

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

法規制薬物の分析と鑑別等の手法開発に向けた研究

令和4年度 総括・分担研究報告書

(22KC1004)

研究代表者 田中 理恵  
令和5(2023)年3月

## 目次

I. 総括研究報告書		
法規制薬物の分析と鑑別等の手法開発に向けた研究		
田中 理恵	.....	1
II. 分担研究報告書		
1. 法規制薬物・植物の新規分析法の検討		
花尻(木倉) 瑠理		
超臨界流体抽出(SFE)を用いた毛髪試料中薬物の抽出法の検討		
花尻(木倉) 瑠理	.....	15
違法薬物のGC/MS分析におけるInjection Port Derivatization(IPD)TMS誘導体化の有効性に関する検討(カンナビノイド類の代謝物分析への応用)		
杉江 謙一	.....	25
2. 新規麻薬類および危険ドラッグの標品合成に関する研究		
三澤 隆史		
新規麻薬類および危険ドラッグの標品合成に関する研究		
三澤 隆史	.....	35
3. 法規制薬物及び植物の分析と識別に関する研究		
田中 理恵		
THCアナログ, THCV, THCB および THCH 含有を標榜するオイル製品中の成分の同定		
田中 理恵	.....	43

4. 法規制植物の基原種の分子生物学的同定法に関する研究 緒方 潤	
大麻テルペン合成酵素遺伝子配列情報を用いた識別法の検討 緒方 潤	..... 57
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 63

法規制薬物の分析と鑑別等の手法開発に向けた研究

研究代表者: 田中理恵 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, 様々な危険ドラッグが出現し, 令和 5 年 3 月時点で, 医薬品医療機器等法下, 指定薬物として規制されている薬物は 2420 種類となった. また, 指定薬物から麻薬に規制強化された薬物は 72 種類にも及ぶ. これら薬物は, 所持・使用が禁止されているが, 構造類似体が多く存在し, また, ほとんどの薬物において代謝物情報が未知であるため, 特に, 生体試料中薬物の鑑別は困難を極めている. 本研究は, 麻薬・向精神薬取締法, 覚せい剤取締法, 大麻取締法及びあへん法などで厳しく規制される薬物及び植物の効果的な鑑別法を薬物取締行政に提示するために, 実際に現場で法規制薬物の鑑定業務を行っている地方厚生局麻薬取締部の研究協力を得て実施する.

法規制薬物の鑑別に関する研究では, dextromethorphan (鎮咳去痰薬)もしくはエナンチオマーの levomethorphan (麻薬)を投与したラット毛髪試料等を用いて, SFE の条件検討を行い, キラルカラムを用いた LC-MS/MS による摂取識別法の検討を行った. その結果, Dextromethorphan 投与ラット毛髪実試料からの dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物の SFE 条件を検討した結果, メタノールにトリフルオロ酢酸 1%, 水 5%を添加した modifier を 50%用い, 85°Cに加温して静的抽出を 1 時間行った条件が最も適していた. ラットもしくはヒトのコントロール試料に, dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物を浸透させたモデル毛髪試料を用いて, 最適化した SFE 条件により各化合物の抽出率を検討した結果, いずれも 88-103%となり, ばらつき(RSD%)は 5.2%以下と良好な結果を示した. さらに, dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/levomethorphan 及びそれらの代謝物を SFE で抽出し, キラルカラムを用いた LC-MS/MS により分離分析を行った. その定量値を既報の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果, (+)-3-HM は 42.5%であったが, 他化合物はいずれも 60%以上であった. SFE による分析結果は塩酸メタノール溶液抽出による結果よりも低い値であったが, すべての分析対象化合物が再現性よく検出された. また, 塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要で, さらに溶媒留去, 再溶解, 固相抽出等の煩雑な操作が必要であるが, 今回検討した SFE は 1 試料につき 1 時間半程度で抽出可能であり, 煩雑な前処理も必要ない. 以上より, SFE は毛髪中の薬物及び代謝物を効率よく簡便に検出可能なスクリーニング手法として有用であると考えられた. 大麻尿試験において GC 注入口で誘導体化する Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化法の検討を行った. また, CBD 代謝物の 7-Carboxy cannabidiol (7COOH-CBD), 7-Hydroxy cannabidiol (7-OH-CBD) 及び大麻尿鑑定の主な対象物質である THC-COOH を対象物質として選択し THC-COOH と CBD 代謝物を識別可能な大麻尿試験法について検討を行った. IPD-TMS 誘導体化のための GC 注入口条件を検討したところ, 注入口温度を 250°C, スプリット比を 1 : 1 に設定し, 試料溶媒にアセトニトリルを用いる条件を設定するに至った. さらに, この条件を用いて, 従来の加熱法による TMS 誘導体化の反応性と比較したところ, IPD-TMS 誘導体化は加熱法と同等の反応効率を有することを確認し, IPD-TMS 誘導体化を用いることで試験時間を大幅に短縮可能であることが示唆された. また, IPD-TMS 誘導体化法を用いた大

麻尿試験法を設計し、各物質を 40 ng/mL 含有する尿試料を用いて添加回収試験を実施したところ、本法における各物質の回収率は 7-OH-CBD が 39.3%, 7-COOH-CBD が 47.6%, THC-COOH が 103.5%となり、低濃度の大麻尿に対しても本法は対応可能であることが示唆された。インターネット上で流通する THC アナログの含有を標榜する製品の流通実態調査を行なった結果、THC のアルキル側鎖の長さが異なる化合物が多く検出された。これら化合物を製品より単離精製し各種スペクトルデータ(GC-MS, LC-MS, NMR)を測定した。その結果、THCV の含有を標榜する製品から  $\Delta^8$ -THCV と  $\Delta^9$ -THCV, THCB の含有を標榜する製品から  $\Delta^8$ -THCB と  $\Delta^9$ -THCB と、THCH の含有を標榜する製品から  $\Delta^8$ -THCH と  $\Delta^9$ -THCH を同定した。 $\Delta^9$ -THC および  $\Delta^8$ -THC それぞれを効率的かつ高純度に合成できるルートの検討を行い、高純度標準品の確保を目指した。その結果、CBD を共通出発原料として、環化反応の反応条件を検討することで、100°C下では $\Delta^8$ -THC が、-40°C下では $\Delta^9$ -THC が優先的に合成されることを明らかにし、それぞれの化合物を分析用標品として提供した。また、合成化合物のコンピュータモデリングによる、カンナビノイド受容体への親和性評価を実施した。 $\Delta^8$ -THC および $\Delta^9$ -THC のコンピュータモデリング計算結果では、計算に用いた CB1 受容体-AM11542 複合体中の、カンナビノイド誘導体 AM11542 と同様に結合することが示唆された。また、CBD (-8.187 kcal/mol)と比較し、それぞれ $\Delta^8$ -THC (-8.612 kcal/mol),  $\Delta^9$ -THC (-8.736 kcal/mol)と見積もられ、 $\Delta^8$ -THC および $\Delta^9$ -THC は同程度の結合力を示すことが示唆された。

法規制植物の鑑別に関する研究では、大麻草のテルペン合成酵素遺伝子の多様性に着目し、テルペン合成酵素遺伝子の配列情報を用いた大麻種(品種, 栽培種)の判別法を検討するために遺伝子を取得し、配列情報の調査を行った。大麻 8 試料(品種, 栽培種)から 2 種のテルペン合成酵素遺伝子断片を単離し、その配列比較を行った結果、各遺伝子はイントロン領域に大きく違いが見られ、それぞれ 2 つのタイプに分離された。

以上、本研究は、厚生労働省の薬物取締行政に直接貢献する研究であり、国の乱用薬物対策に即した内容となっている。

#### 【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

三澤 隆史:国立医薬品食品衛生研究所  
有機化学部部長

緒方 潤:国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部主任研究官

#### 【研究協力者】

杉江 謙一:九州厚生局麻薬取締部  
鑑定課厚生労働技官

木口 昭夫:九州厚生局麻薬取締部  
鑑定課課長

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、様々な危険ドラッグが出現し、令和 5 年 3 月時点で、医薬品医療機器等法下、指定薬物として規制されている薬物は 2420 種類となった。また、指定薬物から麻薬に規制強化された薬物は 72 種類にも及ぶ。これら薬物は、所持・使用が禁止されているが、構造類似体が多く存在し、また、

ほとんどの薬物において代謝物情報が未知であるため、特に、生体試料中薬物の鑑別は困難を極めている。そこで、法規制薬物の鑑別法に関する研究では、主に生体試料中規制薬物及び代謝物の迅速で高感度、かつ選択性の高い鑑別法開発に焦点をあて、新規に開発された質量分析装

置等を用いた検討を行う。また、代謝情報がない規制薬物については、薬物とその代謝酵素のコンピュータモデリングを用いた代謝物予測を行い、入手困難な主要代謝物については合成を検討する。さらに、薬物が起因した救急搬送事例や死亡事例等より入手した血液、尿、毛髪等の実際のヒト生体試料を用いて、上述した分析法の有用性を評価するとともに、測定データを蓄積する。

本研究は、法規制薬物及び植物について効果的な鑑別を行うための手法を確立することを目的としており、現場の諸問題に対応できるように監視・指導麻薬対策課、麻薬取締部等と連絡を取り合いながら、実態に即した研究を行う点に特徴がある。

本研究では以下の検討を行なった。

法規制薬物の鑑別に関する研究では、dextromethorphan (鎮咳去痰薬) もしくはエンナンチオマーの levomethorphan (麻薬) を投与したラット毛髪試料等を用いて、SFE の条件検討を行い、キラルカラムを用いた LC-MS/MS による摂取識別法の検討を行った。大麻尿試験において GC 注入口で誘導体化する Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化法の検討を行った。また、CBD 代謝物の 7-Carboxy cannabidiol (7COOH-CBD), 7-Hydroxy cannabidiol (7-OH-CBD) 及び大麻尿鑑定の主な対象物質である THC-COOH を対象物質として選択し THC-COOH と CBD 代謝物を識別可能な大麻尿試験法について検討を行った。インターネット上等で流通する THC アナログの含有を標榜する製品の流通実態調査を行った結果、THC のアルキル側鎖の長さが異なる化合物が多く検出された。これら化合物を製品より単離精製し各種スペクトルデータ (GC-MS, LC-MS, NMR) を取得した。 $\Delta^9$ -THC および  $\Delta^8$ -THC それぞれを効率的かつ高純度で合成できるルートの検討を行い、高純度標準品の確保を目指した。また、合成化合物のコンピュータモデリングによる、カンナビノイド受容体への親和性評価を実施した。

法規制植物の鑑別に関する研究では、大麻草のテルペン合成酵素遺伝子の多様性に着目し、テルペン合成酵素遺伝子の配列情報を用いた大麻種 (品種, 栽培種) の判別法を検討するために遺伝子を取得し、配列情報の調査を行った。

## B. 研究方法

### 超臨界流体抽出 (SFE) を用いた毛髪試料中薬物の抽出法の検討

#### 1. 生体試料

毛髪実試料として、dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラットの毛髪試料 (5 mg/kg, 10 days, n=3) を使用した。また上記において、薬物投与前にあらかじめラット背部の毛を刈り取り、これをラットコントロール毛髪試料とした。毛髪試料は既報に従い洗浄、乾燥後、0.5 mm 程度に細片化して使用した。さらに SFE 条件検討用のラットおよびヒトのモデル毛髪試料を用意した。細片化したコントロールラット毛髪またはヒト頭髪 100 mg を、dextromethorphan および 3 代謝物 (dextrorphan, 3-MEM, 3-HM) の各 0.01 mg/mL メタノール混合溶液に浸漬し、常温で 24 時間振盪後、メタノール 20 mL を加えて 3 回洗浄し、風乾して作成した。

#### 2. SFE 条件の検討

抽出には MV-10 ASFE システム (Waters 社製) を使用し、超臨界流体には二酸化炭素を用いた。細片化した毛髪試料を正確に量り取って、海砂、脱脂綿を入れた抽出管 (2 mL) に入れ、さらに IS として levallorphan 溶液を添加して密封し、SFE システムに設置して抽出操作を行った。操作は制御ソフト (クロムスコープ) により自動化され、最大 6 試料を連続抽出可能である。1 試料につき pre run, main, post run を 1 サイクルとし、main 抽出時に modifier を添加し、dynamic (動的抽出) - static (静的抽出) - dynamic と順番に切り替えて抽出を行った。抽出液を 50 mL チューブに集め、30°C に加温して窒素吹付により乾固させた。残渣にメタノールを約 5 mL 加え、降り混ぜて溶解し、フィルタ

ろ過後に LC-MS/MS で分析を行った。

SFE の条件検討は以下の点について行った。

- ① Modifier の種類
- ② 抽出温度, 時間, modifier 添加濃度
- ③ 試料量

抽出効率の確認には, LC-MS/MS の MRM モードを用いて対象化合物の分析を行い, 試料間のピーク面積比や, 既報の塩酸メタノール溶液抽出における定量値と比較を行った。

塩酸メタノール抽出は下記の通り, 既報に従って行った。毛髪試料 10 mg に塩酸メタノール溶液および IS 溶液を加え, 1 時間超音波抽出を行った後, 一晚室温放置した。ろ過後, 窒素気流下で溶媒を乾固させ, 蒸留水に溶解後, 固相抽出 (OASIS HLB, 3cc, 60 mg, Waters) を行い, 得られたメタノール溶出液を測定試料とした。

#### 違法薬物の GC/MS 分析における Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化の有効性に関する検討 (カンナビノイド類の代謝物分析への応用)

##### 1. 試薬および試料

7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の各 1 mg/mL のメタノール溶液は Sigma Aldrich® 社製のものを使用した。N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (以下 BSTFA) は Sigma Aldrich® 社製のものを使用した。健常人尿はフナコシ (株) から購入した。その他の試薬は特級品を使用した。

##### 2. 装置及び器具

アルミブロック恒温槽 (TAITEC 社製, 型番: DTU-1CN), 10k ミニ遠心分離機 (ALLSHENG 社製, 型番: Mini-10k), Silicon Coating Tubes 2.0 mL (株) バイオメディカルサイエンス社製, 型番: bmb2200)

##### 3. IPD-TMS 誘導体化

試料液 40  $\mu$ L に BSTFA 10  $\mu$ L を添加したものを GC/MS に注入した。

##### 4. 加熱による TMS 誘導体化

試料液 40  $\mu$ L をガラスバイアルに入れ, BSTFA 10  $\mu$ L 加えた後, 80°C のアルミブロック恒温槽で 30 分間加熱した。反応後, 窒素気流により溶媒を蒸発乾固し, アセトニトリル 50  $\mu$ L に再溶解したものを GC/MS に注入した。

##### 5. 尿試料の調製方法

40 ng/mL の 7-COOH-CBD, 7OH-CBD 及び THC-COOH を含有する尿試料を調製し, 添加回収試験に使用した。尿試料 1 mL を 2 mL のマイクロチューブに入れ, 0.2 mL の 10 N 水酸化カリウム添加し, 攪拌した後, 60°C の水浴で 30 分間加熱した。加熱後, 酢酸 0.2 mL を添加し, 抽出溶媒としてヘキサン・酢酸エチル混合液 (7:1) 0.5 mL を加え, 10 秒間攪拌した後, 遠心分離 (10, 000 rpm, 10 秒間) した。遠心分離後, 上層の有機層を分取した。同様の抽出操作を都合 3 回繰り返し, 分取した有機層は一つの試験管にまとめた。分取した有機層を窒素気流により乾固した後, アセトニトリル 40  $\mu$ L で再溶解し, BSTFA 10  $\mu$ L を添加したものを GC/MS に注入した。

#### 新規麻薬類および危険ドラッグの標品合成に関する研究

合成に使用した試薬・溶媒類は試薬会社から購入したものをそのまま使用した。反応の追跡は薄層クロマトグラフィ (TLC) (Merck) にて行い, スポットの可視化は紫外線照射 (波長 254 nm), およびヨウ素蒸気または, 5w/v% リンモリブデン酸-エタノール溶液による染色にて行った。化合物精製のためのフラッシュカラムクロマトグラフィとしては, 中圧カラムクロマトグラフィ用充填カラム (Inject column / Hi-Flash column (山善)) を使用し, 検出器として UV 検出器 (254 nm) および蒸発光散乱検出器 (ELSD-100X (山善)) を備えた装置 (EPCLC-W-Prep2XY (山善)) を使用した。NMR は ECZ600 (JEOL 社) を使用し, 重クロロホルム (CHLOROFORM-D) を用いて室温にて測定した。化学シフト値 ( $\delta$ , ppm) はテトラメチルシラン (TMS, 0 ppm), もしくは溶媒シグナルを用いて補

正した。質量分析はIT-TOF MS (Shimadzu 社)あるいは Single Quadrupole Detector (SQD) (Waters 社)を使用し、エレクトロスプレーイオン化法にて測定した。化合物の純度は ACQUITY UPLC (Waters)にて測定を行った。カンナビノイドと CB1 (5XRA) のドッキングシミュレーションは、Molecular Operating Environment (MOE) 2022.02 を使用して行った。ドッキング計算は一般的なドッキングの標準プロトコルを用いて実施し、CB1-AM11542 複合体の X 線構造 (5XRA) 中の AM11542 分子をリガンド結合領域として定義した。まず London dG score でランク付けした上位 30 ポーズに対して、力場精密化を行い、その後 GBVI/WSA dG 条件で再スコア化 (Refinement: induced fit) し、5 ポーズを抽出した。得られた計算結果のうち、最もエネルギーの低いドッキングスコア (kcal/mol) 結果を比較評価に使用した。

#### THC アナログ、THCV、THCB および THCH 含有を標榜するオイル製品中の成分の同定

令和 4 年度に入手した THC アナログの含有を標榜する 4 製品について GC-MS、LC-MS 分析を行った。未知成分については、NMR の解析により同定した。

##### 1. 試料及び試薬

令和 3~4 年度に入手した THC アナログの含有を標榜するのうち 4 製品 (オイル 4 製品) を分析に供した。LC-MS の移動相に用いたアセトニトリルは HPLC グレードを使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。分析用標品としては、Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA)、Chiron (Trondheim, Norway) より購入した試薬を用いた。また、その他の化合物は、国立衛研において NMR 及び HR-MS 測定により同定したのものを用いた。抽出溶液の膜ろ過には、Ultrafree-MC (0.45  $\mu\text{m}$  filter unit, Merck MILLIPORE 社製)を用いた。

##### 2. MS 測定用試料の調製法

オイル製品は 1 mg を使用した。アセトニトリル 1 mL を加えて超音波下 10 分間抽出を行った後、

さらに膜ろ過を行い、不溶物を取り除いて測定試料とした。また、試料は適宜希釈して用いた。

##### 3. 製品からの成分の単離

製品について、40mg をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し Hex-Hex:EtoAc 50:1-40:1-30:1-1:1 で溶出して成分を単離した。

#### 大麻テルペン合成酵素遺伝子配列情報を用いた識別法の検討

分析試料として、メキシコ産系統種子 (1 粒) (M)、繊維用栽培種トチギシロ種子 (1 粒) (T)、大津産トチギシロ種子 (1 粒) (O)、大麻品種 “Hindu kush” (HK)、“MAZER” (MZ)、“Ultra skunk” (US)、“SHARMAN” (SN)、“Orange Bud” (OB) (各 1 粒)を用いた。

各果実 1 粒を用い、MM 300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した各種子は Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega) 中の溶出液に溶解し、Maxwell 16 (Promega) を用い DNA を抽出・精製した。回収 DNA 溶液各 300 mL 中の 1 mL を PCR 反応に用いた。

実験に用いたプライマーセットは Booth ら記載のものを用いた。反応溶液として、酵素には 0.05 mL Ex Taq Hot start version (Takara)、PCR 反応試薬には、5mL Ampdirect plus (Shimadzu)、各プライマー 10 pmol とし、全量 10 mL で PCR 反応を行った (95°C 3min; 98°C 10sec, 57°C 30sec, 72°C 120sec, 35cycles ; 72°C 10min)。アガロースゲル (0.8%) 電気泳動によりすべてのサンプルでバンドを確認されたもののみ、ダイレクトシーケンスを行った。ダイレクトシーケンスにより良好な結果が得られない場合は、PCR 反応溶液をポリエチレングリコール沈殿後、Mighty TA-cloning Kit (Takara) を用い、塩基配列を決定した。シーケンス反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、解析は Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer を使用した。



## C. 研究結果・考察

### 超臨界流体抽出(SFE)を用いた毛髪試料中薬物の抽出法の検討

#### 1. SFE 条件の検討

ラット毛髪実試料を用いて、dextromethorphan およびその 3 代謝物の抽出における SFE 条件を検討した。また、回収率や再現性等の検討用に、ラットおよびヒトのモデル毛髪試料を使用した。

##### ① Modifier の検討

メタノール、0.1%ギ酸添加メタノール、10mM 酢酸アンモニウム添加メタノール、アセトニトリル、アセトンの 5 種を超臨界二酸化炭素にそれぞれ 30%添加し、ラット毛髪実試料の抽出を行った。抽出物について、LC-MS/MS により測定を行い、MRM クロマトグラム上の dextromethorphan のピーク面積を算出した。Modifier としてメタノールを用いた際に得られるピーク面積値を 100 としたときの各 modifier 添加時のピーク面積比はそれぞれ 100, 100, 90, 20, 10 となり、メタノールを用いた場合に高い抽出効率が得られた。さらに、メタノールへの添加剤として、トリエチルアミン、ギ酸、トリフルオロ酢酸(いずれも 1%まで)および少量の Milli-Q 水(5%以内)を検討した結果、1%の酸および 5%の水を添加すると高い抽出率が得られた。

##### ②抽出温度、時間、modifier 添加濃度

ラットモデル毛髪試料を用いて、塩酸メタノール溶液抽出時の各化合物濃度を 100 としたときの SFE 使用時の各濃度を抽出比として評価した。ラットモデル毛髪試料 10 mg を用いて、modifier として 1% ギ酸/ 5% Milli-Q 水含有メタノール溶液を 30%添加し、抽出温度を 60°Cあるいは 80°Cとして、45 分間の抽出を同一試料で 3 回繰り返し、各抽出液中の化合物濃度から抽出率を求めた。抽出時間は、dynamic 1 min -static 45 min -dynamic 1 min で 1 回とした。その結果、60°Cでは 1 回目の抽出で 40-55%、3 回目までの合計で 58-79%の抽出率を示した。80°Cに加温した場合は、1 回目で 52-75%、合計で 76-97%と抽出率の向上が確認できた。さらに条件の最適化を行ったところ、

modifier の添加濃度を 50%、加温を 85°C、抽出時間を static 60 分間に変更したところ、1 回で 89-102%の抽出率を得ることが可能であった。

##### ③試料量

②で設定した SFE 条件でラット毛髪実試料 10 mg の分析を行ったところ、ラットモデル毛髪試料での検討結果と比較して、30 %程度低い値となった。これを改善するため、modifier の添加剤を 1%ギ酸から 1%トリフルオロ酢酸へ変更するとともに、試料量の検討を行った。その結果、実試料の試料量を 10 mg から 5 mg へと減らすことで、抽出効率をさらに高くすることが可能であった。

上記の検討結果を反映させた SFE 条件(詳細は方法項に記載)を用いて、ラットおよびヒトモデル毛髪試料を抽出した。SFE により分析を行った場合の各化合物濃度は、ラットおよびヒト試料ともに、塩酸メタノール溶液抽出における定量結果とほぼ同等であった。また、相対標準偏差(RSD %)は 5.2%以下となり、いずれも条件の最適化前と比較して改善していることが確認できた。ヒトモデル試料中の化合物濃度は、ラットと比較して 1/10 程度であったが、これはモデル毛髪試料作成時における、化合物溶液の毛髪内への浸透量の違いに起因していると考えられる。

今回、毛髪試料の SFE 条件検討において、コントロール毛髪試料に薬物溶液を浸透させたモデル毛髪試料を用いることで、化合物をコントロール試料に添加しただけの試料と比較して、より実試料に近い検討が可能であった。

#### 2. SFE を用いた毛髪定量分析

最適化した SFE 条件を用いて、ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/ levomethorphan および代謝物を抽出し、キラルカラム Chiral CD-ph column を用いた LC-MS/MS により定量分析を行った。検量線は、コントロール毛髪に化合物溶液を 0~100 ng/mg hair, IS 溶液を 5 ng/mg hair となるよう添加し、SFEによる抽出後、LC-MS/MS 分析を行い、MRM モードで作成した。真度、精度は 0.1, 10, 100 ng/mg hair (n=3)となるようコントロー

ル毛髪に化合物溶液を添加して検討した。なお、(-)-3-MEM および(-)-3-HM は、(+)-3-MEM および(+)-3-HM の検量線を用いて定量値を算出した。全化合物で検量線範囲の 1-100 ng/mg hair で良好な直線性が得られ、20%以内の真度、精度が得られた。

各濃度について、既報の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果、(+)-3-HM は 42.5%であったが、他化合物はいずれも 60%以上であった。塩酸メタノール溶液抽出と比較して、SFE の各化合物の抽出効率は低かったが、dextromethorphan および levomethorphan と共に、それぞれの 3 種類の代謝物も再現性よく検出されていた。SFE における抽出効率が低い理由のひとつとして、今回用いたラット毛髪は、洗浄・乾燥操作を行っても一定量の水分および油分が残存することから、超臨界流体で十分抽出しきれなかったことが考えられる。また、未変化体と代謝物では極性が異なり、双方の化合物の抽出に最適な条件を設定することが困難であることも考えられた。一方、既報の塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要であり、乾固後の再溶解、固相抽出等の煩雑な操作が必要であったが、今回検討した SFE による抽出は 1 試料につき 1 時間半程度で可能であった。SFE による抽出は、毛髪中の薬物および代謝物を簡便に検出可能で、毛髪中薬物のスクリーニング法として優れていると考えられた。

#### 違法薬物の GC/MS 分析における Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化の有効性に関する検討(カンナビノイド類の代謝物分析への応用)

##### 1. IPD-TMS 誘導体化における GC 注入口条件の検討

7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の IPD-TMS 誘導体化のため、GC 注入口条件を検討した。

