

調製法を大麻使用者尿に適用した。同尿を予め簡易スクリーニングキット「トライエージ™」で試験を行い、THC 陽性を確認した。次に、本調製法で尿中 11-nor- Δ 9-THCCA の定性を行った。11-nor- Δ 9-THCCA や 11-nor- Δ 9-THCCA-d9 の TMS 誘導体のスキャン測定による質量スペクトルでは、図 2 のように TMS 誘導体化剤に起因する m/z73 以外にターゲットイオン（定量用 分子イオン）1 個及びクオリファイイオン（定性用 フラグメントイオン）2 個が主要なイオンであることから、それぞれの化合物のターゲットイオンに対する 2 つのクオリファイイオン比で同定できる。よって、表 1 に示したとおり、定性及び定量を選択イオンモニタリング（SIM）測定で行った。図 3 が大麻使用者尿 10 倍希釈のマスキロマトグラムである。（尚、同尿の大麻代謝物 11-nor- Δ 9-THCCA 陽性判断については SCAN 測定においても確認済）

C. 研究結果及び考察

図 1 のとおり、尿中 11-nor- Δ 9-THCCA の C27 を用いた電子レンジによる効率的 TMS 誘導体化のための実験では、マイクロ波出力及び照射時間 750W10s が最も良いことが分かった。更に、各出力・時間での棒グラフ高さの変動係数が 2.2~16.3 とバラツキが小さいことも判明した。又、750W10s のマイクロ波照射を行った後、室温まで放置し、再び 750W10s の照射を行っても誘導体化生成率は増えなかった。このことは、一回の照射により、誘導体化反応が終了していることが分かった。マイクロ波照射をしない条件の 0W0s で誘導体が生成されている理由は、GC-MS の注入口温度が 250°C により、TMS 誘導体化反応が起こったと考えられる。500W90s や 750W60s で誘導体化生成率が 0W0s の生成率より低くなる現象が生じた。試料液へのマイクロ波照射は、電子レンジ加熱室ターンテーブルの中央に立てて行うが、中央から 85mm 離れたところにおいても同じ生成率であることが分かった。

電子レンジ最適条件のマイクロ波照射 750W10s による TMS 誘導体化生成率と、ヒートブロック加熱（80°C15min）による同生成率を比較したところ、ヒートブロックと比べ生成率は 95.2%で、殆ど生成率に変化はなかった。よって、電子レンジにより誘導体化時間が 1/90 に短縮できるメリットがある。

尿中 11-nor- Δ 9-THCCA の定量用検量線を作成し、一次関数

$$Y=0.02231X+0.00038$$

を得た。尿中濃度 0.5~50ng/ml の範囲で、相関係数の二乗が 0.9996 と良好な相関を示した。また、表 2 のとおり、精度試験では、濃度 0.5、10 及び 50ng/ml での変動係数はそれぞれ 7.9、1.3 及び 3.2%(n=5)で、日間変動（濃度 10ng/ml で測定）は 5.7%(n=5)であった。

実際に、鑑定により同調製法及び GC-MS 装置で大麻使用者尿中の 11-nor- Δ 9-THCCA を定量したところ 313ng/ml であった。

以上の研究結果により、この家庭用電子レンジ迅速調製法で尿中大麻代謝物 11-nor- Δ 9-THCCA の迅速定性・微量定量が可能となった。

D. 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）「法規制薬物の分析と鑑別に関する研究」平成 22 年度研究分担報告「マイクロ波を利用した迅速かつ簡便な違法薬物誘導体化の検討」（藤井広志，山崎直喜）

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

学会発表

藤井広志，緒方 亮：電子レンジを用いた尿中大麻代謝物の迅速トリメチルシリル誘導体化最適条件の検討，日本薬学会第 132 年会（北

海道札幌市, 2012.3.28-31) .

図1. マイクロ波出力・照射時間の違いによる11-nor- Δ^9 -THCCA-2TMS誘導体生成率

(mean \pm S.D. n=5)

