

スキーム 1. サルビノリン A ハプテン (3) 及び抗原 (5-7) の作製

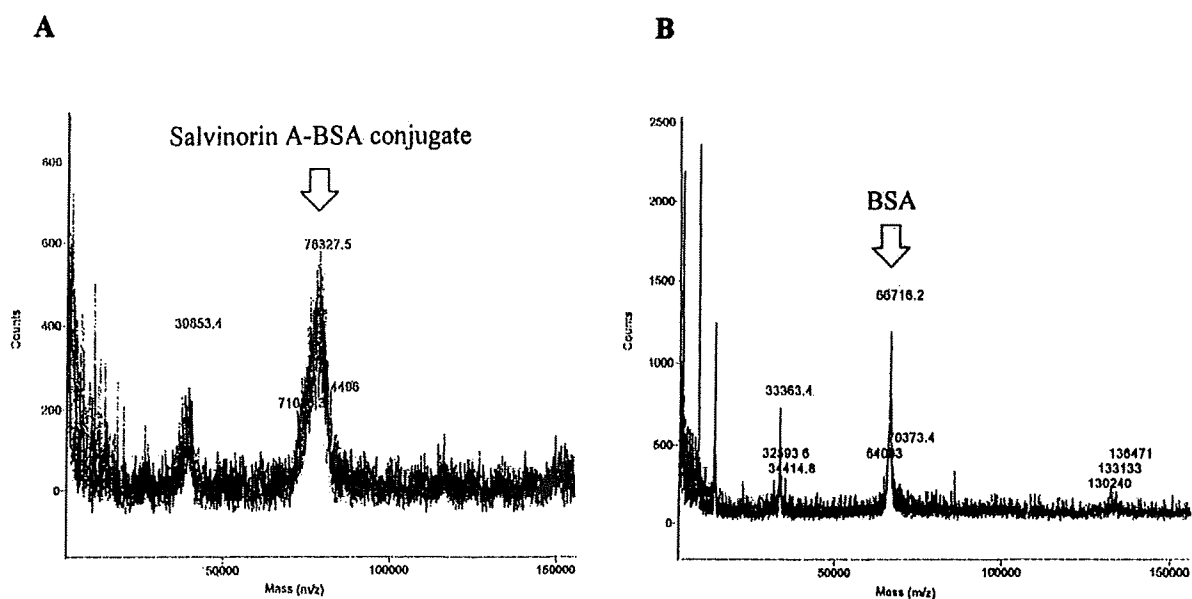


図 1. サルビノリン A-BSA 複合体 (5) (A) および BSA (B) の MALDI-TOF-MS スペクトル

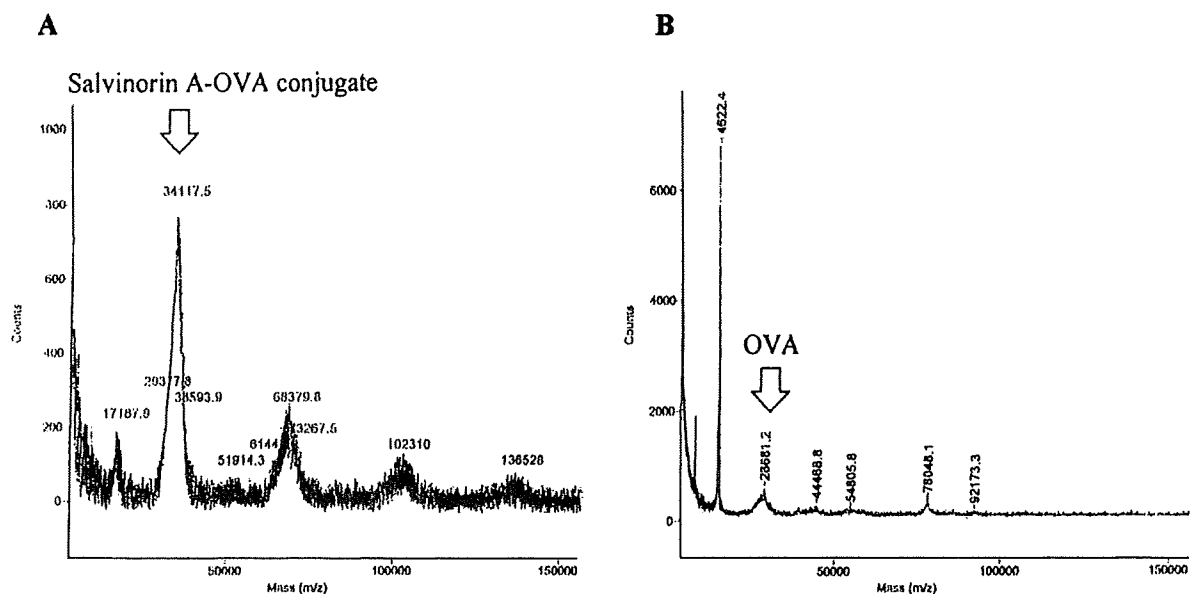


図2. サルビノリンA-OVA複合体 (6) (A) およびOVA (B) のMALDI-TOF-MSスペクトル

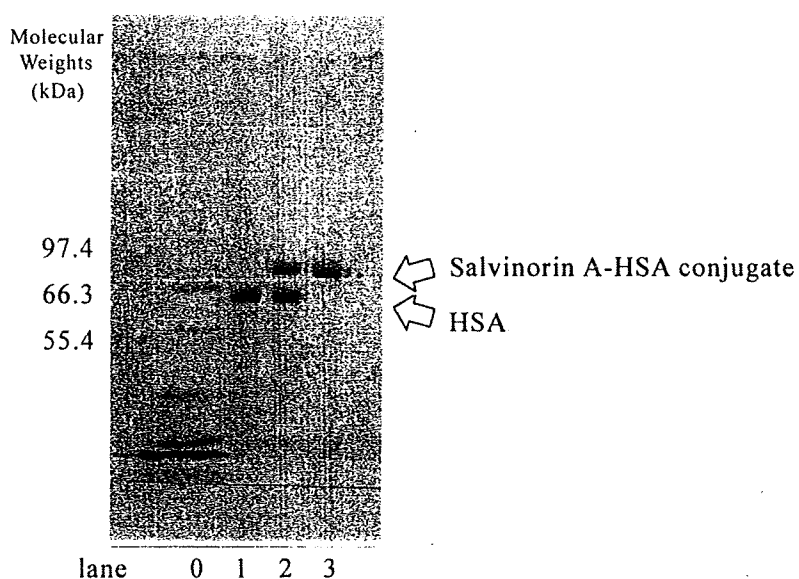


図3. サルビノリンA-HSA複合体 (7) (A) およびHSA (B) のSDS-PAGE
lane 0 : マーカー、1 : HSA、2 : HSA 及びサルビノリンA-HSA複合体 (7)、3 : 7

表1. ハプテンとキャリアタンパク質との縮合反応条件およびタンパク質当たりのハプテン結合数

Compound	Protein (eq)	Et ₃ N (eq)	Temp. (°C)	Time (hr)	Number of hapten / protein [(MW _{conjugate} - MW _{protein}) / MW _{hapten}]
5	0.01	1.71	5	8	22
6	0.01	1.71	5	8	10
7	0.01	1.71	5	9	not determined

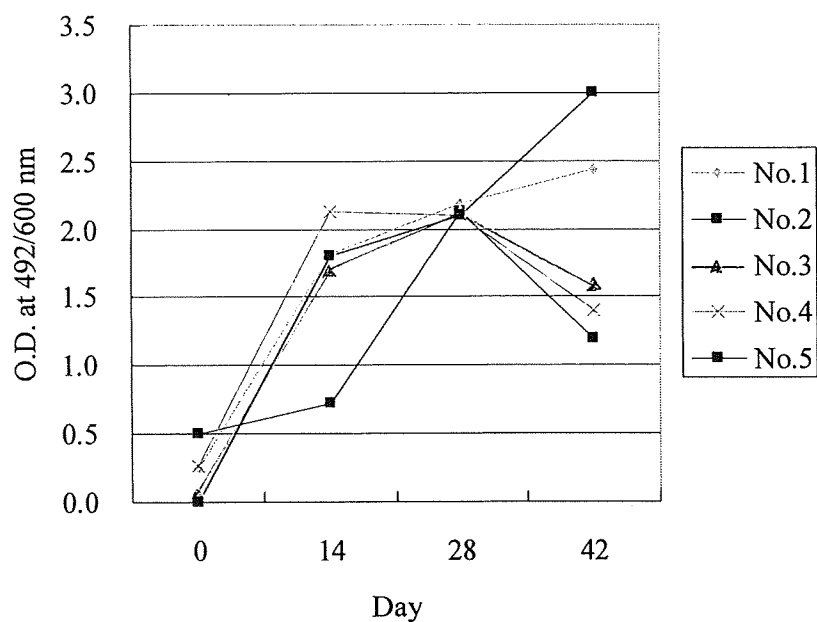


図4. 免疫感作マウス (No. 1-5) の抗原 (5) に対する血中抗体価推移

表2. 免疫感作マウス (No. 5) 細胞増殖ウェルの抗体サブクラス及び非競合的ELISA法による salvinorin A-OVA 抗原 (6) に対する反応性

