

201523001A

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

政策研究事業

乱用薬物の鑑別法に関する研究

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

(H25-医薬-一般-019)

研究代表者 内山 奈穂子

平成 28 (2016) 年 3 月

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

乱用薬物の鑑別法に関する研究

## 目 次

I. 総括研究報告書		
乱用薬物の鑑別法に関する研究		
内山 奈穂子	.....	1
II. 分担研究報告書		
1. 法規制薬物(植物を含む)の分析と鑑別に関する研究		
内山 奈穂子		
法規制薬物の TLC 及び呈色試薬による識別法(2)		
内山 奈穂子	.....	13
薬物簡易スクリーニングキットを用いた法規制薬物の識別法の検討(2)		
内山 奈穂子	.....	21
2. 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究		
花尻(木倉) 瑠理		
ヒト生体試料中危険ドラッグ成分のスクリーニング分析と定量分析		
花尻(木倉) 瑠理	.....	35
合成カンナビノイド分析における光イオン化 GC/MS の有用性		
阿久津 守	.....	45
覚醒剤使用事犯の捜査における尿中簡易試験キットの有用性及び限界		
家宇治 啓	.....	57
3. コンピュータモデリングによる法規制薬物の代謝物予測に関する研究		
出水 庸介		
コンピュータモデリングによる合成カンナビノイドの代謝物予測に関する研究(3)		
出水 庸介	.....	73
4. DNA を用いた法規制植物の識別法に関する研究		
緒方 潤		
違法ドラッグ製品“菌床”の基原種同定		
緒方 潤	.....	85
“菌床”の培養と子実体の形成および Psilocybin, Psilocin の定量		
緒方 潤	.....	89

<i>Psilocybe cubensis</i> の LAMP 法を用いた簡易検出法の検討 緒方 潤	..... 99
大麻種子 1 粒からの RAMS 法を用いた識別法の検討 緒方 潤	..... 107
5. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の鑑別に関する研究 河野 徳昭	
ケシ属植物の遺伝子鑑別法の開発に関する研究 河野 徳昭	..... 115

## 乱用薬物の鑑別法に関する研究

研究代表者:内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨:近年、依存性等の中枢毒性が認められた「指定薬物」について積極的な「麻薬」への指定が進み、平成24年度から平成27年11月までに、指定薬物のうち合成カンナビノイド、カチノン類及びフェネチルアミン類などを含む20化合物が新たに麻薬として規制された。従って、麻薬など法規制薬物とその他未規制化合物を迅速且つ正確に識別することは司法的な観点からも非常に重要である。また、大麻やケシ等の法規制植物に関しては、各植物における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。本研究では、法規制薬物の中で、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植物、さらに今後これらの法律により規制される可能性の高い薬物及び植物について、迅速かつ効果的な分析と鑑別を目的として、以下の研究を行った。

法規制薬物の分析に関しては、麻薬、向精神薬等法規制薬物及びその構造類似化合物として、ベンゾジアゼピン類及び関連化合物、モダフィニル類、計 38 化合物について、TLC 分析、UV 検出及び 4 種類の呈色試薬による発色を確認した。その結果、TLC 分析により各化合物群内においては概ね良好に分離した。また、今回検討した化合物群を一斉検出するには、ヨウ化白金酸試薬が適していた。従って、TLC 及び呈色試薬による分析は、法規制薬物等を識別する際の簡易且つ迅速な予試験法として有用であることが示唆された。さらに、簡易薬物スクリーニングキットを用いて、法規制薬物及び未規制薬物、計 124 化合物(ベンゾジアゼピン類、アンフェタミン類、メタンフェタミン類他)を対象として検出法の評価を行った結果、ベンゾジアゼピン類は 8 割以上が陽性であった。アンフェタミン類及びメタンフェタミン類では、例外はあるものの、各対象薬物の一置換体(ハロゲンやメチル基など)が概ね陽性の結果となった。今回検討を行ったキットでは、法規制薬物及び未規制薬物を区別することは困難であった。しかし、新たな流通が危惧されるベンゾジアゼピン系向精神薬などの構造類似体の簡易検出法の一つとして有用であると考えられた。

法規制薬物の生体試料分析に関しては、危険ドラッグが関与すると考えられている 4 死亡事例の尿試料を分析した結果、4 試料から計 27 化合物(危険ドラッグ 8 化合物および代謝物 10 化合物、その他麻薬、向精神薬等 9 化合物)が 0.1-1538 ng/mL(グルクロニダーゼ処理試料)検出され、様々な危険ドラッグ製品や薬物を併用している乱用実態が明らかとなった。合成カンナビノイドの分析に光イオン化法(Photoionization:PI)を用いた GC/MS-PI を適用し、その有用性について検討した結果、全 62 化合物中 58 化合物から分子イオンを観測することができた。従って、GC/MS-PI は、合成カンナビノイド分析において分子イオンを確認できる有用な方法であると考えられた。覚醒剤捜査における尿中覚醒剤現場簡易試験として、2 種類のキットを用いて偽陽性が生じる濃度等について検討した結果、AccuSign<sup>®</sup>キットは 24 化合物中 12 化合物に偽陽性を示し、INSTANT-VIEW<sup>®</sup>キットは 24 化合物中 2 化合物に偽陽性を示す結果であった。従って、現場簡易試験としては AccuSign<sup>®</sup>のキットより

INSTANT-VIEW<sup>®</sup> キットの方が尿中覚醒剤陽性と誤判定するリスクを下げることに繋がると考えられた。

さらに、違法薬物の鑑別法におけるコンピュータシミュレーションの妥当性について検証することを目的とし、CB1 受容体のホモロジーモデリングに用いる GPCR テンプレートの検討、相同性の高い S1P 受容体 (PDB:3V2Y) およびアドレナリン β2 受容体 (PDB:4QKX) をそれぞれテンプレートとした CB1 受容体の立体構造を構築、および様々な CB1 リガンド (69 種類) のドッキングシミュレーションを行った。その結果、S1P 受容体をテンプレートとしてモデル構築した CB1\_3V2Y を用いることで、リガンドの結合エネルギーと活性との間で良い相関を見出せることが明らかとなった。

植物関係では、法規制植物、麻薬原料植物であるマジックマッシュルームと疑わしき試料 (菌床) を分析材料として、DNA を用いた基原種鑑別を菌糸体由来 DNA から行った。核 rDNA 上の ITS 領域および近傍の Large subunit 領域を分析し、本菌糸体がモエギタケ科シビレタケ属 *Psilocybe cubensis* “ミナシビレタケ” であると同定した。さらに、試料である菌糸体から子実体 (きのこ) を形成させ、子実体から同様に DNA 分析を行い、マジックマッシュルームの一種であるミナシビレタケであることを明らかにし、マジックマッシュルームの幻覚性成分である Psilocybin, Psilocin を含有することも確認した。そこで、ミナシビレタケの簡易 DNA 分析法として LAMP 法を用いた目視判定法の検討を行った。マジックマッシュルームは同属近縁種が多いためミナシビレタケ特異的 LAMP プライマーとして標的 DNA 3 箇所からそれぞれ 1 セット、計 3 種類のプライマーセットを作成した。本手法では子実体のみならず、菌糸体での判別も可能であり、新たな規制の可能性を示唆した。また、大麻の系統識別法を目的として、電気泳動で分析可能なマイクロサテライト解析の一種である RAMS (random amplified microsatellites) 法を検討した。DNA 塩基配列 2 領域で同一塩基配列を有する大麻系統内でも多型が確認され、異動識別法には利用可能であると示唆された。また、オニゲシ特異的遺伝子の全長 cDNA の分子クローニングを RACE 法により行った。本遺伝子は分子系統解析の結果、ケシ由来の機能未知酵素遺伝子 DIOX4 及び DIOX5 と高い相同性を示すことが判明した。得られた配列情報は、これまでにオニゲシ特異的遺伝子候補として取得している遺伝子群とともに、鑑別対象植物のオリパビン生産能の有無の評価に使用できるものと考えられた。