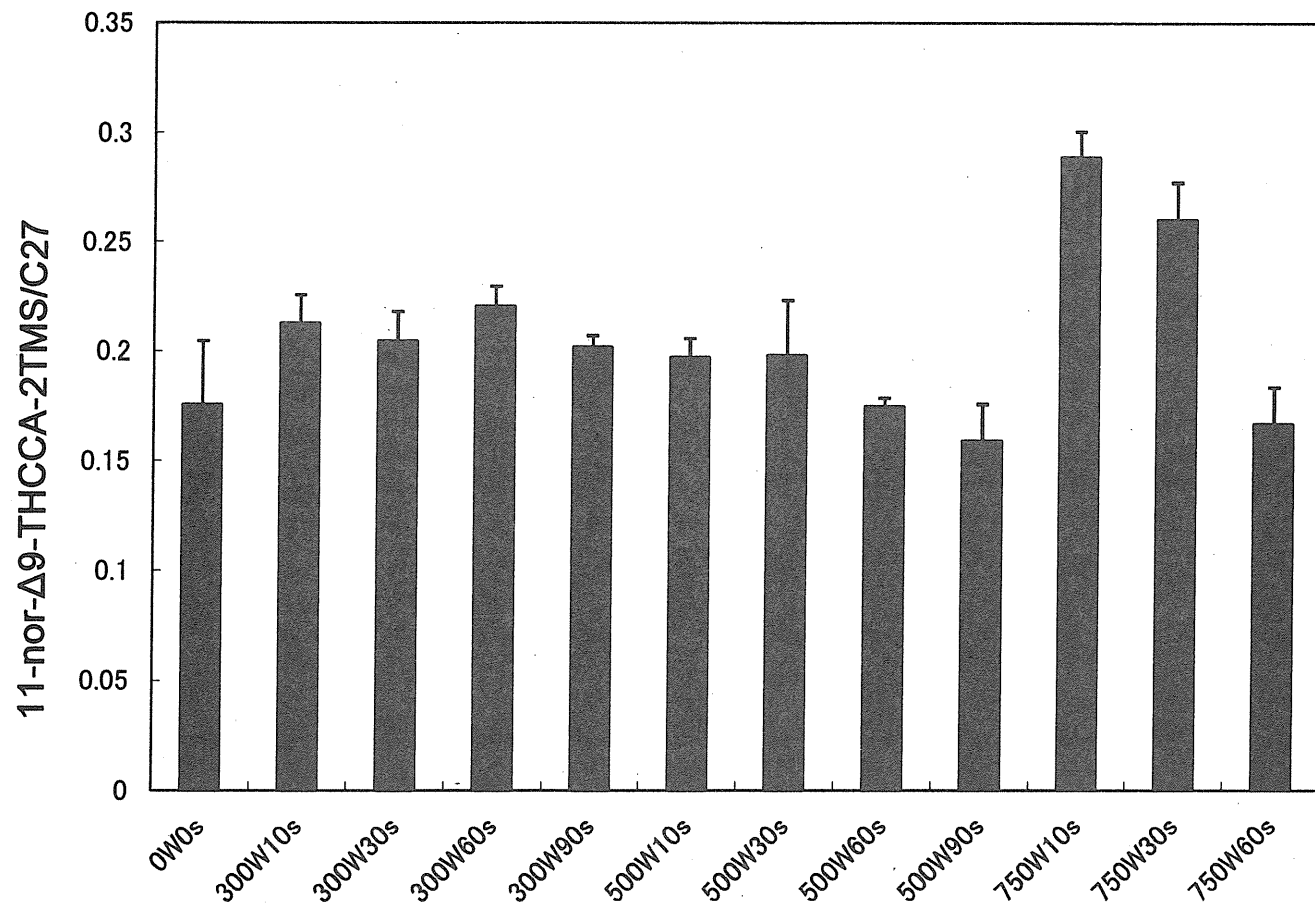


図2. SCAN測定によるマススペクトル

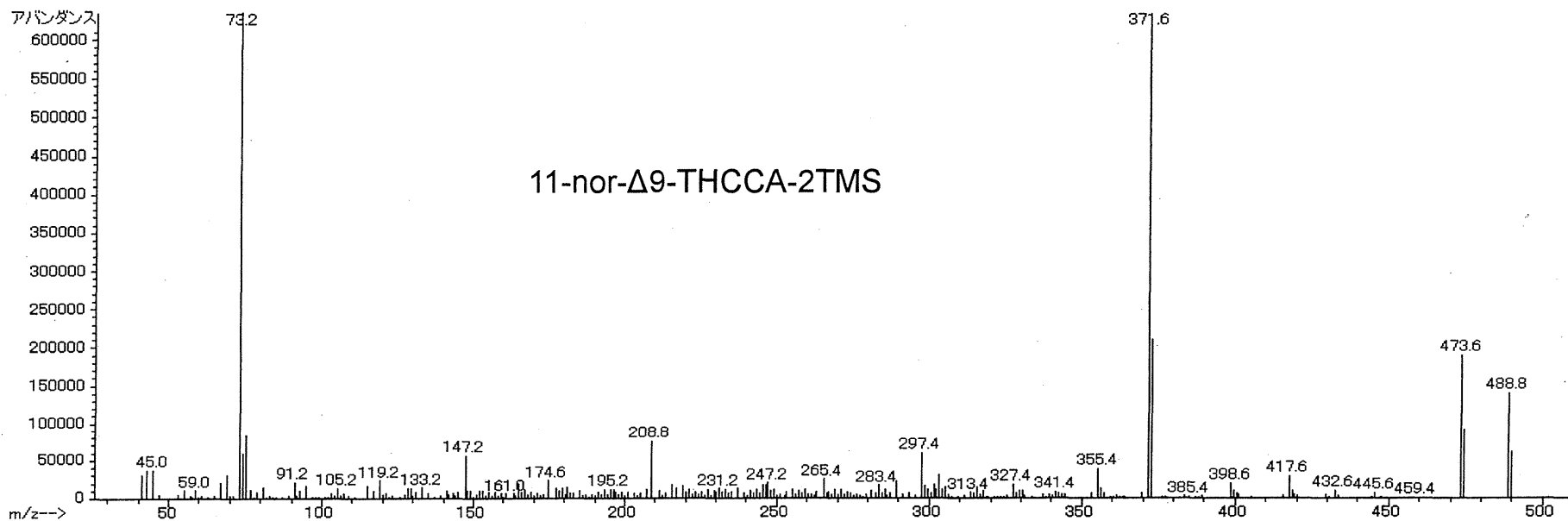
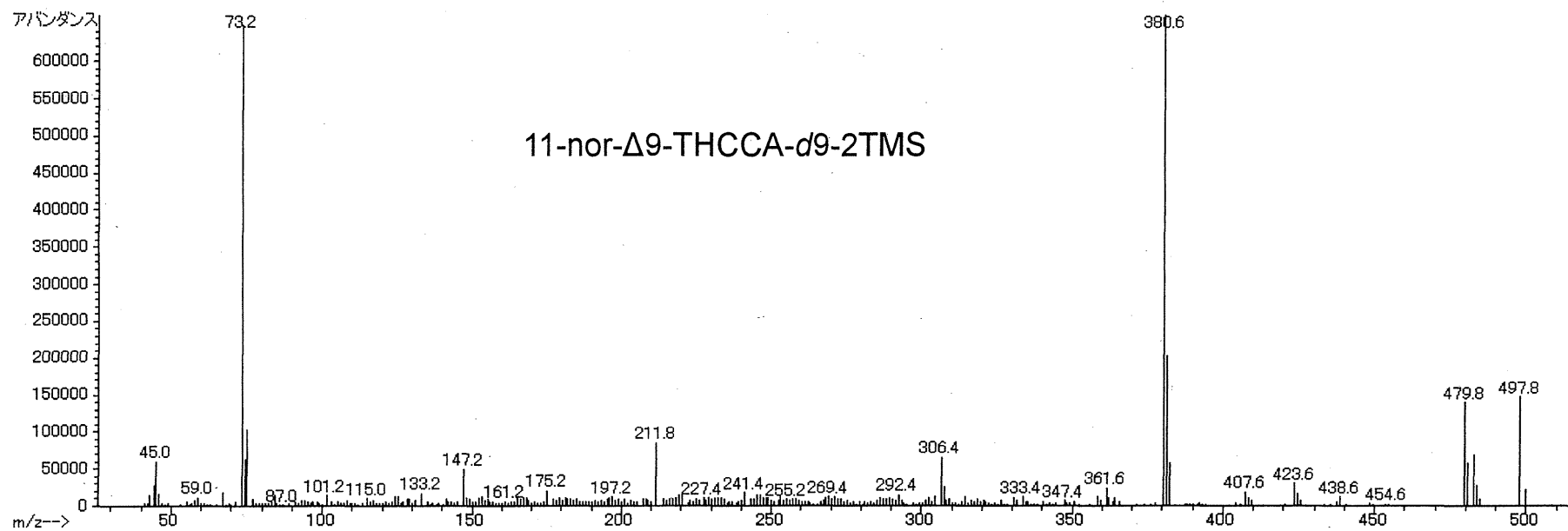


図3. SIM測定によるマスクロマトグラム(大麻使用者尿10倍希釈)

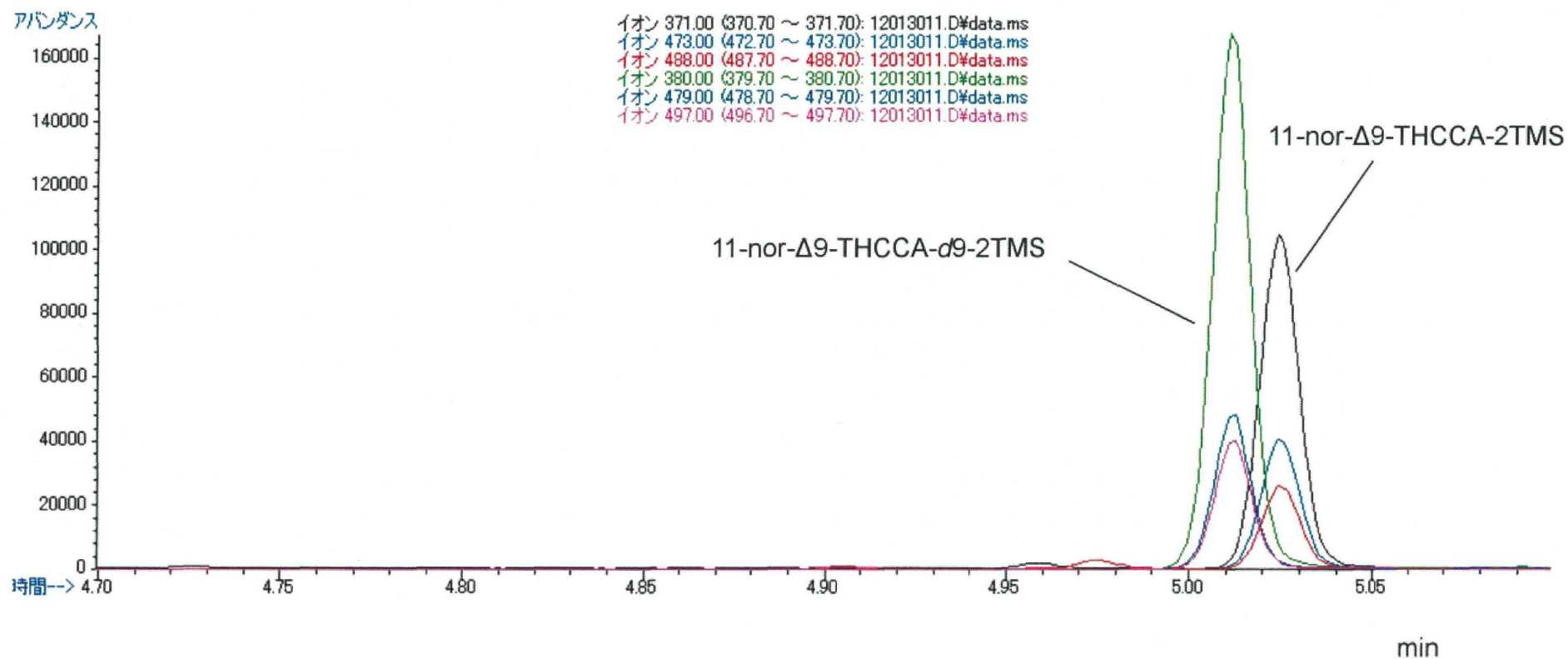


表1. 各化合物の保持時間及び主要フラグメントイオン(SIM測定)

化合物名	分子量	保持時間(分)	定量イオン	マススペクトル(m/z)と相対イオン強度		
C27	380	4.833	57	57(100)	71(80)	380(1.3)
11-nor- Δ 9-THCCA-d9-2TMS	497	5.011	497	380(100)	479(31)	497(25)
11-nor- Δ 9-THCCA-2TMS	488	5.024	488	371(100)	473(48)	488(31)

