

201523001B

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 25 年度～27 年度 総合研究報告書

(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 25 年度～27 年度 総合研究報告書

乱用薬物の鑑別法に関する研究

## 目次

I. 総合研究報告	
乱用薬物の鑑別法に関する研究	
内山 奈穂子	..... 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 19
III. 研究成果の刊行物・別刷り	..... 23

## 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,合成カンナビノイド類,カチノン類,ベンゾジアゼピン類ほか,計132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最も広範囲で一斉検出するには,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イムノアッセイキットを用いて,法規制薬物及び未規制薬物(計210化合物)を対象として検出法を評価した結果,複数薬物同時検出可能な2種のキットを含め,各検出キットにおいて,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,危険ドラッグ製品について検討したところ,対象薬物含有製品のみが陽性であったことから,製品自体への応用も可能であると考えられた.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類,フェンタニル類等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.麻薬として規制された合成カンナビノイド4化合物及び類似構造を有する指定薬物6化合物を対象として,呈色試験,TLC,GC/MS,LC/MS等による試験法をまとめた.本試験法は,日本薬学会環境衛生化学部会薬毒物試験法委員会に「II-6.大麻試験法 6.2 カンナビノイド受容体作動薬 2. アミノアルキルインドール類(ナフトイルインドール類)」として提出し,委員会による審議後,日本薬学会第134年会において試験法案として提示された.

法規制薬物の生体試料分析に関しては,危険ドラッグ(脱法ハーブ)が関与したと考えられる救急搬送1事例において,患者の所持製品及び血清試料から,合成カンナビノイド5F-QUPIC及びカチノン系化合物 $\alpha$ -PHPPが検出された.5F-QUPICは,平成24年度後半から25年度前半に危険ドラッグ製品中から多く検出され健康被害も報告された化合物であり,平成26年に麻薬として規制された.

その他、危険ドラッグが関与すると考えられている死亡事例を分析した結果、4 事例のうち、1 事例においては1 種類の合成カンナビノイド及びその代謝物 5 化合物が検出され、残りの 3 事例からは、薬理作用が異なる複数の危険ドラッグ成分が同一試料から検出された。特に2 事例からは、それぞれ 11 種類の化合物(及び代謝物)が検出された。さらに別の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。さらに、麻薬取締部の協力のもと、麻薬に指定された合成カンナビノイド 7 化合物について、固相分散抽出法-GC/MS 法により、血清中の検出法の検討を行った。同法は、簡便かつ迅速な抽出法であり、ほぼ閉鎖系で抽出を行うため、実験者への感染を回避し易い安全な前処理法であった。従って、合成カンナビノイドの血中未変化体の確認試験法として有用であることが示唆された。また、指定薬物 10 物質について LC-TOF-MS による尿からのスクリーニング分析を検討した結果、正確な保持時間情報が無くても 2.5~50 ng/mL の濃度(尿中)まで検出できた。よって、尿中の指定薬物を幅広くスクリーニングできる鑑定法としての可能性が示唆された。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。また、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。

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、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(3V2Y)、アドレナリン  $\beta$ 2 受容体(4QKX)、ロドプシン受容体(1F88)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が見出せることが明らかとなった。

植物関係では、LAMP法を用いた法規制植物由来DNA (*Cannabis sativa*, *Papaver somniferum*, *Psilocybe cubensis*)の目視判定法の検討を行った。本法は分析機器を使用せず、全工程3時間程度で検出が可能であった。本法は法規制植物の簡易短時間目視判定スクリーニングの有効な手段であると示唆された。また、大麻の系統・産地識別法を目的として、DNA中のマイクロサテライト領域を利用したマイクロサテライトマーカー解析、RAMS解析を行った。マイクロサテライトマーカー解析では17種のマーカーを作成し、大麻32サンプルのDNA多型解析を行い、系統・異同識別に有効であることが示唆された。また、RAMS解析で複数のプライマーを併用することで異同識別が可能であると考えられた。さらに、マジックマッシュルームのDNA分析法を検討し、菌糸体、子実体両検体からの分析が可能であり、Psilocybin, Psilocinも両検体から検出可能であった。また、オニゲシを主な研究対象植物として次世代シーケンサーを用いた *de novo*トランスクリプトーム解析・ESTライブラリー構築を行い、テバインからコデインまたはオリパピンを経てモルヒネへの変換に関わる酵素遺伝子に相同な遺伝子配列

を取得した。そのうちのオニゲシにおいて発現量が高い4遺伝子の中でcontig #1603より作成された特異的プライマーを用いたPCR法はオニゲシ特異的な遺伝子鑑別が可能なが示された。さらに、本遺伝子の塩基配列情報は、発現解析による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。