以上、本研究は、厚生労働省の法規制薬物行政と取り締まりに直接的に貢献する内容であり、ひいては、国民の健康・危機リスクを軽減させるものと考えられる。

#### 【分担研究者】

花尻 (木倉) 瑠理: 国立医薬品食品衛生研究所

生薬部室長

緒方 潤: 国立医薬品食品衛生研究所

生薬部主任研究官

出水 庸介: 国立医薬品食品衛生研究所

有機化学部室長

河野 徳昭: 独立行政法人医薬基盤研究所

薬用植物資源研究センター筑波研究部

主任研究員

#### 【協力研究者】

阿久津 守: 関東信越厚生局麻薬取締部

鑑定課鑑定課長

杉江 謙一: 関東信越厚生局麻薬取締部

厚生労働技官

家宇治 啓: 四国厚生支局麻薬取締部

鑑定官

吉松 嘉代: 独立行政法人医薬基盤研究所

薬用植物資源研究センター筑波研究部

育種生理研究室長

乾 貴幸:独立行政法人医薬基盤研究所  
薬用植物資源研究センター筑波研究部  
特任研究員  
河村 麻衣子:国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部

#### A. 研究目的

近年、依存性等の中樞毒性が認められた「指定薬物」について積極的な「麻薬」への指定が進み、平成 24 年度から平成 27 年 11 月までに、指定薬物のうち合成カンナビノイド、カチン類及びフェネチルアミン類などを含む 20 化合物が新たに麻薬として規制され、平成 27 年度では、4 化合物 (25I-NBOMe, 25B-NBOMe, 2C-C-NBOMe, AH-7921) が麻薬として規制された。従って、麻薬など法規制薬物とその他未規制化合物を迅速且つ正確に識別することは、司法的な観点からも非常に重要である。分析的な面で考えると、麻薬や覚せい剤の使用罪に対応するため、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。法規制植物に関しては、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。ケシ属植物では、一般的に植物の鑑定は難しいため、鑑賞用に誤って違法けしを栽培してしまう事例もある。従って、各植物における種や栽培品種の、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。

研究代表者らは、これまで継続的に法規制薬物及びその代謝物に関する研究を行っており、生体試料(尿, 毛髪等)分析による麻薬化合物の摂取識別法を明らかにしてきた。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、鑑定官に対する研修指導を行うなど、取り締まりの現場に直接貢献する研究を行っている。この様に、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取り合い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。

そこで、本研究では、以下の検討を行った。

麻薬や向精神薬など法規制薬物と未規制化合物との識別のために、各薬物について、呈色試験、TLC、薬物簡易スクリーニングキット(イムノアッセイ法)等により基礎的科学データの収集・整備を行った。また、法規制薬物や今後規制される可能性の高い薬物およびその代謝物を利用した生体試料中の迅速識別法の確立を目的として、危険ドラッグ等の薬物摂取が原因と考えられる死亡事例について、LC-MS/MS を用いた尿試料中薬物分析の検討を行った。さらに、麻薬取締部の協力のもと、合成カンナビノイド(麻薬成分を含む)の同定において必要である、分子イオン情報を得られるイオン化法として光イオン化法(Photoionization:PI)を用いた GC/MS-PI を適用し、GC/MS-PI の有用性について検討した。また、覚醒剤に類似した構造を有する危険ドラッグ成分が、簡易試験キットで偽陽性を示すケースが報告されていることから、覚醒剤事犯の捜査現場において使用する3種類の尿中覚醒剤簡易試験キットを用いて、キットの有用性の評価を行った。

さらに、乱用薬物と特異的受容体との結合様式予測と活性との相関評価、また、その薬物の代謝酵素とのコンピュータモデリングによる代謝物予測を目的として、カンナビノイド CB1 受容体およびそのリガンド(合成カンナビノイドおよび  $\Delta^9$ -THC, 69 種類)について検討を行った。

植物関係では、法規制植物の簡便な鑑別法のひとつとして、麻薬原料植物由来 DNA の LAMP を用いた目視判定法の検討を行った。また、大麻草の DNA 多型に基づいた系統内識別法を目的として、マイクロサテライト解析の一種である RAMS 法による系統識別の有効性を調査した。さ

らに、法規制植物ケシ属植物について、オニゲシ特異的遺伝子の全長 cDNA の分子クローニングを RACE 法により行い、オリパビン生産能の有無の評価に使用できる鑑別用標的遺伝子の分析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 法規制薬物(植物を含む)の分析と鑑別に関する研究

#### 1-1. 法規制薬物の TLC 及び呈色試薬による識別法(2)

本研究では、麻薬、向精神薬等法規制薬物及びその構造類似化合物として、ベンゾジアゼピン類及び関連化合物(向精神薬 10 化合物、未規制 23 化合物)、モダフィニル類:(向精神薬 1 化合物、指定薬物 2 化合物、未規制 2 化合物)計 38 化合物を対象とし、3 種の展開溶媒を用いて TLC 分析を行い、各 Rf 値を確認した。また UV 検出及び 4 種類の検出試薬(呈色試薬:ドラージェンドルフ試薬、ヨウ化白金酸カリウム溶液、エールリッヒ試薬、ニンヒドリン試薬)による発色を確認し、色調の差異を検討した。

#### 1-2. 薬物簡易スクリーニングキットを用いた法規制薬物の識別法の検討(2)

本研究では、向精神薬ベンゾジアゼピン類、メタンフェタミン、アンフェタミン、または複数薬物を検出対象薬物とした市販の各簡易薬物スクリーニングキットを用いて、法規制薬物及び未規制薬物(計 124 化合物)【ベンゾジアゼピン類及び関連化合物:36 化合物、アンフェタミン類:35 化合物、メタンフェタミン類:21 化合物、カチノン類:15 化合物、フェネチルアミン類:9 化合物、その他:8 化合物】を対象として検出法の評価を行った。

### 2. 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究

#### 2-1. ヒト生体試料中危険ドラッグ成分のスクリーニング分析及び定量分析

危険ドラッグが関与したことが疑われる死亡事例 4 件(2014 年)の尿試料(Case 1~Case 4)を使

用した。平成 26 年度に構築した LC-Q-TOF-MS を用いたスクリーニング法により含有化合物の検索を行い、さらに、LC-MS/MS を用いて検出した危険ドラッグ成分および代謝物等の定量分析を行った。

#### 2-2. 合成カンナビノイド分析における光イオン化 GC/MS の有用性

合成カンナビノイド化合物の同定において、GC/MS は、一般的に行われている機器分析法の 1 つである。通常、分子イオン情報を得る必要がある場合、化学イオン化法 (CI) を用いた GC/MS-CI を行っているが、GC/MS-CI は、試薬ガスの選択や流量の調整など新たなパラメータの調整が必要となる。近年、分子イオン情報が容易に得られるイオン化法として、光イオン化法 (Photoionization: PI) が開発されたことから、本研究では合成カンナビノイド (62 化合物) の分析に PI を用いた GC/MS-PI を適用し GC/MS-PI の有用性について検討した。

#### 2-3. 覚醒剤使用事犯の捜査における尿中簡易試験キットの有用性及び限界

覚醒剤事犯の捜査現場において使用する尿中覚醒剤簡易試験キットである AccuSign<sup>®</sup> One-step MET 及び AccuSign<sup>®</sup> One-step AMP キットと INSTANT-VIEW<sup>®</sup> MDMA&METH&AMP キットを用いて、キットの有用性の評価を行った。第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン及び MDMA 類似薬物並びにヒト生体内代謝物と考えられる第 1 級アミン構造を有する N-脱アルキル体等の計 24 化合物を試験化合物として選定し、ドラッグフリー尿に各化合物を添加して、尿中薬物濃度 0.3-100 µg/mL に調製した試料液を各キットで分析した。

