—原著—

メタンフェタミン摂取者尿中の *p*-ヒドロキシメタンフェタミン抱合体濃度
およびその加水分解条件の検討

志摩典明, 鎌田寛恵, 鎌田 徹, 西川眞弓, 片木宗弘, 土橋 均

大阪府警察本部科学捜査研究所
〒541-0053 大阪府中央区本町1-3-18**The Concentrations of Glucuronide and Sulfate of *p*-Hydroxymethamphetamine in Methamphetamine Users' Urine, and Optimization of Their Hydrolysis Conditions**Noriaki Shima, Hiroe Tsutsumi Kamata, Tooru Kamata, Mayumi Nishikawa,
Munehiro Katagi and Hitoshi Tsuchihashi*Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police H.Q.,
1-3-18 Hommachi, Chuo-ward, Osaka 541-0053, Japan**(Received 8 May 2006; accepted 17 August 2006)*

The urinary concentrations of the main metabolites of methamphetamine (MA), specifically *p*-hydroxymethamphetamine-sulfate (*p*-OHMA-Sul) and *p*-hydroxymethamphetamine-glucuronide (*p*-OHMA-Gul) have been directly measured in MA users using an optimized LC-ESI MS method.

The concentrations of the main metabolites and unchanged MA in 50 MA users' urine ranged from 0.02 to 21.7 $\mu\text{g/ml}$ for *p*-OHMA-Sul, from <0.02 to 2.43 $\mu\text{g/ml}$ for *p*-OHMA-Glu, from <0.005 to 1.33 $\mu\text{g/ml}$ for *p*-hydroxymethamphetamine (*p*-OHMA), from 0.01 to 6.79 $\mu\text{g/ml}$ for amphetamine (AP) and from 0.04 to 133 $\mu\text{g/ml}$ for MA, and the ratios of sulfate to glucuronide (S/G ratios) ranged from 2.2 to 37.1 (13.8 ± 8.1). These results demonstrate that the majority of *p*-OHMA is eliminated as its conjugate and the sulfation is quantitatively more important than glucuronidation for the conjugation of *p*-OHMA in humans. The urinary concentration time-dependency in two MA users have also revealed that the conjugates were mostly excreted in urine within 3 days post-intake.

Both the acid and enzymatic hydrolysis conditions for *p*-OHMA conjugates were also optimized using the authentic standards of *p*-OHMA-Sul and *p*-OHMA-Gul. In the acid hydrolysis, the hydrolysis rate of *p*-OHMA-Sul was faster than *p*-OHMA-Glu, and a 3-h incubation with 1.2 mol/l HCl at 98 degrees Celsius gave complete hydrolysis of *p*-OHMA-Sul and *p*-OHMA-Glu. On the other hand, the enzymatic hydrolysis of two conjugates with Sulfatase Type H-1 from *Helix pomatia* required 6 hours for completion.

* 本論文の内容は日本鑑識科学技術学会第10回学術集会発表における奨励賞を受賞した。

Key words: Methamphetamine, Sulfate, Glucuronide, Hydrolysis, Urine, *p*-Hydroxymethamphetamine

緒言

覚せい剤メタンフェタミン (MA) は、日本をはじめアジア諸国で最も乱用されている薬物で¹⁾、乱用の取り締まりには、尿中の MA およびその代謝物の分析が必要不可欠である。覚せい剤摂取者尿中には、未変化体 MA のほか、アンフェタミン (AP) や *p*-ヒドロキシメタンフェタミン (*p*-OHMA)、*p*-ヒドロキシアンフェタミン、ノルエフェドリン、フェニルアセトン等数種類の代謝物が排泄される。現在、法科学分野における MA の摂取証明は、尿中から MA および代謝物である AP を検出することにより行われている。しかしながら AP は、古くから欧米諸国で広く乱用されている他²⁾、近年我が国でも錠剤としての流通が報告されるようになってきている。さらに、MA を吸引パイプ中で熱しながら摂取する、いわゆる“あぶり使用”により MA が熱分解して一部 AP を生成することも報告されている³⁻⁵⁾。そのため、MA および AP を同