表2. 日内変動及び日間変動

化合物名	添加濃度 (ng/ml尿)	日内変動(n=5)		日間変動(n=5)	
		精度(%)	真度(%)	精度(%)	真度(%)
11-nor- Δ 9-THCCA-2TMS	0.5	7.9	166		
	10	1.3	98	5.7	102
	50	3.2	101		

分担研究報告書

研究分担課題 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究
研究分担者 花尻 瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

ラット生体試料中合成カンナビノイド JWH-018 及び代謝物の分析について－2－

研究要旨 近年、大麻様作用を標榜した合成カンナビノイド含有植物製品の流通が世界的に問題となっている。日本では、平成 24 年 3 月現在で 16 種類の合成カンナビノイドが指定薬物として規制されている。昨年度我々は、指定薬物 JWH-018 について、JWH-018 及び 11 種類の推定代謝物（alkylcarboxy, terminal alkylhydroxy, indolehydroxy 及び *N*-dealkylated indolehydroxy 代謝物）を分析対象とし、各化合物をラット尿、毛髪試料に添加して、抽出法及び UPLC-MS/MS を用いた分離分析法を検討した。今年度は、実際に本化合物を投与したラット尿及び毛髪試料を用いて、各生体試料中に排泄される未変化体及び代謝物量について検討を行った。

茶褐色体毛を有する DA ラットに、JWH-018 を 5 mg/kg ずつ 10 日間連続して腹腔内投与し、尿試料は最終投与後 120 時間まで、毛髪試料は初回投与より 28 日間後に採取した。尿試料は β -glucuronidase 処理後、pH 5 の条件下において *t*-butylmethyl ether を用いて液-液抽出操作を行い、抽出液を窒素気流下で乾固後メタノールに溶解し測定試料とした。毛髪試料は洗浄後細片化し、アルカリ可溶化を行った後、尿試料と同様に処理を行い測定試料とした。LC-MS/MS 分析は、0.1% ギ酸及びアセトニトリルのグラジエント条件下で、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (2.1×100 mm, 1.7 μ m) を用いて行った。

検討の結果、薬物投与ラット尿中においては、主に *N*-dealkyl 6-OH indole 体が検出された。その他尿中からは *N*-dealkyl 7-OH indole, *N*-pentanoic acid, 6-OH indole 及び *N*-(5-hydroxypentyl) 体が検出されたが、JWH-018 は 0-24 時間尿において痕跡量検出されたのみであった。一方、毛髪においては、JWH-018 (1.49-2.77 ng/mg), *N*-pentanoic acid (5.32-9.63 ng/mg) 及び *N*-dealkyl 6-hydroxyindole 体 (0.91-1.63 ng/mg) が主に検出された。今回の研究では、*N*-alkyl 側鎖及び indole 環上の一水酸化体及びカルボン酸化体しか分析対象にはしておらず、また、ヒトとラットでは薬物動態に差がある。しかし、本化合物を摂取したヒト尿中からも *N*-pentanoic acid 体は主に検出されることが報告されていることから、ヒトにおいても毛髪中の JWH-018 及び *N*-pentanoic acid 体は、JWH-018 使用の有用なマーカーになる可能性が示唆された。

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

A. 研究目的

平成 19 年に薬事法下に指定薬物制度が施行さ

れ、一時は路上やインターネット等における違法ドラッグ販売数は表面上減少した。しかし、近年、医薬品開発途上でメディシナルケミストリーによって大量に誕生した特定の受容体に対し高い活性を有する化合物が違法ドラッグ市場に次か

ら次へと新たに登場している。特に、カンナビノイド受容体に強い活性を示す合成カンナビノイドアナログを乾燥植物細片に混合した、いわゆる“脱法ハーブ”による健康被害が大きな社会問題となっている。この1,2年の間にインターネット販売のみならず、都市部において店内で違法ドラッグ製品の吸引が可能な店舗型販売店が著しく増加している。また、平成23年には京都府内だけで“脱法ハーブ”を吸引し男女19人が病院で診察を受けるなど、この1年間で全国的に救急搬送事例が急増している。すでに違法ドラッグが間接的に関与すると考えられる死亡例も複数報告されている。日本においては、平成21年11月にカンナビシクロヘキサノール (CCH), CP-47,497 及び JWH-018 の3化合物が合成カンナビノイド類として初めて指定薬物として薬事法下で規制されて以来、平成24年3月現在で、合計16種類の合成カンナビノイドが指定薬物として規制されている。

JWH-018 (1-naphthalenyl(1-pentyl-1*H*-indole-3-yl) methanone) は、CCH と共に、2008~2009年にドイツ及び日本で、「スパイス」と呼ばれる一連の乾燥植物混合物 (ブレンドハーブ) の違法ドラッグ製品に、故意に添加されていることがはじめて報告され、世界的に問題となった化合物である。主に、喫煙の形態で乱用されている。現在、ドイツをはじめとするヨーロッパ各国、米国、日本等において、カテゴリーの違いはあるが、流通が規制されている。JWH-018 は、カンナビノイドレセプターCB₁ 及び CB₂ のフルアゴニストであり、CB₁ レセプターに対し、 Δ^9 -THC の5倍もの親和性を示す。Sobolevsky らは、GC-MS/MS 及び LC-MS/MS を用いて、JWH-018 含有植物製品の乱用者3名の尿中薬物分析を行い、indole 環の一水酸化体と *N*-alkyl 側鎖のカルボン酸化体を主に尿中から検出し、未変化体はほとんど検出されないことを報告している¹⁾。また、Teske らは、ヒト

において JWH-018 含有植物製品を喫煙した場合 (JWH-018 50 μ g/kg), 最高血中濃度は 10 ng/mL 程度で、3時間後には未変化体は血中から消失することを報告している²⁾。ヒト肝ミクロゾームを用いた *in vitro* の phase I 代謝実験では、naphthalene, indole, *N*-alkyl 側鎖部位における一水酸化体、二水酸化体、三水酸化体を検出している。また *N*-dealkyl 体の水酸化体、そして *N*-alkyl 側鎖のカルボン酸化体を検出している³⁾。Möeller らのグループは、JWH-018 使用者と思われるヒトドープングコントロール尿試料から、主に一水酸化体及びそのグルクロン酸抱合体を検出している⁴⁾。また、*N*-alkyl 側鎖のカルボン酸化体、*N*-alkyl 側鎖の水酸化体、5-OH indole 体、*N*-dealkyl 5-OH indole 等を合成し、実際のヒト尿試料からこれら化合物が検出されることを報告しており⁵⁾、JWH-018 使用の尿中マーカーとして、*N*-alkyl 側鎖のカルボン酸化体及び *N*-alkyl 側鎖の水酸化体に着目している。米国において、CCH, CP-47497, JWH-018, JWH-073, JWH-200 を対象として、平成23年3月から Schedule I としての暫定規制が施行されていることもあり、JWH-018 の代謝物に関する報告は、上記以外にもこの1年間で急増している⁶⁻¹¹⁾。

昨年度の研究において我々は、JWH-018 について、未変化体, alkylcarboxy, terminal alkylhydroxy, indolehydroxy, *N*-dealkylated indolehydroxy 代謝物 (合計12化合物) (Fig.1) を分析対象として、UPLC-MS/MS による測定法及び尿、毛髪試料中からの各化合物の抽出法を検討した。その結果、ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m) を用いた 0.1% ギ酸及びアセトニトリルのグラジエント条件下で、12化合物は14分以内に良好に分離した (Fig. 2)。また、毛髪試料中からの薬物の抽出法は、アルカリ可溶化が最も適しており、尿中及び毛髪試料のアルカリ可溶化溶液からの薬物の抽出法は、*t*-butyl methyl ether を用いた液-液抽出が適していることを示した¹²⁾。今年

度の研究では、昨年度検討した分析法を用いて、実際に JWH-018 を投与したラット尿及び毛髪試料を用いて、各生体試料中に排泄される未変化体及び代謝物量について検討を行った。

(倫理面の配慮)

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による倫理審査の承認を経て、当所動物管理室の協力を得て、動物福祉・愛護の精神に基づいて、適切な実験計画及び適正な実験手技のもとで実施した。

