

ーラムであったため、一方的な発表ではなく、自由にディスカッションをすることが可能であった。EMCDDA member countries 30 カ国においては、EMS が立ち上がってすでに 10 年以上が経過していることもあり、各国で新規に流通が認められた違法ドラッグ成分についての情報を EMCDDA が取りまとめ、問題となる化合物についてはリスクアセスメントを進め、最終的に EU の Council decision を通して各国での規制が実施されるというプロトコールは良く機能していると思われた。EMCDDA が窓口となり、EU 内で違法ドラッグに関する様々なプロジェクトが実施されているが、特に英国及びドイツにおける取り組みが進んでいた。ドイツにおける救急病院での患者生体試料中新規違法ドラッグ成分のスクリーニング検討結果、英国における下水から検出される違法ドラッグ成分（代謝物を含む）より乱用実態を検討した結果、英国を中心とした各国におけるインターネットでの違法ドラッグ販売に関する実態調査結果などは興味深いものがあった。

国立衛研生薬部第 3 室では、平成 22 年度より EMCDDA の研究者と密接に連絡を取りあい、EU 内もしくは日本国内で新規に出現した違法ドラッグ成分に関する化合物データをお互いに交換している。未規制違法ドラッグの流通は世界的な問題であり、特にヨーロッパにおける違法ドラッグ成分の新規流通情報、乱用情報及び健康被害情報は、日本においても極めて有用である。今後も諸外国の研究者との情報交換を密接に行っていく必要があると考える。

D. 結論

麻薬の構造類似化合物及びそれら化合物を含有する植物製品の蔓延は世界的な問題となっているが、今回、国際的な専門家会議に出席することにより諸外国の専門家との情報交換及び意

見交換が可能であり、違法ドラッグ研究業務を遂行していく上で極めて有用であった。

E. 参考文献

1. 厚生労働科学研究補助金 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 (H18-医薬-一般-017)「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究」平成 18, 19 及び 20 年度研究分担報告（花尻（木倉）瑠理）
2. 厚生労働科学研究補助金 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 (H21-医薬-一般-030)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 22, 22 及び 23 年度研究分担報告（花尻（木倉）瑠理）

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

発表・講演

1. R. Kikura-Hanajiri: Drug Control in Japan –Designated Substances–, First international multidisciplinary forum on new drugs (Lisbon, Portugal, 11-12 May 2011)
2. R. Kikura-Hanajiri: Survey of current trends in the abuse of psychotropic substances and plants in Japan, First international multidisciplinary forum on new drugs (Lisbon, Portugal, 11-12 May 2011)

論文発表

特になし。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

分担研究報告書

分担研究課題 法規制薬物の分析・鑑別に資する化合物の合成とメタボロミクス研究

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

$^1\text{H-NMR}$ を利用した薬物鑑定法の開発

研究要旨 不正薬物の摂取証明への NMR の有用性を検討することを目的として、麻薬として規制されているレボメトルファンと一般用医薬品である光学異性体のデキストロメトルファンを投与した尿の $^1\text{H-NMR}$ を測定して統計解析を行い、両薬物に特徴的な代謝変動を解析した。レボメトルファンとデキストロメトルファンを投与した尿は非常に類似した $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示すが、スペクトルを多変量解析することにより、全ての尿を薬物と尿の採取時間の違いによって統計学的に別々の群として分類することができた。この結果は、両薬物が内因性代謝物に与える影響は異なること、また、その影響は時間経過とともに変化し、長時間継続していることを示している。従って、尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルについて多変量解析を行い、統計学上どの群に分布しているかを特定することによって、摂取被疑者の薬物依存状態を予測できる可能性が示された。

レボメトルファンとデキストロメトルファンによる直接影響と考えられる、投与後 24 時間以内に変動する内因性代謝物として、エネルギー代謝に関するクエン酸、2-オキソグルタル酸、クレアチニンおよびコリンの分解産物であるジメチルグリシンの尿中濃度がレボメトルファンで高く、デキストロメトルファンで低くなることがわかった。また、投与後 48～72 時間に採取した尿では馬尿酸、トリゴネリンの濃度がレボメトルファンで大きく低下していることがわかった。長時間経過しても変動がみられる内因性代謝物は薬物依存性を診断する上で重要なバイオマーカーになると考えられる。

研究協力者

大野 彰子 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の確実及び簡便な鑑定法の開発は急務の課題である。現在、尿、血液、毛髪等について、LC/MS や GC/MS 等の機器分析法や免疫化学的方法を用いた不正薬物およびその代謝物の簡便な高感度検出法の開発が行われている。我々は、生体試料からの鑑定法への利用を目的とした不正薬物の第 II 相代謝物の合成を試み、シロシン、シロシ

ビンのグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体の合成を行った。従来、尿などの生体試料では抱合体を過水分解処理した第 I 相代謝物および未変化体を検出の対象としてきた。我々が合成した第 II 相代謝物を標品として用いることにより、生体試料を加水分解処理することなく検出できることから、前処理における回収率の低下、代謝物の安定性等の問題を懸念することなく、高感度検出が可能となった。一般に機器分析による生体試料からの検出法としては、液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーに質量分析器を組み合わせた方法が用いられている。この場合、生体試料は加水分解処

理の他に、除蛋白等の前処理が必要であることから、不安定代謝物は前処理の過程で分解することが懸念される。非破壊分析法である NMR は ^1H や ^{13}C ケミカルシフトから、有機化合物の詳細な構造解析が可能であり、また異性体間の構造の違いを同定することもできる。また、近年は軽水中での測定も可能となり、生体試料を前処理することなく構造情報を得ることが可能となった。尿や血清を直接 NMR で測定すると大変複雑なスペクトルが得られるが、スペクトル情報を統計解析することによって、試料間の微妙な変動を特定することができる²⁾。本研究では、 ^1H -NMR による生体試料の解析手法を不正薬物の摂取証明に利用することを目的として、レボメトトルファンとデキストロメトトルファン投与ラットの尿について、 ^1H -NMR によるメタボローム解析を行った。レボメトトルファンは鎮痛、呼吸抑制、鎮咳作用をもち依存性形成を有するため、麻薬として世界的に規制されている。一方、レボメトトルファンの右旋体であるデキストロメトトルファンは鎮咳作用のみ強く、麻薬としての作用はもたないため、一般用医薬品として利用されている。しかし、脳中枢のセロトニン濃度を上昇させるため、多量に摂取すると多幸感や幻覚等が発現することが指摘されており³⁾、米国では本化合物の過剰摂取による死亡例も報告されている⁴⁾。日本においても違法ドラッグとしての流通が認められており、現在は「専ら医薬品として使用される成分本質」として、薬事法上での規制の対象となっている。従って、麻薬および向精神薬法で規制されているレボメトトルファンと薬事法で規制されているデキストロメトトルファンの摂取を証明する為には、確実に両化合物を区別できる鑑別法の開発が必要である。尿などの生体試料の ^1H -NMR スペクトルを詳細に解析することができれば、薬物由来の代謝物とともに内因性代謝物の変動を明らかにすることが可能になる。そこで本研究では、レボメトトルファンと

デキストロメトトルファンを投与したラット尿について ^1H -NMR を測定し、さらにスペクトルの統計解析と代謝物の同定によるメタボローム解析を行い、化合物に特徴的な代謝変動を明らかにした。また、鑑定法としての ^1H -NMR によるメタボローム解析の有効性について考察した。

B. 研究方法

1. 試薬

Imidazole (CAS# 288-32-4) および Sodium 3-(trimethylsilyl)-propionate-2, 2, 3, 3, - d_4 (TSP) (CAS# 24493-21-8) は ALDRICH から購入した。りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol, pH 7.2, CAS# 167-14481) および塩酸 (HCl) 特級は和光純薬より購入した。

2. 尿試料

花尻らにより、以下のプロトコールで行われた動物実験から採取した尿を使用した⁵⁾。

レボメトトルファンおよびデキストロメトトルファンをラット各 3 匹に 5 mg/kg ずつ 10 日間連続して腹腔内投与した。最終投与後、1 匹ずつ代謝ケージに入れて 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。

3. サンプル調製

1) 標品 (デキストロメトトルファン臭化水素酸塩及びレボメトトルファン) の調整

デキストロメトトルファン臭化水素酸塩 (5.3 mg) に軽水を 500 μl , 0.285 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を 123 μl (最終濃度 50 mM), 1 M Imidazole / D_2O 溶液を 7 μl (最終濃度 10 mM), 5 mM TSP / D_2O 溶液を 70 μl (最終濃度 0.5 mM) それぞれ添加し、700 μl になるように ^1H -NMR 用サンプルを調製した。

レボメトトルファン (1.2 mg) に 0.1 N HCl 溶液 (25 μl) 及び 1 N HCl 溶液 (5 μl) に溶解させ酸性条件下にした後、軽水を 399 μl , 0.285 M

PB (pH 7.2)を 105 μ l (最終濃度 50 mM), 1 M Imidazole / D₂O 溶液を 6 μ l (最終濃度 10 mM), 5 mM TSP / D₂O 溶液を 60 μ l (最終濃度 0.5 mM) それぞれ添加し, 600 μ l になるように ¹H-NMR 用サンプルを調製した.

2) 尿サンプル

尿サンプルを水につけて解凍後, 520 μ l 分注し Amicon Ultrafree-MC (0.45 μ m) にて不溶物を遠心濾過 (10,000 rpm, 4 °C, 10 min) した. 濾液 500 μ l をマイクロチューブに採取し, 0.285 M リン酸緩衝液 (pH 7.2)を 123 μ l (最終濃度 50 mM), 1 M Imidazole / D₂O 溶液を 7 μ l (最終濃度 10 mM), 5 mM TSP / D₂O 溶液を 70 μ l (最終濃度 0.5 mM) それぞれ添加し, 700 μ l になるように ¹H-NMR 用サンプルを調製した.

