大麻草の裁判化学的研究 III.¹⁾
大麻成分検出法の実際鑑定への応用 (2)

荒牧繁一郎, 富安 温子,^{2a)} 吉村 英敏, 塚元 久雄^{2b)}
九州地区麻薬取締官事務所,^{2a)} 九州大学薬学部^{2b)}

Forensic Chemical Studies on Marihuana. III.¹⁾
Application of the New Detection Method of Marihuana Constituents
to the Practical Identification of Marihuana (2)

HAN'ICHIRO ARAMAKI, NAKO TOMIYASU,^{2a)}
HIDETOSHI YOSHIMURA, and HISAO TSUKAMOTO^{2b)}
Narcotic Control Office of Kyushu^{2a)} and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Kyushu University^{2b)}

(Received July 20, 1968)

The previous study on marihuana smoking indicated that the addicts would inhale about half amount of three main constituents, cannabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC) and cannabinol (CBN) in marihuana cigarettes, and suggested that some of the constituents might be excreted as unchanged or conjugated forms into the urine of these addicts. The present study was undertaken to confirm this possibility using rabbits.

It was found in this experiment that free marihuana constituents in urine was extracted effectively with CHCl_3 during 10 hr under the pH 3. It was also shown that treatment of the urine with either 5% HCl or β -glucuronidase was necessary for detection of marihuana constituents in the urine before the extraction. Applying these procedures, CBN was detected in the urine of rabbits injected either CBN or ganja extract which contained a considerable amount of CBN. However, the excretion of any constituent could not be confirmed in the urine of either CBD or THC treated rabbits.

緒 言

第I報³⁾において薄層ならびにガスクロマトグラフィーを応用した大麻成分 cannabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC) および cannabinol (CBN) の定性, 定量的検出法を報告し, 第II報¹⁾においてはこの検出法を実際鑑定に応用した場合, なんらかの障害に出あうかどうかについて検討を加えた. この結果大麻草と近縁の植物であるカラハナソウおよびホップについてもなんら大麻成分とまぎらわしい成分を認めず, また実際の鑑定試料としてしばしば混入してくるタバコにおいてもほとんど鑑定上の妨害とならなかった. さらに第II報では大麻スモークの実験を行ない, スモーク中の大麻3主成分の定性, 定量的検討を行なったが, 原料大麻に含まれる

成分の平均50%近くが未変化のまま吸引されることが判明し, もしフィルターがあればその50%がフィルター部分に吸着するとともに残りの50% (大麻に含まれる成分の量の25%) は大麻喫煙者により吸引されることがわかった. このことからして大麻鑑定上フィルター部分は鑑定試料として重要な意味を持つことを指摘するとともに, 大麻喫煙常用者の体には相当量の大麻成分が導入されることが推定でき, その尿からの検出も裁判化学上重要な意義を持つことが考えられた.

この第III報では大麻成分の水溶液からの抽出条件をまず求め, つぎに標品 CBD, THC, CBN およびインド大麻 ganja の EtOH 粗抽出物を家兎の腹腔内に注射し, その尿抽出物について各成分を確認できるかどうかを検

- 1) Part II: 荒牧繁一郎, 富安温子, 吉村英敏, 塚元久雄, 衛生化学, 14, 262 (1968).
- 2) Location: a) Tenjin 5-chome, Fukuoka (福岡市天神町5丁目); b) Katakasu, Fukuoka (福岡市堅粕).
- 3) Han'ichiro Araki, Naoko Tomiyasu, Hidetoshi Yoshimura, Hisao Tsukamoto, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 16, 822 (1968).

討した。また投与大麻成分が抱合体として尿中に排泄される可能性を考慮して、塩酸酸性、水浴中加熱による加水分解、あるいは β -glucuronidase による酵素的加水分解を行なったのち同様の抽出を行ない、抱合型代謝物の有無についても検討した。

実験材料ならびに方法

1) 標品 CBD, THC および CBN 本実験に使用した大麻3成分 (CBD, THC および CBN) はすべて第 I 報⁴⁾ 記載の方法に従って大麻抽出物より単離した。

2) 大麻成分検出法 同じく第 I 報⁴⁾ 記載の薄層ならびにガスクロマトグラフィーを用いた。大麻成分を投与した家兎尿抽出物の定性、定量的検索には、薬物投与前の尿を同様に処理して対照とした。

3) 連続抽出器 エーテル抽出には通常の抽出器を用い、クロロホルム抽出にさいしては、先に報告した抽出器⁴⁾ を使用した。

4) 標品 CBD, THC および CBN の注射液の調製 大麻の3主成分 CBD, THC および CBN の標品の一定量を秤取し、これらにできる限り少量のオリーブ油を加え、わずかに温めて溶解し注射液とした。

5) インド大麻 Ganja の EtOH 粗抽出物の注射液の調製 デシケーター中に2日間放置して乾燥した ganja の一定量を秤取し、これをカバー付きの容器に入れ EtOH の適量 (1g に対し 10ml) を加え2日間室温で抽出する。この抽出液をろ別し減圧で乾固したのち再び少量の EtOH に溶解し不溶物をろ別する。この溶液を減圧で乾固して得た赤褐色透明油状の物質を前記4項と同様の条件でオリーブ油に溶解し注射液とした。この注射液に含まれる大麻の3主成分の量は同一種の ganja についてあらかじめ定量し、その結果から換算した。

6) 家兎への注射方法ならびに投与家兎尿の採取 前記4種の注射液を体重3.0—4.0kg の家兎を用いて腹腔内に注射した。膀胱内の尿は注射の直前にカテーテルで完全に除去し、注射後24時間に排泄された尿および膀胱内の尿をカテーテルで採取し、両者をあわせて24時間尿とした。同様にして48時間尿 (24—48時間) を採取した。

7) β -Glucuronidase の調製 メスの均一系ラット王様 (150—200g) の包皮腺 (preputial gland) を摘出し、この 100mg に対し蒸留水を 1 ml の割合で添加し Potter-Elvehjem 型ガラスホモジナイザーですりつぶした。これを 3000 rpm で10分間遠心分離し、その上澄液

を β -glucuronidase 液として使用した。この力価は Kato 等の方法⁵⁾ で測定したが、55300 units/ml を示した。

結 果

1) 水溶液よりの CBN の回収率実験

標品 CBN を正確に約 10mg 秤取し、ごく微量の MeOH に溶解して 100ml の水に添加し、さらに酸化防止のため 40% NaHSO₃ 溶液 2 ml を加え、これをそれぞれ pH 7.0 ならびに pH 3.0 においてエーテルおよびクロロホルムを用いて抽出し、合計4組の実験を行なった。抽出時間の5、10および15時間の時点で抽出溶媒を新たに交換し、その抽出量を測定して溶媒の種類、pH ならびに抽出時間による抽出の最適条件を検討した。この結果を Fig. 1 に示す。

Fig. 1. Recovery Curve of CBN from the Aqueous Solution

Standard cannabinal (CBN) exactly weighed about 10 mg, was added in 100 ml of distilled water, and extracted at given pH with CHCl₃ or ether. The amount of CBN recovered was estimated by GLC.

本実験により最適抽出条件としては尿を pH 3.0 に調整し、クロロホルムで10時間連続抽出することにあることが判明した。

2) CBD, THC の回収率実験

前記 CBN の回収率実験で得られた最適条件を CBD および THC の場合に適合し、両者の回収条件を検討した結果、両者ともこの条件下ではほぼ完全に抽出しうることが判明した。

3) CBN 投与家兎尿の塩酸加水分解

CBN 200mg/body を家兎に腹腔内注射し、その24時間尿 (240ml) をあらかじめクロロホルムで連続抽出し、未変化の CBN を除いたのち、この尿を4等分してそれぞれつぎの条件で塩酸加水分解を行なった。なおいずれ

4) H. Yoshimura, K. Oguri, H. Tsukamoto, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **14**, 62 (1966).

5) K. Kato, K. Yoshida, H. Tsukamoto, M. Nobunaga, T. Masuya, T. Sawada, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **8**, 239 (1960).

の場合も酸化防止のため尿 50ml に対し 40% NaHSO_3 溶液 1 ml を加えた。(a) 尿を 5% 塩酸濃度として沸とう水浴中で 30 分間および (b) 1 時間水分解 (c) 10% 塩酸濃度として 30 分間および (d) 1 時間加水分解した。これらを前記方法で抽出後、薄層およびガスクロマトグラフィーにより定性、定量し、塩酸加水分解の最適条件を求めた。

i) 薄層クロマトグラフィー いずれの加水分解条件の場合も CBN を検出することができた。ただし試料量を多くしないといずれの場合も明確なスポットを与えにくい。

ii) ガスクロマトグラフィー 各条件による塩酸加水分解尿よりの抽出物の定量を行なった。結果を Table I に一括する。

TABLE I. Hydrolysis of 24 hr Urine from the Rabbit administered 200 mg/ Body of CBN with HCl

	Condition of hydrolysis		Amount of CBN detected in urine (mg)
	HCl (%)	Time of hydrolysis (min)	
(a)	5	30	0.6
(b)	5	60	1.7
(c)	10	30	0.5
(d)	10	60	0.3

After extracted with CHCl_3 at pH 3.0, 24 hr urine was equally divided into 4 parts (a-d) and the amount of CBN which was freed on acid hydrolysis was estimated by GLC.
CBN: cannabiniol

Table I より明らかなように、検討した加水分解条件のうち実験 (b) の場合、すなわち尿を 5% 塩酸濃度として沸とう水浴中で 1 時間加熱するとき最も多量の CBN を検出した。

4) CBD, THC および CBN の塩酸加水分解に対する安定度

家兎尿の塩酸加水分解により遊離した大麻成分が、この加水分解処理に対してどの程度安定であるかを求めるため各標品約 5 mg を正確に秤取し、5% 塩酸 50ml に添加してさきの 3 項で述べたと全く同様の加水分解処理を行ない、その抽出物を薄層ならびにガスクロマトグラフィーにより定性ないし定量的に検討した。

i) 薄層クロマトグラフィー (i) CBD: 未変化の CBD のスポットのほか 7-8 個のスポットが観察され、加水分解処理により相当量の CBD が変化したことが認

められた。このうち大麻成分の R_f 値領域のものとしては CBN に相当するスポット (R_f 値 0.25) が痕跡程度認められ、また Δ_1 - Δ_2 THC (天然の THC) の R_f 値 0.35 に近いが、呈色もこれとは明らかに異なるスポットが R_f 値 0.36 付近に認められた。このスポットの呈色は天然の THC の橙赤色よりやや淡い橙桃色を呈し、この呈色ならびに R_f 値は異性体 Δ_1 - Δ_6 THC⁶⁾ のそれに全く一致した。この CBN および Δ_1 - Δ_6 THC の存在は後述するようにガスクロマトグラフィーにおいても確認された。これら以外のスポット群はクロマトグラムの原点から R_f 値 0.25 付近の間に出現し、ジアゾ化ベンチジン試薬で呈色したが、それらの構造については不明である。

(ii) THC- Δ_1 - Δ_6 THC と CBN のスポットのみが確認され、未変化の Δ_1 - Δ_2 THC スポットは認められなかった。

(iii) CBN- 未変化の CBN のスポットのみが検出され、分解物の生成は認められなかった。

ii) ガスクロマトグラフィー 定量を行なった結果を Table II に一括した。

TABLE II. Percentages of Reaction Products formed by Acid Hydrolysis of Marihuana Constituents

Materials	Products			
	CBD	THC		CBN
	%	Δ_1 - Δ_2 %	Δ_1 - Δ_6 %	%
CBD	27.0	0	45.8	trace
THC (Δ_1 - Δ_2)	—	0	81.1	16.1
CBN	—	—	—	96.1

A solution of each marihuana constituent (CBD, THC and CBN) in 5% HCl was heated on a boiling water bath for 60 min. The reaction products were continuously extracted with CHCl_3 at pH 3.0, and analyzed by GLC.

CBD: cannabidiol, Δ_1 - Δ_2 THC: natural tetrahydrocannabinol, Δ_1 - Δ_6 THC: isomer of tetrahydrocannabinol, CBN: cannabiniol

Δ_1 - Δ_2 and Δ_1 - Δ_6 indicate the position of double bond in cyclohexene ring of tetrahydrocannabinol and numbering of 1 is the carbon branched methyl radical.

(i) CBD: 未変化の CBD および Δ_1 - Δ_6 THC のほかに 3-4 個の比較的大きなピークを生じた。これらの未知の分解物のピークは保持時間として CBD の 4.91 分以前に出現した。CBN の保持時間の位置にも極く微細なピークが認められた。 Δ_1 - Δ_6 THC のピークは Δ_1 - Δ_2 THC の保持時間 6.58 分よりわずかに早く、6.25 分の位置に出現し、これは標品の Δ_1 - Δ_6 THC と co-chromatography を行なったが、単一ピークを示しよく合致した。また、

6) T. Petržilka, C. Sikemeier, *Helv. Chem. Acta*, **50**, 2111 (1967); 標品 Δ_1 - Δ_6 THC は九州大学薬学部生薬学教室教授西岡五夫氏の御好意により分与された。

4_1-2 THC のピークは全く生じなかった. Table II で見られるように, 加水分解処理で CBD の一部 (27%) は変化せずそのまま検出するが, その 45.8% は 4_1-6 THC⁷⁾ に異性化し, また未知の物質へ変化したものが約 27% あることが判明した. しかし, CBD から CBN へ酸化されたものは痕跡程度であった.

