

厚生労働行政推進調査事業費補助金
厚生労働科学特別研究事業

急増する植物成分由来危険ドラッグの
迅速な規制に資する研究

令和4年度 総括・分担研究報告書
(22CA2018)

研究代表者 花尻(木倉) 瑠理

令和5年3月

目次

I. 総括研究報告	
急増する植物成分由来危険ドラッグの迅速な規制に資する研究	
花尻(木倉)瑠理	1
II. 分担研究報告	
1. 植物成分由来危険ドラッグの化学的特性及び <i>in vitro</i> 薬理特性の検討	
花尻(木倉)瑠理	
大麻草由来成分の構造類似化合物の識別法に関する検討	
花尻(木倉)瑠理	9
半合成カンナビノイドを含む大麻成分由来 23 化合物の一斉識別法の検討	
花尻(木倉)瑠理	21
植物成分由来危険ドラッグのカンナビノイド受容体への機能性の評価	
花尻(木倉)瑠理	33
2. 植物成分由来危険ドラッグ製品の流通実態調査及び含有化合物の同定	
田中 理恵	
植物成分由来危険ドラッグ製品の流通実態調査及び含有化合物の同定	
田中 理恵	39
3. 植物成分由来危険ドラッグの分析用標品合成及びインシリコによる活性予測評価法の検討	
出水 庸介	
植物成分由来危険ドラッグの分析用標品合成及びインシリコによる活性予測評価法の検討	
出水 庸介	51
4. 植物成分由来危険ドラッグの <i>in vitro</i> 代謝に関する検討	
石井 祐次	
Δ^9 -THC- <i>O</i> -acetate, Δ^8 -THC- <i>O</i> -acetate, 11 α -HHC <i>O</i> -acetate 及び 11 β -HHC- <i>O</i> -acetate の	
ヒト肝臓マイクロゾームによる <i>in vitro</i> 代謝に関する検討	
石井 祐次	67
5. 植物成分由来危険ドラッグの行動薬理特性の検討	
船田 正彦	
植物成分由来危険ドラッグの行動薬理特性の検討	
船田 正彦	87
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	99

急増する植物成分由来危険ドラッグの迅速な規制に資する研究

研究代表者:花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

研究要旨: 指定薬物 11α -HHC 及び 11β -HHC とそれらのアセチル化体 11α -HHC-*O*-acetate 及び 11β -HHC-*O*-acetate, また麻薬成分 Δ^9 -THC 及び Δ^8 -THC のアセチル化体 Δ^9 -THC-*O*-acetate 及び Δ^8 -THC-*O*-acetate の6化合物について, 流通実態調査, 分析用標品の製造, 対象化合物の化学的特性及び分析法の検討, *in vitro*による代謝検討, そして*in vivo*, *in vitro*及び*in silico*による薬理学的特性を検討した. その結果, 下記が明らかとなった.

① Δ^8 -THC-*O*-acetate 312 mg (99.7%), Δ^9 -THC-*O*-acetate 312 mg (98.7%), 11α -HHC-*O*-acetate 150 mg (99.7%), 11β -HHC-*O*-acetate 183 mg (99.6%)を合成し, 分析用標品として確保した.

② THCOの含有を標榜するオイル状製品から, Δ^8 -THC-*O*-acetate, Δ^9 -THC-*O*-acetate, $\Delta^{4(8)}$ -*iso*-THC-*O*-acetate, HHCOの含有を標榜するオイル状製品からは 11β -HHC-*O*-acetate, 11α -HHC-*O*-acetate, dihydro-*iso*-THC-*O*-acetateを検出・同定した. 両製品から, マイナー成分(副生成物) $\Delta^{4(8)}$ -*iso*-THC-*O*-acetateもしくはdihydro-*iso*-THC-*O*-acetateが検出されており, CBDを原料に合成された可能性が高いことが示唆された.

③ i) 各アセチル化体において, メタノール溶液ではGC-MS測定時及び室温保管時に一部脱アセチル化が認められたため, 溶解溶媒はアセトニトリル及びヘキサンが望ましいと考えられた. ii) 市販のイムノクロマト法によるスクリーニングキット製品を用いて対象6化合物の検出を確認した結果, 尿中代謝物を検出対象とした製品では高濃度でも陰性を示したが, 唾液中大麻草成分を検出対象とした製品では, いずれの化合物も1-10 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で陽性を示した. iii) 天然由来カンナビノイド及び半合成カンナビノイド成分(アセチル化体を含む)計23成分について, LC-(QTOF)MS及びGC-(QTOF)MSによる一斉識別法を開発した.

④ ヒト肝臓マイクロゾームを用いて検討した結果, Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11α -HHC-*O*-acetate, 11β -HHC-*O*-acetateは, ヒト体内で酵素化学的に加水分解され, 麻薬 Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, および指定薬物 11α -HHC, 11β -HHCをそれぞれ生成すると考えられた. また, これらの反応には, 少なくともヒト肝臓マイクロゾームのカルボキシエステラーゼが関与することが示唆された.

⑤ Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-*O*-acetate及び 11β -HHC-*O*-acetateを投与したマウスにおいて, いずれもカタレプシー様の無動状態及び体温下降作用の発現が確認された. これらの効果は, カンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬AM251の前処置によって抑制され, カンナビノイド CB_1 受容体が関与することが明らかになった.

⑥ ヒトカンナビノイド CB_1 受容体を発現させた細胞を用いて検討を行った結果, Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC及び 11β -HHC-*O*-acetateは, 陽性化合物CP-55,940と比較して弱い効果ではあったが, CB_1 受容体作用を有していることが確認された. 11α -HHC-*O*-acetateのみ有意な受容体活性化は認められなかったが, 動物実験において薬理作用の発現を認めることから, その活性には生体内における代謝の関与が示唆された.

⑦ Δ^8 -THC-*O*-acetate, Δ^9 -THC-*O*-acetate, 11α -HHC-*O*-acetateおよび 11β -HHC-*O*-acetate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と同様に結合し、その結合はCBDよりも強力であることが示唆された。

以上の結果より、 Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-*O*-acetate及び 11β -HHC-*O*-acetateを摂取した場合、CB₁受容体が関与した薬理作用の発現が予測され、これらの化合物を乱用することにより健康被害の発生が危惧される。

研究分担者(アイウエオ順)

石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院
准教授
田中 理恵 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部 主任研究官
出水 庸介 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 部長
花尻 (木倉) 瑠理
国立医薬品食品衛生研究所
生薬部 室長
船田 正彦 湘南医療大学薬学部 教授

研究協力者(アイウエオ順)

河村麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
黒原 原崇 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 研究員
正田 卓司 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 室長
辻 徹一郎 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 主任研究官
富山 健一 国立精神・神経医療研究センター
依存性薬物研究室 室長
三澤 隆史 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 室長
水谷佐久美 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
李 任時 中国薬科大学

A. 研究目的

本研究は、大麻の代替品として国内流入が急増して問題となっている大麻成分由来化合物について、医薬品医療機器等法の下に制定されて

いる指定薬物制度に対応し、規制化の検討に必要な科学的データを監視指導・麻薬行政に提供することを目的とする。

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 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)や Δ^8 -THCと構造類似の大麻成分由来化合物を含有する製品の国内流入が急増している。Hexahydrocannabinol (HHC)は大麻成分を原料として合成され、流通製品からは2種類の異性体(11α -HHC及び 11β -HHC)が同時に検出される。HHCは令和4年3月に指定薬物に指定されたが、規制後すぐに類似の新規化合物を含有する製品が出現して問題となっている。規制化合物であるHHC, Δ^9 -THC及び Δ^8 -THCの水酸基をアセチル化したHHC-*O*-acetate, Δ^9 -THC-*O*-acetate及び Δ^8 -THC-*O*-acetateは、新たに国内流入が確認されている代表的な大麻成分由来化合物である。これらの化合物については、人が摂取した際にどのような危険性があるのか、現在までに国内外において化学的特性及び薬理的特性を検討した報告がなく、早急な検討が必要である。

本研究では、早急に検討すべき活性未知の大麻成分由来化合物を対象を絞り、危害影響予測のための検討を行った。即ち、すでに指定薬物として規制されている 11α -HHC及び 11β -HHCとそれらのアセチル化体 11α -HHC-*O*-acetate及び 11β -HHC-*O*-acetate, また麻薬成分 Δ^9 -THC及び Δ^8 -THCのアセチル化体 Δ^9 -THC-*O*-acetate及び Δ^8 -THC-*O*-acetateの6化合物について、流通実態調査、分析用標品の製造、対象化合物の化学的特性及び分析法の検討、*in vitro*による代謝検討、

そして*in silico*, *in vitro*及び*in vivo*による薬理学的特性を検討し、指定薬物指定の検討に必要な科学的データを取得することを試みた。

B. 研究方法

【花尻(木倉)瑠理】

1) 大麻草由来成分の構造類似化合物の識別法に関する検討

対象6化合物について、GC-MS及びLC-MSを用いた分析法、また、イムノクロマト法を使用した市販スクリーニングキットによる検出法について検討を行った。アセチル化体 Δ^8 -THC-*O*-acetate、 Δ^9 -THC-*O*-acetate、 11α -HHC-*O*-acetate および 11β -HHC-*O*-acetateの4化合物について、メタノール、アセトニトリル、ヘキサンに溶解し、各溶液についてGC-MS測定時の安定性を確認すると共に、室温保存時の経時変化についてLC-MSにより検討を行った。市販のイムノクロマト法を用いたスクリーニングキットは、尿検査用 Accu Sign® DOA THC 及び唾液検査用 ToxWipe™ Oral6+ (共に関東化学)を用い、対象6化合物の各濃度のアセトニトリル溶液を水で10倍希釈して試料溶液とし検出確認を行った。

2) 半合成カンナビノイドを含む大麻成分由来23化合物の一斉分析法の検討

多種多様な成分を含む製品分析に対応可能な一斉分析法を確立するために、半合成化合物を含む大麻成分由来23化合物を対象として、LC-MSとGC-MSによる分離分析法を検討した。また、本分析法を用いて、これら化合物含有を標榜する3製品の分析を行い、検出成分についての検討を行った。分析にはLC-MS (UPLC AQUITY SQD, waters), LC-QTOFMS (TripleTOF 6600 LC-MS/MS, Sciex), 及びGC-MS (5975MSD GC-MS, Agilent), GC-QTOFMS (7200 Q-TOF GC-MS, Agilent)を用いた。LC-MSの移動相はA:0.1%ギ酸水溶液、B:0.1%ギ酸アセトニトリル溶液を用い、グラジェント条件で測定した。製品はアセトニトリルで抽出

を行い、フィルターろ過したものを分析に用いた。

3) 大麻草由来成分の誘導体のカンナビノイドCB₁, CB₂受容体における*in vitro*アゴニスト活性

対象6化合物について、ヒトリコンビナントCB₁及びCB₂カンナビノイド受容体を発現させた細胞を用いて、³⁵Sで標識したGuanosine 5'-(γ -thio) triphosphate (³⁵S-GTP γ S)結合を指標とした受容体機能評価試験を行い、被験物質のレセプターに対する最大反応の50%を示す濃度(EC₅₀値)を算出した。最終被験物質濃度は 1×10^{-12} から 1×10^{-5} mol/Lの8濃度設定した。また、CP55940を陽性物質として使用した。(積水メディカル株式会社へ委託)。

【田中 理恵】

令和4年度に入手したTHCアナログの含有を標榜するのうちオイル2製品を分析に供した。製品1mgをアセトニトリル1mL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、不溶成分を取り除いて、適宜希釈してGC-MS, LC-MSの測定試料とした。また、製品中の未知成分は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりHex-Hex:EtoAc 100:1-30:1で溶出して単離した。単離した成分は、精密質量分析及びNMRにより構造を同定した。

【出水 庸介】

Cannabidiol (CBD)を原料に、 Δ^8 -THC-*O*-acetate および Δ^9 -THC-*O*-acetate、また 11α -HHC-*O*-acetate および 11β -HHC-*O*-acetateを合成した。

Δ^8 -THC-*O*-acetateは、CBDを触媒量のトシル酸存在下にトルエン中加熱還流し、2重結合とフェノール性水酸基間にて環化反応を進行させて Δ^8 -THCを合成し、さらに水酸基をアセチル化することで合成した。 Δ^9 -THC-*O*-acetateは、まず、CBDに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℃に冷却した条件で添加し、その後-40℃で長時間攪拌した。続いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより異性体を含まない高純度な Δ^9 -THCを精製し、 Δ^9 -THCの水酸基をアセチル化することで合成した。

11 α -HHC-*O*-acetate 及び11 β -HHC-*O*-acetate については、まず Δ^8 -THCを還元することにより11 α -HHC及び11 β -HHCを得た。これらジアステレオマーをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した後、それぞれをアセチル化することで合成した。

合成した化合物のカンナビノイド CB₁ 受容体に対する結合親和性をコンピュータモデリングにて評価した。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。

【石井 祐次】

各アセチル化体4化合物について、1 mg/mL DMSO 溶液を、終濃度 50 μ g/mL となるように加えた。酵素反応は 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) で行い、プールドヒト肝臓ミクロゾーム (Corning) 10 μ g protein の存在下、終容量 200 μ L として 37°C でインキュベーションを行った。反応溶液中の脱アセチル化体の薬物濃度は、BEH Shield RP18 Column を装着した ACQUITY UPLC (Waters) により測定した。酵素的加水分解生成物を含むその他の各代謝物は、UPLC-QTOFMS によって構造を解析した。

【船田 正彦】

対象6化合物及び陽性化合物 CP-55,940 について、ICR 系雄性マウスを用いた行動薬理的解析とカンナビノイド CB₁ 受容体作用の有無を検討した。行動薬理的解析では、各薬物投与後、無道状態 (カタレプシー) をバーテストで、直腸体温をデジタル体温計で測定した。カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 (3 mg/kg, i.p.) は、各薬物投与15分前に処置した。カンナビノイド CB₁ 受容体作用評価は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO; Chinese Hamster Ovary) 細胞にヒト CB₁ 受容体をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO-CB₁ 細胞を確立し、薬物添加後の細胞内カルシウム濃度を蛍光強度の変化として、Flexstation II により測定した。カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬とし

て AM251、カンナビノイド CB₂ 受容体拮抗薬として AM630 を使用した。

C. 結果及び考察

【花尻 (木倉) 瑠理】

1) 大麻草由来成分の構造類似化合物の識別法に関する検討

LC-MS による分析条件を検討した結果、C18 カラム (ACQUITY BEH C18 2.1mm \times 100mm, 1.7 μ m, Waters) を用いたグラジエント条件で6化合物の十分なピーク分離が可能であった。GC-MS による測定では、 Δ^9 -THC-*O*-acetate 及び Δ^8 -THC-*O*-acetate の異性体間ではフラグメンテーションパターンが異なり判別が容易であったが、11 α -及び11 β -HHC、またそれらのアセチル化体における立体異性体間ではマススペクトルがほぼ同一であった。さらに、11 α -HHC と 11 α -HHC-*O*-acetate は、DB-1 及び DB-5 相当のカラムでは十分な分離が困難であった。各アセチル化体4化合物について3種類の溶媒を用いて測定を行った結果、メタノール溶液では、GC-MS で測定時に一部が分解して脱アセチル化体が同時に検出されたが、その他の溶媒では分解物は認められなかった。また、各溶液を室温保存し経時的に LC-MS で測定したところ、メタノール溶液では2日後に脱アセチル化体がメインピークとの面積比で1%程度確認され、1週間後では5-8%程度に増大した。一方で、アセトニトリル及びヘキサン溶液では分解物は確認されなかったため、これらの溶媒を用いた試料調製、保管が望ましいと考えられた。スクリーニングキットを用いた検出では、代謝物を検出対象とした Accu Sign[®] DOA THC (Δ^9 -THC-COOH カットオフ値 50 ng/mL) では、対象6化合物は10 μ g/mL の濃度でも陰性であった。一方、 Δ^9 -THC 等複数的大麻草成分を検出対象とした ToxWipe[™] Oral6+ (Δ^9 -THC カットオフ値 25 ng/mL) では、6化合物が1-10 μ g/mL の濃度で陽性を示した。

2) 半合成カンナビノイドを含む大麻成分由来

23 化合物の一斉分析法の検討

近年流通が問題となっているカンナビノイド及びそのアセチル化体計 11 化合物 (CBN, CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 及びアセチル化体 CBN-O, Δ^8 -THC-O, Δ^9 -THC-O, 11 α -HHC-O, 11 β -HHC-O) について, LC の分析条件を検討したところ, カラム Cortecs C18 (2.1mm i.d.×150mm, 2.7 μ m, Waters) のグラジエント分析で, これら 11 化合物の良好な分離が得られ, その他の天然由来カンナビノイド成分 (CBDV, CBDB, CBDP, CBDA, Δ^9 -THCV, Δ^9 -THCB, Δ^9 -THCP, Δ^9 -THCA-A, CBG, CBGA, CBC, CBL) を合わせた計 23 化合物の一斉分析においても十分な分離識別が可能であった. 一方, GC では, カラム HP-5MS (30m×0.25mm i.d., 0.25 μ m, Agilent) による分析で, カルボン酸体を除く計 20 化合物の分離識別が可能であった. 次に, これらの測定条件を用いて HHC, HHCO, THCO 等の含有を標榜するオイル状製品の抽出物について分析を行った結果, LC-MS と GC-MS で, 主成分以外に, 合成時の副生成物と考えられる複数の成分が検出された. LC-QTOFMS 及び GC-QTOFMS により, それぞれのピークのスペクトルを詳細に解析した結果, CBD を原料とする 2 つの合成経路が推測された. また, これらの製品から異性体が複数検出されたが, 解析する上で, GC-QTOFMS の精密質量情報が有用であった. しかし GC-MS で検出されない微量成分が, LC-MS で検出される場合も散見され, LC-MS と GC-MS の両方で解析を行うことが望ましいと考えられた.

3) 大麻草由来成分の誘導体のカンナビノイド CB₁, CB₂ 受容体における *in vitro* アゴニスト活性

対象 6 化合物について, CB₁, CB₂ 受容体における *in vitro* アゴニスト活性を測定した. その結果, CB₁ 受容体に対するアゴニスト活性は, 最も活性が強かった 11 β -HHC の EC₅₀ 値が 7.96×10⁻⁶ mol/L であったが, その他は >1×10⁻⁵ mol/L であっ

た. また, 陽性化合物 CP-55,940 が 100%の活性を示す 1×10⁻⁵ mol/L (10 μ M) の濃度において, 11 α -HHC 16%, 11 β -HHC 52%, 11 β -HHC-*O*-acetate 35%, Δ^8 -THC-*O*-acetate 21%, Δ^9 -THC-*O*-acetate 9%のアゴニスト活性を示したが, 11 α -HHC-*O*-acetate は活性が認められなかった. カンナビノイド CB₂ 受容体対しては, いずれの化合物も EC₅₀ 値は >1×10⁻⁵ mol/L であり, 1×10⁻⁵ mol/L (10 μ M) におけるアゴニスト活性も 0~20% であった.

【田中 理恵】

令和 4 年度に入手した 2 製品について, GC-MS, LC-MS, HR-MS, および NMR 分析を行った. その結果, THCO の含有を標榜する製品からは, Δ^8 -THC-*O*-acetate, Δ^9 -THC-*O*-acetate, $\Delta^{4(8)}$ -*iso*-THC-*O*-acetate, HHCO の含有を標榜する製品からは 11 β -HHC-*O*-acetate, 11 α -HHC-*O*-acetate, dihydro-*iso*-THC-*O*-acetate を検出・同定した. $\Delta^{4(8)}$ -*iso*-THC-*O*-acetate については, CBD から環化反応で Δ^9 -THC または Δ^8 -THC を合成する際に副生することが報告されている $\Delta^{4(8)}$ -*iso*-THC の水酸基がアセチル化された化合物と考えられ, また, dihydro-*iso*-THC-*O*-acetate については, 同様に CBD から THC を経て HHC を合成する際に副生する dihydro-*iso*-THC の水酸基がアセチル化された化合物と考えられた. 従って, 両製品ともに CBD をもとに合成された可能性が高いことが示唆された. なお, 2 製品とも, その他構造不明の成分が検出されており, 引き続き解析を行う必要がある.

【出水 庸介】

Δ^8 -THC-*O*-acetate 312 mg (純度 99.7%),
 Δ^9 -THC-*O*-acetate 312 mg (純度 98.7%),
11 α -HHC-*O*-acetate 150 mg (純度 99.7%),
11 β -HHC-*O*-acetate 183 mg (純度 99.6%) を合成し, 分析用標品として確保した.