B. 研究方法

1. 試料

JWH-018 (1)は Cayman 社製を使用した。N-アルキル側鎖のカルボキシル化及び水酸化代謝物 *N*-pentanoic acid (2), *N*-(5-hydroxypentyl) (3), 及びインドール環の 4 位, 5 位, 6 位または 7 位が水酸化された代謝物 2-Naphthoyl-1-pentyl-2-hydroxyindole (2-OH, (4)), 2-Naphthoyl-1-pentyl-4-hydroxyindole (4-OH, (5)), 2-Naphthoyl-1-pentyl-5-hydroxyindole (5-OH, (6)), 2-Naphthoyl-1-pentyl-6-hydroxyindole (6-OH, (7)), 2-Naphthoyl-1-pentyl-7-hydroxyindole (7-OH, (8)), また、内標純物質 JWH-018-d9 (IS)の 9 化合物は Cayman 社から購入した。N-dealkyl 体の indole 環の 4 位, 5 位, 6 位または 7 位が水酸化された代謝物 2-Naphthoyl-4-hydroxyindole (4-OH *N*-dealkylated, (9)), 2-Naphthoyl-5-hydroxyindole (5-OH *N*-dealkylated, (10)), 2-Naphthoyl-6-hydroxyindole (6-OH *N*-dealkylated, (11)), 2-Naphthoyl-7-hydroxyindole (7-OH *N*-dealkylated, (12))は別途合成したものをを使用した¹³⁾。JWH-018 及び各推定代謝物の構造を Fig. 1 に示した。各標準品の 0.1 mg/mL メタノール溶液を標準溶液として作成し、適宜メタノールで希釈して測定に用いた。

β-グルクロニダーゼ (*Helix pomatia*, 77000 U)

は和光純薬から購入し、膜ろ過用フィルター

(Ultra Free-MC, 0.45µm) は Millipore 社製を使用した。アセトニトリル及び 0.1%ギ酸は HPLC 用を、その他抽出試薬等は特級品を用いた。

3. 動物実験

動物は日本エスエルシー (株) より購入した濃茶褐色の体毛を有する Dark-Agouti (DA) ラット (♂, 5 週令) を使用した。DA ラット(n=3)に JWH-018 (2.5 mg/mL, Emulphor/エタノール/注射用生理食塩水 (0.5:0.5:9) に溶解) を 5 mg/kg ずつ各 10 日間連続して腹腔内投与した。薬物投与前にあらかじめラット背部の毛を動物用電気バリカンで刈り取り、これをコントロール毛髪試料とした。初回投与 28 日後、毛を刈り取っておいた部位に新たに生えてきた毛を採取して毛髪試料とした。尿試料は、最終投与後、1 匹ずつ代謝ケージに入れて、投与後 0-24, 24-48, 48-72, 72-120 時間の尿を採取し、分析まで -20°C で保存した。毛髪試料は分析に先立ち、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液、水で各 3 回、1 分間ずつ超音波下洗浄した後、乾燥して、はさみにより 0.5 mm 程度に細かく切って使用した。コントロール DA ラット尿試料は日本エスエルシー (株) より購入した。

4. 測定方法

機器 : UPLC-MS/MS (Waters, Aquity-Quattro Premier XE)

UPLC 条件

カラム : ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (2.1×100 mm, 1.7 µm, Waters 社製), ガードカラム : BEH C18 Vanguard Pre column (2.1×5 mm, 1.7 µm, Waters 社製), 移動相 : A 0.1%ギ酸, B 0.1%ギ酸/アセトニトリル, A/B 0/30 - 25/75 (10 min, 5 min hold), 流速 : 0.3mL/min, 注入量 : 2 µL

MS 条件

ESI, Capillary: 3 kv, Source temp. 120 °C,

Desolvation temp. 400°C, Cone gas flow 50L/hr,

Desolvation gas flow 800L/hr

Scan mode 条件 : Pos/neg, Cone voltage 30V, Scan range m/z 150-500

MRM 条件 : Collision gas flow 0.25 mL/min, その他条件は Table 1 参照.

5. 試料の抽出方法

(1) 尿試料からの薬物の抽出法

薬物投与 DA ラット尿試料 0.1 mL に IS (JWH-018-d9) メタノール溶液 (10 ng/mL urine), 0.1M リン酸緩衝液 (pH 5) 0.5mL, β -グルクロニダーゼ溶液 50 μ L (7,000u) を加え, 37°C で 1 時間振盪した. *t*-Butyl methyl ether 1 mL を加えボルテックスミキサーで震盪後, 10000 rpm で 10 分間遠心し, 上層を取り, 窒素気流下で乾固させた. これを 2 回繰り返す, 残渣について MeOH 100 μ L に溶解し, フィルターろ過を行い UPLC-MS/MS の測定試料とした. 同時に β -グルクロニダーゼ未処理の尿試料についても同様に抽出操作を行い, 測定試料とした.

なお, 上記条件下での β -グルクロニダーゼ処理による尿中グルクロン酸抱合体の加水分解効率については, 未処理尿と処理尿を用いて確認を行った. すなわち, 両尿試料について固相抽出を行い (BOND ELUTE PLEXA, Varian 社製), LC-MS/MS のスキャンモードにおいて, 未処理尿において検出されたグルクロン酸抱合体が処理尿においては検出されないこと確認した.

(2) 毛髪試料からの薬物の抽出法

薬物投与 DA ラット毛髪試料 10 mg に IS (JWH-018-d9) メタノール溶液 (1 ng/mg hair) 及び 1M 水酸化ナトリウム溶液 0.8 mL を加え, 60°C で 1 時間振盪し, 遠心分離後, 上清を試験管に移した. 残渣を水で洗浄し, 同様に遠心分離して上清を上記の試験管に移した. 試験管に *t*-butyl

methyl ether 1 mL を加え液-液抽出を行った後, 残った水層に塩酸を加え中性から酸性とし, 再度, 同様に液-液抽出を行い, 1 回目の抽出液と合わせた. 以下, 尿試料と同様に調製した.

6. 各試料の分析における検出限界, 定量限界, 検量線範囲, 精度及び真度

尿及び毛髪中 JWH-018 及び 11 種類の推定代謝物 (計 12 化合物) の LC-MS/MS 分析における検出限界及び定量限界は下記の通り求めた. DA ラットコントロール尿試料に各化合物を 0.1-1.0 ng/mL となるように加え, 上述した方法に従い抽出操作を行い, UPLC-MS/MS 分析において MRM クロマトグラム上, それぞれ $S/N > 3$ 及び $S/N > 10$ となる最小試料濃度を検出限界及び定量限界とした. 毛髪試料においても, DA ラットコントロール毛髪試料に各化合物 0.01-1.0 ng/mg を加え抽出操作を行い, 同様に求めた.

検量線は, DA ラットコントロール尿 0.1 mL に, スクリーニング分析で尿中から検出された化合物 JWH-018, *N*-pentanoic acid 体, *N*-(5-hydroxypentyl)体, 6-OH indole 体, *N*-dealkyl 6-OH indole 体及び *N*-dealkyl 6-OH indole 体の標準溶液 (最終濃度 0.2-100 ng/mL, *N*-dealkyl 6-OH indole 体については 1.0-400 ng/mL) 及び IS メタノール溶液 (10 ng/mL) を加え, 前述した方法で分析操作を行い, 内標準物質に対する薬物のピーク面積比から作成した. 精度 (相対標準偏差) 及び真度は, ラットコントロール尿試料 0.1 mL に, 各標準溶液を 1.0, 10, 100 ng/mL (*N*-dealkyl 6-OH indole 体については 1.0, 10, 200 ng/mL) の 3 濃度添加し, IS 溶液を加え, 分析法の全操作を各濃度 6 回ずつ繰り返し測定した結果から評価した. 真度は抽出操作における回収率と添加した各化合物の量の差として算出した.