(d) THC: Table II から明らかなように未変化の 4_1-2 THC としては全く検出されず, 4_1-6 THC に異性化したものが 81.1% とその大半を占め CBN へ酸化されたもの 16.1% となっている. そのクロマトグラム上この 2 つのピーク以外にはなにも出現しなかったが, 計算上 2.8% の THC の損失がみられる.

(e) CBN: そのクロマトグラムでは CBN のピークのみを生じ定量値は 96.1% であった. したがってこの加水分解条件では大麻 3 成分のうち CBN のみがほとんど変化をうけず回収されることが判明した.

5) 家兎尿よりの大麻成分の検出

家兎尿そのままを, またさらにこれを塩酸および β -glucuronidase で加水分解した後の尿を, pH 3.0 に調整して NaHSO_3 溶液を添加し, クロロホルムで連続抽出を行なった抽出物について薄層クロマトグラフィーを実施し, 大麻成分の排泄を定性的に検討した. なお, いずれの抽出物のクロマトグラムも原点から R_f 値 0.2 付近までフェノール試薬に対して汚褐色から鮮黄色に tailing した呈色スポットを生じたが, これは対照に用いた正常家兎尿の抽出物でも同様に認められた.

i) 非加水分解での検討 家兎 1 羽あたりに CBD 20.2mg, THC 20.1mg, CBN 19.9mg および ganja 2g の粗抽出物 (CBD 11.4mg, THC 28.4mg, CBN 29.8mg を含む) をそれぞれ投与し, その 24 時間ならびに 48 時間尿の抽出物について検討したが, CBD および THC 投与家兎尿からはいずれの場合もフェノール試薬に感ずるスポットを全く生じなかった.

CBN 投与家兎の 24 時間尿からは CBN の明確なスポットのみが検出されたが, 48 時間尿からは未変化の大麻成分は検出されなかった.

Ganja 投与家兎の 24 時間尿からは CBD および THC の痕跡程度のスポットに加え, CBN の明りょうなスポットが検出されたが, 48 時間尿のものでは CBN の弱い呈色スポットが検出されたにすぎない.

ii) 5% 塩酸加水分解による検討 大麻 3 成分はいずれもフェノール体であり, 抱合型として排泄される可能

性がある. そこであらかじめ前項の i) により遊離の大麻成分を抽出した尿をさらに加水分解してその可能性を検討した.

この場合も CBN および ganja 粗抽出物投与の 24 時間尿からは CBN の明確なスポットを検出したが, そのほかの成分は検出されず, また CBD および THC 投与のものでは 3 成分のいずれに合致するスポットも認められなかった. 48 時間尿については CBD および THC を投与した場合, まったく大麻成分のスポットを認めなかったが, CBN および ganja の粗抽出物を投与した実験で CBN の弱い呈色スポットが認められたにすぎない.

iii) β -Glucuronidase による加水分解⁸⁾での検討 前記 ii) と同じく遊離の大麻成分をまず抽出したのち, β -glucuronidase による加水分解を行ない検索した. すなわち, 酢酸で pH 4.6 に調整し, 0.2M acetate buffer 中 β -glucuronidase の一定量 (尿 50ml に対し酵素液 1 ml) と 37° のふ卵器中で一昼夜インキュベートした. 投与した大麻成分の量は家兎 1 羽あたりそれぞれ CBD 50mg, THC 200mg, CBN 200mg および ganja 10g の粗抽出物 (CBD 57mg, THC 142mg, CBN 149mg を含む) で前記 i) および ii) で投与した量の 5 倍 (ganja) から 10 倍 (THC と CBN) を用いた. ただし CBD は量的に限られていたため 2.5 倍量であった.

結果は i) および ii) とまったく同様で, CBN および ganja 粗抽出物投与の 24 時間尿からは CBN の明確なスポットのみが検出された. 48 時間尿からも CBN の弱い呈色スポットが検出された. CBD および THC 投与の実験では大麻成分は全く検出されなかった.

考 察

大麻成分の代謝に関する文献としては Miras⁹⁾ のものがあるにすぎない. この報告では $^{14}\text{CO}_2$ 中で大麻草を栽培し, これより ^{14}C で標識された THC を単離して, これをラットに投与し, 放射能の強さを測定することで体内分布を調べている. 尿中には投与後 30 分から放射能を検出しているが, それがいかなる化合物として排泄されたかは明らかにされていない.

この報告においてわれわれは大麻の 3 成分の標品とこれら 3 成分を含有するインド大麻 ganja のエタノール粗抽出物をそれぞれ家兎の腹腔内に注射し, それらの 24 時間尿および 48 時間尿から大麻 3 成分が検出できるかどうかを第 I 報⁹⁾ の大麻成分検出法を利用して検討した. また投与した大麻 3 成分が抱合体となって排泄される場合

7) 4_1-6 THC の標品は量的に限られていたため, その定量には便宜的に 4_1-2 THC の検量線を用いた.

8) G. A. Levvy, C. A. Marsh, *Nature*, **180**, 919 (1957).

9) C. J. Miras, *Ciba Found. Study Group*, **21**, 36 (1965) [*C. A.*, **64**, 1214g (1965)].

を考慮し、尿を5%塩酸濃度として沸とう水浴中で1時間加水分解後抽出し検討した。とくにこの塩酸加水分解では大麻成分が変化するおそれがあるので、標品を用いてこの変化を定量的に解明するとともに、 β -glucuronidase による温和な条件での加水分解を行ない、尿中より大麻成分を検出できるかどうかを究明した。

この結果をまとめると、大麻3成分のうち CBN ならびにこれを含む ganja 粗抽出物を投与した家兎尿からは CBN のみが検出された。一方 CBD や THC を投与したものではありませんら大麻成分も検出されなかった。尿中の遊離大麻成分を抽出後、塩酸または β -glucuronidase で加水分解すると CBN および ganja 粗抽出物投与家兎尿からのみ CBN が抽証明されたのに対し、CBD や THC 投与のものからは非加水分解の場合と同様大麻成分の検出はされなかった。これらのことから考察すると CBN をかなりの量含む大麻であれば、これを摂取した動物の尿中に CBN を証明することができ、大麻摂取の有無を結論づけることが可能で、このことは酸または β -glucuronidase で処理すればさらに容易になることが考えられた。しかし、一方 CBN をほとんど含まない大麻を使用した場合は大麻摂取の有無を決定することはきわめて困難といわねばならない。投与量を 20mg から 200mg (THC および CBN) に増加した実験でも、THC 投与家兎尿からは大麻成分を全く検出しなかったし、CBN 投与家兎尿からは CBN のみを検出したが、その量も少く結果としては両実験とも大差なかった。

検出可能な CBN の場合も尿中に遊離および抱合型として排泄される量は投与量に比して少なく、そのため絶対量を正確には定量できなかったが、後者はおよそ投与量の1%以下であり、前者もこれより多くはない。回収率実験によれば3成分とも尿中からの抽出はほとんど

100% 可能であり、また CBN を除いた成分では酸加水分解操作でかなりの異性化や酸化が起るとはいえ、尿中にともかく大麻成分が存在する限り、少なくともこれらの変化物は必ず抽出、検出されることを上記実験結果で示している。しかしながら実際には前述のようにきわめて少量の CBN のみしか検出されなかった。

大麻成分は冷蔵庫に保存しておいても変化をうける不安定なものであり、またほとんどの有機溶媒に溶解する脂溶性の高い化合物である。これらの事実から推察すると、大麻成分は生体内で速かに分解し、フェノール試薬に感じない代謝物となるものか、あるいはまた体内で長時間貯留して尿中への排泄は徐々にしか行なわれず、そのため尿中からの検出が困難となったのかが示唆される。これらについては現在のところなんらの証拠もなく、今後の検討にまたなければならない。

以上は家兎についての実験であり、これを直ちにヒトに適用することは危険であるが、一応類推して考えればつぎのように要約される。すなわち、大麻中毒者の鑑定にあたり、その尿は重要な裁判化学的試料になりうるが、これは現在のところ CBN 含量の比較的高い大麻を使用した場合に適用され、CBN 含量の低い大麻使用者についてはその尿からの検出はかなり困難であると思われる。

謝辞 本研究の費用の一部は厚生科学研究費により支弁された。ここに厚く謝意を表します。

また、標品 41-6 THC は九州大学薬学部生薬学教室西岡教授より分与された。御好意に対し深く感謝いたします。

なお、本研究の実験の一部を援助していただいた永江玲子ならびに犬塚茂子嬢に心から御礼申しあげます。