研究は、日本における監視指導・麻薬行政と密接な連携を経ながら遂行される。従って、日本の乱用薬物実態に

即した研究が行われるところに、本研究の特色がある。

## B. 研究方法

UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の同定のために使用した *p*-OHMAG は、*p*-OHMA を LiOH 存在下、Acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronic acid methyl ester と反応させ、さらに NaOH 5 ml を添加、室温反応後、中和し、逆相分取 HPLC にて精製し得た。*p*-OHMAS は、ピリジン中の *p*-OHMA に Pyridine-sulfur trioxide complex を添加し、50 °C で反応させ、残渣を HPLC 及び再結晶にて精製し得た。

クエン酸フェンタニル及びノルフェンタニルの分析条件は、昨年度と同様の方法を用いた。

デキストロメトルファンとその光学異性体である麻薬化合物レボメトルファンの分析には、Chiral CD-Ph column を利用した UPLC-MS/MS を用いた。

覚せい剤中毒患者頭髪中薬物の分析は、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理委員会で承認された方法に従い、独立行政法人国立病院機構下総精神医療センターにおいて採取した覚せい剤乱用患者の頭髪試料を使用した。試料の分析は、過去にバリデーションされた GC/MS を使用する方法で行った

沖縄県自生きのこの同定は、DNA を抽出、精製し、塩基配列データベースに収載されているこの ITS1 および LS 領域の塩基配列との相同性に基づいて行った。

カートは、(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部より供与された株を 2 年間生育させたもの及び徳島文理大学で所有の株を 3 年間生育させたものを用いた

*Lophophora* 属植物は、昨年度医薬基盤研究所、薬用植物資源研究センター種子島研究部が

収集したものをを用い、ゲノムDNAを調製、PCRを行い、目的のGBSSI領域の部分配列を増幅し、ダイレクトシーケンスを行った。さらに、各タイプの代表個体を選定し、そのPCR産物をサブクローニングし、各試料について、クローニングの塩基配列解析を行った。

発芽能力（発芽防止未処理）を有するケシ種子は、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部において栽培、収穫された、一貫種、フランクフルト、ローマ3号-2、トルコ2-1、イラン1、インド6、（以上、ソムニフェルム種）および、セチゲルム種（朱）の7（品）種を用いた。対照には、発芽防止処理として、各種子をオートクレーブにて120°C、30分間加熱したものを使用した。

遺伝子情報を利用したケシ属植物の識別には、ケシ属植物のアルカロイド生産に関わる二次代謝酵素遺伝子の鍵酵素と推定される(S)-3'-hydroxy-N-methylcoclaurine-4'-O-methyltransferase (4'-OMT)のゲノムDNA部分配列(4'-OMTg)の情報を、ケシ、アツミゲシ、ヒナゲシの3植物種について集積することで行った。また簡易識別法開発のため、Whatman社製FTA® Plant Card (FTAプラントセーバーカード、以下FTAカード)を使用した。

Salvinorin Aは、幻覚性サルビアより単離したものをを用いた。モノクローナル抗体作成のための細胞融合には、マウス骨髄腫細胞P3/NS1/1-AG4-1 (NS-1)を用い、免疫動物にはマウスBALB/cを使用した。

LC-MS/MSデータベース検索ソフトによるデータ解析には、薬毒物スクリーニング・定量解析用ソフトであるCliquid™を用い、ライブラリ検索及び自動レポート化を実施した。さらに、Analyst™を用い、個別の化合物ごとに目視でピーク及びスペクトルを確認した。

尿中薬物蛍光誘導体化試薬としては、4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride (DIB-Cl)を使用した。

大麻成分等の同定、定量には、ESIポジティブイオン化UPLC-MSを用いた。

<倫理面への配慮> 麻薬・覚醒剤・向精神薬等の依存性薬物の中毒患者試料からの分析に関しては、試料の採取及び取り扱いについて十分に討議し、説明文及び同意書等を作成し、国立衛研の研究倫理審査委員会の審査を受け、承認を受けたところである。また、動物実験を行う際には、実験動物に対して各所属機関の動物実験倫理委員会の定める規定に則り、動物愛護上の配慮を行う。

## C. 結果と考察

### C.1 代謝経路に関与するUDP-グルクロン酸転移酵素の同定と*p*-OHMASの合成

12種のヒトUGTアイソザイム(UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B15, and 2B17)を用いてスクリーニングを行ったところ、シロシンのグルクロン酸抱合化に関してはUGT1A8およびUGT1A9が、メタンフェタミンに関してはUGT1A9, UGT2B15が高い活性を示した。次いで、これらアイソザイムの各基質に対する速度論的パラメーターも算出した。その結果、シロシンのグルクロン酸抱合化に関し、UGT1A8の $V_{max}$ および $K_m$ は1.3 nmol/mg/min, 21 mM, UGT1A9の $V_{max}$ および $K_m$ は3.7 nmol/mg/min, 24 mMと算出された。また、メタンフェタミンに関し、UGT1A1およびUGT2B15はMichaelis-Mentenプロットにのり、前者の $V_{max}$ は0.026 nmol/mg/min,  $K_m$ は4.9 mM, 後者の $V_{max}$ は0.43 nmol/mg/min,  $K_m$ は16.2 mMであった。一方、UGT1A9はMichaelis-Mentenプロットにのらないことから、UGT1A1やUGT2B15

とは異なる反応様式であることが明らかとなった。

次に、*p*-OHMAS の合成を行い、HPLC で精製を行ったところ、収率 8.5% で *p*-OHMAS を合成する異が可能となった。本反応は定量的に進行することから、低収率は反応後の精製過程に問題があることが考えられた。そこで、収率の向上を目指して、再結晶による精製を試みた。その結果、99% の純度の *p*-OHMAS を 54% の収率で得ることができた。本化合物は現在、提供用として 0.1 g を保有している。