###### 1-1. 試料溶媒の選択

溶媒は無極性溶媒のヘキサン、極性溶媒の酢酸エチル及びアセトニトリル、誘導体化試薬の BSTFA を選択した。7-COOH-CBD, 7-OH-CBD, THC-COOH について、各種溶媒を用いて 10 µg/mL の試料液を調製し、同試料液 40 µL に BSTFA 10 µL を添加したものを GC/MS で測定した結果、全ての溶媒で十分に TMS 誘導体化反応が進行し、7-COOH-CBD 及び 7-OH-CBD については TMS が 3 つ付加した 7-COOH-CBD-3TMS, 7-OH-CBD-3TMS, THC-COOH については TMS が 2 つ付加した THC-COOH-2TMS が検出された。次に各種溶媒を用いて 100 µg/mL の試料液を調製した結果、ヘキサン溶媒では 7-OH-CBD のみが誘導体化された。他方、酢酸エチル、アセトニトリル、BSTFA を溶媒として用いた場合、全ての物質の TMS 誘導体化が十分に進行した。

溶媒による IPD-TMS 誘導体化への影響は、溶媒ごとの極性が要因であると考えられた。すなわち、極性溶媒のアセトニトリル、酢酸エチルでは IPD-TMS 誘導体化が進行するが、他方、ヘキサンのような無極性溶媒は IPD-TMS 誘導体化を促進しないという性質があるものと推測された。さらに、7-OH-CBD のみ、ヘキサン溶媒で TMS 誘導体化が進行していたことから、特にカルボキシル基への IPD-TMS 誘導体化には極性溶媒が適していると考えられた。また、これら溶媒における各物質 TMS 誘導体のピーク面積を比較したところ、BSTFA を用いた際に全ての TMS 誘導体で最もピーク面積は低くなった。他方、アセトニトリルと酢酸エチルの場合、7-OH-CBD と THC-COOH の TMS 誘導体においてピーク面積に差はみられなかったが、7-COOH-CBD の TMS 誘導体においてはアセトニトリルの方がピーク面積は高くなった。

以上のことから、IPD-TMS 誘導体化における溶媒として、アセトニトリルを選択することとした。

###### 1-2. 注入口温度の設定

GC 注入口温度を 200, 220, 250, 280 及び 300°C、スプリット比を 20:1 に設定し、10 µg/mL の 7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の

アセトニトリル溶液 40  $\mu\text{L}$  に BSTFA 10  $\mu\text{L}$  を添加したものを GC/MS で測定した。その結果、全ての注入温度において、各物質の TMS 誘導体化は十分に進行し、そのピーク面積も全温度において一定であった。次にスプリット比 1:1 における GC 温度の影響について検証した結果、全物質で温度上昇によりピーク面積は上昇し、250°C 以降で一定となった。

以上のことから、上記範囲の GC 注入温度において、各物質の IP-TMS 誘導体化は十分に進行することが示唆され、スプリット比 1:1 における 7-COOH-CBD と THC-COOH のピーク面積上昇を考慮すると、GC 注入温度は 250°C 以上に設定することが望ましいと考えられた。

### 1-3. スプリット比の設定

10  $\mu\text{g/mL}$  のアセトニトリル溶液 40  $\mu\text{L}$  に BSTFA 10  $\mu\text{L}$  を添加したものを GC/MS で測定した。その際に、GC 注入温度は 250°C に設定し、GC 注入のスプリット比を 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 及び 50:1 に設定した。各スプリット比におけるカラムへの試料導入量を算出し、各物質の TMS 誘導体のピーク面積との関係を検証した。カラム導入量は試料注入量 1  $\mu\text{L}$  をカラム流量 1 mL/min と各スプリット流量の総和により除すことで算出した。その結果、カラムへの試料導入量と各物質の TMS 誘導体ピーク面積の間には強い相関関係があることが確認された。このことから、全てのスプリット比において、IPD-TMS 誘導体化の反応効率は一定であることが推測された。さらに、各スプリット比における 7-OH-CBD のピーク面積に対する 7-COOH-CBD 及び THC-COOH とのピーク面積比を検証した。その結果、スプリット比が低いほど 7-COOH-CBD/7-OH-CBD と THC-COOH/7-OH-CBD が高くなる傾向があり、7-COOH-CBD と THC-COOH は低スプリット比により感度が上昇することが確認された。これは両物質が 7-OH-CBD よりも揮発性が低く、高スプリット比ではインサート内の試料滞留時間が短く、十分に気化されていないことが原因であると考えられた。

以上のことから、IPD-TMS 誘導体化における GC 注入のスプリット比については、全ての物質がより高感度に検出可能な 1:1 に設定することとした。

### 2. IPD-TMS 誘導体化と加熱法の比較

IPD-TMS 誘導体化の有効性を検証するため、汎用される加熱法との比較を行った。各物質につき 10  $\mu\text{g/mL}$  のアセトニトリル溶液を試料液とした。加熱法については「4 加熱による TMS 誘導体化」に従い試料調製を行い、GC/MS で測定した。なお、加熱法について、試料液中の BSTFA により GC/MS 注入時に IPD が引き起こされるため、加熱反応後の反応液を一度、窒素乾固する工程を入れている。GC/MS の条件として、スプリット比を 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 及び 50:1 に設定し、各誘導体化法における各物質 TMS 誘導体のピーク面積の挙動を比較した。その結果、窒素乾固していることから、加熱法での各物質のピーク面積は IPD より若干小さくなるが、両者のピーク面積の挙動はほぼ一致していた。加熱法では全物質が TMS 誘導体化された状態で GC/MS に注入されるため、IPD と加熱法のピーク面積挙動が一致するということは、全スプリット比において IPD-TMS 誘導体化は従来の加熱法と同等の反応性を示すと考えられた。以上のことから、7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の IPD-TMS 誘導体化は従来の加熱法と同等の反応性を有し、かつ加熱法で要する 30 分の反応時間も省略できることから、各物質の TMS 誘導体化法として有用であることが示唆された。

### 3. IPD-TMS 誘導体化における検出限界、定量下限及び検出限界

設定した注入条件を用い、各物質の IPD-TMS 誘導体化における検出限界および定量下限を検証した。その際、GC/MS の測定モードは SCAN を用いた。その結果、各物質 TMS 誘導体ともに検出限界は 0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、定量下限 1  $\mu\text{g/mL}$  であった。また、1~50  $\mu\text{g/mL}$  の濃度範囲で検量線を作成したところ、全物質 TMS 誘導体につき

$r=0.999$  以上の良好な相関性が得られた。なお、本 GC 注入口条件を用いた IPD-TMS 誘導体化において、7-COOH-CBD の THC-COOH への変換は確認されなかった。

#### 4. 尿試料への IPD-TMS 誘導体化の応用

大麻尿試験への IPD-TMS 誘導体化の適応を検討するため、40 ng/mL の 7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH を含有する尿試料を調製し、添加回収試験を実施した。その際の GC 注入口条件は注入口温度を 250°C, スプリット比を 1:1 に設定した。なお、本添加回収試験において、尿中の夾雑成分の影響を避けるため GC/MS の測定モードは SIM を用いた。尿試料の測定においても IPD-TMS 誘導体化反応は進行し、7-OH-CBD, 7-COOH-CBD 及び THC-COOH の TMS 誘導体もそれぞれ分離され、識別が可能であった。また、クロマトグラム上の各 SN 比は 7-OH-CBD-3TMS が 188, 7-COOH-CBD-3TMS が 85, THC-COOH-2TMS が 143 となり 40 ng/mL と低濃度の尿試料についても良好な感度を得られた。さらに、本実験で採用した前処理法における各物質の回収率は 7-OH-CBD が 39.3%, 7-COOH-CBD が 47.6%, THC-COOH が 103.5%であった。CBD 代謝物の回収率が THC-COOH よりも低くなったのは、各 CBD 代謝物の化学構造にある2つの水酸基により、THC-COOH よりも水溶性が高くなり、液液抽出時の有機層への分配性が低下したことが要因であると考えられた。そのため、本前処理で採用した抽出溶媒については、溶媒の種類や混合比率の検討を行い、CBD 代謝物の回収率を改善する必要があると考えられた。一方、一般的に使用される大麻尿のスクリーニングキットのカットオフ値は 50 ng/mL であることを考慮すると、本試験法でも大麻尿試験に十分に対応可能であると考えられた。

以上のことから、大麻尿試験においても CBD 代謝物、THC-COOH への IPD-TMS 誘導体化は応用可能であることが示唆された。また、IPD-TMS 誘導体化を用いた各物質を識別可能かつよ

り迅速な大麻尿試験法を構築した。

#### 新規麻薬類および危険ドラッグの標品合成に関する研究

##### ・ $\Delta^8$ -THC の合成

CBD (997 mg, 3.17 mmol) のトルエン溶液 (50 mL) にパラトルエンスルホン酸一水和物 (161 mg, 0.84 mmol) を加え、100°C にて 16 時間攪拌した。反応溶媒を減圧留去した後に、水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後に濃縮し、粗精製物を得た。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $n$ -ヘキサン/トルエン = 4:1) にて精製し、 $\Delta^8$ -THC を淡茶色油状物質として得た (371 mg, 収率 37%)。

##### ・ $\Delta^9$ -THC の合成

CBD (0.944 g, 3.0 mmol) のジクロロメタン溶液 (60 mL) を -78°C に冷却し、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (555  $\mu$ L, 4.5 mmol) を加えた。反応液を -40°C に昇温し、40 時間攪拌した。反応液に、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (3 mL), 水 (20 mL) を加えて反応を停止させ、反応溶液を室温へと昇温した。生成物をジクロロメタン (20 mL) で 3 回抽出し、合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後に濃縮し、粗生成物を得た。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $n$ -ヘキサン:トルエン = 60:40-45:55) にて 2 度精製し、 $\Delta^9$ -THC を褐色油状物質として得た (0.292 g, 収率 31%)。

##### ・ コンピュータモデリングについて

$\Delta^8$ -THC および  $\Delta^9$ -THC のコンピューターモデリング計算結果では、計算に用いた CB1 受容体-AM11542 複合体中の、カンナビノイド誘導体 AM11542 と同様に結合することが示唆された。また、CBD (-8.187 kcal/mol) と比較し、それぞれ  $\Delta^8$ -THC (-8.612 kcal/mol),  $\Delta^9$ -THC (-8.736 kcal/mol) と見積もられ、 $\Delta^8$ -THC および  $\Delta^9$ -THC は同程度の結合力を示すことが示唆された。

## THC アナログ, THCv, THCB および THCH 含有を標榜するオイル製品中の成分の同定

分析を行った危険ドラッグ 4 製品から 6 種類の新規流通化合物を同定した。

製品 A は GC-MS では保持時間 8.33 分に主成分とみられる化合物 **1** のピークが検出された。LC-MS ではそれぞれ保持時間 18.2 分に  $m/z$  287  $[M+H]^+$  のピークが観測された。NMR 分析の結果、化合物 **1** は  $\Delta^8$ -THC の 3 位のアルキル側鎖がペンチルでなくプロピルである構造 (6aR,10aR)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-propyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol ( $\Delta^8$ -tetrahydrocannabivarin,  $\Delta^8$ -THCV) であると同定した。さらに GC-MS では保持時間 8.59 分に、LC-MS では保持時間 27.8 分にマイナー成分とみられる化合物 **2** のピークが検出された。LC-MS では  $m/z$  287 に  $[M+H]^+$  のピークが観測され、GC-MS で  $m/z$  286 に分子イオンも観測されたが、そのマススペクトルは化合物 **1** と異なっていた。 $\Delta^9$ -THCV の標準品と一致したため化合物 **2** は、6aR,7,8,10aR-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-propyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol (11 $\alpha$ -hexahydrocannabinol,  $\Delta^9$ -THCV) であると同定した。

製品 B は GC-MS では保持時間 9.76, 10.13 分にマイナー成分とみられる化合物 **3** と主成分とみられる化合物 **4** のピークが検出された。LC-MS ではそれぞれ保持時間 20.8, 20.3 分に  $m/z$  301 に  $[M+H]^+$  のピークが観測された。化合物 **3** と **4** の NMR 分析の結果、それぞれ  $\Delta^8$ -THC と  $\Delta^9$ -THC のアルキル側鎖がペンチルでなくブチルである構造であることがわかった。以上の結果より、製品 B に含有される化合物 **3** を *trans*-3-butyl-6aR,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol ( $\Delta^8$ -tetrahydrocannabutol,  $\Delta^8$ -THCB), 化合物 **4** を *trans*-3-butyl-6aR,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol ( $\Delta^9$ -tetrahydrocannabutol,  $\Delta^9$ -THCB) と同定した。

製品 C は主成分の CBN の他に、GC-MS では

保持時間 12.6 分、LC-MS では保持時間 28.2 分にマイナー成分とみられる化合物 **5** のピークが検出された。LC-MS では  $m/z$  329 に  $[M+H]^+$  のピークが観測され、GC-MS で  $m/z$  328 に分子イオンも観測された。化合物 **5** の NMR 分析の結果、 $\Delta^8$ -THC のアルキル側鎖がペンチルでなくヘキシルである構造であることがわかった。以上の結果より、製品 C に含有される化合物 **5** の (6aR,10aR)-3-hexyl-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol ( $\Delta^8$ -tetrahydrocannabihexol,  $\Delta^8$ -THCH) であると同定した。

製品 D は GC-MS では保持時間 13.0 分に主成分とみられる化合物 **6** のピークが検出された。LC-MS では保持時間 25.2 分に  $m/z$  329  $[M+H]^+$  のピークが観測された。NMR 分析の結果、化合物 **6** は  $\Delta^9$ -THC の 3 位のアルキル側鎖がペンチルでなくヘキシルである構造 (6aR,10aR)-3-hexyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol ( $\Delta^9$ -tetrahydrocannabihexol,  $\Delta^9$ -THCH) であると同定した。なお製品 D は主成分の  $\Delta^9$ -THCH の他に、GC-MS では保持時間 13.0 分、LC-MS では保持時間 25.8 分にマイナー成分の  $\Delta^8$ -THCH (**5**) のピークも検出された。

以上、4 種類のオイル状危険ドラッグ製品について、それぞれの成分を同定した。

## 大麻テルペン合成酵素遺伝子配列情報を用いた識別法の検討

各分析試料 (8 種) から抽出した DNA を用い、既報のプライマーセットを用い PCR を行った。すべての分析試料でバンド (PCR 産物) が同サイズで確認できたもののみ塩基配列を調べ、それらの類似性を検索した。プライマーセット CsTPS7FN および CsTPS9FN で、すべての試料から産物が得られた。CsTPS7FN で得られた PCR 産物のアライメント (60~407bp) はイントロン領域に大きな変異がみられ、2 種のタイプの類似配列がメキシコ産系統以外から得られた (A タイプ, B タイプ)。大きくは 2 タイプに分けられ本遺伝子のヘテロ接合

度は高い結果であった。CsTPS9FN で得られた PCR 産物のアライメント(78~520bp)ではイントロン領域に大きな変異がみられ、2 種のタイプの類似配列が4種から得られた。

本研究では大麻のテルペン合成酵素遺伝子の多様性に着目し、その配列の違いによる大麻種の判別法の検討を行った。既報のプライマーセット 8 種を用い、PCR を行ったがすべての試料から産物が得られたのは 2 種のみであった。カンナビノイド合成酵素に比べ、大麻のテルペン合成酵素の DNA 情報が少なく、縮重プライマーの作成ができなかった点がある。一方で、今回得られた配列は Finola で得られた 9 種のテルペン合成酵素が基になっているが、テルペン合成酵素 Finola\_TPS7 は Finola\_TPS8 (類似度 92%)と類似しており、今回の結果においても Finola\_TPS7 類似配列として示したが、Finola\_TPS8 とも類似している点は詳細に調査する必要がある。これらはカンナビノイド合成酵素 (THCAS, CBDAS, CBCAS)と類似した点である。近年、大麻のゲノム解析、量的形質遺伝子座解析においてカンナビノイド合成とテルペン合成は同一の遺伝子座に位置していることが指摘されている。大麻のカンナビノイドの多様性はこの染色体位置に依存した遺伝子重複によって起こっていることが指摘されており、同様のことがテルペン合成にも起こっていると示唆される。それはテルペン合成酵素のコピー数とリンクしていると考えられる。コピー数の多さは、その遺伝子の配列情報を用いた遺伝子型判別法に不利である。近年、大麻のマリファナ/ヘンプ判別法として報告されている遺伝子型判別法では EU における認定ヘンプ種子の 35%がマリファナと判定されると報告されている。一方で、カンナビノイド合成酵素とテルペン合成酵素の DNA 配列の大きな違いはイントロンの有無であり、イントロンを有するテルペン合成酵素はより多くの多様性を許容でき、大麻種だけでなく産地などにおける多様性をその DNA 情報に反映でき、判別法には有効とも考えられた。

#### D. 結論

本研究は、法規制薬物及び植物について効果的な鑑別を行うための手法を確立することを目的としており、令和 4 年度は以下の研究を行なった。法規制薬物の鑑別に関する研究では、dextromethorphan もしくはエナンチオマーの levomethorphan を投与したラット毛髪試料等を用いて、SFE の条件検討を行い、キラルカラムを用いた LC-MS/MS による摂取識別法の検討を行った。Dextromethorphan 投与ラット毛髪実試料からの dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物の SFE 条件を検討した結果、メタノールにトリフルオロ酢酸 1%、水 5%を添加した modifier を 50%用い、85°Cに加温して静的抽出を 1 時間行った条件が最も適していた。ラットもしくはヒトのコントロール試料に、dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物を浸透させたモデル毛髪試料を用いて、最適化した SFE 条件により各化合物の抽出率を検討した結果、いずれも 88-103%となり、ばらつき(RSD%)は 5.2%以下と良好な結果を示した。さらに、dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/levomethorphan 及びそれらの代謝物を SFE で抽出し、キラルカラムを用いた LC-MS/MS により分離分析を行った。その定量値を既報の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果、(+)-3-HM は 42.5%であったが、他化合物はいずれも 60%以上であった。SFE による分析結果は塩酸メタノール溶液抽出による結果よりも低い値であったが、すべての分析対象化合物が再現性よく検出された。また、塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要で、さらに溶媒留去、再溶解、固相抽出等の煩雑な操作が必要であるが、今回検討した SFE は 1 試料につき 1 時間半程度で抽出可能であり、煩雑な前処理も必要ない。以上より、SFE は毛髪中の薬物及び代謝物を効率よく簡便に検出可能なスクリーニング手法として有用であると考えられた。大麻尿試験におい

て GC 注入口で誘導体化する IPD-TMS 誘導体化法の検討を行った。また、CBD 代謝物の 7COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び大麻尿鑑定の主な対象物質である THC-COOH を対象物質として選択し THC-COOH と CBD 代謝物を識別可能な大麻尿試験法について検討を行った。IPD-TMS 誘導体化のための GC 注入口条件を検討したところ、注入口温度を 250°C、スプリット比 1 : 1、試料溶媒にアセトニトリルを用いる条件を設定するに至った。この条件を用いて、従来の加熱法による TMS 誘導体化の反応性と比較したところ、IPD-TMS 誘導体化は加熱法と同等の反応効率を有することを確認し、IPD-TMS 誘導体化を用いることで試験時間を大幅に短縮可能であることが示唆された。また、IPD-TMS 誘導体化法を用いた大麻尿試験法を設計し、各物質を 40 ng/mL 含有する尿試料を用いて添加回収試験を実施したところ、本法における各物質の回収率は 7-OH-CBD が 39.3%、7-COOH-CBD が 47.6%、THC-COOH が 103.5%となり、低濃度の大麻尿に対しても本法は対応可能であることが示唆された。インターネット上で流通する THC アナログの含有を標榜する製品の流通実態調査を行った結果、THC のアルキル側鎖の長さが異なる化合物が多く検出された。これら化合物を製品より単離精製し各種スペクトルデータ(GC-MS, LC-MS, NMR)を測定した。その結果、THCV の含有を標榜する製品から  $\Delta^8$ -THCV と  $\Delta^9$ -THCV, THCB の含有を標榜する製品から  $\Delta^8$ -THCB と  $\Delta^9$ -THCB と、THCH の含有を標榜する製品から  $\Delta^8$ -THCH と  $\Delta^9$ -THCH を同定した。 $\Delta^9$ -THC および  $\Delta^8$ -THC それぞれを効率的かつ高純度に合成できるルートの検討を行い、高純度標準品の確保を目指した。その結果、CBD を共通出発原料として、環化反応の反応条件を検討することで、100°C下では $\Delta^8$ -THC が、-40°C下では $\Delta^9$ -THC が優先的に合成されることを明らかにし、それぞれの化合物を分析用標品として提供した。また、合成化合物のコンピュータモデリングによるカンナビノイド受容体への親和性評価を

実施した。 $\Delta^8$ -THC および $\Delta^9$ -THC のコンピュータモデリングの結果、計算に用いた CB1 受容体-AM11542 複合体中の、カンナビノイド誘導体 AM11542 と同様に結合することが示唆された。また、CBD (-8.187 kcal/mol)と比較し、それぞれ $\Delta^8$ -THC (-8.612 kcal/mol)、 $\Delta^9$ -THC (-8.736 kcal/mol)と見積もられ、 $\Delta^8$ -THC および $\Delta^9$ -THC は同程度の結合力を示すことが示唆された。

法規制植物の鑑別に関する研究では、大麻草のテルペン合成酵素遺伝子の多様性に着目し、テルペン合成酵素遺伝子の配列情報を用いた大麻種(品種, 栽培種)の判別法を検討するために遺伝子を取得し、配列情報の調査を行った。大麻 8 試料(品種, 栽培種)から 2 種のテルペン合成酵素遺伝子断片を単離し、その配列比較を行った結果、各遺伝子はイントロン領域に大きく違いが見られ、それぞれ 2 つのタイプに分離された。

以上、本研究は、厚生労働省の薬物取締行政に直接貢献する研究であり、国の乱用薬物対策に即したものと考えられる。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

学会発表

1. 田中理恵, 花尻(木倉)瑠理: インターネット上で流通するオイル製品中の THC アナログの同定, 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.26, 札幌)
2. 河村麻衣子: 超臨界流体抽出を用いた高効率なラット毛髪試料中薬物抽出法の検討. 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.25-28, Web 開催)

論文発表

1. 田中理恵, 水谷佐久美, 河村麻衣子, 瀧野裕之, 川原信夫, 花尻(木倉)瑠理, LC-Q-TOF-MS を用いた大麻草 (*Cannabis sativa* L.)

の cannabinoid 11 成分の分析. , *薬学雑誌*,  
**143**, 411–418 (2023).

2. Kurohara T., Ito T., Tsuji G., Misawa T., Yokoo H., Kawamura M., Shoda T., Hanajiri-Kikura R., Demizu Y. Comprehensive synthesis of 20 fentanyl derivatives for use as reference materials., *Heterocycles*, **106**, 82-93 (2023).



分担研究課題：法規制薬物・植物の新規分析法の検討

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

－超臨界流体抽出(SFE)を用いた毛髪試料中薬物の抽出法の検討－

研究要旨：毛髪試料中の薬物分析では抽出等の煩雑な前処理が必要であることから、簡便かつ高効率な前処理方法が求められている。超臨界流体抽出(SFE)は超臨界流体の高い浸透性と拡散性を利用し、食品等の様々な試料抽出に用いられているが、毛髪試料への適用事例は少ない。本研究で我々は、過去に塩酸メタノール溶液抽出法による分析結果を報告している dextromethorphan (鎮咳去痰薬)もしくはエナンチオマーの levomethorphan (麻薬)を投与したラット毛髪実試料を用いて、SFE の条件検討を行い、LC-MS/MS を用いた定量分析を行った。Dextromethorphan 投与ラット毛髪実試料からの dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物の SFE 条件を検討した結果、メタノールにトリフルオロ酢酸 1%、水 5%を添加した modifier を 50%用い、85℃に加温して静的抽出を 1 時間行った条件が最も適していた。ラットもしくはヒトのコントロール試料に、dextromethorphan 及び代謝物 3 化合物を浸透させたモデル毛髪試料を用いて、最適化した SFE 条件により各化合物の抽出率を検討した結果、いずれも 88-103%となり、ばらつき(RSD%)は 5.2%以下と良好な結果を示した。さらに、dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/levomethorphan 及びそれらの代謝物を SFE で抽出し、キラルカラムを用いた LC-MS/MS により分離分析を行った。その定量値を既報の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果、(+)-3-HM は 42.5%であったが、他化合物はいずれも 60%以上であった。SFE による分析結果は塩酸メタノール溶液抽出による結果よりも低い値であったが、すべての分析対象化合物が再現性よく検出された。また、塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要で、さらに溶媒留去、再溶解、固相抽出等の煩雑な操作が必要であるが、今回検討した SFE は 1 試料につき 1 時間半程度で抽出可能であり、煩雑な前処理も必要ない。以上より、SFE は毛髪中の薬物及び代謝物を効率よく簡便に検出可能なスクリーニング手法として有用であると考えられた。

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

髪組織内からの成分抽出には、通常煩雑な前処理が必要であるため、簡便かつ高効率な前処理方法が求められている。

超臨界流体抽出(Supercritical Fluid Extraction, SFE)は超臨界流体の高い浸透性と拡散性を利用し、食品等の様々な試料抽出に用いられているが、毛髪試料への適用事例は少ない。超臨界流体に主に使用されている二酸化炭素は、不燃

A. 研究目的

毛髪試料中の薬物分析は、長期間の摂取歴が推測できることや、頭髪等試料の入手、保管が容易であることから、広く用いられている。一方、毛

性、無毒で容易に入手可能であり、臨界温度が 31.1°C、臨界圧力が 7.38 MPa と、超臨界状態への移行が容易である。超臨界二酸化炭素はヘキサン程度の低極性の性質を持つが、モディファイア(modifier)と呼ばれるメタノール等の高極性溶媒を添加することで、幅広い化合物の抽出に対応可能である。通常、SFE においては試料を封入した抽出容器内に、温度、圧力をコントロールした抽出溶媒を通液する動的抽出(dynamic)と、溶媒を容器内に保持する静的抽出(static)を繰り返して抽出する。SFE は既存の抽出方法に比べて、簡便、迅速化が期待される手法である。

これらの SFE 条件検討にあたり、他抽出法(塩酸メタノール溶液抽出法)による分析結果をすでに報告している<sup>1),2)</sup>、dextromethorphan(鎮咳去痰薬)もしくは、エナンチオマーの levomethorphan(麻薬)を投与したラット毛髪試料を用い、LC-MS/MS を用いた定量分析を行った。また、対象化合物溶液にコントロール毛髪を浸漬して作成したモデル毛髪試料を用いて、抽出効率等の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

分析対象化合物である dextromethorphan HBr, およびその 3 種類の代謝物 dextrorphan tartrate, (+)-3-hydroxymorphinan HBr ((+)-3-HM), (+)-3-methoxymorphinan HCl ((+)-3-MEM), 内標準物質(IS)として使用した levallorphan tartrate は Sigma-Aldrich 社より購入した。また、dextromethorphan の光学異性体である levomethorphan(麻薬)は Cerilliant 社より入手し、代謝物 levorphanol(麻薬)は過去に東京大学大学院薬学研究系研究科より譲渡いただいたものを使用した。各化合物はフリー体として濃度を換算しメタノール溶液を作成した。各化合物の構造式を Figure 1 に示した。