Well no.	Subclass	Heavy chain	Light chain	O. D. (492/600 nm)
2A11-0	A, M, G _{2b}	α , μ , γ_{2b}	κ	0.832
2F1-0	M, G ₁	μ , γ_1	κ	0.204
2F9-0	A, M, G _{2a} , G _{2b}	α , μ , γ_{2a} , γ_{2b}	κ	0.814
2H1-0	M, G ₁ , G ₃	μ , γ_1 , γ_3	κ , λ	0.245
2H6-0	M, G ₁	μ , γ_1	κ	0.170
3E6-0	A, M, G ₁ , G _{2a} , G _{2b} , G ₃	α , μ , γ_1 , γ_{2a} , γ_{2b} , γ_3	κ , λ	0.339
4D7-0	M, G ₁ , G _{2b}	μ , γ_1 , γ_{2b}	κ	0.351
5C9-0	A, G ₁ , G ₃	α , γ_1 , γ_3	κ , λ	0.223

表3. モノクローナル抗体 2A11、3E6 及び 2F9 の免疫グロブリンアイソタイプ

clone	subclass	heavy chain	light chain
2A11	M	μ	κ
3E6	M	μ	κ
2F9	M	μ	κ

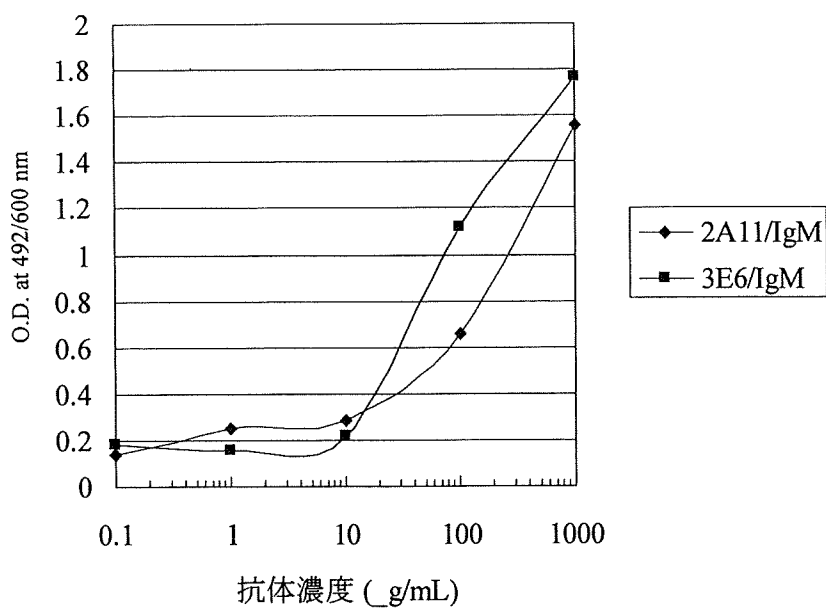


図5. 非競合的ELISA法による抗原(7)に対する抗体の濃度と吸光度との関係

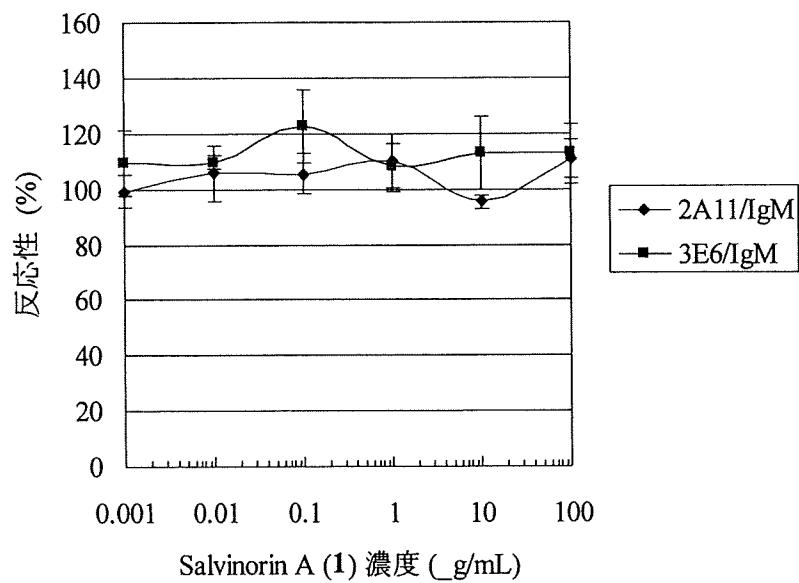
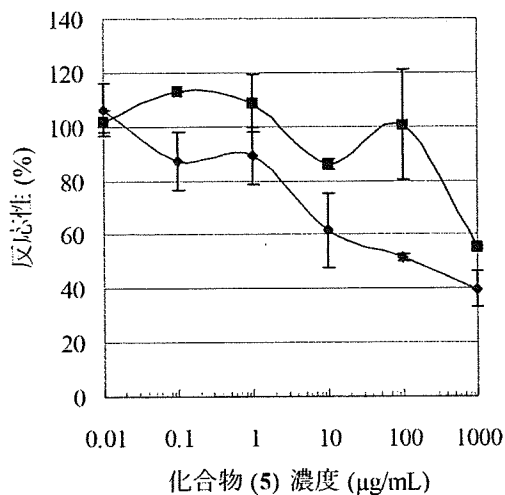


図6. 競合的ELISA法による抗体とサルビノリンA(1)との反応性

A



B

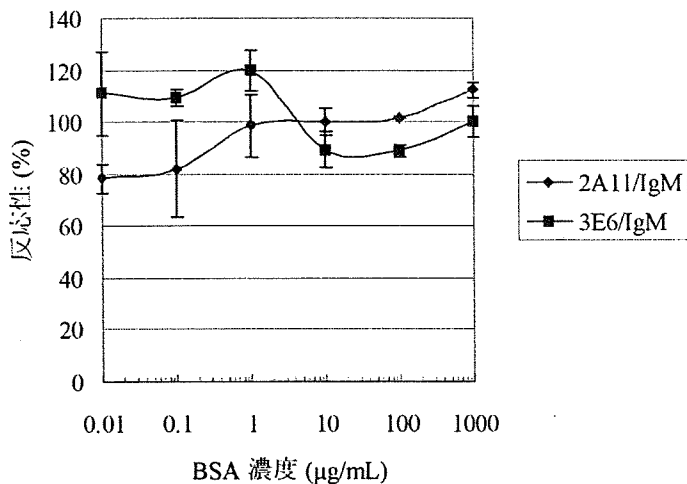
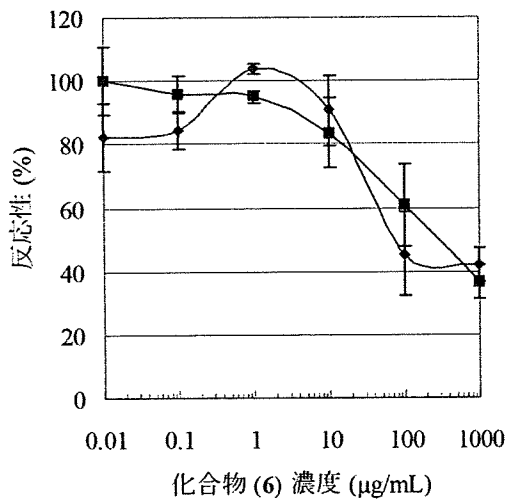