4. ¹H-NMR 測定

1) NMR 測定装置

Varian 600 MHz NMR spectrometer に ¹H-NMR 専用コールドプローブを装備.

2) 測定モード

Presaturation NOESY法 (one dementional ¹H-NOESY spectra, 298 K). 積算回数: 128 回. TSP のシグナルを -0.016 ppm としてケミカルシフトの補正を行った.

5. 多変量解析

¹H-NMR スペクトルを NMR SUITE 6.0 software (Chenomx 社製)で軽水の観測領域 (4.74-4.94 ppm) を除いた ¹H-NMR スペクトルの 0.04-10.0 ppm を 0.04 ppm の幅でバケット積分を行い, ピークエリアリスト (Microsoft Excel format, *.xlt) を作成した. 縮約した NMR データは SIMCA-P+ (Umetrix 社製)で主成分分析を行い, 外れ値がないことを確認後, 部分最小二乗法判別解析 (PLS-DA)を行った. PLS-DA で変動を示す軸については S プロット表示を行い, 変動に寄与しているケミカルシフ

トを解析した. ケミカルシフトからの内因性代謝物の同定は NMR SUITE で行った.

C. 研究結果・考察

1. ¹H-NMR 測定と統計解析

レボメトルファンおよびデキストロメトルファン投与後, 0~24hr, 24~48hr, 48~72hr に採取した尿に, D₂O (10%)及び, 内部標準試料として 10mM イミダゾール (10mM)と TSP(0.5mM)を加えて調整し, ¹H-NMR を測定した. ¹H-NMR の測定は軽水のシグナルを消去する為, presaturation NOESY のパルスシーケンスを用いて行った. 代表的な尿の ¹H-NMR スペクトルを Figure 1 に, また, 同条件で測定したレボメトルファンとデキストロメトルファンの ¹H-NMR スペクトルを Figure 2 に示す. 尿の ¹H-NMR スペクトルは様々な内因性代謝物に由来するピークが確認された. ピークの同定は測定データの FID を ¹H-NMR による代謝物解析ソフトウェア (NMR SUITE)にエクスポートした後, 尿中代謝物スペクトルのデータベースによるフィッティングを行うことによって解析した. その結果, クエン酸, コハク酸, 2-オキシグルタル酸, クレアチンなどのエネルギー代謝に関する代謝物, アラニンやスレオニンなどのアミノ酸および尿素, タウリン, トリメチルアミン N-オキシド (TMAO), アラントイン, 馬尿酸, ギ酸, コレステロール, 脂質などを同定することができた. しかしながら, スペクトルからレボメトルファンとデキストロメトルファンおよびそれらの代謝物に由来するピークを検出することはできなかった.

次に両薬物投与による内因性代謝物の特徴的な変動を明らかにする為, 測定した全ての尿の ¹H-NMR スペクトルデータを用いた統計解析を試みた. ¹H-NMR スペクトルを 0.04 ppm 幅毎のケミカルシフトと相当する積分値で縮約したデータについて多変量解析を行っ

た。その結果、Figure 3 に示すように、多変量解析の方法として部分最小二乗法判別解析 (PLS-DA) を用いることによって、全ての尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを時間経過を反映する軸 (t[2]) と化合物に特徴的な軸 (t[3]) で分類することができた。この PLS-DA 表示では、t[2] は負方向から正方向に尿採取の時間経過を示し、t[3] はデキストロメトर्फアンを正方向に、レボメトर्फアンを負方向に示している。そこで時間経過で変動する内因性代謝物および薬物に特徴的な内因性代謝物について、それぞれの軸の S プロット表示を行い、変動に大きく寄与しているケミカルシフトから解析を行った。Figure 4 に t[2] 軸および t[3] 軸の S プロットを示す。その結果、t[2] の S プロットから時間経過とともに増加する代謝物として尿素 (5.86ppm, 5.82ppm)、タウリン (3.42ppm)、また、減少する代謝物としてジメチルグリシン (3.7ppm)、アラントイン (5.38ppm)、コハク酸 (2.38ppm) を特定することができた。一方、t[3] の S プロットからはレボメトर्फアンとデキストロメトर्फアン投与で尿中排泄量に差が見られる代謝物としてジメチルグリシン (3.7ppm)、クエン酸 (2.54ppm)、クレアチン (3.02ppm)、2-オキシグルタル酸 (2.42ppm) を特定することができた。これらの代謝物は t[3] 軸の負方向に分布することから、デキストロメトर्फアンと比べてレボメトर्फアン投与で増加する代謝物であると予測される。

2. レボメトर्फアン投与で変動する内因性代謝物

レボメトर्फアンとデキストロメトर्फアンの全ての尿のスペクトルを用いた統計解析では、尿採取の時間経過に特徴的な両薬物に共通する内因性代謝物を特定することはできるが、それぞれの薬物固有の時間経過に伴う代謝変動を明らかにすることはできない。そこで薬物毎の統計解析を行い、それぞれの薬物に特徴

的な代謝物の変動を明らかにした。レボメトर्फアンの尿スペクトルを PLS-DA によって多変量解析した結果と PLS-DA の t[1] 軸の S プロットを Figure 5 に示す。PLS-DA よりレボメトर्फアンの尿中代謝物の時間変動は t[1] 軸の負方向に反映していることが示された。しかし、0~23hr の尿に対して 24~48hr と 48~72hr の尿は t[1] 軸上ではほぼ同じ領域 (0~-0.3) に位置していた。これは、レボメトर्फアンの内因性代謝物への影響が、投与終了後、24 時間以降に回復していることを示唆している。レボメトर्फアン投与によって経時的に変動する内因性代謝物は t[1] 軸の S プロットから解析した。その結果、TMAO (3.26ppm)、タウリン (3.42ppm)、2-オキシグルタル酸 (2.42ppm) が増加し、一方、ジメチルグリシン (3.7ppm)、クエン酸 (2.54ppm) が減少することが明らかとなった。

3. デキストロメトर्फアン投与で変動する内因性代謝物

デキストロメトर्फアンの尿スペクトルを PLS-DA によって多変量解析した結果と PLS-DA の t[1] 軸の S プロットを Figure 6 に示す。デキストロメトर्फアンの尿中代謝物の変動は t[1] 軸に反映していることが示された。また、48~72hr 採取の尿は 24~48hr 採取の尿よりもさらに負方向に位置していた。内因性代謝物の影響は 0~24 時間採取の尿に最も強く現れることから、レボメトर्फアンと比べてデキストロメトर्फアンは内因性代謝物への影響からの回復が遅いことが示唆された。次に t[1] 軸の S プロットより、変動に寄与している代謝物を解析したところ、TMAO (3.26ppm)、クエン酸 (2.54ppm)、ジメチルグリシン (3.7ppm)、馬尿酸 (7.54ppm) が増加していることが明らかとなった。

4. 薬物に特徴的な内因性代謝物

レボメトर्फアンとデキストロメトर्फア

ンを多変量解析によって経時的に変動する尿中の内因性代謝物を検討したところ、薬物投与によって変動する代謝物の正常値への回復はレボメトर्फアンの方が早いことが示された。そこで次に、両薬物投与によって影響する内因性代謝物の違いを明らかにすることを目的として、両薬物の尿のスペクトルについて採取時間毎の PLS-DA と S プロット解析を行った。Figure 7 に採取時間毎の PLS-DA と S プロットの結果を示す。その結果、全ての採取時間の PLS-DA でレボメトर्फアンとデキストロメトर्फアンを別々の群に分けることができ、内因性代謝物に与える影響は薬物によって大きく異なることが示された。S プロットより 0~24hr ではジメチルグリシン(3.7ppm)、クエン酸(2.54ppm)、クレアチン(3.02ppm)、2-オキソグルタル酸(2.42ppm)がレボメトर्फアン投与尿に高濃度にみられ、タウリン(3.42ppm)はデキストロメトर्फアン投与尿に高濃度にみられた。また 24~48hr でもほぼ同様の傾向として、ジメチルグリシン(3.7ppm)、クレアチン(3.02ppm)がレボメトर्फアン投与尿で高く、タウリン(3.42ppm)がデキストロメトर्फアン投与尿で高くみられ、さらに TMAO(3.26ppm)がレボメトर्फアンに特徴的に増強することが示された。一方、48~72hr の S プロットからは、0~24hr 及び 24~48hr で変動がみられた代謝物はタウリン(3.42ppm)を除いて二群への分離に寄与していないことが示された。この結果は、両薬物投与によって影響を受けた内因性代謝物の濃度は 48~72hr でほぼ正常に戻ったことが考えられる。代わりに 48~72hr の分離に寄与している代謝物として、馬尿酸(7.54ppm)、アラントイン(5.38ppm)、クエン酸(2.54ppm)、クレアチニン(4.02ppm)、脂質(0.86ppm)がレボメトर्फアンと比べてデキストロメトर्फアンで高濃度を示した。また、タウリン(3.42ppm)は 0~24hr 及び 24~48hr ではデキストロメトर्फアン投与尿で高濃度