膜ろ過用フィルターは Ultrafree-MC-HV

(Durapore PVDF, 0.45 μm, Merck Millipore 社製)を使用し、メタノール、アセトニトリルおよびギ酸は HPLC 用を、その他溶媒等は特級試薬を用いた。

### 2. 生体試料

毛髪実試料として、過去の報告<sup>1)</sup>で分析を行った、dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラットの毛髪試料(5 mg/kg, 10 days, n=3)を使用した。また上記において、薬物投与前にあらかじめラット背部の毛を刈り取り、これをラットコントロール毛髪試料とした。毛髪試料は既報に従い洗浄、乾燥後、0.5 mm 程度に細片化して使用した。

さらに SFE 条件検討用のラットおよびヒトのモデル毛髪試料を用意した。細片化したコントロールラット毛髪またはヒト頭髪 100 mg を、dextromethorphan および 3 代謝物(dextrorphan, 3-MEM, 3-HM)の各 0.01 mg/mL メタノール混合溶液に浸漬し、常温で 24 時間振盪後、メタノール 20 mL を加えて 3 回洗浄し、風乾して作成した。

### 3. SFE 条件の検討

抽出には MV-10 ASFE システム(Waters 社製)を使用し、超臨界流体には二酸化炭素を用いた。抽出方法の概要を Figure 2 に示した。細片化した毛髪試料を正確に量り取って、海砂、脱脂綿を入れた抽出管(2 mL)に入れ、さらに IS として levallorphan 溶液を添加して密封し、SFE システムに設置して抽出操作を行った。操作は制御ソフト(クロムスコープ)により自動化され、最大 6 試料を連続抽出可能である。1 試料につき pre run, main, post run を 1 サイクルとし、main 抽出時に modifier を添加し、dynamic(動的抽出) - static(静的抽出) - dynamic と順番に切り替えて抽出を行った。抽出液を 50 mL チューブに集め、30°C に加温して窒素吹付により乾固させた。残渣にメタノールを約 5 mL 加え、降り混ぜて溶解し、フィルターろ過後に LC-MS/MS で分析を行った。

SFE の条件検討は以下の点について行った。

- ① Modifier の種類
- ② 抽出温度、時間、modifier 添加濃度

### ③ 試料量

抽出効率の確認には、LC-MS/MS の MRM モードを用いて対象化合物の分析を行い、試料間のピーク面積比や、既報の塩酸メタノール溶液抽出における定量値<sup>1)</sup>と比較を行った。

塩酸メタノール抽出は下記の通り、既報に従って行った。毛髪試料 10 mg に塩酸メタノール溶液および IS 溶液を加え、1 時間超音波抽出を行った後、一晩室温放置した。その後、窒素気流下で溶媒を乾固させ、蒸留水に溶解後、固相抽出 (OASIS HLB, 3cc, 60 mg, Waters) を行い、得られたメタノール溶出液を測定試料とした。

最適化後の SFE 条件を以下に示す。

#### SFE 条件

装置設定 Modifier Solvent: 1% トリフルオロ酢酸 / 5% Milli-Q 水含有メタノール溶液, Makeup Solvent: メタノール, 抽出管: 2 mL, 抽出温度: 85°C, 抽出圧力: 280 psi, 試料量: 5 mg, Pre run: Modifier: 0%, Flow rate: 5 mL/min, Dynamic1: 0.1 min, Static: 0.1 min, Dynamic2: 0.1 min, Makeup flow: 0 mL/min, Main: Modifier: 50%, Flow rate: 5 mL/min, Dynamic1: 1 min, Static: 58 min, Dynamic2: 1 min, Makeup flow: 0 mL/min, Post run: Modifier: 0%, Flow rate: 5 mL/min, Dynamic1: 0.1 min, Static: 0.1 min, Dynamic2: 5 min, Makeup flow: 1 mL/min

#### 4. LC-MS/MS 分析

SFE 条件検討時の dextromethorphan および 3 代謝物の LC-MS/MS 分析は、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (2.1x50mm, 1.7 $\mu$ m, waters 社) を用いた分析により簡易的に行った。

Dextromethorphan, levomethorphan および各代謝物の定量分析は、既報<sup>1),2)</sup>に従い、各エナンチオマーが明確に分離可能な Chiral CD-ph column (150 x 2.1 mm, 5 $\mu$ m, Shiseido 社) を使用して行った。測定機器は LC-MS/MS (ACQUITY UPLC I-Class/ Xevo TQ-S, Waters 社) を用い、MRM モードで分析を行った。対象化合物の保持

時間、MRM 分析の各条件等を Table 1 に示した。検量線は、コントロール毛髪に化合物溶液を 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 ng/mg hair, IS 溶液を 5 ng/mg hair となるよう添加し、SFE による抽出後、LC-MS/MS により測定を行い、内標準法により作成した。真度、精度は 0.1, 10, 100 ng/mg hair (n=3) となるようコントロール毛髪に化合物溶液を添加し、作成した検量線を用いて求めた。また、(-)-3-MEM および(-)-3-HM は標準品を所有していなかったため、(+)-3-MEM および(+)-3-HM の検量線を用いて、定量値を算出した。

LC 条件 カラム: Chiral CD-Ph (2.0 x150 mm, 5  $\mu$ m, Shiseido), カラム温度: 30°C, 移動相: A: 0.1% formic acid, B: 0.1% formic acid /acetonitrile, A/B 80 /20 (2 min hold)-70 /30 (15 min)-40 /60-(17 min, 3min hold), 流速: 0.25 mL/min, 注入量: 1  $\mu$ L

質量分析条件 EI, positive, Capillary voltage: 2.0 kV, Source temp.: 150°C, Desolvation Gas Flow: N<sub>2</sub> 1000 L/hr, Desolvation Temp.: 500°C, Cone Gas Flow: 150 L/hr, Collision gas flow: Ar 0.15 mL/min, MS 測定: MRM モード, 解析ソフト: Target Lynx

#### C. 研究結果

##### 1. SFE 条件の検討

ラット毛髪実試料を用いて、dextromethorphan およびその 3 代謝物の抽出における SFE 条件を検討した。また、回収率や再現性等の検討用に、ラットおよびヒトのモデル毛髪試料を使用した。

##### ① Modifier の検討

Modifier の種類を検討するために、メタノール、0.1%ギ酸添加メタノール、10mM 酢酸アンモニウム添加メタノール、アセトニトリル、アセトンの 5 種を超臨界二酸化炭素にそれぞれ 30% 添加し、ラット毛髪実試料の抽出を行った。抽出物について、LC-MS/MS により測定を行い、MRM クロマトグラム上の dextromethorphan のピーク面積を算出した。

Modifier としてメタノールを用いた際に得られるピーク面積値を 100 としたときの各 modifier 添加時のピーク面積比はそれぞれ 100, 100, 90, 20, 10 となり、メタノールを用いた場合に高い抽出効率が得られた。さらに、メタノールへの添加剤として、トリエチルアミン、ギ酸、トリフルオロ酢酸(いずれも 1%まで)および少量の Milli-Q 水(5%以内)を検討した結果、1%の酸および 5%の水を添加すると高い抽出率が得られた。

### ②抽出温度, 時間, modifier 添加濃度

抽出温度, 抽出時間および modifier 添加濃度を検討するために, ラットモデル毛髪試料を用いて, 塩酸メタノール溶液抽出時の各化合物濃度を 100 としたときの SFE 使用時の各濃度を抽出比として評価した。ラットモデル毛髪試料 10 mg を用いて, modifier として 1% ギ酸/ 5% Milli-Q 水含有メタノール溶液を 30%添加し, 抽出温度を 60°C あるいは 80°Cとして, 45 分間の抽出を同一試料で 3 回繰り返し, 各抽出液中の化合物濃度から抽出率を求めた。抽出時間は, dynamic 1 min -static 45 min -dynamic 1 min で 1 回とした。

その結果, 60°Cでは 1 回目の抽出で 40-55%, 3 回目までの合計で 58-79%の抽出率を示した。80°Cに加温した場合は, 1 回目で 52-75%, 合計で 76-97%と抽出率の向上が確認できた。さらに条件の最適化を行ったところ, modifier の添加濃度を 50%, 加温を 85°C, 抽出時間を static 60 分間に変更したところ, 1 回で 89-102%の抽出率を得ることが可能であった (Table 2, Figure 3)。

### ③試料量

②で設定した SFE 条件でラット毛髪実試料 10 mg の分析を行ったところ, ラットモデル毛髪試料での検討結果と比較して, 30 %程度低い値となった。これを改善するため, modifier の添加剤を 1% ギ酸から 1%トリフルオロ酢酸へ変更するとともに, 試料量の検討を行った。その結果, 実試料の試料量を 10 mg から 5 mg へと減らすことで, 抽出効率をさらに高くすることが可能であった。

上記の検討結果を反映させた SFE 条件(詳細は方法項に記載)を用いて, ラットおよびヒトモデル毛髪試料を抽出し, LC-MS/MSにより定量分析を行った結果を Table 3 に示した。SFEにより分析を行った場合の各化合物濃度は, ラットおよびヒト試料ともに, 塩酸メタノール溶液抽出における定量結果とほぼ同等であった。また, 相対標準偏差 (RSD %)は 5.2%以下となり, いずれも条件の最適化前と比較して改善していることが確認できた。ヒトモデル試料中の化合物濃度は, ラットと比較して 1/10 程度であったが, これはモデル毛髪試料作成時における, 化合物溶液の毛髪内への浸透量の違いに起因していると考えられる。

今回, 毛髪試料の SFE 条件検討において, コントロール毛髪試料に薬物溶液を浸透させたモデル毛髪試料を用いることで, 化合物をコントロール試料に添加しただけの試料と比較して, より実試料に近い検討が可能であった。

### 2. SFE を用いた毛髪定量分析

最適化した SFE 条件を用いて, ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/ levomethorphan および代謝物を抽出し, キラルカラム Chiral CD-ph column を用いた LC-MS/MS により定量分析を行った。

実験方法の項に示した通り, 検量線は, コントロール毛髪に化合物溶液を 0~100 ng/mg hair, IS 溶液を 5 ng/mg hair となるよう添加し, SFE による抽出後, LC-MS/MS 分析を行い, MRM モードで作成した。真度, 精度は 0.1, 10, 100 ng/mg hair (n=3)となるようコントロール毛髪に化合物溶液を添加して検討した。なお, (-)-3-MEM および(-)-3-HM は, (+)-3-MEM および(+)-3-HM の検量線を用いて定量値を算出した。バリデーションの結果を Table 4 に示した。全化合物で検量線範囲の 1-100 ng/mg hair で良好な直線性が得られ, 20%以内の真度, 精度が得られた。

Dextromethorphan および levomethorphan を投与したラット毛髪実試料中の薬物および代謝物の

定量分析を行った結果を Table 5 に示した。また、各濃度について、既報<sup>1),2)</sup>の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果、(+)-3-HM は 42.5%であったが、他化合物はいずれも 60%以上であった。塩酸メタノール溶液抽出と比較して、SFE の各化合物の抽出効率は低かったが、dextromethorphan および levomethorphan と共に、それぞれの 3 種類の代謝物も再現性よく検出されていた。SFE における抽出効率が低い理由のひとつとして、今回用いたラット毛髪は、洗浄・乾燥操作を行っても一定量の水分および油分が残存することから、超臨界流体で十分抽出しきれなかったことが考えられる。また、未変化体と代謝物では極性が異なり、双方の化合物の抽出に最適な条件を設定することが困難であることも考えられた。一方、既報<sup>1),2)</sup>の塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要であり、乾固後の再溶解、固相抽出等の煩雑な操作が必要であったが、今回検討した SFE による抽出は 1 試料につき 1 時間半程度で可能であった。SFE による抽出は、毛髪中の薬物および代謝物を簡便に検出可能で、毛髪中薬物のスクリーニング法として優れていると考えられた。

#### D. 結論

Dextromethorphan (鎮咳去痰薬) もしくはエナンチオマーの levomethorphan (麻薬) を投与したラット毛髪実試料を用いて、SFE の条件検討を行い、LC-MS/MS を用いた定量分析を行った。Dextromethorphan 投与ラット毛髪実試料からの dextromethorphan および代謝物 3 化合物の SFE 条件を検討した結果、メタノールにトリフルオロ酢酸 1%、水 5% を添加した modifier を 50% 用い、85°C に加温して静的抽出を 1 時間行った条件が最も適していた。ラットもしくはヒトのコントロール試料に、dextromethorphan および代謝物 3 化合物を浸透させたモデル毛髪試料を用いて、最適化した SFE 条件により各化合物の抽出効率を検討

した結果、いずれも 88-103% となり、ばらつき (RSD%) は 5.2% 以下と良好な結果を示した。さらに、dextromethorphan もしくは levomethorphan 投与ラット毛髪実試料中の dextromethorphan/levomethorphan およびそれらの代謝物を SFE で抽出し、キラルカラムを用いた LC-MS/MS により定量分析を行った。その定量値を既報<sup>1),2)</sup>の塩酸メタノール溶液抽出による定量値と比較した結果、(+)-3-HM は 42.5% であったが、他化合物はいずれも 60% 以上であった。SFE による分析結果は塩酸メタノール溶液抽出による結果よりも低い値であったが、すべての分析対象化合物が再現性よく検出された。また、塩酸メタノール溶液抽出では抽出時間が 16 時間程度必要で、さらに溶媒留去、再溶解、固相抽出等の煩雑な操作が必要であるが、今回検討した SFE は 1 試料につき 1 時間半程度で抽出可能であり、煩雑な前処理も必要ない。以上より、SFE は毛髪中の薬物および代謝物を効率よく簡便に検出可能なスクリーニング手法として有用であると考えられた。

#### 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)「乱用薬物の分析・同定に関する研究」平成 21 年度研究分担報告「毛髪を中心としたラット生体試料中 dextromethorphan 及び levomethorphan の LC-MS/MS を用いた光学異性体分析について」(花尻(木倉)瑠理)。
- 2) R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, A. Miyajima, M. Sunouchi, Y. Goda. Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400, 165–174.

#### F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 学会発表

1. 河村麻衣子:超臨界流体抽出を用いた高効率なラット毛髪試料中薬物抽出法の検討. 日本薬学会第 142 年会 (25-28 Mar. 2022, Web 開催)

### 論文発表

特になし.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Table 1 分析対象化合物の LC-MS/MS MRM 測定条件およびキラル分析における保持時間

Compounds	RT (min)	MRM1 (for quantification)				MRM2 (for confirmation)
		precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	cone voltage (V)	Collision voltage (eV)	
Dextromethorphan	10.2	272.0	146.9	25	30	272.0>170.8
Dextrorphan	5.8	258.0	156.8	25	45	258.0>132.7
(+)-3-MEM	7.7	258.0	214.9	25	20	258.0>170.9
(+)-3-HM	3.6	244.0	156.8	25	30	244.0>200.9
Levomethorphan	10.7	272.0	146.9	25	30	272.0>170.9
Levorphanol	5.1	258.0	156.9	25	30	258.0>132.8
(-)-3-MEM (putative)	9.2	258.0	214.9	25	20	258.0>170.9
(-)-3-HM (putative)	4.0	244.0	156.8	25	30	244.0>200.9
Levallorphan (IS)	7.8	284.0	156.8	25	45	-

Table 2 SFE における抽出温度の違いによるラットモデル毛髪試料からの各薬物の抽出量

	Drug concentrations (ng/mg hair)			
	Dextro-methorphan	Dextrorphan	(+)-3-MEM	(+)-3-HM
60°C-1	15.9	16.9	28.1	24.3
60°C-2	4.4	5.3	7.1	7.3
60°C-3	2.1	2.7	3.0	3.8
80°C-1	23.3	23.7	38.2	31.9
80°C-2	5.0	6.9	8.2	9.8
80°C-3	1.9	3.0	3.1	4.5
85°C-1	29.1	38.3	52.0	56.8
85°C-2	1.0	1.3	1.5	1.7
85°C-3	0.5	0.7	0.8	0.9
MeOH-5N HCl ext.	32.3	43.0	51.0	61.1
85°C-1 *	90%	89%	102%	93%
Extraction efficiency				

\*各薬物濃度は簡易定量値

\*\* Dynamic 1 min -static 45 min -dynamic 1 min を 3 回繰り返して抽出した際に各回で抽出された薬物量

\*\*\*Modifier の添加濃度を 50%, 加温を 85°C, 抽出時間を static 60 分間に変更して 1 回抽出した時の抽出効率 (塩酸メタノール溶液抽出時の各化合物濃度を 100 とした場合の値)

Table 3 ラット(A)およびヒト(B)のモデル毛髪試料の最適化 SFE 条件による抽出検討結果

(A)

	Hair (mg)	Drug concentrations (ng/mg hair)			
		Dextro-methorphan	Dextrorphan	(+)-3-MEM	(+)-3-HM
Rat model hair -1	4.8	45.4	61.4	74.7	84.3
Rat model hair -2	4.8	43.7	59.0	74.0	81.8
Rat model hair -3	5.0	47.0	63.1	79.0	87.8
MeOH-5N HCl ext.	5.1	45.0	61.0	72.0	81.5
Extraction efficiency (%)		101	100	105	104
RSD (%)		3.7	3.4	3.6	3.5

\*薬物濃度は簡易的定量値

\*\*回収率は塩酸メタノール溶液抽出時の各濃度を 100 とした場合の値

(B)

	Hair (mg)	Drug concentrations (ng/mg hair)			
		Dextro-methorphan	Dextrorphan	(+)-3-MEM	(+)-3-HM
human model hair -1	1.9	3.3	3.3	3.1	3.1
human model hair -2	2.4	3.1	3.3	2.9	3.2
human model hair -3	2.8	3.0	3.4	2.9	3.1
MeOH-5N HCl ext.	2.3	3.0	3.5	3.0	3.3
Extraction efficiency (%)		104	94	101	96
RSD (%)		5.2	1.6	2.7	2.2

\*薬物濃度は簡易的定量値

\*\*回収率は塩酸メタノール溶液抽出時の各濃度を 100 とした場合の値

Table 4 LC-MS/MS キラル分析における分析法バリデーション結果

Compounds	RT(min)	Linear range		Precision (%)			Accuracy (%) (n=3)		
		ng/mg hair	R <sup>2</sup>	0.1 ng/mg	10	100	0.1 ng/mg	10	100
Dextromethorphan	10.2	0.1-100	0.999	3.5	5.3	5.5	0.2	5.3	4.2
Dextrorphan	5.8	0.1-100	0.999	7.4	5.5	3.4	3.1	3.6	3.0
(+)-3-MEM	7.7	0.1-100	0.999	0.7	6.3	5.0	-16.3	5.6	2.4
(+)-3-HM	3.6	0.1-100	0.999	9.4	5.9	4.9	-14.4	7.4	-0.1
Levomethorphan	10.7	0.1-100	0.999	1.9	1.3	2.5	2.8	-4.7	-0.5
Levophanol	5.1	0.1-100	0.999	3.0	2.1	1.9	7.6	-4.8	1.8



Table 5 SFE および LC-MS/MS キラル分析によるラット毛髪実試料中薬物の定量値 (ng/mg hair) および既報<sup>1), 2)</sup>の塩酸メタノール溶液抽出による定量値を 100 とした場合の抽出効率 (%) (n=3)

(A) Dextromethorphan 投与ラット毛髪分析結果

	Dextromethorphan (ng/mg) ±SE	Dextrorphan (ng/mg) ±SE	(+)-3-MEM (ng/mg) ±SE	(+)-3-HM (ng/mg) ±SE
Dex-rat hair-1	46.9 ± 0.41	1.9 ± 0.06	16.1 ± 0.37	0.33 ± 0.01
Dex-rat hair-2	53.6 ± 0.55	2.0 ± 0.01	16.8 ± 0.41	0.26 ± 0.02
Dex-rat hair-3	43.3 ± 1.74	1.5 ± 0.05	15.9 ± 0.88	0.27 ± 0.04
Extraction efficiency (%)	75.9	66.0	64.9	42.5

(B) levomethorphan 投与ラット毛髪分析結果

	Levomethorphan (ng/mg) ±SE	Levopranolol (ng/mg) ±SE	(-)-3-MEM* (ng/mg) ±SE	(-)-3-HM* (ng/mg) ±SE
Levo-rat hair-1	22.0 ± 1.01	15.4 ± 0.60	2.31 ± 0.09	0.40 ± 0.03
Levo-rat hair-2	12.4 ± 0.44	12.2 ± 0.25	1.37 ± 0.04	0.29 ± 0.02
Levo-rat hair-3	20.5 ± 0.56	16.6 ± 0.70	2.34 ± 0.09	0.38 ± 0.03
Extraction efficiency (%)	74.0	60.1	78.3	72.3

\*(-)-3-MEM, (-)-3-HM の定量値は (+)-3-MEM, (+)-3-HM の検量線を用いて算出

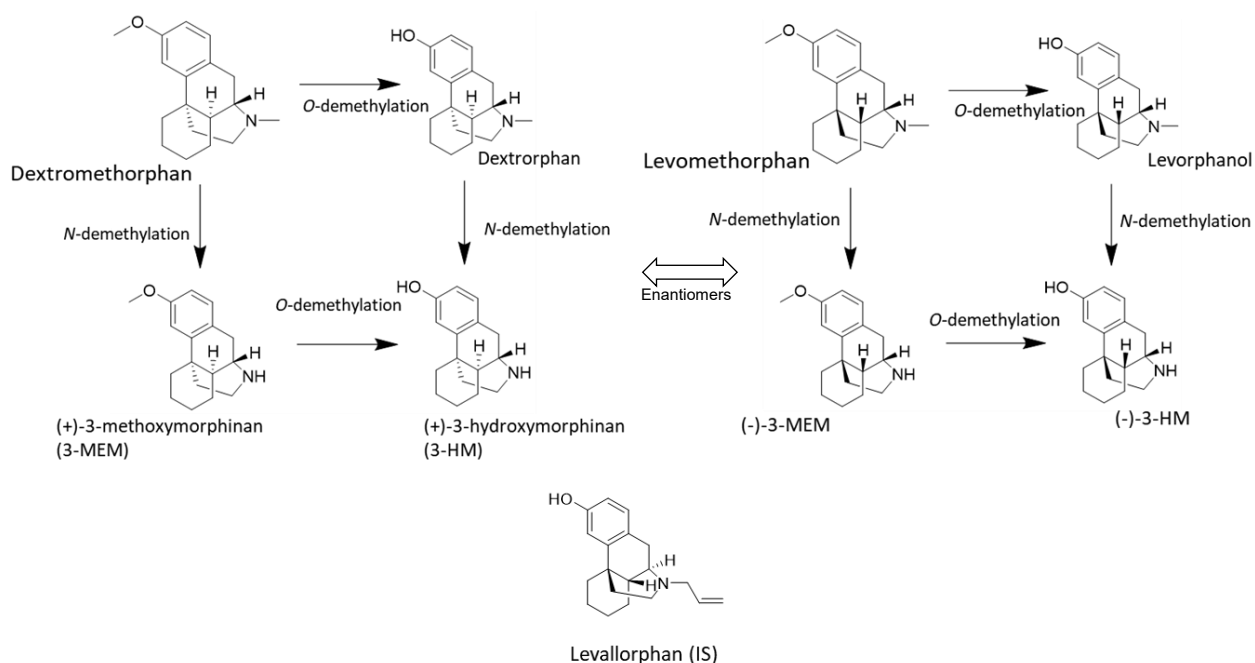


Figure 1 分析対象化合物の構造

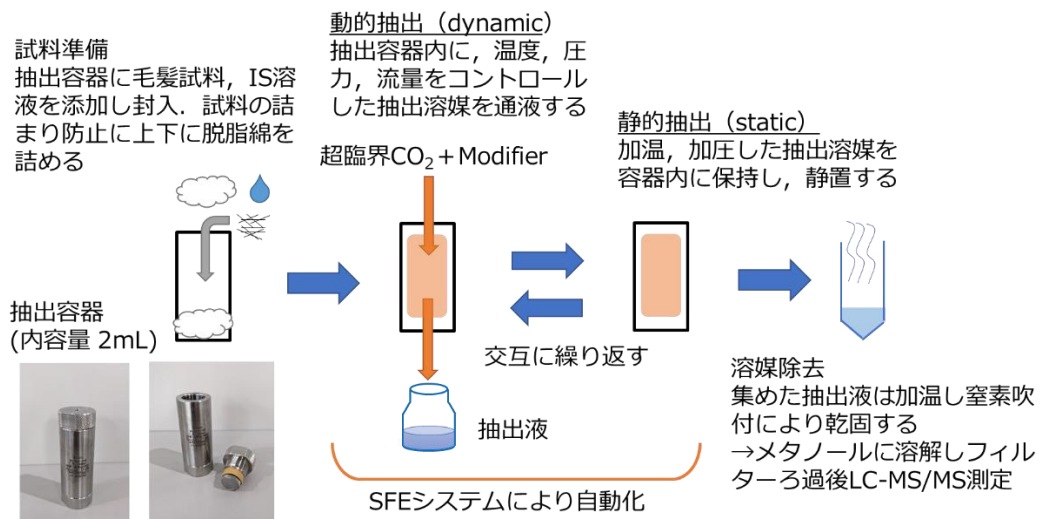


Figure 2 超臨界流体抽出(SFE)法の概要 (装置: MV-10 ASFE システム, Waters 社製)

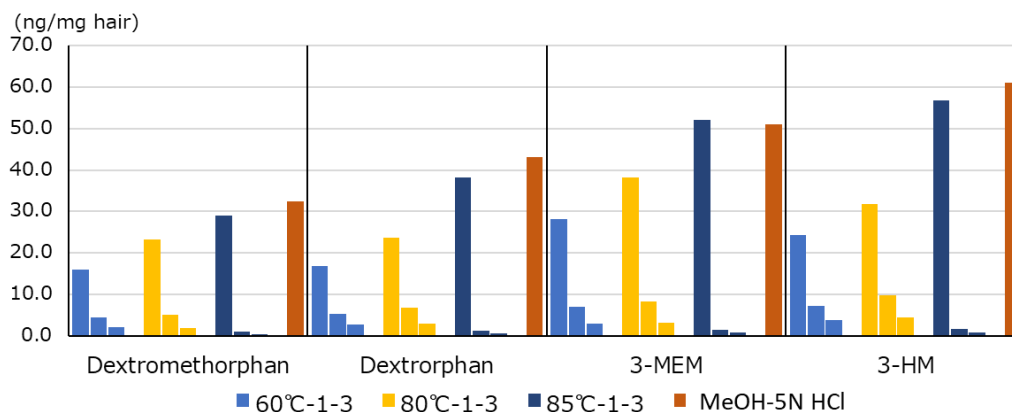


Figure 3 SFE における抽出温度の違いによるラットモデル毛髪試料からの各薬物の抽出量

\* Dynamic 1 min -static 45 min -dynamic 1 min を 3 回繰り返して抽出した際に各回で抽出された薬物量

分担研究課題:法規制薬物の分析手法の検討

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

—違法薬物の GC/MS 分析における Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化の有効性に関する検討(カンナビノイド類の代謝物分析への応用)—

研究協力者:杉江 謙一 九州厚生局麻薬取締部 鑑定課 厚生労働技官

研究要旨:大麻使用罪の創設に伴い,尿中大麻成分代謝物 11-Nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC-COOH) の分析が今後大麻取締において非常に重要となる.近年では  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) 以外の Cannabidiol (CBD) などのカンナビノイドを含有する大麻リキッドが出回っており,今後,被疑者がこのような大麻リキッドを摂取したと抗弁する可能性がある.特に CBD 代謝物は熱や酸によって THC-COOH に変換される可能性があり,大麻尿試験においてはこのような変換を防止する試験法を開発する必要がある.本研究では, CBD 代謝物の変換に対しては TMS 誘導体化が有効であると考えられ, GC 注入口で誘導体化する Injection Port Derivatization (IPD) TMS 誘導体化法の検討を行った.また, CBD 代謝物の 7-Carboxy cannabidiol (7COOH-CBD), 7-Hydroxy cannabidiol (7-OH-CBD) 及び大麻尿鑑定の主な対象物質である THC-COOH を対象物質として選択し THC-COOH と CBD 代謝物を識別可能な大麻尿試験法について検討を行った.