Δ^8 -THC-*O*-acetate, Δ^9 -THC-*O*-acetate, 11 α -HHC-*O*-acetate および 11 β -HHC-*O*-acetate 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 Δ^8 -THC-*O*-acetate(-9.419 kcal/mol)、 Δ^9 -THC-*O*-acetate(-9.470 kcal/mol)、11 α -HHC-*O*-acetate(-9.061 kcal/mol)および11 β -HHC-*O*-acetate(-9.449 kcal/mol)と見積もられ、より強力に結合することが示唆された。

【石井 祐次】

Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11 α -HHC-*O*-acetate および 11 β -HHC-*O*-acetate について、ヒト肝臓マイクロソームと37°Cでインキュベーションした結果、脱アセチル化体である Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11 α -HHC および 11 β -HHCの分析用標品と同一の保持時間に、それぞれピークが検出された。これら脱アセチル化体のピークは、反応時間依存的に増加し、60分後にはアセチル化体は殆ど残存しなかった。また、 Δ^8 -THC-*O*-acetateの方が、 Δ^9 -THC-*O*-acetate, 11 α -HHC-*O*-acetate および 11 β -HHC-*O*-acetate よりも加水分解され易い傾向が認められた。なお、加水分解は予め煮沸してタンパク質(酵素)を変性させたヒト肝臓マイクロソームを用いたインキュベーションでは認められなかった。さらに、カルボキシエステラーゼ阻害剤 Bis(4-nitrophenyl) phosphate (BNPP) とプレインキュベーションしたヒト肝臓マイクロソームを酵素源としたインキュベーションにおいても、加水分解は殆ど認められなかった。

【船田 正彦】

Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-*O*-acetate 及び 11 β -HHC-*O*-acetate を ICR マウスにそれぞれ 20 mg/kg 投与した結果、カタレプシー様無動状態及び直腸体温の下降が観察された。一方、カンナビノイド CB₁ 受容体の強力な作用薬である CP-55,940 は、1 mg/kg の投与によってカタレプシー様無動状態及び直腸体温の下降が発現した。また、カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 (3 mg/kg) の前処置により、 Δ^9 -THC-*O*-acetate,

Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11 β -HHC 及び 11 β -HHC-*O*-acetate (20 mg/kg) の投与 90 分後および

11 α -HHC 及び 11 α -HHC-*O*-acetate (20 mg/kg) の投与 180 分後において、カタレプシー様無動状態および体温下降は有意に抑制された。このことから、無動状態および体温下降の発現には、カンナビノイド CB₁ 受容体が関与することが明らかになった。

CHO-CB₁ 細胞を利用して、対象 6 化合物及び CP-55,940 のカンナビノイド CB₁ 受容体に対する作用を検討した結果、陽性対象である CP-55,940 の EC₅₀ は 7.42×10^{-7} M であった。一方、 Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC 及び 11 β -HHC-*O*-acetate は 40 μ M で有意な蛍光の増加が認められたが、11 α -HHC-*O*-acetate については、本試験濃度では有意な増加は認められなかった。これら化合物の作用は、カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 (10 μ M) の前処置により完全に抑制されたが、CB₂ 受容体拮抗薬 AM630 ではいずれの化合物においても抑制作用が認められなかった。

D. 結論

指定薬物11 α -HHC及び11 β -HHCとそれらのアセチル化体11 α -及び11 β -HHC-*O*-acetate, また麻薬成分 Δ^9 -THC及び Δ^8 -THCのアセチル化体 Δ^9 -THC-*O*-acetate及び Δ^8 -THC-*O*-acetateの6化合物について、下記が明らかとなった。

①分析用標品の製造

Δ^8 -THC-*O*-acetate 312 mg (純度99.7%),
 Δ^9 -THC-*O*-acetate 312 mg (純度98.7%),
11 α -HHC-*O*-acetate 150 mg (純度99.7%),
11 β -HHC-*O*-acetate 183 mg (純度99.6%)を合成し、分析用標品として確保した。

②流通実態調査

THCOの含有を標榜するオイル状製品から、 Δ^8 -THC-*O*-acetate, Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^4 (8)-*iso*-THC-*O*-acetate, HHCOの含有を標榜するオイル状製品からは11 β -HHC-*O*-acetate,

11 α -HHC-*O*-acetate, dihydro-*iso*-THC-*O*-acetate を検出・同定した。両製品から、マイナー成分(副生成物) $\Delta^4(8)$ -*iso*-THC-*O*-acetateもしくは dihydro-*iso*-THC-*O*-acetateが検出されており、CBDを原料に合成された可能性が高いことが示唆された。

③対象化合物の化学的特性及び分析法の検討

i) アセチル化体4化合物, Δ^8 -THC-*O*-acetate, Δ^9 -THC-*O*-acetate, 11 α -HHC-*O*-acetateおよび 11 β -HHC-*O*-acetateにおいて、メタノール溶液ではGC-MS測定時及び室温保管時に一部脱アセチル化が認められたため、溶解溶媒はアセトニトリル及びヘキサンが望ましいと考えられた。

ii) 市販のイムノクロマト法によるスクリーニングキット製品を用いて対象6化合物の検出を確認した結果、尿中代謝物を検出対象とした製品では高濃度でも陰性を示したが、唾液中大麻草成分を検出対象とした製品では、いずれの化合物も 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で陽性を示した。

iii) 天然由来カンナビノイド及び半合成カンナビノイド成分計23成分について、LC-QTOFMS及びGC-QTOFMSによる一斉識別法を開発した。

④*in vitro*による代謝検討

ヒト肝臓マイクロゾームを用いて検討した結果、 Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11 α -HHC-*O*-acetate, 11 β -HHC-*O*-acetateは、ヒト体内で酵素化学的に加水分解され、麻薬 Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, および指定薬物11 α -HHC, 11 β -HHCをそれぞれ生成すると考えられた。また、これらの反応には、少なくともヒト肝臓マイクロゾームのカルボキシエステラーゼが関与することが示唆された。

⑤*In vivo* 薬理学的特性

対象6化合物を投与したマウスにおいて、いずれもカタレプシー様の無動状態及び体温下降作用の発現が確認された。これら効果は、カンナビノイドCB₁受容体拮抗薬AM251の前処置によって抑制され、カンナビノイドCB₁受容体が関与することが明らかになった。

⑥*In vitro* 薬理学的特性

ヒトカンナビノイドCB₁受容体を発現させた細胞を用いて検討した結果、 Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC及び 11 β -HHC-*O*-acetate は、陽性化合物CP-55,940と比較して弱い効果ではあったが、CB₁受容体作用を有していることが確認された。

11 α -HHC-*O*-acetateのみ有意な受容体活性化は認められなかったが、動物実験において薬理作用の発現を認めることから、その活性には生体内における代謝の関与が示唆された。

⑦*In silico* 薬理的特性

各アセチル化体4化合物, Δ^8 -THC-*O*-acetate, Δ^9 -THC-*O*-acetate, 11 α -HHC-*O*-acetateおよび 11 β -HHC-*O*-acetate)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と同様に結合し、その結合はCBDよりも強力であることが示唆された。

以上の結果より、 Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-*O*-acetate及び11 β -HHC-*O*-acetateを摂取した場合、CB₁受容体が関与した薬理作用の発現が予測され、これらの化合物を乱用することにより健康被害の発生が危惧される。

2022年12月に、欧州薬物・薬物依存監視センター(EMCDDA)は、「HHCおよび関連半合成カンナビノイド(semi-synthetic cannabinoids; SSC)に関する専門家会議」を開催し、これらの化合物の出現が、15年前に合成カンナビノイドを含有する「脱法ハーブ」が出現して以来、大麻に代わる「合法的」な市場において、初めての大きな変化となる可能性を指摘している。従来大麻草からはごく微量しか検出されない成分やその誘導体が、インターネット市場で、半合成/合成の高純度な粉末・オイル状製品として流通している。THC様作用を有することが報告されている化合物も存在し、海外では、hempにこれらを添加したものが、

高THC含有大麻草(marijuana)様の味や香りと作用を有する「合法的」な大麻製品として流通している。日本においても、大麻製品喫煙時の作用を期待して、これらを含む電子タバコ用のカートリッジ製品が流通している。しかし、これら化合物の大量使用、長期使用における有害性は明らかになっていない。THCには長期使用によるエピジェネティックな変化が報告されており、これら構造類似化合物についても同様の危険性が憂慮される。本研究において、これら化合物の流通実態及び有害性を把握し、指定薬物指定の検討に必要な科学的データを取得することは、大麻関連製品の乱用防止の一助になると考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

学会発表

- 1) 田中理恵, 河村麻衣子, 水谷佐久美, 花尻(木倉)瑠理:令和2年-令和3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(2021.10.31-11.1, 川崎)
- 2) 河村麻衣子, 三澤隆史, 辻巖一郎, 黒原崇, 伊藤美千穂, 出水庸介, 花尻(木倉)瑠理:大麻草由来成分の構造類似体の分析法に関する検討. 日本薬学会第143年会(2023.3.26, 札幌)
- 3) 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).
- 4) 水谷佐久美, 河村麻衣子, 田中理恵, 三澤隆史, 辻巖一郎, 黒原崇, 伊藤美千穂, 出水庸介, 花尻(木倉)瑠理:大麻成分由来23化合物の一斉分析法の検討. 日本薬学会第143年会(2023.3.26, 札幌)
- 5) Pineda Garcia Jorge Carlos, 趙爽利, 李任時, 花尻瑠理, 出水庸介, 田中嘉孝, 石井祐次:

Δ^9 -THC-*O*-acetate および Δ^8 -THC-*O*-acetate のヒト肝臓ミクロゾームによる酵素化学的加水分解と Δ^9 -THC および Δ^8 -THC 生成. 日本薬学会第143年会(2023.3.26, 札幌).

論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし

分担研究課題:植物成分由来危険ドラッグの化学的特性及び in vitro 薬理特性の検討

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

大麻草由来成分の構造類似化合物の識別法に関する検討

研究要旨:11 α -HHC, 11 β -HHC及びそれらのアセチル化体11 α -HHC-*O*-acetate, 11 β -HHC-*O*-acetate, さらに Δ^9 -THCと Δ^8 -THCのアセチル化体 Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetateの計6化合物について, GC-MS及びLC-MSを用いた識別法, また, イムノクロマト法を使用した市販スクリーニングキットによる検出法の検討を行った. LC-MSによる分析条件を検討した結果, C18カラム(AQCUITY BEH C18 2.1mm \times 100mm, 1.7 μ m, Waters)を用いたグラジエント条件で6化合物の十分なピーク分離が可能であった. GC-MSによる測定では, Δ^9 -THC-*O*-acetate及び Δ^8 -THC-*O*-acetateの異性体間ではマスフラグメンテーションパターンが異なり判別が容易であったが, 11 α -及び11 β -HHC, またそれらのアセチル化体における立体異性体間ではマスペクトルがほぼ同一であった. さらに, 11 α -HHCと11 α -HHC-*O*-acetateは, HP-1及びDB-5相当のカラムでは十分な分離が困難であった. 各アセチル化体について3種類の溶媒を用いて測定を行った結果, メタノール溶液では, GC-MSで測定時に一部が分解して脱アセチル化体が同時に検出されたが, その他の溶媒では分解物は認められなかった. また, 各溶液を室温保存し経時的にLC-MSで測定したところ, メタノール溶液では, 脱アセチル化体の経時的な増加が認められたが, アセトニトリル及びヘキサン溶液では分解物は確認されなかった. 従って, アセトニトリルやヘキサン等の溶媒を用いた試料調製, 保管が望ましいと考えられた. スクリーニングキットを用いた検出では, 尿中代謝物を検出対象としたAccuSign[®] DOA THC(Δ^9 -THC-COOH カットオフ値50 ng/mL)では, 対象6化合物は10 μ g/mLの濃度でも陰性であった. 一方, 唾液中 Δ^9 -THC等複数的大麻草成分を検出対象としたToxWipe[™] Oral6+ (Δ^9 -THC カットオフ値25 ng/mL)では, 6化合物が1-10 μ g/mLの濃度で陽性を示した. 今後も更なる大麻由来成分の構造類似体の出現が懸念されており, 今回得られた分析結果は有用な知見になると考えられる.

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

近年, 大麻の幻覚作用の主体である麻薬成分 Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)の構造類似化合物を含有する製品の流通が急増し, その乱用による健康危害が懸念される. 特に, 令和4年3月に, hexahydrocannabinol (HHC)が指定薬物として規制された後, 規制化合物であるHHC及びTHCのアセチル化体(*O*-acetate)が流通し問題と

なっている. HHCは製品中からジアステレオマー(11 α 体及び11 β 体)として検出されていることから, THCを化学的に還元した化合物であると推測されている. 本研究では, 11 α -HHC, 11 β -HHC及びそれらのアセチル化体 11 α -HHC-*O*-acetate, 11 β -HHC-*O*-acetate, また Δ^9 -THCとその異性体 Δ^8 -THCのアセチル化体 Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetateの計6化合物について, GC-MS及びLC-MSを用いた識別法, また, イムノクロマト法を使用した市販スクリーニングキットによる検出法について検討を行った.

B. 研究方法

①試料

分析対象 6 化合物 Δ^9 -THC-*O*-acetate , Δ^8 -THC-*O*-acetate , 11 α -HHC-*O*-acetate , 11 β -HHC-*O*-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC 及び、麻薬である Δ^9 -THC, Δ^8 -THC は国立医薬品食品衛生研究所で合成し、構造及び純度を確認したものを用いた¹⁾⁻³⁾。その他 11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH(Δ^9 -THC-COOH)及び cannabidiol(CBD), cannabinol(CBN)は Cerilliant 社より購入し分析に使用した。メタノール, アセトニトリルは HPLC 用を, その他溶媒は特級試薬を用い, 水は Milli-Q による精製水を使用した。

THC 判定用の市販スクリーニングキットとして, 尿中薬物検査用 AccuSign® THC (Princeton BioMeditech 社) 及び, 唾液中薬物検査用 ToxWipe™ Oral6+ (Oranoxis 社)を共に関東化学より購入し用いた。

②溶媒中薬物の安定性の検討

アセチル化体 4 化合物について, メタノール, アセトニトリル, ヘキサンに溶解し, 0.1 mg/mL 溶液とした。各溶液の作成直後に GC-MS 分析を行い, 測定時の安定性の確認を行った。

保存時における経時変化の検討は, 各溶液を褐色バイアル瓶にて室温保管し, 0, 24, 48 時間, 7 日, 50 日後に LC-MS 分析を行い, 各化合物の検出確認を行った。なお, ヘキサン溶液については窒素気流化で乾固後に, 同量のアセトニトリルを加えて溶解し測定を行った。

③分析法の検討

1) GC-MS

装置 Agilent 社製 8890 GC/5977B

GC 測定条件

カラム:HP-1MS (30 m x 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μ m, Agilent 社製), キャリアーガス:He, 0.8 mL/min, 注入法:スプリット 10:1, 注入口温度:220 °C, カラム温度:150°C (1 min hold) - 15°C /min - 210°C (20 min hold)- 10°C/min -310°C (5 min hold)

質量分析条件

イオン化法:EI, トランスファーライン温度:280°C, イオン源温度:230°C, 四重極温度:150°C, スキャン範囲: m/z 40-650

2) LC-MS

装置 Waters 社製 ACQUITY UPLC I-Class/SQD2
LC 測定条件

カラム:ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm x 100 mm, 1.7 μ m), Van Guard column BEH C18 (2.1 mm x 5 mm, 1.7 μ m) Waters, 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, 移動相条件:グラジエント分析, A/B:40/60-10/90 (20 min, 5 min hold), Flow:0.3 mL/min, カラム温度:40 °C, 注入量:1 μ L

PDA 分析条件

スキャン範囲:210-450 nm, ピーク検出:281 nm

質量分析条件

イオン化法:ESI, positive/negative, Capillary voltage:2.5 kV, Cone voltage:30V, Source temp.:150°C, Desolvation Temp.:450°C, N₂, Cone Gas Flow:150 L/hr, Desolvation Gas Flow:800 L/hr, スキャン範囲: m/z 120-600

3) イムノアッセイキット

各検査キットは添付の使用説明書に従い測定を行った。

i) AccuSign THC

試験溶液 110 μ L (スポイト 3, 4 滴相当)をスクリーニングキットのサンプルウェルに滴下し, 3 分後に目視判定した (Fig. 1)。判定は下記の通りとした。

- 陽性:Control バンドが現れ, Test バンドが現れない(+)
- 陰性:Control バンドおよび Test バンドが同様の濃さで現れる(-)
- 無効:3 分以内に Control バンドが現れない。

ii) ToxWipe Oral6+

口腔内の唾液相当として, 試験溶液 300 μ L をスクリーニングキットのろ紙部分に満遍なく滴下した後, ろ紙部分を付属容器に差し込んだ。5 分間

水平に静置した後に TH 部のバンドを目視判定した (Fig. 2). 判定基準は Accu Sign THC と同様とした。

化合物の各濃度のアセトニトリル溶液は、水で 10 倍希釈し (アセトニトリル:水=10:90)、試験溶液とした。化合物標品の検出限界濃度について検査キットによる検討を行った。対象化合物濃度は最大 10-100 $\mu\text{g/mL}$ とし、最大濃度で陰性の場合には検出困難とした。

さらに、2017 年に入手した THC オイル、CBD オイル製品 (製品 No.1-3) 及び、2022 年に入手した対象化合物の含有を確認している 4 製品 (製品 No.4-7) について、スクリーニングキットを用いて検出の確認を行った。各製品は 1 mg を量り取り、1 mL のアセトニトリルを加えて、超音波下 10 分間抽出した後、フィルターろ過 (Ultrafree-MC-HV, Durapore PVDF, 0.45 μm , Merck Millipore 社製) を行った。この抽出液を水で 10 倍希釈して試験溶液とし、各スクリーニングキットを用いて判定を行った。なお、製品中の対象化合物含有量については、標品の希釈溶液 (0.05 または 0.1 mg/mL) とのピーク面積比により、暫定的な値を算出した。

C. 結果及び考察

1) GC-MS, LC-MS 分析結果

対象とする 6 化合物及び Δ^9 -THC, Δ^8 -THC のアセトニトリル溶液について機器分析を行い、各化合物の保持時間及びスペクトル情報を得た (Fig. 3-1, Fig. 3-2)。GC-MS による測定では、 Δ^9 -THC-*O*-acetate 及び Δ^8 -THC-*O*-acetate の異性体間ではマスフラグメンテーションパターンが異なり判別が容易であったが、11 α -HHC と 11 β -HHC 及びそれらのアセチル化体の立体異性体間ではマススペクトルがほぼ同一であった。GC-MS の分析条件を検討した結果、11 α -HHC と 11 α -HHC-*O*-acetate は、HP-1MS 及び DB-5MS カラムにおいては十分な分離が困難であったが、その他の化合物についてはピーク分離が確認できた。

一方、LC-MS による分析条件を検討した結果、C18 カラムを用いたグラジエント条件で、8 化合物間の十分なピーク分離が可能であった (Fig.4)。しかし各異性体のマススペクトル及び UV スペクトルによる判別は困難であった。

2) 溶媒中薬物の安定性についての検討結果

各アセチル化体について 3 種類の溶媒を用いて測定を行った結果、メタノール溶液では GC-MS 測定時に一部が分解し、脱アセチル化体が同時に検出された (Fig. 5)。しかし、アセトニトリル及びヘキサン溶液では分解物は認められなかった。

次に、各溶液を室温下で保存し、経時的に採取して LC-MS で測定した。その結果、メタノール溶液では 48 時間後に脱アセチル化体がメインピークとの面積比で 1% 程度確認され、1 週間後では 5-8% 程度、さらに 50 日後には 25-40% の脱アセチル化体が認められた。一方、アセトニトリル及びヘキサン溶液では 50 日後でも分解物やピークの減少は確認されなかった (Table 1)。

以上の結果から、アセチル化体については、アセトニトリルまたはヘキサンを用いた試料調製、保管が望ましいと考えられた。

3) イムノアッセイキットによる検討結果

1) 化合物溶液の検出の確認

対象化合物及びブランク (薬物フリー) 溶液を調製し、2 種類の市販イムノアッセイキットによる検討を行った。

イムノアッセイキットにおいては、試験溶液は水もしくは緩衝液の希釈溶液である必要がある。しかし、対象化合物は脂溶性が高く水に溶けにくい。そこで、はじめに、唾液検査用の ToxWipe Oral6+ を用いて、化合物の高濃度水希釈溶液を可能とする溶解溶媒の検討を行った。アセトニトリルは、対象化合物が比較的溶解しやすい溶媒であるが、水で希釈すると、高濃度においては化合物が析出した。そこで、水で希釈する際に、界面活性剤 (Kolliphor, Sigma-alddrich 社) を少量添加した。その結果、薬物を含有しないブランク溶液でも擬陽性を示し、使用は不可であった。また、化合物

を DMSO に溶解後、水で希釈した結果、アッセイキットの検出感度が大きく低下した。そこで、試験溶液中の最終化合物量の上限は 10 µg/mL 程度となるが、アセトニトリル溶液を水で 10 倍に希釈する調製方法を採用した。

AccuSign THC を用いて、対象とする 6 化合物の検出を確認した結果、 Δ^9 -THC の代謝物 11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH (Δ^9 -THC-COOH, カットオフ値 50 ng/mL) 以外の化合物は、10 µg/mL の最大濃度で陰性であった。Fig. 6 に各化合物の測定結果を写真で示した。

一方、 Δ^9 -THC 等複数の大麻成分を検出対象とした ToxWipe Oral6+ (Δ^9 -THC カットオフ値 25 ng/mL) では、6 化合物が 1-10 µg/mL の濃度で陽性を示した。Fig. 7 に各化合物の検出限界濃度における測定結果を写真で示した。

2 種類の市販イムノアッセイキットによる各化合物の検出限界値をまとめて Table 2 に示した。表中、AccuSign THC において最大濃度 (10 µg/mL) で陰性の化合物は「-」表記とした。

AccuSign THC では、検出対象である Δ^9 -THC-9-COOH 以外の化合物が全て陰性を示したのに対し、ToxWipe Oral6+ では、濃度差はあるが、対象化合物全てが陽性の結果を示した。ToxWipe Oral6+ の添付文書には、クロスリアクティビティについて、検出限界 Δ^8 -THC 6 ng/mL, CBN 12.5 ng/mL の記載があり、 Δ^9 -THC より高感度に検出される。このように、広く大麻由来成分を検出対象として設計されたイムノアッセイキットであると考えられるため、今回の結果は妥当であったと考えられる。また、今回対象とした化合物以外にも様々な大麻類似化合物に陽性反応を示すことが予想される。

ii) 製品中薬物の検出の確認

THC オイル, CBD オイル製品 (製品 No.1-3) 及び、対象化合物含有を過去に確認している 4 製品 (製品 No.4-7) について、スクリーニングキットを用いて検出の確認を行った。製品の一覧および抽出液における検査キットの判定結果を Table 3

に示した。全ての製品抽出液は AccuSign THC で陰性、ToxWipe Oral6+ で陽性の結果を示した。これは、表に併記した抽出液中の化合物含有量 (暫定値) を鑑みると、妥当な結果と考えられた。

D. 結論

11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-*O*-acetate, 11 β -HHC-*O*-acetate, Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate の計 6 化合物について、GC-MS 及び LC-MS を用いた分析法、また、イムノクロマト法を使用した市販スクリーニングキットによる検出法の検討を行った。LC-MS による分析条件を検討した結果、C18 カラム (AQUITY BEH C18 2.1mm×100mm, 1.7µm, Waters) を用いたグラジエント条件で 6 化合物の十分なピーク分離が可能であった。GC-MS による測定では、 Δ^9 -THC-*O*-acetate 及び Δ^8 -THC-*O*-acetate の異性体間ではマスフラグメンテーションパターンが異なり判別が容易であったが、11 α -及び 11 β -HHC、またそれらのアセチル化体における立体異性体間ではマススペクトルがほぼ同一であった。さらに、11 α -HHC と 11 α -HHC-*O*-acetate は、HP-1 及び DB-5 相当のカラムでは十分な分離が困難であった。各アセチル化体について 3 種類の溶媒を用いて測定を行った結果、メタノール溶液では、GC-MS で測定時に一部が分解して脱アセチル化体が同時に検出されたが、その他の溶媒では分解物は認められなかった。また、各溶液を室温保存し経時的に LC-MS で測定したところ、メタノール溶液では、脱アセチル化体の経時的な増加が認められたが、アセトニトリル及びヘキサン溶液では分解物は確認されなかった。従って、アセトニトリルやヘキサン等の溶媒を用いた試料調製、保管が望ましいと考えられた。スクリーニングキットを用いた検出では、尿中代謝物を検出対象とした AccuSign® DOA THC (Δ^9 -THC-COOH カットオフ値 50 ng/mL) では、対象 6 化合物は 10 µg/mL の濃度でも陰性であった。一方、唾液中 Δ^9 -THC 等複数の大麻草成分を検出対象とした ToxWipe™

Oral6+ (Δ^9 -THC カットオフ値 25 ng/mL)では, 6化合物が 1-10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で陽性を示した. 今後も更なる大麻由来成分の構造類似体の出現が懸念されており, 今回得られた分析結果は有用な知見になると考えられる.