【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

河村 麻衣子:国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部

【研究分担者】

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

【研究協力者】

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

津村 ゆかり:東海北陸厚生局麻薬取締部  
鑑定課鑑定課長

城 克己:近畿厚生局麻薬取締部  
厚生労働技官

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

林田 真喜子:日本医科大学法医学教室

A. 研究目的

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。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。

(1) 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。(2) 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 を用いたヒト生体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、固相分散抽出-GC-MS 法によるヒト血清中の合成カンナビノイドの分析法を検討した。また、2014年4月に使用罪が新設された指定薬物について、尿中の指定薬物を幅広くスクリーニングできる鑑定法として、LC-TOF-MS を用いて精密質量から尿中の指定薬物をスクリーニングする方法を検討した。また、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、その有用性について検討した。また、覚醒剤の類似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、その有用性の評価を行った。(3) 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。

(4) 植物関係では、乱用薬物、特に法規制植物の DNA を用いた識別法に関する研究として、大麻草、ケシの簡易迅速鑑定法の開発を試みた。そこで、PCR 装置、分析機器を用いない目視判定による検出法として Loop-Mediated Isothermal Amplification method (LAMP 法)による簡易迅速分析法を検討した。また、大麻草については、日本国内違法流通大麻草(種子)、自生大麻草(種子)の系統・異同識別法の開発として DNA 中のマイクロサテライト領域を用いた分析・鑑別法を検討した。さらに、麻薬原料植物である幻覚性きのこ、いわゆる“マジックマッシュルーム”に関して、培養を行い子実体形成による“きのこ”の確認手法を確立し、その DNA 分析による同定、鑑定法について検討し、マジックマッシュルームの簡易迅速分析法として上記 LAMP 法の適用を試みた。(5) モルヒナンアルカロイドの一種であるオリパピンは、「麻薬及び向精神薬取締法」「麻薬、麻薬原料植物、向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令」により、その所持、使用等が規制されている。一方、このオリパピンはケシ属植物の一種であるオニゲシのアルカロイド成分であるが、現在のところオニゲシは法規制の対象とはなっていない。本研究においては、オニゲシを主な研究対象植物として、オニゲシと近縁のケシ属植物との遺伝子レベルでの簡便な鑑別法を確立することを目的とする。

## 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

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、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, ケタミン類及び MDMA 類, ベンゾジアゼピン類, モダフィニル類及びその他, 計 132 化合物を対象として, TLC 分析を行い, Rf 値及び呈色試薬による発色を確認した. また UV 検出及び 5 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, マルクス試薬, ニンヒドリン試薬, エールリッヒ試薬)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

本研究では, 8 種類の法規制薬物それぞれを検出対象とした, 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イムノアッセイキット(計 10 キット)を用いて, 法規制薬物及び未規制薬物(計 210 化合物)【合成カンナビノイド: 39 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, ベンゾジアゼピン類及び関連化合物: 36 化合物, フェンタニル類: 7 化合物, ケタミン類: 6 化合物, PCP 類: 10 化合物, MDMA 類: 24 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. さらに, 危険ドラッグ製品についても, 検討を行った. 本キットは, 本来尿試料中の対象薬物の検出を目的として用いるが, 本研究では, 化合物本体および製品について, 各キットでの検出法を検討した.

#### 1-3) アミノアルキルインドール(ナフトイルインドール)構造を有する麻薬の分析法について

ナフトイルインドール骨格を有するカンナビノイド受容体作動薬のうち, 麻薬として規制された 4 化合物: JWH-018, JWH-122, AM2201, MAM-2201 及びそれらと類似の構造を有する指定薬物 6 化合物の計 10 化合物を対象として, GCMS, LCMS による試験法をまとめた.

## 2. 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究

### 2-1) “脱法ハーブ”喫煙ヒト生体試料中違法ドラッ

グ成分の定量分析

“脱法ハーブ”が関与したと考えられる救急搬送 1 事例において, 生体試料中含有薬物の検討及び, 搬送患者が所持していた“脱法ハーブ”製品の抽出物を GC-MS 及び LC-MS で測定した. 生体試料(血清)は, LC-MS/MS MRM でスクリーニング分析を行うと共に, 未変化体及び代謝物の定量分析を行った.

### 2-2) 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

危険ドラッグが関与したと考えられている死亡事例 4 件(2013~2014 年前半, Case 1~Case 4)の血清及び尿試料, さらに別の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. 我々が構築した 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 を用いて検出した血清及び尿試料中危険ドラッグ成分および代謝物等の定量分析を行った.

### 2-3) 固相分散抽出-GC/MS 法によるヒト血清中合成カンナビノイドの分析法の検討

麻薬に指定されている合成カンナビノイド類をヒト血液に添加し, 試料の前処理として固相分散抽出法(SPDE 法)法を選択し, SPDE -GC/MS 法による合成カンナビノイド類の検出法の適用性を検討した.