### C.2 フェンタニルおよびノルフェンタニルの生体試料からの分析

近年、医療従事者による違法な摂取が報道された麻薬クエン酸フェンタニル及びその代謝物であるノルフェンタニルの UPLC-MS/MS を用いたラット毛髪中の分析法を検討した。超音波抽出下酵素消化法の緩衝液、抽出温度、抽出時間を最適化することにより、クエン酸フェンタニル及びノルフェンタニルの毛髪中の分析法として、迅速な分析が可能となった。また、メタノール/5M 塩酸 (20/1) 溶液による抽出後、固相抽出により精製する方法で、毛髪中のフェンタニル及びノルフェンタニルともに精度良く分析することができた。さらに、酵素消化法による抽出でも同様に精度良く分析することができた。低濃度薬物投与 (0.1mg/kg) ラットの毛髪中より、フェンタニル 3.72 - 6.58 ng/mg hair, 及びノルフェンタニル 0.15 - 0.37 ng/mg hair 検出された。また、血漿試料についても毛髪試料と同一の精製法を適応し、精度良く分析できることが確認された。薬物投与ラットの毛髪中及び血漿中薬物濃度より、従来から薬物の毛髪への移行性の指標としていた ICR 値 (薬物毛髪中濃度/薬物血中濃度) をクエン酸フェンタニルについて算出したところ、値は 0.22

±0.01 であった。代表的な乱用薬物の同値は、11-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid の約 0.001 からコカインの約 3.6 まで幅広い値を示す。フェンタニルの値は、比較的大きなものであり、同化合物は毛髪分析に適した薬物であると考えられた。

### C.3 デキストロメトルファン及びレボメトルファンの LC-MS/MS を用いた光学異性体分析

Chiral CD-Ph column を用いた分析において、両異性体及び各々の代謝物は 12 分以内に良好に分離し、毛髪試料 10 mg を用いた際の本分析法における各化合物の検出限界は 0.025 ng/mg であった。両異性体を投与した雄 DA ラットにおける未変化体、*O*-脱メチル体、*N*-脱メチル体、*O,N*-脱メチル体の血漿中濃度及び AUC 値、尿中排泄量、毛髪中濃度を測定した結果、*O*-グルクロン酸抱合体を酵素処理してフリーの状態にした場合、両異性体投与で *O*-脱メチル体と *N*-脱メチル体の濃度比が大きく異なり、光学選択的な代謝が考えられた。Dextrometorphan 投与 DA ラット毛髪中では、未変化体、*O*-脱メチル体、*N*-脱メチル体、*O,N*-脱メチル体の濃度はそれぞれ 63.4, 2.70, 25.1, 0.70 ng/mg (100:4:40:1) であったが、levomethorphan 投与 DA ラットでは 24.5, 24.6, 2.57, 0.49 ng/mg (100:100:10:2) であり、光学異性体分析を行わなくても代謝物比から両異性体の摂取識別が検討できる可能性も考えられた。

### C.4 覚せい剤中毒患者頭髪中薬物分析

医療機関で採取された覚せい剤乱用患者の頭髪試料について、1 cm ごとに分画し、メタンフェタミン (MA) 及び代謝物アンフェタミン (AP) 濃度を測定して、頭髪中の薬物の分布状態を検討した。その結果、頭髪試料の根元から 2-3 cm の画分をピークとして、主に 1-6 cm の画分を中心に覚せい剤 MA 及び代謝物 AP が検出



された。個人差や採取部位の差、また各頭髪の成長段階の差等があるが、通常、頭髪は1ヶ月に1.1 cm程度成長することが報告されている。頭髪試料が患者の頭皮より5 mm程度の部位から採取されたことを考慮すると(さらに頭皮より毛根の先端までは5 mm程度)、試料採取の3-4ヶ月前頃をピークとして、主に2~6ヶ月前に覚せい剤に接していた可能性が考えられた。

#### C.5 沖縄県自生きのこの基原種鑑別

ITS及びLS領域のDNA塩基配列を基にした沖縄県内自生きのこの種鑑別を行ったところ、概ね、採取者の形態観察による同定と一致した(ヒカゲタケ、ミナミシビレダケ)、アイゾメヒカゲダケ(*Copelandia (Panaeolus) cyanescens*)と形態観察から推定された試料は、同種である可能性も完全には否定できないが、*Panaeolus cambodginiensis*であると考えられた。データベースに報告されていない種(ツヤマグソタケ *Anellaria antillarum*を形態観察から本種と同定)に関しては、明確な判定を示すことができなかった。また、同一配列が3種で報告されている点や、1箇所配列領域のみを報告している種など、まだ、データベースに不十分な点が多くみられることが判明した。従って、今後、きのこの塩基配列による種鑑別を行う際は、データベースの更なる充実が必須であるものと考えられた。

#### C.6 カートアルカロイドの一斉分析

揮発性イオンペア試薬を添加した移動相による逆相HPLCでのエフェドラアルカロイド一斉分析の条件を用いカートの分析を行ったところ、HPLC-CADにおいては、他の成分との重なりのためにカチノンの検出が困難であることが判明した。UPLC-MSにおいては、MSによる成分の判別が可能となったものの、この条件下で

のカチノンの存在が確認できなかった。今後、本当にカチノンが存在しないのか確認するため、より感度の良い条件の設定を検討する予定である。

#### C.7 幻覚性サボテンの基原種について

園芸市場に流通する *Lophophora* 属植物について、核DNA、GBSSI領域の塩基配列を行い、本遺伝子領域の幻覚性サボテンの鑑別に対する有用性を評価した。その結果、調査を行った試料の多くで、複数の遺伝子型が検出された。また、得られた塩基配列の一部を用いて分子系統解析を行ったところ、葉緑体DNA、trnL-F領域の塩基配列から判断された基原植物との相関性は見られず、GBSSI領域の塩基配列は、種の鑑別の目的には不向きであると考えられた。しかしながら、単一個体の塩基配列が、多数の遺伝子型で構成されていることから、その遺伝子型の構成を調査することで、薬物事犯の際の事故品のトレーサビリティ(追跡可能性)の向上に寄与しうると考えられる。

#### C.8 ケシ属植物種子の発芽能力鑑定法の確立

昨年度、大麻種子の発芽試験に代わる簡便で迅速な発芽能力鑑別法としてテトラゾリウム塩 (2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride: TTC)を用いた呈色反応による判別法を確立した。そこでケシ属植物種子にも応用可能か検討した。各種テトラゾリウム塩類試薬の中でもTTCがケシ属植物種子においても誤判定の危険性が少なく、判定できるものと考えられた。最適化された方法は以下の通りである。