図7. 競合的ELISA法による抗体と競合物質との反応性 -1-
A: サルビノリンA-BSA複合体(5)、B: BSA

A



B

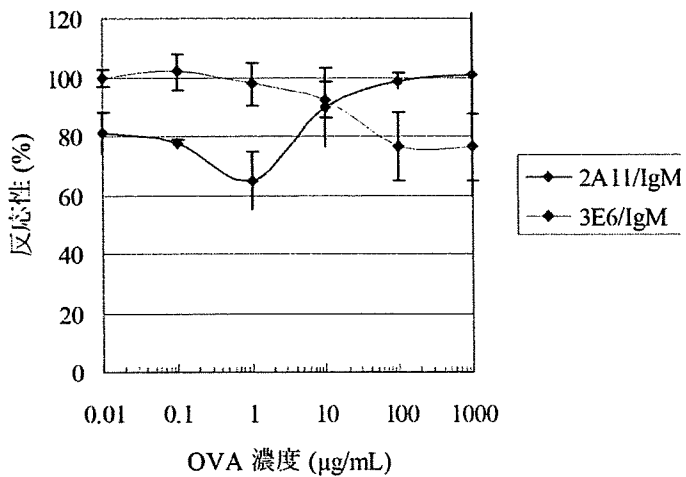


図8. 競合的ELISA法による抗体と競合物質との反応性 -2-
A: サルビノリンA-OVA複合体(6)、B: OVA

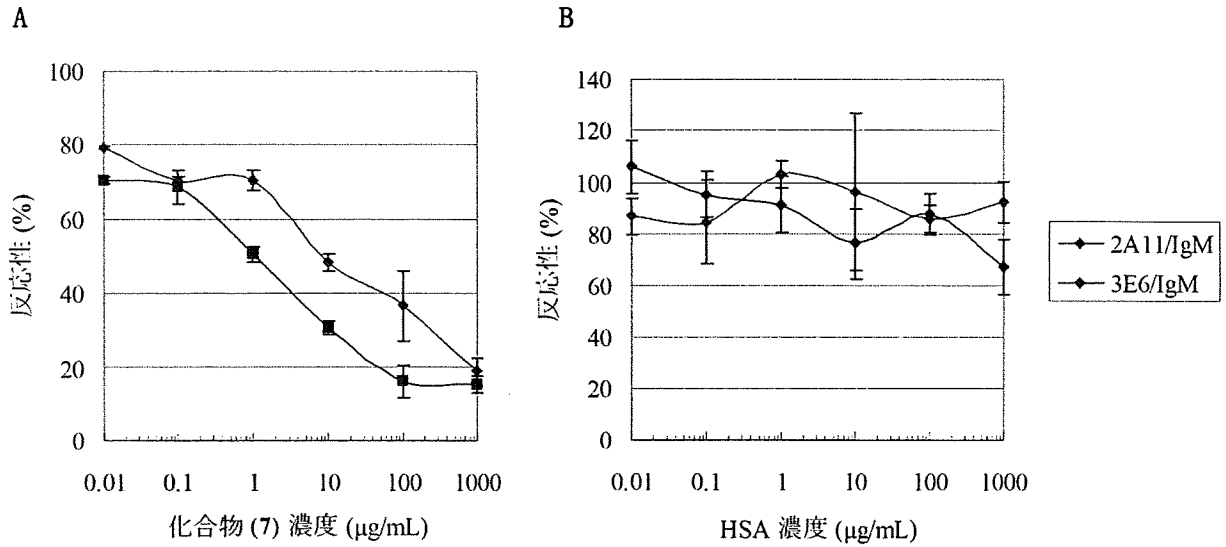


図9. 競合的ELISA法による抗体と競合物質との反応性 -3-
 A: サルビノリンA-HSA複合体(7)、B: HSA

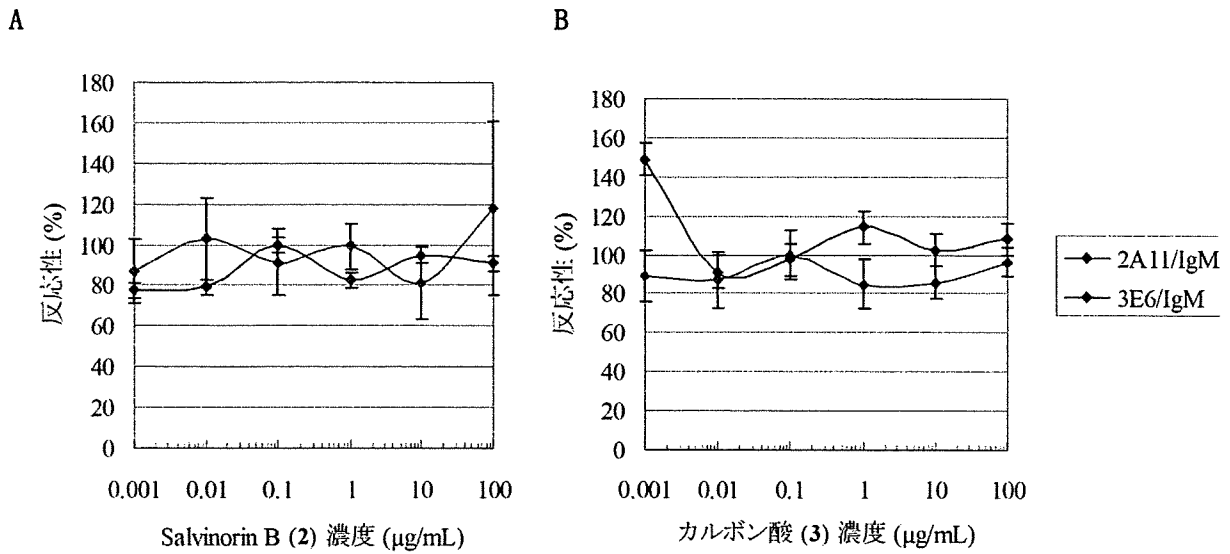
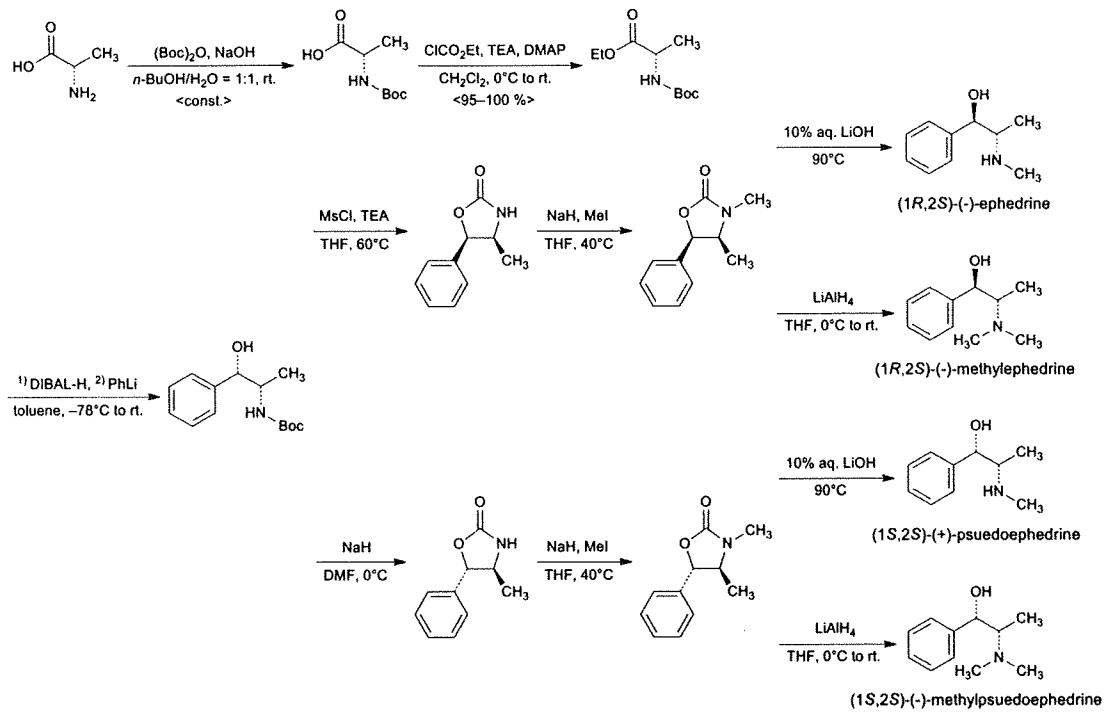
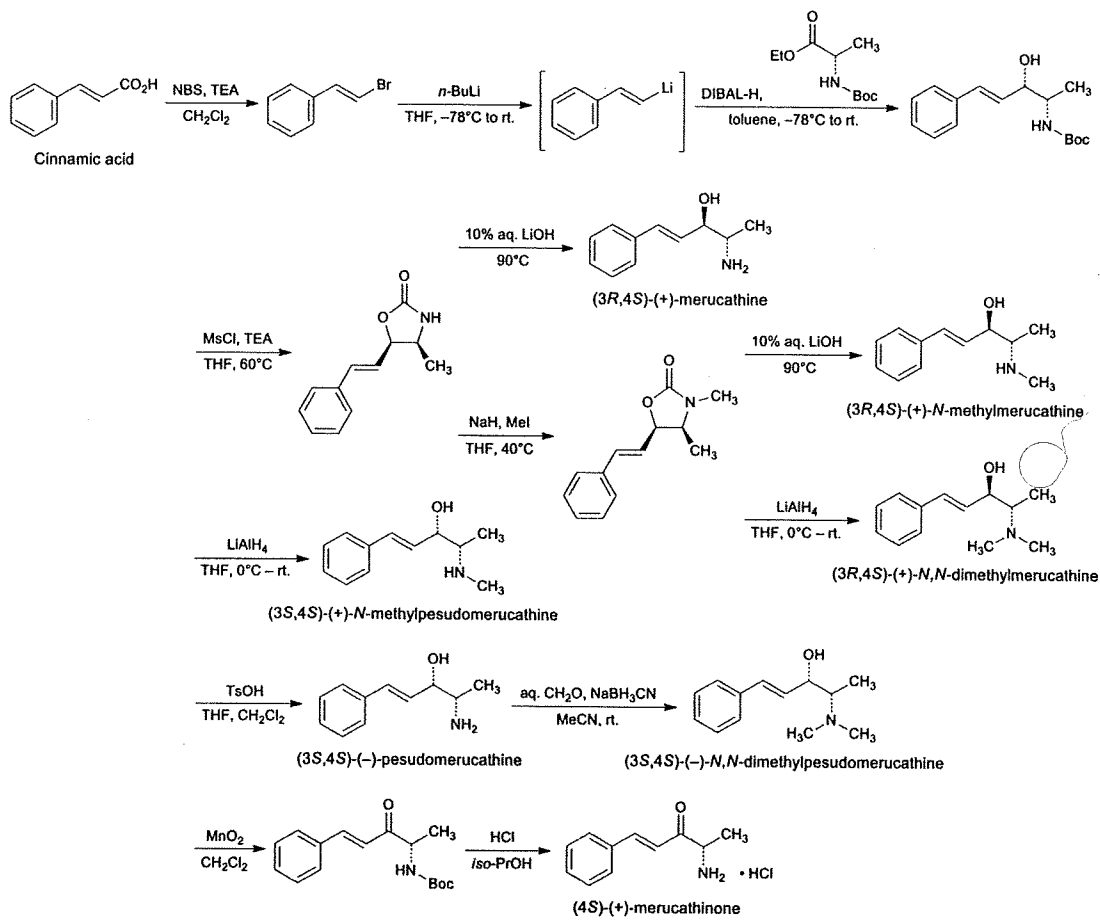