### 2-4) 尿中指定薬物の鑑定試験法に関する検討

保持時間情報を用いずに精密質量のみで尿中の指定薬物をスクリーニングする方法を検討した. 対象とした指定薬物として 10 物資を選択した. 分析手順は, まず, 尿の除タンパクのみを行う簡単な前処理の後に LC-TOF-MS を行い, 検出された物質の精密質量から指定薬物に該当するものを検索することとした. その後に尿をアルカリ性の条件で抽出して GC-MS を行い, LC-TOF-MS で検出された指定薬物の有無を確認することとした.

### 2-5) 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。(倫理面の配慮)

上記2-1)~2-5)の研究は、国立医薬品食品衛生研究所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。

### 2-6) 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。

## 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

研究は、1) 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、2) CB1 受容体と相同性の高い S1P 受容体 (PDB:3V2Y)、アドレナリン β2 受容体 (PDB:4QKX)、ロドプシン (PDB:1F88) をそれぞれテンプレートとした CB1

受容体の立体構造の構築、3) リガンド結合領域の探索、および、4) モデル構築した CB1 受容体 (CB1\_3V2Y, CB1\_4QKX, CB1\_1F88) と様々な CB1 リガンド (69 種類) のドッキングシミュレーション、にわけて遂行した。これらの計算は、MOE (Molecular Operating Environment; CCG 社) を用いて行った。

## 4. DNA を用いた法規制植物の識別法に関する研究

### 4-1) 法規制植物の LAMP 法を用いた簡易検出法の詳細検討

*Cannabis sativa* および *Papaver somniferum* の種特異的 DNA 塩基配列中の 6 ヶ所をターゲットとして、プライマーを設計し、等温での標的 DNA の増幅が可能である Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用い、検出は、反応溶液中の Hydroxynaphthol Blue (HNB) を用いた比色検出法を採用し、法規制植物の簡易検出法を検討した。実験試料は、医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター筑波研究部から分譲された大麻種子 (トチギシロ)、ケシ種子および“脱法ハーブ”製品 (平成 24 年度分析品) から分離・同定したウスベニタチアオイ (マシュマロウ) の種子より発芽させた葉 (乾燥) を使用した。また、精度向上を目的として、HNB に代わる指示薬の検討として、Chlorophosphonazo-III (C-III)、BT、XO、XB-I の 4 種の比色試薬・金属指示薬を検討した。また、DNA 量における反応性の検討として、異種植物混合試料からの DNA 抽出を行った。大麻およびウスベニタチアオイの植物片量を変え、サンプルごとに DNA を抽出し、目視判定検出限界を検討した。また、試料中の DNA 濃度も検討した。さらに、麻薬原料植物である *Psilocybe cubensis* の種特異的 DNA 領域を標的とし、各々 3 種類の LAMP プライマーを設計し、同様に LAMP 法による簡易分析法を検討した。

### 4-2) 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。

#### 4-3) “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4-2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。

#### 4-4) 大麻種子 1 粒からのマイクロサテライトマーカを用いた識別法の検討

実験材料として医薬基盤・健康・栄養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および日本国内繊維用栽培種トチギシロ種子、厚生労働省麻薬取締部より分与された海外大麻種子を用い、各種子 1 粒を用い DNA を抽出・精製した。各大麻特異的マイクロサテライトマーカに蛍光色素をラベルし、PCR 反応を行った。反応産物は ROX dye Size Standard とともに ABI Prism 3100-Avant Genetics Analyzer (ABI)でキャピラリー電気泳動を行い、各反応産物のサイジングを行い、GeneMapper v4.1 ソフトウェアによるマイクロサテライト解析を行った。

#### 4-5) 大麻種子 1 粒からの RAMS 法を用いた識別法の検討

医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源

研究センター筑波研究部より分与され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 (random amplified microsatellites)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、多型の解析を行った。

### 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

ケシ属植物から total RNA 調製し、得られた total RNA 溶液は-80°Cで保存し、かずさ DNA 研究所に輸送した。トランスクリプトーム解析は、かずさ DNA 研究所において実施した。オニゲシより構築した EST ライブラリーより、テバインからオリパビンへの変換に関わると推定される、2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase (ODDs) 酵素遺伝子の相同遺伝子を探索した。オニゲシ EST ライブラリー及びトランスクリプトーム情報の解析結果から、ケシと比較し、オニゲシにおいて高発現していると推定される contig を選択し、これらについてゲノム DNA を PCR 増幅するためのプライマーを設計した。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 の全長 cDNA 配列の取得を行った。

### 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

今回検討した対象 132 化合物(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, ケタミン類及び MDMA 類, ベンゾジアゼピン類, モダフィニル類及びその他)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(ドラーゲンドルフ試薬, ヨウ化白金酸カリウム溶液, マルキス試薬, ニンヒドリン試薬, エールリッヒ試薬)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, 各化合物群により, 検出に適する呈色試薬が異なることが示されたが, 今回検討した化合物群を最も広範囲で一斉検出するには, 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