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

学会発表

- 1) 河村麻衣子, 三澤隆史, 辻巖一郎, 黒原崇, 伊藤美千穂, 出水庸介, 花尻(木倉)瑠理: 大麻草由来成分の構造類似体の分析法に関する検討. 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.26, 札幌)

論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

なし

AccuSign® THC
One-Step THC Test
 For *In Vitro* Use Only
Simple One-Step Immunoassay for the Qualitative Detection of THC Metabolites in Urine

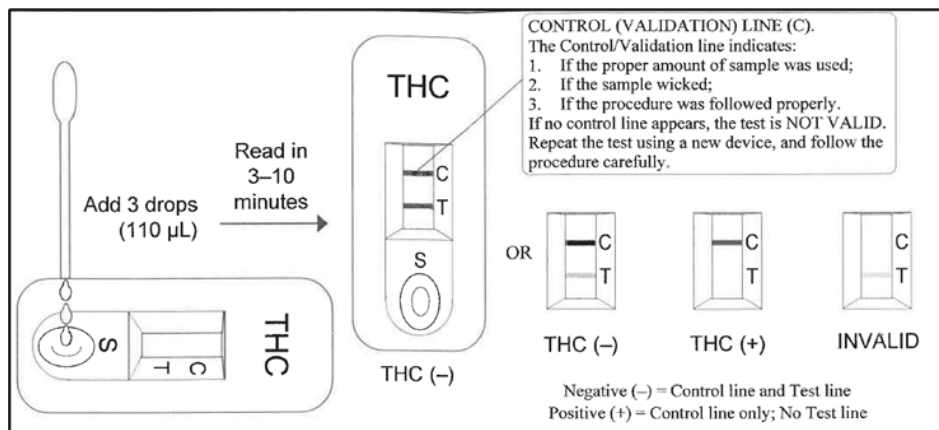


Fig. 1 尿中薬物検査用 AccuSign® THC (Princeton BioMeditech 社) の取扱説明書

Oranoxis
ToxWipe™ -Oral

Intended Use

Qualitative Detection of Drugs of Abuse in Human Saliva: Amphetamine, Opiates, Cocaine, Methamphetamine, Benzodiazepines, and Marijuana (THC)

ToxWipe™ is a rapid lateral flow immunoassay for the qualitative detection of drugs of abuse in human saliva.

Up to 7 commonly abused drugs and drug metabolites can be detected including Amphetamine, Opiates, Cocaine, Methamphetamine, Benzodiazepines, and Marijuana (THC).

ToxWipe™ cut-off concentrations:

Test	Cut-Off
Amphetamine (AM)	50
Methamphetamine (ME)	50
Cocaine (CO)	20
Opiates (OP)	40
Benzodiazepines (BZ)	10
Marijuana (TH)	25

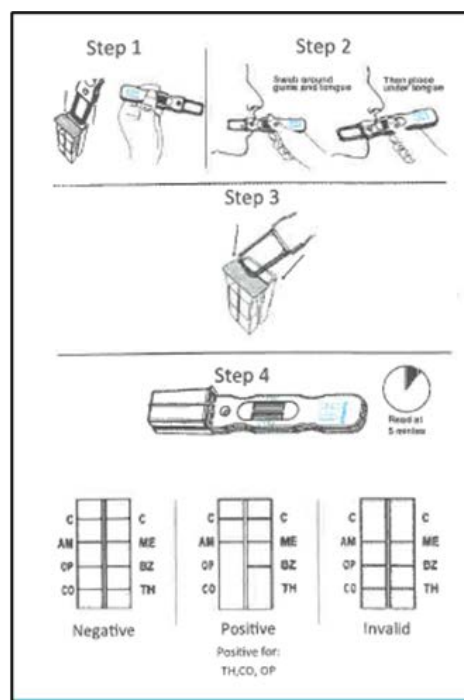


Fig. 2 唾液中薬物検査用 ToxWipe™ Oral6+ (Oranoxis 社) の取扱説明書

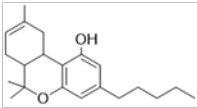
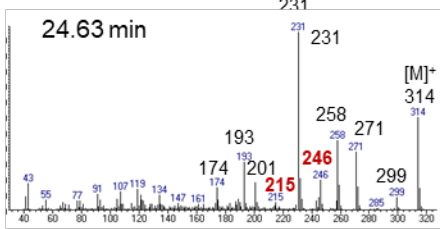
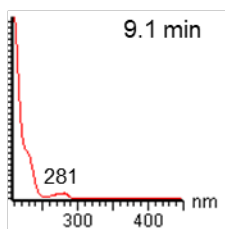
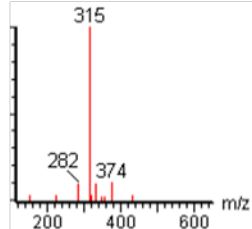
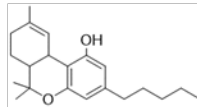
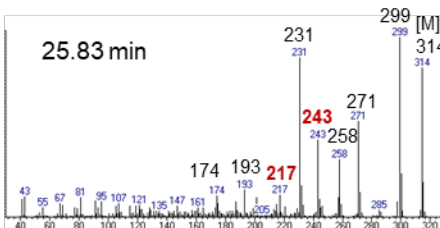
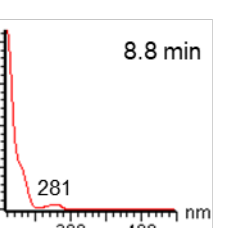
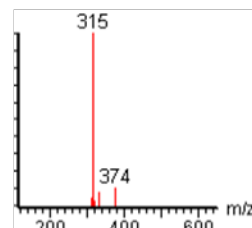
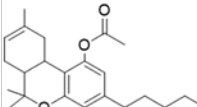
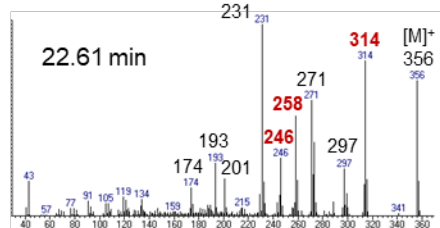
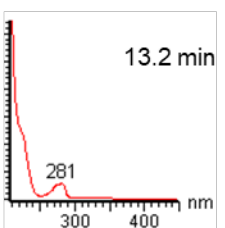
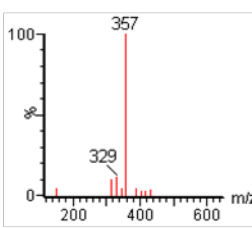
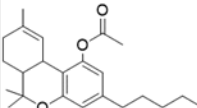
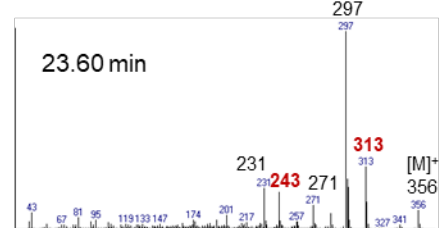
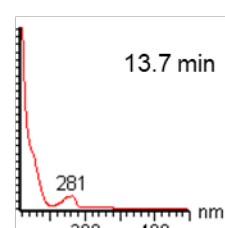
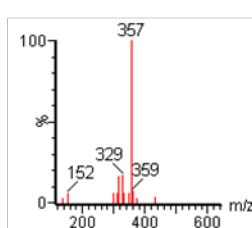
Compounds	Structures	Exact mass	GC-MS EI spectra	LC-MS PDA UV spectra	LC-MS ESI spectra
Δ^8 -THC		314.2246			
Δ^9 -THC		314.2246			
Δ^8 -THC-O-acetate		356.2351			
Δ^9 -THC-O-acetate		356.2351			

Fig. 3-1 Δ^8 -THC, Δ^9 -THC 及びそれらのアセチル化体 Δ^8 -THC-O-acetate, Δ^9 -THC-O-acetate の構造情報ならびに GC-MS, LC-PDA-MS の保持時間及びスペクトルデータ

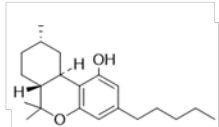
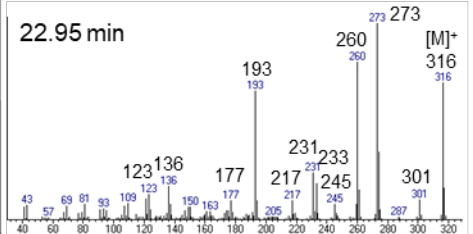
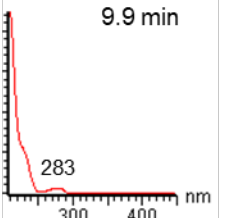
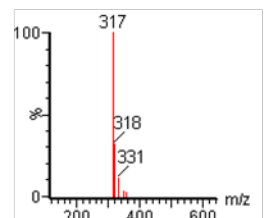
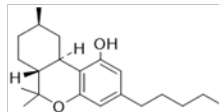
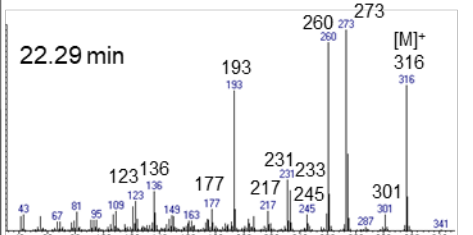
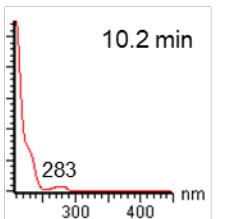
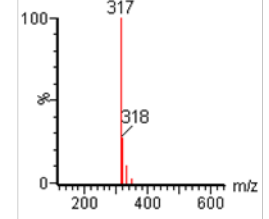
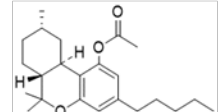
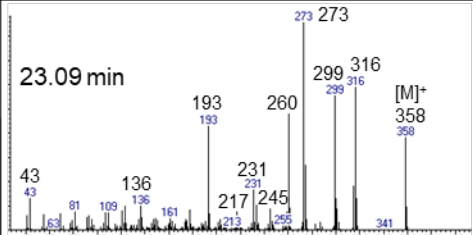
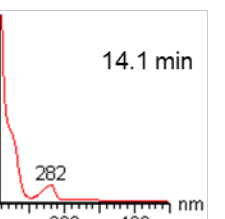
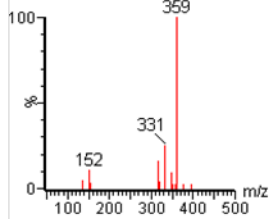
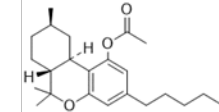
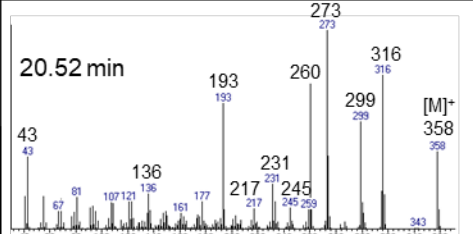
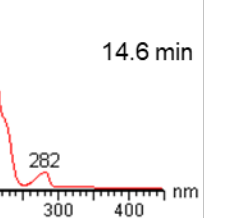
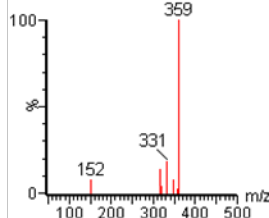
Compounds	Structures	Exact mass	GC-MS EI spectra	LC-MS PDA UV spectra	LC-MS ESI spectra
11 α -HHC		316.2402	 <p>22.95 min</p>	 <p>9.9 min</p>	
11 β -HHC		316.2402	 <p>22.29 min</p>	 <p>10.2 min</p>	
11 α -HHC-O-acetate		358.2508	 <p>23.09 min</p>	 <p>14.1 min</p>	
11 β -HHC-O-acetate		358.2508	 <p>20.52 min</p>	 <p>14.6 min</p>	

Fig. 3-2 11 α -HHC, 11 β -HHC 及びそれらのアセチル化体 1 α -HHC-O-acetate, 11 β -HHC-O-acetate の構造情報ならびに GC-MS, LC-PDA-MS の保持時間及びスペクトルデータ

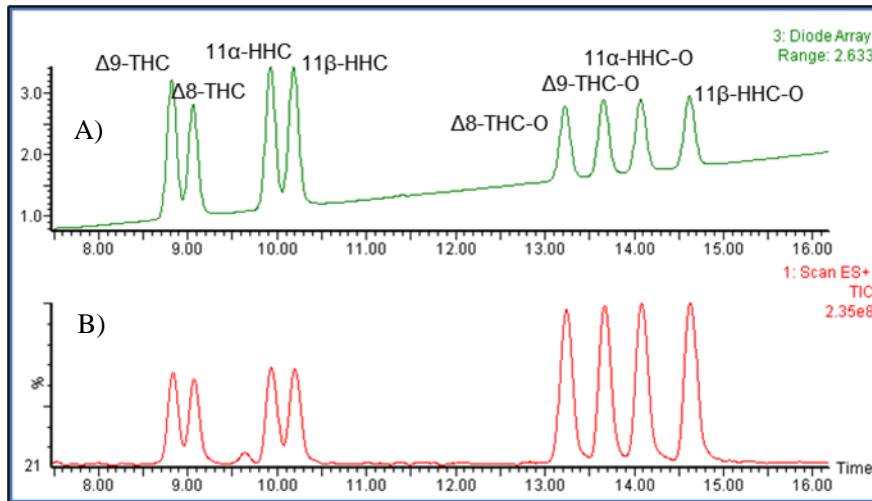


Fig. 4 分析対象 6 化合物及び Δ^8 -THC, Δ^9 -THC のアセトニトリル混合溶液 (0.05 mg/mL) の LC-MS 測定結果
 A) UV クロマトグラム, B) トータルイオンカレントクロマトグラム (TIC)

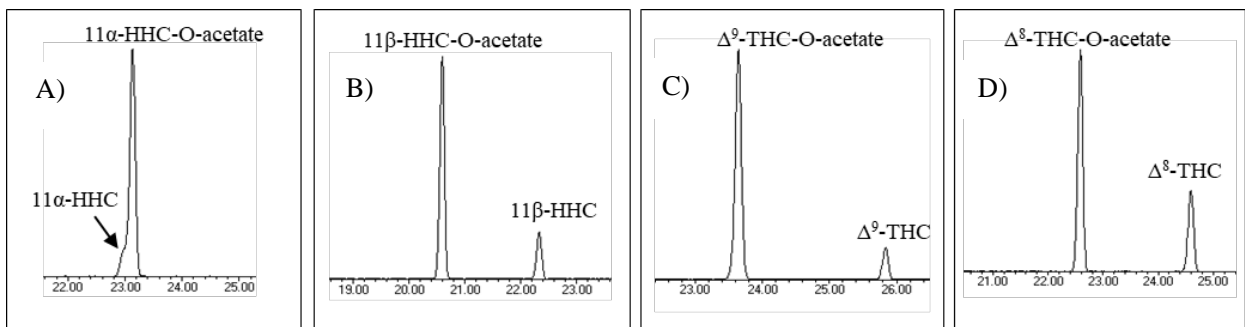


Fig. 5 アセチル化体 4 化合物のメタノール溶液 (0.1 mg/mL) の GC-MS 測定結果
 A) 11α -HHC-*O*-acetate, B) 11β -HHC-*O*-acetate, C) Δ^9 -THC-*O*-acetate, D) Δ^8 -THC-*O*-acetate の TIC

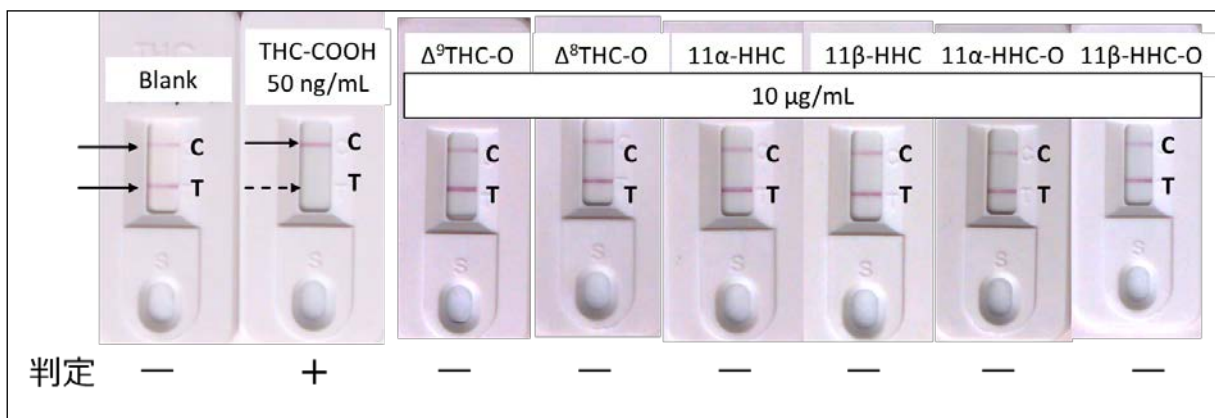


Fig. 6 尿中薬物検査用 AccuSign® THC による分析対象 6 化合物及び Δ^9 -THC の主代謝物 Δ^9 -THC-COOH の検出結果

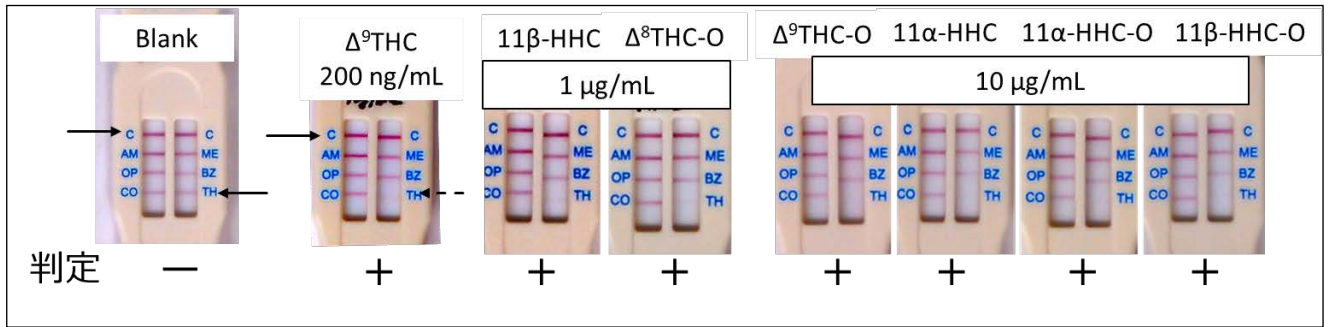


Fig.7 唾液中薬物検査用 ToxWipe™ Oral6+による分析対象 6 化合物及び Δ^9 -THC の検出結果

Table 1 各アセチル化体のアセトニトリル, メタノール及びヘキサン溶液中の室温保存下における安定性

		LC-MS peak area ratios % (TIC)				
		0 hrs	24 hrs	48 hrs	1 weeks	50 days
Δ^9 -THC-O-acetate	CH ₃ CN	100	100	100	100	100
	MeOH unchanged	100	98.9	96.6	94.3	66
	degradnt	-	1.1	3.4	5.7	34
	Hexane	100	100	100	100	100
Δ^8 -THC-O-acetate	CH ₃ CN	100	100	100	100	100
	MeOH unchanged	100	98.5	96.8	92.1	66.4
	degradnt	-	1.5	3.2	7.9	33.6
	Hexane	100	100	100	100	100
11 α -HHC-O-acetate	CH ₃ CN	100	100	100	100	100
	MeOH unchanged	100	100	100	95.3	75
	degradnt	-	-	-	4.7	25
	Hexane	100	100	100	100	100
11 β -HHC-O-acetate	CH ₃ CN	100	100	100	100	100
	MeOH unchanged	100	100	97.6	94.2	63.3
	degradnt	-	-	2.4	5.8	36.7
	Hexane	100	100	100	100	100

Table 2 分析対象 6 化合物及びその他関連カンナビノイドの尿中薬物検査用 AccuSign® THC
ならびに唾液中薬物検査用 ToxWipe™ Oral6+における検出限界

Compounds	Detection limits	
	AccuSign THC	ToxWipe Oral6+
11 α -HHC	-	10 μ g/mL
11 β -HHC	-	1 μ g/mL
11 α -HHC-O-acetate	-	10 μ g/mL
11 β -HHC-O-acetate	-	10 μ g/mL
Δ 9-THC-O-acetate	-	10 μ g/mL
Δ 8-THC-O-acetate	-	1 μ g/mL
Δ 9-THC	-	200 ng/mL
Δ 8-THC	-	1 μ g/mL
11-nor- Δ 9-THC-9-COOH	50 ng/mL	not tested
CBD	-	100 μ g/mL
CBN	-	1 μ g/mL
CBN-O-acetate	-	100 μ g/mL

*- : 最大濃度 (10 μ g/mL) で陰性

Table 3 尿中薬物検査用 AccuSign® THC ならびに唾液中薬物検査用 ToxWipe™ Oral6+による
7 製品中薬物の検出結果

Products	Compounds	Concentrations (tentative)	Assay kits	
			AccuSign THC	ToxWiPe Oral6+
Product 1 (oil)	CBD	13 μ g/mL	—	+
	CBDA	12 μ g/mL	—	+
Product 2 (brown paste)	CBD	14 μ g/mL	—	+
Product 3 (greenish-brown paste)	Δ 9-THC	38 μ g/mL	—	+
Product 4 (brown paste)	11 α -HHC	14 μ g/mL	—	+
	11 β -HHC	42 μ g/mL	—	+
Product 5 (yellow liquid)	Δ 9-THC-O-acetate	2 μ g/mL	—	+
	Δ 8-THC-O-acetate	98 μ g/mL	—	+
	Δ 8-THC	2 μ g/mL	—	+
Product 6 (yellow liquid)	11 α -HHC-O-acetate	38 μ g/mL	—	+
	11 β -HHC-O-acetate	37 μ g/mL	—	+
	11 α -HHC	4 μ g/mL	—	+
	11 β -HHC	1 μ g/mL	—	+
	CBN-O-acetate	14 μ g/mL	—	+
Product 7 (yellow liquid)	Δ 9-THC-O-acetate	5 μ g/mL	—	+
	Δ 8-THC-O-acetate	3 μ g/mL	—	+
	11 α -HHC-O-acetate	18 μ g/mL	—	+
	11 β -HHC-O-acetate	62 μ g/mL	—	+
	11 α -HHC	2 μ g/mL	—	+
	11 β -HHC	7 μ g/mL	—	+