図10. 競合的ELISA法による抗体と競合物質との反応性 -4-
 A: サルビノリンB(2)、B: サルビノリンAハプテン(3)



スキーム 2. エフェドラアルカロイドの網羅的合成



スキーム 3. カチノン類の網羅的合成

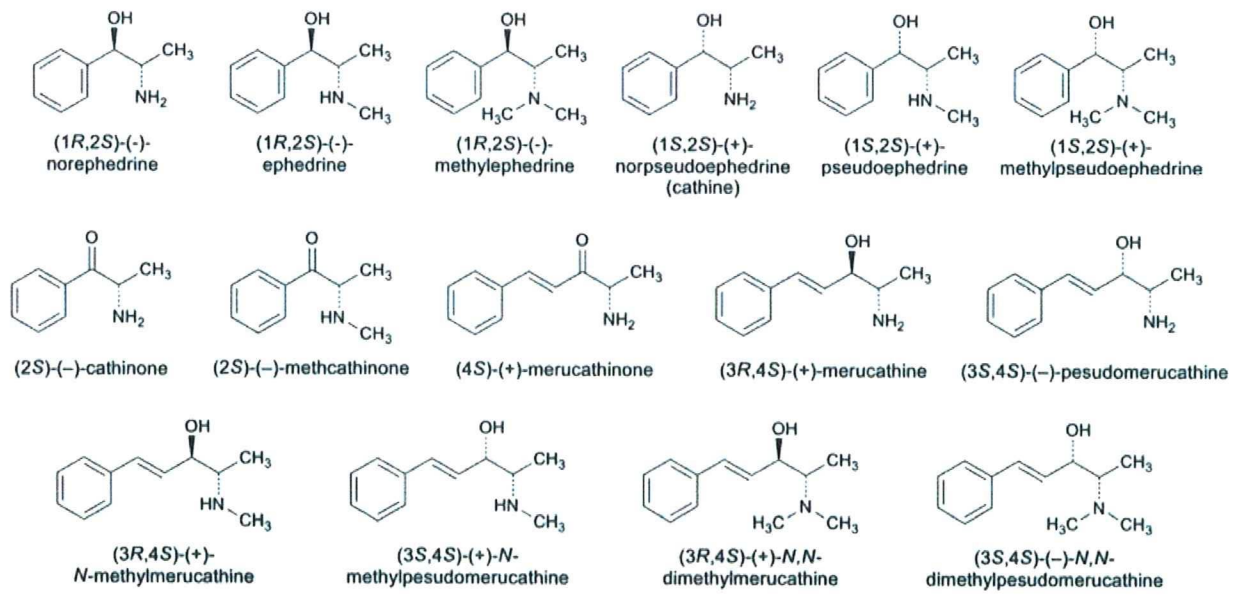


図 11. エフェドラアルカロイド及びカートアルカロイドの構造



(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

徳島文理大学香川薬学部
A) 研究室保存株

徳島文理大学香川薬学部
B) 温室保存株

図 12. 試験材料として用いたカート (*Catha edulis*)