8 種類の法規制薬物を対象薬物とした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 210 化合物)について検討した結果, 合成カンナビノイド及び MDMA 類は約 3 割, ケタミン類は 5 割, アンフェタミン類, メタンフェタミン類及びフェンタニル類は約 7 割, ベンゾジアゼピン類は約 8 割が陽性であった. また, PCP 類は全 10 化合物が陽性であった. また, カチノン類については, メタンフェタミン検出キットを用いたところ約 3 割が陽性であった. フェネチルアミンは 1 化合物のみが陽性であった. 検出限界濃度については, フェンタニル類が 1~250 ng/mL と最も低濃度範囲で検出されたが, その他の薬物群の多くは, 0.5~10 µg/mL の範囲内であった. また, 複数薬物同時検出可能な 2 種のキットを含め, 各検出キットにおいて, 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, これら薬物群は, 使用した各キットにより検出結果が多少異なった. 危険ドラッグ製品については, 対象薬物含有製品のみが陽性であったことから, 製品自体への応用も可能であると考えられた.

#### 1-3) アミノアルキルインドール(ナフトイルインドール)構造を有する麻薬の分析法について

GC-MS 分析に関しては, 微極性キャピラリーカラム DB-5MS を用いた分離条件で, 分析対象とした 10 種類のナフトイルインドール類は, 一部を除きおおむね良好に分離した. LC-MS 分析に関しては, ODS カラムを用いた, ギ酸-アセトニトリ

ルを移動相としたグラジエント分析条件において, 分析対象 10 化合物のピークトップ分離が可能であった.

## 2. 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究

### 2-1) “脱法ハーブ”喫煙ヒト生体試料中違法ドラッグ成分の定量分析

“脱法ハーブ”が関与したと考えられる救急搬送 1 事例において, 患者が所持していた製品から, 合成カンナビノイド 5F-QUPIC 及びカチノン系化合物  $\alpha$ -PHPP が検出された. 患者血清試料からは, 未変化体 5F-QUPIC,  $\alpha$ -PHPP と共に, 5F-QUPIC 3-carboxyindole 体が検出された. 5F-QUPIC は, 平成 24 年度後半から 25 年度前半に違法ドラッグ製品中から最も多く検出され健康被害も報告された化合物であり, 既に麻薬として規制されているが, 今後もその流通・乱用を注視していくべき化合物であると考えられる.

### 2-2) 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) から得た血清及び尿試料について分析した結果, Case 1 では 10 種類のカチノン系化合物及びオピオイド受容体アゴニスト AH-7921 を検出した. Case 2 においては合成カンナビノイド 5F-QUPIC 及びその代謝物 5 化合物が検出された. Case 3 は, 3 種類のカチノン系化合物, 合成カンナビノイド 5F-QUPIC とその代謝物 3 化合物を検出した. Case 4 では, NMDA 受容体アンタゴニスト Diphenidine, カチノン系 8 化合物, 合成カンナビノイド 5F-AB-PINACA 及び代謝物 2 化合物, フェネチルアミン系化合物 5-APDB と, 作用の異なる化合物群が混在して検出された.

さらに別の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は, Case 1 はカチノン類  $\alpha$ -PHP 及び合成カンナビノイド 5F-QUPIC の代謝物を検出した. Case 2 では, Diphenidine,  $\alpha$ -PHP, 5-APDB, 2-EAPB,

Acetylfentanyl, 5F-AB-PINACA 及びその 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 及び 6 代謝物の他, Carbamazepine 及び 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 を検出した. その他に Fentanyl (麻薬) 及び代謝物の 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.

#### 2-3) 固相分散抽出-GC/MS 法によるヒト血清中合成カンナビノイドの分析法の検討

血清試料中の合成カンナビノイド 7 化合物について固相分散抽出法の適用性を検討した結果, 固相分散抽出法-GC/MS 法は, 簡便かつ迅速な抽出法であり, ほぼ閉鎖系で抽出を行うため, 実験者への感染を回避し易い安全な前処理法であった. また同法による検出限界 (S/N>3) は, 2.5 ng/mL (JWH-018, JWH-122, CCH, XLR11, AM2201) 及び 5.0 ng/mL (JWH-073, MAM-2201) で, 定量下限 (S/N>10) は, 5.0 ng/mL (JWH-018, JWH-122, CCH, XLR11, AM2201) 及び 10.0 ng/mL (JWH-073, MAM-2201) であった.