*+ : 陽性, - : 陰性

分担研究課題:植物成分由来危険ドラッグの化学的特性及び in vitro 薬理特性の検討

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

半合成カンナビノイドを含む大麻成分由来 23 化合物の一斉識別法の検討

研究要旨:種多様な成分を含む製品分析に対応可能な一斉分析法を確立するために、合成化合物を含む大麻成分由来23化合物を対象として、LC-MSとGC-MSによる分離分析法を検討した。また本分析法を用いて、これら化合物含有を標榜する3製品の分析を行い、検出成分についての検討を行った。まず、天然由来16カンナビノイド成分(CBDV, CBDB, CBD, CBDP, CBDA, Δ^9 -THCV, Δ^9 -THCB, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, Δ^9 -THCP, Δ^9 -THCA-A, CBG, CBGA, CBC, CBL, CBN)を対象とし、LC-MSの分離識別法を検討した結果、カラムPhenyl-Hexyl(2.1mm i.d.×100mm, 1.7 μ m, Waters)を用いた方法で十分な分離分析が可能であった。しかし、近年流通が問題となっているカンナビノイド及びそのアセチル化体計11化合物(CBN, CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 及びアセチル化体CBN-O, Δ^8 -THC-O, Δ^9 -THC-O, 11 α -HHC-O, 11 β -HHC-O)について、同条件で測定をした結果、十分な分離が達成できなかった。そこで、他のカラムを用いて分析条件を検討したところ、カラムCortecs C18(2.1mm i.d.×150mm, 2.7 μ m, Waters)のグラジェント分析で、これら11化合物の良好な分離が得られ、その他の天然由来カンナビノイド成分を合わせた計23化合物の一斉分析においても十分な分離識別が可能であった。一方、GC-MSでは、カラムHP-5MS(30m×0.25mm i.d., 0.25 μ m, Agilent)による分析で、カルボン酸体を除く計20化合物の分離識別が可能であった。次に、これらの測定条件を用いてHHC, HHC-O, THC-O等の含有を標榜するオイル状製品の抽出物について分析を行った結果、LC-MSとGC-MSで、主成分以外に、合成時の副生成物と考えられる複数の成分が検出された。LC-QTOFMS及びGC-QTOFMSにより、それぞれのピークのスペクトルを詳細に解析すると、CBDを原料とする2つの合成経路が推測された。また、これらの製品から異性体が複数検出されたが、解析する上でGC-QTOFMSの精密質量情報が有用であった。しかしGC-MSで検出されない微量成分が、LC-MSで検出される場合も散見され、LC-MSとGC-MSの両方で解析を行うことが望ましいと考えられた。

研究協力者

水谷佐久美 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

A. 研究目的

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 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol(Δ^9 -THC)と構造類似の大麻成分由来化合物を含有する製品の国内流入が急増している。 Δ^8 -THCあるいは Δ^9 -THCを還元することにより得られるhexahydrocannabinol(HHC)、また2019年

に大麻草からの単離同定が報告された、 Δ^9 -THCとアルキル側鎖の長さが異なる新規カンナビノイド Δ^9 -tetrahydrocannabiphorol(Δ^9 -THCP)は、2022年3月に指定薬物に指定された。しかし、規制後すぐに主要なカンナビノイド成分をアセチル化した化合物等を含有する製品が出現して問題となっている。従来大麻草からはごく微量しか検出されない成分やその誘導体が、インターネット市場で、半合成/合成の高純度な粉末・オイル状製品として流通している。欧州薬物・薬物依存監視セ

ンター (EMCDDA) は、2022年12月に、「HHCおよび関連半合成カンナビノイド (semi-synthetic cannabinoids; SSC) に関する専門家会議」を開催し、大麻成分から半合成されるHHCなどの化合物の出現が、15年前に合成カンナビノイドを含有する「脱法ハーブ」が出現して以来、大麻に代わる「合法的」な市場において、初めての大きな変化となる可能性を指摘している。本研究では、多種多様な成分を含む製品分析に対応可能な一斉分析法を確立するために、半合成化合物を含む大麻成分由来23化合物を対象として、LC-MSとGC-MSによる分離分析法を検討した。また本分析法を用いて、これら化合物含有を標榜する3製品の分析を行い、検出成分についての検討を行った。

B. 研究方法

1) 試薬及び試料

①試薬

分析対象とした 23 カンナビノイドのうち、 Δ^8 -THC、 Δ^9 -THC、CBN及び11 α -HHC、11 β -HHCのアセチル化体は国立衛研で合成したものを使用した。その他のカンナビノイドは Cerilliant/ Merck 社、Sigma-Aldrich 社もしくは Cayman 社から購入したものを使用した。標準溶液として、天然由来 16 カンナビノイド成分 (CBDV, CBDB, CBD, CBDP, CBDA, Δ^9 -THCV, Δ^9 -THCB, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, Δ^9 -THCP, Δ^9 -THCA-A, CBG, CBGA, CBC, CBL, CBN) の混合アセトニトリル溶液と、カンナビノイド及びその還元体、アセチル化体計 11 化合物 (CBN, CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 及びアセチル化体 CBN-O, Δ^8 -THC-O, Δ^9 -THC-O, 11 α -HHC-O, 11 β -HHC-O) の混合アセトニトリル溶液、各 50 μ g/mL、また合計 23 化合物の混合溶液 25 μ g/mL を作成し、適宜希釈して用いた。上記化合物の構造を Fig. 1-1 及び Fig. 1-2 に示した。

②試料

2022 年に入手した 3 製品 (A, B, C) を分析に用

いた。製品は、薄褐色もしくは褐色のペースト状であった。

2) 分析条件

①LC-QTOFMS

Instrument: TripleTOF 6600 LC-MS/MS system (AB SCIEX, MA, USA) / [UPLC] Nexera X2 system (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Column1: ACQUITY CSHTM Phenyl-Hexyl (2.1 mm i.d. x 100 mm, 1.7 μ m, Waters), Column2: Cortecs C18 (2.1 mm i.d. x 150 mm, 2.7 μ m, Waters), Mobile phase: A 0.1% formic acid in water, B 0.1% formic acid in acetonitrile, Gradient program 1: A/B 90/10 (1min) - 35/65 (10min) - 20/80 (30min) - 5/95 (35min, 4min hold), Gradient program 2: A/B 90/10 (1min) - 35/65 (10min) - 30/70 (20min) - 20/80 (30min) - 5/95 (35min, 4min hold), Flow rate: 0.3 mL/min, Column temp.: 40°C

Ion source: ESI, positive mode, Source temp.: 550°C, Gas: N₂, Ion source gas 1: 50 psi, Ion source gas 2: 50 psi, Curtain gas: 25 psi, Ion spray voltage: 5500 V, Declustering potential: 80 V, Collision Energy: 10 V, Collision Energy (CE): Q1 10 V, Q3 30 V, Mass spectral range: TOFMS m/z 100-650 TOFMS2 m/z 100-400

②GC-QTOFMS

Instrument: 7890B GC System/7200 Q-TOF GC-MS (Agilent, USA) Column: HP-5MS (30m x 0.25mm i.d., 0.25 μ m, Agilent) Gas: He Gas flow: 1mL/min Oven temp.: 150°C (1min hold) - 2.5°C/min - 250°C - 10°C/min - 310°C (1min hold) Inlets temp.: 220°C Inlet mode: Splitless Aux temp.: 280°C Ion source: EI and, High resolution mode Ion source temp.: 250°C Quadrupole temp.: 150°C Emission: 35uA (Fixed) Scan range: m/z 50 - 650

3) 試料からの抽出法

製品 A, B, C の 3 試料について、1 mg を 5 mL チューブに秤量し、アセトニトリル 1 mL を加えて

超音波抽出を 10 分間行った。抽出溶液をフィルターろ過してサンプル溶液とし、測定を行った。測定は LC-QTOFMS 及び GC-QTOFMS においてスキャンモード、プロダクトイオンモードで分析を行った。

C. 結果及び考察

1) LC-MS 及び GC-MS による一斉分析法の検討

はじめに、天然由来 16 カンナビノイド成分 (CBDV, CBDB, CBD, CBDP, CBDA, Δ^9 -THCV, Δ^9 -THCB, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, Δ^9 -THCP, Δ^9 -THCA-A, CBG, CBGA, CBC, CBL, CBN) を対象とし、LC-MS の分離識別法を検討した。その結果、カラム Phenyl-Hexyl column (2.1mm i.d.×100mm, 1.7 μ m, Waters) を用いた方法で 16 成分は十分な分離分析が可能であった¹⁾。しかし、近年流通が問題となっているカンナビノイドの還元体やアセチル化体計 11 化合物 (CBN, CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 11 α -HHC, 11 β -HHC 及びアセチル化体 CBN-O, Δ^8 -THC-O, Δ^9 -THC-O, 11 α -HHC-O, 11 β -HHC-O) について、同条件で測定をした結果、十分な分離が達成できなかった (Fig. 2-1)。そこで、Acquity UPLC HSS T3 column (2.1 mm x 100 mm, 1.8 μ m, Waters), Cortecs C18 column (2.1 mm x 150 mm, 2.7 μ m, Waters) 及び Triart C18 ExRS column (2.1 mm x 100 mm, 1.9 μ m, YMC) を用いて、分離条件を検討した。その結果、コアシェルタイプのカラム Cortecs C18 を用いた、0.1%ギ酸水と 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液のグラジエント分析で、これら 11 化合物について、良好な分離が得られた (Fig. 2-2)。さらに、本分離条件を天然由来カンナビノイド成分を合わせた計 23 化合物の一斉分析に適用した結果、CBDP と Δ^9 -THC, CBC と THCA 等、一部の化合物の分離が不十分であったが、それら化合物は分子量が異なることから、本条件で 23 成分は十分識別が可能であった (Fig. 2-3)。一方、GC-MS では、(5%-フェニル)-メチルポリシロキサントタイプのカラム HP-5MS (30 m×0.25 mm i.d.,

0.25 μ m, Agilent) による分析で、熱により分解 (脱炭酸) が認められるカルボン酸体を除く、計 20 化合物の分離識別が可能であった (Fig. 3)。

2) 半合成カンナビノイド含有を標榜する製品分析への適用

1) で確立した測定条件を用いて HHC, HHC-O, THC-O 等の含有を標榜するペースト状 3 製品 (製品 A, B, C) のアセトニトリル抽出物について分析を行った。LC-MS と GC-MS による測定結果を、Fig. 4, 5, 6 に示した。

分析の結果、GC-QTOFMS 測定において、HHC 含有を標榜する製品 A から、11 α -HHC, 11 β -HHC 及び CBN が主ピークとして検出され、dihydro-iso-THC, Δ^8 -THC も確認された。また、その他マイナー成分として、HHC (m/z 316.2402) と同質量を有するピークが複数検出された (Fig. 4-1)。そのうち、図中の赤③と赤④のピークについては、HHC と類似のマススペクトルを示した。LC-QTOFMS 測定においても、GC-QTOFMS 測定と同様に、CBN, 11 α -HHC, 11 β -HHC, Δ^8 -THC が主に確認された (Fig. 4-2)。CBD を酸触媒下加熱することにより、 Δ^8 -THC 及び Δ^9 -THC が合成されるが、その際、副生成物として、 Δ^8 -iso-THC, $\Delta^{4(6)}$ -iso-THC が生成することが報告されている²⁾。今回、GC-QTOFMS 測定において製品 A から検出された dihydro-iso-THC は、これら副生成物の還元体である。従って、本製品に含まれる 11 α -HHC, 11 β -HHC は、CBD から Δ^8 -THC, Δ^9 -THC (Δ^8 -iso-THC, $\Delta^{4(6)}$ -iso-THC) を経て、さらに還元されて合成されたものであることが推測された。なお、CBN については、別途、製品に添加されたものである可能性が考えられた。

次に、HHC-O 含有を標榜する製品 B について、GC-QTOFMS 測定を行った。その結果、11 α -HHC-O, 11 β -HHC-O 及び CBN-O が主ピークとして検出され、その他、HHC-O と同一の質量数 (m/z 358.2508) を有する複数のマイナーピークが確認された (Fig. 5-1)。マイナーピークのうち、図

中の赤③‘と赤④’のピークについては、HHC-O と類似のマススペクトルを示した。LC-QTOFMS 測定においても同様に、11 α -HHC-O、11 β -HHC-O、CBN-O が主に確認されたが、GC-MS では確認できなかった 11 α -HHC 及び 11 β -HHC のピークも確認することが可能であった (Fig. 5-2)。

さらに、THC-O 含有を標榜する製品 C について GC-QTOFMS 測定を行った結果、 Δ^8 -THC-O が主に検出された。また、 Δ^9 -THC-O、 Δ^8 -THC、CBN-O も確認され、その他、THC-O と同一の質量数 (m/z 356.2351) を有する複数のマイナーピークも確認された (Fig. 6-1)。LC-QTOFMS 測定においても GC-QTOFMS 測定と同様に、 Δ^8 -THC-O が主に検出され、マイナーピークとして Δ^9 -THC-O、 Δ^8 -THC、CBN-O が確認された (Fig. 6-2)。

以上、LC-QTOFMS 及び GC-QTOFMS の結果より得られた、製品 A、B、C の推定関係図を Fig. 7 に示した。製品 A については、HHC がジアステレオマーとして存在することから、 Δ^8 -THC もしくは Δ^9 -THC を還元することにより得られたものであることが推測され、また、dihydro-iso-THC が検出されることから CBD を原料とする合成経路が推測された。いずれの製品においても、CBN あるいは CBN のアセチル化体が検出されたが、CBN の還元体は検出されなかった。

D. 結論

多種多様な成分を含む製品分析に対応可能な一斉分析法を確立するために、天然由来 16 カンナビノイド成分及び半合成 7 化合物 (還元体及びアセチル化体) を含む計 23 化合物を対象として、LC-MS と GC-MS による分離分析法を検討した。その結果、LC-MS 測定において、コアシェルタイプのカラム Cortecs C18 を用いたグラジエント分析で、23 化合物の十分な分離識別が可能であった。一方、GC-MS では、(5%-フェニル)-メチルポリシロキサンタイプのカラム HP-5MS による分析で、カルボン酸体を除く計 20 化合物の分離識別が可能であった。次に、これらの測定条件を用い

て HHC、HHC-O、THC-O 等の半合成カンナビノイド含有を標榜するオイル状 3 製品の抽出物について分析を行った。その結果、LC-MS と GC-MS で、主成分以外に、合成時の副生成物と考えられる複数の成分が検出された。LC-QTOFMS 及び GC-QTOFMS により、それぞれのピークのスペクトルを詳細に解析すると、CBD を原料とする合成経路が推測された。また、これらの製品から異性体が複数検出されたが、解析する上で GC-QTOFMS の精密質量情報が有用であった。しかし GC-MS で識別されない微量成分が、LC-MS で識別される場合も散見され、LC-MS と GC-MS の両方で解析を行うことが望ましいと考えられた。

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政策研究事業) 「規制薬物の分析と鑑別等の手法の開発のための研究」令和 2 年度研究分担報告「LC-QTOFMS による大麻製品中 16 カンナビノイド成分の定量分析」(花尻 (木倉) 瑠理)
- 2) P. Marzullo et al., Cannabidiol as the Substrate in Acid-Catalyzed Intramolecular Cyclization. *J. Nat. Prod.* 83, 2894–2901 (2020).

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

学会発表

- 1) 水谷佐久美, 河村麻衣子, 田中理恵, 三澤隆史, 辻巖一郎, 黒原崇, 伊藤美千穂, 出水庸介, 花尻 (木倉) 瑠理: 大麻成分由来 23 化合物の一斉分析法の検討. 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.26, 札幌)

論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし

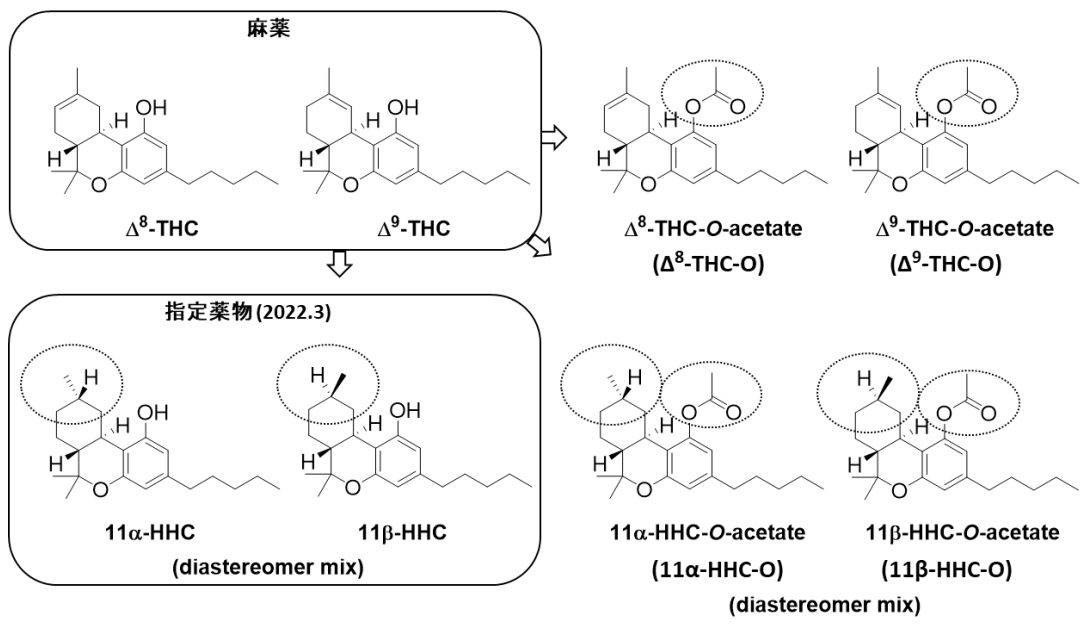


Fig. 1-1 Δ^8 -THC 及び Δ^9 -THC 由来半合成化合物(還元体及びアセチル化体)の構造

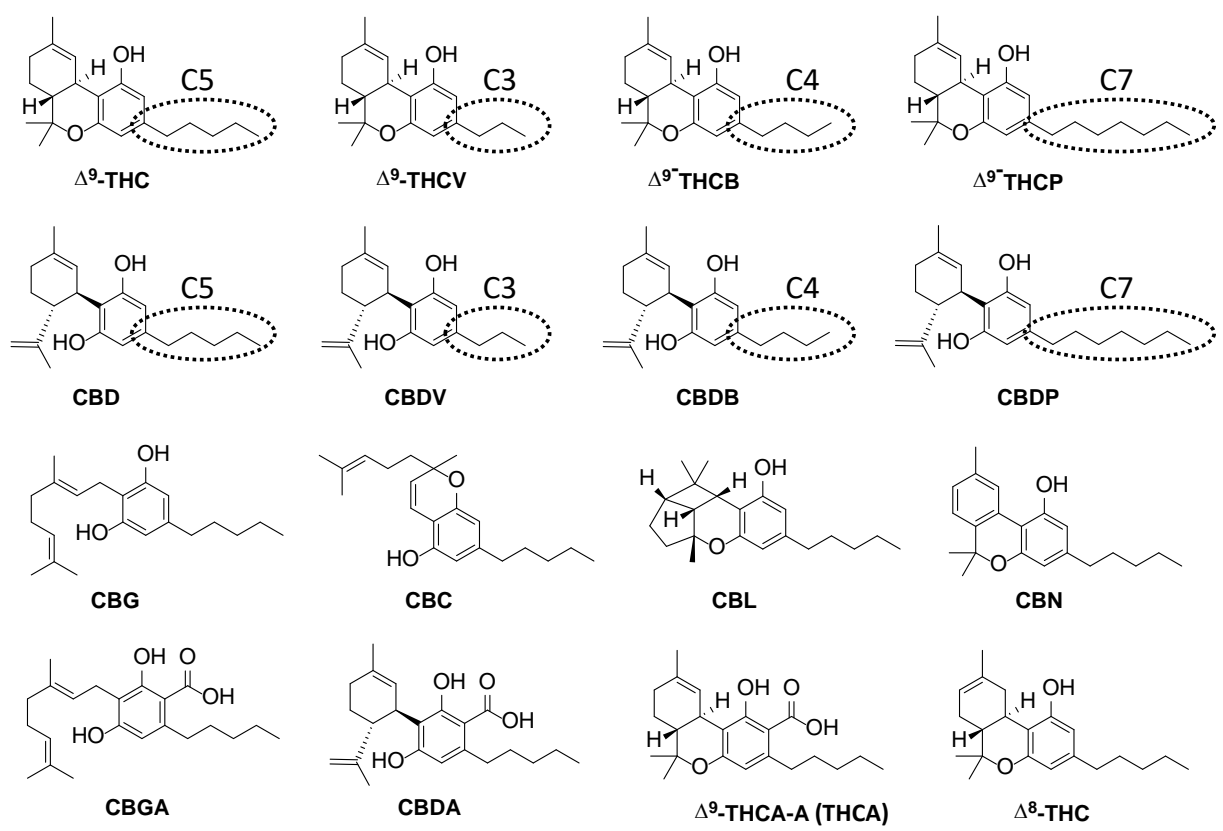


Fig. 1-2 主な大麻草由来カンナビノイドの構造

Table 1 LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオン

	[M + H] ⁺	組成式	抽出イオン	成分
●	287.2006	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	287.2006	CBDV, THCv
●	301.2162	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	301.2162	CBDB, Δ ⁹ -THCB
●	311.2006	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	311.2006	CBN
●	315.2319	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	315.2319	CBD, Δ ⁹ -THC, Δ ⁸ -THC, CBL, CBC
●	317.2475	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	317.2475	CBG, 11α-HHC, 11β-HHC
●	343.2632	C ₂₃ H ₃₄ O ₂	343.2632	CBDP, Δ ⁹ -THCP
●	353.2111	C ₂₃ H ₃₄ O ₃	311.2006	CBN-O
●	357.2424	C ₂₃ H ₃₂ O ₃	357.2424	Δ ⁹ -THC-O, Δ ⁸ -THC-O
●	359.2217	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	341.2110	CBDA, THCA
●	359.2581	C ₂₃ H ₃₄ O ₃	359.2581	11α-HHC-O, 11β-HHC-O
●	361.2373	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	343.2268	CBGA

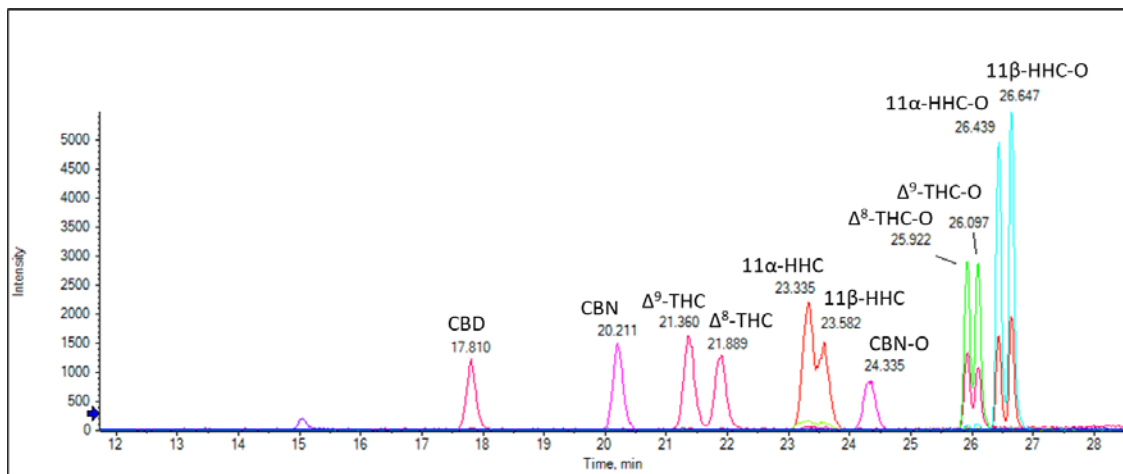


Fig. 2-1 大麻成分 Δ⁸-THC, Δ⁹-THC, CBD 及び CBN 由来半合成化合物(還元体及びアセチル化体)の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム (Phenyl-Hexyl column 使用)