時に摂取する可能性もあり、MA の摂取を証明する上で、流通や加熱生成の認められていない *p*-OHMA が、重要な指標となることも想定される。

ヒトにおける MA の主代謝経路としては、N 脱メチル化により AP へと代謝される経路と芳香環 *p*-位の水酸化により *p*-OHMA へと代謝される経路がよく知られている (Fig. 1)。尿中への排泄量は、未変化体 MA が最も多く、投与量の 37-54% を占め、主代謝物である *p*-OHMA (抱合体を含む) は、代謝物の約 50% を占めることが報告されている^{4,6-9)}。

また、*p*-OHMA は、酸加水分解することにより顕著に増加することから、*p*-OHMA の大部分はさらに抱合化を受けて、尿中に排泄されていることが示されている¹⁰⁻¹²⁾。さらに β -グルクロニダーゼによる加水分解との比較により、その抱合体の大部分はグルクロン酸抱合体であると考えられてきた^{11,12)}。しかしながら近年著者らは、LC/MS およ

Fig. 1. Proposed main metabolic pathways for MA in humans.

び LC/MS/MS を用いて、MA 摂取者尿 3 検体から *p*-OHMA のグルクロン酸抱合体 (*p*-OHMA-Glu) および硫酸抱合体 (*p*-OHMA-Sul) を直接検出、定量し、*p*-OHMA には 2 種の抱合経路が存在することを明らかにした (Fig. 1)¹³⁾。

本研究では、MA 摂取者尿中の *p*-OHMA-Glu と *p*-OHMA-Sul の排泄量およびその排泄割合を明らかにするため、先に確立した LC/MS での一斉分析法により¹³⁾、MA 摂取者尿 50 検体について、MA とその代謝物である AP、*p*-OHMA、*p*-OHMA-Glu、*p*-OHMA-Sul の定量を行った。さらに、MA 摂取者 2 名について、最終摂取から 5 日間にわたり、経時的に尿中代謝物の濃度を測定した。

また、尿中 *p*-OHMA の分析では、通常前処理として加水分解を行った後 GC-MS や LC/MS により検出する方法が用いられる。これまで加水分解条件の報告^{11,12)}はいくつか見られるが、いずれも加水分解前後における *p*-OHMA の増加を観察することにより検討したものであり、直接抱合体をモニターしたものではないため、加水分解が完全に進行しているかどうかは不明である。そのうえ、完全な加水分解条件の構築のためには、排泄される抱合体の種類およびその割合を明らかにすることが不可欠である。そこで本研究では、50 検体の定量値を基準に作製した *p*-OHMA-Glu および *p*-OHMA-Sul の添加尿を用い、加水分解前後の *p*-OHMA および抱合体を直接モニターすることにより、酸および酵素の最適な加水分解条件を検討した。

材料および方法

1 試薬類

methamphetamine・HCl は大日本製薬製を用いた。*p*-OHMA・HCl は Buzas らの方法¹⁴⁾に、AP・HCl は Ogamo らの方法¹⁵⁾に従って合成した。*p*-OHMA-Glu および *p*-OHMA-Sul はいずれも当研究所で合成を行った¹³⁾。内部標準物質 (IS) には、東京化成工業製の β -Phenethylamine (PEA) を用いた。各標準品はメタノールに溶解し、必要に応じて蒸留水で希釈して用いた。

加水分解酵素には、SIGMA 製の Sulfatase Type H-1 (from *Helix pomatia*, sulfatase activity-15.1

units/mg, β -Glucuronidase activity-300~600 units/mg) および Sulfatase Type IV (from Limpets, sulfatase activity-21.5 units/mg, β -Glucuronidase activity-762 units/mg) を用いた。

2 尿試料

平成15年から16年にかけて大阪府警科学捜査研究所に鑑定嘱託された尿試料のうち、予備試験で陽性を示した50検体 (年齢18~64歳 (平均39歳)、男性37名、女性13名) について分析を実施した。また、2名の覚せい剤摂取者については、尿採取の主旨を説明し、同意を得たうえで、最終摂取から5日間にわたって提供を受けた尿について分析を実施した。

3 試料の前処理

尿試料100 μ l に、PEA (1 μ g/ml) 100 μ l およびメタノール500 μ l を添加し混和した後、1500 $\times$ g で10分間遠心分離を行った。上清を窒素気流下、60 $^{\circ}$ Cで蒸発乾固させた後、残さを蒸留水100 μ l で溶解し、その5 μ l を LC/MS に注入した。