#### 2-4) 尿中指定薬物の鑑定試験法に関する検討

LC-TOF-MS を用いて精密質量から薬物をスクリーニングし, その結果を GC-MS により確認する一連の方法の構築を試みた. 種々の系統から選んだ指定薬物 10 物質について検討した結果, LC-TOF-MS においてピーク高さ 6000 count 以上, 質量誤差 10 ppm 以下, 安定同位体比 score 40 以上の条件を設定することで, 尿中薬物濃度として 2.5~50 ng/mL の検出下限値を得ることができた. ボランティア尿 3 検体を測定した結果, この条件において得られる尿成分由来の擬陽性ピーク (一般的な尿成分と考えられるものを除く) の数は

3~10 本であり, LC における保持時間及び GC-MS による確認試験で陽性の疑いを排除できる数に留まった. 本法は尿中指定薬物のスクリーニング分析に適用可能と考えられた.

#### 2-5) 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.

#### 2-6) 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, メチルピ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。

### 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

CB1 受容体のアミノ酸配列と 20%以上の相同性を持つGPCRのなかで、S1P受容体(3V2Y)、アドレナリン β2 受容体(4QKX)、ロドプシン受容体(1F88)をテンプレートとしてCB1受容体のモデル構築(CB1\_3V2Y, CB1\_4QKX, CB1\_1F88)をおこなった。モデル構築した3種類のCB1受容体は、それぞれのテンプレート構造と良い一致を示した。次いで、それぞれのCB1受容体に対しリガンド結合領域の探索をおこなった結果、CB1\_3V2YとCB1\_4QKXのポケットサイズはほぼ同じであったが、CB1\_1F88はCB1\_3V2Y, CB1\_4QKXよりも広い疎水性空間を持っていた。探索したリガンド結合領域におけるCB1リガンド(69種類)の安定配座探索をおこなった結果、リガンドの多くは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。モデル構築した3種類のCB1受容体(CB1\_3V2Y, CB1\_4QKX, CB1\_1F88)と各リガンドの結合エネルギー(E<sub>refine</sub>)を比較した結果、ほとんどが-46~-36間(CB1\_3V2Y), -43~-30間(CB1\_4QKX), -26~-22間(CB1\_1F88)に収まっていた。CB1\_1F88に関しては、リガンドの結合エネルギーと活性の間に顕著な相関を見出すことができなかった。一方で、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における結合エネルギーが低く見積

もられていることもあり、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) 法規制植物のLAMP法を用いた簡易検出法の詳細検討

*Cannabis sativa*, *Papaver somniferum* および *Psilocybe cubensis* 各々について設計したLAMPプライマーを用いて、LAMPによる検出を検討した。その結果、それぞれの特異的LAMPプライマーからDNA増幅が確認された。また、DNA増幅に伴う反応副産物であるピロリン酸の増加に伴うHNBの色調が変化(青紫→青)することを確認した。今回行ったLAMPによる一連の実験系は、DNAの抽出に1時間、調整、酵素反応に2時間と、全工程3時間程度で検出が可能であり、大量生産される“脱法ハーブ”製品中の法規制植物の混入の有無の簡易スクリーニング法として有効な手法であることが示唆された。また、反応指示薬としてHNB以外にBTも有効であることが明らかとなった。以上の結果から、法規制植物の迅速簡易分析法としてLAMP法は有効であることが示唆された。

#### 4-2) 違法ドラッグ製品“菌床”の基原種同定

菌床より菌糸を剥離し、DNAを抽出した。

菌類の鑑別・同定に用いられるITS+Large Subunit領域を増幅後、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。DNAは良好に抽出・精製された。供試した4検体の塩基配列はすべて一致した(解析塩基数1551)。また、データベースとの配列比較の結果 *Psilocybe cubensis* と100%一致した(1551/1551)。このことから本菌は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が示唆された。

#### 4-3) “菌床”の培養と子実体の形成およびPsilocybin, Psilocinの定量

違法ドラッグ製品からの菌分離・再培養では、子実体形成培地への移植後、開放系培養開始 20 日目で子実体の形成が確認された。本実験で得られた子実体より DNA を調製し、4-2 の方法で、解析した結果、いずれの塩基配列も、*Psilocybe cubensis* 配列と一致した。Psilocybin, Psilocin の分析では、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。以上の結果から、菌糸からの子実体形成法を確立し、本菌がマジックマッシュルームであることを DNA 分析ならびに成分分析から明らかにした。

#### 4-4) 大麻種子 1 粒からのマイクロサテライトマーカーを用いた識別法の検討

海外で嗜好目的として販売されている大麻種子 16 サンプル、日本国内で隔離栽培された系統保存用の大麻 2 種 (メキシコ産系統種子集団 8 サンプル, トチギシロ集団 8 サンプル), 計 32 サンプルを用い、マイクロサテライトマーカーを利用した遺伝的多様性 (多型) を調査し、系統識別の可能性を検討した。用いた 17 マーカー (うち 7 マーカーは本研究で作成) による分析において 32 サンプル全てで同一の多型を示すものは見られなかった。また、同一集団内 (メキシコ産系統種子集団 8 サンプル, トチギシロ集団 8 サンプル) での多型の類似性も確認された。以上のことから、マイクロサテライトマーカーを用いた大麻集団識別法は有効な手段であり、大麻の異同識別や系統識別に効力があるものと示唆された。