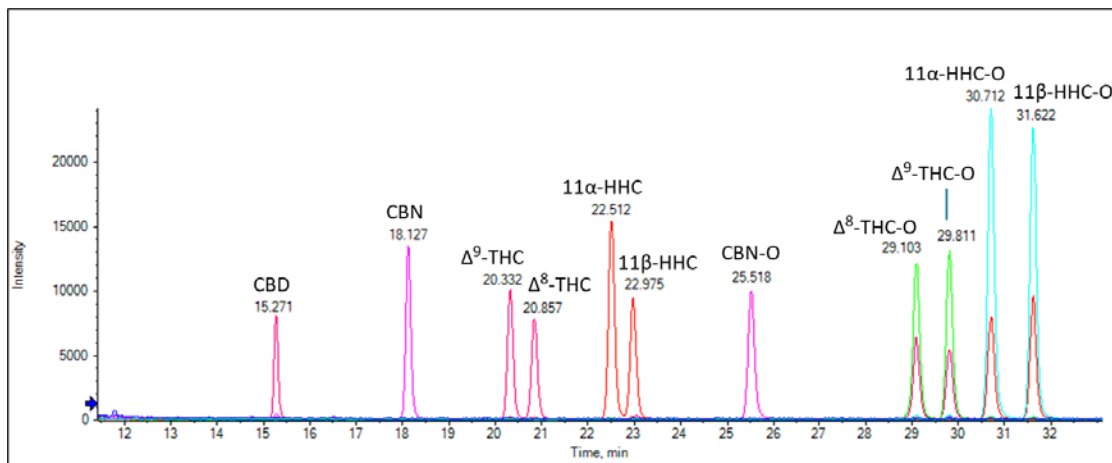


Fig. 2-2 大麻成分 Δ⁸-THC, Δ⁹-THC, CBD 及び CBN 由来半合成化合物(還元体及びアセチル化体)の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム (Cortecs C18 column 使用)

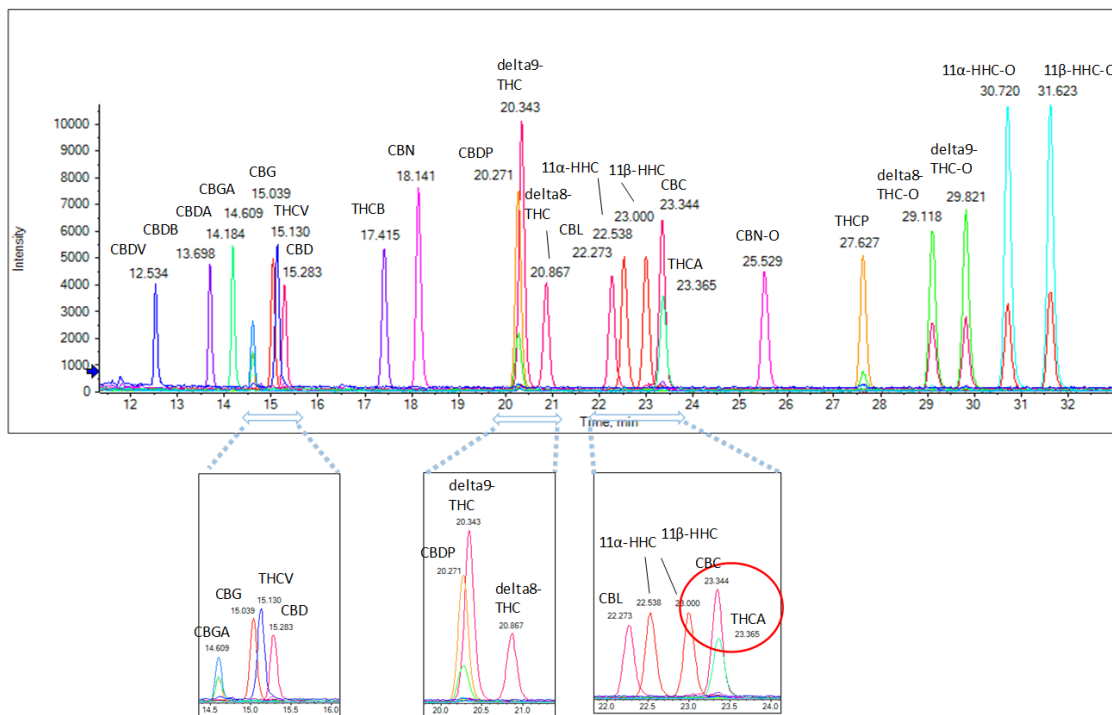


Fig. 2-3 主な大麻草由来カンナビノイド及び半合成化合物 23 化合物の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム

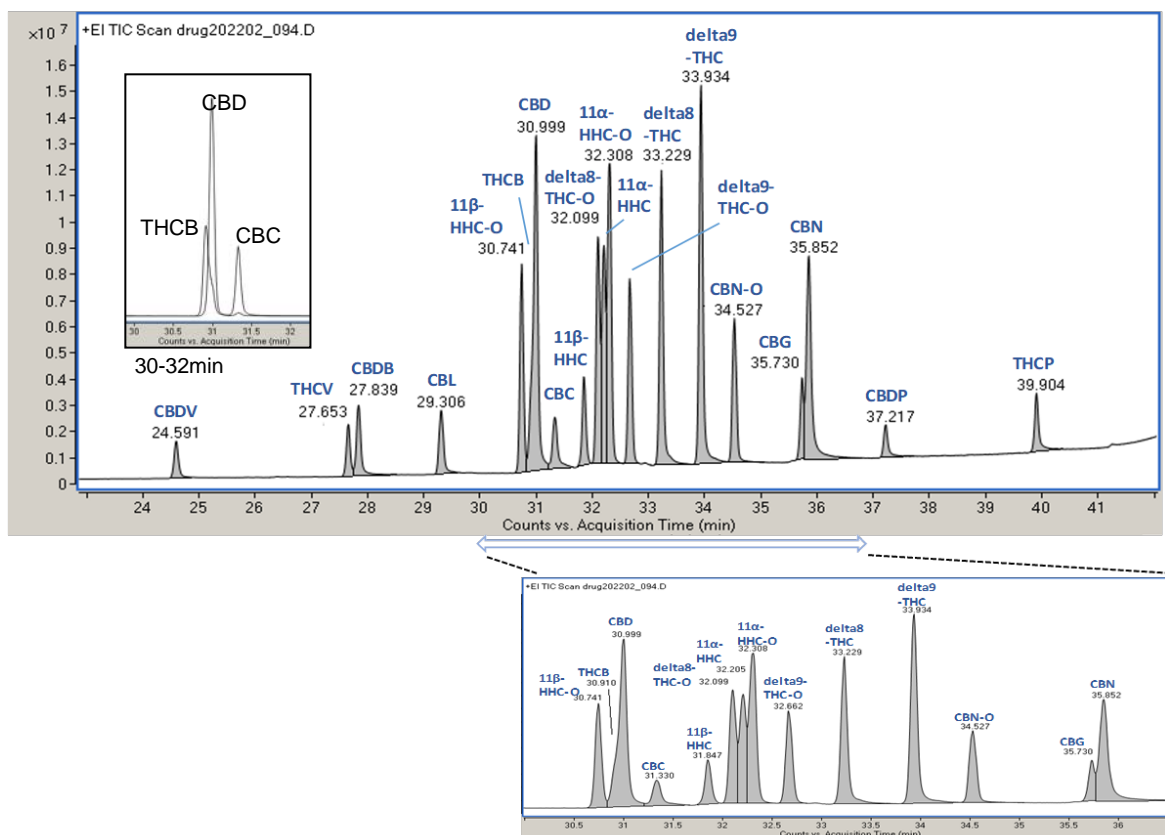


Fig. 3 主な大麻草由来カンナビノイド(カルボン酸体を除く)及び半合成化合物 20 化合物の GC-MS 測定におけるトータルイオンカレントクロマトグラム(TIC)

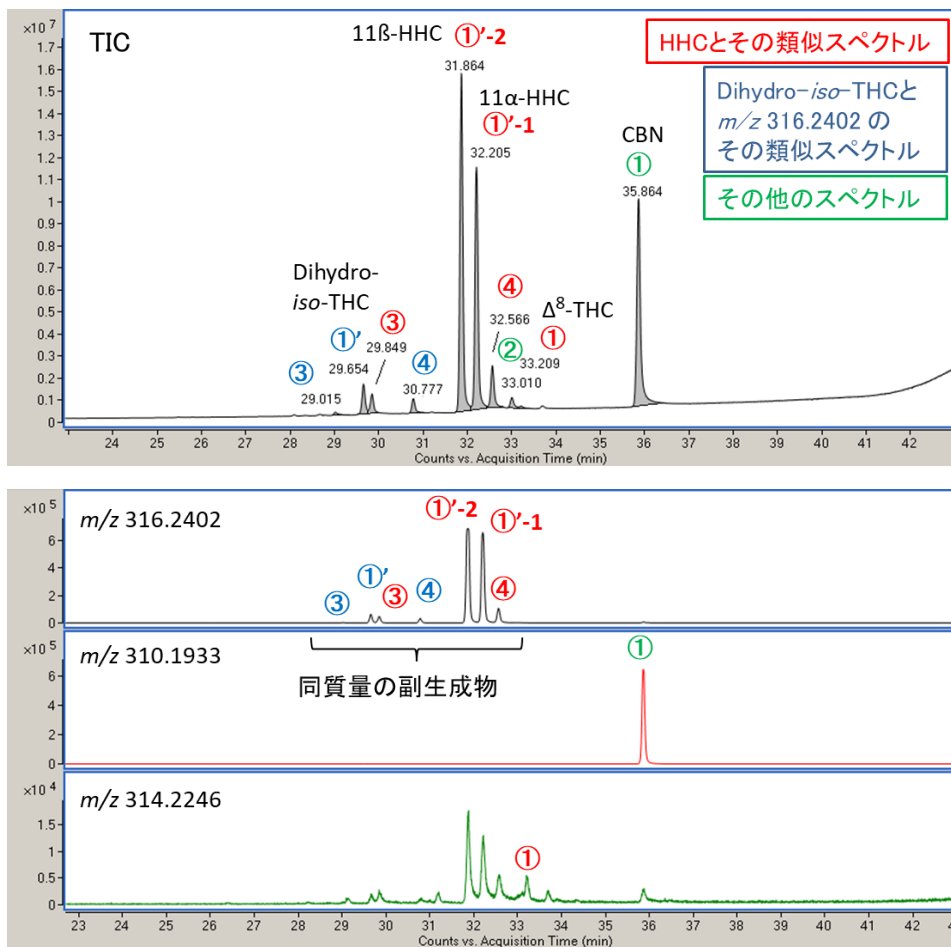


Fig. 4-1 製品 A のアセトニトリル抽出物の GC-QTOFMS 測定結果
 上段: トータルイオンカレントクロマトグラム (TIC), 下段: 抽出イオンクロマトグラム

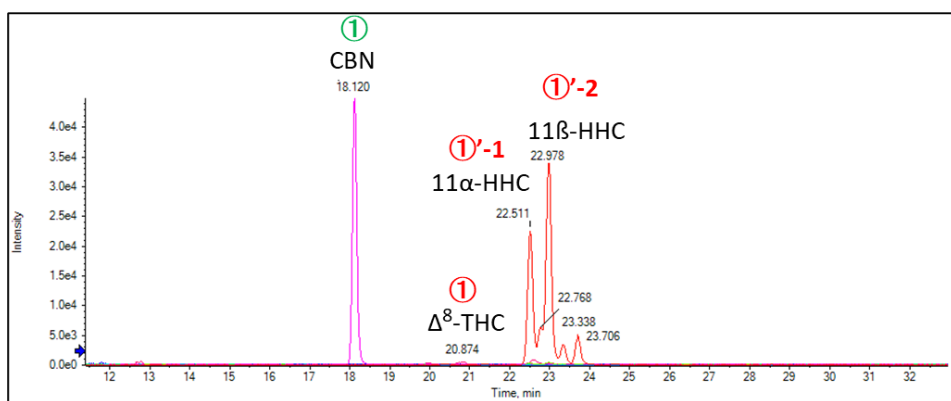


Fig. 4-2 製品 A のアセトニトリル抽出物の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム

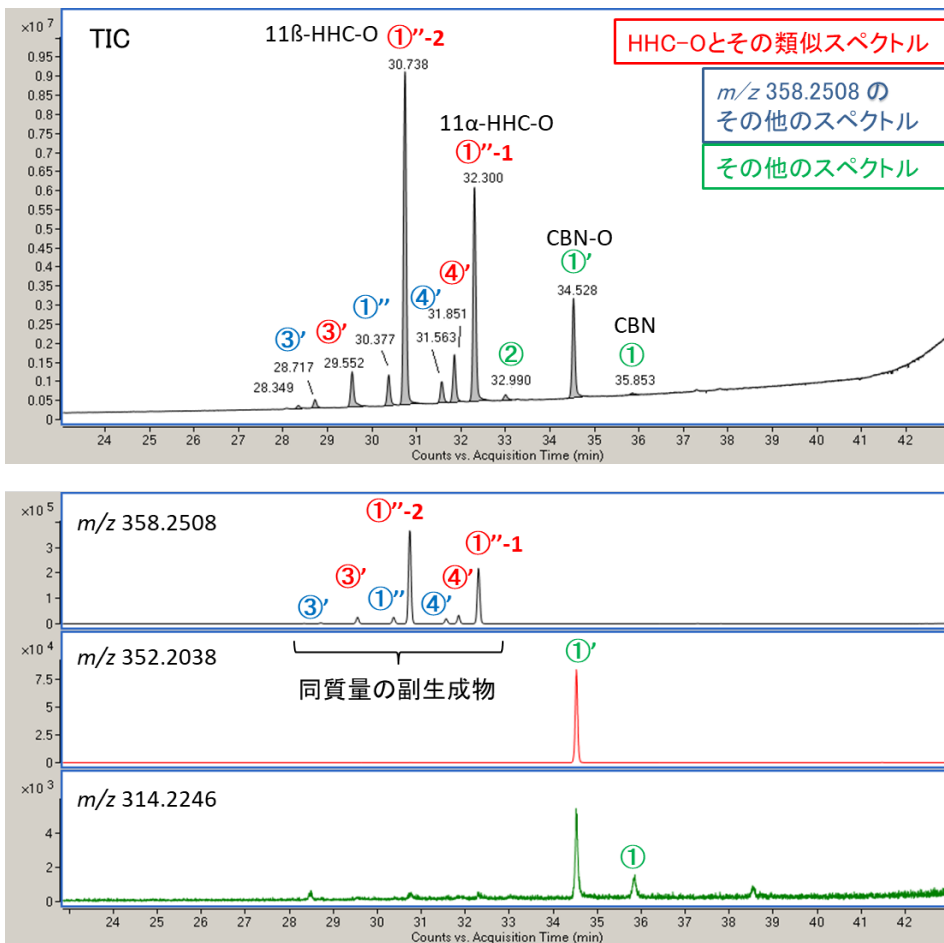


Fig. 5-1 製品 B のアセトニトリル抽出物の GC-QTOFMS 測定結果

上段: トータルイオンカレントクロマトグラム (TIC), 下段: 抽出イオンクロマトグラム

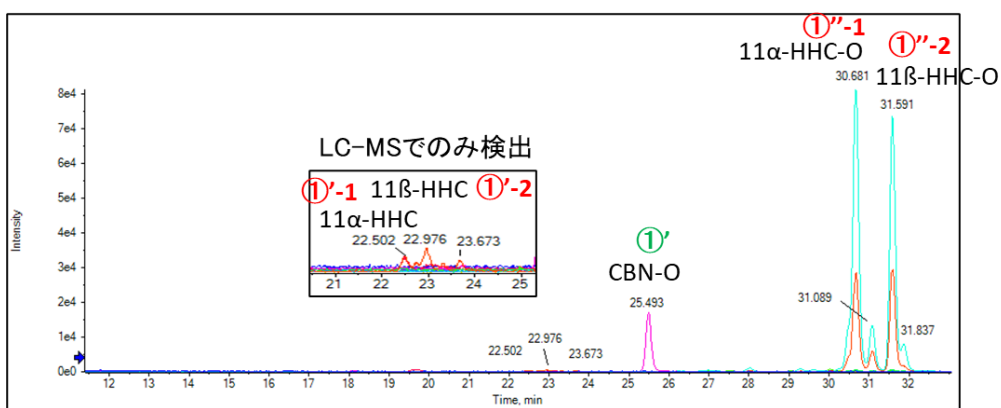


Fig. 5-2 製品 B のアセトニトリル抽出物の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム

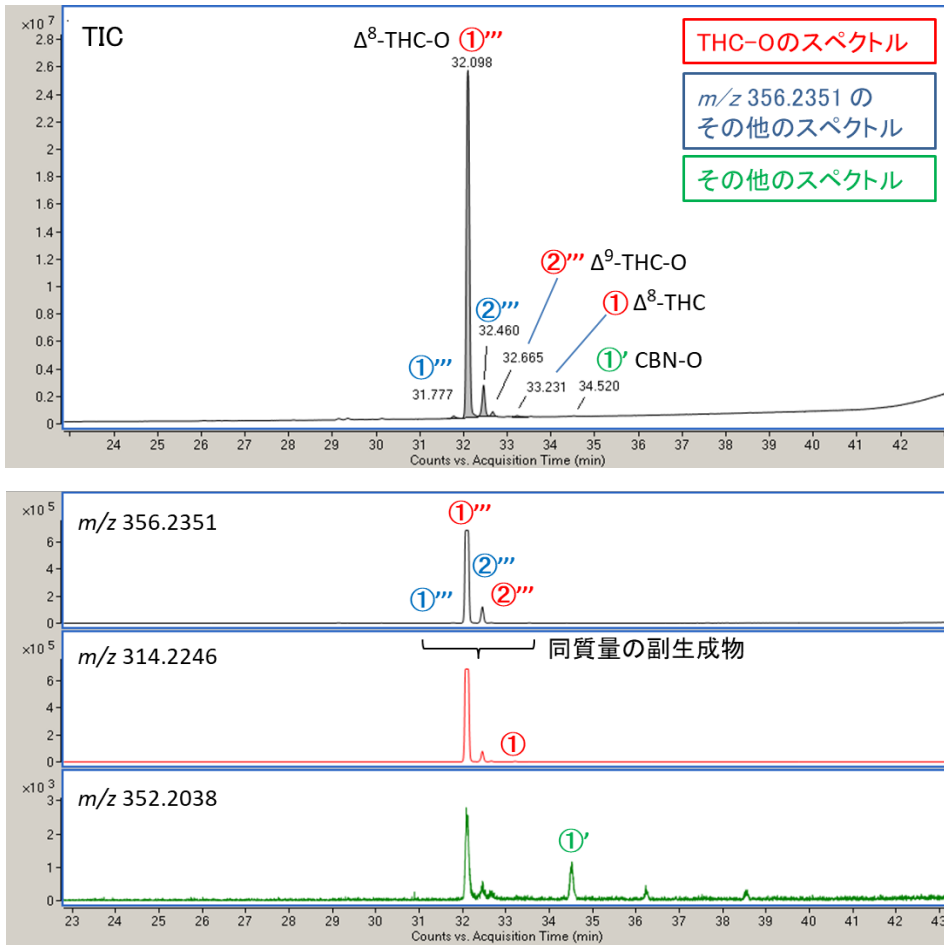


Fig. 6-1 製品 C のアセトニトリル抽出物の GC-QTOFMS 測定結果
 上段: トータルイオンカレントクロマトグラム (TIC), 下段: 抽出イオンクロマトグラム

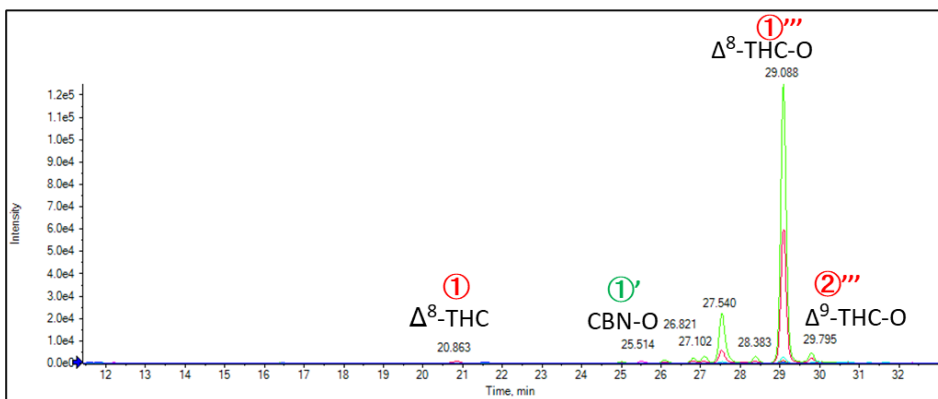


Fig. 6-2 製品 C のアセトニトリル抽出物の LC-QTOFMS 測定における分析対象化合物の抽出イオンを重ね合わせたクロマトグラム

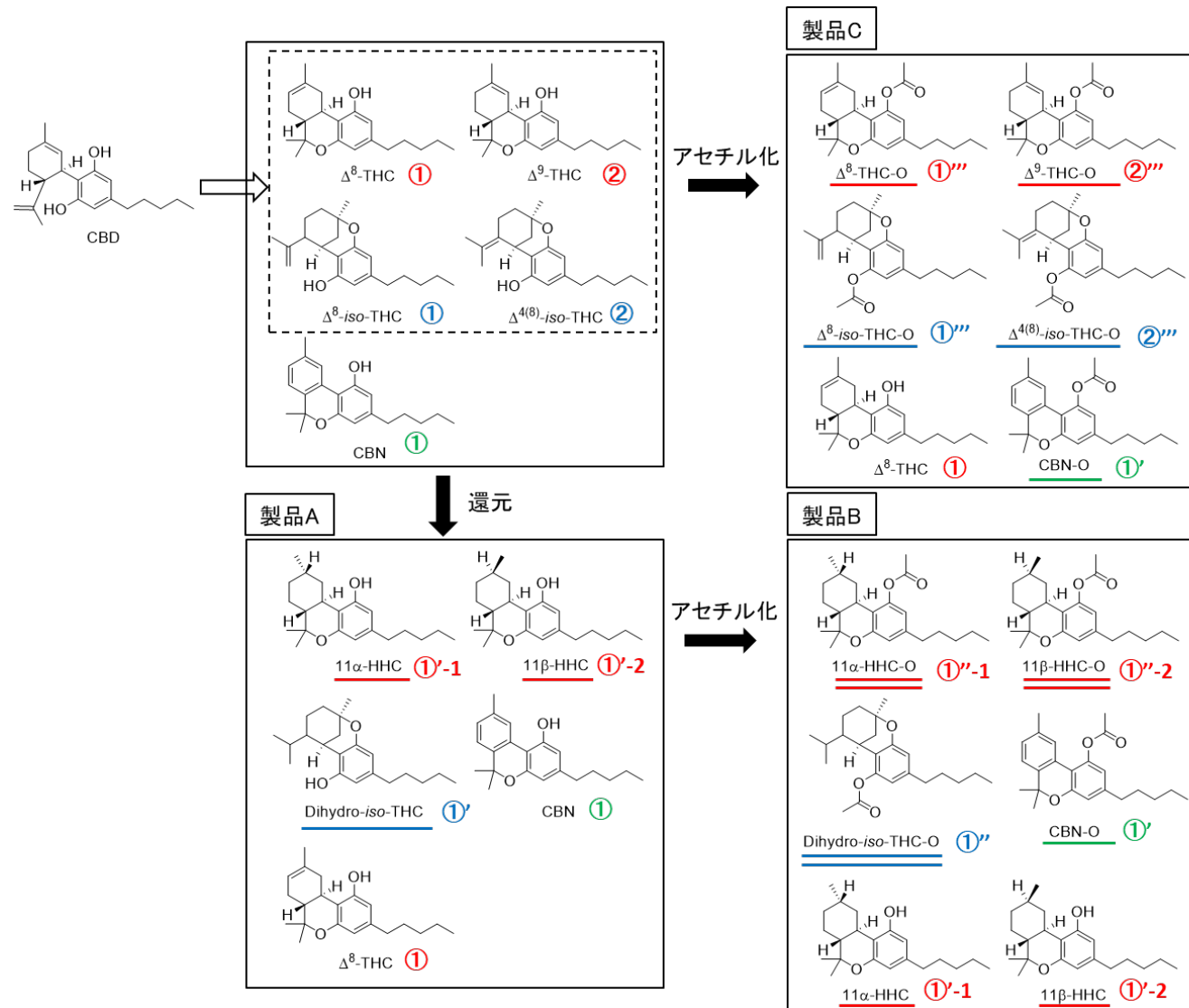


Fig. 7 検出された化合物から推定される製品 A, B 及び C の関連図

分担研究課題:植物成分由来危険ドラッグの化学的特性及び in vitro 薬理特性の検討

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

植物成分由来危険ドラッグの cannabinoid 受容体への機能性の評価

研究要旨: 11α -HHC, 11β -HHC, 及びそれらのアセチル化体 1α -HHC-*O*-acetate, 11β -HHC-*O*-acetate, また, Δ^9 -THC 及び Δ^8 -THC のアセチル化体 Δ^9 -THC-*O*-acetate 及び Δ^8 -THC-*O*-acetate の 6 化合物を対象として, ヒト cannabinoid 受容体 (CB_1 及び CB_2) に対するアゴニスト活性を明らかにするために, ヒトリコンビナント受容体を用いて, ^{35}S -GTP γ S 結合を指標とした受容体機能評価試験を実施した. その結果, 本研究で検討した濃度範囲では, 11α -HHC-*O*-acetate は有意な受容体活性化は認められなかったが, Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC 及び 11β -HHC-*O*-acetate は, 陽性化合物 CP-55,940 と比較して弱い効果ではあったが, CB_1 受容体作用を有していることが確認された. また, CB_2 受容体に対しては, アセチル化体 4 化合物はほとんど活性を示さなかったが, 11α -HHC 及び 11β -HHC は弱いながらもアゴニスト活性を有することが示唆された.