IPD-TMS 誘導体化のための GC 注入口条件を検討したところ,注入口温度を 250°C, スプリット比を 1:1 に設定し,試料溶媒にアセトニトリルを用いる条件を設定するに至った.さらに,この条件を用いて,従来の加熱法による TMS 誘導体化の反応性と比較したところ, IPD-TMS 誘導体化は加熱法と同等の反応効率を有することを確認し, IPD-TMS 誘導体化を用いることで試験時間を大幅に短縮可能であることが示唆された.

また, IPD-TMS 誘導体化法を用いた大麻尿試験法を設計し,各物質を 40 ng/mL 含有する尿試料を用いて添加回収試験を実施したところ,本法における各物質の回収率は 7-OH-CBD が 39.3%, 7-COOH-CBD が 47.6%, THC-COOH が 103.5%となり,低濃度の大麻尿に対しても本法は対応可能であることが示唆された.

本研究により, IPD-TMS 誘導体化を用いることで GC 注入口での CBD 代謝物の変換を防止し,さらに CBD 代謝物と THC-COOH を識別可能,より迅速な大麻尿試験法を構築した.

研究協力者

木口 昭夫 九州厚生局麻薬取締部 鑑定課  
課長

A. 研究目的

大麻使用罪の創設に伴い,今後,尿中大麻成分  
代 謝 物 11-Nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -

Tetrahydrocannabinol (THC-COOH) の分析が非常に重要なものとなることが予想される.一方,近年では, Cannabidiol (CBD) などのカンナビノイドを高濃度含有する製品がインターネット上で容易に購入できる状態であり,被疑者がこのような製品を使用したなどと抗弁する可能性がある.その

ため、尿中大麻成分代謝物の鑑定では THC-COOH だけでなく、CBD などカンナビノイド代謝物の分析を要求される可能性がある。GC や GC/MS は薬物分析で汎用される分析機器であるが、特に CBD は熱や酸により  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) に異性化することが知られており、GC 注入口においても同様の現象が引き起こされる<sup>1,2)</sup>。この現象は CBD 代謝物にも引き起こされることが予想され、すなわち GC 注入口で CBD 代謝物の 7-Carboxy cannabidiol (7COOH-CBD) が THC-COOH へ変換される可能性もあると考えられる。なお、7-COOH-CBD の変換について、ペンタフルオロプロピオン酸無水物による誘導体化や試験中の尿を長時間の酸性状態に置くことにより引き起こされることが報告されており<sup>2)</sup>、大麻尿鑑定において誤判定を引き起こす可能性があり、THC-COOH と CBD 代謝物を識別可能な試験法構築も必要であると考えられる。

GC 注入口における CBD 代謝物の変換については、化学構造中の水酸基を誘導体化することが効果的であり、誘導体化反応の際に酸性条件を要さない Trimethyl silyl (TMS) 試薬を用いた誘導体化が有効と考えられる。また、TMS 誘導体化については、従来の加熱法以外に GC 注入口内で直接反応させる Injection Port Derivatization (IPD) が報告されており、IPD を用いることで、反応時間の短縮や試験法の簡素化が期待できる。実際に、IPD を用いた TMS 誘導体化を尿中 THC-COOH の分析に応用する報告もあり<sup>4)</sup>、CBD 代謝物の TMS 誘導体化にも IPD の応用は可能であると考えられた。そのため、本研究では IPD-TMS 誘導体化を用いた GC 注入口での CBD 代謝物の変換を防止する GC/MS 分析法を検討し、IPD-TMS 誘導体化を用いた GC/MS による大麻尿試験法の構築を試みた。また、本研究の対象物質として、CBD 代謝物として 7-COOH-CBD 及び 7-Hydroxy cannabidiol (7-OH-CBD)、大麻尿使用罪のターゲット物質である  $\Delta^9$ -

THC 代謝物の THC-COOH を選択し、各物質の識別が可能であるかも検証した。

## B. 研究方法

### 1 試薬及び試料

7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の各 1 mg/mL のメタノール溶液は Sigma Aldrich<sup>®</sup> 社製のものを使用した。N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (以下 BSTFA) は Sigma Aldrich<sup>®</sup> 社製のものを使用した。健常人尿はフナコシ(株)から購入した。その他の試薬は特級品を使用した。

### 2 装置及び器具

アルミブロック恒温槽 (TAITEC 社製, 型番: DTU-1CN), 10k ミニ遠心分離機 (ALLSHENG 社製, 型番: Mini-10k), Silicon Coating Tubes 2.0 mL (株)バイオメディカルサイエンス社製, 型番: bmb2200)

### 3 IPD-TMS 誘導体化

試料液 40  $\mu$ L に BSTFA 10  $\mu$ L を添加したものを GC/MS に注入した。

### 4 加熱による TMS 誘導体化

試料液 40  $\mu$ L をガラスバイアルに入れ、BSTFA 10  $\mu$ L 加えた後、80°C のアルミブロック恒温槽で 30 分間加熱した。反応後、窒素気流により溶媒を蒸発乾固し、アセトニトリル 50  $\mu$ L に再溶解したものを GC/MS に注入した。

### 5 尿試料の調製方法

40 ng/mL の 7-COOH-CBD, 7OH-CBD 及び THC-COOH を含有する尿試料を調製し、添加回収試験に使用した。尿試料 1 mL を 2 mL のマイクロチューブに入れ、0.2 mL の 10 N 水酸化カリウム添加し、攪拌した後、60°C の水浴で 30 分間加温した。加温後、酢酸 0.2 mL を添加し、抽出溶媒としてヘキサン・酢酸エチル混合液 (7:1) 0.5 mL を加え、10 秒間攪拌した後、遠心分離 (10,000 rpm, 10 秒間) した。遠心分離後、上層の有機層を分取した。同様の抽出操作を都合 3 回繰り返し、分取した有機層は一つの試験管にまとめ

た. 分取した有機層を窒素気流により乾固した後, アセトニトリル 40  $\mu$ L で再溶解し, BSTFA 10  $\mu$ L を添加したものを GC/MS に注入した.

## 6 分析条件

### GC/MS 分析条件

装置: Agilent 社製: 7890GC system/5977 GC/MSD)

分析カラム: DB-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m) (Agilent 社製)

注入口温度: 250 $^{\circ}$ C

注入法: スプリット (1:1)

注入量: 1  $\mu$ L

昇温条件1 (条件検討): 200 $^{\circ}$ C (1 min 保持) – 40 $^{\circ}$ C /min 昇温 – 300 $^{\circ}$ C (2.5 min 保持)

昇温条件2 (添加回収試験) 100 $^{\circ}$ C (1 min 保持) – 20 $^{\circ}$ C /min 昇温 – 300 $^{\circ}$ C (4 min 保持)

トランスファーライン: 280 $^{\circ}$ C

キャリアーガス: ヘリウム

イオン化法: 電子イオン化法 (EI)

イオン化電圧: 70 eV

イオン源温度: 200 $^{\circ}$ C

四重極温度: 150 $^{\circ}$ C

測定モード 1: SCAN モード ( $m/z$  40~600)

測定モード 2: SIM モード

THC-COOH 測定用イオン:  $m/z$  371, 確認用イオン:  $m/z$  488

7-COOH-CBD 測定用イオン:  $m/z$  492, 確認用イオン:  $m/z$  561

7-OH-CBD 測定用イオン:  $m/z$  478, 確認用イオン:  $m/z$  546

## C. 結果及び考察

### 1 IPD-TMS 誘導体化における GC 注入口条件の検討

7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の IPD-TMS 誘導体化のため, GC 注入口条件を検討した.

### 1. GC 注入口温度による IPD-TMS 誘導体化への影響

#### 1-1 試料溶媒の選択

IPD-TMS 誘導体化における試料溶媒の影響について検証した. 溶媒は無極性溶媒のヘキサン, 極性溶媒の酢酸エチル及びアセトニトリル, 誘導体化試薬の BSTFA を選択した. 7-COOH-CBD, 7-OH-CBD, THC-COOH について, 各種溶媒を用いて 10  $\mu$ g/mL の試料液を調製し, 同試料液 40  $\mu$ L に BSTFA 10  $\mu$ L を添加したものを GC/MS で測定した. その結果, 全ての溶媒で十分に TMS 誘導体化反応が進行し, 7-COOH-CBD 及び 7-OH-CBD については TMS が 3 つ付加した 7-COOH-CBD-3TMS, 7-OH-CBD-3TMS, THC-COOH については TMS が 2 つ付加した THC-COOH-2TMS が検出された. Fig. 1 に GC/MS により得られた Total Ion Current Chromatogram (TICC) と各物質の TMS 誘導体のマススペクトルを示す.

次に, 試料液濃度による反応性を検証するため, 各種溶媒を用いて 100  $\mu$ g/mL の試料液を調製した. その結果, ヘキサン溶媒では 7-OH-CBD のみが誘導体化され, ほかの物質について TMS 誘導体化は十分に進行しなかった (Fig. 2-1). 他方, 酢酸エチル, アセトニトリル, BSTFA を溶媒として用いた場合, 全ての物質の TMS 誘導体化が十分に進行した. アセトニトリル溶媒で測定した際の各物質 TMS 誘導体の TICC を Fig. 2-2 に示す.

溶媒による IPD-TMS 誘導体化への影響は, 溶媒ごとの極性が要因であると考えられた. すなわち, 極性溶媒のアセトニトリル, 酢酸エチルでは IPD-TMS 誘導体化が進行するが, 他方, ヘキサンのような無極性溶媒は IPD-TMS 誘導体化を促進しないという性質があるものと推測された. さらに, 7-OH-CBD のみ, ヘキサン溶媒で TMS 誘導体化が進行していたことから, 特にカルボキシル基への IPD-TMS 誘導体化には極性溶媒が適していると考えられた.

また、これら溶媒における各物質 TMS 誘導体のピーク面積を比較したところ、BSTFA を用いた際に全ての TMS 誘導体で最もピーク面積は低くなった (Fig. 3). 他方、アセトニトリルと酢酸エチルの場合、7-OH-CBD と THC-COOH の TMS 誘導体においてピーク面積に差はみられなかったが、7-COOH-CBD の TMS 誘導体においてはアセトニトリルの方がピーク面積は高くなった。

以上のことから、IPD-TMS 誘導体化における溶媒として、アセトニトリルを選択することとした。

### 1-2 注入口温度の設定

次いで、IPD-TMS 誘導体化における GC 注入口温度の設定について検討した。GC 注入口温度を 200, 220, 250, 280 及び 300°C, スプリット比を 20:1 に設定し、10 µg/mL の 7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH のアセトニトリル溶液 40 µL に BSTFA 10 µL を添加したものを GC/MS で測定した。その結果、全ての注入口温度において、各物質の TMS 誘導体化は十分に進行し、そのピーク面積も全温度において一定であった (Fig. 4)。

次にスプリット比 1:1 における GC 温度の影響について検証した。その結果、全物質で温度上昇によりピーク面積は上昇し、250°C 以降で一定となった。

以上のことから、上記範囲の GC 注入口温度において、各物質の IP-TMS 誘導体化は十分に進行することが示唆され、スプリット比 1:1 における 7-COOH-CBD と THC-COOH のピーク面積上昇を考慮すると、GC 注入口温度は 250°C 以上に設定することが望ましいと考えられた。

### 1-3 スプリット比の設定

次に、GC 注入口のスプリット比による IPD-TMS 誘導体化への影響について検証した。10 µg/mL のアセトニトリル溶液 40 µL に BSTFA 10 µL を添加したものを GC/MS で測定した。その際に、GC 注入口温度は 250°C に設定し、GC 注入口のスプリット比を 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 及び 50:1 に設定した。各スプリット比にお

けるカラムへの試料導入量を算出し、各物質の TMS 誘導体のピーク面積との関係を検証した。カラム導入量は試料注入量 1 µL をカラム流量 1 mL/min と各スプリット流量の総和により除すことで算出した。その結果、カラムへの試料導入量と各物質の TMS 誘導体ピーク面積の間には強い相関関係があることが確認された (Fig. 5)。このことから、全てのスプリット比において、IPD-TMS 誘導体化の反応効率は一一定であることが推測された。

さらに、各スプリット比における 7-OH-CBD のピーク面積に対する 7-COOH-CBD 及び THC-COOH とのピーク面積比を検証した。その結果、スプリット比が低いほど 7-COOH-CBD/7-OH-CBD と THC-COOH/7-OH-CBD が高くなる傾向があり、7-COOH-CBD と THC-COOH は低スプリット比により感度が上昇することが確認された (Fig. 6)。これは両物質が 7-OH-CBD よりも揮発性が低く、高スプリット比ではインサート内の試料滞留時間が短く、十分に気化されていないことが原因であると考えられた。

以上のことから、IPD-TMS 誘導体化における GC 注入口のスプリット比については、全ての物質がより高感度に検出可能な 1:1 に設定することとした。

## 2 IPD-TMS 誘導体化と加熱法の比較

IPD-TMS 誘導体化の有効性を検証するため、汎用される加熱法との比較を行った。各物質につき 10 µg/mL のアセトニトリル溶液を試料液とした。加熱法については「4 加熱による TMS 誘導体化」に従い試料調製を行い、GC/MS で測定した。なお、加熱法について、試料液中の BSTFA により GC/MS 注入時に IPD が引き起こされるため、加熱反応後の反応液を一度、窒素乾固する工程を入れている。GC/MS の条件として、スプリット比を 1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 及び 50:1 に設定し、各誘導体化法における各物質 TMS 誘導体のピーク面積の挙動を比較した。その結果、窒素乾固していることから、加熱法での各物

質のピーク面積は IPD より若干小さくなるが、両者のピーク面積の挙動はほぼ一致していた (Fig. 7). 加熱法では全物質が TMS 誘導体化された状態で GC/MS に注入されるため、IPD と加熱法のピーク面積挙動が一致するということは、全スプリット比において IPD-TMS 誘導体化は従来の加熱法と同等の反応性を示すと考えられた。以上のことから、7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH の IPD-TMS 誘導体化は従来の加熱法と同等の反応性を有し、かつ加熱法で要する 30 分の反応時間も省略できることから、各物質の TMS 誘導体化法として有用であることが示唆された。

### 3 IPD-TMS 誘導体化における検出限界, 定量下限及び検出限界

設定した注入口条件を用い、各物質の IPD-TMS 誘導体化における検出限界および定量下限を検証した。その際、GC/MS の測定モードは SCAN を用いた。その結果、各物質 TMS 誘導体ともに検出限界は 0.5 µg/mL, 定量下限 1 µg/mL であった。また、1~50 µg/mL の濃度範囲で検量線を作成したところ、全物質 TMS 誘導体につき  $r=0.999$  以上の良好な相関性が得られた (Fig. 8)。なお、本 GC 注入口条件を用いた IPD-TMS 誘導体化において、7-COOH-CBD の THC-COOH への変換は確認されなかった。

### 4 尿試料への IPD-TMS 誘導体化の応用

大麻尿試験への IPD-TMS 誘導体化の適応を検討するため、40 ng/mL の 7-COOH-CBD, 7-OH-CBD 及び THC-COOH を含有する尿試料を調製し、添加回収試験を実施した。その際の GC 注入口条件は注入口温度を 250°C, スプリット比を 1:1 に設定した。なお、本添加回収試験において、尿中の夾雑成分の影響を避けるため GC/MS の測定モードは SIM を用いた。測定の結果得られた各物質 TMS 誘導体の測定イオンのクロマトグラムを Fig. 9 に示す。尿試料の測定においても IPD-TMS 誘導体化反応は進行し、7-OH-CBD, 7-COOH-CBD 及び THC-COOH の TMS

誘導体もそれぞれ分離され、識別が可能であった。また、クロマトグラム上の各 SN 比は 7-OH-CBD-3TMS が 188, 7-COOH-CBD-3TMS が 85, THC-COOH-2TMS が 143 となり 40 ng/mL と低濃度の尿試料についても良好な感度が得られた。さらに、本実験で採用した前処理法における各物質の回収率は 7-OH-CBD が 39.3%, 7-COOH-CBD が 47.6%, THC-COOH が 103.5% であった。CBD 代謝物の回収率が THC-COOH よりも低くなったのは、各 CBD 代謝物の化学構造にある 2 つの水酸基により、THC-COOH よりも水溶性が高くなり、液液抽出時の有機層への分配性が低下したことが要因であると考えられた。そのため、本前処理で採用した抽出溶媒については、溶媒の種類や混合比率の検討を行い、CBD 代謝物の回収率を改善する必要があると考えられた。一方、一般的に使用される大麻尿のスクリーニングキットのカットオフ値は 50 ng/mL であることを考慮すると、本試験法でも大麻尿試験に十分に対応可能であると考えられた。

以上のことから、大麻尿試験においても CBD 代謝物、THC-COOH への IPD-TMS 誘導体化は応用可能であることが示唆された。また、IPD-TMS 誘導体化を用いた各物質を識別可能かつより迅速な大麻尿試験法を構築した。

### D. 結論

本研究では CBD 代謝物である 7-OH-CBD 及び 7-COOH-CBD の GC/MS 分析における IPD-TMS 誘導体化の有用性について検証した。その結果、各物質の IPD-TMS 誘導体化に最適な条件として、GC 注入口温度 250°C, スプリット比 1:1 に設定し、試料溶媒としてアセトニトリルを用いることを考案した。IPD-TMS 誘導体化により GC 注入口での CBD 代謝物の変換を防止可能であることを確認した。さらに、実試料を想定した添加回収試験を実施したところ、大麻尿試験へも IPD-TMS 誘導体化が有効であることが示され、大麻尿試験の試験時間短縮と簡素化が期待できるも

のと考えられた。

本研究では各物質のグルクロン酸抱合体を用いた加水分解の検証は行っておらず、大麻尿試験で一般的に使用されている加水分解法で 7-COOH-CBD と THC-COOH が十分に脱抱合されていると仮定して実験を行った。そのため、本研究で構築した試験法については各物質のグルクロン酸抱合体を対象とした検証も必要である。

以上のことから、今後の研究では THC-COOH 及び 7-COOH-CBD のグルクロン酸抱合体を対象とした大麻尿試験法の構築を検討するとともに、近年、大麻リキッドに含有され、令和 4 年 3 月 7 日に指定薬物に指定された Hexahydrocannabinol (HHC) の代謝物についても対象物質として追加し、幅広いカンナビノイド代謝物に対応可能な鑑定試験法の構築を試みていきたい。

#### E. 参考文献

- 1) 杉江謙一, 林侑加子, 津村ゆかり, 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラーサイエンス政策研究事業)「規制薬物の分析と鑑定等の手法の開発のための研究」令和2年度総括・分担研究報告書「ガスクロマトグラフ注入口における cannabidiol から tetrahydrocannabinoid への異性化に関する研究」
- 2) Golombek P., Muller M., Barthlott I., Sproll C., Lachenmeier D. W., *Toxics.*, **8(2)**.
- 3) E. D. Hart, S. Vikingsson, J. M. Mitchell, R. E. Winecker, R. Flegel, E. D. Hayes , *J. Anal. Toxicol.*, **46(5)**, 573–576 (2022).
- 4) Y. E. Sim, J. W. Kim, J. Y. Kim, *Analytical Science and Technology*, 34, 68-77 (2021).

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

1. 学会発表  
なし
2. 論文発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



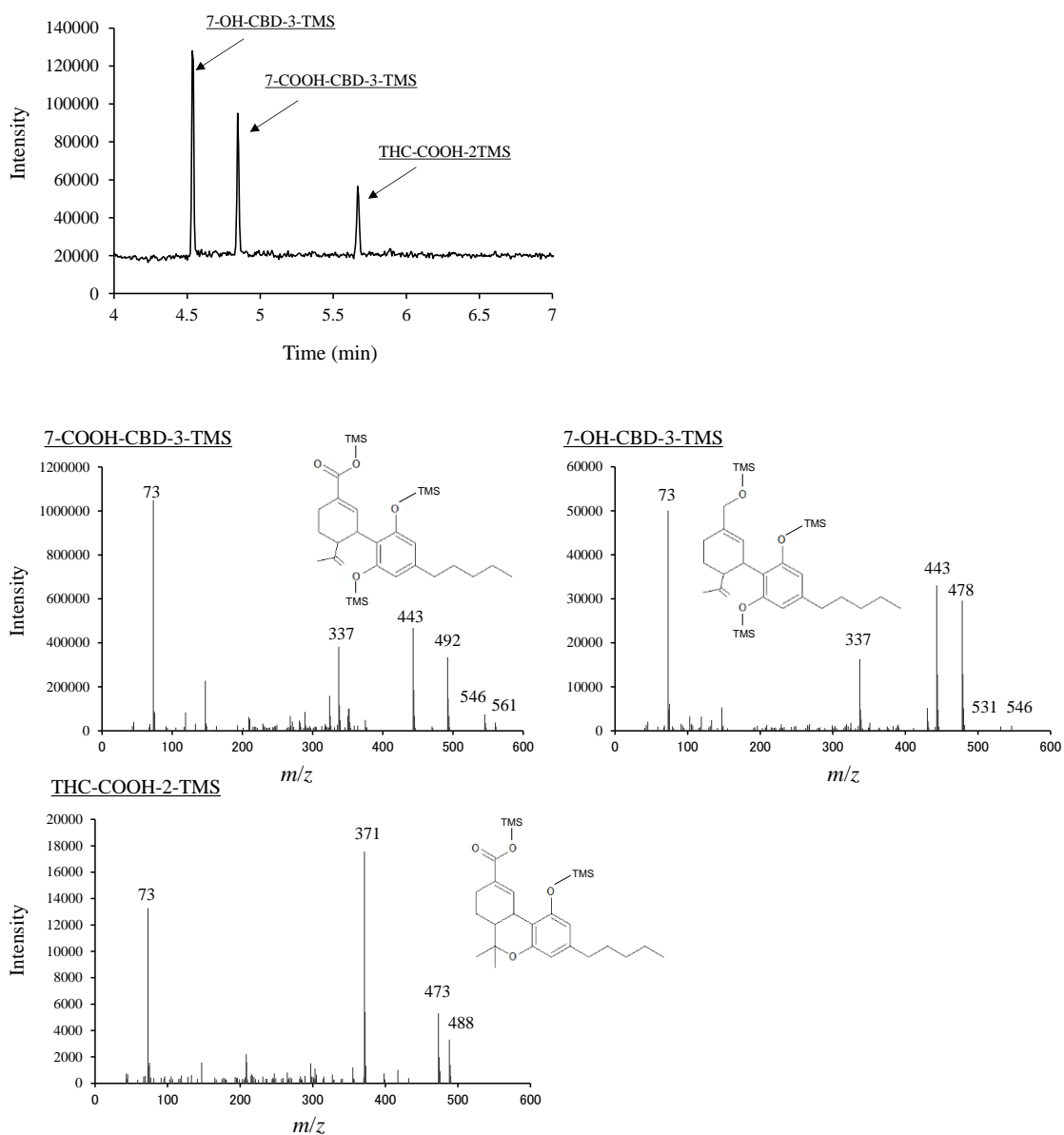


Fig. 1 Total ion current chromatogram and Mass spectrum of 7-COOH-CBD-3TMS, 7-OH-CBD-3TMS and THC-COOH-2TMS measured by GC/MS.

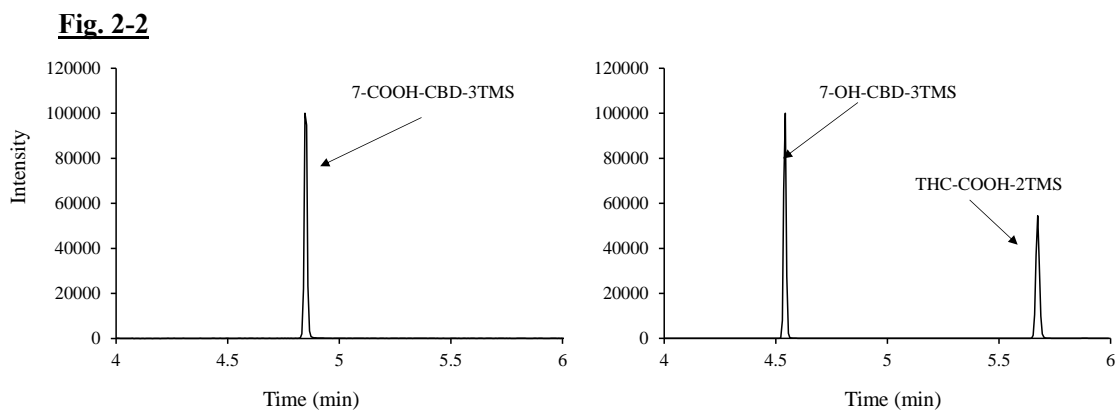
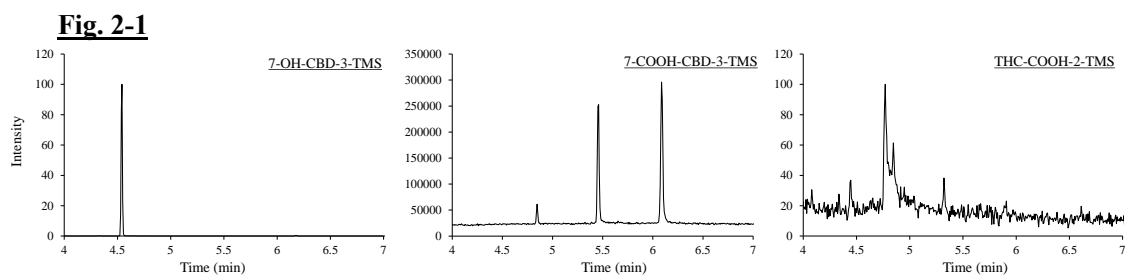


Fig. 2 TIC of 7-OH-CBD, 7-COOH-CBD and THC-COOH 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in hexane or acetonitrile solution measured by GC/MS. 2-1: hexane solvent. 2-2: acetonitrile solvent.