4 LC/MS

装置は島津社製 SIL-HTc オートサンプラー、LC-10AD ポンプ、CTO-10A カラムオープンおよびエレクトロスプレーイオン化 (ESI) インターフェース付き島津社製 LCMS2010A システムを用いた。イオン化は ESI のポジティブモードで行い、以下に示す測定条件により分析を行った。LC カラム: L-column ODS セミマイクロカラム (1.5 mm i.d. $\times$ 150 mm, 化学物質評価研究機構製)、移動相: 10 mM ギ酸アンモニウム (pH 3.5)-メタノール (5-40%, 20 min) のリニアグラジエント分析、移動相流量: 0.1 ml/min, プロブ電圧: 4.5 kV, ネブライザー窒素ガス流量: 1.5 l/min, 脱溶媒管温度: 200 $^{\circ}$ C, Q-array 電圧: 10 V¹³⁾。

定量分析は SIM モードで行い、ターゲットイオンとして、*p*-OHMA-Glu は *m/z* 342, *p*-OHMA-Sul は *m/z* 246, *p*-OHMA は *m/z* 166, MA は *m/z* 150, AP は *m/z* 136 および PEA は *m/z* 122 を選定した¹³⁾。

5 加水分解

尿試料として、薬物を摂取していない健常人の尿に *p*-OHMA-Sul および *p*-OHMA-Glu をそれぞれ 30 および 5 μ g/ml の濃度で添加したものを用いた。

(1) 酸加水分解

尿試料100 μ l に、各種濃度 (0.3, 0.6, 1.2, 2.4 mol/l) の希塩酸を100 μ l 添加して終濃度を0.15, 0.3, 0.6, 1.2 mol/l とし、98°Cで加水分解反応を行った。反応時間は、15, 30, 60, 180分として検討を行った。

(2) 酵素加水分解

尿試料100 μ l に10%酢酸および酢酸緩衝液 (pH 5.0) を添加し pH 5.0に調整した後、酵素 (Sulfatase Type H-1) を添加し、37°Cで加水分解反応を実施した。酵素濃度を10, 20, 30 mg/ml, 37°Cでのインキュベーション時間を3, 6, 24時間として検討を行った。加水分解酵素には、スルファターゼ活性と β -グルクロニダーゼ活性を併せ持つ2種類の酵素, Sulfatase Type H-1 (from *Helix pomatia*) および Sulfatase Type IV (from *Limpets*) を用いた。

結果および考察

1 覚せい剤摂取者尿中のMA および代謝物の濃度

MA 摂取者尿50検体について、MA およびその代謝物の濃度をLC/MSにより測定した (Table 1)。Fig. 2 に Subject 37から得られたマスクロマトグラムおよび *p*-OHMA 抱合体のマススペクトルを示した。Subject 1~50におけるMA および各代謝物の濃度は、MA が0.04–133 μ g/ml, AP は0.01–6.79 μ g/ml, *p*-OHMA は<0.01–1.33 μ g/ml, *p*-OHMA-Glu は<0.02–2.43 μ g/ml, *p*-OHMA-Sul は0.02–21.7 μ g/mlであり、これまで報告されているように^{4,6-9)}、最も排泄量が多いのは、いずれの検体においても未変化体MAであった。一方、代謝物の中では、いずれの検体においてもAPもしくは*p*-

Fig. 2. Extracted mass chromatograms obtained from (A) a drug-free and (B) an MA user's (Subject 37) urine sample, and (C) ESI mass spectra of (a) *p*-OHMA-Glu and (b) *p*-OHMA-Sul.

Peaks: a, *p*-OHMA-Glu; b, *p*-OHMA-Sul; c, *p*-OHMA; d, AP; e, MA

Table 1 Urinary concentrations of MA and its metabolites in urine samples from 50 MA users.