A. 研究目的

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 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) や Δ^8 -THC と構造類似の大麻成分由来化合物を含有する製品の国内流入が急増している. Hexahydrocannabinol (HHC) は大麻成分 cannabidiol (CBD) を原料として合成され, 流通製品からは 2 種類の異性体 (11α -HHC 及び 11β -HHC) が同時に検出される. HHC は令和 4 年 3 月に指定薬物に指定されたが, 規制後すぐに類似の新規化合物を含有する製品が出現して問題となっている. 規制化合物である HHC, Δ^9 -THC 及び Δ^8 -THC の水酸基をアセチル化した HHC-*O*-acetate, Δ^9 -THC-*O*-acetate 及び Δ^8 -THC-*O*-acetate は, 新たに国内流入が確認されている代表的な大麻成分由来化合物である. これらの化合物については, 人が摂取した際にどのような危険性があるのか, 現在までに国内外において薬理的特性を検討した報告がなく, 早急な検討が必要である.

大麻の主活性成分である Δ^9 -THC は, cannabinoid 受容体 CB_1 及び CB_2 のパーシャルアゴニストである. cannabinoid 受容体 CB_1 及び CB_2 は GPCR (G protein-coupled receptor; Gタンパク質共役受容体) の一種である. リガンドの GPCR に対するアゴニスト活性を評価する手法のひとつとして, GPCR を過剰発現させた細胞膜に非加水分解性 GTP が結合する量を測定する手法がある. GPCR にアゴニストが作用すると, GPCR が活性化してコンフォメーションが変化することで, Gタンパク質複合体の結合部位が露出する. これにより, G α タンパク質において GDP が放出されて GTP が結合する. 通常, GTP は G α タンパク質の GTPase 活性 (代謝分解) によって GDP に加水分解され, γ 位のリン酸は除去放出される. この際, GTP として, 放射性標識された非加水分解性の GTP 類似体である ^{35}S - γ -GTP (Guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate; GTP の末端 (γ 位) のリン酸基を ^{35}S で標識) を用いると, ^{35}S - γ -GTP は非加水分解性であるため, 細胞膜から ^{35}S リン酸基が除去されることなく,

³⁵S-γ-GTPが結合したままの状態となり検出される。そのため、細胞膜に結合した³⁵S-γ-GTPの量(放射エネルギー)を測定することで、GPCRの活性化を評価することが可能である。

本研究では、11α-HHC, 11β-HHC, 及びそれらのアセチル化体 1α-HHC-O-acetate, 11β-HHC-O-acetate, また、Δ⁹-THC 及び Δ⁸-THC のアセチル化体 Δ⁹-THC-O-acetate 及び Δ⁸-THC-O-acetate の6化合物を対象として、ヒトカンナビノイド受容体 (CB₁ 及び CB₂) に対するアゴニスト活性を明らかにするために、ヒトリコンビナント受容体を用いて、³⁵S-GTPγS 結合を指標とした受容体機能評価試験を実施した。

B. 研究方法

以下の試験は、積水メディカル株式会社に委託して実施した。

①試験試料

11α-HHC, 11β-HHC, 1α-HHC-O-acetate, 11β-HHC-O-acetate, Δ⁹-THC-O-acetate 及び Δ⁸-THC-O-acetate は国立衛研で合成したものを使用した^{1), 2), 3)}。陽性物質 CP-55,940 は Sigma 社, トレーサー [³⁵S]-Guanosine 5'-(γ-thio) triphosphate (³⁵S-GTPγS) は PerkinElmer Life & Analytical Sciences 社, ヒトリコンビナントクロニンレセプター cannabinoid CB₁ 及び Cannabinoid CB₂ は Eurofins 社, Guanosine 5'-diphosphate sodium salt (GDP) は Sigma 社, Dimethyl sulfoxide (DMSO) は関東化学から入手した。

②試料溶液

被験物質 6 化合物及び陽性物質 CP-55,940 を秤量し、DMSO で溶解して、最終濃度 (1x10⁻¹² ~ 1x10⁻⁵ mol/L の 8 濃度) の 100 倍濃度の溶液を調製した。更に、調製した濃度の溶液を、試験用水で 10 倍希釈することにより被験物質溶液及び陽性物質溶液を調製した(用時調製)。同様に、陽性物質 CP-55,940 を DMSO で溶解し、最終濃度 (1x10⁻⁶ mol/L) の 100 倍濃度の溶液を調製した。更に、調製した溶液を、試験用水で 10 倍希釈し

て 100% 反応溶液を調製した(用時調製)。

②測定方法

1) 総結合算出用チューブには 10% DMSO を、100% 反応量算出用チューブには 100% 反応溶液を、被験物質及び陽性物質の反応量算出用チューブには被験物質溶液あるいは陽性物質溶液をそれぞれ 50 μL 添加した (DMSO の最終濃度は 1%)。

2) 1) のそれぞれの溶液に、緩衝液 (100 mmol/L NaCl 及び 10 mmol/L MgCl₂ を含む 20 mmol/L HEPES-NaOH pH 7.4) 100 μL, トレーサー (³⁵S-GTPγS) 溶液 100 μL, GDP 溶液 50 μL, レセプター (cannabinoid CB₁ または Cannabinoid CB₂) 溶液 200 μL を添加し、30°C 60 分間インキュベートした。

3) 2) の溶液をセルハーベスターにより濾過 (GF/C, Whatman, PBS 処理) し、氷冷した PBS 3 mL で 3 回洗浄した。

4) 濾紙を測定バイアルビンに移し、液体シンチレーター (PICO-FLUOR™ PLUS) 5 mL を添加し、液体シンチレーションカウンターで測定 (測定時間 2 min) した。

④反応率の計算

以下の式により算出した。

反応率: $[(B - B_0) / (B_{max} - B_0)] \times 100 (\%)$

B: 被験物質存在下での反応放射エネルギー (個別値)

B₀: 被験物質非存在下での反応放射エネルギー (basal 量) (平均値)

B_{max}: 最大反応溶液 (アゴニスト溶液) 存在下での反応放射エネルギー (平均値)

陽性物質に関しても被験物質と同様に反応率を算出した。

EC₅₀ 値は、ロジスティックモデルによる非線形回帰の結果から推定した。

$Y = 0 + 1 / [1 + 10^{-\beta \times (X - ED_{0.5})}]$

Y (反応量比): $(B - B_0) / (B_{max} - B_0)$

ED_{0.5}: EC₅₀ の常用対数

β: 傾き (Hill 係数)

X: 被験物質濃度の常用対数

C. 結果及び考察

対象 6 化合物について、ヒトリコンビナントカンナビノイド CB₁ 及び CB₂ 受容体を用いて、³⁵S-GTPγS 結合を指標としたアゴニスト活性評価を行った。結果を、Table 1 及び Table 2 に示した。CB₁ 受容体に対するアゴニスト活性は、最も活性が強かった 11β-HHC の EC₅₀ 値が 7.96×10⁻⁶ mol/L であったが、その他の化合物の EC₅₀ 値は >1×10⁻⁵ mol/L であった。また、陽性化合物 CP-55,940 が 100%の活性を示す 1 x 10⁻⁵ mol/L (10 μM) の濃度において、11α-HHC 16%、11β-HHC 52%、11β-HHC-O-acetate 35%、Δ⁸-THC-O-acetate 21%、Δ⁹-THC-O-acetate 9%の活性を示したが、11α-HHC-O-acetate は活性が認められなかった。カンナビノイド CB₁ 受容体に対しては、11α-HHC/11α-HHC-O-acetate よりも、11β-HHC/11β-HHC-O-acetate の方が、アゴニスト活性が強いことが示唆された。

カンナビノイド CB₂ 受容体に対しては、いずれの化合物も EC₅₀ 値は >1×10⁻⁵ mol/L であり、1 x 10⁻⁵ mol/L (10 μM) における活性においても、11α-HHC 18%、11β-HHC 20%であったが、その他アセチル化体は、本実験条件では、ほとんど活性を示さなかった。

カンナビノイド類は脂溶性が高く、水系溶媒に溶解性が悪いことを考慮して、本研究で検討した被験物質の濃度範囲の上限を 1×10⁻⁵ mol/L (10 μM) に設定した。しかし、最高濃度を、5×10⁻⁵ mol/L もしくは 1×10⁻⁴ mol/L に設定すれば、各化合物のアゴニスト活性をより明確に観察できた可能性が考えられる。今回は、同条件下で、Δ⁸-THC 及び Δ⁹-THC の評価は実施しなかったが、11α-HHC と 11α-HHC-O-acetate、また 11β-HHC と 11β-HHC-O-acetate のヒトカンナビノイド CB₁、CB₂ 受容体に対するアゴニスト活性を比較すると、アセチル化体の方が、わずかに活性が弱い可能性が考えられた。

D. 結論

対象 6 化合物について、ヒトカンナビノイド受容体 (CB₁ 及び CB₂) に対するアゴニスト活性を明らかにするために、ヒトリコンビナント受容体を用いて、³⁵S-GTPγS 結合を指標とした受容体機能評価試験を実施した。その結果、本研究で検討した濃度範囲では、11α-HHC-O-acetate は有意な受容体活性化は認められなかったが、Δ⁹-THC-O-acetate、Δ⁸-THC-O-acetate、11α-HHC、11β-HHC 及び 11β-HHC-O-acetate は、陽性化合物 CP-55,940 と比較して弱い効果ではあったが、CB₁受容体作用を有していることが確認された。また、CB₂受容体に対しては、アセチル化体 4 化合物はほとんど活性を示さなかったが、11α-HHC 及び 11β-HHC は弱いながらもアゴニスト活性を有することが示唆された。

E. 参考論文

- 1) 厚生労働行政推進調査事業費補助金(厚生労働科学特別研究事業)「急増する植物成分由来危険ドラッグの迅速な規制に資する研究」令和 4 年度研究分担報告「植物成分由来危険ドラッグの分析用標品合成及びインシリコによる活性予測評価法の検討」出水庸介
- 2) 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政策研究事業)「危険ドラッグ等の乱用薬物の迅速識別に関する分析情報の収集及び危害影響予測のための研究」令和4年度研究分担報告「危険ドラッグの合成に関する研究」出水庸介
- 3) 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 年度研究分担報告「新規麻薬類の標品合成に関する研究」三澤隆史

F. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

学会発表

なし

論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし

Table 1 Reaction Ratio and EC₅₀ Values of ³⁵S-GTPγS Binding of Test Substances on Cannabinoid CB1 (Human) Receptor

Substance	Substance concentration (mol/L)								EC ₅₀ (mol/L)
	1×10 ⁻¹²	1×10 ⁻¹¹	1×10 ⁻¹⁰	1×10 ⁻⁹	1×10 ⁻⁸	1×10 ⁻⁷	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁵	
	Reaction ratio (%)								
11α-HHC	3.24	4.35	4.35	1.00	0.00	0.00	0.00	15.98	>1×10 ⁻⁵
11β-HHC	0.00	0.00	0.23	0.00	0.00	5.69	24.10	52.26	7.96×10 ⁻⁶
11α-HHC- <i>O</i> -acetate	0.00	0.00	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	>1×10 ⁻⁵
11β-HHC- <i>O</i> -acetate	0.00	0.00	0.00	0.00	5.13	0.13	6.88	34.58	>1×10 ⁻⁵
Δ8-THC- <i>O</i> -acetate	1.10	0.00	2.82	4.69	0.00	0.00	2.18	20.93	>1×10 ⁻⁵
Δ9-THC- <i>O</i> -acetate	0.00	0.00	2.98	0.00	0.00	0.00	0.54	8.57	>1×10 ⁻⁵
CP55940	0.95	0.00	0.88	28.00	66.59	81.27	93.00	100.00	4.74×10 ⁻⁹

Data are expressed as the mean values of duplicate sample.

Table 2 Reaction Ratio and EC₅₀ Values of ³⁵S-GTPγS Binding of Test Substances on Cannabinoid CB2 (Human) Receptor

Substance	Substance concentration (mol/L)								EC ₅₀ (mol/L)
	1×10 ⁻¹²	1×10 ⁻¹¹	1×10 ⁻¹⁰	1×10 ⁻⁹	1×10 ⁻⁸	1×10 ⁻⁷	1×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁵	
	Reaction ratio (%)								
11α-HHC	2.69	4.79	9.20	4.97	8.11	3.28	3.91	17.93	>1×10 ⁻⁵
11β-HHC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.66	19.52	>1×10 ⁻⁵
11α-HHC- <i>O</i> -acetate	1.84	0.00	2.20	0.00	0.00	0.00	0.00	2.66	>1×10 ⁻⁵
11β-HHC- <i>O</i> -acetate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.28	>1×10 ⁻⁵
Δ8-THC- <i>O</i> -acetate	0.00	4.67	0.00	0.00	0.00	0.91	0.00	5.40	>1×10 ⁻⁵
Δ9-THC- <i>O</i> -acetate	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	>1×10 ⁻⁵
CP55940	1.21	0.00	8.86	61.88	82.22	96.92	96.30	100.00	7.59×10 ⁻¹⁰

Data are expressed as the mean values of duplicate sample.

分担研究課題:植物成分由来危険ドラッグ製品の流通実態調査及び含有化合物の同定

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

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)をはじめとする Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -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.本研究では,令和 4 年度に入手したこれらの THC アナログの含有を標榜するオイル製品の成分を同定した. GC-MS, LC-MS で分析を行った後,成分を単離し NMR 測定による構造解析を行なった.その結果,THCO の含有を標榜する製品からは, Δ^8 -THCO, Δ^9 -THCO, $\Delta^{4(8)}$ -iso-THC-O-acetate, HHCO の含有を標榜する製品からは 11β -HHCO, 11α -HHCO, dihydro-iso-THC-O-acetate を同定した. 2 製品ともそのマイナー成分の存在から cannabidiol (CBD)をもとに合成された可能性が高いことが示唆された.

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

令和 5 年 2 月時点で指定薬物として, 2413 化合物+2 植物が指定されている. 我々は継続的に日本国内での危険ドラッグの流通実態調査を行っている. しかし, 現在でも新たな化合物が危険ドラッグ成分として検出され続けており, いまだ予断を許さない状況である.

大麻草(*Cannabis sativa* L.)の中枢作用の活性成分は, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)である. Δ^9 -THC は現在, その異性体の Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC)などとともに麻薬及び向精神薬取締法の麻薬として規制されている. 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)をはじめとする 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 は天然の大麻草には微量しか含まれていないが Δ^9 -THC や Δ^8 -THC を還元することでも合成できる. 我々はこれまでに HHC 含有を標榜する製品について成分を単離し, 構造異性

体 11β -HHC と 11α -HHC を同定した(Fig.1). HHC は指定薬物として令和 4 年 3 月に規制された. 今回, インターネット上等で流通するその他の THC アナログの含有を標榜する製品について含有成分を同定することにした.

本研究では, 今年度入手した危険ドラッグ製品について GC-MS, LC-MS, HR-MS, および NMR 分析を行った. その結果, 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オイル 2 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

1. 試料及び試薬

令和 4 年度に入手した THC アナログの含有を標榜するのうち 2 製品(オイル 2 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ものをを用いた。抽出溶液の膜ろ過には、Ultrafree-MC (0.45 µm 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

オイル製品をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し Hex-Hex:EtoAc 100:1-30:1 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 µm, 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 µL, 注入口温度:250°C, カラム温度:200°C (1 min hold)-5°C/min-310°C (7 min hold), トランスファーライン温度:280°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 µm, 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°C,注入量:1 µL, 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:N₂ 650 L/h, Desolvation gas temp.:350°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 µm, Waters 社製), ガードカラム:Van Guard HSS T3 (2.1 mm i.d. x 5 mm, 1.7 µm, 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°C, 注入量:1 µL, 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°C; desolvation gas, nitrogen (flow rate of 800 L/h at 400 °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]⁺)] 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:¹H, ¹³C, 測定溶媒:chloroform-*d* (99.96%), methanol-*d*₄ (99.96%) and dimethyl sulfoxide (DMSO)-*d*₆ (99.96%) (ISOTEC 社製).

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

C. 研究結果・考察

分析を行った 2 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. 1 に示し、2 製品(A-B)のアセトニトリル抽出試料の GC-MS, LC-MS データを Fig. 2-5 に示した。化合物(1-6)の NMR データを Table 1-4 に示した。

製品 A の GC-MS 分析の結果、主成分とみられる化合物 1 が保持時間 10.13 分に検出され、そのマススペクトルは Fig. 2b に示す通りであった。ライブラリー検索の結果、 Δ^8 -THC と高い相動性を示したが、分子イオンピーク[M]⁺は *m/z* 356 にまた LC-MS では *m/z* 356 に[M+H]⁺のピークが観測された。NMR データより Δ^8 -THC よりカルボニル炭素とメチル基がそれぞれ 1 つ多く観測され、2 次元 NMR の相関よりアセチル基の存在が確認された。その結果、化合物 1 は Δ^8 -THC の 1 位水酸基がアセチル化された構造であることがわかった。以上より、化合物 1 は 6*aR*,7,10,10*aR*-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-1-ol, 1-acetate, Δ^8 -tetrahydrocannabinol acetate, Δ^8 -THC-O acetate, Δ^8 -THCO, Fig. 1)であると同定した。また製品 A からはその他に化合物 2 が保持時間 10.84 分に検出され、そのマススペクトルは Fig. 2c に示す通りであった。ライブラリー検索の結果、 Δ^9 -THC の 1 位水酸基がアセチル化された構造である Δ^9 -THC-O-acetate と一致した。また LC-MS では *m/z* 356 に[M+H]⁺のピークが観測された (Fig. 3d)。NMR 分析の結果、 Δ^9 -THC よりカルボニル炭素とメチル基がそれぞれ 1 つ多く観測され、2 次元 NMR の相関よりアセチル基の存在が確認された。以上より化合物 2 は、6*aR*,7,8,10*aR*-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-1-ol, 1-acetate, Δ^9 -tetrahydrocannabinol acetate, Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^9 -THCO, Fig. 1)であると同定した。

さらに GC-MS では保持時間 10.71 分に、LC-MS では保持時間 26.6 分にマイナー成分とみら

れる化合物 3 のピークが検出された(Fig. 2a, Fig. 3a)。LC-MS では *m/z* 357 に[M+H]⁺のピークが観測され、GC-MS で *m/z* 356 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, 2 と異なっていた (Fig. 2d)。化合物 3 の NMR 分析の結果、CBD から環化反応で Δ^9 -THC または Δ^8 -THC を合成する際に副生することが報告されている $\Delta^{4(8)}$ -*iso*-THC の水酸基がアセチル化された化合物である 3,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-5-(1-methylethylidene)-9-pentyl-2*R*,6*R*-methano-2*H*-1-benzoxocin-7-ol acetate ($\Delta^{4(8)}$ -isotetrahydrocannabinol acetate, $\Delta^{4(8)}$ -*iso*-THC-O-acetate, Fig. 1)と同定した。

製品 B は GC-MS では保持時間 10.13, 10.84 分に主成分とみられる化合物 4 と化合物 5 のピークが検出され (Fig. 4a), そのマススペクトルは Fig. 4b, 4c に示す通りであった。LC-MS ではそれぞれ保持時間 28.2, 28.7 分に *m/z* 359 に[M+H]⁺のピークが観測された。化合物 4 と 5 の NMR 分析の結果、それぞれ 11 β -HHC と 11 α -HHC の一位水酸基がアセチル化されてい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 4 を (6*aR*,9*R*,10*aR*)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6*a*,7,8,9,10,10*a*-hexahydro-6*H*-benzo[*c*]chromen-1-yl acetate (9(*R*)-hexahydrocannabinol acetate, 11 β -HHCO), 化合物 5 を (6*aR*,9*S*,10*aR*)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6*a*,7,8,9,10,10*a*-hexahydro-6*H*-benzo[*c*]chromen-1-yl acetate (9(*S*)-hexahydrocannabinol acetate, 11 α -HHCO, Fig. 1)と同定した。

さらに GC-MS では保持時間 9.82 分に、LC-MS では保持時間 28.4 分にマイナー成分とみられる化合物 6 のピークが検出された (Fig. 4a), LC-MS では *m/z* 359 に[M+H]⁺のピークが観測され、GC-MS で *m/z* 358 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 4, 5 と異なっていた (Fig. 4d)。化合物 6 の NMR 分析の結果、HHC のマイナー成分である dihydro-*iso*-THC の水酸基がアセチル化された化合物である(2*R*, 6*R*)-5-

isopropyl-2-methyl-9-pentyl-3,4,5,6-tetrahydro-2H-2,6-methanobenzo[b]oxocin-7-ol acetate (dihydro-iso-tetrahydrocannabinol acetate, dihydro-iso-THC-O-acetate, Fig. 1)と同定した。

以上、2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 A および B とも構造不明の成分があるため引き続き分析を行う。

D. 結論

本研究では、今年度に入手した2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、THCOの含有を標榜する製品からは、 Δ^8 -THCO, Δ^9 -THC-O, $\Delta^{4(8)}$ -iso-THC-O-acetate, HHCOの含有を標榜する製品からは11 β -HHCO, 11 α -HHCO, dihydro-iso-THC-O-acetateを同定した。2製品ともそのマイナー成分の存在からCBDをもとに合成された可能性が高いことが示唆された(Fig. 6)。

今後も新しい骨格を有する危険ドラッグの流通が懸念される。故に、本研究結果は、既知および新規危険ドラッグを判断する際の有用な科学的データであると考えられる。

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政策研究事業)「危険ドラッグ等の乱用薬物に関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究」平成29年度研究分担報告「平成29年度入手危険ドラッグ製品中の新規流通危険ドラッグ成分の同定」(田中理恵)
2. 田中理恵, 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志:平成28・29年度の新規流通危険ドラッグ成分の同定, 第54回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 2017 pp272-273.
3. 田中理恵, 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志:平成29年—令和元年の新規流通危険ドラッグ成分の同定, 第56回全国衛生化学

技術協議会年会講演集, 2019 pp.258-259.