前処理として45°C30分の加温、種子を押しつぶし胚組織を露出させ、2% TTC溶液(pH8.0)、45°C、40分の加温し、試薬による種子の発色を観測する。

#### C.9 遺伝子情報を利用したケシ属植物の識別法の開発

ヒナゲシとアツミゲシ由来の 4' OMTg クローンの塩基配列情報の詳細解析の結果、両植物種の識別に利用可能と考えられる塩基配列の相違点が見出された。そこで、各植物種由来のクローンに特異的にアニールするプライマーを設計し、両植物の PCR 識別を試みた。その結果アツミゲシ特異的なプライマーではアツミゲシより抽出したゲノム DNA を鋳型としたときのみ、また、ヒナゲシ特異的なプライマーではヒナゲシより抽出したゲノム DNA を鋳型としたときのみ、増幅産物を与え、すなわち、PCR 法による識別が可能であることが明らかとなった。

次いで、簡易識別法として、FTA カードを利用した識別法について検討した。FTA カード吸着 DNA を鋳型とし、PCR 反応を阻害する狭雑物の影響に耐性が高いとされる PCR 用バッファ Ampdirect Plus を使用して PCR を行ったところ、ヒナゲシ特異的なプライマーセットではヒナゲシの特異的な識別はできなかったが、アツミゲシ特異的なプライマーセットでは、アツミゲシを鋳型とした場合のみに特異的な増幅産物を与え、両植物の識別が可能であることが示された。さらに、ここで用いたアツミゲシ特異的なプライマーの塩基配列は、ケシにも存在することが明らかになったため、本手法により、栽培規制対象であるアツミゲシ及びケシを、一般栽培可能なヒナゲシと識別することが可能であることが判明した。

次に、ケシとアツミゲシの遺伝子判別について検討した。その結果、134-10r 特異的なプライマーセットを用いることで、ケシの 4 種を PCR の鋳型とした場合は増幅産物が認められず、アツミゲシの 3 種を鋳型とした場合のみ、特異的な増幅産物が得られることが判明し、両者の遺伝子識別が可能であることが明らかとなった。

#### C.10 Salvinorin A に対するモノクローナル抗体の作成

Salvinorin A の認識を目的とするモノクローナル抗体の作製を行ったが、得られた二種の抗体は同化合物と良好な特異的な反応性を示さず、同化合物を含むタンパク質構造を認識することが判明した。今後、抗体がどのような構造を認識しているのかを解明するとともに、同化合物特異的な反応性を示す抗体の作製を引き続き検討する予定である。

#### C.11 LC-MS/MS 及びデータベース検索ソフトを用いる尿中薬物スクリーニング法の検討

16 種の化合物の混合標準溶液を用いて検出状況を調べた結果、検出下限濃度が化合物により大きく変動 (1 ng/mL 以下から 500 ng/mL) することが判明した。また、2 検体の健常者の尿に添加した場合も類似の検出下限値となり、尿成分の影響は小さいことが明らかとなった。鑑定嘱託された尿 60 検体を用いて本法の実用性を検討したところ、クロマトグラムの目視または GC-MS による測定で薬物が確認されたにもかかわらず、データベース検索では不検出となる場合があり、今後鑑定において実用に供するためには、前処理法や検索パラメータの再検討を行って検出下限を引き上げることが必要と考えられた。

#### C.12 蛍光誘導体化試薬を用いる尿中薬物の迅速確認法の検討

尿中薬物を DIB-Cl と反応させて蛍光検出器付 HPLC で分析する方法 (平成 19 年度に報告) を、新規指定麻薬 7 化合物に適用した。その結果、尿に添加した薬物 (1  $\mu$ g/mL) の回収率は 69.6~119.4 % であり、検出下限値は尿中濃度として 0.01~0.2  $\mu$ g/mL であった。フェネチルアミン系薬物のみでなく、ピペラジン系薬物である TFMP 等及びトリプタミン系薬物である

AMTにも適用可能であることが明らかになった。

本法においては、試薬由来と考えられる妨害ピークが多数出現する。大きなものは保持時間10分以前に集中しているが、その後にもいくつかの妨害ピークが現れる。一方、覚せい剤及びMDA・MDMAの鑑定では、長年の経験から、妨害ピークの出現する位置及び大きさが把握されており妨害ピークの大きさは常に一定範囲内にあることが判明している。今後、鑑定嘱託例の少ない薬物にまで本法を適用するためには、より幅広い保持時間範囲にわたって妨害ピークの状況のデータを蓄積する必要があるものと考えられた。

#### C.13 違法ドラッグ製品から検出された大麻成分及び合成カンナビノイド等の分析

本製品のLC-MS分析の結果、9種の化合物normacromerine, macromerine, mescaline, harmaline, harmine, cannabidiol, cannabinol, cannabicyclohexanol,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolに由来する擬分子イオンピーク[M+H]<sup>+</sup>が認められた。これらは、各々の標品とUVスペクトル、保持時間、及びマススペクトルを比較することにより同定した。得られた検量線から算出した試料中の成分含量は、それぞれ、0.16, 0.04, 0.02, 0.33, 0.13, 0.02, 0.03, 0.54, 0.13 mg/g productであった。これらの化合物のうち、大麻の主活性成分である3種のカンナビノイド(cannabidiol, cannabinol,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol)が検出されており、本製品には大麻、またはその加工品が混入することが強く示唆された。また、合成カンナビノイドであるcannabicyclohexanolは、近年、主に“スパイス”という名称で流通する植物系違法ドラッグ製品及びその関連製品において検出例が増大したため、平成21年11月より指定薬物制度において規制対象となった化合物

である。さらに、フェネチルアミン化合物であるnormacromerine, macromerineは、幻覚性サボテンとして知られている *Coryphantha macromeris* (サボテン科)の含有成分であることが知られている。近年、他の違法ドラッグ製品からも、本サボテンが検出された事例が報告されている<sup>3)</sup>。化合物harmaline, harmine, は、違法ドラッグ市場において汎用される植物であるハルマラ (*Peganum harmala*)等の含有成分として知られており、モノアミンオキシダーゼの阻害作用をもつため、normacromerine, macromerine, mescaline, との同時摂取により幻覚作用が高まる可能性がある。なお、定量分析の結果、各分析対象化合物は、合成カンナビノイドcannabicyclohexanolが0.54 mg/gと最も高い値を示したが、その他成分は製品1g中0.5 mg未満であり、大麻主活性成分 $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolの含有量は0.01%程度であった。