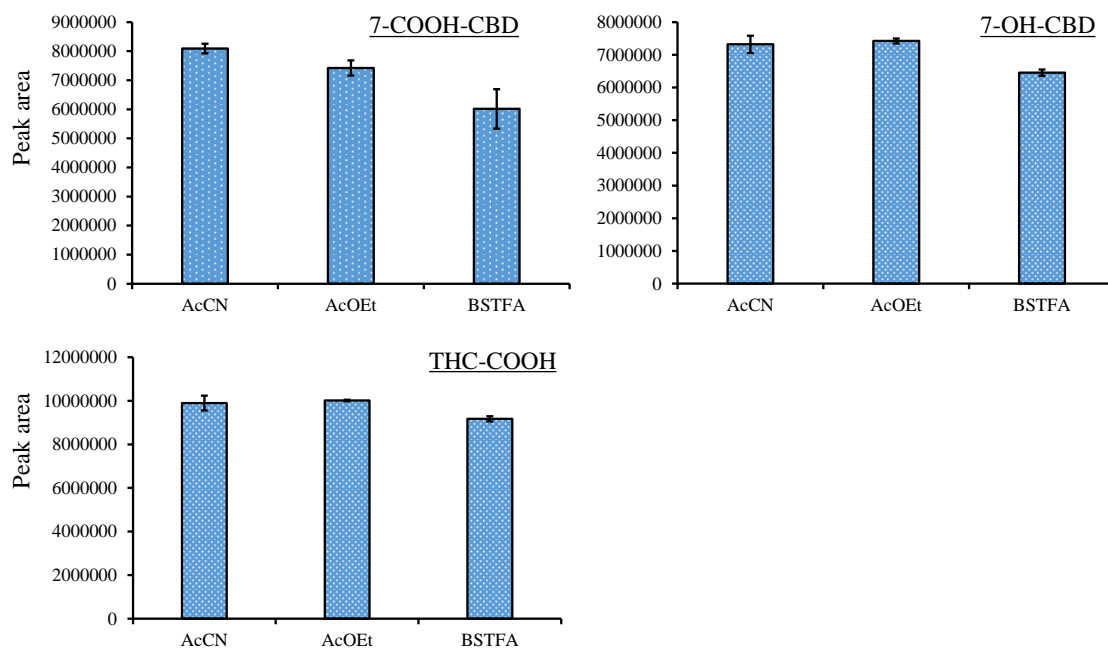


Fig. 3 Comparison of peak areas of substances measured by GC/MS using each solvent.

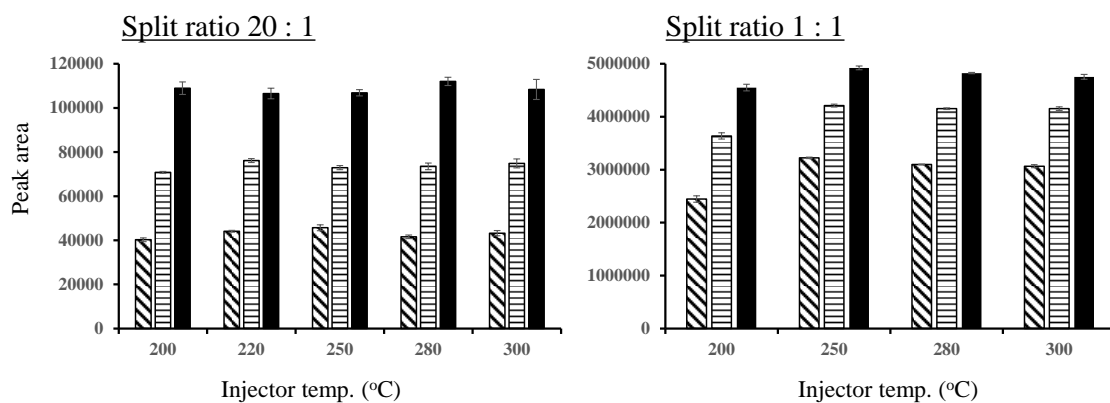


Fig. 4 Comparison of peak areas of substances measured by GC/MS at each injector temperatures. ■ 7-OH-CBD. ▨ 7-COOH-CBD. □ THC-COOH

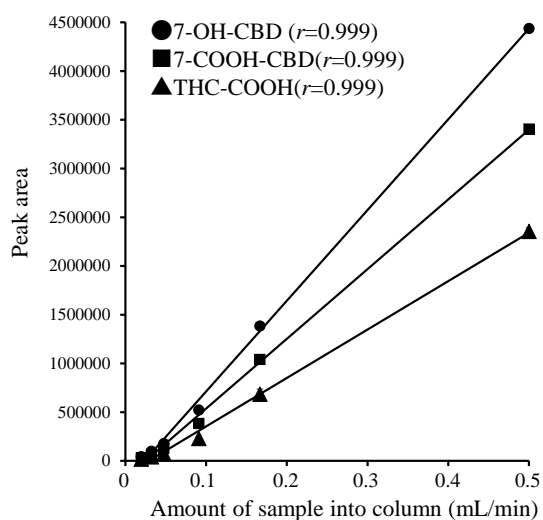


Fig. 5 Relationships of between peak areas of substances with amount of sample introduced into column measured by GC/MS.

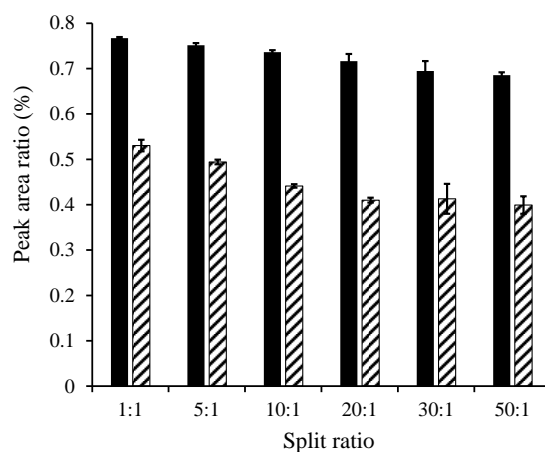


Fig. 6 Comparison of peak area ratio and each split ratio measured by GC/MS. ■ 7-COOH-CBD/7-OH-CBD. ▨ THC-COOH/7-OH-CBD.

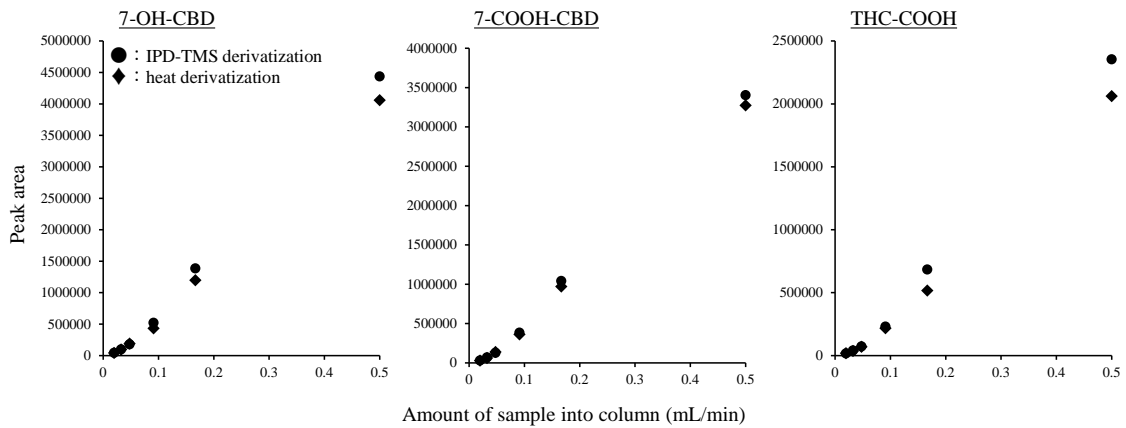


Fig. 7 Relationships of between peak areas of substances with amount of sample introduced into column measured by GC/MS at IPD and heat derivatization. ●: IPD-TMS derivatization. ◆: Heat derivatization.

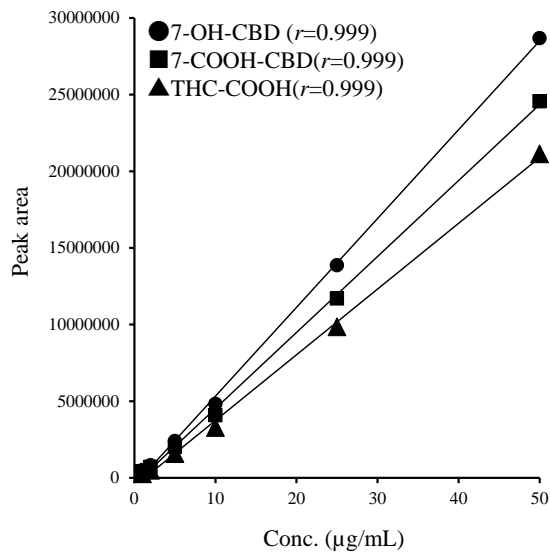


Fig. 8 Calibration curves of each 7-OH-CBD, 7-COOH-CBD and THC-COOH measured by GC/MS.

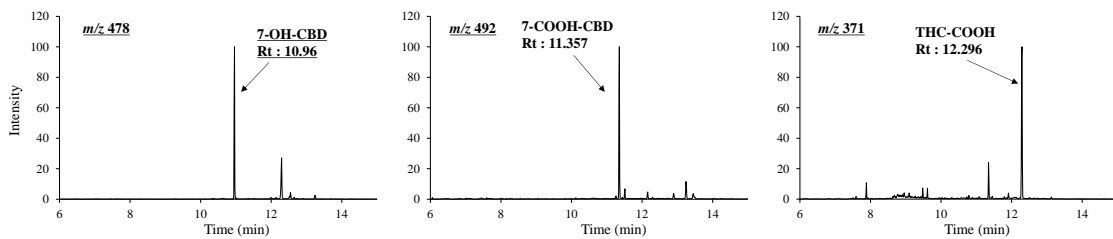


Fig. 9 Chromatograms of each substances monitored ions measured by GC/MS. 7-OH-CBD :  $m/z$  478, 7-COOH-CBD :  $m/z$  492, THC-COOH :  $m/z$  371.

分担研究課題:新規麻薬類および危険ドラッグの標品合成に関する研究

研究分担者:三澤隆史 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長

### 新規麻薬類および危険ドラッグの標品合成に関する研究

研究要旨:近年,大麻の代替品として,大麻の幻覚作用の主体である麻薬成分  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC)や $\Delta^8$ -THC および構造類似の大麻成分誘導体を含有する製品の国内流入が急増している. 上記製品の国内規制に向けた標品の安定供給が重要であるが,  $\Delta^9$ -THC および $\Delta^8$ -THC は合成過程において異性体として混合物として得られる. そこで,  $\Delta^9$ -THC および $\Delta^8$ -THC それぞれを効率的かつ高純度に合成できるルートの検討を行い, 高純度標準品の確保を目指した. また, 合成化合物のコンピュータモデリングによる, カンナビノイド受容体への親和性評価を実施した.

#### A. 研究目的

近年, 危険ドラッグなどの乱用薬物による健康被害が急増して深刻な社会問題となっている. これら規制薬物の迅速で高感度, かつ選択性の高い鑑別法を確立するためには, 高純度な標品の安定供給が重要である. 本分担研究課題では, 新たに報告された麻薬類および危険ドラッグ等を迅速に国内規制するための標品合成を行うことを目的とした.

#### B. 研究方法

合成に使用した試薬・溶媒類は試薬会社から購入したものをそのまま使用した. 反応の追跡は薄層クロマトグラフィー(TLC) (Merck)にて行い, スポットの可視化は紫外線照射(波長 254 nm), およびヨウ素蒸気または, 5w/v%リンモリブデン酸-エタノール溶液による染色にて行った. 化合物精製のためのフラッシュカラムクロマトグラフィーとしては, 中圧カラムクロマトグラフィー用充填カラム (Inject column / Hi-Flash column(山善))を使用し, 検出器としてUV 検出器(254 nm)および蒸発光散乱検出器(ELSD-100X(山善))を備えた装

置 (EPCLC-W-Prep2XY (山善))を使用した. NMR は ECZ600 (JEOL 社)を使用し, 重クロロホルム(CHLOROFORM-D)を用いて室温にて測定した. 化学シフト値( $\delta$ , ppm)はテトラメチルシラン (TMS, 0 ppm), もしくは溶媒シグナルを用いて補正した. 質量分析はIT-TOF MS (Shimadzu 社)あるいは Single Quadrupole Detector (SQD) (Waters 社)を使用し, エレクトロスプレーイオン化法にて測定した. 化合物の純度は ACQUITY UPLC (Waters)にて測定を行った. カンナビノイドと CB1 (5XRA) のドッキングシミュレーションは, Molecular Operating Environment (MOE) 2022.02 を使用して行った. ドッキング計算は一般的なドッキングの標準プロトコルを用いて実施し, CB1-AM11542 複合体の X 線構造(5XRA)<sup>1)</sup>中の AM11542 分子をリガンド結合領域として定義した. まず London dG score でランク付けした上位 30 ポーズに対して, 力場精密化を行い, その後 GBVI/WSA dG 条件で再スコア化 (Refinement: induced fit) し, 5 ポーズを抽出した. 得られた計算結果のうち, 最もエネルギーの低いドッキングスコア (kcal/mol) 結果を比較評価に使用した.

### C. 結果

#### $\Delta^8$ -THC (2)の合成

CBD (1) (997 mg, 3.17 mmol)のトルエン溶液 (50 mL)にパラトルエンスルホン酸一水和物(161 mg, 0.84 mmol)を加え, 100°Cにて16時間攪拌した. 反応溶媒を減圧留去した後に, 水を加え, 酢酸エチルで3回抽出した. 合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後に濃縮し, 粗精製物を得た. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-ヘキサン/トルエン = 4 : 1)にて精製し,  $\Delta^8$ -THC (2)を淡茶色油状物質として得た (371 mg, 収率 37%).

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, CHLOROFORM-D)  $\delta$  : 6.27 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.71 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 3.18 (dd,  $J = 16.2, 4.8$  Hz, 1H), 2.70 (td, 10.2, 4.8 Hz, 1H), 2.49–2.38 (m, 2H), 2.14 (d,  $J = 13.8$  Hz, 1H), 1.92–1.75 (m, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.61 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 1.56 (quint,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 1.38 (s, 3H), 1.35–1.24 (m, 4H), 1.11 (s, 3H), 0.88 (t,  $J = 6.6$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (151MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 154.9, 154.8, 142.8, 134.8, 119.4, 110.6, 110.2, 107.7, 76.7, 44.9, 36.1, 35.5, 31.6, 30.7, 28.0, 27.7, 23.6, 22.6, 18.6, 14.3, 14.1.

#### $\Delta^9$ -THC (3)の合成

CBD (1) (0.944 g, 3.0 mmol)のジクロロメタン溶液 (60 mL)を-78°Cに冷却し, 三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体(555  $\mu\text{L}$ , 4.5 mmol)を加えた. 反応液を-40°Cに昇温し, 40時間攪拌した. 反応液に, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (3 mL), 水 (20 mL)を加えて反応を停止させ, 反応溶液を室温へと昇温した. 生成物をジクロロメタン (20 mL)で3回抽出し, 合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後に濃縮し, 粗生成物を得た. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-ヘキサン:トルエン = 60 : 40 – 45 : 55)にて2度精製し,  $\Delta^9$ -THC (3)を褐色油状物質

として得た (0.292 g, 収率 31%).

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, CHLOROFORM-D)  $\delta$  6.31–6.30 (m, 1H), 6.27 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 6.14 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 4.86 (s, 1H), 3.21–3.19 (m, 1H), 2.47–2.38 (m, 2H), 2.17–2.16 (m, 2H), 1.93–1.89 (m, 1H), 1.71–1.66 (m, 4H), 1.58–1.52 (m, 2H), 1.44–1.36 (m, 4H), 1.34–1.26 (m, 4H), 1.08 (d,  $J = 15.1$  Hz, 3H), 0.88 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, CHLOROFORM-D)  $\delta$  154.7, 154.1, 142.8, 134.4, 123.7, 110.0, 109.0, 107.5, 77.2, 45.8, 35.4, 33.5, 31.5, 31.1, 30.6, 27.5, 25.0, 23.4, 22.5, 19.2, 14.0.

#### コンピュータモデリングについて

$\Delta^8$ -THC および $\Delta^9$ -THC のコンピュータモデリング計算結果では, 計算に用いた CB1 受容体-AM11542 複合体中の, カンナビノイド誘導體 AM11542 と同様に結合することが示唆された. また, CBD (-8.187 kcal/mol)と比較し, それぞれ  $\Delta^8$ -THC (-8.612 kcal/mol),  $\Delta^9$ -THC (-8.736 kcal/mol)と見積もられ,  $\Delta^8$ -THC および $\Delta^9$ -THC は同程度の結合力を示すことが示唆された (Table 1).

### D. 考察

#### $\Delta^8$ -THC (2)について

合成原料である CBD (1) より, 1段階の反応工程を経て合成した. まず, 触媒量のトシル酸存在下にトルエン中100°C加熱反応を行うことで, CBD の2重結合と水酸基間にて環化反応が進行し,  $\Delta^8$ -THC が合成できた (Scheme 1). この環化反応においては, 分離が困難な環化異性体 ( $\Delta^9$ -THC)が生じることが明らかになった. 本合成法では, 精製段階の各フラクションについて GC-MS 解析を行うことで異性体を含まない高純度なフラクションのみを回収し, 目的化合物である  $\Delta^8$ -THC を高純度に合成することに成功した.

#### $\Delta^9$ -THC (3)について

合成原料である CBD (1)より, 2段階の反応工程

を経て合成した。まず、CBD に対して、1.5 倍量に相当する三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体を  $-78^{\circ}\text{C}$  に冷却した条件で添加し、その後  $-40^{\circ}\text{C}$  で長時間攪拌することで、可能な限りの副反応を制御し、目的物である  $\Delta^9\text{-THC}$  の精製に必要な労力を低減している (Scheme 2)。

特になし

#### E. 結論

本年度は、 $\Delta^8\text{-THC}$  および  $\Delta^9\text{-THC}$  の各異性体を高純度に合成することを目指した。CBD を共通出発原料として、環化反応の反応条件を検討することで、 $100^{\circ}\text{C}$  下では  $\Delta^8\text{-THC}$  が、 $-40^{\circ}\text{C}$  下では  $\Delta^9\text{-THC}$  が優先的に合成されることを明らかにした。しかし、各異性体は不純物として混在することが示唆され、二つの異性体を分離する手法の検討を行った。その中で、カラム長の検討やヘキサン・トルエン混液を利用することで、二つの異性体を分離することに成功した。

#### F. 参考文献

#### G. 健康危険情報

なし

#### H. 研究発表

- (1) Kurohara T., Ito T., Tsuji G., Misawa T., Yokoo H., Kawamura M., Shoda T., Hanajiri-Kikura R., Demizu Y. *Heterocycles*, **106**, 82-93 (2023).

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

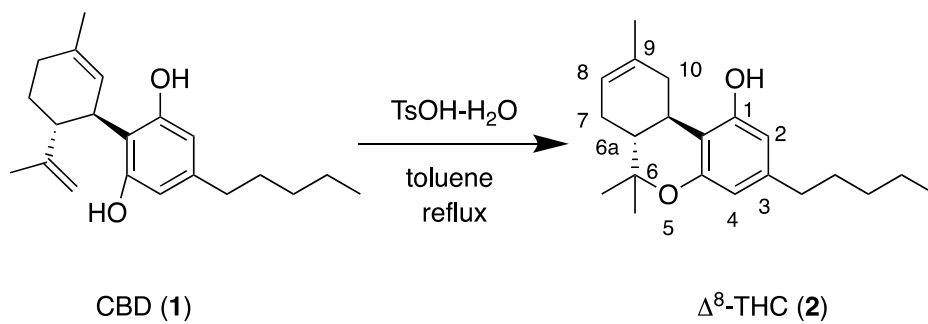
特になし

##### 2. 実用新案登録

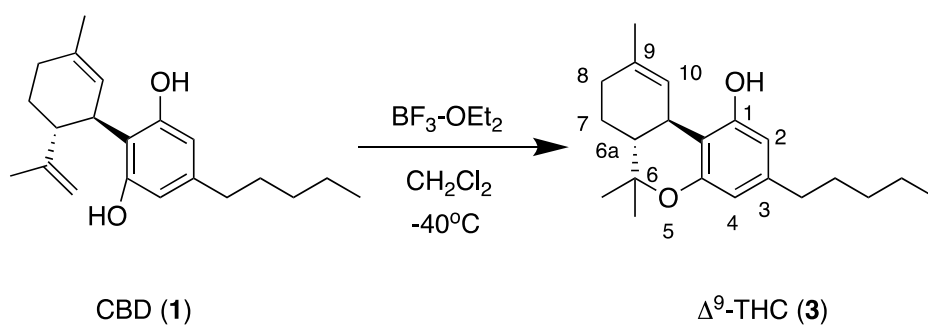
特になし

##### 3. その他

Scheme 1.  $\Delta^8$ -THC-O (3)の合成ルート



Scheme 2.  $\Delta^9$ -THC-O (5)の合成ルート





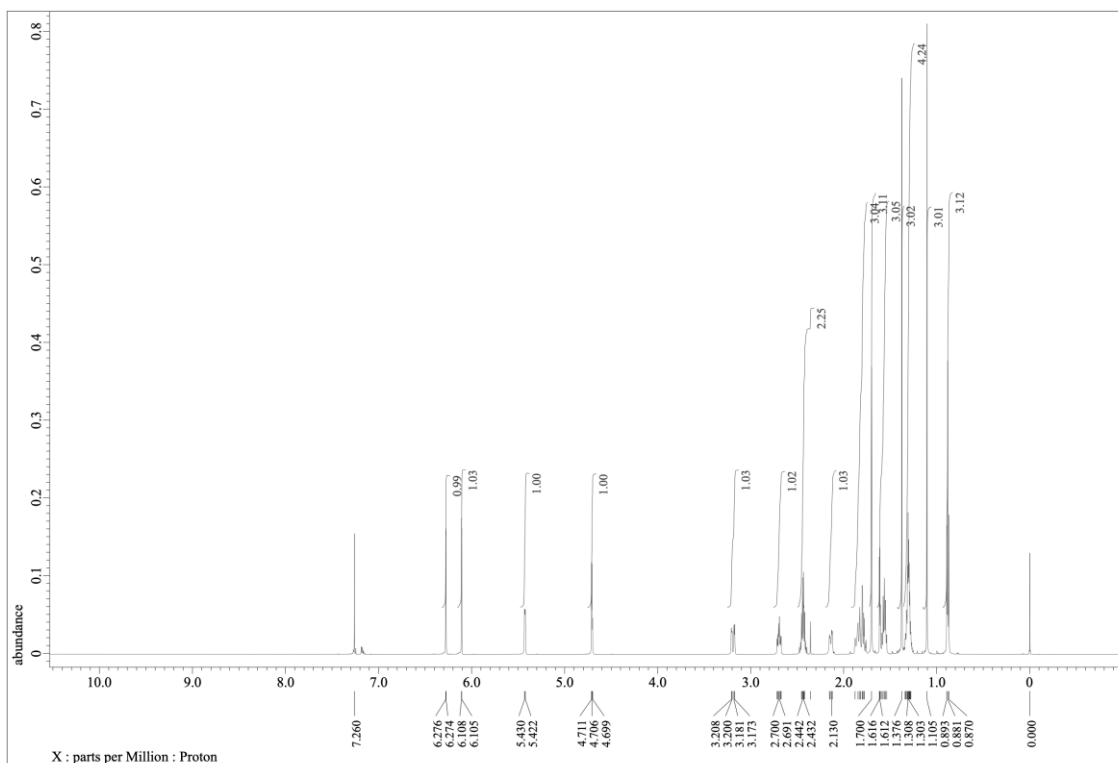


Fig. 1.  $\Delta^8$ -THC (2)の $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