4. 田中理恵, 河村麻衣子, 袴塚高志, 花尻(木倉)瑠理:シート状危険ドラッグ製品中のLSD誘導体の同定と分析の検討. 薬学雑誌 2020;140(5):739-750.
5. 田中理恵, 河村麻衣子, 袴塚高志, 花尻(木倉)瑠理:シート状危険ドラッグ製品中のLSD誘導体 1cP-LSD, MIPLA, 1B-LSDの同定. 薬学雑誌 2020;140:1405-1413.
6. Tanaka R, Kawamura M, Hakamatsuka T, Kikura-Hanajiri R: Identification of six tryptamine derivatives as designer drugs in illegal products. *Forensic Toxicol* 2021;39:248–258.
7. 田中理恵, 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志:2019年—2020年の新規流通危険ドラッグ成分の同定, 第57回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 2020 pp324-325.
8. 田中理恵, 河村麻衣子, 水谷佐久美, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志:令和2年-令和3年の新規流通危険ドラッグ成分の同定, 第58回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 2021 pp248-249.
9. 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.

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, 河村麻衣子, 水谷佐久美, 花尻(木倉)瑠理:令和2年-令和3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(2021.10.31-11.1, 川崎)

- 2) 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 142 年会 (2023.3.26, 札幌)

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.

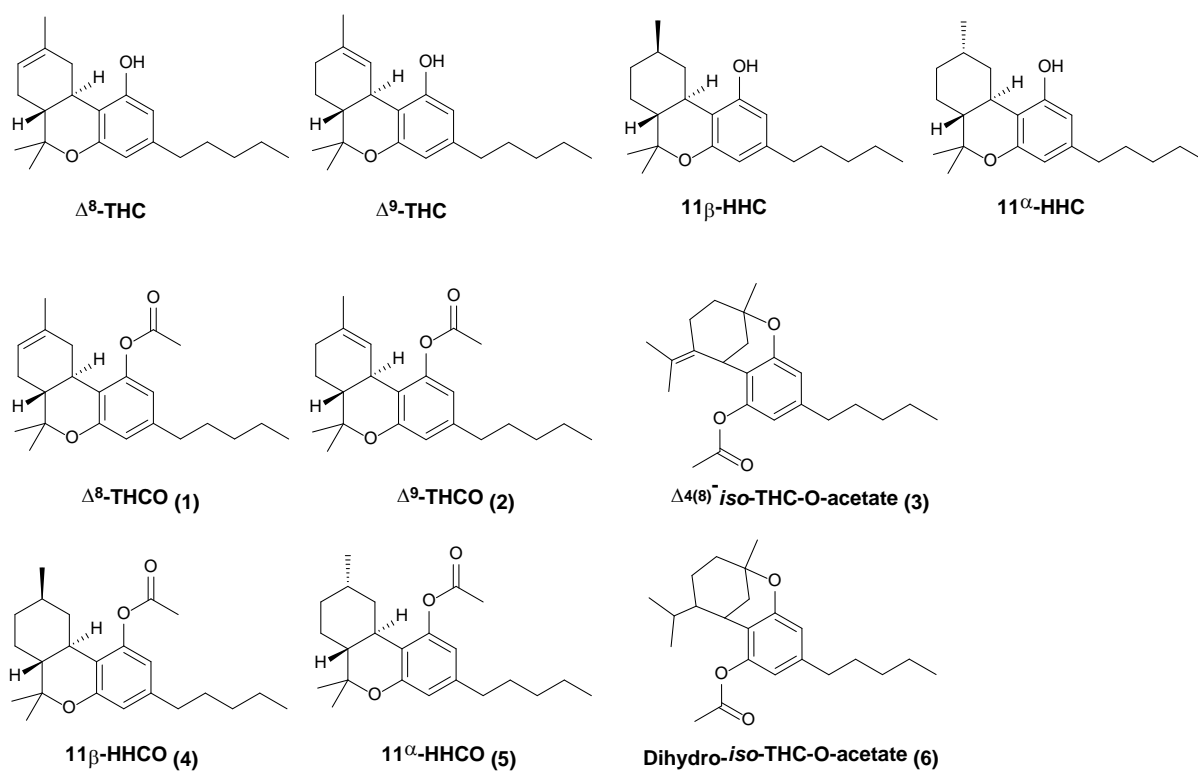


Fig. 1. Structures of the newly detected compounds (1-6).

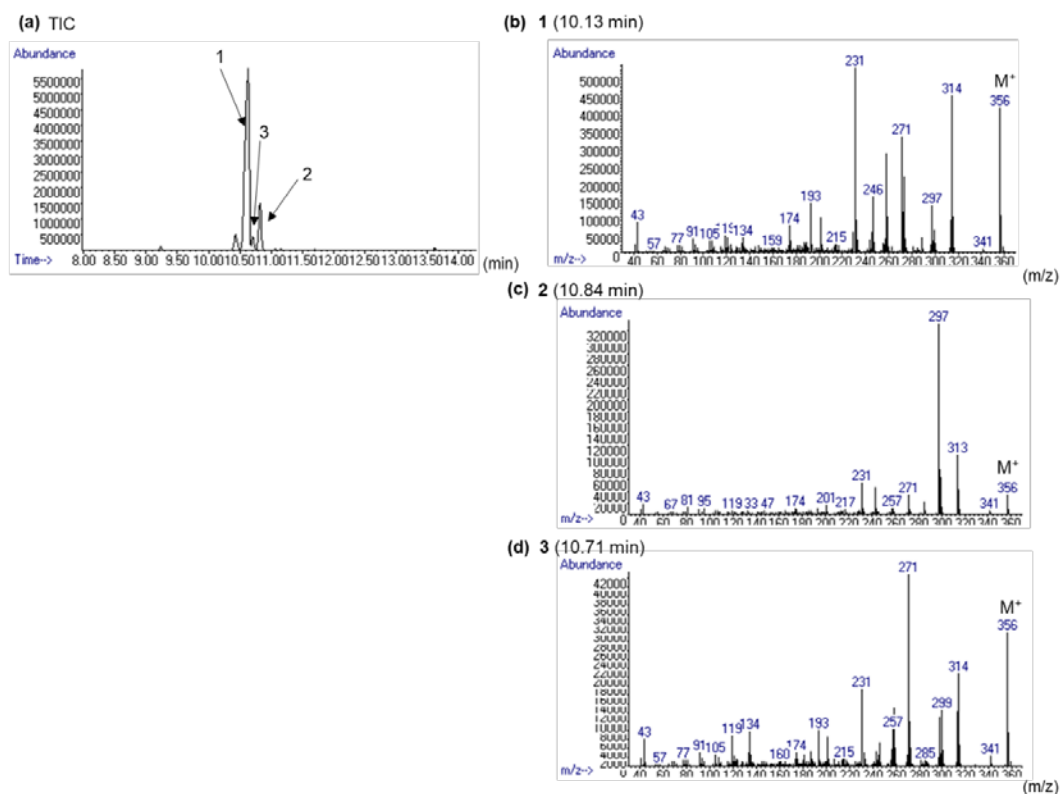


Fig. 2 GC-MS analysis of product A.

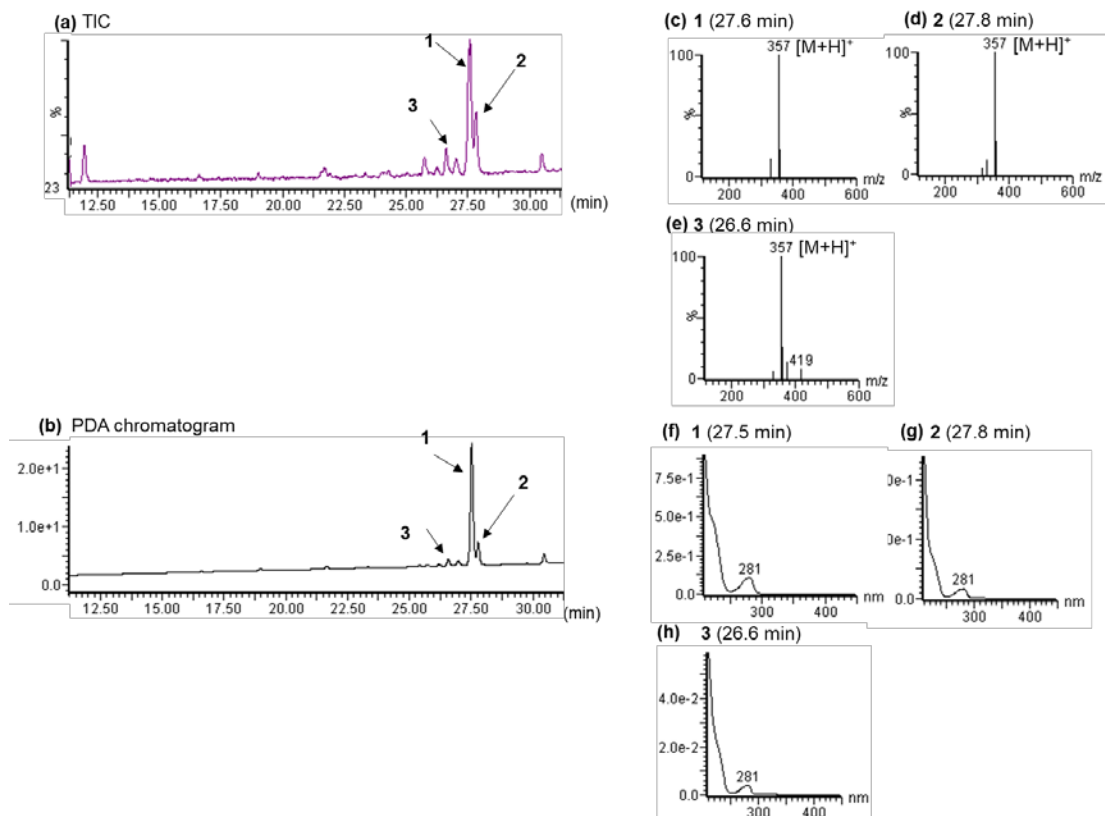


Fig. 3. LC-MS analysis of product A.

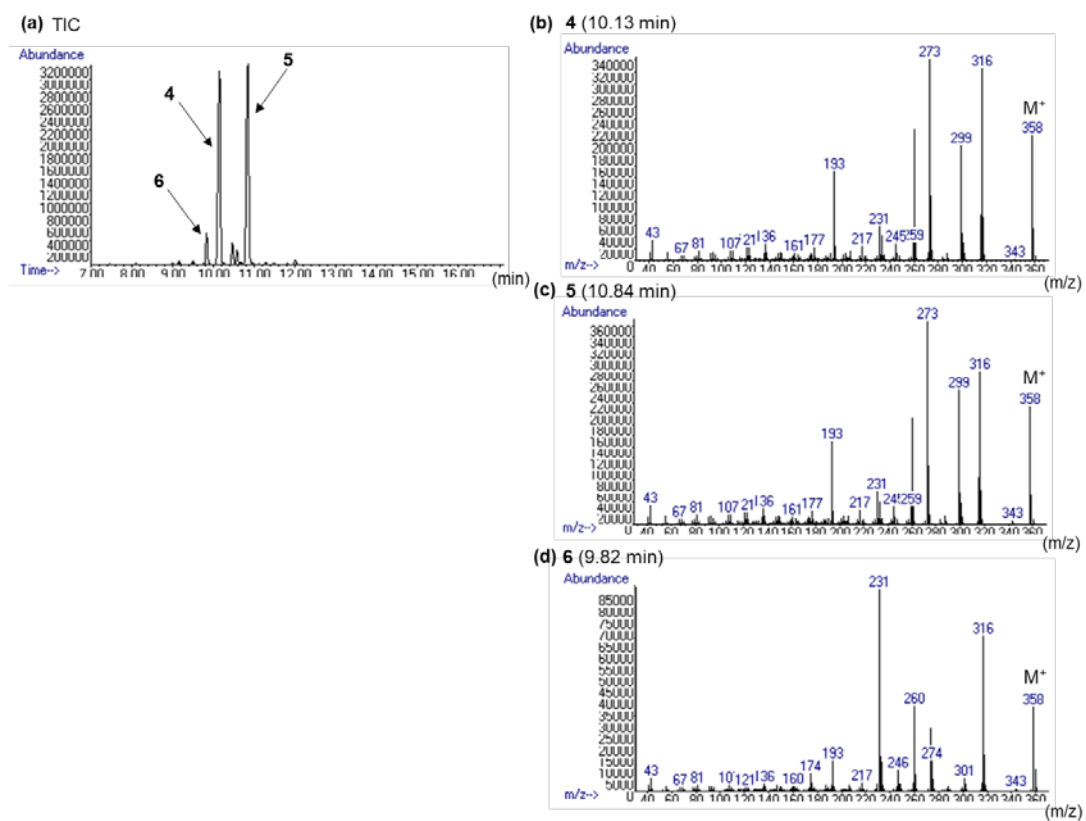


Fig. 4. GC-MS analysis of product B.

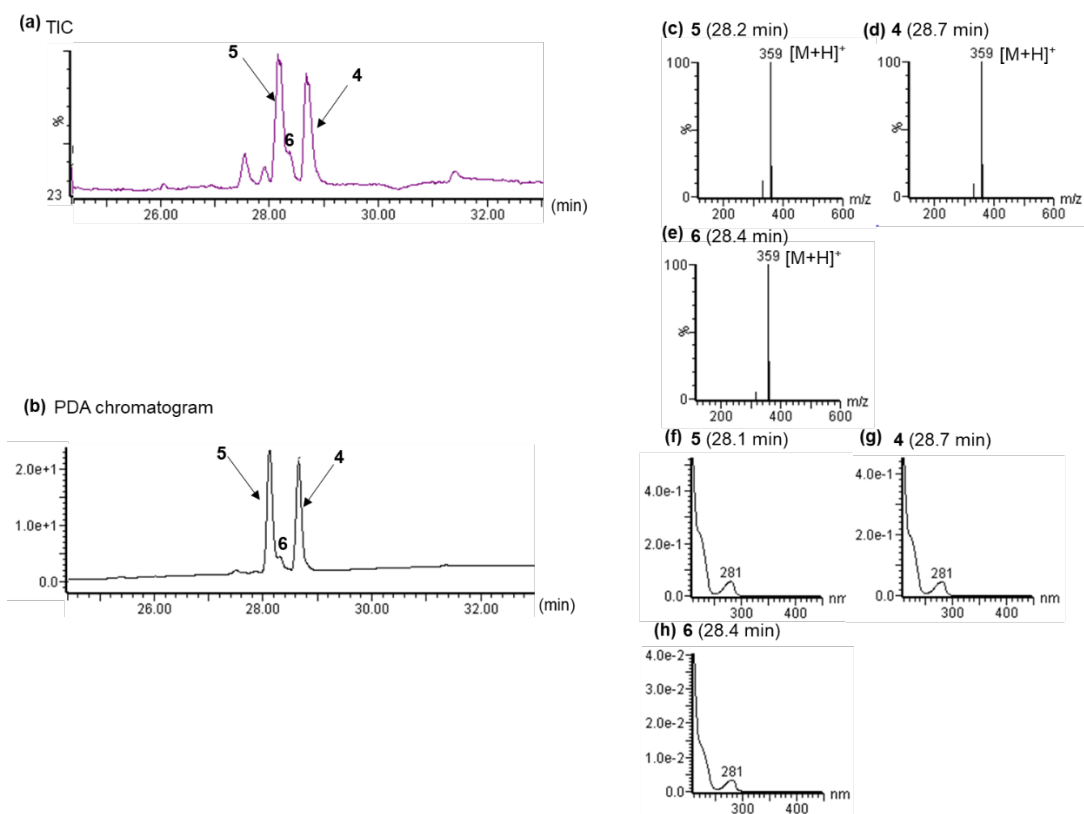


Fig. 5. LC-MS analysis of product B.

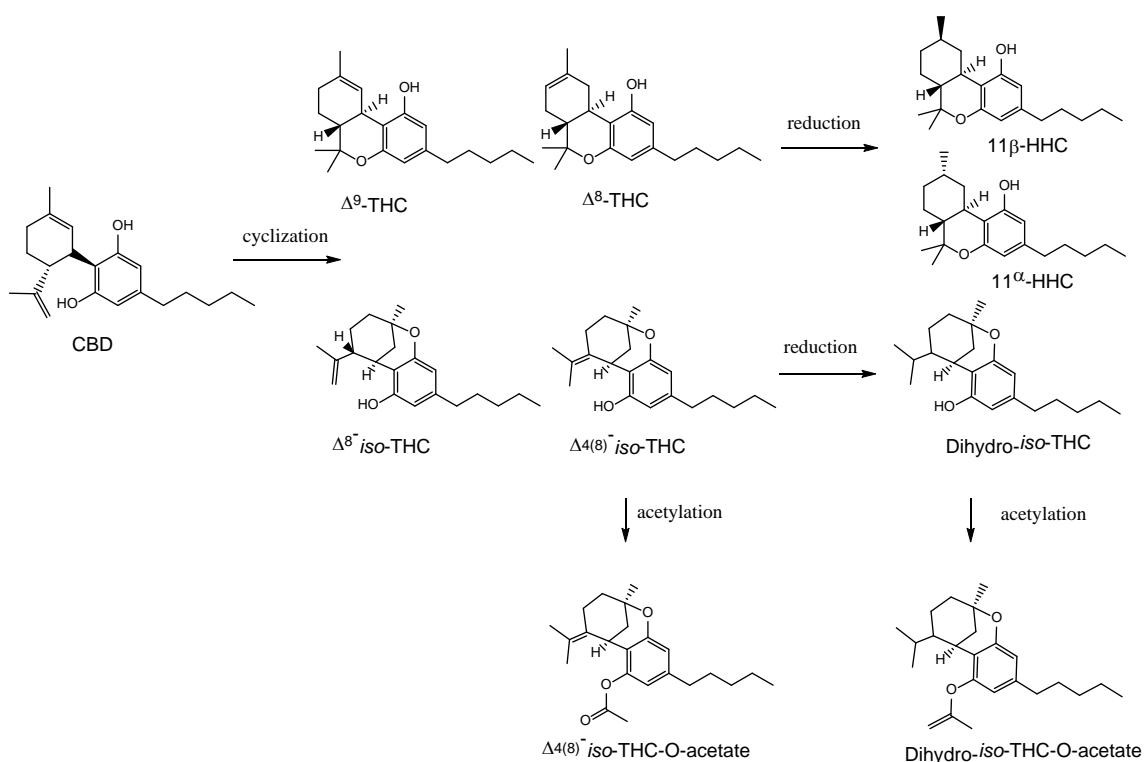


Fig. 6. Proposed synthetic route for 11 β -HHC, 11 α -HHC, and dihydro-*iso*-THC.

Table 1 NMR data of Δ^8 -THCO (1) and Δ^9 -THCO (2)^a

No.	Δ^8 -THCO (1) in Methanol- <i>d</i> ₄		Δ^9 -THCO (2) in Methanol- <i>d</i> ₄	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	151.3	–	150.9	–
2	115.5	6.38, 1H, d, <i>J</i> =1.4 Hz	115.1	6.39, 1H, d, <i>J</i> =1.6 Hz
3	143.9	–	143.9	–
4	116.2	6.48, 1H, d, <i>J</i> =1.4 Hz	116.2	6.48, 1H, d, <i>J</i> =1.6 Hz
5	155.9	–	155.8	–
6	77.9	–	78.5	–
6a	46.3	1.70, 1H, m, overlapped	47.1	1.59, 1H, m, overlapped
7	28.8	1.80, 1H, m, overlapped	26.1	1.37, 1H, m
8	120.9	2.14, 1H, m	31.9	1.94, 1H, m
9	135.0	5.44, 1H, d, <i>J</i> =3.8 Hz	–	1.51, 1H, m, overlapped
10	37.4	–	136.2	2.16, 1H, m
10a	33.3	1.82, 1H, m, overlapped	124.1	–
10b	117.5	2.76, 1H, dd, <i>J</i> =4.9, 14.7 Hz	–	5.96, 1H, s
11	18.6	2.54, 1H, ddd, <i>J</i> =4.9, 11.1, 11.1 Hz	35.5	–
12	–	–	116.5	3.02, 1H, d-like, <i>J</i> =12.8 Hz
13	27.8	1.68, 3H, s	23.6	–
1'	36.3	1.06, 3H, s	19.4	1.67, 3H, s
2'	31.9	1.35, 3H, s	27.8	1.04, 3H, s
3'	32.6	2.49, 2H, t, <i>J</i> =7.8 Hz	36.3	1.38, 3H, s
4'	23.5	1.57, 2H, m	31.9	2.49, 2H, t, <i>J</i> =7.8 Hz
5'	14.4	–	–	1.51, 1H, m, overlapped
Acetyl	–	–	–	2.16, 1H, m
C=O	170.8	1.29, 2H, m, overlapped	32.6	1.30, 2H, m, overlapped
CH ₃	21.1	1.33, 2H, m, overlapped	23.6	1.34, 2H, m, overlapped
		0.90, 3H, t, <i>J</i> =7.3 Hz	14.4	0.90, 3H, t, <i>J</i> =7.3 Hz
		–	170.5	–
		2.26, 3H, s	21.1	2.25, 3H, s

^a Recorded at 800 MHz (¹H) and 200 MHz (¹³C), respectively; data in δ ppm (*J* in Hz).