同様に, DA ラットコントロール毛髪試料 10 mg に, スクリーニング分析において毛髪中から検出された化合物 JWH-018, *N*-pentanoic acid 体,

N-dealkyl 6-OH indole 体 (最終濃度 0.1-10 ng/mg hair) 及び IS メタノール溶液 (1 ng/mg hair) を加えて検量線を作成すると共に、精度及び真度 (0.1, 1.0, 10 ng/mg hair) を検討した。

なお、尿及び毛髪試料の各抽出法における回収率は、前年度の抽出法の検討において、すでに報告している。

C. 研究結果

1. JWH-018 及び分析対象代謝物の検出限界及び定量限界

DA コントロール尿及び毛髪試料に各化合物を添加して、抽出操作及び UPLC-MS/MS 分析を行い、MRM クロマトグラム上、それぞれ $S/N > 3$ 及び $S/N > 10$ を与える最小試料濃度を検討し、各化合物の検出限界及び定量限界を求めた。その結果を Table 2 に示す。尿試料においては、検出限界は 0.2-0.5 ng/mL であり、定量限界は 0.5-1.0 ng/mL であった。また、毛髪試料においては、それぞれ、0.025-0.05 ng/mg, 0.1 ng/mg であった。

2. ラット尿及び毛髪へ排泄される代謝物の探索

JWH-018 の代謝経路としては、Fig.3 の上図に記載したように、monohydroxylation (M1, $[M+H]^+$ m/z 358), dihydroxylation (M2, $[M+H]^+$ m/z 374), dehydration and *N*-alkyl dihydroxylation (M2', $[M+H]^+$ m/z 372), dihydrodiol formation (M2'', $[M+H]^+$ m/z 376), dihydrodiol formation and monohydroxylation (M3, $[M+H]^+$ m/z 392), *N*-dealkylation and monohydroxylation (M4, $[M+H]^+$ m/z 288), *N*-dealkylation and dihydroxylation (M5, $[M+H]^+$ m/z 304), *N*-dealkylation and dihydrodiol formation (M5', $[M+H]^+$ m/z 306), carboxylation (M6, $[M+H]^+$ m/z 372) が主に考えられる。そこで、まず、 β -グルクロニダーゼ処理をした JWH-018 投与 DA ラット尿抽出物について、上記推定代謝物の分子量関連イオン (m/z 358, 374, 372, 376, 392, 288,

304, 306 及び 372) に着目し、LC-MS/MS によりスクリーニング分析を行った。また、それらイオンのプロダクトイオンを検討した。各分子関連イオンをモニターした結果を Fig. 3 の下図に示す。薬物投与後 0-24 時間尿で分析を行った結果、本研究の分析対象化合物中では、*N*-dealkyl 6-OH indole 体が最も大きいピークを示し、その他、6-OH indole 体、*N*-pentanoic acid 体、*N*-dealkyl 7-OH indole 体、*N*-(5-hydroxypentyl)体が検出された。また、同定には至っていないが、その他、保持時間 2.6 分及び 3.1 分程度に M3 ($[M+H]^+$ m/z 392, プロダクトイオンとして m/z 171), 保持時間 2.1 分程度に M5 ($[M+H]^+$ m/z 304, プロダクトイオンとして m/z 171), 保持時間 2.4 分程度に M5' ($[M+H]^+$ m/z 306, プロダクトイオンとして m/z 144) と推定される代謝物が主に検出された。

一方、毛髪試料においては、同様にして、推定代謝物について LC-MS/MS によりスクリーニング分析を行った結果、本研究の分析対象化合物中では、JWH-018, *N*-pentanoic acid 体、*N*-dealkyl 6-OH indole 体が主に検出された。

3. ラット尿への JWH-018 及び代謝物の排泄量

DA ラットに JWH-018 を 5 mg/kg ずつ各 10 日間連続して腹腔内投与し、最終投与後 0-24, 24-48, 48-72, 72-120 時間の尿を採取して代謝物濃度を測定した。Fig. 4(A)に、薬物投与 0-24 時間後の尿抽出物の LC-MS/MS MRM クロマトグラムを示した。また、Fig. 5 に各代謝物濃度の経時変化を示した。

Fig. 5 に示すとおり、DA ラット尿中においては、主に *N*-dealkyl 6-OH indole が検出された。また、*N*-dealkyl 7-OH indole, *N*-pentanoic acid, 6-OH indole 及び *N*-(5-hydroxypentyl) 代謝物が検出されたが、JWH-018 は 0-24 時間尿において痕跡量検出されたのみであった。今回分析対象とした他の代謝物は、DA ラット尿中からは検出されなかった。一方、Fig. 4(A)に示すとおり、分析対象代謝

物以外に, dehydration and *N*-alkyl dihydroxylation (M_2^+ , $[M+H]^+$ m/z 372, プロダクトイオンとして m/z 155), また *N*-alkyl monohydroxylation ($[M+H]^+$ m/z 358, プロダクトイオンとして m/z 155)と推定される代謝物が検出された。

尿中から検出された化合物 JWH-018, *N*-pentanoic acid 体, *N*-(5-hydroxypentyl)体, 6-OH indole 体, *N*-dealkyl 6-OH indole 体及び *N*-dealkyl 6-OH indole 体について, 定量分析のために検量線, 精度及び真度を求めた結果を Table 2 に記載した。いずれも 1.0-100 ng/mL の濃度範囲 (*N*-dealkyl 6-OH indole 体については 1.0-400 ng/mg) で $r_2 > 0.994$ の良好な直線性を示し, 精及び真度も 20.7%以下であった。

4. ラット毛髪への JWH-018 及び代謝物の排泄量

DA ラットに JWH-018 を 5 mg/kg ずつ各 10 日間連続して腹腔内投与し, 最終投与後ラット背部に新たに生えてきた体毛を採取して代謝物濃度を測定した。Fig. 4(B)に, 毛髪試料抽出物の LC-MS/MS MRM クロマトグラムを示した。また, Table 3 に毛髪中の各薬物の定量値を示した。

DA ラット毛髪中からは, 主に *N*-pentanoic acid 体(5.32-9.63 ng/mg) が検出され, 次いで尿中ではほとんど検出されなかった未変化体 JWH-018

(1.49-2.77 ng/mg) 及び尿中で主として検出された *N*-dealkyl 6-hydroxyindole 体(0.91-1.63 ng/mg)が検出された。

N-(5-hydroxypentyl)についても痕跡量

(定量限界以下) 検出されたが, その他の分析対象代謝物は検出されなかった。一方, Fig. 4(B)に示すとおり, 対象分析代謝物以外に, *N*-alkyl monohydroxylation ($[M+H]^+$ m/z 358, プロダクトイオンとして m/z 155)と推定される代謝物が検出された。

毛髪中から検出された化合物 JWH-018, *N*-pentanoic acid 体及び *N*-dealkyl 6-OH indole 体について, 定量分析のために検量線, 精度及び真度

を求めた結果を Table 3 に記載した。いずれも 0.1-10 ng/mg hair の濃度範囲で $r_2 > 0.979$ の良好な直線性を示し, 精及び真度も 26.4%以下であった。

今回の研究では, *N*-alkyl 側鎖及び indole 構造上の一水酸化体もしくはカルボン酸化体しか分析対象にはしていない。また, ヒトとラットでは薬物動態に差が認められている。しかし, JWH-018 を摂取したヒト尿中からも *N*-pentanoic acid 体は主に検出されることが報告されていることから^{1),5)}, 毛髪中の JWH-018 及び *N*-pentanoic acid 体を検出することによって, 過去の JWH-018 使用が推定できる可能性が示唆された。

なお, JWH-018 等合成カンナビノイドは, 乾燥植物細片にまぶして喫煙の形で乱用されることから, 毛髪分析の際には試料の外部汚染の影響が懸念される。今回, コントロールされた実験条件下で腹腔内投与したラットから採取した毛髪試料を使用しているため, 毛髪の洗浄は定法に従い, 界面活性剤で行った。しかし, 実際の使用者の毛髪を分析する際は, 大麻使用者の毛髪を洗浄する際に用いられる推奨法(メタノールやジクロロメタンなどの有機溶媒を用いた洗浄)を用いるなど, 更なる洗浄条件の検討が必要と思われる。また, 未変化体と共に, 今回示した *N*-pentanoic acid 体などの代謝物を一緒に検出する必要があると思われる。

D. 結論

薬物投与ラット尿中においては, 主に *N*-dealkyl 6-OH indole が検出された。その他尿中からは *N*-dealkyl 7-OH indole, *N*-pentanoic acid, 6-OH indole 及び *N*-(5-hydroxypentyl) 代謝物が検出されたが, JWH-018 は 0-24 時間尿において痕跡量検出されたのみであった。一方, 毛髪においては, JWH-018 (1.49-2.77 ng/mg), *N*-pentanoic acid (5.32-9.63 ng/mg) 及び *N*-dealkyl 6-hydroxyindole (0.91-1.63 ng/mg) が主に検出された。今回の研究

では, *N*-alkyl 側鎖及び indole 構造上の一水酸化体もしくはカルボン酸化体しか分析対象にはしておらず, また, ヒトとラットでは薬物動態の差がある. しかし, 本化合物を摂取したヒトにおいても尿中からも *N*-pentanoic acid 体は主に検出されることが報告されていることから, 毛髪中の JWH-018 及び *N*-pentanoic acid 体は, JWH-018 使用の有用なマーカーになる可能性が示唆された.

E. 参考文献

- 1) Sobolevsky T, Prasolov I, Rodchenkov G: Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. *Forensic Sci Int.* (2010), 200(1-3), 141-7.
- 2) Teske J, Weller JP, Fieguth A, Rothämel T, Schulz Y, Tröger HD: Sensitive and rapid quantification of the cannabinoid receptor agonist naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-018) in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, (2010) 878(27), 2659-63.
- 3) Wintermeyer A, Möller I, Thevis M, Jübner M, Beike J, Rothschild MA, Bender K: In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. *Anal Bioanal Chem.* (2010), 398(5), 2141-53.
- 4) Möller I, Wintermeyer A, Bender K, Jübner M, Thomas A, Krug O, Schänzer W, Thevis M: Screening for the synthetic cannabinoid JWH-018 and its major metabolites in human doping controls. *Drug Test Anal.* (2010) 3(9), 609-20.
- 5) Beuck S, Möller I, Thomas A, Klose A, Schlörer N, Schänzer W, Thevis M: Structure characterisation of urinary metabolites of the cannabimimetic JWH-018 using chemically synthesised reference material for the support of LC-MS/MS-based drug testing. *Anal Bioanal Chem.* (2011) 401(2), 493-505.
- 6) Grigoryev A, Savchuk S, Melnik A, Moskaleva N, Dzhurko J, Ershov M, Nosyrev A, Vedenin A, Izotov B, Zabirowa I, Rozhanets V: Chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures. *J Chromatogr B* (2011) 879(15-16), 1126-36.
- 7) Moran CL, Le VH, Chimalakonda KC, Smedley AL, Lackey FD, Owen SN, Kennedy PD, Endres GW, Ciske FL, Kramer JB, Kornilov AM, Bratton LD, Dobrowolski PJ, Wessinger WD, Fantegrossi WE, Prather PL, James LP, Radomska-Pandya A, Moran JH: Quantitative measurement of JWH-018 and JWH-073 metabolites excreted in human urine. *Anal Chem.* (2011) 83(11), 4228-36.
- 8) Chimalakonda KC, Moran CL, Kennedy PD, Endres GW, Uzieblo A, Dobrowolski PJ, Fifer EK, Lapoint J, Nelson LS, Hoffman RS, James LP, Radomska-Pandya A, Moran JH: Solid-phase extraction and quantitative measurement of omega and omega-1 metabolites of JWH-018 and JWH-073 in human urine. *Anal Chem.* (2011) 83(16), 6381-8.
- 9) Chimalakonda KC, Bratton SM, Le VH, Yiew KH, Dineva A, Moran CL, James LP, Moran JH, Radomska-Pandya A: Conjugation of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, metabolites by human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos.* (2011) 39(10), 1967-76.
- 10) Brents LK, Reichard EE, Zimmernan SM, Moran JH, Fantegrossi WE, Prather PL: Phase I hydroxylated metabolites of the K2 synthetic cannabinoid JWH-018 retain in vitro and in vivo

cannabinoid 1 receptor affinity and activity. *PLoS One*. (2011) 6(7), e21917.

特になし.

2. 実用新案登録

特になし.

11) Wang AY and Liu HF: Development of a Screening Method for Major Metabolites of JWH-018 and JWH-073 in Human Urine using a Hybrid Triple Quadrupole Linea Ion Trap System. *TIAFT BULLETIN*, (2011) 41(2), 11-14.

12) 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）
「法規制薬物の分析と鑑別に関する研究」平成22年度研究分担報告「ラット生体試料中合成カンナビノイド JWH-018 及び代謝物の分析について」（花尻（木倉）瑠理）

13) 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）
「法規制薬物の分析と鑑別に関する研究」平成22年度研究分担報告「代謝物の合成に関する研究」（福原潔，正田卓司）

F. 健康危機情報

特になし.

G. 研究発表

学会発表

1. R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, T. Shoda, K. Fukuhara, H. Okuda, Y. Goda; Determination of a synthetic cannabinoid, JWH-018, and its metabolites in rat urine and hair samples using UPLC-MS/MS. 2011 Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) & The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) (Sep. 2011, San Francisco, USA).

論文発表

特になし.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

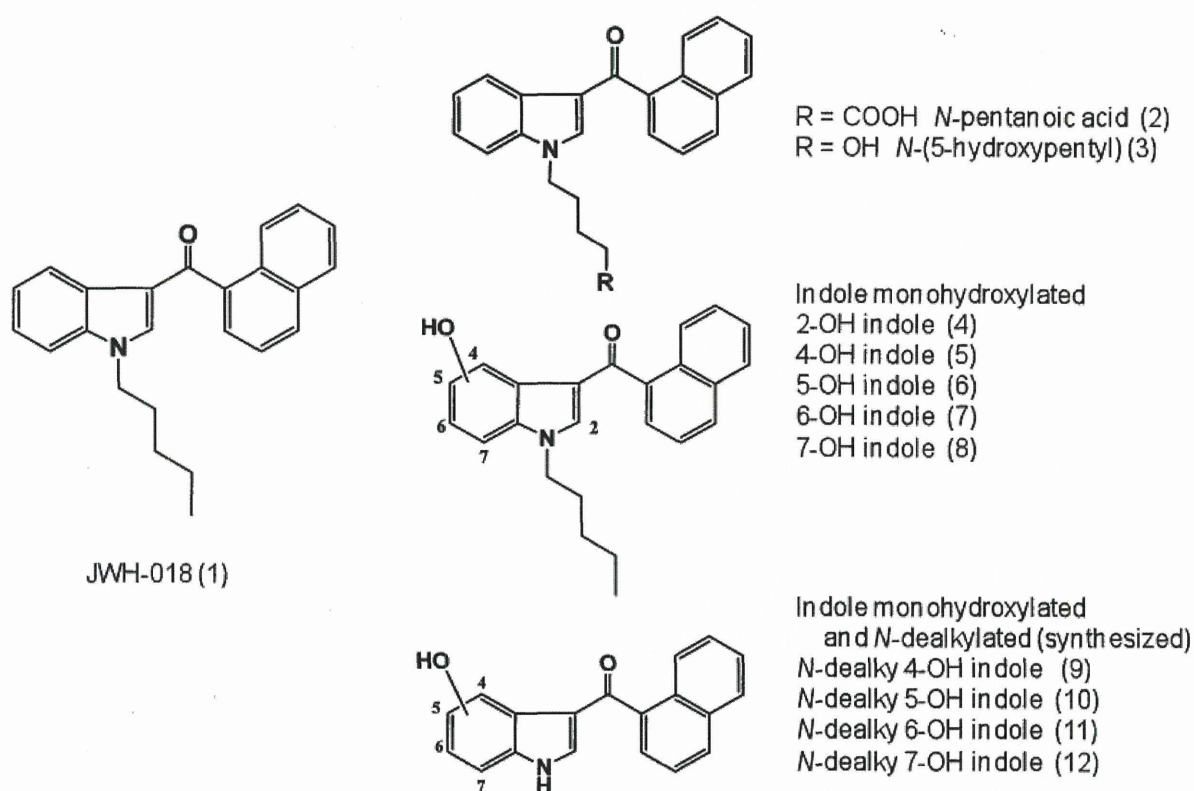


Fig. 1 Chemical structures of JWH-018 and its targeted metabolites

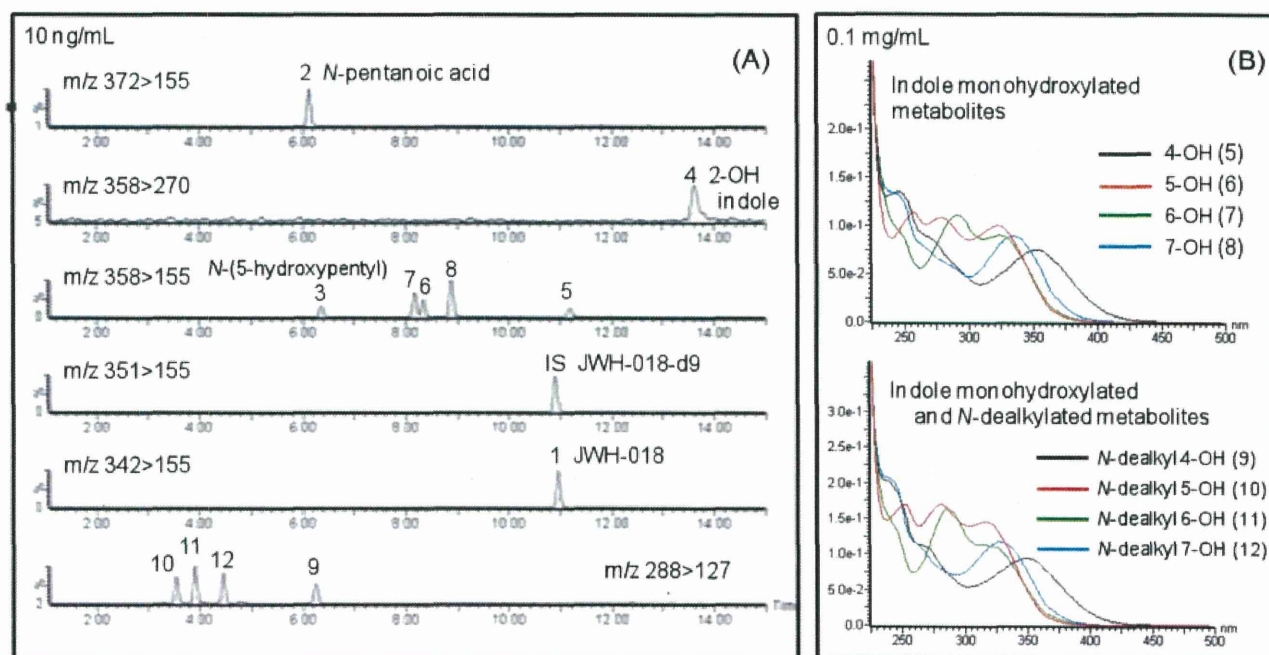
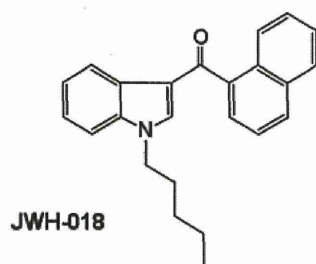


Fig. 2 UPLC-MS/MS MRM mass chromatograms (A) and PDA UV spectra (B) of the standard mixed solution of JWH-018 and its 11 putative metabolites



Possible metabolites	[M+H] ⁺
M1 Monohydroxylation	358
M2 Dihydroxylation	374
M2' Dehydration and N-alkyl dihydroxylation	372
M2'' Dihydrodiol formation	376
M3 Dihydrodiol formation and monohydroxylation	392
M4 N-Dealkylation and monohydroxylation	288
M5 N-Dealkylation and dihydroxylation	304
M5' N-Dealkylation and dihydrodiol formation	306
M6 Carboxylation	372

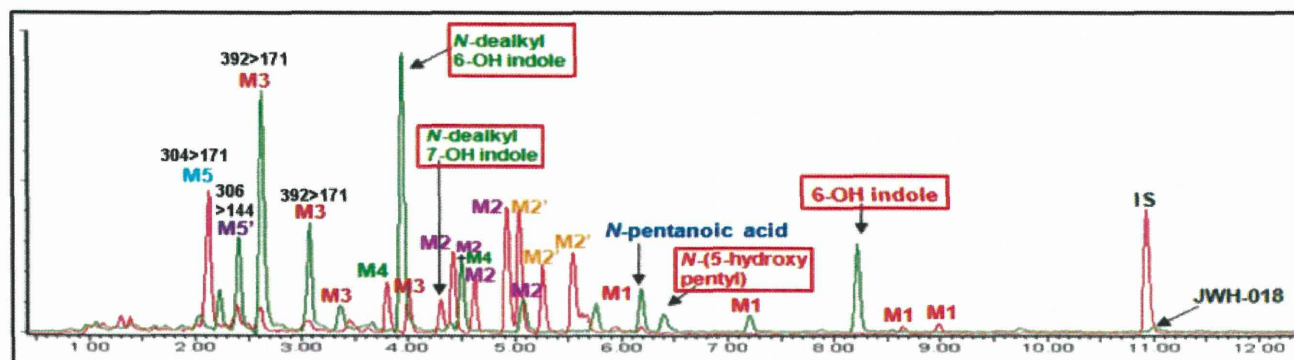


Fig. 3 UPLC-MS chromatogram (combined with ion peaks of m/z 358, 374, 372, 376, 392, 288, 304, 306 and 372) of the extract from the rat urine (treatment with β -glucuronidase) 0-24 h after the last administration of JWH-018 (5 mg/kg, *i.p.*, Rat 1)

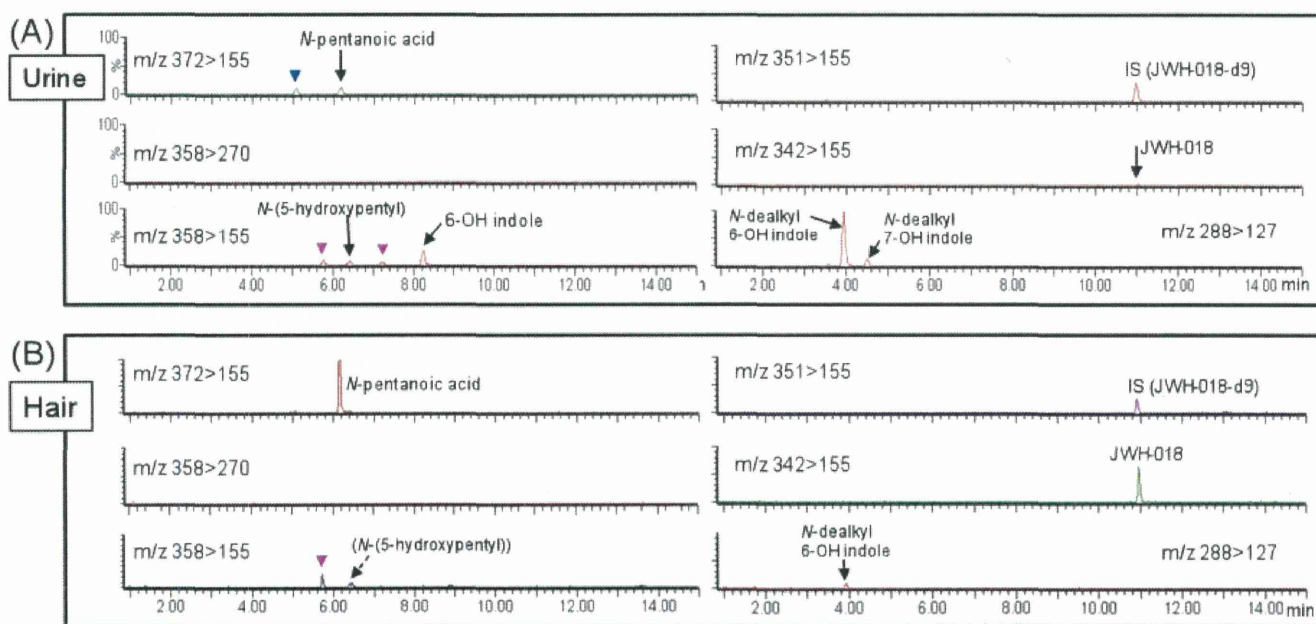


Fig. 4 UPLC-MS/MS MRM chromatograms of the extracts from the rat urine collected 0-24 hr after the last administration of JWH-018 (A) and the hair collected 4 weeks after the first administration (B) (5 mg/kg x 10 days, *i.p.*, Rat 1)

- ▼ Putative metabolite of dehydration and *N*-alkyl dihydroxylation except for the targeted metabolites
- ▼ Putative metabolites of *N*-alkyl monohydroxylation except for the targeted metabolites

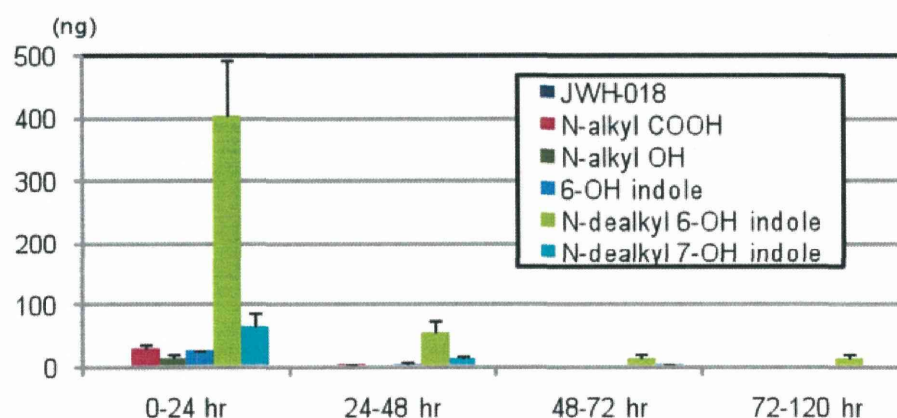


Fig. 5 Time course of the excretion of JWH-018 and its putative metabolites into the rat urine after the last administration of JWH-018 (5 mg/kg, *i.p.*, n=3)

*2-OH, 4-OH, 5-OH, 7-OH indole *N*-dealkyl 4-OH indole and *N*-dealkyl 5-OH indole were not detected in the urine of DA rat administered with JWH-018.

Table 1 MRM mode used for the quantitative analyses

Compounds	Retention time (min)	Precursor ion	Production	Cone voltage (V)	Collision voltage (V)
JWH-018 (1)	11.0	342	155	30	30
<i>N</i> -pentanoic acid (2)	6.1	372	155	30	30
<i>N</i> -(5-hydroxypentyl) (3)	6.4	358	155	30	30
2-OH indole (4)	13.6	358	270	40	20
4-OH indole (5)	11.2	358	155	30	30
5-OH indole (6)	8.4	358	155	30	30
6-OH indole (7)	8.2	358	155	30	30
7-OH indole (8)	8.9	358	155	30	30
<i>N</i> -dealkyl 4-OH indole (9)	6.3	288	127	40	40
<i>N</i> -dealkyl 5-OH indole (10)	3.6	288	127	40	40
<i>N</i> -dealkyl 6-OH indole (11)	3.9	288	127	40	40
<i>N</i> -dealkyl 7-OH indole (12)	4.5	288	127	40	40
JWH-018-d9 (IS)	10.9	351	155	30	30

Table 2 Validation of results of the LC-MS/MS analyses of JWH-018 and its putative metabolites in the rat urine

	JWH-018	<i>N</i> -pentanoic acid	<i>N</i> -(5-hydroxypentyl)	2-OH indole	4-OH indole	5-OH indole	6-OH indole	7-OH* indole	<i>N</i> -dealkyl 4-OH indole	<i>N</i> -dealkyl 5-OH indole	<i>N</i> -dealkyl 6-OH indole	<i>N</i> -dealkyl 7-OH indole	
LOD (ng/mL) S/N > 3	0.2	0.2	0.2	0.5	0.5	0.2	0.2	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	
LOQ (ng/mL) S/N > 10	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	
Precision (%) n=6	1 ng/mL	20.7	5.8	6.2	—	—	—	7.3	—	—	—	11.7	19.7
	10 ng/mL	4.1	11.4	11.5	—	—	—	4.3	—	—	—	10.2	19.1
	100 ng/mL	6.9	4.0	4.5	—	—	—	6.8	—	—	—	—	5.3
	200 ng/mL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.5	—
Accuracy (%) n=6	1 ng/mL	-3.0	-5.7	-16.7	—	—	—	-11.3	—	—	—	-0.3	-2.7
	10 ng/mL	-10.6	-6.0	-11.5	—	—	—	-9.0	—	—	—	-0.4	-15.6
	100 ng/mL	1.5	0.5	1.4	—	—	—	1.6	—	—	—	—	0.9
	200 ng/mL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-2.3	—
Linear range	1-100 ng/mL r2=0.9947	r2=0.9975	r2=0.9962	—	—	—	r2=0.9951	—	—	—	1-400 ng/mL r2=0.9954	r2=0.9943	

—: Not determined

Table 3 Validation of results of the LC-MS/MS analyses of JWH-018 and its putative metabolites in the rat hair and drug concentrations in the hair samples of rats collected 4 weeks after the first administration (5 mg/kg x 10 days, *i.p.*, n=3).

	JWH-018	<i>N</i> -pentanoic acid	<i>N</i> -(5-hydroxy pentyl)	2-OH indole	4-OH indole	5-OH indole	6-OH indole	7-OH indole	<i>N</i> -dealkyl 4-OH indole	<i>N</i> -dealkyl 5-OH indole	<i>N</i> -dealkyl 6-OH indole	<i>N</i> -dealkyl 7-OH indole
LOD (ng/mg) S/N > 3	0.025	0.025	0.025	0.05	0.05	0.025	0.025	0.025	0.05	0.05	0.05	0.05
LOQ (ng/mg) S/N > 10	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Precision (%) n=6	0.1 ng/mg	26.4	19.2	—	—	—	—	—	—	—	3.4	—
	1 ng/mg	11.8	4.7	—	—	—	—	—	—	—	11.1	—
	10 ng/mg	8.5	10.3	—	—	—	—	—	—	—	5.3	—
Accuracy (%) n=6	0.1 ng/mg	-11.7	-10.3	—	—	—	—	—	—	—	12.6	—
	1 ng/mg	5.2	-9.6	—	—	—	—	—	—	—	0.2	—
	10 ng/mg	-3.8	-10.1	—	—	—	—	—	—	—	-5.9	—
Linear range	0.1–10 ng/mg	r ² =0.9929	r ² =0.9794	—	—	—	—	—	—	—	r ² =0.9958	—
Concentrations in hair (ng/mg)	Rat1	2.04 ± 0.20	6.19 ± 0.38	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.97 ± 0.06	ND
	Rat2	1.49 ± 0.12	5.32 ± 0.31	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.91 ± 0.06	ND
	Rat3	2.77 ± 0.25	9.63 ± 0.13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.63 ± 0.04	ND

—: Not determined
ND: Not detected

分担研究報告書

研究分担課題 法規制薬物の代謝と分析及び鑑別に関する研究
研究分担者 花尻 瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

The First International Multidisciplinary Forum on New Drugs 参加報告

研究要旨 EUの乱用薬物モニタリング機関 European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) の招聘により、ポルトガル・リスボンにある EMCDDA で行われた The First International Multidisciplinary Forum on New Drugs に出席し、日本における違法ドラッグ流通実態及び指定薬物制度に関する2演題について口頭発表を行った。本フォーラムにはEU諸国を中心に合計41カ国の違法ドラッグに関する専門家が参加したが、本フォーラムに出席することにより、諸外国の専門家と知り合い、各国での流通実態及び問題点等に関する情報交換及び意見交換を行うことが可能であった。

A. 研究目的

EUの乱用薬物モニタリング機関 European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) の招聘により、ポルトガル・リスボンにある EMCDDA で行われた The First International Multidisciplinary Forum on New Drugs に出席し、ヨーロッパ及び諸外国における乱用薬物に関する情報収集及びディスカッションを行うと共に、日本における違法ドラッグ流通実態及び指定薬物制度に関する2演題（内容については参考文献1,2を参照）について口頭発表を行った。

B. 研究方法

1. 出張期間

平成23年5月10日-14日

2. 出張場所

EMCDDA, Lisbon, Portugal

3. 会議名

The First International Multidisciplinary Forum on New Drugs（平成23年5月11日-12日）

4. 日本からの参加者

花尻（木倉）瑠理

5. その他主な参加者

The European Commission, Europol, the European Medicines の他、EMCDDA member countries 30カ国（27 EU countries, Croatia, Turkey and Norway）、Australia, Belarus, Canada, Hong Kong SAR, Israel, Japan, New Zealand, Russia, Switzerland, Ukraine 及び USA の新規違法ドラッグに関する専門家。

C. 研究結果

本フォーラムは、11th Annual meeting of the Reitox early-warning system (EMS) network のサテライトフォーラムとして EMCDDA が開催したものである。近年、世界的にその流通が問題となっているカチノン系化合物や合成カンナビノイドを中心とした新規流通違法ドラッグに関する情報共有化を目的として、EU諸国を中心に合計41カ国の新規違法ドラッグに関する専門家が参加し、各国での流通実態及び問題点等を討議した。2日間と短い期間ではあったが、参加者は招聘者のみの限られた人数であり、円卓を囲んでのフォ