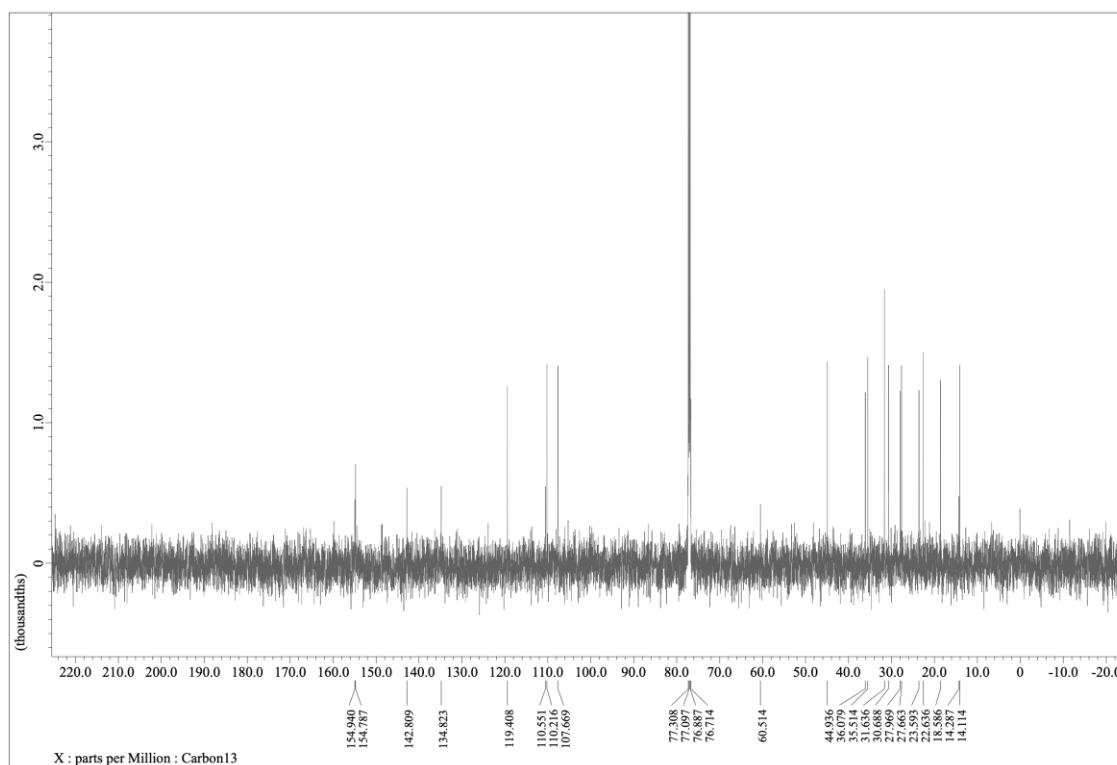


Fig. 2.  $\Delta^8$ -THC (2)の $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル

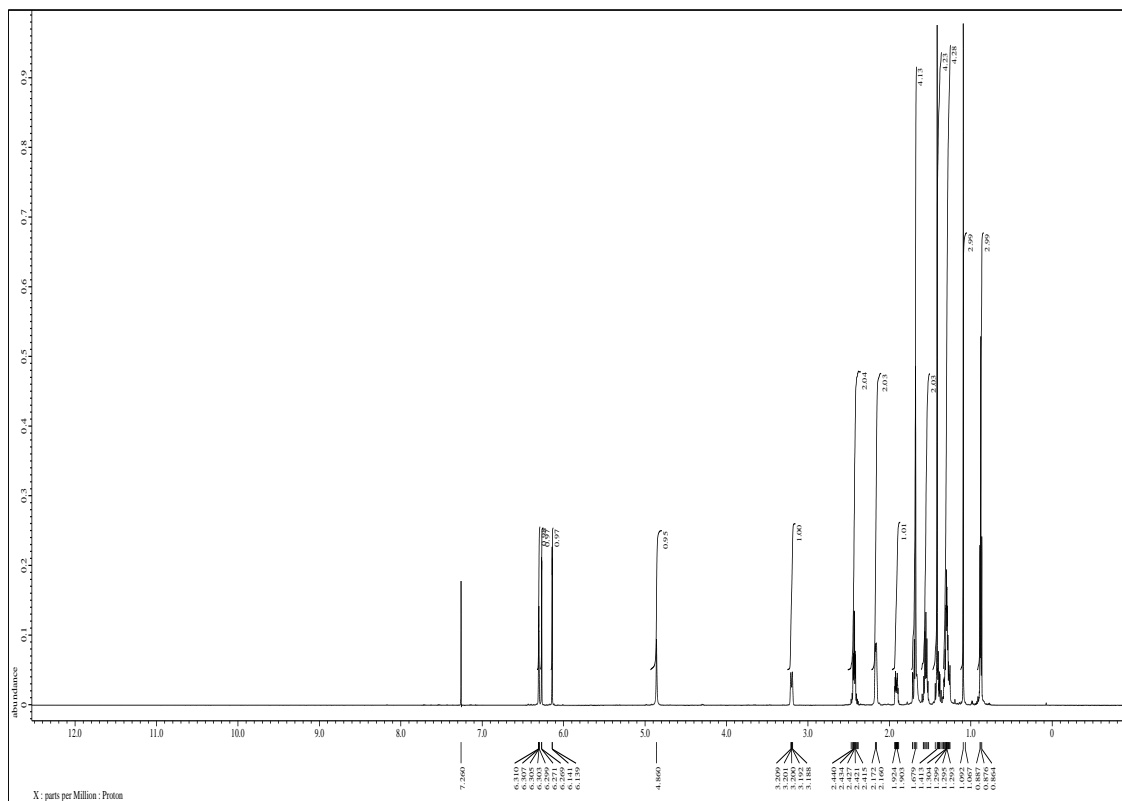


Fig. 3.  $\Delta^9$ -THC (3)の $^1\text{H}$ -NMR スペクトル

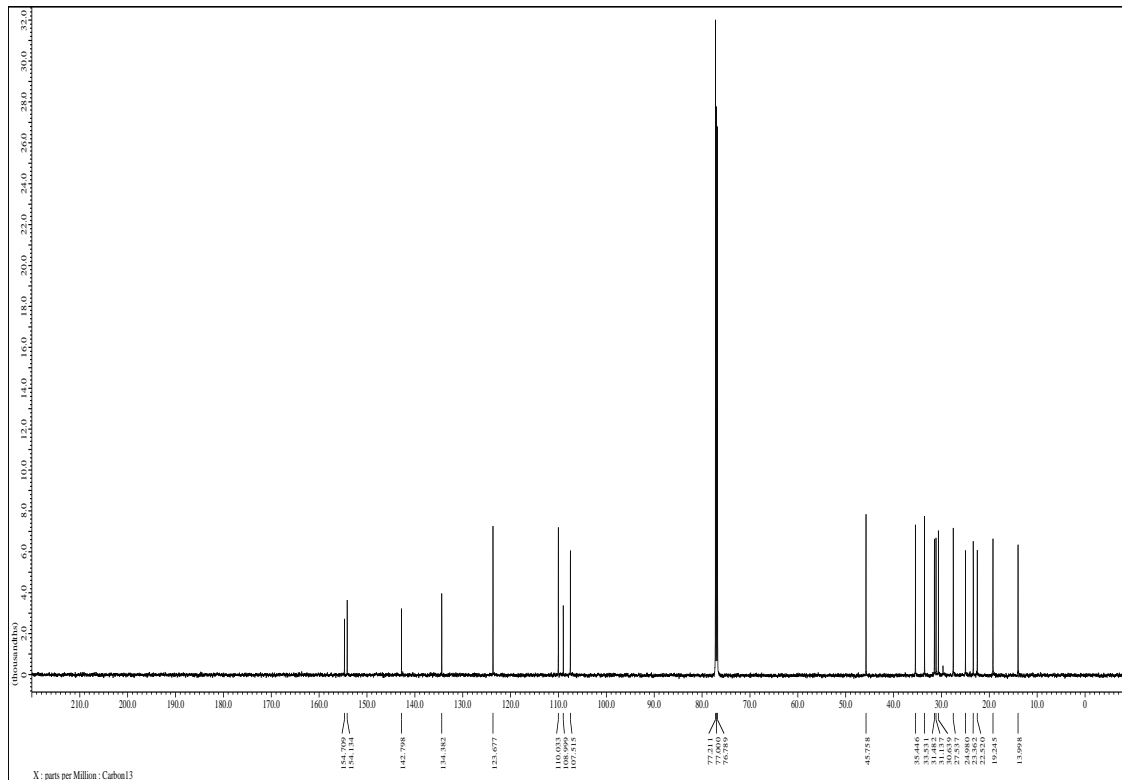
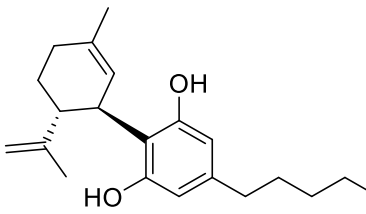
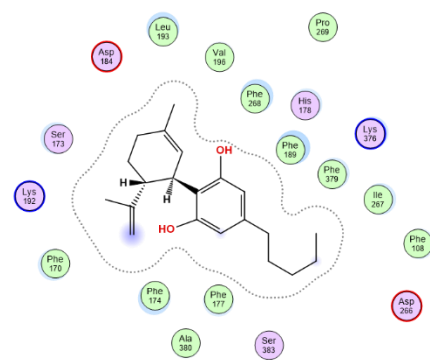
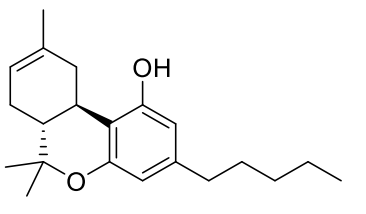
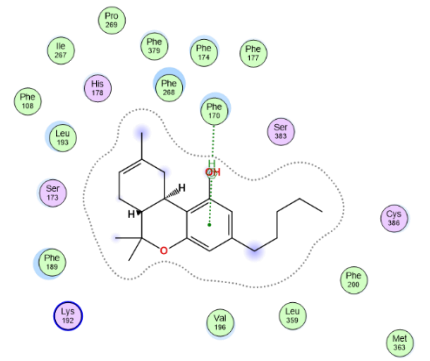
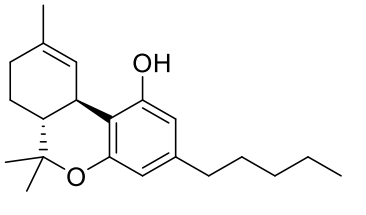
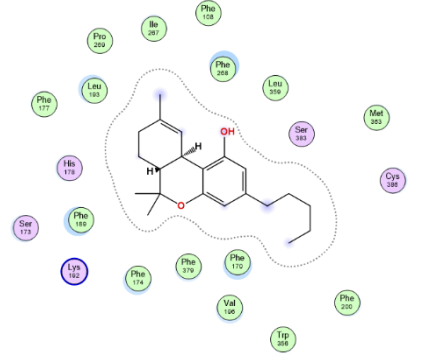


Fig. 4.  $\Delta^9$ -THC (3)の $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル

Table 1. コンピュータモデリング

化合物	構造	S: ドッキングスコア (kcal/mol)	CB1 受容体 (5XRA) とのポーズ
CBD		-8.1872082	
$\Delta^8$ -THC (2)		-8.6118507	
$\Delta^9$ -THC (3)		-8.7364016	

分担研究課題:法規制薬物及び植物の分析と識別に関する研究

研究分担者: 田中理恵 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

THC アナログ, THC<sub>V</sub>, THC<sub>B</sub> および THC<sub>H</sub> 含有を標榜するオイル製品中の成分の同定

研究要旨:令和3年頃より,大麻草由来のカンナビノイドである Hexahydrocannabinol (HHC)を初めてとする THC アナログの含有を標榜する製品がインターネット販売サイト上等で販売されているのが確認されている. HHC は天然の大麻草から検出したとの報告もあるが, CBD などを原料として  $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC)または  $\Delta^9$ -THC を合成し,これを還元することでも得られる. HHC は令和4年3月に指定薬物に指定され規制されている. 最近では HHC より3位のアルキル側鎖が二つ長いヘプチル基である hexahydrocannabiphorol (HHCP)含有を標榜する製品や,  $\Delta^8$ -THC または  $\Delta^9$ -THC, HHC の1位水酸基をアセチル化した化合物である THCO, HHCO の含有を標榜する製品もでてきている. さらに  $\Delta^8$ -THC または  $\Delta^9$ -THC の3位のアルキル側鎖の長さが異なる化合物である THC<sub>V</sub>, THC<sub>B</sub> 及び THC<sub>H</sub> の含有を標榜する製品もでてきている. これらは主に電子タバコ用のリキッドカートリッジ製品としてインターネット上などで売られている.

本研究では,令和3~4年度に入手した THC アナログの含有を標榜する製品のうち  $\Delta^8$ -THC または  $\Delta^9$ -THC の3位のアルキル側鎖の長さが異なる化合物の含有を標榜する4製品について,成分を単離し NMR を用いて各異性体の構造を同定した. その結果,3位のアルキル側鎖が THC<sub>V</sub> の含有を標榜する製品から  $\Delta^8$ -THC<sub>V</sub> と  $\Delta^9$ -THC<sub>V</sub>, THC<sub>B</sub> の含有を標榜する製品から  $\Delta^8$ -THC<sub>B</sub> と  $\Delta^9$ -THC<sub>B</sub> と, THC<sub>H</sub> の含有を標榜する製品から  $\Delta^8$ -THC<sub>H</sub> と  $\Delta^9$ -THC<sub>H</sub> を同定した.

今後も新たな大麻成分由来化合物含有を標榜する危険ドラッグの流通が懸念されるため,継続的な実態調査を行うことが必要と考えられる.

#### A. 研究目的

大麻は世界で最も乱用されている薬物であり,日本においても覚せい剤に次いで二番目に検挙される人数が多い.平成27年度には2167人,平成28年度には2722人,平成29年度には3218人,平成30年度には3762人と大麻事犯の検挙数は増加の一途をたどっており,令和元年は4570人,令和2年は5260人,令和3年は5783人と2年間で1000人以上増加している.この要因として若年層の増加があげられ,令和3年は20代が2823人,20歳未満が994人と前年よりそれぞれ11.1%,12.1%増と報告されている<sup>1)</sup> また中学生が8人,高校生が186人検挙されている.こ

のような若年層の増加により,大麻の乱用による健康被害はもちろん,いわゆる“ゲートウェイドラッグ”としてコカインや覚せい剤などのハードドラッグの乱用につながるものが危惧される.

大麻は大麻草(*Cannabis sativa* L.)及びその製品のことをいう.大麻草はアサ科(*Cannabaceae*)の雌雄異株の一年生草本であり,西アジア~エジプト原産と言われている.紀元前より人類に利用されており,大麻草の茎よりとれる繊維は麻縄や衣服などに,種子は麻の実,ヘンプシードオイルとして食用に,また生薬の麻子仁としても利用される.また大麻草は繁殖力が非常に強いという特徴もある<sup>2-7)</sup>.大麻草にはカンナビノイドと総称され

る炭素、水素、酸素のみからなる化合物群が含まれている (Fig.1). カンナビノイドの中には幻覚作用などの中枢作用を持つ化合物があり、そのため大麻草は古くから乱用されてきた。カンナビノイドのうち $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC)が最も中枢作用が強く大麻草の活性本体である。 $\Delta^9$ -THCは生の植物体中ではフェノールカルボン酸体である tetrahydrocannabinolic acid (THCA)の状態が存在する。THCA 自体は活性を持たないが、収穫後に乾燥したり、保存中に光や熱によって脱炭酸がおこり $\Delta^9$ -THC へと変化する。現在 120 種類以上のカンナビノイドが存在することが報告されており、このうち cannabidiol (CBD)はフェノールカルボン酸体 CBDA として fiber type の生の大麻草に最も多く含まれるカンナビノイドである。THCA と同じ前駆体 cannabigerolic acid (CBGA)から植物体内で CBDA は生合成される。CBD は $\Delta^9$ -THC のような中枢作用は持たないが抗けいれん作用などの生理活性が見いだされているため医療用として応用されている国もある。

大麻草の成熟した茎や種子のみから抽出・製造された CBD を含有する製品については、大麻取締法上の「大麻」に該当しないとされているため、成熟した茎と種子から製造され違法でないとして標榜する CBD 製品も国内で市販されている。CBD オイル以外にアイソレートパウダーと称された高純度な粉末製品、チョコレートやグミなどの菓子類、コーヒー等の飲料、錠剤やカプセル等のサプリメント製品または石鹸やバスソルトなどの食品以外の製品も出てきている。最近では電子タバコ用のリキッドカートリッジ製品が増えている。

ところで令和 3 年頃より、大麻草由来のカンナビノイドである Hexahydrocannabinol (HHC)を初めとする THC アナログの含有を標榜する製品がインターネット販売サイト上で販売されているのが確認されている。HHC は天然の大麻草から検出したとの報告もあるが、CBD などを原料として  $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC)または  $\Delta^9$ -THC を合成し、これを還元することでも得られる。HHC は

令和 4 年 3 月に指定薬物に指定され規制されている。

さらに最近では HHC より 3 位のアルキル側鎖が二つ長いヘプチル基である hexahydrocannabiphorol (HHCP)含有を標榜する製品が出現している。さらに  $\Delta^8$ -THC または  $\Delta^9$ -THC, HHC の 1 位水酸基をアセチル化した化合物である THCO, HHCO の含有を標榜する製品もでてきている。さらに  $\Delta^8$ -THC または  $\Delta^9$ -THC の 3 位のアルキル側鎖の長さが異なる化合物である THCV, THCB 及び THCH の含有を標榜する製品もでてきている。これらは主に電子タバコ用のリキッドカートリッジ製品としてインターネット上で売られている。

本研究では、令和 3~4 年度に入手した THC アナログの含有を標榜する製品について、成分を単離し NMR を用いて各異性体の構造を同定することにした。今回新規流通危険ドラッグ成分として THC アナログの含有を標榜する 4 製品から同定した 6 化合物について報告する。

## B. 研究方法

令和 4 年度に入手した THC アナログの含有を標榜する 4 製品について GC-MS, LC-MS 分析を行った。未知成分については、NMR の解析により同定した。

### 1. 試料及び試薬

令和 3~4 年度に入手した THC アナログの含有を標榜するのうち 4 製品(オイル 4 製品)を分析に供した。LC-MS の移動相に用いたアセトニトリルは HPLC グレードを使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。分析用標品としては、Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA), Chiron (Trondheim, Norway) より購入した試薬を用いた。また、その他の化合物は、国立衛研において NMR 及び HR-MS 測定により同定したのものを用いた。抽出溶液の膜ろ過には、Ultrafree-MC (0.45  $\mu\text{m}$  filter unit, Merck MILLIPORE 社製)を用いた。

### 2. MS 測定用試料の調製法

オイル製品は 1 mg を使用した。メタノール 1 mL を加えて超音波下 10 分間抽出を行った後、さらに膜ろ過を行い、不溶物を取り除いて測定試料とした。また、試料は適宜希釈して用いた。

### 3. 製品からの成分の単離

製品について、40mg をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し Hex-Hex:EtoAc 50:1-40:1-30:1-1:1 で溶出して成分を単離した。

### 4. GC-MS 分析条件

装置:Agilent 社製 6890N GC 及び 5975 MSD  
カラム:HP-1MS (30 m x 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製), キャリアーガス:He, 1.1 mL/min, 注入法:スプリット 10:1, 注入量:1  $\mu$ L, 注入口温度:250 $^{\circ}$ C, カラム温度:200 $^{\circ}$ C (1 min hold)-5 $^{\circ}$ C/min-310 $^{\circ}$ C (7 min hold), トランスファーライン温度:280 $^{\circ}$ C, イオン化法:EI 法, scan range:m/z 40-550

### 5. LC-MS 分析条件

装置:[UPLC] Waters ACQUITY UPLC/[MS] Waters Single Quadrupole Detector (SQD), カラム:XBridge C18 (2.1 x 150 mm, 3.5  $\mu$ m, Waters 社製), 移動相 A:0.1% ギ酸, 移動相 B:0.1% ギ酸 アセトニトリル/メタノール(60:40), A:B 50:50 (0 min)-10:90 (30 min, 5 min hold), 流速:0.3 mL/min, カラム温度:40 $^{\circ}$ C, 注入量:1  $\mu$ L, 検出:ダイオードアレイ検出器(210 - 450 nm)及び質量検出器, 質量分析条件 イオン化法:ESI 法, ポジティブモード, コーン電圧:30V, キャピラリー電圧:2500V

#### 質量分析条件

イオン化:エレクトロスプレーイオン化(ESI)法, Positive and negative mode, Desolvation gas flow: N<sub>2</sub> 650 L/h, Desolvation gas temp.:350 $^{\circ}$ C, Cone voltage:30 V, Capillary voltage:2500 V, scan range:m/z 120-650

### 6. 高分解能 MS 分析

#### LC-Q-TOF-MS

装置:Acquity UPLC and Xevo G2-X2 QTOFMS (Waters, Milford, MA, USA), カラム:ACQUITY

HSS T3 (2.1 mm i.d. x 100 mm, 1.8  $\mu$ m, Waters 社製), ガードカラム:Van Guard HSS T3 (2.1 mm i.d. x 5 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters 社製), 移動相 A:0.1% ギ酸水溶液, 移動相 B:0.1% ギ酸アセトニトリル溶液, グラジエント条件:50:50 (0 min)-10:90 (30 min, 5 min hold), 測定波長:210-450 nm, 流速:0.3 mL/min, カラム温度:40 $^{\circ}$ C, 注入量:1  $\mu$ L, 検出:フォトダイオードアレイ検出器および質量検出器

#### 質量分析条件

イオン化:エレクトロスプレーイオン化(ESI)法, Positive mode; Source temperature, 120 $^{\circ}$ C; desolvation gas, nitrogen (flow rate of 800 L/h at 400 $^{\circ}$ C); capillary voltage, 2000 V; cone voltage, 20 V; collision energy, 2 V; mass spectral range, m/z 100-1000. Leucine enkephalin [m/z 278.1141 and 508.20783 ([M+H]<sup>+</sup>)] was used as a substance for lock mass ions during the measurements.

### 7. NMR 測定

NMR 装置:JEOL 製 ECZ-600, ECZ-800 または ECA-800

測定核種:<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, 測定溶媒:chloroform-*d* (99.96%), methanol-*d*<sub>4</sub> (99.96%) and dimethyl sulfoxide (DMSO)-*d*<sub>6</sub> (99.96%) (ISOTEC 社製)。

各種 NMR (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC), heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC), HH correlation spectroscopy (HH-COSY), nuclear Overhauser effect (NOE)) 測定を行った。

### C. 研究結果・考察

分析を行った危険ドラッグ 4 製品から 6 種類の新規流通化合物を同定した。今回同定した化合物(1-6)の構造は Fig. 2 に示し, 4 製品(A-D)のアセトニトリル抽出試料の GC-MS, LC-MS データを Fig. 3-10 に示した。化合物の NMR データを Table 1-3 に示した。

製品 A は GC-MS では保持時間 8.33 分に主成分とみられる化合物 1 のピークが検出され(Fig.

3a), そのマスペクトルは Fig. 3b に示す通りであった. LC-MS ではそれぞれ保持時間 18.2 分に  $m/z$  287  $[M+H]^+$  のピークが観測された. NMR 分析の結果, 化合物 **1** は  $\Delta^8$ -THC の 3 位のアルキル側鎖がペンチルでなくプロピルである構造 (6aR,10aR)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-propyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol ( $\Delta^8$ -tetrahydrocannabivarin,  $\Delta^8$ -THCV) (Fig. 2) であると同定した. さらに GC-MS では保持時間 8.59 分に, LC-MS では保持時間 27.8 分にマイナー成分とみられる化合物 **2** のピークが検出された (Fig. 3a, Fig. 4a). LC-MS では  $m/z$  287 に  $[M+H]^+$  のピークが観測され, GC-MS で  $m/z$  286 に分子イオンも観測されたが, そのマスペクトルは化合物 **1** と異なっていた (Fig. 3c).  $\Delta^9$ -THCV の標準品と一致したため化合物 **2** は, 6aR,7,8,10aR-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-propyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol (11 $\alpha$ -hexahydrocannabinol,  $\Delta^9$ -THCV) (Fig. 2) であると同定した.

製品 B は GC-MS では保持時間 9.76, 10.13 分にマイナー成分とみられる化合物 **3** と主成分とみられる化合物 **4** のピークが検出され (Fig. 5a), そのマスペクトルは Fig. 5b, 5c に示す通りであった. LC-MS ではそれぞれ保持時間 20.8, 20.3 分に  $m/z$  301 に  $[M+H]^+$  のピークが観測された. 化合物 **3** と **4** の NMR 分析の結果, それぞれ  $\Delta^8$ -THC と  $\Delta^9$ -THC のアルキル側鎖がペンチルでなくブチルである構造であることがわかった. 以上の結果より, 製品 B に含有される化合物 **3** を *trans*-3-butyl-6aR,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol ( $\Delta^8$ -tetrahydrocannabutol,  $\Delta^8$ -THCB, Fig. 2), 化合物 **4** を *trans*-3-butyl-6aR,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol ( $\Delta^9$ -tetrahydrocannabutol,  $\Delta^9$ -THCB, Fig. 2) と同定した.

製品 C は主成分の CBN の他に, GC-MS では保持時間 12.6 分, LC-MS では保持時間 28.2 分にマイナー成分とみられる化合物 **5** のピークが検出された (Fig. 7a, Fig. 8a). LC-MS では  $m/z$  329

に  $[M+H]^+$  のピークが観測され, GC-MS で  $m/z$  328 に分子イオンも観測された. 化合物 **5** の NMR 分析の結果,  $\Delta^8$ -THC のアルキル側鎖がペンチルでなくヘキシルである構造であることがわかった. 以上の結果より, 製品 C に含有される化合物 **5** の (6aR,10aR)-3-hexyl-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol ( $\Delta^8$ -tetrahydrocannabihexol,  $\Delta^8$ -THCH, Fig. 2) であると同定した.

製品 D は GC-MS では保持時間 13.0 分に主成分とみられる化合物 **6** のピークが検出され (Fig. 9a), そのマスペクトルは Fig. 9b に示す通りであった. LC-MS では保持時間 25.2 分に  $m/z$  329  $[M+H]^+$  のピークが観測された. NMR 分析の結果, 化合物 **6** は  $\Delta^9$ -THC の 3 位のアルキル側鎖がペンチルでなくヘキシルである構造 (6aR,10aR)-3-hexyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol ( $\Delta^9$ -tetrahydrocannabihexol,  $\Delta^9$ -THCH) (Fig. 2) であると同定した. なお製品 D は主成分の  $\Delta^9$ -THCH の他に, GC-MS では保持時間 13.0 分, LC-MS では保持時間 25.8 分にマイナー成分の  $\Delta^8$ -THCH(**5**) のピークも検出された (Fig. 9a, Fig. 10a).

以上, 4 種類のオイル状危険ドラッグ製品について, それぞれの成分を同定した. しかしながら製品中の成分について構造不明の化合物があるため引き続き分析を行う.

#### D. 結論

本研究では, 令和 3~4 年度に入手した 4 種類のオイル状危険ドラッグ製品について, GC-MS, LC-MS 分析, NMR 分析を行った. その結果, THCV の含有を標榜する製品からは,  $\Delta^8$ -THCV と  $\Delta^9$ -THCV, THCB の含有を標榜する製品からは  $\Delta^8$ -THCB と  $\Delta^9$ -THCB を同定した. THCH の含有を標榜する製品からは  $\Delta^8$ -THCH と  $\Delta^9$ -THCH を同定した. 今後も新規のカンナビノイド類似化合物の流通が懸念される. 引き続き危険ドラッグの新規出現を監視していく予定である.

E. 参考文献

- 1) 法務省, 令和4年版 犯罪白書
- 2) 厚生労働省, 「大麻取扱者免許申請に関するパンフレット」, 東京(2016)
- 3) Handbook of Cannabis, Pertwee, R. ed., Oxford(2014)
- 4) 山本郁男, 大麻の文化と科学 –この乱用薬物を考える–, 廣川書店, 東京(2001)
- 5) 厚生労働省, 大麻・けしの見分け方, 東京(2016)
- 6) 船山信次, ファルマシア, 52(9), 827-831(2016)
- 7) 森元聡, ファルマシア, 52(9), 832-836(2016)
- 8) 田中理恵, 花尻(木倉)瑠理:危険ドラッグ製品中の Hexahydrocannabinol (HHC)の同定, 日本法中毒学会第41年会講演要旨集, 2022 pp58.
- 9) 田中理恵, 河村麻衣子, 水谷佐久美, 花尻

(木倉)瑠理:令和3年-令和4年の新規流通危険ドラッグ成分の同定, 第59回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 2022 pp270-271.

F. 健康危険情報

特になし.

G. 研究発表

学会発表

- 1) 田中理恵, 花尻(木倉)瑠理:インターネット上で流通するオイル製品中の THC アナログの同定, 日本薬学会第143年会(2023.3.26, 札幌)

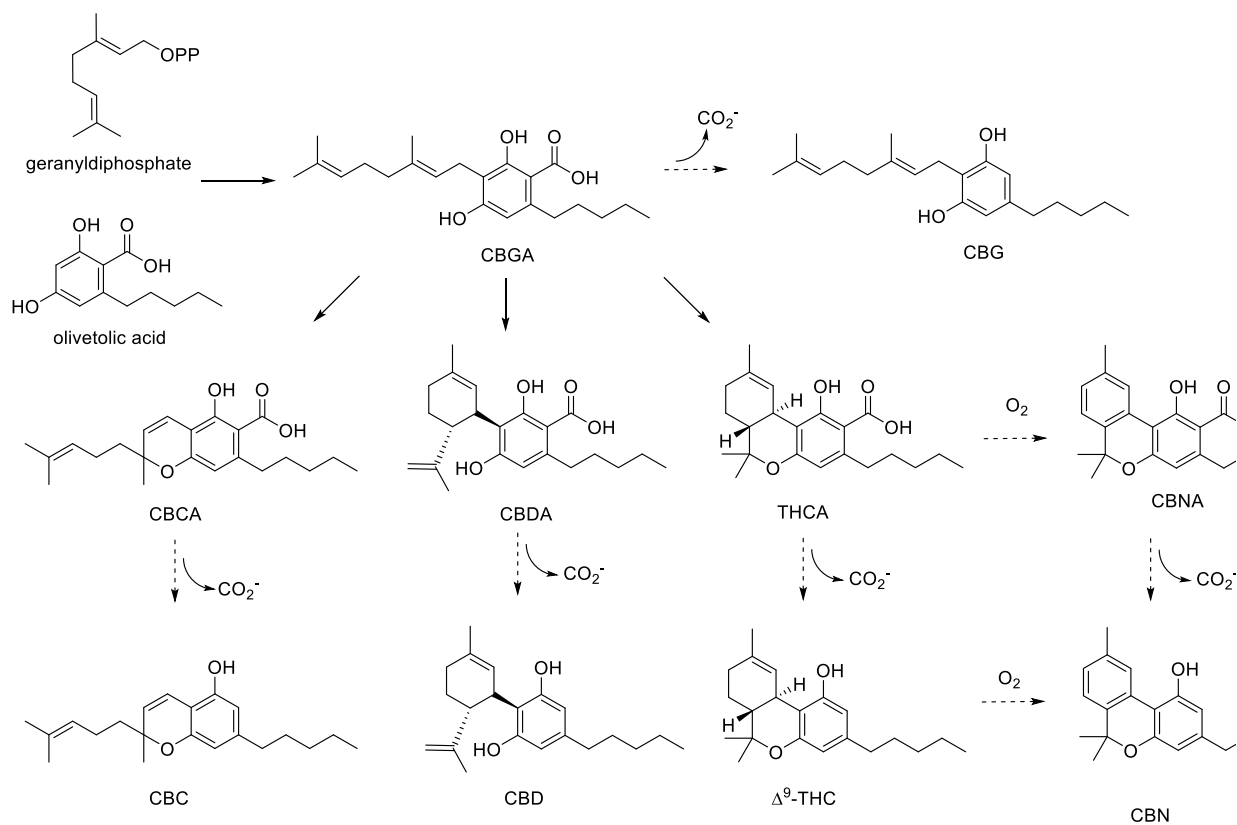
論文発表

なし.

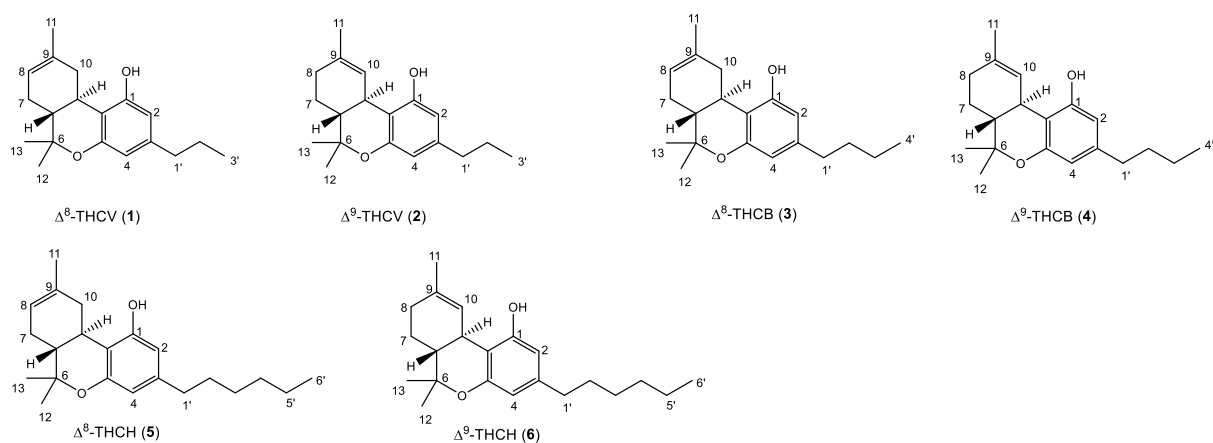
H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.

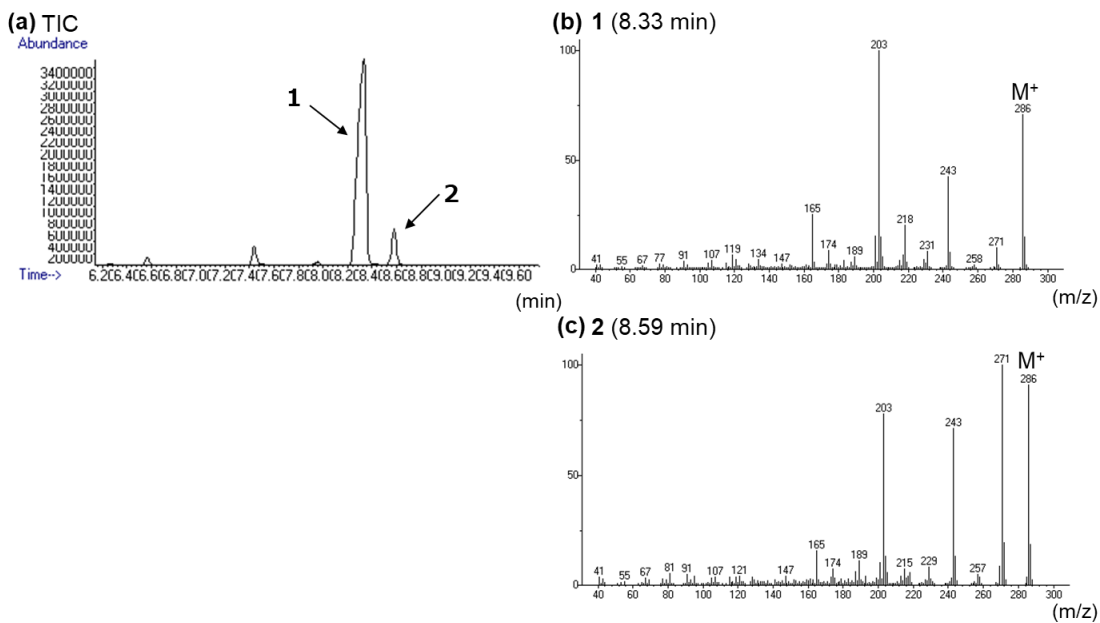




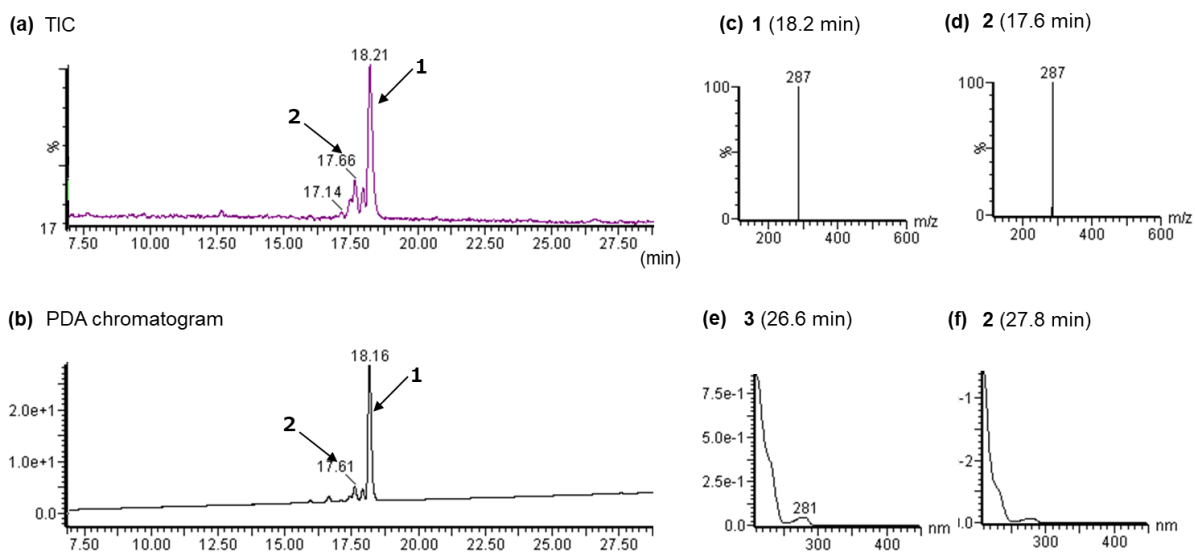
**Fig. 1** Biosynthesis of cannabinoids



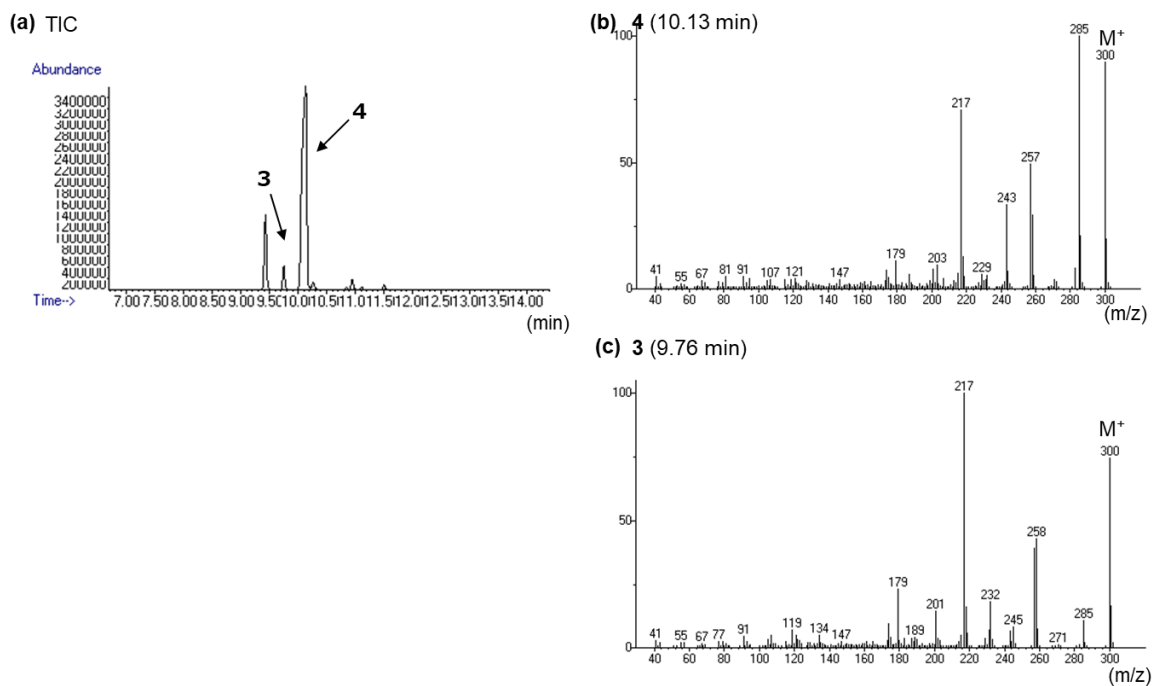
**Fig. 2** Chemical structures of  $\Delta^8$ -THCV,  $\Delta^9$ -THCV,  $\Delta^8$ -THCB,  $\Delta^9$ -THCB,  $\Delta^8$ -THCH and  $\Delta^9$ -THCH.



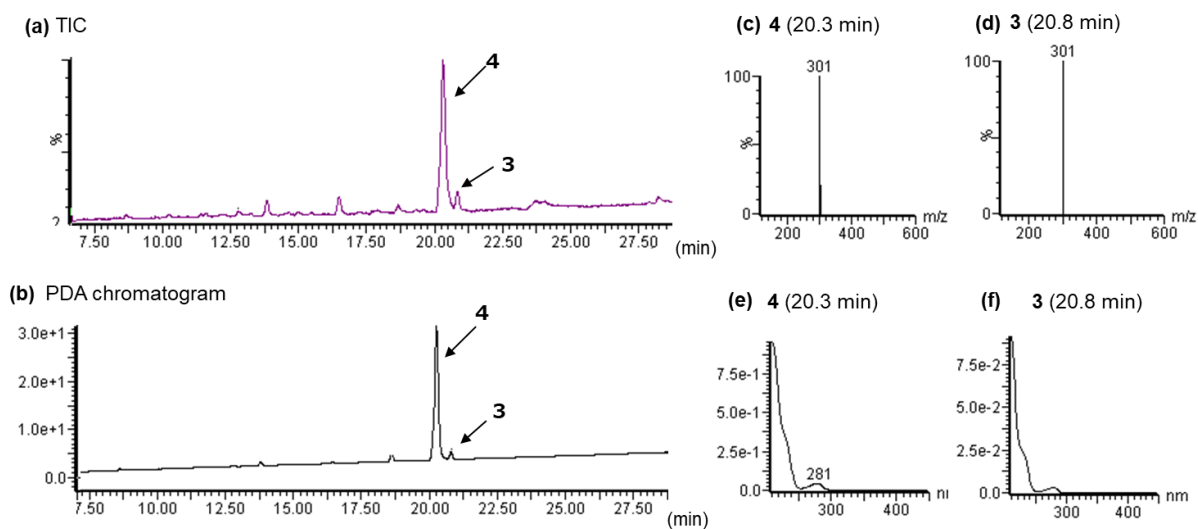
**Fig. 3** GC-MS analysis of Product A. TIC (a), and EI mass spectra of peak 1 (b) and peak 2 (c)



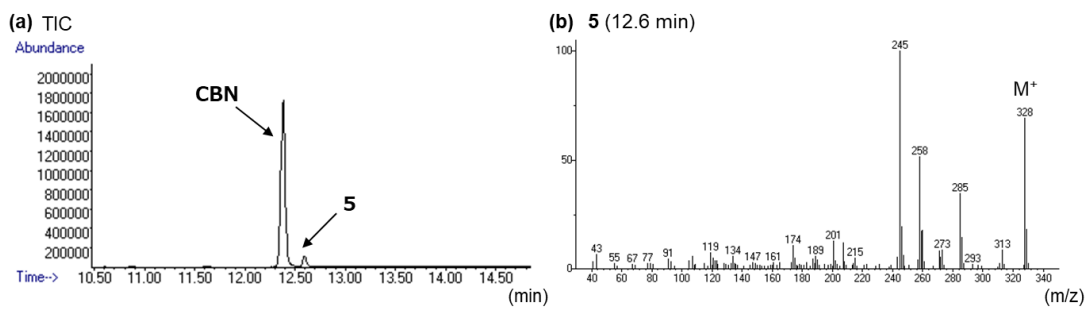
**Fig. 4** LC-MS analysis of Product A. TIC (a), LC-UV-PDA chromatogram (b), ESI mass spectra (c, d) and UV spectra (e, f)



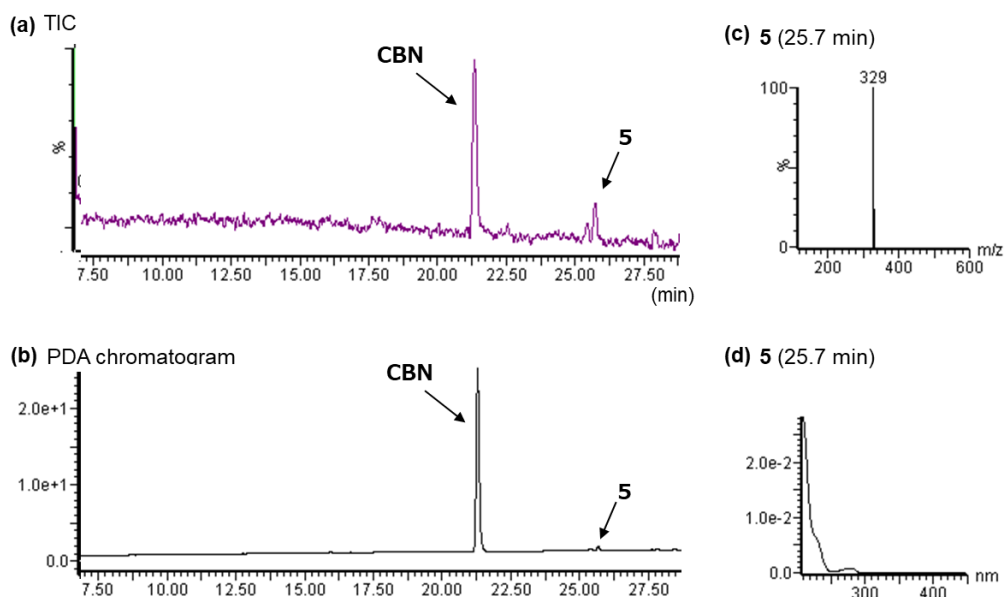
**Fig. 5** GC-MS analysis of Product B. TIC (a), and EI mass spectra of peak 4 (b) and peak 3 (c).



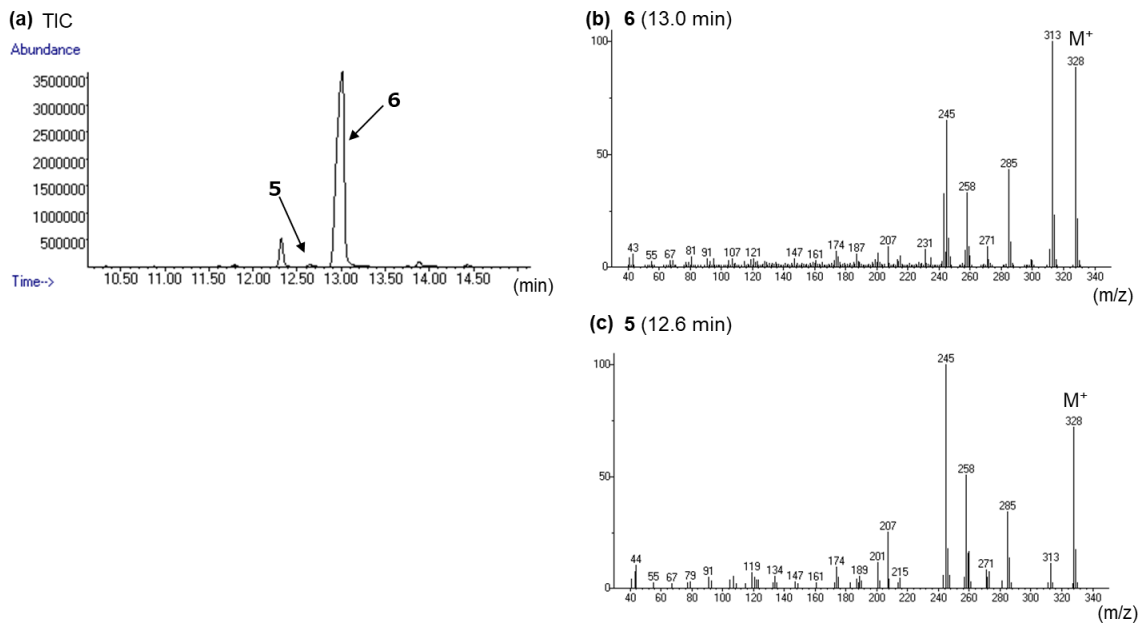
**Fig. 6** LC-MS analysis of Product B. TIC (a), LC-UV-PDA chromatogram (b), ESI mass spectra (c, d) and UV spectra (e, f)



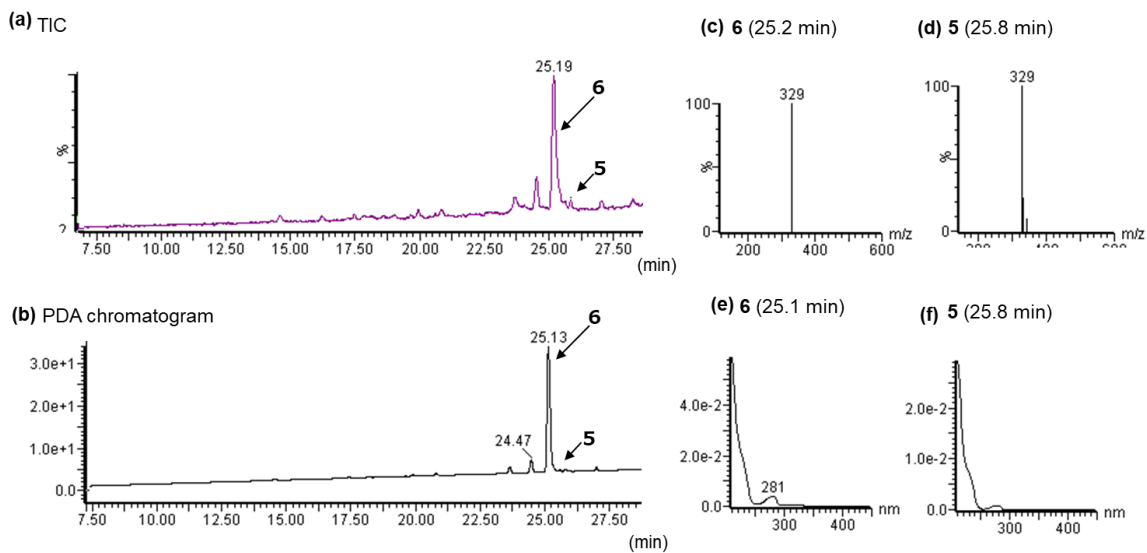
**Fig. 7** GC-MS analysis of Product C. TIC (a), and EI mass spectra of peak 5 (b)



**Fig. 8** LC-MS analysis of Product C. TIC (a), LC-UV-PDA chromatogram (b), ESI mass spectra (c) and UV spectra (d)



**Fig. 9** GC-MS analysis of Product D. TIC (a), and EI mass spectra of peak 6 (b) and peak 5 (c)

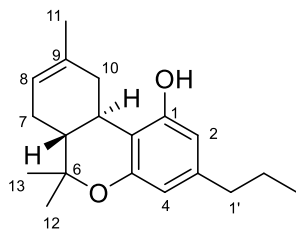


**Fig. 10** LC-MS analysis of Product D. TIC (a), LC-UV-PDA chromatogram (b), ESI mass spectra (c, d) and UV spectra (e, f)

**Table 1** NMR data of  $\Delta^8$ -THCV (**1**)<sup>a</sup>

$\Delta^8$ -THCV ( <b>1</b> ) in Methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>		
No.	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
1	157.8	–
2	108.5	6.38, 1H, d, <i>J</i> =1.4 Hz
3	143.2	–
4	109.8	6.48, 1H, d, <i>J</i> =1.4 Hz
5	155.7	–
6	77.3	–
6a	46.8	1.70, 1H, m, overlapped
7	29.0	1.80, 1H, m, overlapped 2.14, 1H, m
8	120.4	5.44, 1H, d, <i>J</i> =3.8 Hz –
9	135.8	–
10	37.2	1.82, 1H, m, overlapped 2.76, 1H, dd, <i>J</i> =4.9, 14.7 Hz
10a	33.2	2.54, 1H, ddd, <i>J</i> =4.9, 11.1, 11.1 Hz
10b	111.8	–
11	23.2	1.68, 3H, s
12	18.6	1.06, 3H, s
13	28.0	1.32, 3H, s
1'	38.8	2.38, 2H, t, <i>J</i> =7.8 Hz
2'	25.4	1.57, 2H, m, overlapped
3'	14.2	0.90, 3H, t, <i>J</i> =7.3 Hz

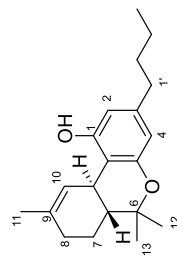
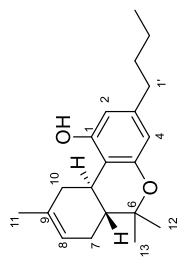
<sup>a</sup> Recorded at 800 MHz (<sup>1</sup>H) and 200 MHz (<sup>13</sup>C), respectively; data in  $\delta$  ppm (*J* in Hz).



**Table 2** NMR data of  $\Delta^8$ -THCB (**3**) and  $\Delta^9$ -THCB (**4**)

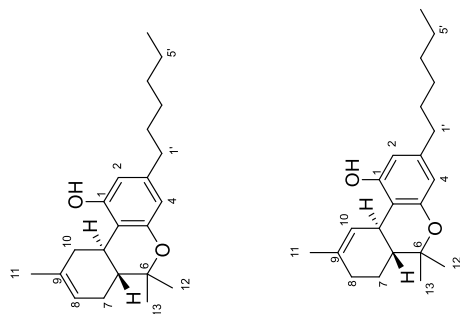
No.	$\Delta^8$ -THCB ( <b>3</b> ) in Methanol- $d_4$		$\Delta^9$ -THCB ( <b>4</b> ) in Methanol- $d_4$	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	157.8	–	155.2	–
2	108.4	6.14, 1H, d, $J=1.6$ Hz	108.4	6.13, 1H, d, $J=1.3$ Hz
3	143.4	–	143.0	–
4	109.7	6.07, 1H, d, $J=1.6$ Hz	109.7	6.06, 1H, d, $J=1.3$ Hz
5	155.9	–	155.8	–
6	77.3	–	77.9	–
6a	46.8	1.68, 1H, m, overlapped	47.5	1.59, 1H, m, overlapped
7	29.0	1.81, 1H, m	26.3	1.39, 1H, m
8	120.4	2.14, 1H, m, overlapped 5.41, 1H, d-like, $J = \text{Hz}$	32.3	1.93, 1H, m 1.51, 1H, m, overlapped 2.16, 1H, m
9	135.8	–	133.5	–
10	37.2	1.67, 2H, m, overlapped	126.2	5.96, 1H, s
10a	33.2	2.61, 1H, ddd, $J=4.9, 11.5, 11.5$ Hz	35.2	3.02, 1H, d-like, $J=12.8$ Hz
10b	111.7	–	110.4	–
11	23.8	1.67, 3H, s	23.6	1.65, 3H, s
12	18.6	1.05, 3H, s	19.4	1.04, 3H, s
13	28.0	1.32, 3H, s	28.0	1.36, 3H, s
1'	36.3	2.39, 2H, m, overlapped	36.3	2.40, 2H, t, $J=7.7$ Hz
2'	34.6	1.52, 2H, m, overlapped	34.6	1.53, 2H, m, overlapped
3'	23.4	1.33, 2H, m, overlapped	23.4	1.33, 2H, m, overlapped
4'	14.3	0.92, 3H, t, $J=7.5$ Hz	14.3	0.92, 3H, t, $J=7.5$ Hz

<sup>a</sup> Recorded at 800 MHz ( $^1\text{H}$ ) and 200 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), respectively; data in  $\delta$  ppm ( $J$  in Hz).



**Table 3** NMR data of  $\Delta^8$ -THCH (**5**) and  $\Delta^9$ -THCH (**6**)

No.	$\Delta^8$ -THCH ( <b>5</b> ) in Methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>		$\Delta^9$ -THCH ( <b>6</b> ) in Methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>	
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
1	157.8	—	157.2	—
2	108.4	6.14, 1H, d, <i>J</i> =1.6 Hz	108.4	6.15, 1H, d, <i>J</i> =1.6 Hz
3	143.4	—	143.3	—
4	109.7	6.07, 1H, d, <i>J</i> =1.6 Hz	109.7	6.06, 1H, d, <i>J</i> =1.6 Hz
5	155.8	—	155.8	—
6	77.4	—	77.9	—
6a	46.8	1.70, 1H, m, overlapped	47.4	1.59, 1H, ddd, <i>J</i> =2.0, 12.7, 12.7 Hz
7	29.0	1.81, 1H, m, overlapped	26.3	1.36, 1H, m, overlapped
		2.13, 1H, m		1.93, 1H, m
8	120.4	5.41, 1H, d, <i>J</i> =3.3 Hz	32.3	2.16, 2H, m
9	135.8	—	133.5	—
10	37.2	1.68, 2H, m, overlapped	126.2	6.92, 1H, s
10a	33.2	2.61, 1H, ddd, <i>J</i> =4.8, 11.3, 11.3 Hz	35.2	3.14, 1H, m
10b	111.8	—	116.5	—
11	23.7	1.67, 3H, s	23.6	1.65, 3H, s
12	18.6	1.05, 3H, s	19.4	1.04, 3H, s
13	28.0	1.32, 3H, s	28.0	1.36, 3H, s
1'	36.7	2.40, 2H, t, <i>J</i> =7.8 Hz	36.7	2.39, 2H, t, <i>J</i> =7.8 Hz
2'	32.4	1.53, 2H, m, overlapped	32.4	1.54, 1H, m, overlapped
3'	30.1	1.31, 2H, m, overlapped	30.1	1.30, 2H, m, overlapped
4'	32.9	1.30, 2H, m, overlapped	32.9	1.30, 2H, m, overlapped
5'	23.7	1.30, 2H, m, overlapped	23.7	1.30, 2H, m, overlapped
6'	14.4	0.90, 3H, t, <i>J</i> =7.1 Hz	14.4	0.99, 3H, t, <i>J</i> =7.8 Hz

<sup>a</sup> Recorded at 800 MHz (<sup>1</sup>H) and 200 MHz (<sup>13</sup>C), respectively; data in  $\delta$  ppm (*J* in Hz).



分担研究課題:法規制植物の基原種の分子生物学的同定法に関する研究

研究分担者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—大麻テルペン合成酵素遺伝子配列情報を用いた識別法の検討—

研究要旨: 大麻の花の独特の香りを担う化合物としてさまざまなモノテルペン, セスキテルペンが存在する。これら合成酵素であるテルペン合成酵素の DNA 配列情報が近年報告されている。そこでこれら合成酵素遺伝子がカンナビノイド合成酵素による DNA 型判別法と同様に利用可能かどうか検討する。今回は, 大麻8種を用い, テルペン合成酵素遺伝子の取得を行った。既報のプライマーセットを用い2種のテルペン合成酵素遺伝子断片を取得した。それぞれの合成酵素はイントロン領域に多くの変異が見られ, 大きく2つの型に分けられた。

#### A. 研究目的

大麻樹脂には, さまざまなモノテルペンとセスキテルペンが含まれており, 大麻の花の香りの多くを担い, 大麻製品に独特の香りを与える。セスキテルペンである  $\beta$ -カリオフィレンは哺乳類のカンナビノイド受容体と相互作用し [1], テルペンは, 抗不安作用, 抗菌作用, 抗炎症作用, および鎮静作用に寄与する可能性が示唆されている [2]。植物におけるテルペン生合成には, 2つの生合成経路, メチルエリスリトールリン酸経路およびメバロン酸経路が関与する。これらの経路は, 最終的にテルペン合成酵素 (TPS) に様々な基質を提供する。植物 TPS 遺伝子ファミリーは 6 種のサブファミリーに分類され, 多くの TPS は, 同じ基質から複数の産物を合成する。大麻樹脂のテルペン組成は, 遺伝的, 環境的および発達段階で大幅に異なる [3,4]。大麻テルペンの化学的多様性は, 大麻 TPS 酵素の多様性を反映している。 $\beta$ -カリオフィレンおよび  $\alpha$ -フムレンは, ほとんどの大麻栽培種に存在する。その他に, モノテルペンの  $\alpha$ -ピネン, リモネン, リナロール, セスキテルペンのピサボロール, (*E*)- $\beta$ -ファルネセンなどがある [5]。大麻

“Purple Kush”ゲノムおよびトランスクリプトームの最近の解析により, 30 を超える異なる TPS 遺伝子が特定され, “Finola”で花の毛状突起で高度に発現する 9 つの TPS の生化学的機能が特定された [5]。一方, 大麻に含まれるさまざまなテルペンの多くを担う TPS は, まだ明確にはない [6]。

本研究では, テルペン合成酵素遺伝子の配列情報を用いた大麻種 (品種, 栽培種) の判別法を検討するために遺伝子を取得し, 配列情報の調査を行う。

#### B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

##### 1. 分析試料

- ・メキシコ産系統種子 (1 粒) (M)
- ・繊維用栽培種トチギシロ種子 (1 粒) (T)
- ・大津産トチギシロ種子 (1 粒) (O)
- ・大麻品種 “Hindu kush” (HK), “MAZER” (MZ), “Ultra skunk” (US), “SHARMAN” (SN), “Orange Bud” (OB) (各1粒)

##### 2. 実験方法

各果実 1 粒を用いた。MM 300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した各種子は Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega) 中の溶出液に溶解し、Maxwell 16 (Promega) を用い DNA を抽出・精製した。回収 DNA 溶液各 300 mL 中の 1 mL を PCR 反応に用いた。

実験に用いたプライマーセットは Booth ら[5]記載のものをを用いた(表1)。反応溶液として、酵素には 0.05 mL Ex Taq Hot start version (Takara), PCR 反応試薬には、5mL Ampdirect plus (Shimadzu), 各プライマー 10 pmol とし、全量 10 mL で PCR 反応を行った(95°C 3min; 98°C 10sec, 57°C 30sec, 72°C 120sec, 35cycles ; 72°C 10min)。アガロースゲル(0.8%)電気泳動によりすべてのサンプルでバンドを確認されたもののみ、ダイレクトシーケンスを行った。ダイレクトシーケンスにより良好な結果が得られない場合は、PCR 反応溶液をポリエチレングリコール沈殿後、Mighty TA-cloning Kit(Takara) を用い、塩基配列を決定した。シーケンス反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems) を用い、解析は Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer を使用した。

### C. 研究結果

各分析試料(8種)から抽出した DNA を用い、表1に示すプライマーセットを用い PCR を行った(図1)。すべての分析試料でバンド(PCR 産物)が同サイズで確認できたもののみ塩基配列を調べ、それらの類似性を検索した。プライマーセット CsTPS7FN および CsTPS9FN で、すべての試料から産物が得られた。

CsTPS7FN で得られた PCR産物のアライメント(60~407bp)を図2に示す。イントロン領域に大きな変異がみられ(図2)、2種のタイプの類似配列がメキシコ産系統以外から得れ(A タイプ, B タイプ)。大きくは 2 タイプに分けられ本遺伝子のヘテロ接合度は高い結果であった(図3)。

CsTPS9FN で得られた PCR 産物のアライメント

(78~520bp)を図 4 に示す。イントロン領域に大きな変異がみられ(図4)、2種のタイプの類似配列が4種から得られた(図4, 5)。

### D. 考察

本研究では大麻のテルペン合成酵素遺伝子の多様性に着目し、その配列の違いによる大麻種の判別法の検討を行った。既報[5]のプライマーセット8種(表1)を用い、PCR を行ったがすべての試料から産物が得られたのは2種(図3, 5)のみであった。カンナビノイド合成酵素に比べ、大麻のテルペン合成酵素の DNA 情報が少なく、縮重プライマーの作成ができなかった点がある。一方で、今回得られた配列は Finola で得られた9種のテルペン合成酵素が基になっているが、テルペン合成酵素 Finola\_TPS7 は Finola\_TPS8 (類似度 92%)と類似しており、今回の結果においても Finola\_TPS7 類似配列として示したが(図3, 4)、Finola\_TPS8 とも類似している点は詳細に調査する必要がある。これらはカンナビノイド合成酵素(THCAS, CBDAS, CBCAS)と類似した点である。近年、大麻のゲノム解析、量的形質遺伝子座解析においてカンナビノイド合成とテルペン合成は同一の遺伝子座に位置していることが指摘されている[7]。大麻のカンナビノイドの多様性はこの染色体位置に依存した遺伝子重複によって起こっていることが指摘されており、同様のことがテルペン合成にも起こっていると示唆される。それはテルペン合成酵素のコピー数[5]とリンクしていると考えられる。コピー数の多さは、その遺伝子の配列情報を用いた遺伝子型判別法に不利である。近年、大麻のマリファナ/ヘンプ判別法として報告されている遺伝子型判別法では EU における認定ヘンプ種子の 35%がマリファナと判定されると報告されている[8]。一方で、カンナビノイド合成酵素とテルペン合成酵素の DNA 配列の大きな違いはイントロンの有無であり、イントロンを有するテルペン合成酵素はより多くの多様性を許容でき、大麻種だけでなく産地などにおける多様性をその DNA

情報に反映でき、判別法には有効とも考えられた。

#### E. 結論

大麻8試料(品種, 栽培種)から2種のテルペン合成酵素遺伝子断片を単離し, その配列比較を行った。各遺伝子はイントロン領域に大きく違いが見られ, それぞれ2つのタイプに分離された。

#### F. 参考文献

- 1) Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen JZ, Xie XQ, Altmann KH, Karsak M, Zimmer A, *PNAS*, **105**, 9099-104 (2008).
- 2) Russo EB, *British Journal of Pharmacology*, **163**, 1344-64 (2011).
- 3) Fishedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R, *Phytochemistry*, **71**, 2058-73 (2010).
- 4) Hazekamp A, Fishedick JT, *Drug Testing and Analysis*. 4, 660-7 (2012).
- 5) Booth JK, Page JE, Bohlmann J, *PLoS ONE* **12**, e0173911 (2017).
- 6) Booth JK, Bohlmann J, *Plant Science*, **284**, 67-72 (2019).
- 7) Woods P, Campbell BJ, Nicodemus TJ, Cahoon EB, Mullen JL, McKay JK, *Genetics*,

**219**, iyab099 (2021).

- 8) Borroto FE, Peterseil V, Hackl G, Menges S, de Meijer E, Staginnus C, *J Forensic Sci*, **65**, 715-21 (2020).

G. 健康危険情報  
特になし。

#### H. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表  
なし

#### I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
なし

表 1. 本研究に用いたプライマーセット[5]

Gene ID	F primer	Tm	R primer	Tm2
CsTPS2FN	ATGCATTGCATGGCT	44	TTATAAAGGAATAGGGTTAATAAT	53
CsTPS3FN	TGTAGTTTGCCAAAAGCC	62	TTATTTAGGAATATTAATTGGAGTAAT	55
CsTPS4FN	GGTGTATTTTTAGACCAAAATT	56	TTATGTATATAGGGGAATAGGTTC	55
CsTPS5FN	ATGTCACTATCAGGACTAATCTCCACT	63	TCAAATGGGAATGGAAGTGAAGA	66
CsTPS6FN	ATGTCCACTCAAATCTTAGC	55	TTATGGAATTGGATCAATGA	57
CsTPS7FN	ATGTCTAGTCAAGTGTTAGCTTC	55	CTATAATGGGATGGGATCTA	55
CsTPS8FN	TCATCTCAATTAAGTGACAAAA	56	TTAATATGGGATTGGATCTATAAG	56
CsTPS9FN	ATGTCATATCAAGTTTTAGCCTCAT	60	TCATGGGATTTGATCTATAAGTAAC	58

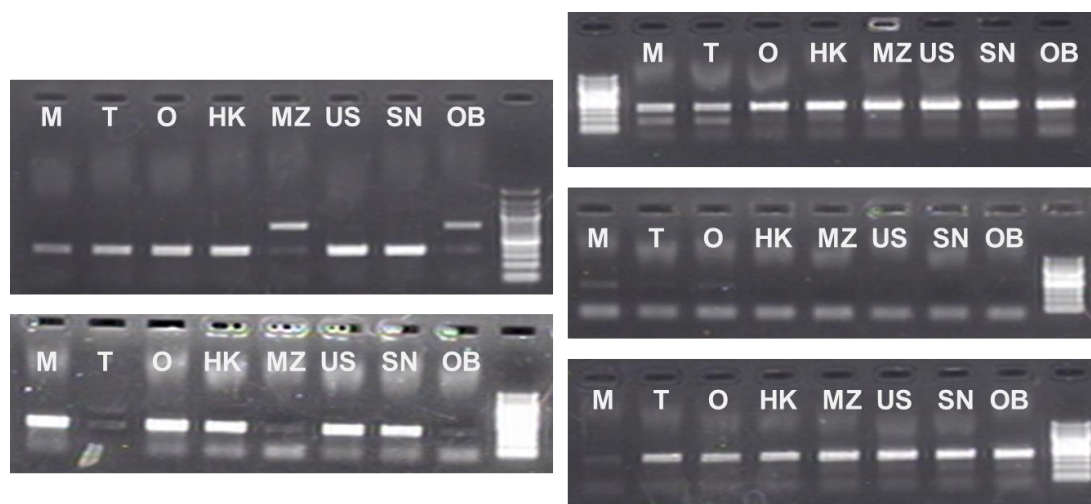


図1. 表1に示すプライマーセットを用いた PCR の電気泳動

M;メキシコ産系統, T;トチギシロ, O;大津産トチギシロ, HK;Hindu kush, MZ;MAZER, US;Ultra skunk, SN;SHAMAN, OB;Orange bud

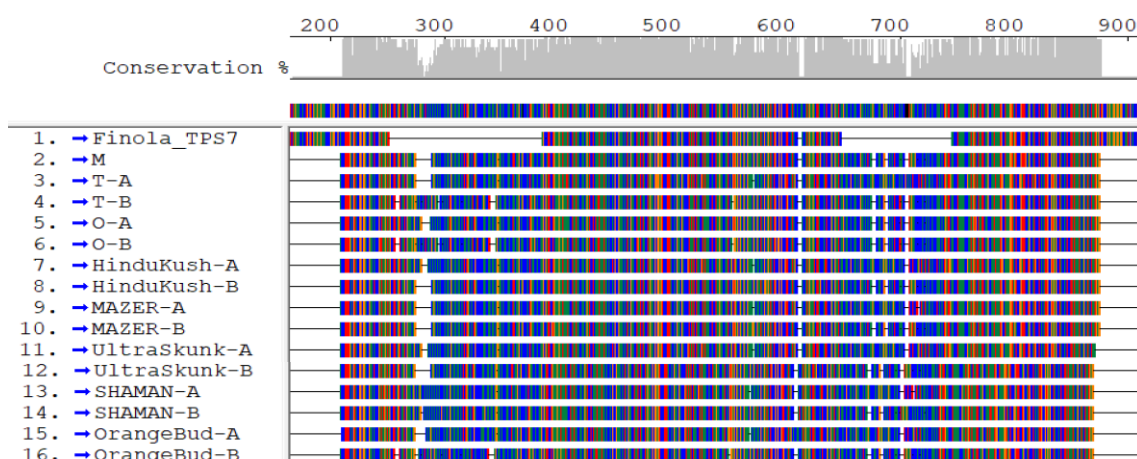


図2. 各試料から得られた Finola TPS7 mRNA との配列アライメント

Finola\_TPS7: フィノーラテルペン合成酵素7遺伝子の mRNA, M;メキシコ産系統, T;トチギシロ, O;大津産トチギシロ.  
 -A,-Bは各々の試料から得られた2タイプを示す.

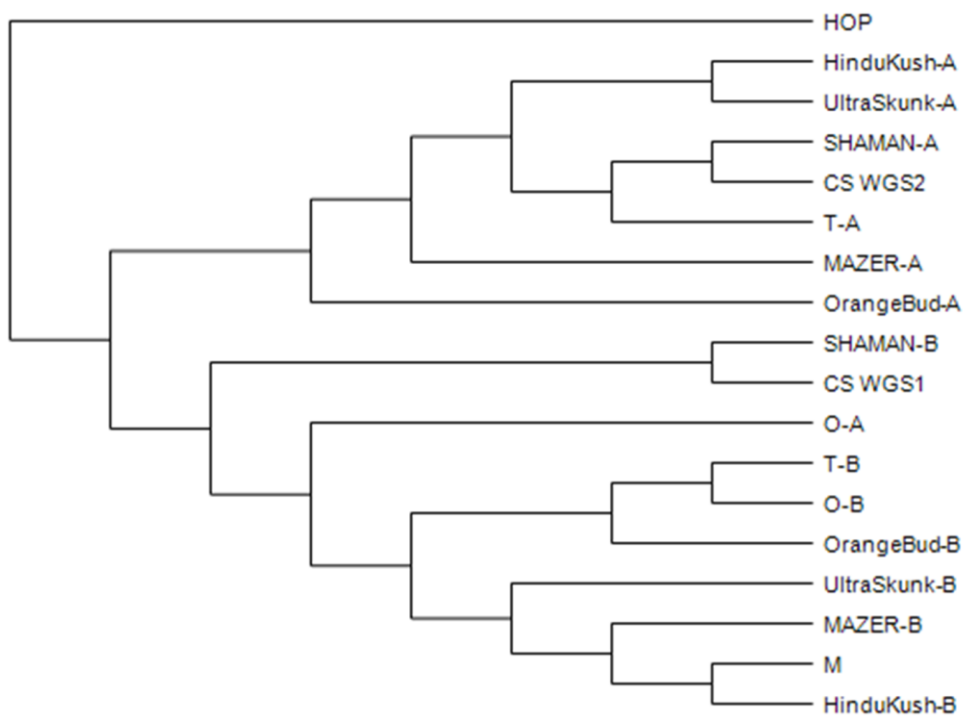


図3. 各試料から得られた Finola TPS7 類似配列の系統解析

HOP;ホップから得られた類似配列(outgroup), CS WGS; 大麻の whole genome shotgun シークエンスによる類似配列

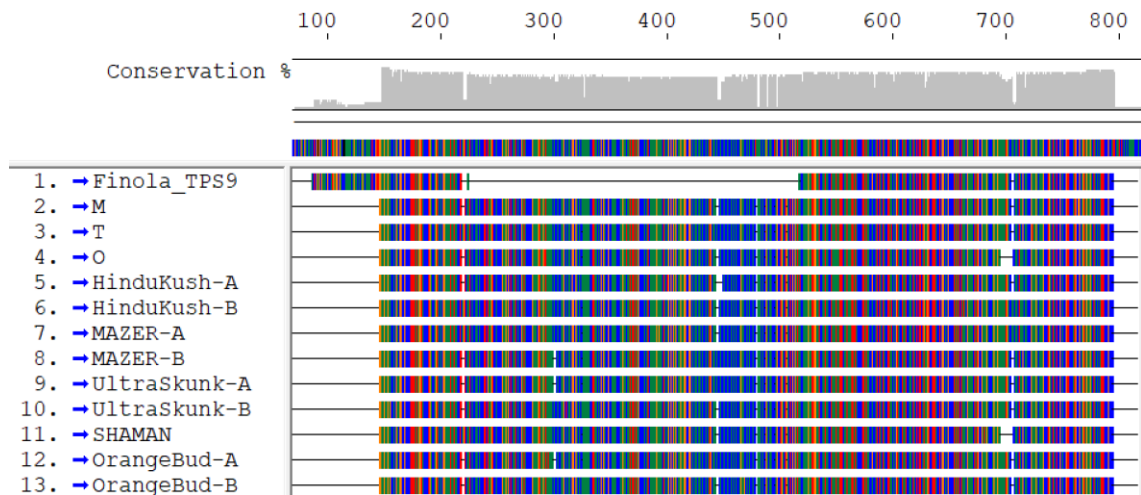


図 4. 各試料から得られた Finola TPS9 mRNA との配列アライメント

Finola\_TPS7: フィノーラテルペン合成酵素9遺伝子の mRNA, M;メキシコ産系統, T;トチギシロ, O;大津産トチギシロ.

-A,-Bは各々の試料から得られた2タイプを示す.

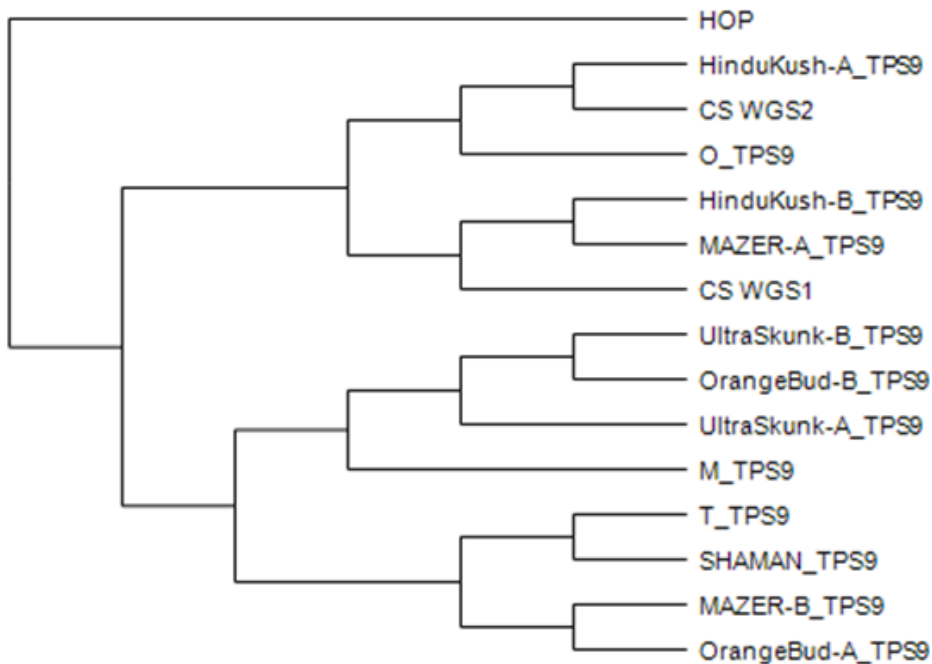


図 5. 各試料から得られた Finola TPS9類似配列の系統解析

HOP;ホップ(outgroup), CS WGS; 大麻の whole genome shotgun シークエンスによるゲノム情報

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
田中理恵, 水谷佐久美, 河村麻衣子, 瀧野裕之, 川原信夫, 花尻(木倉) 瑠理	LC-Q-TOF-MS を用いた大麻草 ( <i>Cannabis sativa</i> L.) のカンナビノイド 11 成分の分析.	薬学雑誌	143	411-418	2023
Kurohara T., Ito T., Tsuji G., Misawa T., Yokoo H., Kawamura M., Shoda T., R. Hanajiri-Kikura, Demizu Y.	Comprehensive synthesis of 20 fentanyl derivatives for use as reference materials.	Heterocycles	106	82-93	2023

令和5年3月31日

厚生労働大臣  
~~(国立医薬品食品衛生研究所長)~~ 殿  
~~(国立保健医療科学院長)~~

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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

2. 研究課題名 法規制薬物の分析と鑑別等の手法開発に向けた研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 生薬部・主任研究官

(氏名・フリガナ) 田中 理恵・タナカ リエ

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

#### その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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

2. 研究課題名 法規制薬物の分析と鑑別等の手法開発に向けた研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 生薬部第3室・室長

(氏名・フリガナ) 花尻 瑠理・ハナジリ ルリ

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣  
—(国立医薬品食品衛生研究所長)— 殿  
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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

2. 研究課題名 法規制薬物の分析と鑑別等の手法開発に向けた研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 有機化学部第二室・室長

(氏名・フリガナ) 三澤 隆史・ミサワ タカシ

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所所属研究機関長 職 名 所長氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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2. 研究課題名 法規制薬物の分析と鑑別等の手法開発に向けた研究3. 研究者名 (所属部署・職名) 生薬部・主任研究官(氏名・フリガナ) 緒方 潤・オガタ ジュン

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。