を示したが 48~72hr ではレボメトर्फアン投与尿で高くなることがわかった。

5. 内因性代謝物の経時変化

レボメトर्फアンとデキストロメトर्फアンに特徴的な内因性代謝物の変動を投与尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを多変量解析することにより明らかにすることができた。そこで両薬物摂取のバイオマーカーとしてのこれらの内因性代謝物の有用性について、薬物投与後の代謝物の経時変化から検討を行った。PLS-DA と S プロットにより明らかにした両薬物投与で特徴的に変動する内因性代謝物およびスペクトルから同定可能なその他の代謝物について、 $^1\text{H-NMR}$ シグナルの経時変化を Figure 8 に示す。両薬物を同条件で腹腔内投与すると、未変化体と抱合体の血漿中濃度は約 30 分で最大値を示し、約 12 時間で検出されなくなることが花尻らによって報告されている⁵⁾。また、これらの代謝物は 24 時間以内に尿中へ排泄されることから、化合物による生体影響とそれに伴う内因性代謝物の変動も 24 時間内に発生することが予測される。実際、0~24 時間の S プロットで特定できた両化合物を特徴づける内因性代謝物(ジメチルグリシン、クエン酸、クレアチン、2-オキソグルタル酸)は全て有意差がみられることから、両化合物による生体影響を識別するバイオマーカーとして有効であることが示唆された。クエン酸、2-オキソグルタル酸およびクレアチニンはエネルギー代謝に関する代謝産物であり、また、ジメチルグリシンはコリンの分解産物であることから、これらの代謝物濃度の差はレボメトर्फアンとデキストロメトर्फアンの作用の違いが細胞内代謝に影響を与えた結果と考えられる。

不正薬物の摂取証明において、摂取直後に被疑者から生体試料を採取できれば、薬物由来の代謝物を比較的容易に検出することが可能であり、今回、新たに内因性代謝物の変動を撰

取証明のバイオマーカーとして利用可能である可能性を示すことができた。しかしながら、薬物の未変化体とその代謝物は、その殆どが摂取してから 24 時間以内に排泄されてしまうため、摂取してから長時間経過して採取した生体試料からの証明は難しい。もし、不正薬物に特徴的な内因性代謝物の変動が薬物排泄後も観測できれば、それは薬物摂取を証明するバイオマーカーとして利用できる可能性がある。薬物によって変動を示した内因性代謝物は、長時間経過すると正常値へと回復する。しかしながら、レボメトルファン投与尿では馬尿酸とアラントインおよびトリゴネリンが 48~72hr で大きく低下していることがわかった。この結果は馬尿酸とトリゴネリンがレボメトルファンとデキストロメトルファンの摂取識別に有効なバイオマーカーとして利用可能なことを示している。また、脂質は 48 時間まで殆ど変化がないが、48~72hr 尿で大きく増加した。この結果は両化合物の反復投与によって低下していた脂質の生合成が投与終了して 48 時間経過後に回復が始まることを示唆しているが、48~72hr の脂質濃度に両薬物で大きな差が見られたことは、脂質も摂取識別に有効なバイオマーカーとして利用可能なことを示唆している。

D. 結論

不正薬物の摂取証明への NMR の有用性を検討することを目的として、麻薬として規制されているレボメトルファンと一般用医薬品である光学異性体のデキストロメトルファンを投与した尿の $^1\text{H-NMR}$ を測定して統計解析を行い、両薬物に特徴的な代謝変動を解析した。尿中には 24 時間以内に両薬物の未変化体および抱合体が排泄されるが、0~24hr 採取尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルからは薬物由来のピークは検出できなかった。花尻より同様の実験において両薬物に由来する代謝物の尿への総排泄

量は約 $400\ \mu\text{g}$ ~ $500\ \mu\text{g}$ であることが報告されており、薬物の尿中濃度は本研究で使用した 600MHz の NMR では検出限界以下であったと考えられる。薬物由来のピークが観測できない NMR で摂取証明を行うことは大変難しいことが予測されるが、もし不正薬物によって変動する内因性代謝物をバイオマーカーとして利用できれば、麻薬に特徴的な精神依存と神経毒性の診断に NMR は利用可能である。レボメトルファンとデキストロメトルファンの投与尿は非常に類似した $^1\text{H-HNMR}$ スペクトルを示したが、スペクトルを多変量解析することにより、全ての尿を薬物と尿の採取時間の違い(0~24, 24~48, 48~72 時間)によって統計学的に別々の群として分類することができた。この結果は、両薬物が内因性代謝物に与える影響は異なること、また、その影響は時間経過とともに変化し、長時間継続していることを示している。従って、尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルについて多変量解析を行い、統計学上どの群に分布しているかを特定することによって、摂取被疑者の薬物依存状態を予測できる可能性が示された。

レボメトルファンとデキストロメトルファンによる直接影響と考えられる投与後 24 時間以内に変動する内因性代謝物としては、エネルギー代謝に関するクエン酸、2-オキソグルタル酸、クレアチニンおよびコリンの分解産物であるジメチルグリシンの尿中濃度がレボメトルファンで高く、デキストロメトルファンで低くなることがわかった。また、投与後 48~72 時間に採取した尿では馬尿酸、トリゴネリンの濃度がレボメトルファンで大きく低下していることがわかった。長時間経過しても変動がみられる内因性代謝物は薬物依存性を診断する上で重要なバイオマーカーになると考えられる。

以上、尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを多変量解析することにより、レボメトルファンとデキストロメトルファンによる内因性代謝物の特徴的な変動を明らかにすることができた。この結

果は、現在、法規制されている薬物全てについて、尿の $^1\text{H-NMR}$ から統計学的な分類分けが可能であることを示している。従って $^1\text{H-NMR}$ のデータベースを整備することができれば、新たな摂取被疑者について薬物の種類とその依存状態について本手法による統計学的な予測ができる可能性が示唆された。

E. 参考文献

- 1) Shoda, T., et. al., *Drug Test. Analysis*, **3**, 594-596 (2011).
- 2) Fukuhara, K., et. al., *Drug. Metab. Pharmacokinet.* **26**, 399-406 (2011).
- 3) Chyka, P. A., et.al., *Clinical Toxicology*, **45**, 662-677 (2007).
- 4) Logan, B. K., et. al., *J. Amal. Toxicol.*, **33**, 99-103 (2009).
- 5) 花尻ら, 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 平成 21 年度 総括・分担研究報告書

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Enzyme-assisted synthesis of the glucuronide conjugate of psilocin, a hallucinogenic component of magic mushroom, Shoda, T., Fukuhara, K., Goda, Y., Okuda, H., *Drug Test. Analysis*, **3**, 594-596 (2011)

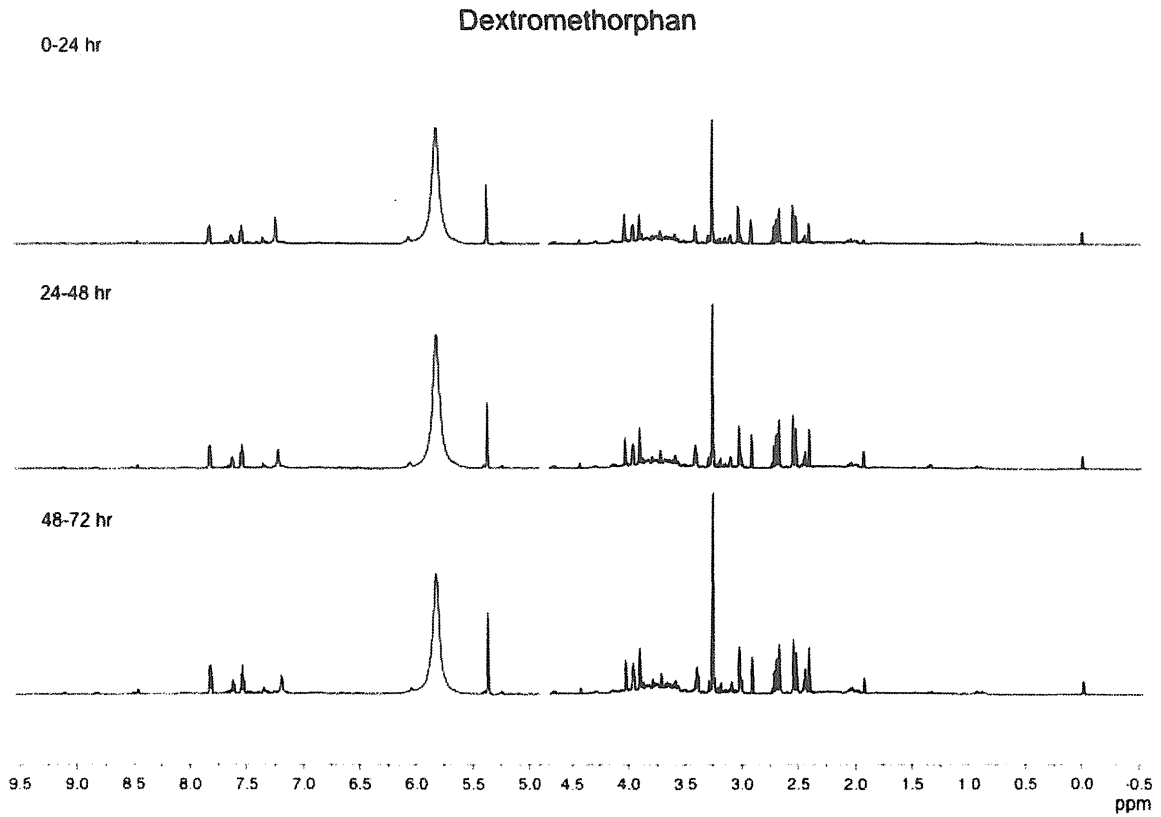
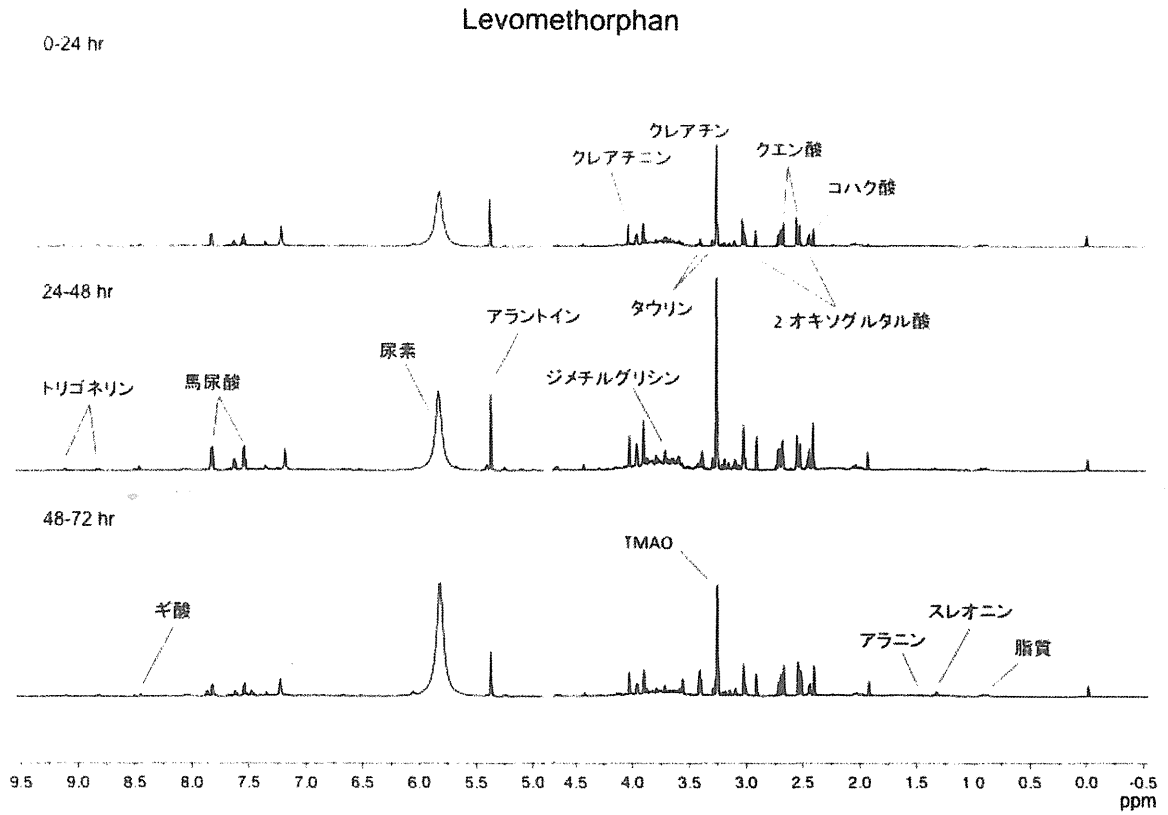


Figure 1 レボメトルファンおよびデキストロメトルファン投与後 0~24hr, 24~48hr, 48~72hr に採取した尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

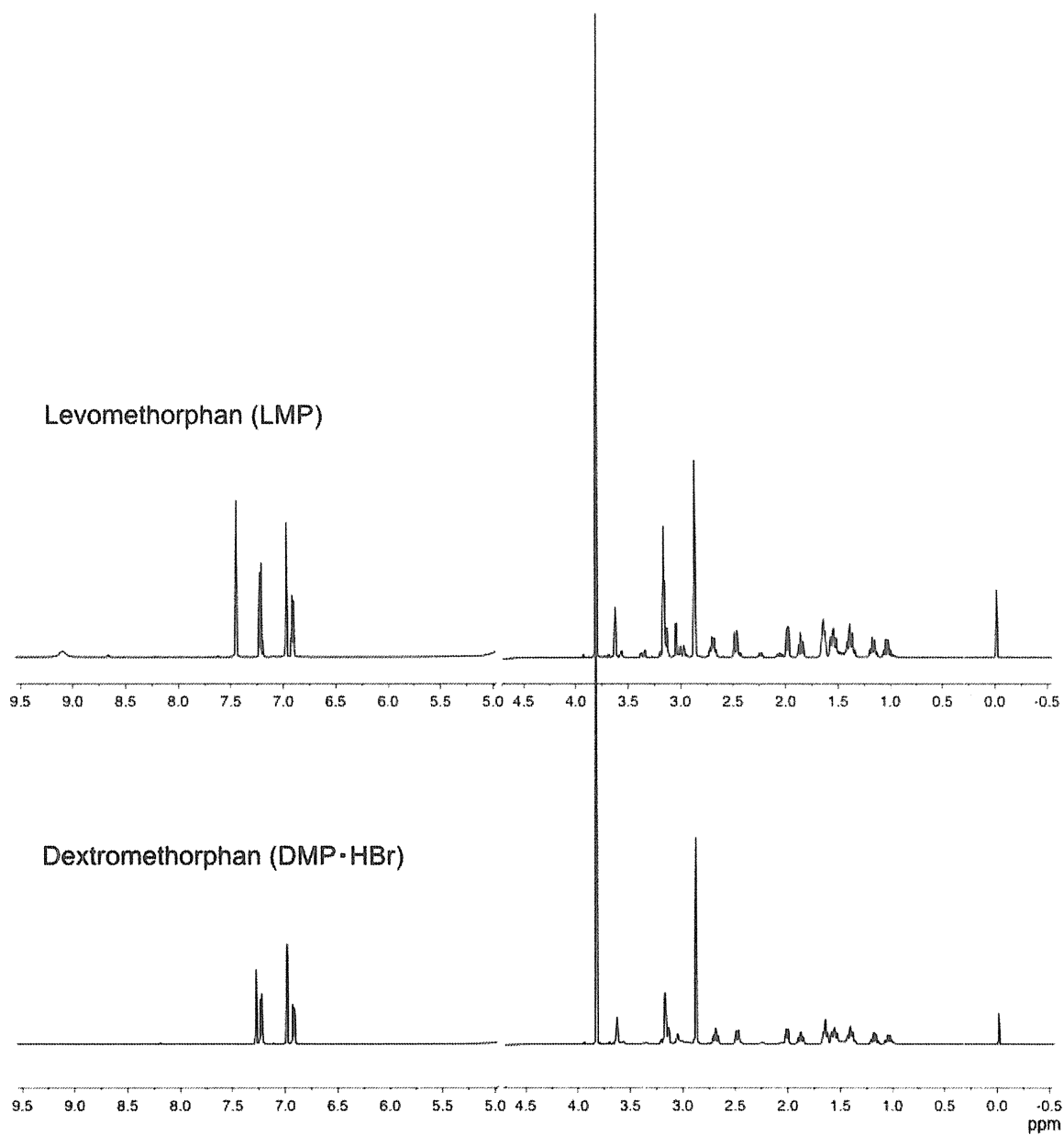
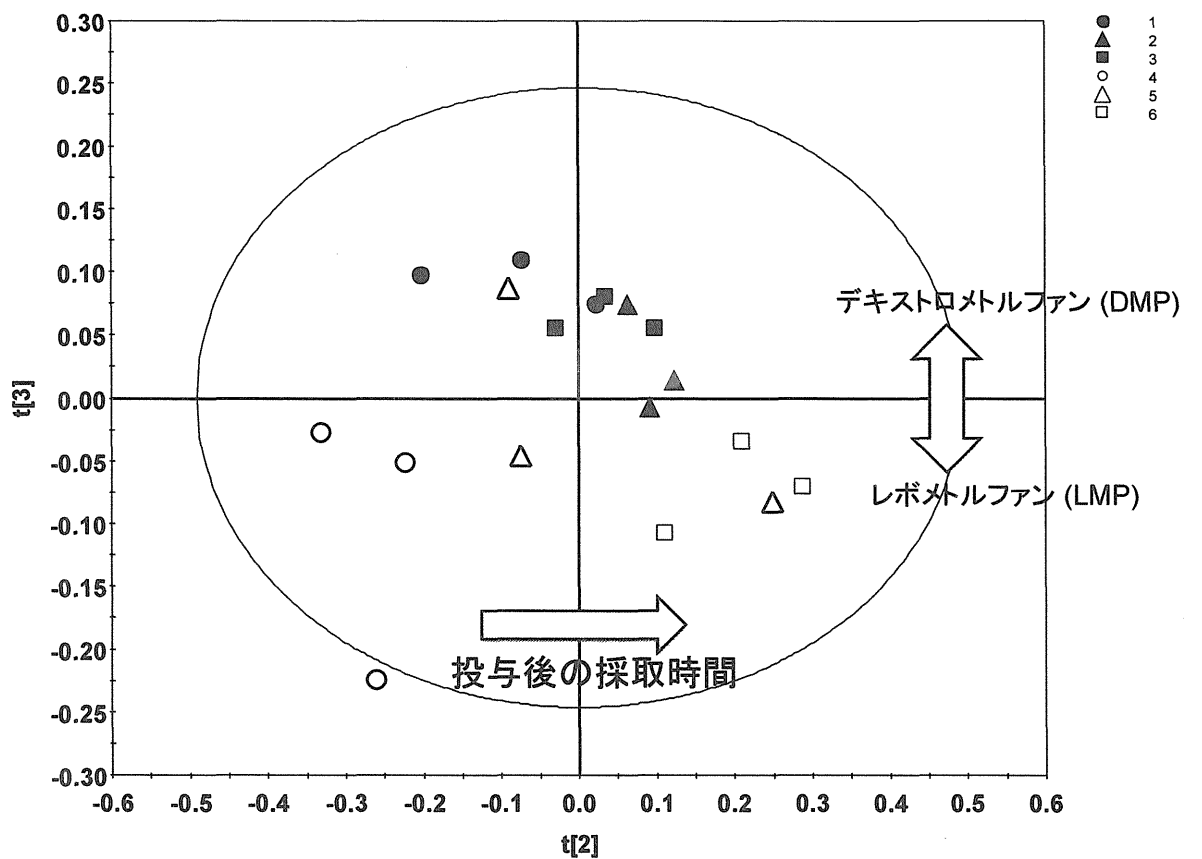


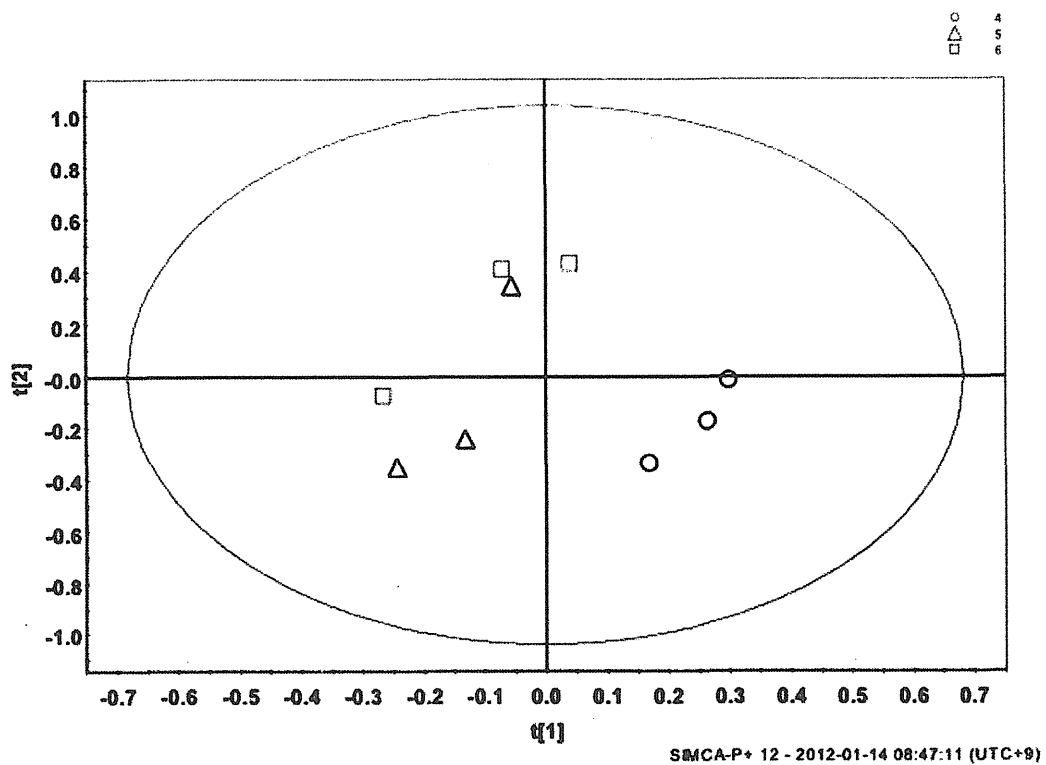
Figure 2 レボメトルファンとデキストロメトルファンの水溶液(10% D₂O)の¹H-NMR スペクトル.



SIMCA-P+ 12 - 2012-01-14 07:41:03 (UTC+9)

Figure 3 レボメトर्फアンとデキストロメトर्फアン投与尿の多変量解析(PLS-DA)結果
 レボメトर्फアン投与後：○ (0~24hr), △ (24~48hr), □ (48~72hr)
 デキストロメトर्फアン投与後：● (0~24hr), ▲ (24~48hr), ■ (48~72hr)

1) 多変量解析(PLS-DA)



2) t[1]軸のSプロット

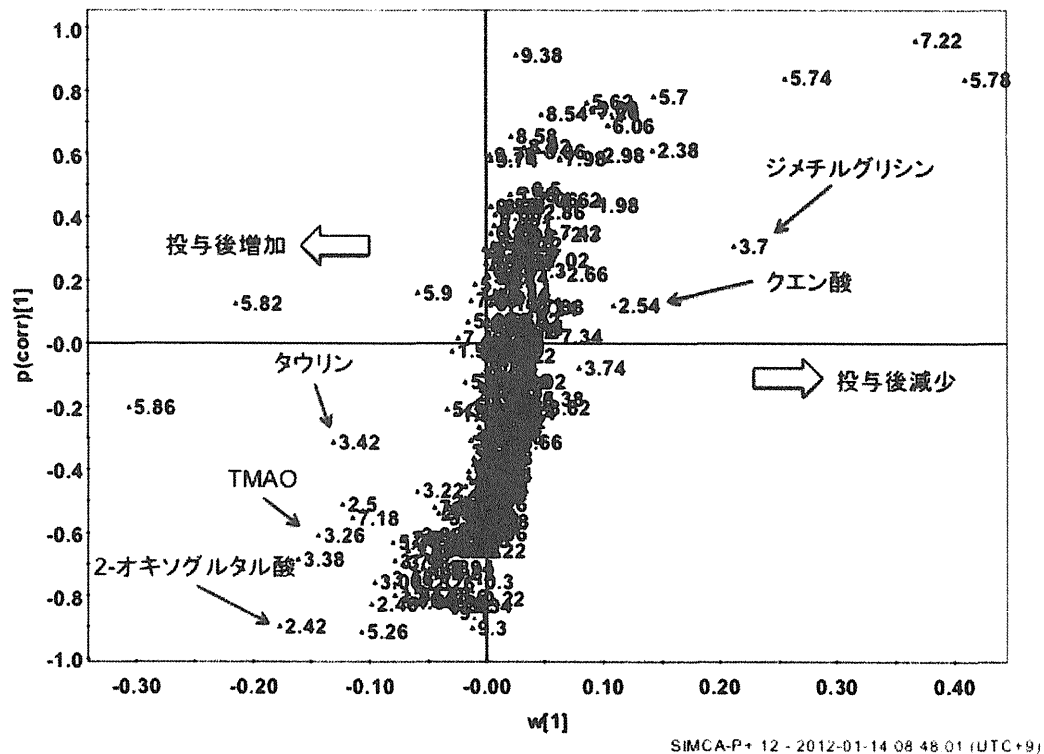
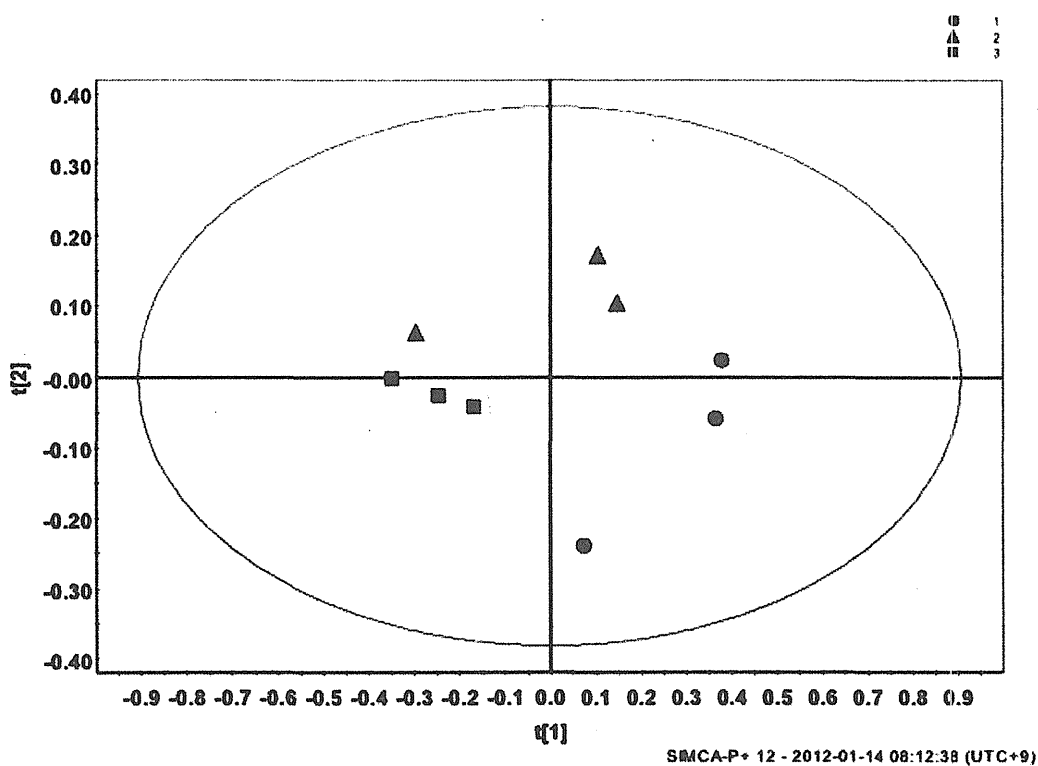


Figure 5 レボメトルフアン投与尿の多変量解析(PLS-DA)結果と t[1]軸の S プロット
 レボメトルフアン投与後 : ○ (0~24hr), △ (24~48hr), □ (48~72hr)

1) 多変量解析(PLS-DA)