Subject (sex)*	MA ($\mu\text{g/ml}$)	AP ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA-Glu ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA-Sul ($\mu\text{g/ml}$)	Subject (sex)	MA ($\mu\text{g/ml}$)	AP ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA-Glu ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA-Sul ($\mu\text{g/ml}$)
1 (M)	133	1.54	1.08	0.56	5.65	26 (M)	15.5	0.39	0.39	0.62	3.79
2 (M)	108	1.93	0.25	0.18	3.00	27 (F)	10.9	0.98	0.19	0.25	2.47
3 (M)	86.3	0.53	0.24	1.06	5.80	28 (F)	10.8	0.81	0.19	0.17	1.60
4 (F)	85.1	3.92	0.82	1.99	15.2	29 (M)	10.6	0.53	1.33	0.96	4.20
5 (M)	75.7	2.56	0.30	0.32	2.80	30 (M)	10.0	2.16	1.11	0.79	6.39
6 (M)	71.6	4.82	0.99	2.43	3.95	31 (F)	6.27	0.57	0.10	0.09	0.67
7 (M)	60.3	1.54	0.58	1.02	5.80	32 (M)	5.95	0.12	0.62	0.14	1.80
8 (M)	55.6	1.87	0.67	0.52	4.70	33 (F)	5.48	1.60	0.16	0.71	2.94
9 (M)	47.6	4.26	0.75	0.91	21.7	34 (M)	5.32	0.17	0.32	0.19	1.80
10 (M)	45.9	0.79	0.90	0.79	4.52	35 (M)	3.52	0.03	0.01	n.d.	0.08
11 (F)	36.3	0.30	0.12	0.11	0.90	36 (M)	3.45	0.98	0.09	0.08	1.31
12 (F)	36.3	4.15	0.59	0.26	4.20	37 (M)	3.42	0.19	0.24	0.24	3.00
13 (M)	33.8	0.69	0.35	0.15	2.10	38 (F)	1.38	0.26	0.05	n.d.	0.30
14 (M)	33.8	1.78	0.99	0.15	4.00	39 (M)	1.18	0.34	0.04	n.d.	0.21
15 (F)	32.0	0.53	1.09	1.68	4.46	40 (M)	1.07	0.17	0.07	0.04	0.74
16 (M)	30.5	0.76	0.12	0.15	1.65	41 (M)	1.06	0.57	0.03	0.06	0.67
17 (M)	30.2	0.78	0.51	0.24	3.70	42 (M)	1.04	0.06	0.43	0.20	3.70
18 (M)	28.1	0.48	0.16	0.44	0.70	43 (F)	0.66	0.20	0.03	0.05	0.21
19 (M)	26.8	6.84	1.00	0.61	6.66	44 (M)	0.37	0.26	0.04	0.02	0.21
20 (M)	21.3	0.97	0.29	0.32	1.80	45 (F)	0.34	0.05	n.d.	n.d.	0.08
21 (M)	21.0	1.19	0.81	0.89	6.46	46 (M)	0.31	0.07	0.02	n.d.	0.10
22 (F)	20.4	1.40	0.20	0.33	1.70	47 (M)	0.20	0.18	n.d.	n.d.	0.25
23 (M)	19.9	0.35	0.48	0.33	0.80	48 (F)	0.19	0.23	0.03	n.d.	0.24
24 (M)	18.7	1.81	1.00	1.06	6.02	49 (M)	0.15	0.05	n.d.	n.d.	0.07
25 (M)	17.8	2.08	0.22	0.69	6.64	50 (M)	0.04	0.01	n.d.	n.d.	0.02

*: M, male; F, female

n.d., not detected

OHMA-Sul が最も高濃度であった。

また、抱合体 *p*-OHMA-Sul と *p*-OHMA-Glu の濃度を比較すると、すべての検体で *p*-OHMA-Sul の排泄量が多く、その比率 (*p*-OHMA-Sul/*p*-OHMA-Glu) は、2.2-37.1 (平均 13.8 ± 8.1 , $n=41$) であった。

さらに、尿中の抱合体の割合 ($(p\text{-OHMA-Glu} + p\text{-OHMA-Sul}) / (p\text{-OHMA} + p\text{-OHMA-Glu} + p\text{-OHMA-Sul})$) は 59.3-100% (平均 $85.3 \pm 8.3\%$, $n=50$) であり、*p*-OHMA の大部分が抱合体として尿中に排泄されていることが示され、これは早川らの報告^{11,12)}とよく一致した。

2 MA 摂取者 2 名における尿中排泄の挙動

代謝物の経時的な濃度変化を調べるため、MA 摂取者 2 名について最終摂取から約 5 日間にわたって代謝物濃度を測定した (Table 2)。Subject 51 (54 才男性) は静脈注射により単回摂取 (摂取量 45 mg)、Subject 52 (32 才男性) は最終摂取 (30 mg) の 7 時間前 (45 mg) と 26 時間前 (45 mg) にそれぞれ静脈注射により MA 塩酸塩を複数回摂取している。

その結果、*p*-OHMA-Glu および *p*-OHMA-Sul は、他の代謝物と同様に、最終摂取から 3 日間で大

部分が排泄された。なお、本研究で用いた尿の液性は pH 6~7 の中性であり、Beckett らの報告によれば⁶⁾、アルカリ尿と酸性尿とでは、MA と AP の排泄パターンは、顕著に変化することから、*p*-OHMA 抱合体の排泄パターンも、尿の液性により変化する可能性も考えられる。また、前項の尿試料 50 検体の結果と同様に、5 日間を通して *p*-OHMA-Sul の排泄量が *p*-OHMA-Glu の排泄量を上回っていることから、*p*-OHMA は主に硫酸抱合体として尿中に排泄されることが示された。

3 加水分解

p-OHMA は、抱合体として排泄される割合が高いため、GC-MS 等を用いて検出する場合、分析に先立ち尿の加水分解が必要である。特に、尿中には主に硫酸抱合体として排泄される (Table 1 および 2) ため、酸およびアリルスルファターゼを用いて、加水分解条件の検討を行った。尿試料として、薬物を摂取していない健常人の尿に *p*-OHMA-Sul および *p*-OHMA-Glu をそれぞれ 30 および 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加したものをを用いた。

(1) 酸加水分解

塩酸濃度を 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 mol/l, 98°C での加温時間を 15, 30, 60, 180 分として加水分解条件を検討

Table 2 Time changes in the urinary concentrations of MA and its metabolites, investigated for two MA users. (A) Subject 51 (a 54-year-old male, single injection)

Time after a final intake (h)	MA ($\mu\text{g/ml}$)	AP ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA-Glu ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA-Sul ($\mu\text{g/ml}$)
9	8.27	0.61	0.55	0.38	2.00
35	8.03	1.63	0.35	0.29	1.85
61	1.32	0.53	0.06	0.04	0.36
83	0.35	0.20	0.02	0.01	0.13
114	0.19	0.12	n.d.	n.d.	0.01

(B) Subject 52 (a 32-year-old male, multiple injections)

Time after a final intake (h)	MA ($\mu\text{g/ml}$)	AP ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA-Glu ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -OHMA-Sul ($\mu\text{g/ml}$)
5	39.6	5.15	0.87	3.23	7.59
44	5.53	2.95	0.13	0.38	1.26
60	0.73	0.60	0.03	0.07	0.36
83	0.40	0.36	0.01	n.d.	0.21
106	0.08	0.05	n.d.	n.d.	0.02

n.d., not detected

Fig. 3. Time-course of remained *p*-OHMA-Sul (◆) and *p*-OHMA-Glu (■), and released *p*-OHMA (▲) during incubation with diluted HCl at 98°C. HCl concentrations examined were (a) 0.15 mol/l, (b) 0.30 mol/l, (c) 0.60 mol/l and (d) 1.20 mol/l.

Initial concentrations were as follows: *p*-OHMA-Sul, 30 µg/ml; *p*-OHMA-Glu, 5 µg/ml; *p*-OHMA, 0 µg/ml. Error bars mean standard deviation (n=3)

した (Fig. 3). その結果, 今回検討した塩酸濃度 (0.15–1.2 mol/l) の場合, 加温時間30分以上で, *p*-OHMA-Sul は完全に加水分解されることが示され, 特に塩酸濃度が0.3 mol/l 以上の場合には, 15分で完全に加水分解が進行した. 一方, *p*-OHMA-Glu を完全に加水分解するには, 塩酸濃度1.2 mol/l で, 180分の加温が必要であった. なお, 今回検討したいずれの条件でも, 加水分解に伴って遊離した *p*-OHMA 量は, 加水分解された抱合体の量と, モル濃度で比較すると概ね一致したことから, *p*-OHMA は抱合体から遊離した後, 塩酸や加熱によって分解 (減少) しないことが示唆された.

以上の結果から, 塩酸濃度を1.2 mol/l, 加温時間を180分とすることで *p*-OHMA 抱合体を完全に加水分解することが可能であった. 但し, 主代謝物である *p*-OHMA-Sul のみを対象とした場合には, 塩酸濃度0.15 mol/l, 加温時間30分で十分に加水分解が進行した.

(2) 酵素加水分解

酵素濃度を10, 20, 30 mg/ml, 37°Cでのインキュベーション時間を3, 6, 24時間として加水分解条件を検討した. 加水分解酵素には, スルファターゼ活性とβ-グルクロニダーゼ活性を併せ持つ2種類の酵素, Sulfatase Type H-1 (from *Helix pomatia*) および Sulfatase Type IV (from *Limpets*) を用いた (Fig. 4).

Sulfatase Type H-1 を用いた加水分解では, 検討した酵素濃度 (10–30 mg/ml) の場合, 24時間のインキュベーションを行うことで, *p*-OHMA-Sul および *p*-OHMA-Glu が完全に加水分解され, 特に酵素濃度が30 mg/ml の場合には, 6時間のインキュベーションで完全に加水分解が進行した. なお, 酸加水分解と同様に, 酵素による *p*-OHMA の分解 (減少) は観察されなかった.

一方, Sulfatase Type IV を用いた加水分解では, 30 mg/ml の酵素濃度で, 24時間インキュベーションを行っても, 約50%の *p*-OHMA-Sul が加水分解

Fig. 4. Time-course of remained *p*-OHMA-Sul (◆), *p*-OHMA-Glu (■) and released *p*-OHMA (▲) during incubation with (a) Sulfatase Type H-1 from *Helix pomatia* and (b) Sulfatase Type IV from Limpets. Amounts of added enzyme were (i) 10 mg/ml, (ii) 20 mg/ml and (iii) 30 mg/ml. Incubation was performed at pH 5 and 37°C.

Initial concentrations were as follows: *p*-OHMA-Sul, 30 μg/ml; *p*-OHMA-Glu, 5 μg/ml; *p*-OHMA, 0 μg/ml. Error bars mean standard deviation (n=3)

されず、遊離した *p*-OHMA 量も、酸や Sulfatase Type H-1 での加水分解と比べて少なかった。

以上の結果から酵素加水分解では、酵素として Sulfatase Type H-1 (from *Helix pomatia*) を用いて、酵素濃度を 30 mg/ml (sulfatase activity-約 450 units/ml, β-Glucuronidase activity-> 9000 units/ml), インキュベーション時間を 6 時間とすることで、短時間で効果的に加水分解を行うことが可能であった。

また、酸および酵素での加水分解を比較すると、酸加水分解の方がより短時間で完全に加水分解が進行した。特に、主代謝物である *p*-OHMA-Sul は、塩酸により容易に加水分解されるため、MA 摂取者尿に対しては酸加水分解が有効である。但し、酸に

よる加水分解は選択性が低く、エステル類やベンゾジアゼピン系薬物等、他の成分も分解される可能性が高いため、分析試料によっては酵素での加水分解の方が有効となる場合も考えられる。

一方、フェノール性水酸基を有する他の薬物についてみると、3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) の代謝物である 4-ヒドロキシ-3-メトキシメタンフェタミンは、*p*-OHMA と同様、主に硫酸抱合体として尿中に排泄され¹⁶⁾、また、モルヒネやサイロシンは、大部分がグルクロン酸抱合体として尿中に排泄される^{17,18)}。このように、薬物によって抱合体の種類やその割合は様々であるため、加水分解を行う時は、その特徴を考慮した上で加水分解条件を決定するのが望ましい。

結 語

MA 摂取者尿50検体について、LC/MS を用いて MA および代謝物の定量分析を行った。さらに、MA 摂取者 2 名について、尿中の経時的濃度変化を観察した。本研究から、ヒトでは、MA の主代謝物である *p*-OHMA は、大部分が第Ⅱ相の抱合反応を受け、主として硫酸抱合体として尿中に排泄されることが明らかとなった (Fig. 1)。更に、抱合体の加水分解条件を検討したところ、希塩酸での酸加水分解が効果的であった。一方、アリルスルファターゼによる酵素加水分解では、酸と比較して *p*-OHMA-Sul の加水分解に長時間を要した。

現在、わが国では代謝物として AP を検出し法科学的な摂取証明を行っている。AP は、尿からの抽出が簡便であるうえ、GC-MS を用いて高感度に分析できるという利点がある。一方、*p*-OHMA は、抱合体の割合が高いため、抽出に先立ち加水分解を行う必要があるものの、代謝物としての特異性が高いうえ、90%以上の検体で、AP よりも尿中排泄量 (抱合体を含む) が多く、より長期間での検出が期待できる。さらに、近年わが国では AP 錠剤の乱用が報告されているため、MA と AP を同時に摂取しているような場合も考えられ、MA 摂取証明の指標としての *p*-OHMA の重要性が、今後益々高まってくるものと思われる。本研究のデータは、*p*-ヒドロキシアンフェタミン類の代謝経路の解明に貢献すると共に、MA 摂取証明を目的とした尿中 MA 代謝物の分析の一助となることが期待される。

文 献

- 1) 警察庁：警察白書 平成16年
- 2) 財団法人 社会安全研究財団：世界のドラッグ問題 (1991)
- 3) Tohhara, S., Kato, A. and Nakajima, T.: Methamphetamine abuse by smoking. *Jpn. J. Alcohol and Drug Dependence*, **25**, 467-474 (1990).
- 4) Cook, C. E., Jeffcoat, A. R., Hill, J. M., Pugh, D. E., Pletta, P. K and Sadler, B. M., *et al.*: Pharmacokinetics of methamphetamine self-administered to human subjects by smoking *S*-(+)-methamphetamine hydrochloride. *Drug Met. Disp.*, **21**, 717-723 (1993).
- 5) Sato, M., Hida, M. and Nagase, H.: Analysis of pyrolysis products of methamphetamine. *J. Anal. Toxicol.*, **28**, 638-643 (2004).
- 6) Beckett, A. H. and Rowland, M.: Urinary excretion of methylamphetamine in man. *Nature*, **206**, 1260-1261 (1965).
- 7) Cook, C. E., Jeffcoat, A. R., Sadler, B. M., Hill, J. M., Voyksner, R. D and Pugh, D. E., *et al.*: Pharmacokinetics of oral methamphetamine and effects of repeated daily dosing in humans. *Drug Met. Disp.*, **20**, 856-862 (1992).
- 8) Baselt, R. C.: Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 6th ed. Year Book Publishers Chicago 646-649 (2002).
- 9) Caldwell, J., Dring, L. G. and Williams, R. T.: Metabolism of [¹⁴C] methamphetamine in man, the guinea pig and the rat. *Biochem. J.*, **129**, 11-22 (1972).
- 10) Caldwell, J.: The metabolism of amphetamines in mammals. *Drug Met. Disp.*, **5**, 219-280 (1976).
- 11) Shimamoto, K., Tomita, M. and Ijiri, I.: Urinary examination of *p*-hydroxylated methamphetamine metabolites in man. *Arch. Toxicol.*, **59**, 135-140 (1986).
- 12) Hayakawa, K., Miyoshi, Y., Kurimoto, H., Matsushima, Y., Takayama, N., Tanaka, S. and Miyazaki, M.: Simultaneous determination of methamphetamine and its metabolites in the urine samples of abusers by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Bio. Pharm. bull.*, **16**, 817-821 (1993).
- 13) Shima, N., Tsutsumi, H., Kamata, T., Nishikawa, M., Katagi, M., Miki, A. and Tsuchihashi, H.: Direct determination of glucuronide and sulfate of *p*-hydroxymethamphetamine in methamphetamine users' urine. *J. Chromatogr. B*, **830**, 64-70 (2006).
- 14) Buzas, A. and Dufour, C.: Sur la preparation de la B-(paraoxyphenyl)-i-sopropyl-methylamine. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **17**, 139-140 (1950).

- 15) Ogamo, A., Ueda, M. and Fukumoto, M.: *N*-demethylation of methamphetamine and selegiline. *Jpn. J. Forensic Toxicol.*, **19**, 140–141 (2001).
- 16) Shima, N., Tsutsumi, H., Katagi, M., and Tsuchihashi, H.: Excretion of the sulfate and glucuronide of 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA), the main urinary metabolite of MDMA, and their hydrolysis conditions. *Jpn. J. Forensic Toxicol.*, **23**, 124–125 (2005).
- 17) Romberg, R. W. and Lee, L.: Comparison of the hydrolysis rates of morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide with acid and β -glucuronidase. *J. Anal. Toxicol.*, **19**, 157–162 (1995).
- 18) Kamata, T., Nishikawa, M., Katagi, M. and Tsuchihashi, H.: Optimized glucuronide hydrolysis for the detection of psilocin in human urine samples. *J. Chromatogr. B*, **796**, 421–427 (2003).