#### 4-5) 大麻種子 1 粒からの RAMS 法を用いた識別法の検討

RAMS 解析では、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。複数のプライマーを組み合わせることで異同識別法になることが明らかとなった。本法は上記マイクロサテライトマーカー (4-4) とは異なりキャピラリーシーケンサーを必要としない簡易な手法であり、迅速分析・簡易分析として効力を発揮するものと考えられた。

## 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

ケシ属植物のトランスクリプトーム解析では、ケシ属植物無菌培養物の total RNA を調整し、次世代シーケンサー用サンプルとして、HiSeq1500 (illumina) による Paired-End 100 bp の run を行い、EST データ, contig データ, RPKM 値データ, blastx による機能アノテーションデータの各種データを取得した。オニゲシより構築した EST ライブラリーより、*ODDs* 酵素遺伝子の相同遺伝子を探索し、計 16 個の contig が抽出された。オニゲシにおいて発現量が高く、ケシにおける発現量との差が大きい、#25434, #1495, #17742, #1603 の 4 contig について以降の解析を進めた。オニゲシの遺伝子鑑別用プライマーの開発として、#17742 の contig 配列を元に、配列中 3 か所の増幅領域を設定し、それぞれを増幅するプライマーを設計し、オニゲシとケシのゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。その結果、2 つのセットがオニゲシのみに特異的なバンドを与えることが判明した。続いて #1495, #1603, #25434 の 3 contig について、それぞれ特異的な PCR プライマーを設計し、これらを用いそれぞれに対応するオニゲシのゲノム DNA の増幅を試みた。その結果、先に検討した #17742 に加え、#1495, #1603 の 2 contig 特異的プライマーにおいて特異的とみられる増幅産物が得られた。以上のように、ケシと比較してオニゲシにおいて発現量が高いと推定された contig の塩基配列情報を元に、オニゲシに特異性の高いプライマーの設計に成功した。さらに、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を行い、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分子系統解析の結果、オニゲシ由来 *contig* #1603 は、機能未同定の酵素遺伝子 *DIOX4* 及び *DIOX5* と近縁であることが判明した。

#### 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。

### 1. 法規制薬物(植物を含む)の分析及び鑑別に関する研究

#### 1-1) 法規制薬物の TLC 及び呈色試薬による識別法

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、合成カンナビノイド類、カチノン類、フェネチルアミン類など 11 種類)計 132 化合物について、TLC 分析、UV 検出及び5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。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。

#### 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

さらに 8 種類の法規制薬物を対象薬物とした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 210 化合物)を対象として検出法を評価した結果、複数薬物同時検出可能な 2 種のキットを含め、各検出キットにおいて、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、危険ドラッグ製品について検討したところ、対象薬物含有製品のみが陽性であったことから、製品自体への応用も可能であると考えられた。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類、フェンタニル類等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。

#### 1-3) アミノアルキルインドール(ナフトイルインドール)構造を有する麻薬の分析法について

近年麻薬として規制された合成カンナビノイド 4 化合物及びそれらと類似の構造を有する指定薬物 6 化合物を対象として、呈色試験、TLC、GC/MS、LC/MS 等による試験法をまとめた。なお、本試験法は、日本薬学会 環境衛生化学部会 薬毒物試験法委員会に「II-6. 大麻試験法 6・2 カンナビノイド受容体作動薬 2. アミノアルキルインドール類(ナフトイルインドール類)」として提出したものであり、委員会において審議された後、日本薬学会第 134 年会において試験法案として提示された。

### 2. 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究

#### 2-1) “脱法ハーブ”喫煙ヒト生体試料中違法ドラッグ成分の定量分析

“脱法ハーブ”が関与したと考えられる救急搬送 1 事例において、患者が所持していた製品から、合成カンナビノイド 5F-QUPIC 及びカチノン系化合物  $\alpha$ -PHPP が検出された。患者血清試料からは、未変化体 5F-QUPIC、 $\alpha$ -PHPP、5F-QUPIC 3-carboxyindole 体が検出された。5F-QUPIC は、平成 24 年度後半から 25 年度前半に違法ドラッグ製