2) t[1]軸のSプロット

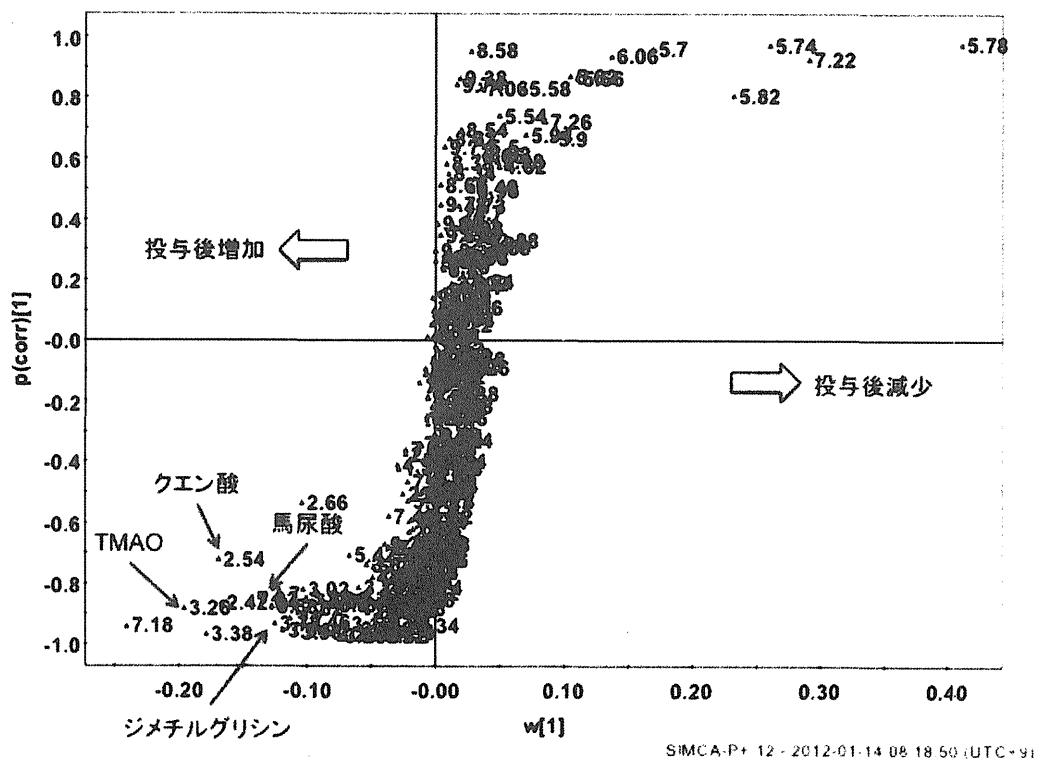
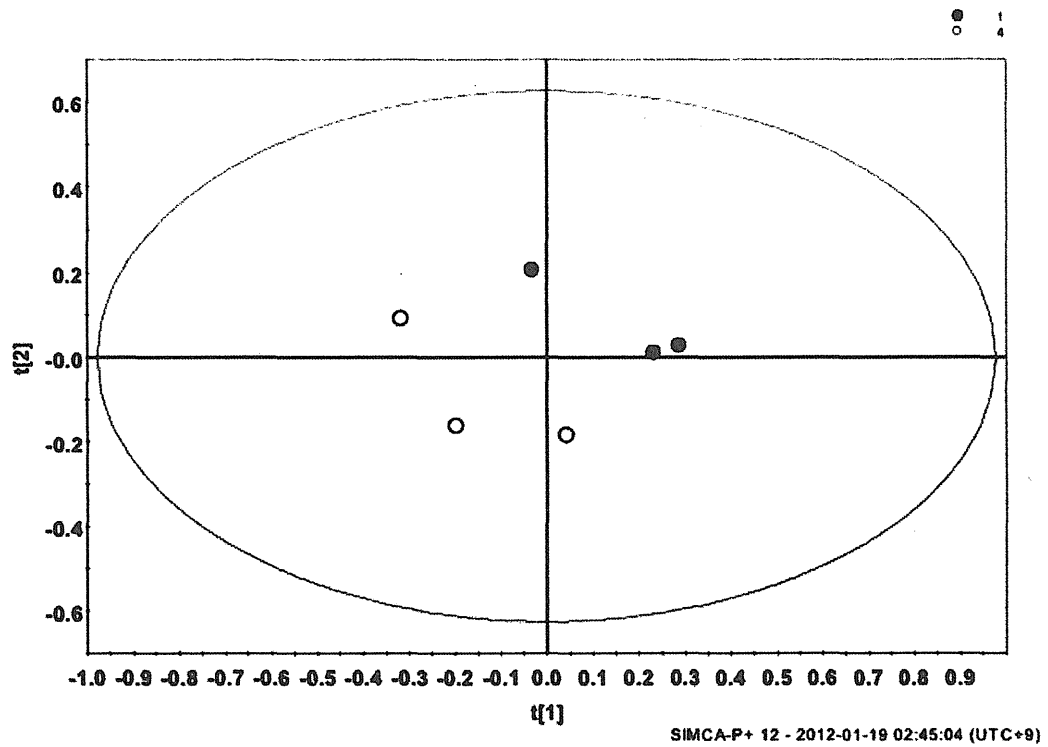


Figure 6 デキストロメトルファン投与尿の多変量解析(PLS-DA)結果と t[1]軸の S プロット
 デキストロメトルファン投与後：● (0～24hr), ▲ (24～48hr), ■ (48～72hr)

1) 0~24hr: 多変量解析(PLS-DA)



2) 0~24hr: t[1]軸の S プロット

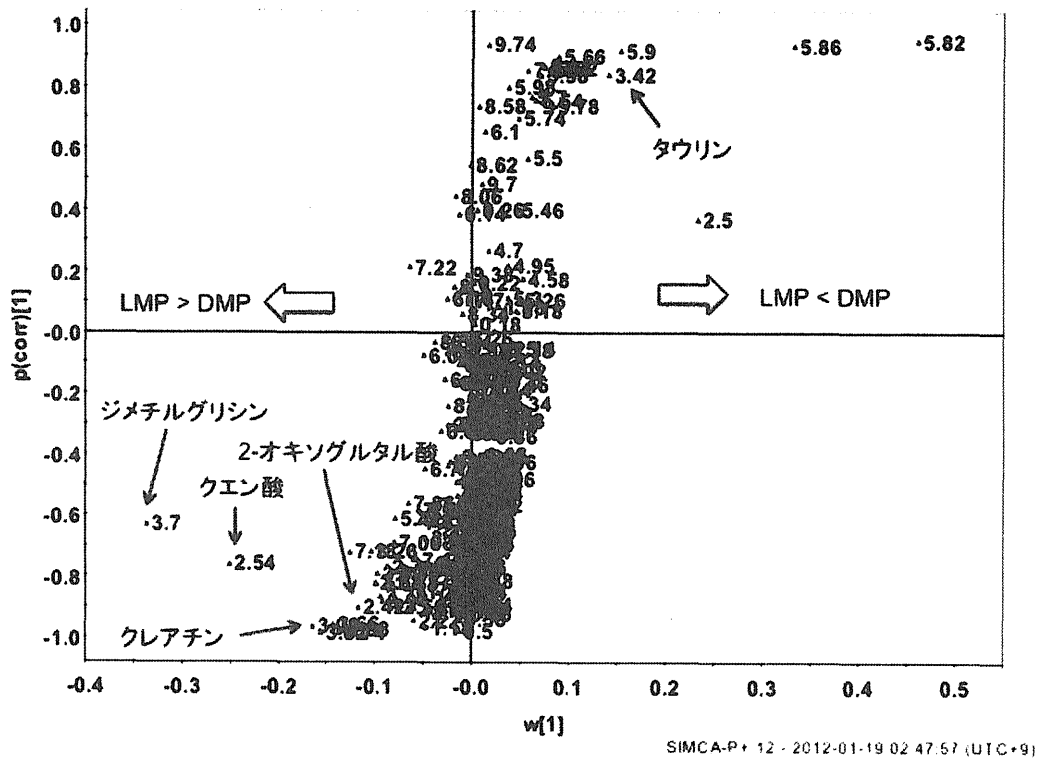
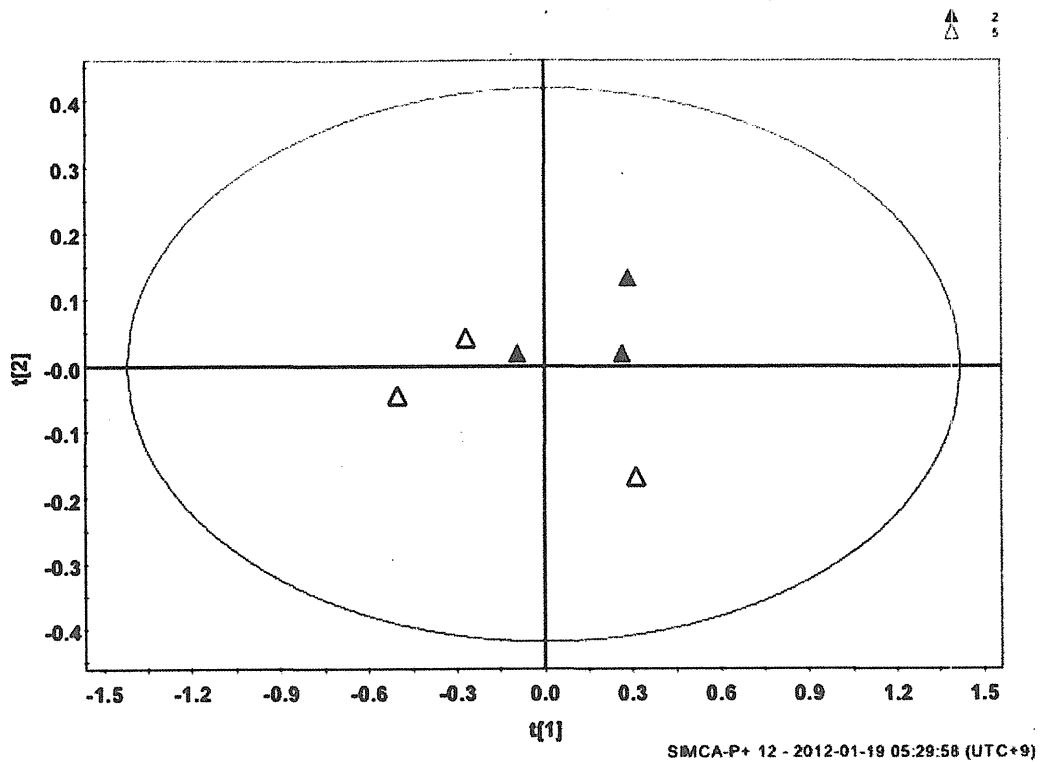


Figure 7a 薬物投与後0~24時間に採取した尿の多変量解析(PLS-DA)結果とt[1]軸のSプロット
 ○: レボメトルファン (LMP), ●: デキストロメトルファン (DMP)

1) 24~48hr: 多変量解析(PLS-DA)



2) 24~48hr: t[1]軸の S プロット

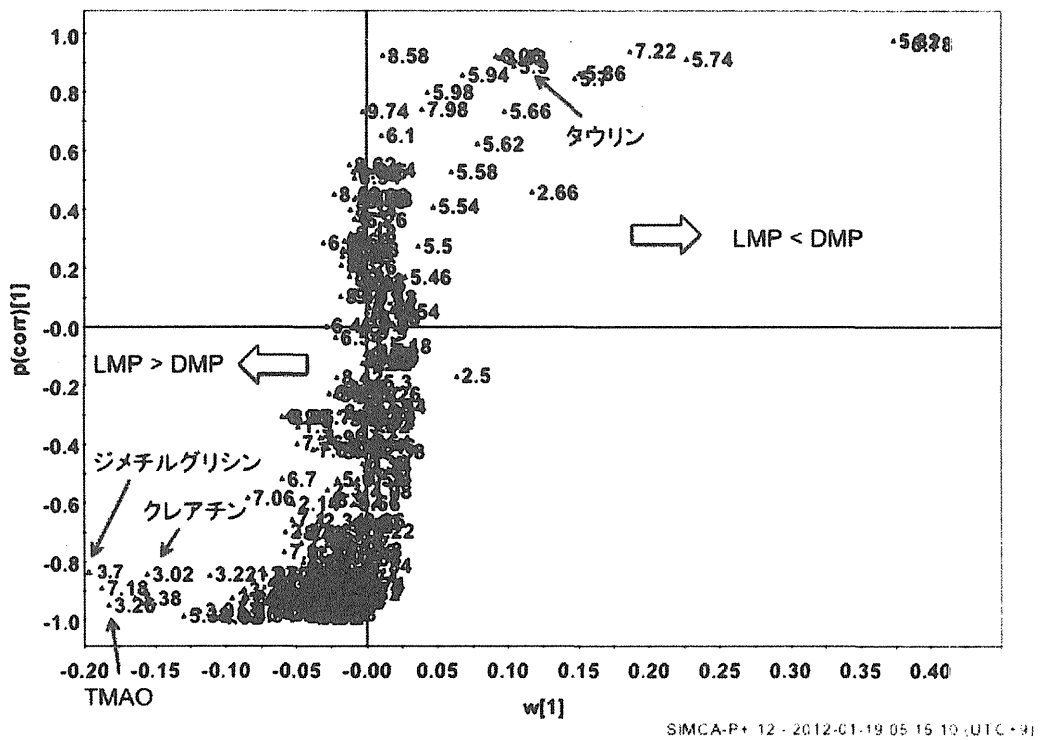
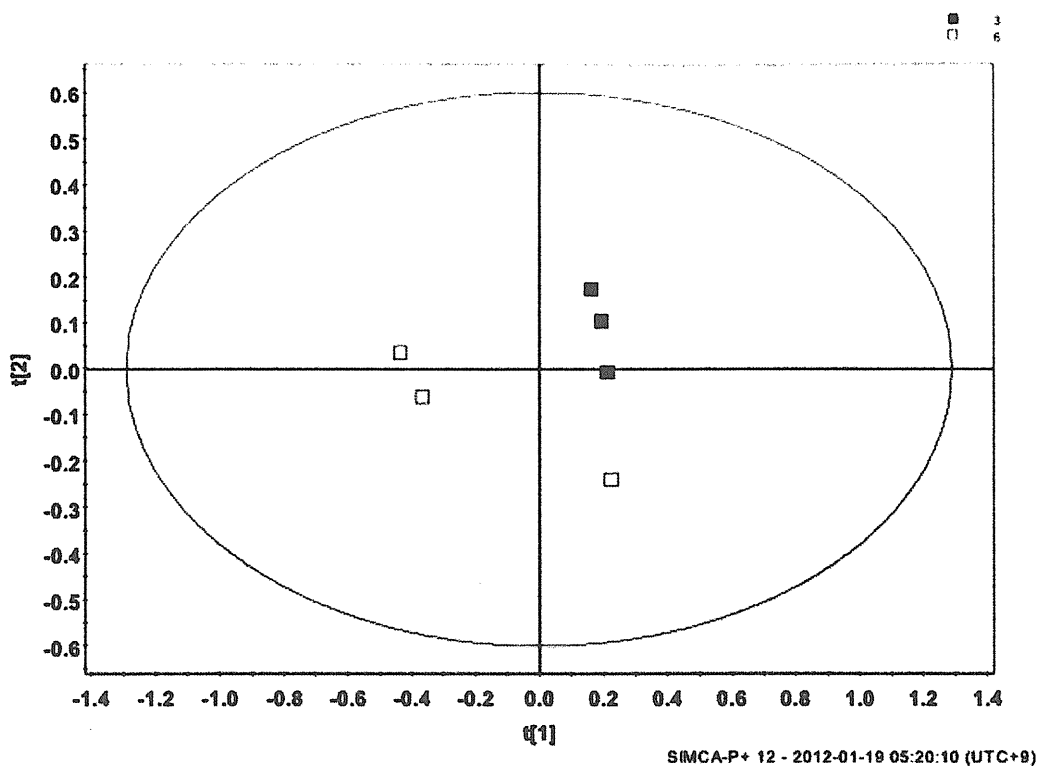


Figure 7b 薬物投与後 24~48 時間に採取した尿の多変量解析(PLS-DA) 結果と t[1]軸の S プロット
 △ : レボメトルフアン (LMP), ▲ : デキストロメトルフアン (DMP)

1) 48~72hr: 多変量解析(PLS-DA)



2) 48~72hr: t[1]軸の S プロット

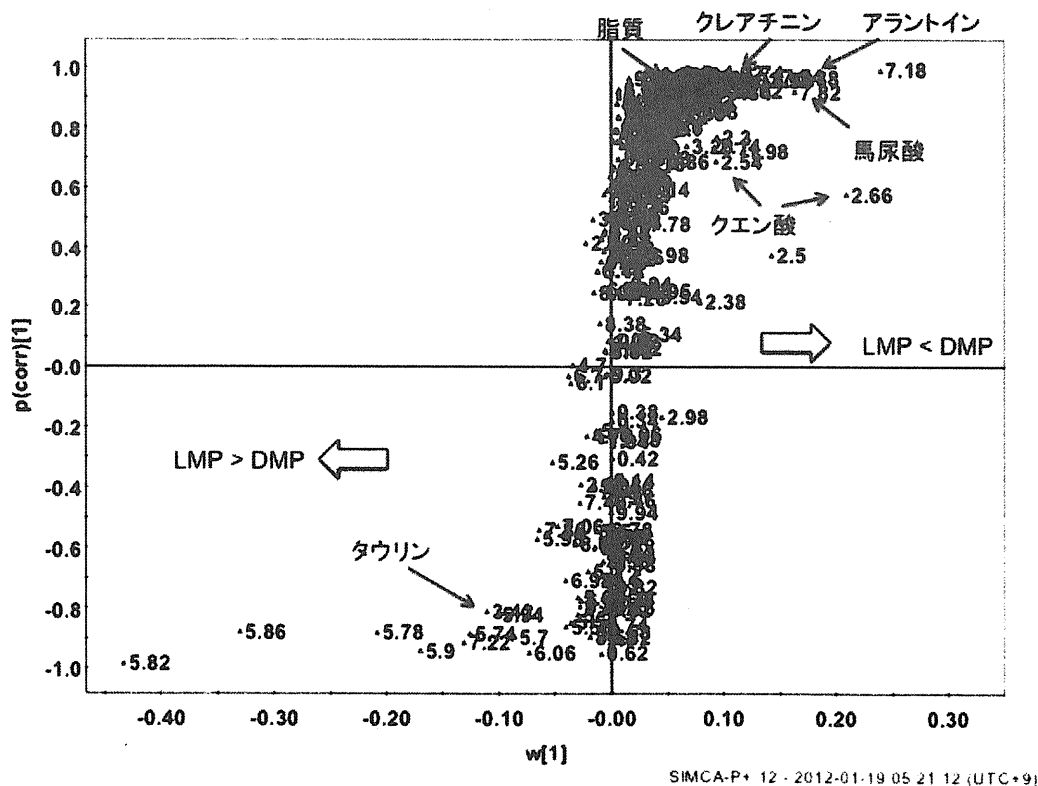


Figure 7c 薬物投与後 48~72 時間に採取した尿の多変量解析(PLS-DA) 結果と t[1]軸の S プロット
 □ : レボメトトルファン (LMP), ■ : デキストロメトトルファン (DMP)

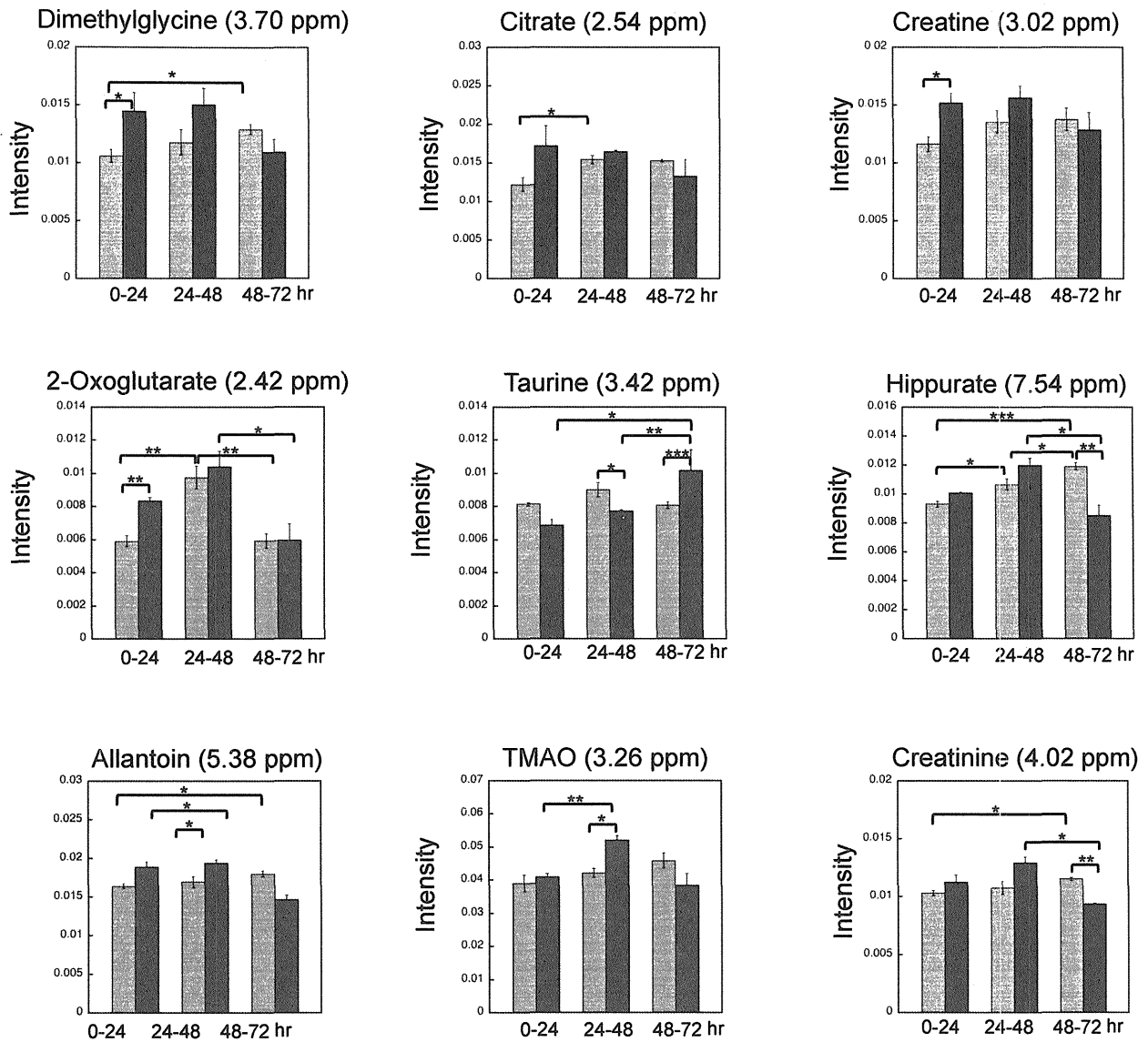


Figure 8 薬物投与後に変動が見られる主な内因性代謝物

■ : デキストロメトルファン ■ : レボメトルファン

T-test ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$)

Values are means \pm S.E. of at least 3 experiments.

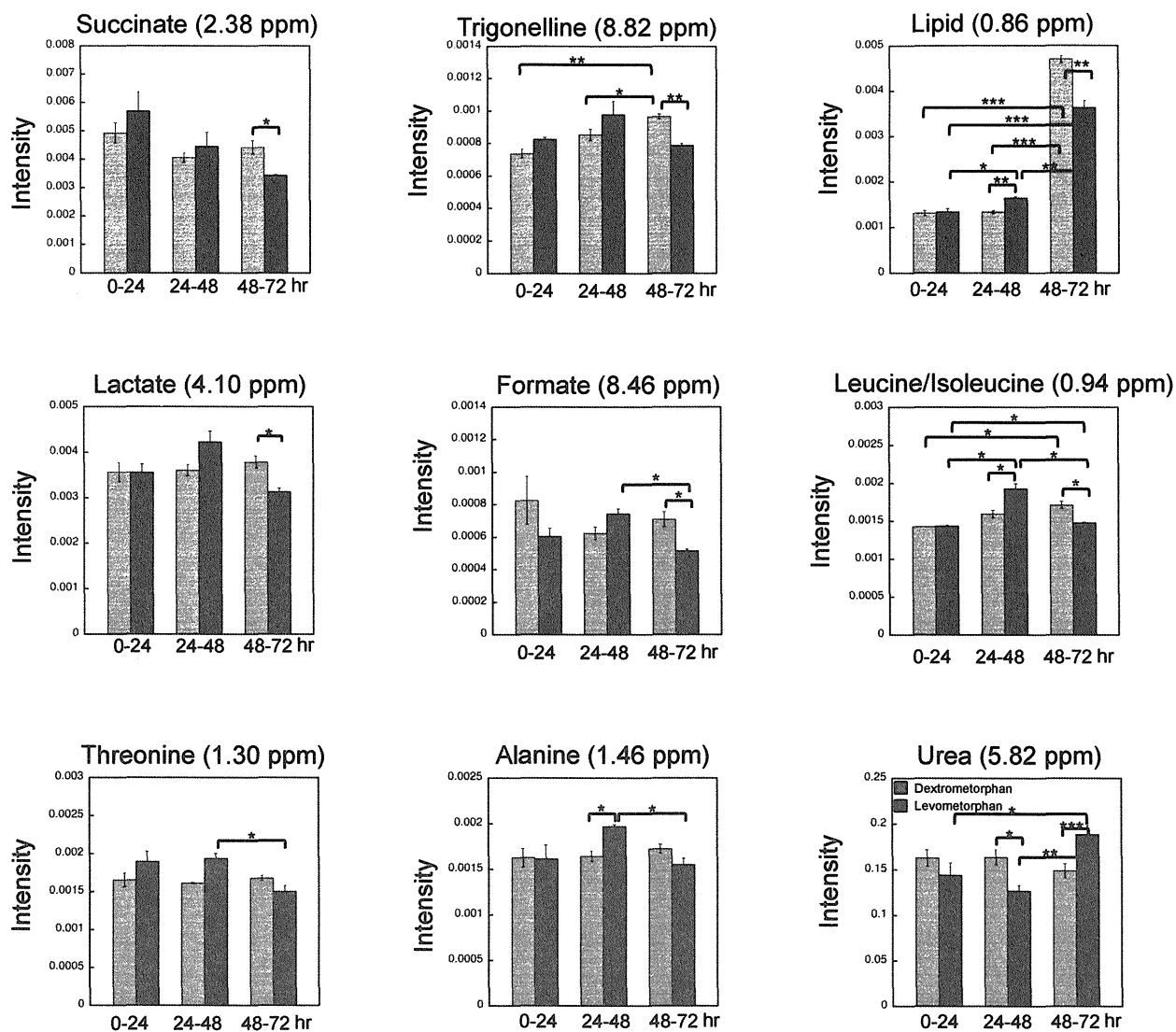


Figure 8 (続き) 薬物投与後に変動が見られる主な内因性代謝物

■ : デキストロメトルファン ■ : レボメトルファン

T-test ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$)

Values are means \pm S.E. of at least 3 experiments.

分担研究課題 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

分担研究者

河野徳昭（独）医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部 主任研究員

研究要旨 ケシ属植物は、類似した形態を有し、栄養繁殖期における識別には経験を要する。本研究においては、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のひとつと推定される(S)-3'-hydroxy-N-methylcoclaurine-4'-O-methyltransferase (4' OMT)のゲノムDNA部分配列(4' OMTg)の多型情報による植物種、系統の迅速かつ簡便な判別法の確立について検討する。今年度は、*Papaver pseudo-orientale* (PPO)、オニゲシ*P. orientale* (PO)、ハカマオニゲシ*P. bracteatum* (PB)間の遺伝子鑑別に利用可能と期待される、PPO特異的に反応する可能性が高いプライマーセットを用い、当センターにPB種子として導入された系統について、プライマーの反応性を検討し、植物種の遺伝子鑑別に利用できることを示唆する結果を得た。また、ケシ*P. somniferum* (Ps)、アツミゲシ*P. setigerum* (Pseti)及びヒナゲシ*P. rhoeas* (Pr)間の識別が可能なプライマーについて、プライマー配列及びPCR条件を精査し、植物種識別の精度を向上させることに成功した。

A. 研究目的

ケシ属植物は種間で類似した形態を有し、とくに、栄養繁殖期における識別には経験を要する。本研究においては、遺伝子レベルでのケシ属植物各種の判別に利用可能なゲノムDNA配列の相違点を見出し、迅速かつ簡便な判別法の確立を目的とする。本研究の成果として、ケシ属植物の簡便な判別法が確立されれば麻薬植物の監視行政への多大な貢献が期待される。また、本研究においては、植物種の判別法として、植物をはじめとする生物全般に普遍的に存在する遺伝子、たとえば、核リボソームDNAのITS領域、葉緑体DNAの遺伝子、*matK*遺伝子、*rbcL*遺伝子の塩基配列の変異（多型）を進化遺伝学的に解析し、分類するという手法を用いるのではなく、有用物質生産に関わる二次代謝酵素遺伝子群のうち、とくに鍵酵素と予想される反応段階に関わる酵素遺伝子について、塩基配列の種間、系統間変異のデータを集積し、それらの多型情報による植物種、系統の同定が可能か否かを検討する。本手法により、遺

伝子レベルの情報と、薬用植物の品質の主体である有用物質の組成、含有量との相関について直接的な議論が可能になると考えられ、他の薬用植物等への応用や有用物質高生産株の育種マーカーとしての利用も期待され、その意義は大きい。

本年度は、近縁な植物種と考えられ、形態による識別が難しいケシ属植物、*Papaver pseudo-orientale* (PPO)、オニゲシ*P. orientale* (PO)、ハカマオニゲシ*P. bracteatum* (PB)間の遺伝子鑑別に利用可能と期待される、PPO特異的に反応する可能性が高いプライマーセットを用い、（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター（以下、センター）にPBとして種子で導入された系統について、プライマーの反応性を確認した。また、ケシ*P. somniferum* (Ps)、アツミゲシ*P. setigerum* (Pseti)及びヒナゲシ*P. rhoeas* (Pr)間の識別が可能なプライマーについて、プライマー配列及びPCR条件を精査し、植物種識別の確度の向上について検討を行った。