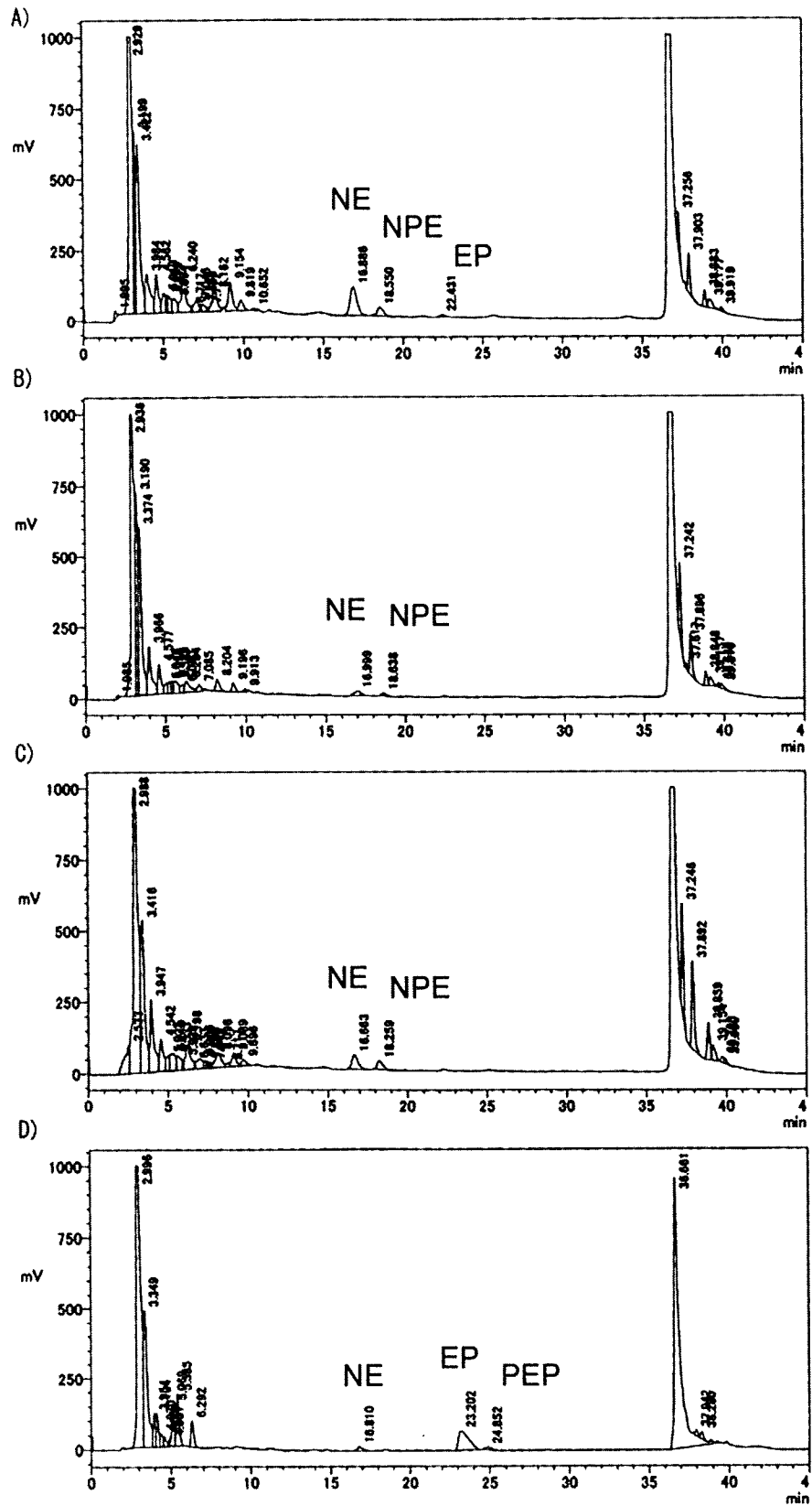


図 13. カート予試験試料の CAD クロマトグラフ

A) 種子島研究部からの株、B) 研究室保存株、C) 温室保存株、D) 比較サンプル：マオウ

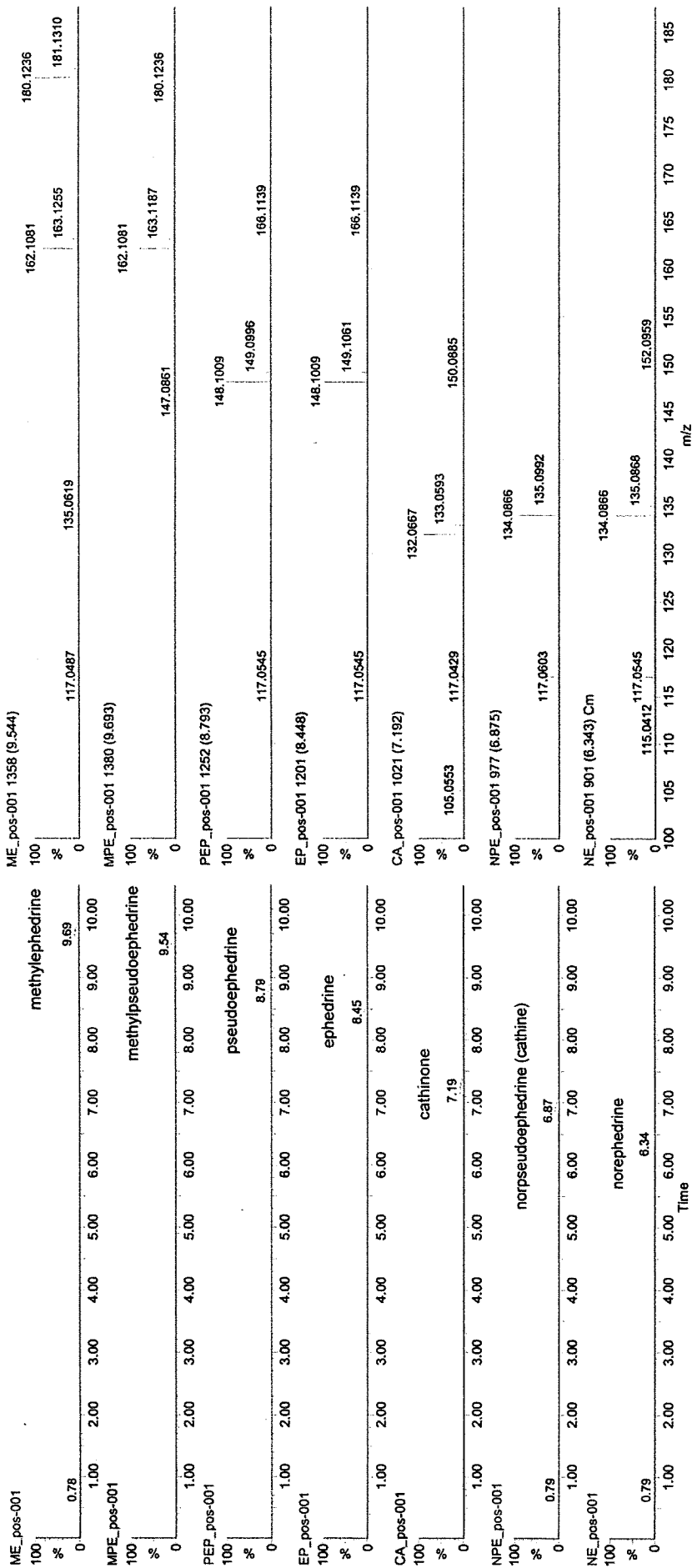


図 14. エフェドラアルカロイド及びカチノン標準品の UPLC-MS スペクトル

分担研究報告書

分担研究課題 代謝物の合成に関する研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長 福原 潔

研究要旨 不正薬物摂取の確実かつ簡便な鑑定法を開発することを目的として不正薬物の代謝物に着目し、標品として提供可能な抱合体の合成および抱合反応を触媒する酵素の同定を行った。本年度は、マジックマッシュルームに含まれ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。その結果、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。また、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。提供用の標品としては、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）を化学法により合成し、54%の収率で得ることができた。現在、0.1 g の *p*-OHMAS が提供可能である。

研究協力者

正田卓司 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 主任研究官

A. 研究目的

不正薬物の摂取を証明するために、確実および簡便な鑑定法の確立は急務の課題である。薬物の鑑定には尿などの生体試料を分析し、未変化体を検出することが指標となる。この未変化体とともに代謝物の同定を同時に行うことができれば、薬物の鑑定は二重に確認されることとなり、より確実な摂取証明となりうる。また、摂取後の時間経過に伴い尿中の未変化体量は減少し、代謝物の量は増加することから、代謝物を指標とできれば、摂取後時間が経過した場合でも適用可能な鑑定法になることが期待される。尿中に検出される代謝物には酸化や還元などを受けた第Ⅰ相代謝物の他に第Ⅱ相代謝物である抱合体が多く検出される。そのため、代

謝物として抱合体を利用した鑑定が確立できれば、有用な手法になることが予測される。しかしながら、不正薬物に関しては鑑定の標品となる抱合体の合成法が確立されていないことが多く、また、抱合反応に関わる薬物代謝酵素の報告例が少ないことなど、多くの課題が残されている。一方、抱合体を産生する薬物代謝酵素は多くのアイソザイムが存在し、その発現量には個人差があることから、不正薬物に由来する症状や副作用等に影響することが考えられる。したがって、不正薬物を代謝する薬物代謝酵素のアイソザイムを同定することは、その症状の出方や中毒の治療方針を検討する上で極めて重要な知見を与える。このような観点から本研究は、新規鑑定法の開発を目指して、不正薬物の抱合体の合成と代謝酵素に関連した研究を行うことを目的とする。

我々は、本分担研究課題において前年度までにメチレンジオキシメタンフェタミン

(MDMA)の代謝物である4-ヒドロキシ-3-メトキシメタンフェタミングルクロン酸抱合体(HMMA-Gluc)の酵素による大量合成法の開発および、HMMA-Glucを産生するUDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)のアイソザイムの同定を行った(Figure 1A)¹⁾。またマジックマッシュルームに含まれるシロシンの代謝物であるシロシングルクロン酸抱合体(PCG, Figure 1B)の酵素による大量合成にも成功した²⁾。PCGに関しては化学合成法に関する報告がなく、本手法が唯一のものである。そこで、本年度はシロシンのPCGへの代謝に関与するUGTの同定および、覚せい剤メタンフェタミンの代謝物に関する研究を行った。

シロシン(Psilocin: PC)とは、シロシビン(Psilocybin: PB)とともに幻覚作用を有するトリプタミンアルカロイドであり、これらの成分を含む菌類(キノコ)はマジックマッシュルームと呼ばれ、日本では2002年6月に麻薬原料植物に指定され、非合法化された。それ故、販売品は現在市場には流通していないが、その乱用は未だ社会的な問題となっている。PB, PCは体内に取り込まれるとFigure 2Aに示す代謝を受け、体外に排泄される。PBは体内に取り込まれると内在性のアルカリホスファターゼにより速やかに加水分解され、PCとなる。さらにPCはPCGに代謝されて尿中排泄される³⁾。尿中に検出されるPCはほとんどがグルクロン酸抱合体(PCG)であるため⁴⁾、現状の鑑定法では尿を加水分解処理してPCGをPCへと変換した後に、PCの同定を行うことで摂取を証明する。もし、PCGを標品として保有し、PCの摂取証明にPCGが利用できれば、尿を加水分解処理する必要がなく、分析時間の短縮が可能となり、極めて有用な鑑定方法となる。さらに、PCGを標品として利用することによって、この薬物代謝反応を触媒するUGTの分子種を決定できれば、シロシンの体内動態を解析する上で極めて重要な情報が得られる。

覚せい剤メタンフェタミン(MA)は日本においてもっとも乱用されている薬物である。覚せい剤を使用すると、瞳孔散大、血圧上昇、ふるえ、幻覚、妄想、精神異常などの深刻な傷害が生じ、脳溢血、心臓発作などで死に至る場合もある。平成19年度中の全薬物事犯の検挙人員のうち、覚せい剤事犯は81.2%を占めており、覚せい剤の不正使用が大きな社会問題となっているのは周知の事実である。メタンフェタミンは、Figure 2Bに示す代謝を受けて体外に排泄される。摂取されたメタンフェタミンは、主として未変化体として尿中に排泄されるが、一部は代謝物として検出される。メタンフェタミンは第I相代謝反応により、N-脱メチル化されたアンフェタミン(AP)、芳香環が水酸化されたp-ヒドロキシメタンフェタミン(p-OHMA)へと代謝される⁵⁾。またp-OHMAはさらに第II相代謝反応を受けて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)、およびp-ヒドロキシメタンフェタミン硫酸抱合体(p-OHMAS)へと代謝される。以前は、尿中のメタンフェタミン代謝物のうち、85%がp-OHMAとその代謝物であり⁶⁾、第II相代謝物としてp-OHMAGが検出されることが報告されていた^{7, 8)}。しかし近年、Shimaらは、LC-MSおよびLC-MS-MSを用いてメタンフェタミンとその代謝物の一斉分析を行い、メタンフェタミン摂取者の尿からp-OHMAGだけでなくp-OHMASが検出されることを明らかにした^{8, 9)}。その結果、ヒトにおいてはその存在比(p-OHMAS / p-OHMAG)は2.2 - 37.1倍であり、グルクロン酸抱合体に対して硫酸抱合体の方が多く含まれていた。なお、ラットにおいてはその存在比は逆転し、99%以上がグルクロン酸抱合体であることを示し、メタンフェタミンの代謝経路には種差があることを明らかにした。以上のことから覚せい剤の使用証明に用いる標品としてはグルクロン酸抱合体の他に硫酸抱合体も有用であり、どちらも提供可能

な合成法を確立する必要があると考えられる。

以上のことを踏まえて本年度は、シロシンの代謝物であるPCGを産生するUGTアイソザイムの同定、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) を産生する UGT の同定、および、もう一つのメタンフェタミン代謝物である *p*-ヒドロキシメタンフェタミン硫酸抱合体 (*p*-OHMAS) の合成を行った。

B. 研究方法

1. 試薬と装置

用いた試薬および溶媒のうち、特に明記しないものについては和光純薬、東京化成、関東化学から購入し、精製せずにそのまま用いた。Acetobromo- α -D-glucuronic acid methyl ester, uridine 5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA), alamethicin, Pyridine sulfur trioxide complex は Sigma-Aldrich から購入した。ヒト UGT アイソザイム (バキュロウイルス発現系昆虫細胞由来マイクロゾーム) は BD Biosciences から購入した。

分析用 HPLC (Waters) は Alliance model 2695, Dual λ Absorbance Detector 2487, micromass ZQ を用いた。カラムは CAPCELL PAK C18 MGII 5 μ m, 4.6 x 250 mm (資生堂) を用いた。移動層は A: 0.1% HCOOH/H₂O, B: CH₃CN を用いた。

分取用 HPLC (センシュー化学) は SSC-660 グラジエントコントローラー, SSC-3465 ポンプ, SSC-5410 UV/Vis 検出器, SSC-3465 カラムオープンを用いた。カラムは SenshuPak PEGASIL ODS column, 5 μ m, 20 x 250 mm (センシュー化学) を用いた。移動層は A: 0.1% TFA/H₂O, B: 0.1% TFA/CH₃CN を用いた。

¹H NMR および ¹³C NMR スペクトルは Varian MERCURY VX 400 を用いた。ケミカルシフトは D₂O の場合は Sodium 3-(trimethylsilyl)-propionate-2,2,3,3-*d*₄

(TSP) を 0 ppm として補正した。

MS は低分解能 MS (LR-MS) を micromass ZQ (Waters), 高分解能 MS (HR-MS) を LTQ Orbitrap (Thermo Fischer Scientific) を用いて測定した。

2. シロシン代謝物

(1) UGT のスクリーニング

全量 20 μ l の溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 8 mM MgCl₂, 25 μ g/ml alamethicin, 5 mM UDPGA, 5 mM シロシン, 1 mg/ml 各種マイクロゾーム, 10% DMSO) を調整し、酵素反応を 37°C で 24 時間行った。反応停止液として 10% HClO₄ 20 μ l を添加し、3000 rpm, 4°C, 10 分間遠心してタンパク質を除去した溶液 20 μ l を LC-MS にて分析し、254nm で検出した PCG の吸収面積にて定量した。

(2) 速度論解析

全量 20 μ l の溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 8 mM MgCl₂, 20 mM UDPGA, 1 ~ 30 mM シロシン, 1 mg/ml 各種マイクロゾーム, 10% DMSO) を調整し、酵素反応を 37°C で 2 時間で行った。反応停止液として 10% HClO₄ 20 μ l を添加し、3000 rpm, 4°C, 10 分間遠心してタンパク質を除去した溶液 20 μ l を LC-MS にて分析し、定量は 254nm の吸収面積を利用した。解析ソフトは KaleidaGraph ver 4.0 (Hulinks) を使い、Michaelis-Menten プロット、すなわち $v = V_{\max} \cdot [S] / (K_m + [S])$ に対してフィッティングすることにより求めた。

3. メタンフェタミン代謝物

(1) *p*-ヒドロキシメタンフェタミン (*p*-hydroxymetamphetamine, *p*-OHMA) の合成

4-Hydroxyphenylacetone 0.95 g (6.3 mmol) を脱水 MeOH 10 ml に溶解し、40% methylamine methanol solution 3.7 ml (2.8 g, 36 mmol) を滴下

した。続いて、 NaBH_3CN 0.9 g (14 mmol) を添加し、 c-HCl を用いて pH 5 に合わせ、窒素雰囲気下、室温で 24 時間撹拌した。水 100 ml を添加し、 c-HCl で pH 2 に合わせ、1 時間静置した。MeOH を減圧留去し、水層を Et_2O で洗浄し、NaOH で pH 12 にし、食塩を添加し、 Et_2O で抽出した。 HCl in Et_2O を添加し、固体が析出したところで、 Et_2O 層を減圧留去し、得られた固体を 2-butanol で再結晶した。

白色粉末 0.20 g, 収率 15% (HCl salt), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.86 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 1.35 (br s, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.78 - 2.33 (m, 1H), 2.54 - 2.61 (m, 2H), 6.64 - 6.67 (m, 2H), 6.93 - 6.96 (m, 2H), 9.13 (br s, 1H), MS (ESI) 166 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(2) *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) の合成

p-OHMA 0.10 g (0.50 mmol), $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 21.9 mg (0.52 mmol) を MeOH 0.5 ml に溶解し、Acetobromo- α -D-glucuronic acid methyl ester 0.22 g (0.55 mmol) を添加し、窒素雰囲気下、室温にて 3 時間撹拌した。2 N NaOH 5 ml を添加し、室温にて終夜撹拌した。溶媒を減圧下、濃縮し、2N HCl にて中和し、0.1% TFA/ H_2O を用いて希釈し、逆相分取 HPLC にて精製した。

白色固体 106.6 mg, 収率 63%, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 1.25 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 2.71 (s, 3H), 2.84 (dd, $J = 7.8, 14.0$ Hz, 1H), 3.01 (dd, $J = 6.4, 14.0$ Hz, 1H), 3.43 - 3.50 (m, 1H), 3.64 - 3.75 (m, 3H), 4.22 (s, 1H), 5.18 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ 14.8, 30.0, 38.0, 56.5, 71.3, 72.6, 74.5, 75.1, 100.1, 117.1, 130.6, 130.9, 155.7, 171.9, MS (ESI), 342 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(3) UGT のスクリーニング

全量 20 μl の溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 8 mM MgCl_2 , 20 mM UDPGA, 20 mM

p-OHMA, 1 mg/ml 各種マイクロゾーム, 10% DMSO) を調整し、酵素反応を 37°C で 2 時間行った。反応停止液として 10% HClO_4 20 μl を添加し、10000 rpm, 4°C, 10 分間遠心してタンパク質を除去した溶液 10 μl を LC-MS にて分析した。なお、LC-MS による分析・定量は選択イオン検出モード (Selected Ion Monitoring) で行い、ターゲットイオンとして、*p*-OHMAG の m/z 342 を選択し、イオンクロマトグラムにおける該当ピークの面積により算出した。

(4) 速度論解析

全量 20 μl の溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 8 mM MgCl_2 , 25 $\mu\text{g/ml}$ alamethicin, 20 mM UDPGA, 1 ~ 25 mM *p*-OHMA, 1 mg/ml 各種マイクロゾーム) を調整し、酵素反応を 37°C で 2 時間で行った。反応停止液として 10% HClO_4 20 μl を添加し、10000 rpm, 4°C, 10 分間遠心してタンパク質を除去した溶液 10 μl を LC-MS にて分析した。なお、LC-MS による分析・定量は選択イオン検出モード (Selected Ion Monitoring) で行い、ターゲットイオンとして、*p*-OHMAG の m/z 342 を選択し、イオンクロマトグラムにおける該当ピークの面積により算出した。解析ソフトは KaleidaGraph ver 4.0 (Hulinks) を用い、Michaelis-Menten プロット、すなわち $v = V_{\text{max}} \cdot [\text{S}] / (K_m + [\text{S}])$ に対してフィッティングすることにより求めた。

(5) *p*-ヒドロキシメタンフェタミン硫酸抱合体 (*p*-OHMAS) の合成 —HPLC による精製

p-OHMA 0.20 g (1.0 mmol) をピリジン 10 ml に懸濁した。Pyridine-sulfur trioxide complex 1.59 g (10 mmol) を添加し、窒素雰囲気下、50 °C にて終夜撹拌した。反応溶媒を減圧留去し、残渣を 0.1% TFA/ H_2O および DMSO を添加することで溶解し、逆相 HPLC にて精製した。

白色固体 20.9 mg, 収率 8.5%, ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 1.29 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 2.71 (s, 3H), 2.95 (dd, $J = 6.8, 14$ Hz, 1H), 3.07 (dd, $J = 6.8, 14$ Hz, dd), 3.55 (m, 1H), 7.3 – 7.36 (m, 4H), ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 15.1, 29.8, 37.7, 55.4, 120.6, 130.0, 130.7, 152.5, LR-MS 246 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(6) *p*-ヒドロキシメタンフェタミン硫酸抱合体 (*p*-OHMAS) の合成 — 再結晶による精製

p-OHMA 0.20 g (1.0 mmol) をピリジン 5 ml に懸濁した. Pyridine-sulfur trioxide complex 0.3 g (1.9 mmol) を添加し, 窒素雰囲気下, 50 °C にて終夜攪拌した. 沈殿物をろ取り, Et_2O で洗浄した. これを H_2O にて再結晶した. 純度 99% (HPLC, 254 nm の吸光度にて計算. 不純物として 1% 以下の *p*-OHMA を含む).

白色固体 131.8 mg, 収率 54%.

C. 研究結果

1. シロシングルクロン酸抱合体を生成する UGT アイソザイムの同定と速度論的解析

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. 標品は前年度に合成した PCG を用いた. 反応終了後, HPLC にて分析し, クロマトグラムの比較, PCG の定量を行ったところ, UGT1A8 および UGT1A9 において PCG が検出された (Figure 3). 他の UGT アイソザイムの場合には PCG は検出されなかった. UGT1A8 および UGT1A9 において速度論解析を行ったところ, Michaelis-Menten 式にてフィッティングが可能であり, 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 (Table 1).

2. *p*-OHMAG の合成および UGT アイソザ

イムの同定と速度論的解析

メタンフェタミンの尿中代謝産物のうちグルクロン酸抱合体 (*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) の産生に關与する UGT アイソザイムの同定を行うため, 標品として用いる *p*-OHMAG の合成を行った (Figure 4). 我々はこれまでに MDMA の代謝物である HMMA-Gluc の化学合成を行っており, 同様の手法で *p*-OHMA にグルクロン酸を導入した. すなわち 4-Hydroxyphenylacetone に methylamine を縮合後, NaBH_3CN によって還元して *p*-OHMA の塩酸塩を合成し, 続いて, *p*-OHMA をメタノール溶液に溶解後, Acetobromo- α -D-glucuronic acid methyl ester を LiOH を用いて反応させてグルクロナイドを合成した. さらに NaOH 水溶液で脱アセチル, 脱メチルを同時に行い, 逆相 HPLC にて精製することで *p*-OHMAG の白色固体を得た. 各ステップにおける収率は *p*-OHMA (塩酸塩) が 15%, *p*-OHMA から *p*-OHMAG の総収率は 63% であった. 構造は ^1H NMR, ^{13}C NMR およびマススペクトルにより確認した.

続いて, シロシンの場合と同様の方法で UGT のスクリーニングを行い, *p*-OHMA のグルクロン酸抱合反応に關わるアイソザイムの解析を行った. 各アイソザイムで *p*-OHMA へのグルクロン酸抱合反応を行い, 生成した *p*-OHMA について化学合成により得た標品 *p*-OHMAG を用いて定量した結果, UGT1A4, 1A6 からは *p*-OHMAG が全く検出されず, UGT1A1, 1A3, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B15, 2B17 から *p*-OHMAG が検出された (Figure 5). これらアイソザイムのうち, UGT1A1 および UGT1A9, UGT2B15 について *p*-OHMAG に対する速度論解析を行った (Figure 6, Table 2). その結果 UGT1A1 および UGT2B15 は Michaelis-Menten プロットにのり, UGT1A1 の V_{max} は 0.026 nmol/mg/min, K_m は 4.9 mM, UGT2B15 の V_{max} は 0.43 nmol/mg/min, K_m

は 16.2 mM であることがわかった。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示された。

3. *p*-OHMAS の合成

メタンフェタミンの尿中代謝産物のうち硫酸抱合体 (*p*-ヒドロキシメタンフェタミン硫酸抱合体: *p*-OHMAS) を提供用として、*p*-OHMAS の合成を行った。反応はピリジンに溶解した *p*-OHMA に、Pyridine-sulfur trioxide complex を添加し、窒素雰囲気下、50°C にて終夜攪拌することで行った。溶媒を減圧留去後、残渣を 0.1% TFA/H₂O および DMSO に溶解し、HPLC に供したところ、新規のピークが現れ、MS 分析によりこのピークが *p*-OHMAS であることがわかった。このピークを分取用の逆相 HPLC にて精製し、白色固体 20.9 mg を得た。¹H NMR および ¹³C NMR、マススペクトルにより構造解析を行った結果、*p*-OHMAS であることを確認し、収率 8.5% で *p*-OHMAS を合成することができた。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。すなわち、反応後に生じた沈殿物を濾取し、H₂O にて再結晶することにより、99% (HPLC, Figure 7) 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。

D. 考察

尿中には第 I 相薬物代謝酵素による代謝物の他に、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体といった第 II 相代謝物すなわち抱合体が多く含まれている。そのため不正薬物の鑑定に、尿などの生体試料から、未変化体の薬物とともに抱合体の同定を同時に行うことができれば、二重に鑑定されたこととなり、より確実な摂取証明が可

能になる。しかしながら、不正薬物の代表的な代謝物は標品として提供されていない。本研究では、これら抱合体の合成方法を確立し、提供可能な標品を合成すること、また代謝物に関連した研究を行うことを目的としている。我々はこれまでに MDMA の第 II 相代謝物である HMMA-Gluc に関して既存の化学合成法と酵素合成法を比較し、酵素合成法の有用性を示したり、また、HMMA-Gluc を生成する UGT アイソザイムを同定した。昨年度は、マジックマッシュルームに含まれるシロシンの代謝物であるシロシングルクロン酸抱合体の酵素による大量合成法についての報告を行った。本年度は、シロシンのグルクロン酸抱合反応に関わる UGT アイソザイムの同定を行った。また、覚せい剤メタンフェタミンの第 II 相代謝物である *p*-OHMA のグルクロン酸抱合体 *p*-OHMAG と硫酸抱合体 *p*-OHMAS を合成した。*p*-OHMAG に関してはグルクロン酸抱合反応に関わる UGT アイソザイムを同定した。また、*p*-OHMAS を提供用試料として 0.1g 合成した。