品中から最も多く検出され健康被害も報告された化合物であり、既に麻薬として規制されているが、今後もその流通・乱用を注視していくべき化合物であると考えられる。

## 2-2) 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

危険ドラッグが関与すると考えられている死亡事例を分析した結果、4事例のうち、1事例においては1種類の合成カンナビノイド及びその代謝物5化合物が検出され(< 444 ng/mL)、残りの3事例からは、薬理作用が異なる複数の危険ドラッグ成分が同一試料から検出された。特に2事例からは、それぞれ11種類の化合物(及び代謝物)が検出され(< 1048 ng/mL)た。また、別の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)検出された。以上、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。

## 2-3) 固相分散抽出-GC/MS法によるヒト血清中合成カンナビノイドの分析法の検討

麻薬に格上げ指定された合成カンナビノイド7化合物について、固相分散抽出法-GC/MS法により、血清中の検出法の検討を行った。同法は、簡便かつ迅速な抽出法であり、ほぼ閉鎖系で抽出を行うため、実験者への感染を回避し易い安全な前処理法であった。従って、合成カンナビノイドの血中未変化体の確認試験法として有用であることが示唆された。

## 2-4) 尿中指定薬物の鑑定試験法に関する検討

指定薬物10物質についてLC-TOF-MSによる尿からのスクリーニング分析を検討した結果、正確な保持時間情報が無くても2.5~50 ng/mLの濃度(尿中)まで検出できた。この条件において、3検体のボランティア尿から11~22本の擬陽性ピークが検出された。これらのピークのうち13本は一般的な尿成分であると推定され、残るピークに

についても、GC-MSによる分析及びLC保持時間情報により、指定薬物に該当するか否かの判定が可能であると考えられた。

## 2-5) 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た。従って、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。

## 2-6) 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。

## 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

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、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 GPCR を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 リガンドのドッキングシミュレーションをおこなった。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が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ュレーションの妥当性について検証する。

#### 4. DNA を用いた法規制植物の識別法に関する研究

##### 4-1) 法規制植物の LAMP 法を用いた簡易検出法の詳細検討

PCR 装置, 電気泳動装置, ゲル撮影装置など分析機器を一切使用せず, 一定温度条件のみで法規制植物の DNA 分析が可能な手法として LAMP を用いた迅速・簡易分析法の確立を行った。法規制植物 *Cannabis sativa*, *Papaver somniferum* および *Psilocybe cubensis* より各種特異的 LAMP プライマーを作成し, 全行程 3 時間, 判定結果は色調 (HNB, BT) の目視判定で行う手法を確立した。

##### 4-2) 違法ドラッグ製品“菌床”の基原種同定

違法ドラッグ製品“菌床”からの菌の DNA 分析を行った, 菌体より DNA を抽出し, 菌類の同定に利用される ITS 領域を解析した結果, 本菌はマジックマッシュルームであるミナミシビレタケ *Psilocybe cubensis* であることが示唆された。

##### 4-3) “菌床”の培養と子実体の形成および Psilocybin, Psilocin の定量

“菌床”より菌を分離・培養し, 本研究室内で子

実体(きのこ)を形成させることに成功した。本子実体より DNA を抽出・分析し本子実体は *Psilocybe cubensis* であり, 成分分析の結果, Psilocybin, Psilocin が検出された。また, 菌糸の段階であっても DNA 鑑定, Psilocybin, Psilocin の同定は可能であった。

##### 4-4) 大麻種子 1 粒からのマイクロサテライトマーカーを用いた識別法の検討

マイクロサテライトマーカー 17 種を用いたキャピラリーシーケンサーを用いた大麻の系統・異同識別法の適用を試みた。本研究で用いた大麻 32 サンプルは上記マーカーを用いることで明確な多型が検出され, 32 サンプル全て多型による分離が可能であった。

##### 4-5) 大麻種子 1 粒からの RAMS 法を用いた識別法の検討

上記マイクロサテライトマーカー(4-4)の簡易迅速分析法として RAMS プライマーによる大麻異同識別法の適用を試みた。複数の RAMS プライマーを併用することで異同識別が可能であった。ゲル電気泳動を使用する簡易法であり, マイクロサテライトマーカーと異なり, 同プライマーで様々な植物種にも適用可能である点は, 簡易法として有効な手法であると考えられた。

#### 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

ケシ属植物から次世代シーケンサー (HiSeq1500)を用い, 発現する全遺伝子の情報集積である EST (expressed sequence tag)ライブラリーを構築した。オニゲシ及びケシの *de novo* トランスクリプトーム解析情報を用い, オリパビンの生合成, とくにテバイン以降の変換に関わると推定される酵素遺伝子の配列 16 種を相同性解析等により取得した。オニゲシ特異的な遺伝子鑑別法の確立を目的とし, オニゲシにおいて発現量が高い遺伝子 4 種を抽出し, contig #1603 について特異的プ

ライマーを設計し、オニゲシと他のケシ属植物との遺伝子鑑別に使用できることが示された。さらに、contig#1603 の全長 cDNA のクローニングを行った結果、1098 bp, 365 アミノ酸をコードする全長 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。