### 3. コンピュータモデリングによる法規制薬物の代謝物予測に関する研究

#### 3-1. コンピュータモデリングによる合成カンナビノイドの代謝物予測に関する研究(3)

MOE (Molecular Operating Environment; CCG 社) Protein Search を用いて、CB1 受容体の配列と 164 種の GPCR 配列からシークエンスアラインメン



トをおこない、20%以上の相同性を持つ GPCR を抽出した。その中で、最も相同性の高い S1P 受容体 (PDB:3V2Y), およびアドレナリン  $\beta$ 2 受容体 (PDB:4QKX) をテンプレートとして用いた。次いで、それぞれのアラインメントをおこなった配列を用いて CB1 受容体のホモロジーモデリング (力場; AMBER12:EHT) をおこなった。さらに、Site Finder を用いてモデル構築した 2 種類の CB1 受容体 (CB1\_3V2Y, CB1\_4QKX) のリガンド結合領域を検出し、69 種類の CB1 リガンドとのドッキングシミュレーション (力場; MMFF94X) を行うことで、CB1 受容体に対するリガンドの結合様式の解析を行った。

#### 4. DNA を用いた法規制植物の識別法に関する研究

##### 4-1. 違法ドラッグ製品“菌床”の基原種同定

違法ドラッグ製品として流通した“菌床”から DNA の塩基配列を指標とし、菌糸の同定を行った。菌床より菌糸体を回収し、Maxwell 16 (Promega) を用い DNA を抽出・精製した。回収 DNA 溶液を鋳型として核ゲノム上の ITS 領域および近傍の Large subunit 領域を、各領域で菌類において保存性の高い配列を基にして作成されたユニバーサルプライマーを用い PCR 増幅後、配列決定のためのシーケンス解析を行った。得られた配列データは国際塩基配列データベースで照合した。

##### 4-2. “菌床”の培養と子実体の形成および Psilocybin, Psilocin の定量

違法ドラッグ製品“菌床”を試料とし、3 種の培地を調製 (PDA, PDYA, 子実体形成) し、子実体 (きのこ) の形成を試みた。植菌および培養は無菌的に 25°C、暗所培養を行い、子実体形成はそれまでの閉鎖系から開放系、明培養へ移行させ、子実体の形成を行った。得られた子実体は 4-1 の方法により塩基配列を決定し菌種を同定した。また、試料である菌糸体および形成された子実体より Psilocybin および Psilocin の分析を LC-Q-TOF-MS, LC-MS/MS MRM 分析により行った。

##### 4-3. Psilocybe cubensis の LAMP 法を用いた簡易検出法の検討

*Psilocybe cubensis* および市販の“食用きのこ”、シイタケ、ブナシメジ、エリンギ、エノキタケ、マイタケより Maxwell 16 (Promega) を用い DNA を抽出した。*Psilocybe cubensis* の Translation elongation factor 1-alpha (*EF1-alpha*) gene (KF586480), ITS-1 (KP780435), ITS-2 (KP780435) の 3 か所を標的 DNA とし、各々 3 種類の LAMP プライマーを設計した。LoopampDNA 増幅試薬キット (EIKEN Chemical Co., Ltd.) を用い 65°C の等温条件下で 90 分反応させ、Hydroxynaphthol Blue (HNB) (Dojindo) 水溶液を混合し目視判定を行った。

##### 4-4. 大麻種子 1 粒からの RAMS 法を用いた識別法の検討

関東信越厚生局麻薬取締部より分与された大麻種子海外市場製品 16 種、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て系統保存されているメキシコ産系統種子 8 種、日本国内繊維用栽培種トチギシロ種子 8 種および筑波研究部より分与いただいた「大津市トチギシロ」8 種を用いた。各種子 1 粒より Maxwell 16 を用い DNA を抽出・精製した。*trnH-psbA* および ITS 領域の解析し各試料の系統関係を解析した。メキシコ産系統種子 8 種、日本国内繊維用栽培種トチギシロ種子 8 種から得られた DNA をもとに、RAMS プライマーを用い PCR 増幅を行い 1.8% アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認した。

##### 5. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の鑑別に関する研究

##### 5-1. ケシ属植物の遺伝子鑑別法の開発に関する研究

昨年度、本研究の成果のひとつであるケシ属植物のトランスクリプトーム解析の結果から、オニゲシ特異的な 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase (ODDs) 酵素遺伝子の相同遺伝子 contig #1603 を見出し、その塩基配列情報を利用し、オニゲシ特異的な検知が可能な PCR 鑑別法を開発した。薬用植物資源研究センター筑波研

究部で保存栽培されている‘ハカマオニゲシ’#188-00#4 株は、ハカマオニゲシの特徴を有しているが、昨年度の contig #1603 特異的プライマーを用いた PCR スクリーニングで positive となり、ハカマオニゲシの外観であるが contig #1603 遺伝子を有する奇異な株と判断されていた。そこで、今年度開花した同株について、葉より再度ゲノム DNA を調製して PCR を行い再現性を確認した。得られた増幅産物はアガロース電気泳動で解析した。トランスクリプトーム解析により得られた contig #1603 の機能推定、機能解析等のため、全長 cDNA 配列の取得を行った。Contig #1603 の塩基配列情報をもとに特異的プライマーを設計し、3'及び5'末端部のクローニングには RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)法を用いた。オニゲシ(導入番号 13-95)の葉(中央部)より RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用い total RNA を調製した。Superscript III(Invitrogen)により 1 本鎖 cDNA を逆転写合成した。3'-RACE により 8 クローンを得、塩基配列解析に供した。5'-RACE により 8 クローンを得、塩基配列解析に供した。5'-RACE より得られた cDNA の N 末端側の塩基配列情報と、3'-RACE より得られた C 末端側の情報より、PCR を行い 16 クローンを得、塩基配列解析に供した。得られた配列情報は、BLAST 解析及び分子系統解析に供した。

## C. 研究結果・考察

### 1. 法規制薬物(植物を含む)の分析と鑑別に関する研究

#### 1-1. 法規制薬物の TLC 及び呈色試薬による識別法(2)

今回検討した対象 38 化合物は、TLC 分析により、各化合物群内においては概ね良好に分離した。しかし、一部の化合物については、複数のスポットが検出され、これは展開溶媒で用いたトリエチルアミンにより化合物が分解した可能性が考えられた。従って、TLCでの検討には注意が必要であった。また、各呈色試薬により、構造類似化

合物内で特徴的な呈色を示す事例もみられた。ベンゾジアゼピン類及び関連化合物(33 化合物)については、いずれも UV 検出が可能であったが、モダフィニル類については、UV 254 nm では検出が困難であった。さらに、今回検討した化合物群を一斉検出するには、ヨウ化白金酸試薬が適していた。

#### 1-2. 薬物簡易スクリーニングキットを用いた法規制薬物の識別法の検討(2)

法規制薬物及び未規制薬物(計 124 化合物)について検討した結果、ベンゾジアゼピン類 29 化合物については、25 化合物(向精神薬 9 化合物、未規制 16 化合物)が陽性であった [検出限界濃度 (LOD): 0.5~10 µg/mL]。また、複数薬物同時検出可能な 2 種のキットでは、それぞれ 26 化合物及び 23 化合物が陽性であり、キットにより検出結果が若干異なった。アンフェタミン類では、35 化合物中 24 化合物が陽性であり [LOD: 1.0~10 µg/mL]、メタンフェタミン類では、21 化合物中 15 化合物が陽性であった [LOD: 0.5~10 µg/mL]。また、これら薬物群についても、複数薬物同時検出可能な 2 種のキットでは、各キットにより検出結果が異なった。

### 2. 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究

#### 2-1. ヒト生体試料中危険ドラッグ成分のスクリーニング分析と定量分析

危険ドラッグ摂取起因死亡 4 事例 (Case 1~ Case 4) から得た尿試料について、生体試料中薬物の定量分析を行った。Case 1 においては尿からはカチノン類の  $\alpha$ -PHP を 91.48 ng/mL、合成カンナビノイド 5F-QUPIC の代謝物と推定される 5F-QUPIC carboxyindole を 1.96 ng/mL 検出した。Case 2 では、親化合物として、NMDA 受容体アンタゴニストの Diphenidine を 57.45 ng/mL と最も高濃度検出した。さらに危険ドラッグの  $\alpha$ -PHP、5-APDB、2-EAPB、Acetylfentanyl、5F-AB-PINACA およびその 3 代謝物、AB-CHMINACA およびその 6 代謝物を検出した。Case 3 では、合

成カンナビノイド AB-CHMINACA および 6 代謝物を検出した他, Carbamazepine および微量の Haloperidol を検出した. Case 4 では, 危険ドラッグ関連化合物としてカチノン類の 4F- $\alpha$ -PHPP のみを微量 (0.27 ng/mL) 検出した. その他に Fentanyl (麻薬) および代謝物の Norfentanyl, Diazepam (向精神薬), Oxazepam (向精神薬), Midazolam (向精神薬), Haloperidol, Pentazocin (向精神薬) 等様々な化合物を検出した. 以上, 4 試料から計 27 化合物 (危険ドラッグ 8 化合物および代謝物 10 化合物, その他麻薬, 向精神薬等 9 化合物) が 0.1-1538 ng/mL (グルクロニダーゼ処理試料) 検出された.

## 2-2. 合成カンナビノイド分析における光イオン化 GC/MS の有用性

本研究において, GC/MS-PI で測定を行った合成カンナビノイド全 62 化合物中 58 化合物から分子イオンを観測することができた. このうち, フラグメントイオンピークが基準ピークとなるものが 8 化合物あった. 通常, 合成カンナビノイド類は, ヘテロ環, 芳香族環を内包した共役系の化合物であるため, PI のようなソフトなイオン化では, 開裂なく分子ピークが観測される. ただし, メチルペリジニル基のような共役系から孤立した官能基が結合している場合は, その部位が開裂したイオンが強く観測されることが予想される. また, カルボキサミド基を有する化合物では, 分子イオンおよび EI と同様のフラグメントイオン ( $m/z$  312) が観測され, その質量差が 44 Da であった. このことは, PI では, カルボキサミド基を有する化合物の定性に有効であることが示唆された. このように, PI では, 分子イオンの強度が低い場合でも, 解析が容易な単純開裂により生成されたフラグメントイオンが観測されるため, 構造を検証する上で有利と考える.

## 2-3. 覚醒剤使用事犯の捜査における尿中簡易試験キットの有用性及び限界

AccuSign<sup>®</sup> のメタンフェタミン試験では 17 化合物に偽陽性を示した. これらの代謝物と考えられる *N*-脱アルキル体 12 化合物 (重複化合物を含

む.) も試験濃度により, アンフェタミン試験に偽陽性を示すことが示され, 覚醒剤尿との区別は困難であった. INSTANT-VIEW<sup>®</sup> のメタンフェタミン試験では *d*-Amphetamine を除いた 10 化合物に偽陽性を示したが, そのうちの 8 化合物は MDMA 試験で偽陽性を示したことから, 尿中覚醒剤陽性と判定されず, 覚醒剤尿との区別は可能であった. 残りの 2 化合物の *N*-脱アルキル体については試験濃度により, アンフェタミン試験に偽陽性を示したことから, 覚醒剤尿との区別は困難であった. 両キットを用いて検証した結果, AccuSign<sup>®</sup> キットでは, 24 化合物中 12 化合物が尿中覚醒剤陽性と判定された. INSTANT-VIEW<sup>®</sup> キットでは, 24 化合物中 2 化合物が尿中覚醒剤陽性と判定された.

## 3. コンピュータモデリングによる法規制薬物の代謝物予測に関する研究

### 3-1. コンピュータモデリングによる合成カンナビノイドの代謝物予測に関する研究 (3)

はじめに, CB1 受容体のアミノ酸配列と 164 種の GPCR のアミノ酸配列からシーケンズアライメントをおこない, 最も相同性の高い S1P 受容体 (PDB:3V2Y), および, GPCR 中にリガンドを含む Human Species のアドレナリン  $\beta$ 2 受容体 (PDB:4QKX) をテンプレートとして用いることとした. 次いで, CB1 受容体のホモロジーモデリングをおこなった結果, モデル構築した 2 種類の CB1 受容体 (CB1\_3V2Y および CB1\_4QKX) は, それぞれのテンプレート構造と良い一致を示した. さらに, これら 2 種類の CB1 受容体のリガンド結合領域を比較すると, ポケットサイズはほぼ同じであるがリガンドが結合する位置に若干の違いが認められた. 続いて, CB1 受容体 (CB1\_3V2Y, CB1\_4QKX) リガンド結合領域と 69 種類の CB1 リガンドとのドッキングシミュレーションによりスコアリングし, CB1\_3V2Y あるいは CB1\_4QKX と各リガンドの結合エネルギーを比較した結果, ほとんどが -46~-36 間 (CB1\_3V2Y), -43~-30 間 (CB1\_4QKX) に収まっていた. リガンドの多くは

CB1 受容体のリガンド結合領域中で疎水性相互作用によって安定なコンフォメーションを形成していた。CB1\_3V2Y に関しては、活性の高いリガンドが比較的安定な結合エネルギー[例えば、リガンド 34(0.2 nM:-46.2), 60(0.01 nM:-45.8)]を示すことが明らかとなった。CB1\_4QKX に関しては、CB1\_3V2Y と類似の傾向を示したが、最も活性の高いリガンド 60 における結合エネルギーが低く見積もられていることから、CB1 リガンドとのドッキングシミュレーションにおいては CB1\_3V2Y が適したテンプレートとなり得ることが示唆された。

#### 4. DNA を用いた法規制植物の識別法に関する研究

##### 4-1. 違法ドラッグ製品“菌床”の基原種同定

菌類の鑑別・同定に用いられる ITS 領域を増幅後、各増幅産物の塩基配列を決定し、国際塩基配列データベースに登録されている配列と比較した。各試料ともに DNA は良好に抽出・精製された。供試した 4 検体で増幅産物が確認された。塩基配列を確認した結果、4 検体の塩基配列はすべて一致した(解析塩基数 1551)。また、配列比較の結果 *Psilocybe cubensis* とも 100%一致した(1551/1551)。

##### 4-2. “菌床”の培養と子実体の形成および *Psilocybin*, *Psilocin* の定量

製品からの再培養では、高栄養下寒天培地(PDA, PDYA)にて再培養を試みたが 1 製品は菌糸の伸長、成長が見られなかった。1 製品に関しては菌糸の伸(成)長が見られた。PDA および PDYA 培地への移植については、両培地ともに良好な成長が見られ、20 日後ではプレート一面を覆う菌糸の成長が見られた。また、培地による成長速度に大きな差は見られなかった。子実体形成培地への移植については開放系培養後 20 日目で子実体の形成が確認された。本実験過程で得られた子実体で最も大きいものは 33.27g(湿重量)であった。子実体の同定では、本実験で得られた子実体より DNA を調製し、4-1 の方法で、核 rDNA 上の ITS 領域および近傍の Large subunit

領域を解析した結果、いずれの塩基配列も、モエギタケ科シビレタケ属 *Psilocybe cubensis* “ミナシビレタケ”の配列と一致した。*Psilocybin*, *Psilocin* の分析では、製品を 2 週間程度の培養を行った菌糸からは、微量であるが *Psilocybin*, *Psilocin* の両化合物が確認できた(0.8 ng, 0.04 ng/mg)。さらに寒天培地に移植して培養を行った菌糸からは、*Psilocybin*, *Psilocin* 共に良好に検出した(95 ng, 5 ng/mg)。形成された子実体は柄とカサに分割して分析を行った。生試料は各培地から採取してすぐに一部分を切り取り抽出し、乾燥試料は残った部分を室内で乾燥後量り取り抽出を行った。その結果バラつきは大きかったが、各試料中から高濃度の *Psilocybin*(Raw:410~1201 ng/mg, Dried:2.2~6.8 μg/mg), *Psilocin* (Raw:69~148 ng/mg, Dried:0.14~3.4 μg/mg)を検出した。

##### 4-3. *Psilocybe cubensis* の LAMP 法を用いた簡易検出法の検討

LAMP プライマーの作成では *Psilocybe cubensis* の *EF1-alpha gene*, ITS-1, ITS-2 の 3 領域から各々 1 種類を選び、各プライマーセットを作成した。LAMP による検出では *Psilocybe cubensis* のみ各プライマーセットにおいて青色を呈した。それ以外のきこでは陰性を示す青紫色(色調変化なし)であった。これは、DNA の増幅(酵素反応)によって溶液中の HNB の色調が変化したものである。

##### 4-4. 大麻種子 1 粒からの RAMS 法を用いた識別法の検討

*trnH-psbA* および ITS 領域の解析では、*trnH-psbA* では塩基配列は 4 タイプに分類され、メキシコ産系統、各トチギシロの配列はそれぞれ一致していた。ITS では塩基配列は 3 タイプに分類され、同じくメキシコ産系統、各トチギシロの配列はそれぞれ一致していた。海外市場製品 16 種は *trnH-psbA*, ITS でそれぞれ 3 タイプに分離された。RAMS 解析では、ITS, *trnH-psbA* 両領域において配列が一致したメキシコ産系統 8 種およびトチギシロ(筑波) 8 種に関して多型解析を行った。

HBBB(GAAA)<sub>5</sub> プライマーを用いた場合、メキシコ産系統に 2 か所の多型が観察された。ITS, *trnH-psbA* 両塩基配列では同一のグループであったが、マイクロサテライト領域を用いることで更なるグループ分け、異同識別が可能であった。一方で、トチギシロ(筑波) 8 種では多型が確認されず、本プライマーを用いることでの異同識別は不可能であった。各プライマー間での多型出現差異を見てみると、HBBB(GAAA)<sub>5</sub> プライマーではメキシコ産系統の 4, 5 レーン間は同一多型を示していたが、DBVB(CATA)<sub>5</sub> プライマーでのメキシコ産系統の 4, 5 レーン間は多型に差異が生じており、このことから更なる異同識別が可能であることが確認できた。BHD(AGC)<sub>5</sub> プライマーではメキシコ産系統間での多型は確認できなかった。また、HBV(GAT)<sub>5</sub> プライマーにおけるメキシコ産系統間では、大きな多型の変化は見られなかったが、約 300bp 付近のメインバンドにサイズ差が見られた。

## 5. 遺伝子情報を利用したケシ属植物の鑑別に関する研究

### 5-1. ケシ属植物の遺伝子鑑別法の開発に関する研究

ハカマオニゲシ#188-00 #4 株における再解析では、Contig #1603 に特異的な PCR プライマーを用い、#188-00#4 株の今年度開花した同株を検体として、葉より再度ゲノム DNA を調製し PCR を行い再現性を確認した。その結果、今年度調製のゲノム DNA を鋳型とした PCR では陰性であった。この結果を受けて、昨年度の株の葉より調製したゲノム DNA を鋳型として PCR → 陽性、昨年度の株の葉の残りより調製したゲノム DNA を鋳型として PCR → 陰性の結果を得た。以上より、昨年度の#188-00#4 はゲノム DNA の調製の過程でオニゲシ由来の遺伝子等の混入があったと判断された。RACE 法によるオニゲシ高発現 *ODDs* 相同遺伝子 contig #1603 の分子クローニングでは、逆転写合成した ss-cDNA プールを鋳型として 3'-RACE より約 0.5 kbp の増幅産物が得られた。この

増幅産物をクローニングし、塩基配列を解析した。その結果、数塩基の変異点はあるが、解析した PCR 産物 8 クローンはいずれも contig #1603 の 3' 下流側配列と考えられる塩基配列を有していた。5'-RACE より約 0.5 kbp の増幅産物が得られ、塩基配列を解析し増幅産物が#1603 の 5' 領域であることが判明した。Contig #1603 の全長 cDNA の PCR 増幅では、増幅産物の塩基配列を解析したところ、1098 塩基対、365 アミノ酸のコード領域を含む全長 cDNA の塩基配列情報が得られた。Contig #1603 の分子系統解析では、ケシ由来 *ODDs* と分子系統解析を行ったところ、機能未特定の酵素遺伝子 *DIOX4* 及び *DIOX5* と近縁であることが判明した。推定アミノ酸配列について blastp 検索を行ったところ最も高いスコアを示したのは、ケシ由来 *DIOX5* であり 75% の同一性、86% の相同性を示した。次にスコアが高かったものは同 *DIOX4* で 72% の同一性、84% の相同性であった。

## D. 結論

本研究は、現在厳しく法規制されている薬物及び今度同様に法規制される可能性の高い薬物の迅速かつ効果的な分析及び鑑別法に関する研究であり、厚生労働省の法規制薬物行政と取り締まりに直接貢献することを目的に以下の研究を行った。

法規制薬物の分析に関しては、麻薬、向精神薬等法規制薬物及びその構造類似化合物として、ベンゾジアゼピン類及び関連化合物、モダフィニル類、計 38 化合物について、TLC 分析、UV 検出及び 4 種類の呈色試薬による発色を確認した結果、TLC 分析により、各化合物群内においては概ね良好に分離した。また、各呈色試薬により、構造類似化合物内で特徴的な呈色を示す事例もみられた。さらに、今回検討した化合物群を一斉検出するには、ヨウ化白金酸試薬が適していた。従って、TLC 及び呈色試薬による分析は、法規制薬物等を識別する際の簡易且つ迅速な予試験

法として有用であることが示唆された。また、GC-MS や LC-MS の分析データとともに、TLC 分析データを包括的に蓄積、整備することは、法規制薬物等の識別法を検討する際に有用であると考えられる。

さらに、簡易薬物スクリーニングキットを用いて、法規制薬物及び未規制薬物(計 124 化合物)【ベンゾジアゼピン類及び関連化合物、アンフェタミン類、メタンフェタミン類、カチノン類、フェネチルアミン類、その他】を対象として検出法の評価を行った結果、ベンゾジアゼピン類 29 化合物については、25 化合物が陽性となり、高い割合で陽性となることが示された。また、複数薬物同時検出可能な 2 種のキットでは、キットにより検出結果が若干異なった。アンフェタミン類及びメタンフェタミン類では、例外はあるものの、各対象薬物の一置換体(ハロゲンやメチル基など)が概ね陽性の結果となった。また、これら薬物群について、複数薬物同時検出可能な 2 種のキットでの検出結果を比較したところ、各キットにより検出結果が異なった。今回検討を行ったキットでは、法規制薬物及び未規制薬物を区別することは困難であった。しかし、新たな流通が危惧されるベンゾジアゼピン系向精神薬などの構造類似体の簡易検出法の一つとして有用であると考えられ、今後、救急医療機関などでの活用の可能性が示唆された。

法規制薬物の生体試料分析に関しては、危険ドラッグが関与すると考えられている 4 死亡事例の尿試料を分析した結果、4 試料から計 27 化合物(危険ドラッグ 8 化合物および代謝物 10 化合物、その他麻薬、向精神薬等 9 化合物)が 0.1-1538 ng/mL(グルクロニダーゼ処理試料)検出され、様々な危険ドラッグ製品や薬物を併用している乱用実態が明らかとなった。

合成カンナビノイドの分析に PI を用いた GC/MS-PI を適用し GC/MS-PI の有用性について検討した結果、全 62 化合物中 58 化合物から分子イオンを観測することができた。GC/MS-PI は、プロトン付加分子や脱離分子が検出されることは

なく、化合物の分子量と同じ質量で検出されるため真の分子量情報が得られたことから、GC/MS-PI は、合成カンナビノイド分析において分子イオンを確認できる有用な方法であると考えられた。

覚醒剤捜査における尿中覚醒剤現場簡易試験として、AccuSign<sup>®</sup> One-step MET 及び AMP と INSTANT-VIEW<sup>®</sup> MDMA&METH&AMP の 2 種類のキットを用いて偽陽性が生じる濃度等について検討した結果、AccuSign<sup>®</sup>キットは 24 化合物中 12 化合物に偽陽性を示し、INSTANT-VIEW<sup>®</sup>キットは 24 化合物中 2 化合物に偽陽性を示す結果であった。どちらのキットも少なからず、メタンフェタミン等類似薬物に対して偽陽性を示す化合物が存在することから、現場簡易試験としては充分ではないものの、INSTANT-VIEW<sup>®</sup>キットは、MDMA 試験を実施することにより、メタンフェタミンとそれ以外の MDMA 等類似薬物を区別することができる可能性が示され、現場簡易試験としては AccuSign<sup>®</sup>のキットよりも INSTANT-VIEW<sup>®</sup>キットの方が尿中覚醒剤陽性と誤判定するリスクを下げることに繋がると考えられる。

さらに、違法薬物の鑑別法におけるコンピュータシミュレーションの妥当性について検証することを目的し、本年度は、CB1 受容体のホモロジーモデリングに用いる GPCR テンプレートの検討、相同性の高い S1P 受容体(PDB:3V2Y)およびアドレナリン  $\beta$ 2 受容体(PDB:4QKX)をそれぞれテンプレートとした CB1 受容体の立体構造を構築、および様々な CB1 リガンド(69 種類)のドッキングシミュレーションを行った。その結果、S1P 受容体をテンプレートとしてモデル構築した CB1\_3V2Y を用いることで、リガンドの結合エネルギーと活性との間で良い相関を見出せることが明らかとなった。今後は、Induced-Fit(タンパク質のリガンド結合部位の構造を変化させる)を考慮した Glide(高速・高精度ドッキングプログラム)/Prime(タンパク質立体構造予測プログラム)によるタンパク質-リガンド相互作用解析をおこなうことで、より詳細なドッキングシミュレーションをおこない、コンピュータシミ

レーションの妥当性について検証する。

植物関連では、麻薬原料植物である“マジックマッシュルーム”の DNA 解析を行った。今回分析した試料は、子実体、いわゆる「きのこ」ではなく、穀物等培地に繁殖した菌糸・菌糸体であったが DNA の調製は特に問題はみられず、サイロシン、サイロシピンを含有するいわゆるマジックマッシュルームである、担子菌門モエキタケ科シビレタケ属 *Psilocybe cubensis* “ミナミシビレタケ”であることが DNA 解析から強く示唆された。また、本菌糸体から子実体を形成させることが可能であった。さらに、子実体から得られた DNA からも、*Psilocybe cubensis* “ミナミシビレタケ”であることが示唆される。活性成分である Psilocybin, Psilocin を菌糸体、子実体から検出しており、現在の規制対象は“きのこ”であるが、「子実体、きのこ」以前、生活環における「菌糸体」の状態であっても規制(対象)区分になり得ることが考えられた。

幻覚性きのこの簡易スクリーニング法のひとつとして *Psilocybe cubensis* 由来 DNA の Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) を用いた目視判定法を検討した。本実験系では電気泳動やシーケンサーなどの機器を使用せず、全工程 3 時間程度で検出が可能であることが示唆された。また、子実体(きのこ)のみならず菌糸(体)の形態であっても DNA さえ抽出可能であれば分析できる点は分析法のひとつとして有効であると考えられた。

アサ科アサ属の大麻 *Cannabis sativa* L. は世界中に多様な変異系統の存在が認められている。このような種内変異を DNA 塩基配列情報を用い明らかにすることは、摘発大麻の由来を解明する上で重要と考えられることから、マイクロサテライト解析のひとつである RAMS (random amplified microsatellites) 法を検討した。DNA 塩基配列 2 領域で同一塩基配列を有する大麻系統内でも多型が確認され、異動識別法には利用可能であると示唆された。本法はシーケンサーなどの機器を必要としない点も簡易な手法として有効であった。

ケシ属植物の分析では、今年度はオニゲシ特異的遺伝子 contig#1603 の遺伝子配列情報を、より発展的に使用するため、その全長 cDNA の分子クローニングを RACE 法により行った。その結果、1098 bp, 365 アミノ酸をコードすると推定される全長 cDNA 配列の取得に成功した。本遺伝子は、分子系統解析の結果、ケシ由来の機能未知酵素遺伝子 *DIOX4* 及び *DIOX5* と高い相同性を示すことが判明した。得られた cDNA 配列情報は、これまでにオニゲシ特異的遺伝子候補として取得している遺伝子群とともに、鑑別対象植物のオリパビン生産能の有無の評価に使用できるものと考えられた。

以上、本研究は、厚生労働省の法規制薬物行政と取り締まりに直接的に貢献する内容であり、ひいては、国民の健康・危機リスクを軽減させるものと考えられる。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

##### 【論文発表】

なし

##### 【学会発表等】

- 1) 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志: 簡易薬物スクリーニングキットを用いた危険ドラッグ成分の識別法の検討(3). 第 30 回日本中毒学会・東日本地方会(東京・2016.1.)
- 2) 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志: 簡易薬物スクリーニングキットを用いた危険ドラッグ成分の識別法の検討(2) 日本法中毒学会第 35 年会(2016.7.発表予定)
- 3) 河村 麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 前橋 恭子, 岩楯 公晴, 袴塚 高志: LC-IMS-Q-TOF-MS を用いた生体試料中危険ドラッグ成分のスクリーニングおよび定量分析 日本法中毒学会第 35 年会(2016.7 発表予定) 日本法中毒学会第 35 年会(2016.7.発表予定)

- 4) 阿久津守, 杉江謙一, 齊藤貢一: 合成カンナビノイド分析における光イオン化(PI)GC/MSの有用性の検討, 日本法中毒学会第34年会, 福岡(2015.6).
- 5) 出水庸介, 三澤隆史, 内山奈穂子, 花尻瑠理, 袴塚高志, 栗原正明: コンピュータシミュレーションによる合成カンナビノイドのCB1受容体への結合様式解析, 第59回日本薬学会関東支部大会, 千葉(2015.9).
- 6) 緒方潤, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志: DNA情報をを用いた幻覚性植物の鑑定事例, 第52回全国衛生化学技術協議会年会(2015.12)
- 7) 河野徳昭, 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 鈴木秀幸, 吉松嘉代, 川原信夫: ケン属植物の網羅的な発現遺伝子情報を利用した鑑別法の開発, 日本生薬学会第62回年会, 岐阜(2015.9)



分担研究課題:法規制薬物(植物を含む)の分析と鑑別に関する研究

研究分担者:内山奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—法規制薬物の TLC 及び呈色試薬による識別法(2)—

研究要旨: 国内(外)流通危険ドラッグ製品中から, 合成カンナビノイドやカチノン類の他に, これまでにフェネチルアミン類, フェンタニル類などの構造類似体が多数検出されているが, これに加えて近年新たに, ベンゾジアゼピン系向精神薬やモダフィニル(向精神薬)の構造類似体も検出されている。これまでに我々は, 近年麻薬に指定された化合物及びその構造類似麻薬を中心に, 合成カンナビノイド類, カチノン類, フェネチルアミン類, トリプタミン類, ピペラジン類, PCP 類, フェンタニル類, ケタミン類, MDMA 類及びその他の 10 群, 計 94 化合物について TLC 及び呈色試薬による分析結果を報告している。

本研究では, 麻薬, 向精神薬等法規制薬物及びその構造類似化合物として, ベンゾジアゼピン類及び関連化合物(向精神薬 10 化合物, 未規制 23 化合物), モダフィニル類:(向精神薬 1 化合物, 指定薬物 2 化合物, 未規制 2 化合物)計 38 化合物を対象とし, 3 種の展開溶媒を用いて TLC 分析を行い, 各 Rf 値を確認した。また UV 検出及び 4 種類の検出試薬(呈色試薬:ドラーゲンドルフ試薬, ヨウ化白金酸カリウム溶液, エールリッヒ試薬, ニンヒドリン試薬)による発色を確認し, 色調の差異を検討した。その結果, 今回検討した対象化合物は, TLC 分析により, 各化合物群内においては概ね良好に分離した。また, 各呈色試薬により, 構造類似化合物内で特徴的な呈色を示す事例もみられた。さらに, 今回検討した化合物群を一斉検出するには, ヨウ化白金酸試薬が適していた。従って, TLC 及び呈色試薬による分析は, 麻薬等法規制薬物を識別する際の簡易且つ迅速な予試験法として有用であると考えられる。なお, 本研究における未規制化合物とは, 麻薬及び向精神薬取締法, 覚せい剤取締法, 大麻取締法, あへん法における規制薬物, 及び医薬品医療機器等法において指定薬物として規制される薬物以外を示す。

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

ノイド, カチノン類やフェネチルアミン類の他に, 麻薬成分であるフェンシクリジン(PCP), フェンタニル, ケタミンの構造類似化合物などが検出されている。さらに平成 27 年度に行った危険ドラッグ製品の流通実態調査において, 向精神薬, 特にベンゾジアゼピン類及びモダフィニル類の構造類似体を複数検出した [1]。

A. 研究目的

近年, いわゆる“脱法ドラッグ”や“脱法ハーブ”と呼ばれる危険ドラッグ製品の流通により, これら危険ドラッグに起因すると考えられる健康被害や交通事故等が問題となっている。最近の傾向として, 国内流通危険ドラッグ製品中から, 合成カンナビ

一般的に, 法規制薬物等を正確に分析, 同定するには, GC-MS や LC-MS などの分析機器が必要となる。しかし, 様々な現場でこれら機器が設

置されているとは限らず、また一度に多量の検体を処理するには予試験法があることが望ましい。そこで、我々は迅速かつ簡易な予試験法として、TLC 及び呈色試薬による分析を行うこととした。

これまでに我々は、近年麻薬に指定された化合物及びその構造類似麻薬を中心に、合成カンナビノイド類(7 化合物)、カチノン類(麻薬 8 化合物、向精神薬 2 化合物)、フェネチルアミン類(覚せい剤 2 化合物、覚せい剤原料 1 化合物、麻薬 13 化合物)、トリプタミン類(5 化合物)、ピペラジン類、PCP 類及び関連化合物(麻薬 4 化合物、向精神薬 1 化合物、指定薬物 9 化合物、未規制 4 化合物)、フェンタニル類(麻薬 1 化合物、指定薬物 1 化合物、未規制 5 化合物)、ケタミン類(麻薬 1 化合物、指定薬物 1 化合物、未規制 4 化合物)、MDMA 類(麻薬 7 化合物、指定薬物 2 化合物、未規制 11 化合物)及びその他(麻薬 4 化合物、向精神薬 1 化合物)の 10 群、計 94 化合物について TLC 及び呈色試薬による分析結果を報告している [2-4]。

本研究では、ベンゾジアゼピン類、モダフィニル類及び関連化合物:計 38 化合物(向精神薬 11 化合物、指定薬物 2 化合物、その他 25 化合物)について、TLC 分析を行い、Rf 値を確認した。また 4 種類の検出試薬(呈色試薬)による発色を確認した。なお、本研究における未規制化合物とは、麻薬及び向精神薬取締法、覚せい剤取締法、大麻取締法、あへん法における規制薬物、及び医薬品医療機器等法において指定薬物として規制される薬物以外を示す。

## B. 研究方法

### 1. 試料及び試薬

向精神薬、指定薬物など法規制薬物及びその構造類似化合物として、国立医薬品食品衛生研究所にて所有する、ベンゾジアゼピン類及び関連化合物(向精神薬 10 化合物、未規制 23 化合物)、モダフィニル及び関連化合物(向精神薬 1 化合物、指定薬物 2 化合物、その他 2 化合物)の計 38 化

合物を対象とした。各化合物のメタノール溶液(1 mg/mL)を試験に使用した。

### (A) ベンゾジアゼピン類(17 化合物)

Diazepam, Oxazepam, Bromazepam, Ethyl Loflazepate, Phenazepam, 3-Hydroxy phenazepam, Diclazepam, Flubromazepam, Delorazepam, Pivoxazepam, Clonazepam, Flunitrazepam, Nifoxipam, Meclonazepam, Cloniprazepam, Bentazepam, Oxazolam

### (B) トリアゾロベンゾジアゼピン類及びイミダゾロベンゾジアゼピン類(12 化合物)

Alprazolam, Midazolam, 4-Hydroxyalprazolam, Flubromazolam, Pyrazolam, Clonazolam, Adinazolam, Brotizolam, Etizolam, Metizolam, Deschloroetizolam, Flumazenil

### (C) その他(4 化合物)

Olanzapine, Clozapine, Clozapine N-oxide, Carbamazepine

### (D) モダフィニル類(5 化合物)

Modafinil, Fluoromodafinil, Adrafinil, Fluoroadrafinil, Modafindz

なお、各化合物の構造式及び規制区分は、Fig. 1, 2 及び Table 1, 2 に記載した。

## 2. 呈色試薬

ヨウ化白金酸カリウム溶液は、10%塩化白金酸 1 mL に 4%ヨウ化カリウム 25 mL を加え、さらに水 24 mL を加えて調整した。ドラーゲンドルフ-2 試薬は、次硝酸ビスマス 0.85 g に水 40 mL と酢酸 10 mL を加えて溶解した溶液(I)、ヨウ化カリウム 8 g を水 20 mL に溶解した溶液(II)を作成し、I-II-酢酸-水混合液(1:1:4:20)を調製した。エールリッヒ試薬は、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 0.5 g をエタノール 50 mL に溶解し、塩酸 5 mL を加えて調整した。なお、ヨウ化白金酸カリウム溶液、ドラーゲンドルフ-2 試薬及びエールリッヒ試薬の調製法は、日本薬学会編「薬毒物試験法と注解 2006」に従った[5]。ニンヒドリン試薬スプレー(和光純薬)は市販品を用いた。

## 3. TLC 分析条件

### 3-1. TLC プレート

シリカゲルプレートは Silica gel 60F<sub>254</sub>, 20 cm x 20 cm (Merck 社製)を用いた。TLC プレートは使用前に 120°Cで 30 分加熱し活性化を行った。

### 3-2. 展開溶媒及び試験法

#### 【展開溶媒】

① ヘキサン:アセトン:トリエチルアミン (30:10:1)

② ヘキサン:アセトン:トリエチルアミン (10:20:1)

③ ヘキサン:アセトン (10:20)

#### 【試験法】

TLC プレートに各化合物溶液を約 10  $\mu$ L ずつ点着(約 10  $\mu$ g)し、2 種類の展開溶媒を用いて 10 cm 展開した。各プレートを風乾した後、紫外線照射(254 nm)により吸収を確認し、各化合物の Rf 値を求めた。なお、TLC プレートごとに、指標成分として Diazepam を毎回展開し、各化合物の Rf 値との相対値を算出した。溶媒①及び③で展開を行ったプレートではヨウ化白金酸カリウム溶液を噴霧し、溶媒②で展開を行ったプレートではドラージェンドルフ-2 試薬噴霧により呈色を確認した。また、プレート上に各化合物を約 10  $\mu$ g ずつ点着し、溶媒による展開を行わずに風乾後、エールリッヒ試薬添加、およびニンヒドリン試薬をスプレー後加熱してそれぞれの発色を確認した。

### C. 結果・考察

ベンゾジアゼピン類及び関連化合物(33 化合物)については、その構造から、(A) ベンゾジアゼピン類(17 化合物, **1-17**), (B) トリアゾロベンゾジアゼピン類及びイミダゾロベンゾジアゼピン類(12 化合物, **18-29**), (C) その他(4 化合物, **30-33**)の 3 つに分類した(Fig. 1, 2)。これら化合物群を 2 種の展開溶媒を用いて展開し、UV と呈色試薬を用いて Rf 値を確認した。また、化合物 **6**, **13**, **17** については、3 種類の展開溶媒を用いた。また、Diazepam (**1**)の Rf 値を指標とした相対値を併記した。結果を Table 1 及び 2 に示す。

### 1. (A) ベンゾジアゼピン類(17 化合物)

ベンゾジアゼピン類(**1-17**)は、展開溶媒①では、若干 Rf 値が若干低く、分離は良好でなかった。一方、展開溶媒②では Rf 値が 0.5-0.8 付近と若干高いものの、概ね良好に分離した(Table 1)。UV 254 nm では、全て検出可能であった。また、ヨウ化白金酸試薬で全て検出可能であり、Pivoxazepam (**10**)のみ白抜きであったが、その他は青紫色～紫色～赤紫色に呈色した。ドラージェンドルフ試薬、ニンヒドリン試薬、エールリッヒ試薬では、呈色するものとしめないものがあつたが、各試薬とも、呈色した化合物の構造的な共通点は見られなかった(Table 1)。また、また、化合物 **6**, **13**, **17** については、展開溶媒①及び②のどちらにおいても複数のスポットが検出された(Table 1)。そこで、トリエチルアミンを加えない展開溶媒③を用いて検討したところ、化合物 **6**, **17** についてはスポットが 1 つとなり、トリエチルアミンにより化合物が分解したことが原因であると考えられた(Table 1 下段)。一方、化合物 **13** については、展開溶媒③においても複数のスポットが検出されたことから、TLC での検討には注意が必要である(Table 1 下段)。

### 2. (B) トリアゾロベンゾジアゼピン類及びイミダゾロベンゾジアゼピン類(12 化合物)

本薬物群(**18-29**)は、展開溶媒①では、Rf 値が低く、何れのスポットもほぼ原点付近であつた。一方、展開溶媒②においては、Rf 値は 0.09-0.54 であり、概ね良好に分離した(Table 1)。UV 254 nm では、全て検出可能であつた。また、ヨウ化白金酸試薬で全て検出可能であり、白抜きとなるものと薄青紫色～紫色～赤紫色に呈色するものがあつた。ドラージェンドルフ試薬、ニンヒドリン試薬では、呈色するものとしめないものがあつたが、各試薬とも、呈色した化合物の構造的な共通点は見られなかった(Table 1)。エールリッヒ試薬では、チエノジアゼピン骨格の化合物(**25-28**)及び化合物 **29** は呈色しなかった。

### 3. (C) その他(4化合物)

次に、その他の化合物(30-33)については、展開溶媒①では、Rf 値が低く、何れのスポットもほぼ原点付近であった。一方、展開溶媒②での Rf 値は、化合物 32 を除き、0.3-0.7 付近であり、概ね良好に分離した(Table 2, Fig. 2)。UV 254 nm では、全て検出可能であった。また、ヨウ化白金酸試薬で全て検出可能であり、白抜きとなるものと紫色～赤紫色に呈色するものがあった。ドラーゲンドルフ試薬においても全て橙色に呈色した。ニンヒドリン試薬及びエールリッヒ試薬では、呈色するものとしなないものがあったが、各試薬とも、呈色した化合物の構造的な共通点は見られなかった(Table 2)。

### 4. モダフィニル類及び関連化合物:5化合物

次に、(D)モダフィニル類(34-38)については、展開溶媒①では、Rf 値が低く、何れのスポットもほぼ原点付近であった。一方、展開溶媒②での Rf 値は、化合物 36 及び 37 を除き、0.3-0.4 付近であり、概ね良好に分離した(Table 2, Fig. 2)。UV 254 nm では、全ての化合物の検出が困難であった。また、ヨウ化白金酸試薬は、全ての化合物が紫色に呈色したが、後に退色した。ドラーゲンドルフ試薬においては、何れも呈色しなかった。ニンヒドリン試薬及びエールリッヒ試薬では、呈色するものとしなないものがあったが、呈色した化合物の構造的な共通点は見られなかった。エールリッヒ試薬では、NH-OH 構造を有する化合物(36, 37)は呈色した(Table 2)。以上、モダフィニル類の検出には、ヨウ化白金酸試薬が共通した呈色反応を示し、識別に有用であると思われる。

### D. 結論

本研究では、麻薬、向精神薬等法規制薬物及びその構造類似化合物として、ベンゾジアゼピン類及び関連化合物(向精神薬 10 化合物、未規制 23 化合物)、モダフィニル類:(向精神薬 1 化合物、指定薬物 2 化合物、未規制 2 化合物)計 38 化合

物を対象とし、3種の展開溶媒を用いてTLC分析を行い、各Rf値を確認した。またUV検出及び4種類の呈色試薬による発色を確認し、色調の差異を検討した。その結果、今回検討した対象化合物は、TLC分析により、各化合物群内においては概ね良好に分離した。また、各呈色試薬により、構造類似化合物内で特徴的な呈色を示す事例もみられた。さらに、今回検討した化合物群を一斉検出するには、ヨウ化白金酸試薬が適していた。以上、TLC及び呈色試薬による分析は、法規制薬物等を識別する際の簡易且つ迅速な予試験法として有用であることが示唆された。また、GC-MSやLC-MSの分析データとともに、TLC分析データを包括的に蓄積、整備することは、法規制薬物等の識別法を検討する際に有用であると考えられる。

### 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政策研究事業)「危険ドラッグ等に関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究」平成27年度研究分担報告「平成27年度入手危険ドラッグ製品中の新規流通危険ドラッグ成分の同定(2)」(内山奈穂子)
- 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)「乱用薬物の鑑別法に関する研究」平成25年度研究分担報告「麻薬類のTLC分析による鑑別法」(花尻(木倉)瑠理)
- 3) 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政策研究事業)「乱用薬物の鑑別法に関する研究」平成26年度研究分担報告「法規制薬物のTLC及び呈色試薬による鑑別法」(内山奈穂子)
- 4) 河村 麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 内山奈穂子, 最所 和宏, 緒方 潤, 合田幸広, 袴塚 高志: 薬毒物試験法 II-6. 大麻試験法 6・2 カンナビノイド受容体作動薬 2. アミノアルキル