#### D. 結論

本研究は、厚生労働省の乱用薬物行政と乱用薬物取締りに直接貢献することを目的に遂行される。麻薬指定される化合物は、本研究で事前に分析法が確立されることで、指定後の迅速な取締りが行われることになる。また、代謝物の合成と生体試料からの分析が遂行されることで、使用罪に対し始めて対応することが可能となる。さらに、今後対応が必要とされる植物系乱用薬物について、本研究で事前にその規制の範囲が検討され、分析、鑑定法が確立されることで、適切な規制を行うことが出来る。また、大麻や麻薬含有植物では、栽培事犯が増加しているが、本研究の結果、簡便正確な鑑定法が確立することで、迅速な取締りが行われることになり、国民の危機リスクを低減させることにな

る。特に、本年度の研究により、容易にケシ、アツミゲシとヒナゲシを区別できることになり、種を間違えて観賞用に法規制植物であるアツミゲシが大量に栽培される事例を減らすことが可能になるものと考えられる。また、ケシにおいても、大麻同様生死の迅速判別法の確立が行われ、発芽させなくても発芽能力を確認することが可能となっており、本法が利用されることで、種子の段階で破棄させることが可能となった。さらに、本研究では、乱用薬物の取締りの現場で迅速に規制化合物を同定する手法について、具体的な方法論の改良が図られており、今後の乱用薬物取締りに直接貢献するものと考えられる。

#### E. 健康危機情報

特になし

#### F. 研究発表等

論文発表等

- 1) Shoda, T., Fukuhara, K., Goda, Y., Okuda, H., "4-Hydroxy-3-methoxymethamphetamine glucuronide as a Phase II metabolite of MDMA: Enzyme-assisted synthesis and involvement of human hepatic UGT2B15 in the glucuronidation." *Chem Pharm. Bull.* **57**, 472-475 (2009).
- 2) Kawamura, M., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., "Simple and rapid screening for psychotropic natural products using Direct Analysis in Real Time (DART)-TOFMS." *Yakugaku Zasshi* **129**, 719-725 (2009).
- 3) Matsushima, Y., Shirota, O., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Eguchi, F., "Effects of *Psilocybe argenteipes* on

marble-burying behavior in mice."

*Biosci. Biotech. Biochem.* **73**, 1866-1868 (2009).

- 4) Kikura-Hanajiri, R., "Simple and rapid screening method using Direct Analysis in Real Time (DART)-MS, *FFI Journal* **215** (2), 137-143 (2010).
- 5) Shirota, O., "Charged Aerosol Detection (CAD): A new universal approach for HPLC." *FFI Journal* **215** (2), 144-153 (2010).
- 6) Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Miyajima, A., Sunouchi, M., Goda, Y. "Determination of a new designer drug, N-hydroxy-3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites in rats using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Forensic Science International*, on-line available, (2010).

学会発表等

- 1) 河野徳昭, 薬用植物資源の高度利用を目指して, 日本生薬学会第56回年会若手企画シンポジウム「これからの生薬 -6年制教育のもたらす変革を意識して-」(2009年10月, 京都) .
- 2) 久保泰裕, 蓮田知代, 山崎 朗, 青柳 裕, 代田 修, 関田節子, 竹谷孝一, 幻覚性ジテルペン salvinorin A に対するモノクローナル抗体の作製及びその応用, 日本薬学会第130年会, (2010年3月, 岡山) .
- 3) 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 毛髪を中心としたラット生体試料 dextromethorphan 及び levomethorphan の LC-MS/MS を用いた光学異性体分析について, 日本薬学会第130年会 (2010年3月, 岡山) .

- 4) 緒方 潤, 内山奈穂子, 菊地博之, 徳本廣子, 花尻 (木倉) 瑠理, 合田幸広, 植物系違法ドラッグ製品いわゆる“ブレンドハーブ”の基原植物について, 日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月, 岡山).
- 5) 正田卓司, 福原潔, 合田幸広, 奥田晴宏, 覚せい剤の代謝経路に関与する UDP-グルクロン酸転移酵素の同定, 日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月, 岡山) 本発表はハイライトポスターに選ばれた.



分担研究報告書

研究分担課題 薬物の分析と同定に関する研究

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

毛髪を中心としたラット生体試料中 dextromethorphan 及び levomethorphan の  
LC-MS/MS を用いた光学異性体分析について

研究要旨 非麻薬性鎮咳薬として一般用医薬品としても広く利用されている dextromethorphan と、強い鎮痛作用を有し麻薬として世界的に規制されている光学異性体 levomethorphan に着目し、両薬物の摂取識別法を開発することを目的とし、薬物投与ラットにおいて、血漿中、尿中及び毛髪中の各化合物及び代謝物について、LC-MS/MS を用いた光学異性体分離分析法を検討した。Chiral CD-Ph column を用いた分析において、両異性体及び各々の代謝物は 12 分以内に良好に分離し、毛髪試料 10 mg を用いた際の本分析法における各化合物の検出限界は 0.025 ng/mg であった。両異性体を投与した雄 DA ラットにおける未変化体、*O*-脱メチル体、*N*-脱メチル体、*O,N*-脱メチル体の血漿中濃度及び AUC 値、尿中排泄量、毛髪中濃度を測定した結果、*O*-グルクロン酸抱合体を酵素処理してフリーの状態にした場合、両異性体投与で *O*-脱メチル体と *N*-脱メチル体の濃度比が大きく異なり、光学選択的な代謝が考えられた。Dextromethorphan 投与 DA ラット毛髪中では、未変化体、*O*-脱メチル体、*N*-脱メチル体、*O,N*-脱メチル体の濃度はそれぞれ 63.4, 2.70, 25.1, 0.70 ng/mg (100:4:40:1) であったが、levomethorphan 投与 DA ラットでは 24.5, 24.6, 2.57, 0.49 ng/mg (100:100:10:2) であり、光学異性体分析を行わなくても代謝物比から両異性体の摂取識別が検討できる可能性も考えられた。

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

Dextromethorphan は、非麻薬性中枢性鎮咳薬として一般用医薬品としても広く利用されている化合物である。一方、光学異性体である levomethorphan は、鎮咳作用のみならず、強い鎮痛、呼吸抑制作用及び依存形成を有するため、医薬品としての使用実績はなく、麻薬として世界的に規制されている (Fig. 1)。

Dextromethorphan は NMDA 受容体の非競合的拮抗薬であり、治療量では levomethorphan に見ら

れる麻薬様作用等の副作用がないとされている。しかし、多量に摂取すると脳中枢のセロトニン濃度を上昇させ、多幸感や幻覚等が発現することが指摘されており、若者の間で乱用されている<sup>1)</sup>。米国 FDA では、適切に使用すれば安全だが、乱用すれば脳や心臓に損傷を与え、死に至る可能性もあると警告している。実際、米国ではインターネットで購入した本化合物の過剰摂取による死亡例も報告されている<sup>2)</sup>。また、韓国においても乱用が問題となっており<sup>3)</sup>、日本においても、違法ドラッグとして流通が認められたため、現在では、「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）」のリストに記載され、薬事法上での規制

対象となっている。

Dextromethorphan のヒトでの代謝は、主に *O*-脱メチル化と *N*-脱メチル化、またそれに続く *O*-グルクロン酸抱合反応である<sup>4,5)</sup>。脱メチル化反応には、主に、それぞれ肝ミクロゾーム中の代謝酵素 CYP2D6 及び CYP3A4 が関与していることが報告されている<sup>6,7)</sup> (Fig. 2)。*O*-脱メチル体である dextrorphan は活性代謝物であるが、ヒトにおいて、dextromethorphan の *O*-脱メチル化に主に関与する CYP2D6 には遺伝子多型が認められており、poor metabolizer と extensive metabolizer が存在する<sup>8-10)</sup>。一方、levomethorphan に関する代謝報告はないが、dextromethorphan と同様に、生体内においてまずは *O*-及び *N*-脱メチル化が起こることが予想される。*O*-脱メチル体である levorphanol は、鎮痛、鎮咳の諸作用を有し、特に、鎮痛作用はモルヒネの約 4 倍の効力を有する合成鎮痛薬(未承認)である。呼吸抑制・平滑筋収縮作用・依存形成も強く、麻薬としても規制されている。

本研究では、一般用医薬品として広く流通しているが乱用も認められている dextromethorphan と麻薬として厳しく規制されている levomethorphan の摂取識別法を開発することを目的として、薬物投与ラットにおいて、血漿中、尿中及び毛髪中の各化合物及び代謝物 (*O*-脱メチル体、*N*-脱メチル体、*O,N*-脱メチル体) について、LC-MS/MS を用いた光学異性体分離分析法を検討した。また、光学活性の違いによる代謝の差異についても考察を加えた。

## B. 研究方法

### 1. 実験材料

Dextromethorphan HBr (Sigma), Dextrorphan tartrate (Sigma), 3-hydroxymorphinan HBr (3-HM, Sigma), 3-methoxymorphinan HCl (3-MEM, Sigma), levomethorphan (Cerilliant) 及び内標準物質 (IS) として使用した levallorphan tartrate (Sigma) はそ

れぞれ括弧内に記載した会社のものを使用した。Levorphanol は東京大学大学院薬学研究系研究科長野先生より、確認用に用いた dextrorphan-*O*-glucuronide は国立医薬品食品衛生研究所薬理部簾内先生よりご供与いただいたものを使用した。β-Glucuronidase 溶液 (103000 units/mL) は和光純薬のものを、その他、固相抽出カラムは OASIS HLB 3cc (60 mg, Waters), 遠心用膜フィルターは Ultrafree-MC (Durapore PVDF 0.45µm, Millipore) を使用した。

### 2. 実験動物

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 dextromethorphan HBr 注射用生理食塩水溶液 (2.5 mg/mL) を、ラット 4~6 には levomethorphan 溶液 (2.5 mg/mL, Emulphor/エタノール/注射用生理食塩水 (0.5:0.5:9) に溶解) を 5 mg/kg ずつ各 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<sub>0-360min</sub>) 値は台形法により算出した。尿試料は、最終投与後、1 匹ずつ代謝ケージに入れて、投与後 0~24, 24~48, 48~72 時間の尿を採取し、分析まで -20°C で保存した。毛髪試料は分析に先立ち、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液、水で各 3 回、1 分間ずつ超音波下洗浄した後、乾燥して、はさみにより 0.5 mm 程度に細かく切

って使用した。

(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. LC-MS/MS 分析条件

対象化合物の保持時間, MS/MS 分析の各条件等は、Table 1 及び 2 に示した。

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

<LC 条件>

#### 1. UPLC 分析

カラム : ACQUITY UPLC HSS T3 1.8  $\mu$ m, 2.1 x 100 mm (Waters), 移動相 : 1% Formic acid / CH<sub>3</sub>CN with 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  $\mu$ L

#### 2. キラル分析

カラム : Chiral CD-Ph 2.0 x 150 mm 5  $\mu$ m (Shiseido) 移動相 : 1% Formic acid / CH<sub>3</sub>CN with 1% Formic acid 80/20 (2 min hold) - 70/30 (15min), 流速 : 0.25 mL, カラム温度 : 30°C, 注入量 : 2  $\mu$ L

<質量分析条件>

Electrospray ionization : positive, Capillary : 3 kV, Source temp. : 120°C, Desolvation Temp. : 400°C (キラルカラム使用時は 350°C), Cone Gas Flow : 50 L/hr, Desolvation Gas Flow : 800 L/hr, Collision gas flow : Ar 0.25 mL/min

### 4. 試料からの抽出方法

#### 1) 血漿試料

血漿試料 50  $\mu$ L に IS 100 ng/mL MeOH 溶液を 40  $\mu$ L 加え、さらに MeOH を 110  $\mu$ L 加える。よく振り混ぜ氷上で保持した後、3°C, 12000rpm で3 分間遠心分離を行い、上清をフィルターろ過して、

LC-MS/MS 測定試料とした。

#### 2) 尿試料

尿試料 100  $\mu$ L に蒸留水 1 mL, IS 1  $\mu$ g/mL 水溶液を 50  $\mu$ L 加え、固相抽出を行った。

#### 3) 毛髪試料

洗浄して細片にした毛髪試料 10 mg を量り取り、5M HCl/MeOH (1:20) 溶液 1 mL 及び IS 1  $\mu$ g/mL MeOH 溶液を 50  $\mu$ L 加え、1 時間超音波抽出を行った後一晩室温放置する。抽出液をろ過後、窒素気流下で乾固させ、蒸留水 1mL に溶解後、固相抽出を行った。

### 5. $\beta$ -Glucuronidase 酵素処理

#### 1) 血漿試料

血漿試料 25  $\mu$ L に  $\beta$ -glucuronidase 溶液 20  $\mu$ L, 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 5) 50  $\mu$ L を加え、37°C で 20 時間振盪した。IS 100 ng/mL MeOH 溶液を 40  $\mu$ L および MeOH を 100  $\mu$ L 加え、4. 試料からの抽出方法の 1) 血漿試料と同様にタンパク沈殿を行い測定試料とした。

#### 2) 尿試料

尿試料 50  $\mu$ L に  $\beta$ -glucuronidase 溶液 100  $\mu$ L, 10mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 5) 1 mL 及び IS 1  $\mu$ g/mL 水溶液 50  $\mu$ L を加え、37°C で 20 時間振盪し、反応液について固相抽出を行った。特にグルクロン酸抱合体の多い 0-24 h の尿試料については、使用量を 20 $\mu$ L に減らして、抱合体がクロマトグラム上検出限界以下に分解されることを確認し、他成分の定量を行った。

### 6. 固相抽出条件

尿 (酵素処理済みを含む) 及び毛髪の固相抽出用溶液について、固相抽出カラム OASIS HLB を用いて抽出を行った。MeOH 2 mL 及び蒸留水 2 mL で活性化したカラムに試料を吸着させた後、水 2 mL で洗浄し、MeOH 1 mL により目的化合物を溶出した。溶出液を LC-MS/MS 測定用試料とし

た。

7. 各試料の分析における検出限界，定量限界，検量線範囲，回収率，精度及び真度について

検量線は，DA ラットコントロール毛髪試料 10 mg を測りとり，各濃度が 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 25, 50 ng/mg hair となるようにそれぞれの薬物の標準溶液及び IS MeOH 溶液 (1 µg/mL) 50 µL を加え，前述した方法で分析操作を行い，内標準物質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) 及び真度はラットコントロール毛髪試料 10 mg に各化合物の標準溶液を 0.1, 5.0, 50.0 ng/mg hair の 3 濃度になるように添加し，IS 溶液を加え，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。真度は抽出操作における回収率と添加した各化合物の量の差として算出した。また，回収率は，ラットコントロール毛髪試料 10 mg に各化合物の標準溶液を 10 ng/mg となるように添加し，分析法の全操作を 5 回ずつ繰り返し測定し，同濃度の標準溶液で得られたピーク面積と比較して算出した。

同様に，DA ラットコントロール血漿 25 µL に各薬物の標準溶液 (最終濃度 1.0-400 ng/mL) 及び IS 水溶液を加えて検量線を作成すると共に，精度及び真度 (2.0, 20, 200 ng/mL)，回収率 (80 ng/mL) を検討した。また，尿試料についても，DA ラットコントロール尿 50 µL に各薬物の標準溶液 (最終濃度 5.0-10000 ng/mL，ただし Levometorphan 及び Levorphanol は 10-10000 ng/mL) 及び IS 水溶液を加えて検量線を作成すると共に，精度及び真度 (5.0, 500, 5000 ng/mL，ただし Levometorphan 及び Levorphanol は 10, 500, 5000 ng/mL)，回収率 (500 ng/mL) を検討した。各試料中薬物の検出限界及び定量限界は，MRM クロマトグラム上，それぞれ  $S/N > 3$  及び  $S/N > 10$  となる最小試料濃度とした。

なお，Levomethorphan の *N*-脱メチル体及び *O,N*-脱メチル体 ((-)-3-MEM 及び (-)-3-HM) の定量値については，標準化合物が入手できなかったので，

(+)-3-MEM 及び (+)-3-HM の検量線を用いて算出した。LC-MS/MS 分析において，定量分析はキラルカラムを用いた分析により行い，(-)-3-MEM 及び (-)-3-HM の確認は，ODS 系の UPLC カラムを用いた分析での (+)-3-MEM 及び (+)-3-HM とのピーク的一致により行った。

## C. 研究結果

### 1. 分析法

UPLC HSS T3 カラムを用いた分析において，本分析条件において，dextrometorphan/levometorphan, dextrophan/levorphanol, 3-MEM, 3-HM, dextrophan/levorphanol-3-glucronide, levallorphan は 7 分以内に良好に分離した。また，キラルカラム (Chiral CD-Ph) を用いた分析においても，上記化合物の光学異性体は 12 分以内にすべて良好に分離し，クロマトグラム上，他成分の妨害は認められなかった。

DA rat 血漿，尿及び体毛中の dextrometorphan, levometorphan 及び代謝物のキラルカラム (Chiral CD-Ph) を用いて定量分析を行う際の分析法バリデーション結果 (検出限界，定量限界，検量線範囲，回収率，精度及び真度) を Table 3 に示した。本分析法における各生体試料中薬物の定量限界は，血漿試料で 0.8-1.0 ng/mL，尿試料で 2.5-5.0 ng/mL，毛髪試料で 0.05-0.1 ng/mg であり，定量範囲での精度，真度は血漿及び尿試料の定量限界付近濃度でわずかに 20% を超えた試料も見られたが，特に毛髪試料では良好な値を示した。

### 2. 血漿中濃度変化

Dextrometorphan を DA ラットに投与した場合，β-glucuronidase 酵素未処理の血漿試料では，未変化体が主に検出された。O-脱メチル体 dextrophan 及び *N*-脱メチル体 3-MEM は最高血中濃度で未変化体の 1/15~1/20 程度の濃度であり，*O,N*-脱メチル体である 3-HM は定量限界付近の濃度であった。