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】

- 1) 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志: 薬物簡易スクリーニングキットを用いた危険ドラッグ成分である合成カンナビノイドの識別法の検討. 薬学雑誌, 135(3), 535-542 (2015).
- 2) 津村ゆかり: 危険ドラッグの分析. ぶんせき, 485, 195-202 (2015).
- 3) Usui, K.,\* Yamamoto, K., Shimizu, T., Biao, M., Okazumi, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Suemune, H.\* Synthesis and resolution of substituted [5]carbohelicenes, *J. Org. Chem.*, **80**, 6502-6508 (2015).
- 4) Yamashita, H., Demizu, Y.,\* Misawa, T., Shoda, T., Kurihara, M.\* Synthesis of a bis-cationic  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acid (9-amino-bispidine-9-carboxylic acid) and its effects on the conformational properties of peptides, *Tetrahedron*, **71**, 2241-2245 (2015).
- 5) Yamada, S., Kotake, Y., Demizu, Y., Kurihara, M., Sekino, Y., Kanda, Y.\* NAD-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells,

*Sci. Rep.*, **4**, 5952, DOI:10.1038/srep05952 (2014).

- 6) Demizu, Y.,\* Nagoya, S., Shirakawa, M., Kawamura, M., Yamagata, N., Sato, Y., Doi, M., Kurihara, M.\* Development of stapled short helical peptides capable of inhibiting vitamin D receptor (VDR)-coactivator interactions, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 4292-4296 (2013).
- 7) Sakakibara, N.,\* Hamasaki, T., Baba, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Irie, K., Iwai, M., Asada, R., Kato, Y., Maruyama, T. Synthesis and evaluation of novel 3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil analogs as potential anti-HIV-1 agents, *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 5900-5906 (2013).

【学会発表等】

- 1) R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, S. Kanno, T. Nagai, M. Takada, T. Mukai and Y. Goda: Determination of MAM-2201 and its metabolites in a fatal case and the binding affinities of MAM-2201 at the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. 51th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT 2013) (2013. 9, Funchal, Portugal).
- 2) S. Kanno, R. Kikura-Hanajiri, M. Sagi, T. Nagai, S. Chiba, H. Takeshita, M. Takada, M. Kawamura, Y. Goda, T. Mukai: A fatal case after smoking herb containing a synthetic cannabinoid MAM-2201. 51th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT 2013) (2013. 9, Funchal, Portugal).
- 3) 永井智紀, 花尻(木倉)瑠理, 菅野さな枝, 鷲盛久, 千葉正悦, 竹下裕史, 高田女里, 河村麻衣子, 合田幸広, 向井敏二: いわゆる「脱法ハーブ」吸入による急死の一剖検例,

- 日本法医学会(2013.6,札幌).
- 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. アミノアルキルインドール類(ナフトイルインドール類),日本薬学会第 134 年会(2014.3, 熊本).
  - 5) 緒方 潤, 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 袴塚高志, 法規制植物の LAMP を用いた簡易検出法の検討 日本薬学会第 134 年会(2014.3, 熊本).
  - 6) 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合成カンナビノイドの識別法の検討 第36回日本中毒学会(2014.7.)
  - 7) 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:合成カンナビノイドの CB1 受容体に対する結合様式解析に関する研究, 第 58 回日本薬学会関東支部大会(2014. 10, 東京).
  - 8) R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, K. Maebashi, S. Matsumoto, K. Iwadate and T. Hakamatsuka: Screening and quantitative analyses of newly-emerged psychoactive substances in 4 fatal cases using UPLC-MS/MS. TIAFT2014 (Nov. 2014, Buenos Aires)
  - 9) 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 前橋恭子, 松本紗里, 岩楯公晴, 袴塚高志:LC-MS/MS を用いたヒト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, 日本薬学会第 135 年会(2015.3, 神戸).
  - 10) 城克己, 津村ゆかり, 高木敏之:尿中危険ドラッグの抽出方法の検討, 日本薬学会第 135 年会(2015. 3, 神戸).
  - 11) 緒方 潤, 阿久津守, 河野徳昭, 吉松嘉代, 川原信夫, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志:大麻の SSR マーカーによる系統識別, 日本薬学会第 135 年会, (2015. 3, 神戸)
  - 12) 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 日本法中毒学会第 34 年会(2015.6, 福岡)
  - 13) 阿久津守, 杉江謙一, 斉藤貢一: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).
  - 14) 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).
  - 15) 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:ケシ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)
  - 16) 緒方 潤, 花尻(木倉) 瑠理, 袴塚 高志: DNA 情報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)
  - 17) 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.)
  - 18) 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(4) 日本法中毒学会第 35 年会(2016.7.発表予定)
  - 19) 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)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし