

201235009B

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

法規制薬物の分析と鑑別に関する研究

平成 22 年度～24 年度 総合研究報告書

(H22-医薬-一般-016)

研究代表者 合田 幸広

平成 25 (2013) 年 3 月

## 目 次

I. 総合研究報告書	
法規制薬物の分析と鑑別に関する研究 合田 幸広	..... 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 23
III. 研究成果の刊行物・別刷	..... 25

## 法規制薬物の分析と鑑別に関する研究

研究代表者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

本研究では、法規制薬物の内、麻薬・向精神薬取締法及びあへん法など関連 4 法で厳しく規制される薬物及び、今後これらの法律により規制される可能性の高い薬物を対象とし、同薬物の分析と鑑別に関する研究を行う。

分析的な面で考えると、麻薬や覚せい剤の場合、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、法規制薬物の場合、現場では様々な使用形態があるため、それぞれの使用形態に対応した分析法が重要となる。また、ケシ属植物では、法規制される植物が種により決められている一方、マジックマッシュルームの場合、麻薬成分を含む種の範囲が現段階では不明確である。さらに、大麻では、栽培品種により含有成分が大きく異なることが知られている。従って、各植物において、種や栽培品種の簡便で、厳密な鑑別法の確立が有効な規制を行うために重要な課題となっている。一般的には、植物の鑑定は開花時でないとなし。そのため、種子の段階での鑑別法ができず、種を間違えて観賞用に法規制植物であるアツミゲシ (*Papaver setigerum*) が大量に栽培された例(小貝川フラワーフェスティバル)は記憶に新しい。本研究は、このような厳しく規制される法規制薬物(植物を含む)において、現在の分析上の隘路となっている代謝物の問題と現場分析の課題、植物鑑別の問題等を解決するため行われた。

代謝物関係では、平成 24 年度に麻薬規制された合成カンナビノイド JWH-018 の代謝物を合成し、代謝物を利用した生体試料からの分析について検討した結果、尿からは、主に *N*-dealkyl 6-OH indole 体が検出される一方、毛髪においては、主に JWH-018, *N*-pentanoic acid 及び *N*-dealkyl 6-hydroxyindole 体が検出される事が判明した。さらにラットおよびヒト肝ミクロゾームを用いて、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デキストロメトルファン (DEM) と、強い鎮痛作用を有し麻薬である光学異性体レボメトルファン (LEM) の光学選択的代謝について検討するとともに、DEM/LEM 投与のラット尿について NMR を利用したメタボロミクス的アプローチを実施し、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可能であることを示した。また、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法を確立した。さらに、いわゆる脱法ハーブが関与したと考えら

れる死亡1事例において、生体試料中薬物の検討を行った。

現場分析関係では、押収錠剤型麻薬の形態観察及び薬物含有量を調査するとともに、マイクロ波を利用した違法薬物誘導体化条件の検討を行った。また、薬物犯罪の捜索現場で発見された物件が違法薬物であるか否かを迅速に判定する方法として、携行型ラマン分光光度計の有効性を検討した。また、合成カンナビノイド類（JWH-018等は麻薬）の呈色による簡易検出法の検討を行うと共に、今後麻薬に指定される可能性のある1-(1H-インドール-5-イル)プロパン-2-アミン（5-IT）の標品の合成を実施した。

また別に、麻薬向精神薬の評価系として薬物報酬系について検討し、学習が成立したマウスについて、向精神薬MK-801を投与すると、行動量が増加して正答率が低下、メタンフェタミンでは、行動量が低下して正答率が低下する一方、合成カンナビノイドであるWIN55212-2では、鎮静効果により行動に時間がかかるようになるものの正答率は変わらないことが判明した。

植物関係では、まず遺伝子情報を利用したケシ属植物の簡便な識別法を検討した。ハカマオニゲシ（PB）として収集した種子について、4' OMT 遺伝子の塩基配列を決定、*Papaver pseudo-orientale*（PPO）特異的プライマーを用いPCRを実施、同プライマーがPB、PPO等の近縁植物間の識別に利用可能であること明確にした。さらに、ケシ*P. somniferum*（Ps）、アツミゲシ*P. setigerum*（Pseti）及びヒナゲシ*P. rhoeas*（Pr）間の識別プライマー及びPCR条件を検討し、種子を検体とした植物種鑑別法、並びに現場で容易に利用可能な、核酸調製・保存資材（FTAカード）を用いた植物種鑑別法を確立した。

大麻では、押収大麻の形態観察及びTHC含有量調査を実施し、高THC含有大麻の国内流通を確認した。さらに、大麻を鑑定する上で、常法である剛毛確認という手法が適さない事例に対応する目的で、大麻の特異的生合成化合物 $\Delta^9$ -THCAの合成関連酵素であるTHCASのDNA塩基配列を調査し、大麻を確認する際の標的遺伝子となりうるかどうか検討した。さらに、マイクロ波による大麻代謝物の簡易誘導体化法を検討し、尿中代謝物の微量定量を実施した。また別に、大麻種子1粒を用いた産地特定のためのDNA鑑別法の開発を行うため、まず、基盤研・薬植セ・筑波にて系統保存されている2種類の種子の及び、押収品由来の製品を用い、植物鑑別によく利用される遺伝子領域について解析を行った、その結果、すべての検体においてどの領域においても2種類のパターンに収束した。そこで、より変異度が高いといわれているIGS領域について検討した結果、IGSの長さ、構造に多型が生じていることが判明し、IGS内の単純反復配列を利用したPCR法による大麻の種内変異の分析法を確立した。続いて、ISSR-PCR法についても検討を行い、大麻種子1粒を用いた産地特定のためのISSR-PCR法による検討を行い、7種類の識別マーカーを作成した。それらを併用することで大麻16種中14種の大麻の相互識別が可能であることを示した。

さらに、幻覚性サルビアの幻覚性分である Salvinorin A (Sal A) の免疫化学的分析手法による検出法の開発を行い、迅速に分析可能なイムノクロマトストリップを構築した。また、幻覚性サルビアの幻覚成分であるサルビノリン A (SalA) に対する抗 SalA MAb の高機能化を目的に、抗 SalA MAb 産生ハイブリドーマを用いて組換え抗体の作成を試みた。さらに、カートに含有される麻薬成分であるカチノンについてハプテンを合成し、抗カチノン抗体を取得、本品を利用したカチノン検出競合的 ELISA を開発し、抗 CA MAb を用いた ELISA について詳細な検討を行った。

#### 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

河野徳昭 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部研究員

#### A. 研究目的

研究代表者らは、従来より、法規制薬物の代謝物に関する研究を行い、直近では、麻薬化合物レボメトルファンと光学異性体の医薬品では、毛髪中の代謝物が異なることを明らかにし、注目を浴びている。また、植物の鑑別に関する研究では、大麻種子の発芽能力の迅速鑑別法を確立し、鑑定官に対し研修指導を行うなど、取締まりの現場に直接貢献する研究を行っている。このように本研究は、現在厳しく法規制されている薬物及び今後同様に法規制される可能性の高い薬物について、監視・指導麻薬対策課、地方厚生局麻薬取締部等と連絡をとりながら現場の諸問題に対応できるように、実態に即した研究を行う点に特徴があり、日本の法規制薬物行政に直接的に貢献することを目的としている。

麻薬・向精神薬取締法等で厳しく規制される薬物は現在 250 種以上ある。一方で、この分野

では法規制を逃れるため、常に新規に合成された類縁体や植物等が出回ることが続き、結果として、毎年新規な化合物が麻薬指定されることになる。他方、このような化合物は、国民の健康被害や社会的弊害をなくす観点から、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に麻薬指定されるため、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い。本研究では、このような薬物のうち、合成カンナビノイドについて、使用罪に対応するため代謝物について検討するとともに合成し、分析と鑑別方法等について検討を行う。また、ケシの様に天然物を種として法規制するには、植物や菌類の鑑別法が重要となる。他方、植物（菌類）の場合、分類学的に形態で鑑別を行うには、経験が必要となる。従って、植物鑑定の未経験者でも、より客観性の高い鑑別が行えるように遺伝子情報を利用した鑑別法の確立が重要となる。本研究では、特に具体的な問題事例が存在した、けし属植物及び大麻について種子での鑑別法を確立すると共に、今後より厳しい法規制の可能性のあるサルビノリン A やカートの簡便な検出法の確立をはかる。さらに、薬物犯罪の捜索現場で発見された物件が違法薬物であるか否かを迅速に判定する手法の検討、錠剤系麻薬の形態観察と薬物含有量調査など、取締まりの現場で直接貢献できる研究を行う。

## B. 研究方法

### B. 研究方法

#### B.1. 合成カンナビノイド代謝物の合成と代謝物の生体試料からの分析

JWH-018 代謝物として、インドール環の 4 位、5 位、6 位または 7 位が水酸化された化合物を想定し、水酸基の位置が異なる 4 種の代謝物 (M1-4, 5, 6, 7) を合成した。M1-4, 5, 6, 7 の脱アルキル化体 (M2-4, 5, 6, 7) を合成した。合成ルートとしては代謝物 M1 の場合、市販されている 4 種類のベンジルオキシインドールをペンチル化(2)後、インドール骨格の 3 位のナフトイル化を行い(3)、さらに脱ベンジル化して目的物 (M1) を得る方法を検討した。また、M2 の場合は 4 種類のベンジルオキシインドールをナフトイル化後、脱ベンジル化する方法で実施した。

茶褐色体毛を有する DA ラットに、JWH-018 を 5 mg/kg ずつ 10 日間連続して腹腔内投与し、尿試料は最終投与後 120 時間まで、毛髪試料は初回投与より 28 日間後に採取した。尿試料は  $\beta$ -glucuronidase 処理後、pH 5 の条件下において *t*-butylmethyl ether を用いて液-液抽出操作を行い、抽出液を窒素気流下で乾固後メタノールに溶解し測定試料とした。毛髪試料は洗浄後細片化し、アルカリ可溶化を行った後、尿試料と同様に処理を行い測定試料とした。LC-MS/MS 分析は、0.1% ギ酸及びアセトニトリルのグラジエント条件下で、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (2.1×100 mm, 1.7  $\mu$ m) を用いて行った。

#### B.2. ラット及びヒト肝ミクロゾームにおける dextromethorphan (DEM) 及び levo-methorphan (LEM) の光学選択的代謝

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 DEM 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 LEM 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、これまでの研究で、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開発した。さらに、両異性体をそれぞれ投与した雄 DA ラットにおいて、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、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。そこで、本研究では、ラット及びヒト肝ミクロゾーム、またヒトにおいて DEM の脱メチル化に主に係わる肝ミクロゾーム中の代謝酵素 (CYP2D6 及び 3A4) を用いて、両異性体の光学選択的代謝をさらに検討した。

DAラット肝ミクロゾームは、6週齢のオス4匹 (体重125 g程度) から、過去に報告した方法により調製した。SD ラット肝ミクロゾーム及びヒト肝ミクロゾームは、BD Biosciences 社 (Woburn, MA, USA) より購入した。Baculo virusを用いたヒト代謝酵素発現系は以下のものをBD Biosciences社 (Woburn, MA, USA) より購入した。CYP2D6 : Human CYP2D6\*1 + P450 Reductase SUPERSOMES™, CYP3A4 : Human CYP3A4 + P450 Reductase + Cytochrome b<sub>5</sub> SUPERSOMES™.

DEM とその光学異性体である麻薬化合物 LEM とその代謝物の分析には、Chiral CD-Ph column を利用した UPLC-MS/MS を用いた。

#### B.3. DEM/LEM 投与のラット尿に関する <sup>1</sup>H-NMR を利用したメタボロミクスのアプローチ

尿試料は、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。レボメトルファンおよびデキストロメトルファンをラッ

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℃で保存した。NMRは、Varian 600 MHz NMR spectrometerに<sup>1</sup>H-NMR専用コールドプローブを装備したものを使用し、Presaturation NOESY法(1D-<sup>1</sup>H-NOESY, 298 K)により、積算回数128回で測定し、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。多変量解析は、以下の手順で実施した。<sup>1</sup>H-NMRスペクトルについて、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<sup>1</sup>H-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。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。

#### B. 4. 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

固相抽出には、OASIS HLBを使用した。UPLC-MS/MS分析条件は、本研究の前身である研究班の報告書に記載したものと同様の方法を用いた。

#### B. 5. いわゆる「脱法ハーブ」使用者生体試料からの薬物分析

いわゆる脱法ハーブを吸煙し、嘔吐・意識不明となり救急搬送され、その後死亡が確認された男性について、聖マリアンナ大学法医学教室より生体試料及び死亡時所持していた脱法ハーブ製品を得た。UPLC-MS/MSは、Waters Aquity-Quattro Premier XE, UPLC-QTOFは、Waters Xevo QToF MSを使用し、両者ともESI

でイオン化を行った。

#### B. 6. 押収錠剤型麻薬の形態観察及び薬物含有量調査

錠剤型不正麻薬としては、2009年から2010年に札幌、東京、横浜、名古屋、大阪、神戸、福岡の各地方検察庁から国庫帰属品として厚生労働大臣に引き継がれた錠剤型不正麻薬の中から交付を受けたもの100検体を用いた。いずれも、刻印・色・含有薬物等がそれぞれ異なっている。薬物含有量分析はPDA-HPLC(210 nm)により実施した。さらに、GC-MSにより、麻薬・覚せい剤及びその他の成分の定性を行った。

#### B. 7. マイクロ波を利用した違法薬物誘導体化の検討

マイクロ波発生には、家庭用電子レンジを使用した。TMS誘導化の内部標準物質候補としては、直鎖飽和炭化水素ノナデカン(C19)、トリコサン(C23)、ヘプタコサン(C27)及びヘントリアコンタン(C31)を使用した。TMS誘導体化剤は「BSTFA+TMCS, 99:1 (SylonBFT)」(Sylon)を使用した。

#### B. 8. 携行型ラマン分光光度計を用いる不正錠剤中薬物の識別の検討

ラマン分光光度計は、リガクXantus-1 785 nmレーザー搭載機を使用、レーザー出力は400 mW(標準試料)、100 mW(錠剤等)、積分時間1000 ms(ただしこの条件でスペクトルが飽和したものについては、500 ms, 250 ms)、ラマンシフトの測定波数範囲180~2150 cm<sup>-1</sup>で測定を行った。

#### B. 9. 合成カンナビノイド類の簡易検出法の検討及び5-ITの合成

麻薬であるJWH-018を用い、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン、アセトニルアセトン、2,5-ジメトキシテトラヒドロフラン、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド、ガルビノキシルラ

ジカルとの反応(加温下)について、検討した。なお、アセトニルアセトン、2,5-ジメトキシテトラヒドロフラン、4-ジメチルアミノベンズアルデヒドについては、室温条件の反応性も検討した。

1-(1H-インドール-5-イル)プロパン-2-アミン(5-IT)はインドール5-カルボキシアルデヒドより合成した。

#### B.10. 薬物報酬系を利用した学習実験の有用性に関する研究

マウス用にタッチスクリーン認識学習装置(Bussey-Sakside型チェンバー)を用い視覚弁別試験を行った。マウスは、日本クレアで購入した9週令C57BL/6N雄マウスを用いた。まず、12時間の飲水制限をした成熟雄マウスを用い、10%コンデンスミルクを報酬とした視覚弁別学習を行った。タッチスクリーンにランダムに映し出される画像を口あるいは前肢でタッチする事によって報酬が得られるトレーニングを1週間行ったところ、すべての個体で学習が成立することが確認できた。次いで、視覚弁別学習が成立したマウスに、向精神薬の1種であるNMDA型グルタミン酸受容体阻害薬のMK-801(0.1 mg/kgおよび0.3 mg/kg)、覚せい剤メタンフェタミン(1 mg/kg)、カンナビノイド作用薬であるWIN55212-2(1 mg/kg)を投与して、学習成立後の正答率への影響を検証した。

#### B.11. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の識別法

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。本研究では、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(S)-3'-hydroxy-N-methylcoclaurine-4'-O-methyltransferase(4'OMT)のゲノムDNA部分配列(4'OMTg)の情報を集積し、種間、系統間に

おける塩基配列の相違点を見出し、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とともに、迅速かつ簡便な判別法の確立について検討した。本研究で解析対象としたケシ属植物は、ケシ *Papaver somniferum* 1系統(あへん法で規制)、アツミゲシ *P. setigerum* DC.(あへん法で規制)1系統、オニゲシ *P. orientale* (P0)2系統(一般栽培が可能)、ハカマオニゲシ *P. bracteatum* (PB)9系統(麻薬原料植物)、*P. pseudo-orientale* (PPO)3系統(ハカマオニゲシとオニゲシの中間的な外部形態をもつ、未規制植物)である。また、別に、法規制対象でないヒナゲシ *P. rhoeas* L.、ナガミヒナゲシ *P. dubium* L.も目的に応じて、解析対象とした。4'OMTゲノムDNA情報収集には、ベンジリソキノリンアルカロイド生産植物由来4'OMTアミノ酸配列の高度保存領域から設計した縮重入りプライマーを用いPCRを実施した。核酸調製・保存資材(FTAカード)は、GE Healthcare社製FTA® Plant Card(FTAプラントセーバーカード、以下FTAカード)を用いた。本品は植物の新鮮組織を、直接ろ紙状のカード表面で圧力をかけ組織の破碎と同時に破碎物(ホモジネート)の吸着を行う製品であり、押し花のような簡便な操作でPCRの鋳型として使用可能な品質の核酸の収集・室温保存が可能とされるものである。

#### B.12. 押収大麻の形態観察及びTHC含有量調査

THC含量の測定は国連の推奨試験法を用いた。精度管理分析は、以下の方法で、定量分析を行う8か所で実施した。関東信越厚生局麻薬取締部において国庫帰属乾燥大麻の中から比較的量の多いもの3検体を選び、それぞれ0.5~1cm程度の大きさにハサミでカットした。それをよく混ぜ合わせて均一にし、1gずつに小分けしてポリ袋に封入した。これらを各地区の鑑定官



が持ち帰り、THC等を定量した(各3試行×3検体)。

#### B.13. 国内流通大麻の tetrahydrocannabinolic acid synthase (THCAS) 遺伝子配列の調査

大麻を鑑定する上で、常法である剛毛確認という手法が適さない事例に対応する目的で、大麻の特異的生合成化合物である $\Delta^9$ -THCAの合成関連酵素であるTHCASのDNA塩基配列を調査し、この遺伝子配列において、大麻を確認する際の標的遺伝子となりうる遺伝子であるかどうかの確認を行った。試料としては、関東信越厚生局麻薬取締部に大麻として国庫帰属され、研究者間譲渡により譲り受けた植物組織片9検体、医薬基盤研薬用植物資源研究センター筑波にて系統保存されているアサのメキシコ産系統およびトチギシロ種の種子を用いた。

#### B.14. マイクロ波を利用した大麻成分代謝物誘導体化の検討

家庭用電子レンジを用いた尿中大麻代謝物11-nor- $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノールカルボキシリックアシッド(11-nor- $\Delta^9$ -THCCA)のトリメチルシリル(TMS)誘導体化反応条件の迅速・最適化を検討した。TMS誘導化の内部標準物質としては、直鎖飽和炭化水素ヘプタコサン(C27)を使用した。他の条件は、B.7.と同様に行った。

#### B.15. 大麻種子1粒を用いた産地特定のためのDNA鑑別法の開発

試料としては、関東信越厚生局麻薬取締部で押収された違法大麻種子、基盤研・薬植セ・筑波にて系統保存されているメキシコ産系統種子およびトチギシロ(Tochigi-shiro)種子を用いた。

#### B.16. Salvinorin A (Sal A) の免疫化学的分析手法による検出法の開発

Sal Aに対するモノクローナル抗体の作成を

目的として、まずキャリアタンパク質への結合のためにSal Aを加水分解することによりsalvinorin B (Sal B)へと導き、続いてコハク酸をSal Bの2位水酸基とエステル結合させることでSal Aハプテンを合成した。さらに、ハプテンとBSAを結合させ、これを免疫源として5週齢、オスのBALB/cマウス腹腔に4度感作した。感作マウスより脾細胞を調製後、ミエローマ細胞との細胞融合を行い、抗Sal MAb産生ハイブリドーマを確立した。さらに、ハイブリドーマ培養上清より抗Sal A MAbを精製し、このものと、プレート上に固相化したSal A-ヒト血清アルブミンを用いて、競合的ELISAを確立した。また、幻覚性サルビア*Salvia divinorum*より単離した12化合物(Sal A, B, C, D, E, F; divinatorins A, B; salvidivins A, B, C, D)、及び非天然型サルビノリンとして天然物より合成した8化合物を用い、交差反応性を確認した。

次に、作製したサルビノリン類を認識するモノクローナル抗体(抗Sal A MAb)を用い、常法に従いイムノクロマトストリップを構築した。

さらに、抗-SalA MAb産生ハイブリドーマを材料として、より安価に調製可能で、高機能化が可能な組換え抗体についても作製を試みた。まずSal Aを認識するFabを作製するために、既に作製している抗Sal Aモノクローナル抗体(MAb)産生ハイブリドーマからmRNAを得、続いてcDNAの調製を行った。続いて、VH-CH1、軽鎖をコードする遺伝子を増幅し、増幅した遺伝子の配列が正しいことを確認した。得られた遺伝子について配列の解析を行い、抗体の変換部をコードしていることを見極めた。次いで、各種抗体遺伝子を発現用ベクターpET28a(+)に導入したのち、大腸菌BL21(DE3)を形質転換し

た。形質転換体を培養し、IPTG を添加することで組換えタンパク質の発現誘導を行った。次に、封入体に発現した各々の組換え抗体をニッケルキレートクロマトグラフィーにより VH-CH1, 軽鎖を精製した。精製した VH-CH1, 軽鎖を同濃度で混和したのち、透析法による巻き戻しを行った。続いて、抗 SalA MAb との比較を行うことで、調製した Fab の反応性、特異性について、その有用性を調べた。

#### B. 17. 抗カチノン抗体の取得と競合的 ELISA の開発

抗カチノン (CA) 抗体を得るために用いたハプテンは、カチノンから化学誘導した。免疫源は、カルボジイミド法によりハプテンと牛血清アルブミン (BSA) を結合し、CA-Suc-BSA コンジュゲートとして合成した。これを免疫原として 5 週齢、オスの BALB/c マウス腹腔に 4 度感作した。感作マウスから採血し、血中抗体価の測定を行い、その結果、十分な血中抗体価が得られた段階で、脾臓を摘出し、脾細胞を調製後、ミエローマ細胞との細胞融合を行った。ELISA により精査することで、抗 CA MAb 産生ハイブリドーマを見出し、その後クローニングを行なった。クローニングの完了したハイブリドーマを無血清培地中で培養することで、抗 CA MAb を含んだ培養上清を得た。本上清を Protein G セファロースカラムに付し、抗 CA MAb を精製した。次いで、各種濃度の CA 溶液に水溶性カルボジイミドと *N*-ヒドロキシコハク酸イミドを加え活性化し、さらに BSA と反応させることで CA-BSA コンジュゲートを合成した。反応溶液をイムノプレートに分注し、CA-BSA を固相化した後、抗 CA MAb と反応させた。続いて、二次抗体による抗原-抗体複合体の酵素標識を行い、最後に基質を加えて発色させ、ELISA を構築した。

<倫理面への配慮>いわゆる「脱法ハーブ」使用者生体試料からの薬物分析は、国立医薬品食品衛生研究所及び聖マリアンナ大学研究倫理審査委員会の承認を経て、各委員会の定める規定に則り、遵守すべき規準に従って実施した。

動物実験は、実施研究者の所属する組織の動物実験委員会等による倫理審査の承認を経て、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。

#### C. 結果と考察

##### C. 1. 合成カンナビノイド代謝物の合成と代謝物の生体試料からの分析

指定薬物 JWH-018 について、JWH-018 及び合成した 11 種類の推定代謝物 (alkylcarboxy, terminal alkylhydroxy, indolehydroxy 及び *N*-dealkylated indolehydroxy 代謝物) を分析対象とし、各化合物をラット尿、毛髪試料に添加して、抽出法及び UPLC-MS/MS を用いた分離分析法を検討した。次いで、実際に本化合物を投与したラット尿及び毛髪試料を用いて、各生体試料中に排泄される未変化体及び代謝物量について検討を行った。その結果、薬物投与ラット尿中では、主に *N*-dealkyl 6-OH indole 体が検出された。その他尿中からは *N*-dealkyl 7-OH indole, *N*-pentanoic acid, 6-OH indole 及び *N*-(5-hydroxypentyl) 体が検出されたが、JWH-018 は 0-24 時間尿において痕跡量検出されたのみであった。一方、毛髪においては、JWH-018 (1.49-2.77 ng/mg), *N*-pentanoic acid (5.32-9.63 ng/mg) 及び *N*-dealkyl 6-hydroxyindole 体 (0.91-1.63 ng/mg) が主に検出された。今回の研究では、*N*-alkyl 側鎖及び indole 環上の一水酸化体及びカルボン酸化体しか分析対象にはしておらず、また、ヒトとラットでは薬物動態に差がある。しかし、本

化合物を摂取したヒト尿中からも *N*-pentanoic acid 体は主に検出されることが報告されていることから、ヒトにおいても毛髪中の JWH-018 及び *N*-pentanoic acid 体は、JWH-018 使用の有用なマーカーになる可能性が示唆された。

### C. 2. ラット及びヒト肝ミクロゾームにおける DEM 及び LEM の光学選択的代謝

SD ラット及び DA ラット肝ミクロゾームにおいて、*N*-脱メチル体の生成には両異性体で大きな差は認められなかったが、*O*-脱メチル体の生成は、levo 体の方が SD ラットでは約 4 倍、DA ラットでは約 9 倍多く認められた。一方、ヒト肝ミクロゾームでは、levo 体の方が *N*-脱メチル体及び *O*-脱メチル体共に 3 倍程度多く認められた。さらに CYP2D6 及び 3A4 についても検討を行ったところ、CYP3A4 における *N*-脱メチル体の生成量は両異性体でほぼ同程度であったが、CYP2D6 における *O*-脱メチル化については、levo 体が 2.3 倍高い値を示した。以上の結果より、ラット及びヒトにおいて、DEM と levomethorhan で光学選択的な *O*-脱メチル化（ヒトにおいては CYP2D6 が介在）がおこることが明らかとなった。

また、DA ラット肝ミクロゾームにおいては、 $V_{max}$  値は LEM  $3.8 \pm 0.3$ 、DEM  $0.65 \pm 0.03$  nmole/min/mg protein と、levo 体が dextro 体の 5.9 倍もの値を示した。また、 $K_m$  値は LEM  $22.1 \pm 5.0$ 、DEM  $44.1 \pm 4.0$   $\mu$ M であり、levo 体の方が 2 倍程度親和性の高い ( $K_m$  値が低い) 結果となった。これらの結果を考慮すると、DA ラット肝ミクロゾームにおいて観察された LEM に光学選択的な *O*-脱メチル化は、 $V_{max}$  (反応速度) 及び  $K_m$  値 (親和性) 共に寄与しており、特に  $V_{max}$  そのものが大きく関与していることが推測された。一方、ヒト肝ミクロゾームにおいても、 $V_{max}$  値は LEM  $0.58 \pm 0.02$ 、DEM  $0.26 \pm$

$0.03$  nmole/min/mg protein と、levo 体が dextro 体の 2.2 倍もの値を示したが、 $K_m$  値は LEM  $8.9 \pm 1.7$ 、DEM  $4.5 \pm 0.8$   $\mu$ M であり、levo 体の方が親和性が低い ( $K_m$  値が大きい) 結果となった。

なお、上記述べたような光学選択的な代謝の違いから、生体内試料中の代謝物の濃度比を光学異性体分析の出来ない通常のカラムの分析結果に基づいて比較することにより、DEM と LEM との摂取識別を論じることは困難であると思われる。なぜならば、ヒトの *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 及び extensive metabolizer が存在しているからである。従って、ヒトにおける両異性体の摂取識別は、光学異性体分析により、代謝物の光学活性を測定する必要があると考えられる。

### C. 3. <sup>1</sup>H-NMR を利用した DEM 薬物鑑定法の開発

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、LEM と DEM 投与ラット尿の <sup>1</sup>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。LEM と DEM を投与した尿は非常に類似した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 <sup>1</sup>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。

LEM と DEM 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 LEM で高く、DEM 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 LEM 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 LEM とデキルストロメトर्फ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。従って、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。以上、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。

#### C. 4. 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

医療従事者による違法な摂取が報道された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 を用いたラット尿試料中の分析法を検討した。これまでの検討で、短時間に抽出可能な超音波抽出下酵素消化法及び UPLC カラムを用いることにより、毛髪及び血清中のフェンタニル及びノルフェンタニルの迅速な分析（4 分以内）が可能となっている。本年度、尿試料について、血漿試料の分析法を適応することで、尿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。薬物投与ラットの 0 から 24 時間の尿中より、ノルフェンタニル 1.18

mg/mL 及びフェンタニル 0.03 mg/mL 検出された。薬物の使用証明の方法として、摂取してから短期間に採取できれば、本分析法が適応可能であることが示唆された。

#### C. 5. いわゆる「脱法ハーブ」使用者生体試料からの薬物分析

被害者が死亡時所持していた脱法ハーブ 3 製品（乾燥植物細片）いずれからも MAM-2201 が検出され、さらに 1 製品からは MAM-2201 とともに JWH-122 *N*-(4-pentenyl) analog 及び JWH-122 *N*-50H が検出された。生体試料においては、上記 3 化合物に加えて、MAM-2201 の推定 3 代謝物 (MAM-2201 *N*-40H, JWH-122 *N*-50H, JWH-122 *N*-pentatonic acid), 処方薬 sulpiride, brotizolam, ethyl loflazepate を分析対象とし、LC-MS/MS MRM モードで定量分析を行った。その結果、頭髪洗浄液からは MAM-2201, JWH-122 *N*-50H 及び sulpiride が、頭髪アルカリ可溶抽出物からは MAM-2201 が検出された。救急搬送時等の薬物スクリーニング分析において、喫煙で摂取した場合、頭髪洗浄液は直前の使用薬物を推測するのに有用な試料と考えられた。また、搬送時及び解剖時の血液と血清試料からは、処方量が多い sulpiride が高濃度検出され、次いで濃度順に JWH-122 *N*-50H, MAM-2201, brotizolam, JWH-122 pentatonic acid が検出された。解剖時尿試料からは、濃度順に sulpiride, JWH-122 *N*-50H, MAM-2201, JWH-122 pentatonic acid が検出された。本研究においては、生体試料中から未変化体 MAM-2201 は検出されたが、その特異的代謝物である MAM-2201 *N*-40H は検出されなかった。*N*-Alkyl 側鎖末端がハロゲンに置換された化合物においては、 $\omega$ 1-酸化が進みにくいことが予想される。これらの結果を考慮すると、すでに麻薬として規制されている JWH-122 と MAM-2201 の摂取識別に

においては、主代謝物  $\omega$ -酸化体 JWH-122 *N*-5OH 及び JWH-122 pentatonic acid が同一であるため、未変化体もしくは JWH-122 摂取においては主代謝物のひとつと推測される  $\omega$ 1-酸化体 JWH-122 *N*-(4-hydroxy)metabolite を検出する必要があると考えられた。その他薬物について LC-QTOF によりスクリーニング分析を行った結果、頭髮のアルカリ可溶化抽出物から zolpidem が検出された。

今回の分析において生体試料から検出された MAM-2201 及びその代謝物濃度を考慮すると、本化合物が直接の死亡原因と結論することは困難であるが、MAM-2201 は麻薬である JWH-018 や JWH-122 よりもカンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体に対し強い結合性を有する。また、naphthoyl-indole 構造を有する合成カンナビノイドは脂溶性が高く、水酸化代謝物も強い活性を維持していることが報告されており、薬物が長時間活性を維持したまま体内に貯留している可能性も考えられる。使用者の健康状況、他の薬物使用状況などによっては、大きな健康被害を与える可能性があると考えられた。なお、MAM-2201 は 2013 年 10 月 17 日（11 月 16 日施行）に指定薬物に、さらに現在（2013 年 2 月 27 日～3 月 28 日まで）、麻薬指定のためのパブリックコメントが募集されている。

#### C. 6. 押収錠剤型麻薬の形態観察及び薬物含有量調査

収集した錠剤のほとんどは円盤形であったが、長円形及び菱形のものがそれぞれ 1 件あった。色は桃色・水色・白色等であり、ブランドのロゴやアルファベット等の刻印があるものが多かった。100 検体の錠剤の内、MDMA のみが含有される錠剤が最も多く 52 検体であった。次いでケタミンと覚せい剤が含有されるものが 10 検体、2C-B のみが含有されるものが 9 検体で

あった。近年新たに麻薬及び向精神薬取締法に基づいて麻薬に指定された TFMP, メチロン, 3CPP, BZP, 2C-I を含むものもみられた。錠剤の直径は 4.1～9.3mm, 厚さは 2.8～8.1mm, 重量は 117.1～1590.3mg の範囲内であった。このうち 1590.3mg の錠剤は長円形であった。また、HPLC を用いてこれらの薬物を定量するための条件検討を行った結果、錠剤からの抽出溶媒として水または中性の緩衝液を用いた場合に定量値が低くなる傾向があった。酸性の緩衝液（pH3.0）を抽出液として用いることにより良好な結果が得られた。

錠剤に対する薬物の添加回収実験を行う中で、薬物標準品として用いた BZP（水溶液）の HPLC におけるピーク高さが経時的に減少することが判明した。本研究において、BZP 以外の薬物は塩酸塩または硫酸塩（いずれも結晶）を標準品として使用したが、BZP は遊離塩基（液体）を使用した。このために BZP だけ異なる挙動を示した可能性がある。各種溶液中での標準品の安定性は、司法鑑定の上からも重要であることから、今後 BZP の塩酸塩を入手して検討する予定である。

GC-MS 分析により、麻薬及び覚せい剤成分を確認した。引継時に示された成分以外のピークが検出された場合、錠剤中 MDMA として 1%以上に相当する大きさのものについてマススペクトルを検討したが、新規乱用薬物成分と考えられるものはなかった。100 検体中 24 検体の錠剤にカフェインが含まれており、また、マススペクトルから脂肪酸またはそのエステルやアミド、滑剤と推定されるものが検出された。

次いで、検出された麻薬及び覚せい剤 12 化合物（BZP, メチロン, アンフェタミン, MDA, メタンフェタミン, MDMA, MDEA, ケタミン, 3CPP, 2C-B, 2C-I, TFMP）並びに指定薬物ブチロン

について含有量及び組み合わせを解析した。含有される検体数が最も多かった薬物はMDMA(64検体)であり、含有量の範囲は1.4~178 mg(塩酸塩として、以下同じ)、平均値は96.1 mg、中央値は104 mgであった。MDMAのみを含むものは51検体、他の薬物も含むものは13検体で、最も検体数が多かったのは含有量120~140 mgの錠剤であった。ただし最頻値付近に分布が集中しているとは言えず、含有量20 mg以下から180 mgまで20 mg刻みの階層のいずれにも複数検体が含まれていた。他の薬物が共存する場合だけでなく、MDMA単独の錠剤であっても、含有量20 mg以下のものがあつた。最も含有量が高かつた検体は重量254.2 mgと平均的なサイズであるが70.1%の濃度でMDMAを含有しており、1錠中に178 mg含まれていた。

メタンフェタミンは14検体から検出された。うち13検体において含有量は20 mg未満であり、1検体(5-4)のみ214 mgと極めて大量に含まれていた。「メタンフェタミンが医療用として使用される場合の標準量は約3 mg、乱用される場合の1回使用量は20~30 mg」との文献があり、214 mgもの含有量の錠剤は、服用した場合の健康影響が懸念される。

TFMPPは8検体から検出され、今回調査した成分の中では最も含有量のばらつきが小さかつた(CV 34.1%)。その範囲は36.9~105 mg、平均値は72.1 mgであった。ただしBZPまたは3CPPが共存しているものが6検体あり、TFMPPのみ含有のものは2検体であつた。

TFMPPは8検体から検出され、今回調査した成分の中では最も含有量のばらつきが小さかつた(CV 34.1%)。その範囲は36.9~105 mg、平均値は72.1 mgであった。ただしBZPまたは3CPPが共存しているものが6検体あり、TFMPPのみ含有のものは2検体であつた。

その他の成分についても同様に解析を行い、所期の目的である各薬物の含有量把握を達成することができた。錠剤中含有量の情報は、捜査官からの問い合わせが多い1回使用量の目安として有用である。また、各錠剤中の薬物の多様性と共に、含有量のばらつきが大きい実態が明らかとなつた。これは意図しない過量摂取につながるものであり、本研究で得られた知見は不正麻薬錠剤による健康被害の防止に資すると考えられる。

#### C.7. マイクロ波を利用した違法薬物誘導体化の検討

測定機器にGC-MSを使用し、覚せい剤TMS誘導体化生成率を客観的に把握するため内部標準物質の選定を行った。種々の条件検討を行い、C27直鎖飽和炭化水素が内部標準物質に適していることが判明した。最終的にアンフェタミン及びメタンフェタミンTMS誘導体化最適条件は、用いた電子レンジの設定範囲で170W(低出力条件)、30秒の照射が最も有効であつた。なお、メタンフェタミンの塩酸塩についてTMS誘導体化実験を行ったが、誘導体は殆ど生成されなかつた。従つて、反応物質が遊離の状態ではTMS誘導体化反応が促進されることが判つた。

#### B.8. 携行型ラマン分光光度計を用いる不正錠剤中薬物の識別の検討

薬物犯罪の捜索現場で発見された物件が違法薬物であるか否かを迅速に判定する方法として、携行型ラマン分光光度計の有効性を検討した。MDMA等を含有する錠剤を測定するための条件を検討したところ、レーザー光により試料が焦げる場合があることが判明したため、光を弱めた条件を設定した。標準試料を測定してライブラリを構築し、不正麻薬錠剤(100検体、違法ドラッグ3検体、医薬品13検体について

測定及び判定を行った。その結果、MDMA のみを含有する錠剤 51 検体中、正しく「検出」と判定できたものは 22 検体であった。一方、MDMA を含まない 52 検体中 2 検体（いずれも違法ドラッグ含有）を誤って「検出」と判定した。従って、レーザー光の出力調製の必要性、繰り返し測定の際のばらつき大きさも含めて、本装置は即座に捜索現場での実用化が可能とは結論づけられなかった。

#### C. 9. 合成カンナビノイド類の簡易検出法の検討及び 5-IT の合成

平成 24 年 6 月 29 日に麻薬に指定された JWH-018 をはじめとして、昨今流通が確認されている (1H-インドール-3-イル) (ナフタレン-1-イル) メタノン骨格を持つ違法薬物について簡易検出法の開発を目的として、JWH-018 に対して特異的に呈色反応を示す試薬の検討を行った。種々の検討を行ったが、インドール骨格を酸化分解させた後、生成するケトンに対しての呈色反応を試みたところ、色の変化はみられ、複数の化合物が生成していることが判った。引き続き、インドール構造とカルボニルの同時検出法としては、アミノアセトアルデヒドジメチルアセタールとの反応による 5H-pyrido[4,3-b]indole 骨格の形成反応を検討する予定である。また、ヨーロッパで死亡例がいくつか報告されており、我が国では平成 24 年 12 月 17 日に指定薬物に指定され、今後麻薬指定の可能性がある 1-(1H-インドール-5-イル)プロパン-2-アミン (5-IT) について数 100mg スケールで合成を行った。

#### C. 10. 薬物報酬系を利用した学習実験の有用性に関する研究

MK-801 (0.1 mg/kg) では、変化が見られなかった。MK-801 (0.3 mg/kg) では、行動量が増加して正答率が低下した。従って、MK-801

は高濃度で典型的な hyperlocomotion, stereotypies を誘発することが判明した。メタンフェタミンでは、行動量が低下して正答率が低下した。WIN55212-2 では鎮静効果により行動に時間がかかるようになるものの正答率は変わらなかった。

各薬物投与の次の試行では何も投与せず、あるいは生理食塩水を投与して行った結果、動物の正答率、30 トライアル完了時間はもとのレベルに回復しており、各薬物の単回投与の影響が一過性である事が分かった。

本研究で用いたタッチスクリーンを用いた視覚刺激の弁別学習装置は、刺激や報酬がコンピュータにあらかじめプログラムされたスケジュールによって全自動で提示され、かつスクリーンタッチやトレイへの nose-poking をはじめとする動物の行動も時系列に従って記録してくれるものである。そのプログラムに従えば特に経験と熟練を要せずにマウスを効率良く視覚弁別の学習を獲得させる事ができる。いったん学習を獲得した動物に対して中枢神経作用薬を投与することで、その正答率への効果のみならず、それぞれの薬物に応じて特徴のある行動様式の変化を観察できることが分かった。薬物の 1 回投与で行動変化が観察されるが、翌日には行動や正答率が回復しており、同一個体を利用して、濃度の異なる薬物投与や、薬物の種類を変えて効果を確認出来ることが判明した。あらかじめ学習を成立させたマウスを用意しておくことで、迅速に薬物の中枢神経作用を検出することが可能である。また、トレーニング前に薬物を投与することで、慣れの成立への影響を調べることができる。もしも慣れの成立に要する日数が、向精神薬、麻薬、覚せい剤などにより影響されれば、必ずしも視覚弁別学習の成立を待つ必要はなく、中枢神経作用をさら

に迅速かつ簡便に検証できる試験法となる。

### C. 11. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の識別法

塩基配列を解析したところ、イントロンの位置は各植物種においてよく保存されていることが明らかになった。集積した4' OMTgの塩基配列データから、P0, PB, PPOの3種のケシ属植物由来の4' OMTgのバリエーションについて検討した。その結果、これらの植物由来の4' OMTg分子種は植物種ごとに独立したクレードを形成するのではなく、同一クレードに複数の植物種由来の分子種が入る複雑な系統樹を形成することが判明した。次に、これらのデータを使用し、4種の新規プライマーセットA-Dを設計し、各植物試料のPCRによる特異性（交叉反応性）を検討した。その結果、PPO特異的に設計したプライマーセットCはPPOのみを鋳型としたときにPCR産物を与え、その他のPBやP0に対しては、反応しないことが明らかになった。一方、プライマーセットAは、一部のPBと、P0に反応し、PPOとは反応しなかった。また、プライマーセットBはPPOのみに反応する可能性が高いが、非特異的増幅産物由来と思われるバンドが認められた。さらにプライマーセットDは、特異性が高すぎ、一部のPBのみに反応した。以上の結果より、プライマーセットCがPPOとPB, P0との遺伝子識別に利用可能であることが明らかとなった。

次に、医薬基盤研薬用植物資源研究センターの種子交換事業により海外の植物園等からPBとして種子で導入したものについて、PPOと特異的に反応する可能性の高いプライマーセットを適用し、その反応性を検討した。その結果、PBの特徴を示す系統については、PCR産物は得られず、PPO様の特徴を示す系統がPCR産物を与えた。このPCRの結果は、形態の差異とよく合

致しており、PCRで陰性となった系統のみが、真のPBであり、PCR陽性の系統はPPOまたは、PPOとPB等の交雑種である可能性が高いことが判明した。また、以上の結果は、ケシ属植物の植物種の識別に本プライマーが有用であることを示すものであると考えられる。

ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシの3植物種の識別が可能な各プライマーセットの交叉反応性確認では、ヒナゲシ特異的プライマーセットで交叉反応性の確認を行った際に、目的の増幅産物のほかに、プライマーダイマーまたは非特異的増幅産物と考えられるバンドが現れた。そこで、プライマーの濃度について検討したところ、プライマーの濃度を1/4濃度に変更することにより、改善されることが判明した。また、アツミゲシ特異的プライマーがヒナゲシ（シャーレーポピー）を鋳型とした場合、薄いバンドではあるが増幅産物を与えることが判明した。そこで、あらためて、識別対象領域として用いるヒナゲシ（シャーレーポピー）の4' OMTgの塩基配列を精査したところ、本プライマーセットのセンスプライマーがヒナゲシの配列と一致することが判明した。そこで、センスプライマーを再設計したところ、交叉反応による増幅産物を与えることはなくなった。以上のように、プライマーの濃度の変更及び再設計により、ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシの遺伝子識別の精度の向上が達成された。本研究で設計したケシ、アツミゲシ及びヒナゲシ間の識別用プライマーの特異性は高く、これらを組み合わせることにより、3植物種間のPCR法による簡便な識別が可能となった。

次に、ケシ、アツミゲシ、ヒナゲシの3植物種を鑑別可能なプライマーセットを利用して、ケシ属植物種子を検体とした植物種鑑別法の確立を行うと共に、簡便な核酸の採集・保管シ



システムである FTA カード (GE Healthcare 社) を使用したケシ属植物の簡便な鑑別法の開発を実施した。

まず、ケシ、アツミゲシ及びヒナゲシの3植物の種子1粒または10粒より調製したゲノム DNA について、特異的プライマーセットを用い、各植物種の鑑別が可能か検討した。特異的プライマーセットを用い種々の PCR 条件を検討した結果、Ampdirect Plus + NovaTaq を使用し、40 サイクルで PCR を行った場合に各植物種に特異的な明瞭なバンドが検出された。次に、ケシ属種子混合物に対する検知実験を実施したところ、アツミゲシ特異的 134-10r-Srev2 + Arev プライマーセットを使用した場合、アツミゲシ0%以外は全て positive となり、良好に識別ができた。一方、ヒナゲシ特異的 Pr21S + Pr21A プライマーセットを使用したところ、アツミゲシでは特異的なバンドの位置に明瞭なバンドは確認されなかったが、非特異的増幅産物も検出されることが判明した。しかしながら、この非特異的増副産物は10%混合物以上では、観測されず、アツミゲシとヒナゲシの種子の混合物において、それぞれ10%の混入を検知できることが示された。次に、食品のケシ種子(10粒)を使用して、植物種の鑑別を行ったところ、ケシまたはアツミゲシを認識するプライマーでバンドが出現し、アツミゲシ特異的プライマーではバンドは出現しなかった。従って、食品に用いられている場合でも、種の鑑別ができることが明らかになった。

次に、ケシ属植物試料 FTA カードにサンプリングし、室温で約8ヶ月保存した FTA カードの約1mm角切片を、PCR 反応液に添加し、植物種特異的プライマーセットを適用し PCR を行うことにより、植物種特異的に増幅産物が得られ、植物種の鑑別が可能か検討した。その結果、

アツミゲシ特異的プライマーセットを適用した場合、アツミゲシを試料とした場合のみ特異的増幅産物のバンドを与え、アツミゲシ特異的な検知ができることが示された。ケシ・アツミゲシ共通プライマーセットでは、プライマー濃度を0.125 mM に下げることによって、ケシ及びアツミゲシを試料とした場合にのみ、特異的増幅産物のバンドが得られ、両植物種の特異的な検知ができることが示された。ヒナゲシについては、ヒナゲシ特異的プライマーセットを利用して種々の条件を検討したが、新鮮葉を試料とする場合は良好な結果が得られるものの、FTA カードで採集した試料では、ナガミヒナゲシにて増幅産物が認められ、現段階ではヒナゲシとナガミヒナゲシ両植物種間の鑑別ができないことが判明した。しかしながら、両種は、どちらも非規制種であり、バンド出現の非特異性は、規制種鑑別には大きな問題とはならないものと考えられた。

#### C. 12. 押収大麻の形態観察及び THC 含有量調査

国連の推奨試験法を用いて8機関で同一の乾燥大麻試料 (THC 6.2%含有) の精度管理分析を実施した結果、各機関間の THC 定量値の相対標準偏差は9.2%であった。

2010年4月から2011年3月に全国麻薬取締部を經由して地方検察庁から厚生労働大臣に引き継がれた大麻9072検体中、6376検体(286.6kg)が乾燥大麻であった。そのうち検体数で65.2%、重量で73.0%が、いわゆるシンセミアの可能性のある種のない花穂であった。1g以上の乾燥大麻1115検体を分析した結果、THCの酸化生成物であるカンナビノール(CBN)の含有量が高いものが多く、保存中にTHCが減少していると考えられた。そこで、比較的新鮮と考えられるCBN/THCが0.1以下のものについて集計した結果、種のない花穂(335検体)の

THC 含有量平均値は 11.2%, 最大値は 22.6%であった。1970 年に厚生省が実施した調査結果によれば、国産の大麻の THC 最高含有量は栃木県産のもので 4%, 次いで北海道産の野生のもので 3.4%, 最低は九州産のもので 0.1%であり、平均すれば我が国の大麻草に含有される THC は 1%程度とされている。今回の報告は我が国における不正大麻に関する初の実態調査であるが、今回得られた THC 含有量は、諸外国で「高まった」とされる THC 含有量に匹敵するものであり、高 THC 含有大麻の流通実態がわが国にもあることが推定された。(本研究内容は、読売新聞に掲載された)

#### C. 13. 国内流通大麻の THCAS 遺伝子配列の調査

本研究では、まず葉緑体 DNA 上の ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit (*rbcl*)を増幅対象として PCR を行い、配列解析の結果より、実験を行った植物は、確実にアサであることを確認した。ついで、THCAS 領域について PCR を実施したところ、トチギシロを除いて 1.5kbp 付近に 1つの明瞭なバンドが確認された。さらに塩基配列解析の結果、大きく 3種類に分類され、押収大麻 5検体のグループ、押収大麻 1検体とメキシコ産のもの、ハイブリッドと考えられる押収大麻 3検体の、3グループに分類された。相同性検索の結果、最初のグループは、アサの THCAS として報告されている Acc. No. AB212834 と 99%の相同性を示し、次のグループは Acc. No. AB212830 と 99%の相同性を示した。さらに、既報の論文の結果との比較及び別に行った成分分析の結果を考え合わせると、THCAS の配列は内部配列の変異が多く存在していることが示唆された。従って、本配列は、アサ以外の植物種の塩基配列と相同性が低く鑑別の有効な塩基配列ではあるが、さらにより多くの検体を

用い精査が必要であることが示唆された。また、プライマーの再検討が必要であると考えられた。

#### C. 14. マイクロ波を利用した大麻成分代謝物誘導体化の検討

直鎖飽和炭化水素ヘptaコサン (C27) を内部標準物質として、尿中 11-nor- $\Delta$ 9-THCCA のマイクロ波照射による TMS 誘導体化最適条件を検討したところ、用いた電子レンジの設定範囲で 750W10 秒の照射が最も TMS 誘導体化生成率が高いことが判明した。この迅速誘導体化条件で尿中 11-nor- $\Delta$ 9-THCCA の定量を行うため、重水素標識の内部標準物質 (11-nor- $\Delta$ 9-THCCA-*d*9) を用い検量線を作成したところ、0.5~50ng/ml の範囲で相関係数の二乗が 0.9996 と良好な直線性を示し、定量下限値は 0.5ng/ml であった。濃度 0.5, 10 及び 50ng/ml での変動係数はそれぞれ 7.9, 1.3 及び 3.2%(n=5)で、日間変動(濃度 10ng/ml で測定)は 5.7%(n=5)であった。電子レンジとヒートブロック加熱(80°C 15分)での TMS 誘導体化を比較すると、電子レンジを使用した場合、ヒートブロックと比べ生成率は 95.2%で、殆ど生成率に変化はなかった。よって、電子レンジにより誘導体化時間が 1/90 に短縮できるメリットがあることが明らかとなった。

#### C. 15. 大麻種子 1 粒を用いた産地特定のための DNA 鑑別法の開発

今回、基盤研・薬植セ・筑波にて系統保存されている 2 種類の種子のデータを標準品とし検討した。その結果、どの領域においても、標準品において、2 種類のタイプに分類された。一方、押収品由来の製品においても、母系由来である *trnH-psbA*, *matK*, *trnL-trnF* 領域ではすべての領域で 2 種類のタイプがあることが明らかになった。さらに、*matK* を除く 2つの

領域配列は塩基配列データベース上にも、それぞれ今回得られた配列と一致する 2 種類の配列が報告されていた。

押収品由来のもの多くは、その包装から、Nirvana seed というオランダ由来の製品であり、このホームページには様々な種子製品が紹介され、その THC 含量や植物体の形態も様々であったにもかかわらず、今回の検討では、配列として 2 種類のパターンに収束した。さらに、核ゲノム上の ITS 領域においても配列は 2 種類のみであり、その各々のホモ型およびヘテロ型の 3 タイプのみであった。今回、選択した 4 箇所の領域はいずれも DNA を用いた系統分類に用いられる領域であり、多くの植物の属間、種間分類に利用されているものの、今回の検討から、アサでは有効ではないものと考えられた。アサは 1 属 1 種の植物であり、亜種として *ssp. sativa* および *ssp. indica* が存在するとも考えられている。本結果はその点を示唆した可能性も考えられる。いずれにしても、2 種類にパターンに収束した結果に基づいて産地特定を行うことは出来ないことが明らかとなった。よって、次に、より変異度が高いといわれている IGS 領域の解析を行うと共に、SSR マーカーによる解析を実施した。

IGS 領域においても、大麻種子 1 粒から DNA の抽出が可能であり、PCR による IGS 領域の増幅が可能であった。IGS 領域の PCR 産物はすべて 3,500~4,000bp 付近にバンドが確認され、トチギシロ IGS は全長 3,608bp であった。市場品 1 製品、トチギシロ、メキシコ産系統種子由来の IGS 領域を比較した結果、26S 側から 1.5kbp 付近に市場品に対してトチギシロでは 132bp の欠失、メキシコでは 198bp の欠失が見られた。また、66bp の反復配列の回数は、市場品で 5 回、トチギシロ 3 回、メキシコ産 2 回

であった。上記結果に基づき、欠失領域を挟むようにプライマーを設計し、各種子より得られた DNA を用い PCR によるバンドの確認を行った。その結果、24 欧州市場品（種子）中、2 製品でトチギシロと同一の約 600bp の大きさのバンド（塩基配列 595bp）が確認された。また、メキシコ産系統種子と同一のバンドは製品中に確認されなかった。今回実験を行った市場品は、欧州で栽培されている大麻であるが、本結果は、これらの大麻が、メキシコ産のものとは明らかに異なることを示している。また、これらの大麻は、交配の結果得られた高濃度の THC を蓄積する栽培種であるものと推定されるため、バンドが画一化したものと考え、合理的に説明可能となる。また、ヨーロッパの気候や室内環境下での栽培を考慮して、メキシコ産などの栽培種は交配親として利用されていないとも考えられた。

今回、PCR によるバンド比較に用いた領域は 66bp の反復配列であり、一般にミニサテライトと呼ばれる領域である。今後は、マイクロサテライト領域をさらに詳細に検討することで、より明確に PCR による判定が可能になると考えられる。

次に ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)-PCR 法による検討を行った ISSR-PCR 法に有効な UBC (University of British Columbia) プライマー 20 種を用い PCR を行った。各プライマーを使用した PCR 産物において、同一のバンドパターンを示す種が存在することが明らかとなったが、複数のプライマーの結果で比較することで、各サンプルは分別が可能であると考えられた。また、UBC-818, 876 プライマーではすべてのサンプルからバンドが得られなかった。

次に、各種 UBC プライマーによる PCR で得ら

れた特異的バンドを切り出し、識別プライマーを作成した。UBC-835 プライマーによる PCR の結果、1.4kbp 付近にトチギシロ特異的バンドが安定的かつ明瞭に確認された。そこで得られたバンドについて、塩基配列の解析を行った。得られた塩基配列より STS (Sequence Tagged site) 化プライマー (STS835-1) を作成し PCR を行った結果、トチギシロでのみ明瞭なバンドが確認された。また、得られるバンドがトチギシロ特異的であることを明確にするために、新たにトチギシロ 5 粒より DNA を調製し PCR 反応を行ったところ、STS 化プライマーよりバンドが確認された。さらに、同様の手法により各 UBC プライマーから得られる種内間特異的なバンドを切り出し塩基配列を決定後、STS 化プライマーを作成し PCR を行った。その結果、STS 化プライマーを用いることで、今回実験に用いた大麻種子 16 サンプルは 14 パターンに分離可能であった。

次に、海外で喫煙用の栽培目的で売買がなされているオランダ産の大麻種子を用い実験を行った。栽培・育種地域も限定されており、近縁交配(雑)による高頻度の掛け合わせ(繰り返し)による栽培(喫煙目的用の人工栽培)が予想されたが、数種の UBC プライマーにおいては多くの DNA 多型が観察された一方で、トチギシロとそれ以外、メキシコ産とそれ以外では、多型に大きな差がみられると予想されたが、個々のサンプルと部分一致するバンドが数多くみられた。また、多型解析において *C. sativa* および *C. indica* といった 2 種類に大別可能な種間差はみられなかった。

本研究では、7 種類の識別プライマーを作成した。それらを併用することで 16 サンプル中 14 サンプルが分離可能であった。今後はこれから 7 種の識別プライマーが世界各地に分散す

る大麻に、どこまで汎用性があるかを検討する必要があると考えられる。

#### C.16. Salvinorin A (Sal A) の免疫化学的分析手法による検出法の開発

まず、独自の手法を駆使し免疫化学的分析手法に必須な抗体の作製を行った結果、Sal 類を特異的に認識する MAb を得た。さらに、最適一次抗体濃度の検討を行ったのち、間接競合法による Sal A の検出を試みたところ、0.156 mg/ml から 1.25 mg/ml の濃度領域において、Sal A の濃度と吸光度との間に良好な直線関係が得られ、競合的 ELISA の開発に成功したことを確認した。次に、作製した抗 Sal A MAb の特異性を確認するために各種関連化合物との交差反応性を検討したところ、本抗体は Sal 類 (A, C, D, E 及び非天然型 Sal 類) を認識することが判明した。一方、divinatorin 類、salvidivin 類に対する反応性は確認されず、このことから本抗体が Sal 類を広範に認識する抗体であることが明らかとなった。Sal 類の中で、比較的強く交差反応性を示したものは、非天然型の pivaloyl-salvinorin (72.8%), propinoyl-salvinorin (67.2%) であり、天然型の Sal 類では、Sal C が 26.2% の交差反応性であった。次に、今回確立した競合的 ELISA により *S. divinorum* 葉中の Sal 類の定量を行ったところ、すべてのサンプルで Sal 類を検出し、また定量値は乾燥葉単位重量当たり 10 mg/mg~17 mg/mg であった。これまでに報告されている *S. divinorum* 葉中の Sal 類の定量値と比較すると、本定量値は総 Sal 類の含量を示しているものと考えられる。

次に、常法に従いイムノクロマトストリップを作成し、このものを用い 50  $\mu$ g/ml の SalA 溶液を分析した。その結果、ターゲットゾーンのスポットの消失が確認でき、本法を用いる