(Fig. 3 及び 4). Levometorphan 投与 DA ラットにおいては、未変化体と共に、*O*-脱メチル体 levorphanol が最も高濃度検出され、*N*-脱メチル体及び *O,N*-脱メチル体は同程度の濃度で未変化体の 1/15~1/20 程度検出された。また、両化合物共に、LC-MS/MS クロマトグラム上では *O*-脱メチル体の glucuronide が高濃度検出された。一方、血漿試料を  $\beta$ -glucuronidase で酵素処理を行うと、dextrometorphan 投与ラット血漿試料においては、dextrorphan 及び 3-HM 濃度が上昇し、未変化体の 3 倍程度となった。Levometorphan 投与試料においては、levorphanol 濃度が未変化体濃度の 6 倍程度、3-HM 濃度も 2 倍程度まで上昇した。血漿中  $AUC_{0-360min}$  を比較しても、*O*-脱メチル体の生成量は levometorphan の方が明らかに多く (Fig.5), DA ラットにおいては、levometorphan と dextrometorphan で *O*-脱メチル化に光学選択的な代謝があることが明らかとなった。なお、両化合物投与試料共に、酵素処理を行うことにより、LC-MS/MS クロマトグラム上の glucuronide のピークが検出されなくなることから、本条件下で glucuronide はほぼ完全に加水分解していると考えられた。

Fig.3 に Rat 2 (dextrometorphan 投与) 及び Rat 4 (levometorphan 投与) の薬物投与 30 分後の血漿抽出物の LC-MS/MS の MRM mode におけるトータルイオンクロマトグラムを示した。図中、(A) は  $\beta$ -Glucuronidase 酵素未処理の試料、(B) は処理済みの試料を、(1) はキラルカラム (Chiral CD-Ph) を、(2) は UPLC HSS T3 カラムを用いた分析結果を示す。両カラムを用いた分析により、標準化合物を有しない(-)-MEM 及び(-)-HM について、ピークの確認を行った。また、Fig.4 に  $\beta$ -Glucuronidase 酵素未処理 ((A)-1 及び(B)-1) と処理済み ((A)-2 及び(B)-2) の、Rat 3 (dextrometorphan 投与、(A)) 及び Rat 6 (levometorphan 投与、(B)) の薬物初回投与後の血漿中薬物濃度変化 (0-360 分) を示す。

さらに、Fig.5 に、 $\beta$ -Glucuronidase 酵素未処理と処理済みの、Rat 3 (dextrometorphan 投与) 及び Rat 6 (levometorphan 投与) の薬物投与後 360 分までの各薬物濃度の血漿中 AUC 値を示した。

### 3. 尿中への排泄量

Dextrometorphan を DA ラットに投与した場合、 $\beta$ -glucuronidase 酵素未処理の尿試料では、投与後 72 時間を通して、dextrorphan, 3-MEM と共に *O,N*-脱メチル体である 3-HM が主に検出された (Fig. 6 及び 7)。Levometorphan 投与 DA ラットにおいては、levorphanol が最も高濃度検出され、次いで *O,N*-脱メチル体が検出された。また、両化合物共に、LC-MS/MS クロマトグラム上では *O*-脱メチル体及び 3-HM の glucuronide と思われるピークが極めて高濃度検出された。一方、尿試料を  $\beta$ -glucuronidase で酵素処理を行うと、dextrometorphan 投与ラット血漿試料においては、3-HM 濃度が最も高く、dextrorphan が 3-HM の 1/2 程度検出された。Levometorphan 投与試料においては、levorphanol 濃度が 3-HM の 6 倍程度検出され、両化合物投与尿中では、*O*-脱メチル体と *O,N*-脱メチル体の排泄量比は逆転していた (Fig.7 及び Fig.8)。以上の結果は、血漿試料と同様、levometorphan と dextrometorphan で *O*-脱メチル化に光学選択的な代謝があることを示唆していた。なお、両化合物投与尿試料共に、酵素処理を行うことにより、LC-MS/MS クロマトグラム上の glucuronide のピークがほぼ検出されなくなることから、本条件下で glucuronide はほぼ完全に加水分解していると考えられた。

Fig.6 に Rat 2 (dextrometorphan 投与) 及び Rat 4 (levometorphan 投与) の薬物投与 0-24 時間後の尿抽出物の LC-MS/MS の MRM mode におけるトータルイオンクロマトグラムを示した。図中、(A) は  $\beta$ -Glucuronidase 酵素未処理の試料、(B) は処理済みの試料を、(1) はキラルカラム (Chiral CD-Ph)



を、(2)は UPLC HSS T3 カラムを用いた分析結果を示す。

また、Fig.7 に  $\beta$ -Glucuronidase 酵素未処理 ((A)-1 及び(B)-1) と処理済み ((A)-2 及び(B)-2) の、Rat 3 (dextrometorphan 投与, (A)) 及び Rat 6

(levometorphan 投与, (B)) の薬物最終投与後の尿中薬物濃度変化 (0-72 時間) を示す。さらに、Fig.8 に、 $\beta$ -Glucuronidase 酵素未処理と処理済みの、Rat 3 (dextrometorphan 投与) 及び Rat 6

(levometorphan 投与) の薬物採取投与後 72 時間までの各薬物の尿中総排泄量を示した。

#### 4. 毛髪中濃度

Dextrometorphan 及び levometorphan を 5 mg/kg ずつ連続して 10 日間投与し、初回投与 4 週後に新たに背部に生えてきた毛髪を採取し、各薬物濃度を測定した。その結果、dextrometorphan 投与ラット毛髪中では、未変化体、*O*-脱メチル体、*N*-脱メチル体、*O,N*-脱メチル体の濃度はそれぞれ 63.4, 2.70, 25.1, 0.70 ng/mg (100:4:40:1) であったが、levomethorphan 投与ラットでは 24.5, 24.6, 2.57, 0.49 ng/mg (100:100:10:2) であり、明らかに代謝物の濃度比が異なった。Fig.9 に、Rat 2

(dextrometorphan 投与) 及び Rat 4 (levometorphan 投与) の薬物投与 4 週後の毛髪抽出物の

LC-MS/MS の MRM mode におけるトータルイオンクロマトグラムを示した。図中、(1)はキラルカラム (Chiral CD-Ph) を、(2)は UPLC HSS T3 カラムを用いた分析結果を示す。また、Fig.10 に、Rat 2 (dextrometorphan 投与) 及び Rat 4 (levometorphan 投与) の血漿試料 (30 min)、尿試料 (0-24 h) 及び毛髪試料の抽出物の定量に用いた LC-MS/MS MRM クロマトグラムを示した。

血漿中、尿中及び毛髪中の各薬物量を比較すると ( $\beta$ -Glucuronidase 酵素処理)、尿中総排泄量 (0-72 h) としては、dextrometorphan 投与時は 3-HM の排泄量が最も多く dextrometorphan の 2 倍程度の量であ

ったが、levometorphan では逆に levorphanol 量が多く、3-HM 量は 1/5 程度であった。3-MEM に関しては、両者ともに排泄量が少なく特に

levometorphan では 0.13  $\mu$ g 程度であった。血漿中 AUC においては、0-360 分の AUC 値では特に dextrometorphan 投与において 3-MEM 及び 3-HM

の血漿中濃度が半減期にも達しておらず正しい評価は困難であるが、尿中排泄量と類似の傾向が見られた。一方、毛髪中においては、両化合物投与共に、未変化体が主に検出されたが、

dextrometorphan 投与では次いで 3-MEM が未変化体の 1/2 程度、levometorphan 投与で levorphanol

が未変化体と同程度検出されており、3-HM は共に低濃度であった。薬物の血中から毛髪への移行は、化合物の物性が大きく関与しており、一般に塩基性が高く、脂溶性が高い化合物が移行しやすい。そのため、脂溶性が最も高い未変化体や、塩

基性が高い *N*-脱メチル体が血中濃度を考慮すると比較的高濃度毛髪中から検出され、極性が最も高い 3-HM 濃度が低い可能性が考えられた。いずれの試料においても、levometorphan 投与において

は、*O*-脱メチル体の濃度比が高い傾向にあり、代謝物比から両異性体の摂取識別が検討できる可能性も考えられた。Table 4 に dextrometorphan 投与及び levometorphan 投与の薬物初回投与後 360

分までの各薬物濃度の血漿中 AUC 値

( $\beta$ -Glucuronidase 酵素未処理(-)及び処理済(+))、薬物最終投与後 72 時間までの各薬物の尿中総排泄量 ( $\beta$ -Glucuronidase 酵素未処理(-)及び処理済(+)) 及び毛髪中各薬物濃度をまとめた。また、Fig.11 に血漿中 AUC<sub>0-360min</sub>、尿中総排泄量、毛髪中各薬物の量比をまとめた。

#### D. 考察

DA rat に dextrometorphan 及び levometorphan を投与して、血漿、尿、毛髪中の各代謝物を測定したところ、各試料中の *O*-脱メチル体、*N*-脱メチル

体, *O,N*-脱メチル体の濃度比に大きな差が認められ, 光学選択的な代謝が示唆された. 特に毛髪試料においては, 代謝活性の差が長期にわたり蓄積されるため, 光学異性体分析を行わなくても毛髪中の代謝物比から両異性体の摂取識別が検討できる可能性が考えられた. しかし, dextrometorphan の *O*-脱メチル化に主に関与する CYP2D6 には多型が認められており, 例えばヨーロッパ人種の 5-10%が CYP2D6 の poor metabolizer であることが報告されている. 実際の dextrometorphan 使用者のヒト毛髪分析に関する論文報告がないため, dextrometorphan に関するヒト毛髪分析のデータを蓄積し, 代謝物濃度比について検討を加える必要があると思われる.

また, dextrometorphan について, メス DA rat と SD rat の肝ミクロゾームにおける *O*-脱メチル化を比較すると,  $V_{max}$  に差異は認められないものの, 各ミクロゾーム画分に対する親和性は, DA rat は SD ラットの 1/50 程度であり, *O*-脱メチル化活性に, ヒトの poor metabolizer と extensive metabolizer に類似した差異が認められることが報告されている<sup>11,12)</sup>. 今回, 有色毛髪への薬物の移行性を検討するために, オスの DA rat (茶褐色体毛) を使用したが, 代謝にはヒトとラットの差のみならず, ラットにおいても種差や性差がある. DA rat で認められた dextrometorphan と levometorphan の光学選択的な代謝についてさらに検討するためには, オスの DA rat だけではなく, メスの DA rat や他のラット種, またヒト組織を用いた検討を行う必要があると思われる. 現在, SD rat 及びヒトの肝ミクロゾーム画分における dextrometorphan, levometorphan の代謝を検討している. さらに, CYP2D6 及び CYP3A4 について, baculo virus を用いたヒト CYP 発現系を用いた両化合物の光学選択的な代謝についても検討中である.

## E. 結論

一般用医薬品である dextrometorphan と麻薬として規制されている光学異性体 levometorphan に着目し, 両薬物の摂取識別法を開発することを目的とし, 薬物投与ラットにおいて, 血漿中, 尿中及び毛髪中の各化合物及び代謝物について, LC-MS/MS を用いた光学異性体分離分析法を検討した. Chiral CD-Ph column を用いた分析において, 両異性体及び各々の代謝物は 12 分以内に良好に分離し, 毛髪試料 10 mg を用いた際の本分析法における各化合物の検出限界は 0.025 ng/mg であった. 両異性体を投与した雄 DA ラットにおける未変化体, *O*-脱メチル体, *N*-脱メチル体, *O,N*-脱メチル体の血漿中濃度及び AUC 値, 尿中排泄量, 毛髪中濃度を測定した結果, *O*-グルクロン酸抱合体を酵素処理してフリーの状態にした場合, 両異性体投与で *O*-脱メチル体と *N*-脱メチル体の濃度比が大きく異なり, 光学選択的な代謝が考えられた. 特に dextrometorphan 投与 DA ラット毛髪中では, 未変化体及び *O*-脱メチル体, *N*-脱メチル体, *O,N*-脱メチル体の濃度比は 100:4:40:1 であったが, levometorphan 投与 DA ラットでは 100:100:10:2 であり, 光学異性体分析を行わなくても代謝物比から両異性体の摂取識別が検討できる可能性も考えられた.

## F. 参考文献

- 1) P. A. Chyka et al., *Clinical Toxicology*, 45, 662-677 (2007).
- 2) B. K. Logan et al., *J. Anal. Toxicol.*, 33, 99-103 (2009).
- 3) S. C. Kim, *Forensic. Sci. Int.*, 161, 185-188 (2006).
- 4) J. W. Barnhart, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 55(1), 43-48 (1980).
- 5) C. Koppel et al., *Arzneimittelforschung*, 37(11), 1304-1306 (1987).
- 6) E. Jacqz-Aigrain et al., *Pharmacogenetics*, 3(4),