マジックマッシュルームに含まれるシロシピン、シロシンは、生体内で代謝されて、グルクロン酸抱合体 PCG として尿に排泄される (Figure 2A)。尿中に検出される PC 代謝物はほとんどが PCG であるため、PC をグルクロン酸抱合化する UGT は、シロシンの体内動態を決定する上で極めて重要であると考えられる。我々は、12 種の UGT アイソザイムを用いて、スクリーニングを行ったところ、UGT1A8 と UGT1A9 で PCG の生成が確認された。(Figure 3)。また、それぞれの速度論的パラメーターを算出したところ、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 であった。

シロシンは脳内の神経伝達物質であるセロトニンと同様のインドール骨格を有しており、シロシンはセロトニン受容体のアゴニストと

して働くことで幻覚作用を引き起こしていることが報告されている。セロトニンは UGT1A6 により抱合化され¹⁰⁾、その速度論的パラメータ V_{max} および K_m はそれぞれ 4.5 nmol/mg/min, 5 mM である。一方、シロシンは UGT1A8 や UGT1A9 で抱合化され、セロトニンはこれらのアイソザイムでは抱合化されない¹⁰⁾。シロシンとセロトニンは同じインドール骨格を有しているが、抱合化される OH 基の位置により、代謝のメカニズムが大きく異なることが示唆された。

覚せい剤メタンフェタミンは日本でもっとも乱用されている薬物であり、取り締まりの強化はもとより、その根拠となる鑑定法についてはより迅速でより確実なものが望まれている。また、メタンフェタミンの代謝経路を理解することは、鑑定法に関する知見を与えるのみならず、中毒患者の治療方針等にも役立つ可能性がある。メタンフェタミンの代謝は、主に芳香環が水酸化され、さらにその水酸基がグルクロン酸や硫酸によって抱合化される (Figure 2B)。実際に覚せい剤摂取被疑者の尿を LC-MS で分析すると、*p*-OHMAG と *p*-OHMAS が検出される^{7,9)}。しかしながら、抱合体を産生する薬物代謝酵素は同定されていない。我々はシロシンと同様に *p*-OHMAG へのグルクロン酸抱合反応に関係する UGT アイソザイムの同定を試みたところ、いくつかの UGT アイソザイムが *p*-OHMAG の生成を触媒することが示された (Figure 5)。そこで次に、UGT1A1 と UGT1A9, UGT2B15 における速度論的解析を行ったところ、UGT1A1 および UGT2B15 は Michaelis-Menten 型の酵素応答が確認でき、 V_{max} および K_m は、UGT1A1 では 0.026 nmol/mg/min, 4.9 mM, UGT2B15 では 0.43 nmol/mg/min, 16.2 mM であることがわかった。一方、UGT1A9 は Michaelis-Menten 型の酵素応答を示さなかった。抗てんかん薬フェニトインの代謝物である 5-(4'-hydroxy

phenyl)-5-phenylhydantoin は UGT1A9 および UGT2B15 によって抱合化されるが、非 Michaelis-Menten 型の酵素応答によりアロステリックな効果を示すことが知られている¹¹⁾。これは基質結合部位以外の部位に基質が結合することにより酵素活性に影響を与えているためだと考えられている。UGT1A9 の *p*-OHMA に対する正確な反応様式を検討するためにはより高濃度の基質濃度で反応を行う必要があるが、基質の溶解性を考慮すると、これ以上の解析は難しいと判断した。

メタンフェタミンのグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体への抱合反応には種差があることが報告されている⁹⁾。ラットではグルクロン酸抱合体がほとんどであるのに対して、ヒトにおいては、硫酸抱合体とグルクロン酸抱合体の尿中の存在比 (*p*-OHMAS/*p*-OHMAG) は 2.2 ~ 37.1 倍で硫酸抱合体の量が多いことが示されている⁹⁾。したがって、被疑者の覚せい剤摂取証明には、グルクロン酸抱合体とともに硫酸抱合体を用いることが有効であることが考えられる。そこで、尿試料における抱合体同定の標品として *p*-OHMAS を提供する目的で *p*-OHMAS の合成を行った。その結果、*p*-OHMA から *p*-OHMAS への反応は定量的に進行するが、反応後の精製に分取用の逆相 HPLC を用いたところ収率が大きく低下することがわかった。HPLC で精製する際に、サンプルを 0.1% TFA/H₂O で希釈したところ溶解しなかったため、DMSO を添加したが、そのためピークのブロード化や保持時間の再現性が悪くなったことが原因と考えられる。そこで、収率の改善を目指して、逆相 HPLC による精製から、沈殿物をろ取り、それを H₂O によって再結晶する方法に変更したところ、54%の収率で *p*-OHMAS を得ることができた。純度は HPLC で 99% であることから、本精製法は *p*-OHMAS の合成に大変有用であることがわかった (Figure 7)。なお、HPLC クロマトグラム上のピークは、

p-OHMAS の保持時間が 8.94 分であるのに対し、*p*-OHMA は 8.07 分であった。硫酸基の存在により、水溶性が高まり、保持時間が *p*-OHMA より短くなることを予想していたが逆の結果となった。これは、酸性の溶出液 (0.1% HCOOH) を用いた影響であると考えられる。現在、提供用として *p*-OHMAG および *p*-OHMAS を 0.1g 程度保有している。

E. 結論

不正薬物摂取の新規鑑定法の開発を目的として抱合体に着目した研究を行った。本年度は不正薬物のグルクロン酸抱合化に関する UGT アイソザイムの同定を中心に行った。マジックマッシュルームに含まれるシロシン、シロシビンの代謝物であるシロシングルクロン酸抱合体への抱合反応には UGT1A8 と UGT1A9 が関与することが示された。また、覚せい剤メタンフェタミンの代謝物である *p*-OHMAG への抱合反応には数種類の UGT が関与することが示され、UGT1A9 および UGT2B15 の活性が高いことがわかった。さらに、提供用標品としては、*p*-OHMAS を *p*-OHMA に Pyridine-sulfur trioxide complex を反応させて合成し、H₂O で再結晶することで 54% の収率で得ることができた。現在、*p*-OHMAS を 0.1g 程度保有している。

今後は、本研究により合成した標品となる化合物を用いてラットなどのモデル動物の生体試料から代謝物の直接検出を試み、新規鑑定法の開発を行う。

F. 参考文献

- 1) Shoda T., Fukuhara, K., Goda, Y., Okuda, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 472-475 (2009).
- 2) Shoda T., Fukuhara, K., Goda, Y., Okuda, H., *in preparation*.
- 3) Hasler F., Bourquin, D., Brenneisen, R., Vollenweider, F. X., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**,

331-339 (2002).

- 4) Kamata T., Nishikawa, M., Katagi, M., Tsuchihashi, H., *J. Chromatogr. B*, **796**, 421-427 (2003).
- 5) Lin L. Y., Kumagai, Y., Hiratsuka, A., Narimatsu, S., Suzuki, T., Funae, Y., Distefano, E. W., Cho, A. K., *Drug. Metab. Dispos.*, **23**, 610-614 (1995).
- 6) Caldwell J., Dring, L. G., Williams, R. T., *Biochem J*, **129**, 11-22 (1972).
- 7) Nakajima R., Morishita, M., Aiso, S., Yajima, T., *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 493-495 (2006).
- 8) Shima N., Tsutsumi, H., Kamata, T., Nishikawa, M., Katagi, M., Miki, A., Tsuchihashi, H., *J. Chromatogr. B*, **830**, 64-70 (2006).
- 9) Shima N., Kamata, H. T., Katagi, M., Tsuchihashi, H., *Xenobiotica*, **36**, 259-267 (2006).
- 10) Krishnaswamy S., Duan, S. X., Von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., Court, M. H., *Drug. Metab. Dispos.*, **31**, 133-139 (2003).
- 11) Nakajima M., Yamanaka, H., Fujiwara, R., Katoh, M., Yokoi, T., *Drug. Metab. Dispos.*, **35**, 1679-1686 (2007).

G. 健康危機情報

特になし。

H. 研究発表

論文発表

- 1) 4-Hydroxy-3-Methoxymethamphetamine Glucuronide as a Phase II Metabolite of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine: Enzyme-Assisted Synthesis and Involvement of Human Hepatic UGT2B15 in the Glucuronidation. Shoda T., Fukuhara, K., Goda, Y., Okuda, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 472-475 (2009)
- 2) Enzyme-Assisted Synthesis of Psilocin

glucuronide as a Phase II Metabolite of Psilocin and Psilocybin and Involvement of Human Uridine 5'-Diphospho-Glucuronosyltransferase 1A8 and 1A9 in the Glucuronidation. Shoda, T., Fukuhara, K., Goda, Y. and Okuda H, *Chem. Pharm. Bull.*, in preparation.

学会発表

- 1) 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 (岡山) .

*本発表はハイライトポスターに選ばれた.