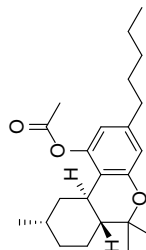
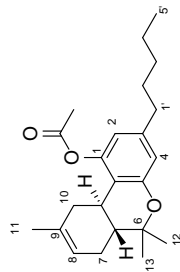


Table 2 NMR data of $\Delta^{4(8)}$ -*iso*-THC-*O*-acetate (**3**)^a

No.	$\Delta^{4(8)}$ - <i>iso</i> -THC- <i>O</i> -acetate (3) in Methanol- <i>d</i> ₄	
	¹³ C	¹ H
1	75.7	—
2	38.0	1.80, 2H, m, overlapped
3	32.0	4.08, 1H, s
4	133.0	—
5	23.9	1.77, 1H, m, overlapped 2.43, 1H, dd, <i>J</i> =5.5, 14.4 Hz
6	41.6	1.51, 1H, ddd, <i>J</i> =5.5, 7.4, 7.4 Hz 1.95, 1H, m
7	29.0	1.31, 3H, s
8	122.6	—
9	20.5	1.64, 3H, s
10	20.6	1.87, 3H, s
1'	158.4	—
2'	113.8	6.49, 1H, d, <i>J</i> =1.1 Hz
3'	143.6	—
4'	114.1	6.05, 1H, d, <i>J</i> =1.6 Hz
5'	149.5	—
6'	116.9	—
7'	36.5	2.49, 2H, t, <i>J</i> =7.8 Hz
8'	32.1	1.57, 2H, m, overlapped
9'	32.6	1.30, 2H, m, overlapped
10'	23.6	1.31, 2H, m, overlapped
11'	14.4	0.90, 3H, t, <i>J</i> =7.1 Hz
Acetyl		
C=O		—
CH ₃		2.25, 3H, s

^a Recorded at 800 MHz (¹H) and 200 MHz (¹³C), respectively; data in δ ppm (*J* in Hz).

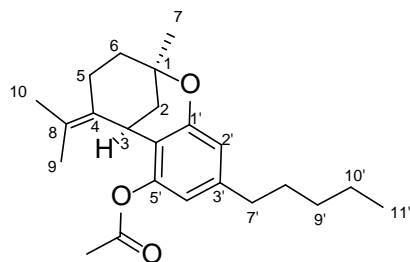


Table 3 NMR data of 11 β -HHCO (1) and 11 α -HHCO (2)^a

No.	11 β -HHCO (1) in Methanol- <i>d</i> ₄		11 α -HHCO (2) in Methanol- <i>d</i> ₄	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	151.2	–	151.1	–
2	115.3	6.34, 1H, d, <i>J</i> =1.7 Hz	115.2	6.33, 1H, d, <i>J</i> =1.6 Hz
3	143.8	–	143.7	–
4	116.2	6.45, 1H, s	116.2	6.45, 1H, s
5	156.0	–	156.2	–
6	78.2	–	78.1	–
6a	50.5	1.40, 1H, m	51.6	1.41, 1H, m
7	29.0	1.12, 1H, m, overlapped	24.1	1.29, 1H, m, overlapped
8	36.5	1.87, 1H, m, overlapped	33.1	1.65, 1H, m, overlapped
9	34.3	1.05, 1H, m, overlapped	–	1.64, 1H, m, overlapped
10	40.7	1.87, 1H, m, overlapped	29.2	1.68, 1H, m, overlapped
10a	37.2	1.56, 2H, m, overlapped	37.8	2.11, 1H, br
10b	117.3	0.78, 1H, ddd, <i>J</i> =11.6, 11.6, 11.6 Hz	31.1	1.32, 1H, m, overlapped
11	23.0	2.60, 1H, m	–	2.46, 1H, m, overlapped
12	19.2	2.31, 1H, ddd, <i>J</i> =2.7, 11.3, 11.3 Hz	111.7	2.64, 1H, ddd, <i>J</i> =2.3, 11.6, 11.6 Hz
13	28.0	–	19.2	1.10, 3H, d, <i>J</i> =7.3 Hz
1'	36.3	0.96, 3H, d, <i>J</i> =6.7 Hz	27.8	1.04, 3H, s
2'	32.0	1.04, 3H, s	36.3	1.33, 3H, s
3'	32.6	1.31, 3H, s	32.0	2.47, 2H, t, <i>J</i> =8.0 Hz
4'	23.6	2.47, 2H, m	32.6	1.58, 2H, m
5'	14.4	1.56, 2H, m, overlapped	23.6	1.29, 2H, m, overlapped
Acetyl	–	1.30, 2H, m, overlapped	14.4	1.31, 2H, m, overlapped
C=O	170.7	1.32, 2H, m, overlapped	–	0.90, 3H, t, <i>J</i> =7.2 Hz
CH ₃	21.0	0.90, 3H, t, <i>J</i> =7.2 Hz	170.6	–
		–	22.2	2.26, 3H, s

^a Recorded at 800 MHz (¹H) and 200 MHz (¹³C), respectively; data in δ ppm (*J* in Hz).

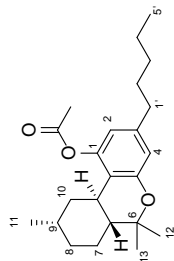
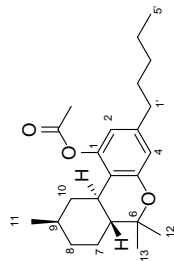
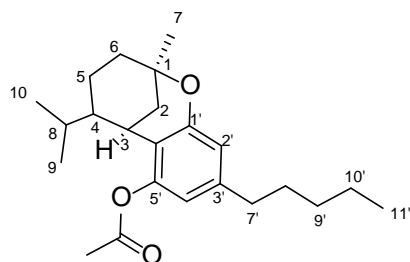


Table 4 NMR data of Dihydro-*iso*-THC-*O*-acetate (**6**)^a

Dihydro- <i>iso</i> -THC- <i>O</i> -acetate (6) in Methanol- <i>d</i> ₄		
No.	¹³ C	¹ H
1	75.4	–
2	37.9	1.69, 1H, m 1.85, 1H, dd, <i>J</i> =2.8, 12.9 Hz
3	31.5	3.17, 1H, d, <i>J</i> =2.4 Hz
4	51.0	1.28, 1H, m, overlapped
5	23.5	1.59, 2H, m, overlapped
6	41.1	1.52, 1H, m, overlapped 1.92, 1H, m
7	28.9	1.31, 3H, s
8	30.3	1.29, 1H, m, overlapped
9	20.5	0.72, 3H, d, <i>J</i> =6.4 Hz
10	23.5	1.08, 3H, d, <i>J</i> =6.1 Hz
1'	158.9	–
2'	113.7	6.45, 1H, d, <i>J</i> =1.4 Hz
3'	143.6	–
4'	113.8	6.34 1H, d, <i>J</i> =1.7 Hz
5'	150.2	–
6'	115.1	–
7'	36.5	2.49, 2H, m
8'	32.0	1.58, 2H, m, overlapped
9'	32.6	1.31, 2H, m, overlapped
10'	23.6	1.35, 2H, m, overlapped
11'	14.4	0.90, 3H, t, <i>J</i> =7.0 Hz
Acetyl		
C=O	171.3	–
CH ₃	21.3	2.27, 3H, s

^a Recorded at 800 MHz (¹H) and 200 MHz (¹³C), respectively; data in δ ppm (*J* in Hz).



分担研究課題：植物成分由来危険ドラッグの in vitro 代謝に関する検討

研究分担者：石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院 准教授

Δ^9 -THC-*O*-acetate, Δ^8 -THC-*O*-acetate, 11 α -HHC *O*-acetate 及び 11 β -HHC-*O*-acetate の
ヒト肝臓マイクロゾームによる in vitro 代謝に関する検討

研究要旨：大麻由来成分である Δ^9 -THC (tetrahydrocannabinol) および Δ^8 -THC は、現在麻薬として規制されている。また、これらの同族体である 11 α -HHC (hexahydrocannabinol) および 11 β -HHC は、指定薬物として規制されている。昨今、これらの薬物のアセチル化体が流通している。アセチル化体は生体内で容易に加水分解されると推定されるものの、筆者の知る限り、これらの薬物のアセチル化体の酵素的加水分解については未だ証明がなされていない。そこで、本研究では、 Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11 α -HHC および 11 β -HHC のアセチル化体を用い、ヒト肝臓マイクロゾーム (HLM)により酵素化学的加水分解が起こるか否か検討した。各カンナビノイドのアセチル化体は、1 mg/mL DMSO 溶液を終濃度 50 μ g/mL となるよう加えた。酵素反応は 100 mM Tris-HCl (pH 7.4)で行い、プールドヒト肝臓マイクロゾーム (Corning)10 μ g protein の存在下、終容量 200 μ L として 37°C でインキュベーションを行い、BEH Shield RP18 Columnを装着した ACQUITY UPLC (Waters)により解析した。各々の合成標品と同一の保持時間に Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11 α -HHC および 11 β -HHC が、それぞれ検出され、反応時間依存的に増加し、60 分後にはアセチル化体は殆ど残存しなかった。これらの反応は予め煮沸した HLM によっては起こらなかった。また、カルボキシエステラーゼ阻害剤とプレインキュベーションした HLM を酵素源とした時は、加水分解は殆ど起こらなかった。酵素的加水分解生成物のマススペクトルは、 Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11 α -HHC および 11 β -HHC と合致することを UPLC-QTOFMS によって検証した。従って、 Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11 α -HHC および 11 β -HHC のアセチル化体はヒト体内で酵素化学的に加水分解され麻薬 Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, および指定薬物 11 α -HHC, 11 β -HHC をそれぞれ生成することが強く示唆された。

研究協力者

李 任時 中国薬科大学
出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 部長
花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部 室長

について、医薬品医療機器等法の下に制定されている指定薬物制度に対応し、規制化の検討に必要な科学的データを監視指導・麻薬行政に提供することを目的とする。

近年、日本において大麻事犯が増加し、検挙人員が過去最多を更新している。また、大麻ワックス等の大麻濃縮物や大麻を含有した食品等、乱用形態の多様化が見られる。一方、大麻の代替品として、大麻の幻覚成分である Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)や Δ^8 -THC と

A. 研究目的

本研究は、大麻の代替品として国内流入が急増して問題となっている大麻成分由来化合物に

構造類似の大麻成分由来化合物を含有する製品の国内流入が急増している。Hexahydrocannabinol (HHC)は、大麻草から微量に検出されることが報告されているが、大麻成分 Cannabidiol (CBD)を原料として容易に合成することが可能である。電子タバコ用リキッドカートリッジやハーブ製品等として、令和3年頃からインターネット上等で流通していた。HHCは3つの不斉炭素を有するが、流通製品からは、9位のメチル基の立体のみが異なる2種類の異性体(11 α -HHC及び11 β -HHC)が同時に検出される。HHCは令和4年3月に指定薬物に指定されたが、規制後すぐに類似の化合物を含有する製品が出現している。規制化合物であるHHC、 Δ^9 -THC及び Δ^8 -THCの水酸基をアセチル化したHHC-*O*-acetate、 Δ^9 -THC-*O*-acetate (Δ^9 -THC-ACT, Δ^9 -THC-O) 及び Δ^8 -THC-*O*-acetate (Δ^8 -THC-ACT, Δ^8 -THC-O)は、新たに国内流入が認められている代表的な大麻成分由来化合物である。しかし、これら化合物について、今までに化学的特性及び薬理的特性に関する科学的報告はない。

本研究では、 Δ^9 -THC-*O*-acetate、 Δ^8 -THC-*O*-acetate、11 α -HHC-*O*-acetate (11 α -HHC-ACT, 11 α -HHC-O) 及び 11 β -HHC-*O*-acetate (11 β -HHC-ACT, 11 β -HHC-O)の計4種類の大麻成分由来化合物を対象として、*in vitro*による代謝を検討し、指定薬物指定の検討に必要な科学的データを取得する。

アセチル化された薬物が強い薬理作用を示す代表的な例として、ヘロインがよく知られている¹⁾。ヘロインは、体内で加水分解されモルヒネを生成する。体内での薬物の酵素的加水分解には、肝臓を始めとした多くの組織に分布しているカルボキシエステラーゼの寄与が大きく²⁾、これを利用して医薬品の薬理作用を効率的に発揮させる目的でプロドラッグも多く開発されている。代表例には、抗がん剤イリノテカンがあり、体内で加水分解されて活性代謝物SN-38を生成することが知られてい

る³⁻⁵⁾、カルボキシエステラーゼ (carboxylesterase, CES)にはCES1とCES2があり、これら2分子種が主要な酵素である^{2,5)}。また、ヒトにはCES3-CES6も存在することが知られている⁶⁾。これらは、マウス等の実験動物の血漿にも存在することが知られているが、ヒトでは血漿にはCES1とCES2は存在しないと言われている⁵⁾。一方、血漿には、別のエステラーゼの存在も知られている⁵⁾。これらのことから、ヒトが Δ^9 -THC-*O*-acetate、 Δ^8 -THC-*O*-acetate、11 α -及び11 β -HHC-*O*-acetateを摂取した場合、*in vivo*で加水分解されて、規制化合物である Δ^9 -THC、 Δ^8 -THC、11 α -HHC及び11 β -HHCが生成すると推定される (Fig. 1, Fig. 2)。ヒトでは、これを検証することは難しいため、CES1及びCES2が発現しているヒト肝臓マイクロゾーム (HLM)^{2,5)}を用いて*in vitro*代謝実験を行い、体内における酵素的加水分解の蓋然性を示す。

本研究は、監視指導・麻薬行政と密接に連携して遂行され、指定薬物制度に即して実施される。

B. 研究方法

被検薬物

Δ^9 -THC、 Δ^8 -THC、11 α -HHC および 11 β -HHC、さらにこれらのアセチル化体は、国立医薬品食品衛生研究所より供与された。

酵素的加水分解の定量的解析:

Δ^9 -THC、 Δ^8 -THC、11 α -HHC および 11 β -HHCのアセチル化体を用い、ヒト肝臓マイクロゾーム (HLM)により酵素化学的加水分解が起こるか否か検討した。各カンナビノイドのアセチル化体は、1 mg/mL DMSO 溶液を終濃度 50 μ g/mL となるよう加えた。DMSO の終濃度 1%。酵素反応は 100 mM Tris-HCl (pH 7.4)で行い、150 Pooledヒト肝臓マイクロゾーム (HLM) (Corning Gentest, Discovery Life Sciences) を酵素源として 10 μ g protein の存在下、終容量 200 μ L として 37°C でインキュベーションを行い、BEH Shield RP18 Column を装着した ACQUITY UPLC (Waters)により解析した。

解析は Δ^9 -THC、 Δ^8 -THC、11 α -HHC および

11 β -HHC と、各々のアセチル化体を標品とした絶対検量線法で実施した。

分析条件は

Equipment

: ACQUITY UPLC H-Class (Waters, Milford, MA)

Column:

: ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 Column, 130 Å, 1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm

Column temperature: 40°C

Sample temperature: 4°C

Injection volume: 10 μ L

Flow rate: 0.2 mL/min

Mobile phase:

Solvent A: water+0.1% formic acid

Solvent B: acetonitrile

0-20 min A:20%; B:80%

対照としては、予め熱変性させた HLM を用いることで、加水分解が酵素化学的か否かを検討した。また、カルボキシエステラーゼの特異的阻害剤である Bis(4-nitrophenyl) phosphate (BNPP)³⁾ を前処理した HLM を用いて、加水分解反応に関わる酵素がカルボキシエステラーゼか否かを検討した。

酵素的加水分解の定性的解析:

定量的解析と同様の加水分解反応を行い、生成物の m/z を UPLC-QTOFMS 解析によって検証した。

分析条件は

UPLC

カラム: CORTECS C18 (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 2.7 μ m, Waters)

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:

A/B 90/10-35/65(10min)-30/70(20min)-

20/80(30min)

流速: 0.3 mL/min

カラム温度: 40°C

UPLC/MS

機器: TripleTOF 6600 LC/MS/MS system

(AB SCIEX, MA, USA)/

イオン化: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法
positive mode

Source temperature: 550°C

gas: N₂

ion source gas 1: 50 psi; ion source gas 2: 50 psi

curtain gas: 25 psi

ion spray voltage: 5500 V

declustering potential: 80 V

Collision Energy: 10V

mass spectral range: m/z 100–650

統計解析:

3 群の統計解析は、One way ANOVA 及び post-hoc test として Dunnett's multiple comparisons test を実施した。有意水準は p<0.05 とした。

C. 結果

Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11 α -HHC および 11 β -HHC のアセチル化体を用い、HLM と 37°C でインキュベーションした時、加水分解で生成すると予想した Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11 α -HHC および 11 β -HHC 各々の合成標品と同一の保持時間にそれぞれ検出され、反応時間依存的に増加し、60 分後にはアセチル化体は殆ど残存しなかった (Figs. 3-8)。これらの反応は予め煮沸した HLM によっては起こらなかった。また、カルボキシエステラーゼ阻害剤 BNPP とプレインキュベーションした HLM を酵素源とした時は、加水分解は殆ど起こらなかった (Figs. 9-17)。

次に、酵素的加水分解生成物のマススペクトルを LC-QTOFMS によって定性分析により検証した (Fig. 18)。 Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11 α -HHC および 11 β -HHC のアセチル化体から、加水分解で生成

した主要ピークのプロトン付加分子イオンは、各々 Δ^9 -THC ($m/z=315.2319$), Δ^8 -THC ($m/z=315.2319$), 11α -HHC ($m/z=317.2745$) および 11β -HHC ($m/z=317.2745$) とそれぞれ合致した。 Δ^9 -THC のアセチル化体からは、 Δ^9 -THC 以外に微量ではあるものの複数の代謝物及び非酵素的生成物が認められた (Fig. 18). また、2種の Oxo 体 ($m/z=329.211$) と 1種の COOH 体 ($m/z=345.206$) の存在も推定された。

D. 考察

本研究では、 Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11α -HHC および 11β -HHC のアセチル化体が生体内で加水分解されるか否か検討を行った。HLM 及び対照として煮沸で酵素を失活させた HLM を用いることで、酵素化学的加水分解反応を確認した。これらは、いずれも非酵素的に一部分解するとともに、 37°C でインキュベーションした時、HLM によって酵素化学的に加水分解され、それぞれ、 Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11α -HHC および 11β -HHC になることが明らかだった。この反応は CES の特異的阻害剤 BNPP により著しく阻害されたことから、HLM に発現している CES1 と CES2 のいずれか、あるいは両方の関与が考えられた。これらのことから、現時点では規制されていない、カンナビノイド類のアセチル化体 Δ^9 -THC-O, Δ^8 -THC-O, 11α -HHC-O および 11β -HHC-O を摂取した場合、生体内で規制薬物の Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11α -HHC および 11β -HHC になることの蓋然性が担保された。

Δ^9 -THC-O, Δ^8 -THC-O, 11α -HHC-O および 11β -HHC-O の生体内で酵素化学的加水分解は、反応時間依存的であった。 Δ^9 -THC, Δ^8 -THC の構造の違いは二重結合の位置が異なるのみであるが、 Δ^8 -THC のアセチル化体の方が Δ^9 -THC-O, 11α -HHC-O および 11β -HHC-O よりも加水分解され易い傾向があった。もし、アセチル化体そのものに薬理作用が存在しないのであれば、薬理作用の発現に加水分解が必要となるため、酵素反応に時間を要する分、薬理作用の出現に遅延が

出ると推察される。本研究で用いた条件下 37°C , 60 分後にはアセチル化体は殆ど残存しなかったことから、用いる用量にもよるであろうが、比較的速度やかに脱アセチル化されると考えられる。ヘロインの例にもあるように、アセチル化体の方が脂溶性が高く脳へ分布しやすくなる可能性もある。これは、投与方法にも影響を受けるであろう。CES1 は肝臓に高発現しており、CES2 は小腸に高発現している^{2, 5)}。また、予備的検討で、ヒト血漿 (Pooled) と Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11α -HHC および 11β -HHC のアセチル化体を 37°C で 30 分間インキュベーションした結果、脱アセチル化は殆ど進まなかった (データ未掲載)。ヒトの血漿には CES1 及び CES2 は発現していないと知られているため⁵⁾、このことは、肝臓での代謝の重要性を支持する。しかし、今回の検討では、ヒト血漿で酵素的加水分解を受ける陽性対照を用いていないため、引き続き検討を行う必要がある。これらのことに鑑み、経口投与の場合には小腸や肝臓を経由するため脳に移行する前に脱アセチル化する割合が多いと推定される。

Δ^9 -THC-O, Δ^8 -THC-O, 11α -HHC-O および 11β -HHC-O の *in vitro* 代謝物としての Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11α -HHC および 11β -HHC の生成は、上述の UPLC による標準品との保持時間の一致での検証だけでなく、LC-QTOFMS でも検証した。この検出方法では、他の代謝物も検出し得るが、本研究では、pooled HLM を酵素源に用いており、これは調製の過程で washing を経ていると推定される。従って、HLM に発現している薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (P450) による酸化反応に必要な補酵素 NADPH や UDP-グルクロン酸転移酵素の補酵素 UDP-グルクロン酸がほとんど含まれていないと考えるのが妥当である。これを裏付けるように、LC-QTOFMS では、確認されたのは脱アセチル化体の生成が主要な反応である (Fig. 18)。唯一、 Δ^9 -THC-O では、脱アセチル化によって生成した Δ^9 -THC とともに、僅かに、2種の Oxo 体 ($m/z=329.211$) と 1種の COOH 体

(m/z=345.206)と推測される化合物が生成していた。また、僅かではあるが非酵素的な分解物生成しており、 Δ^9 -THC-O では、 Δ^8 -THC-O、 11α -HHC-O および 11β -HHC-O より明白だった。 Δ^9 -THCは Δ^8 -THCよりも化学的に不安定だと言われており^{7, 8)}、そのことを支持する結果と考えられた。また、外から補酵素を加えない条件であったことから、代謝には内在性の補酵素が利用されたと考えられ、 Δ^9 -THCの方が Δ^8 -THCより酸化的代謝を受け易いと推定される。

実際の生体内では、細胞質の酵素や補酵素も存在することを考慮すると、本研究は、特に脱アセチル化反応に着目して検証したものと言える。CES1及びCES2の関与については、今後、組換え酵素発現マイクロゾームを用いた検討を行うことが望ましい。それにより、関与する分子種を特定するとともに、小腸の関与についても考察ができる。脱アセチル化後は、脳に分布するだけでなく、P450による酸化やUDP-グルクロン酸転移酵素による抱合など様々な代謝を受けると推定される。それらの過程は、規制薬物 Δ^9 -THC、 Δ^8 -THC、 11α -HHC および 11β -HHC自身の代謝である。 Δ^9 -THCの9位の二重結合は酸により容易に8位に移動し、 Δ^8 -THCとなる^{7, 8)}。これの方が安定であるため、特に Δ^8 -THCでは代謝研究が進んでいる。また、 Δ^9 -THCでも類似の代謝が起こると報告されている⁷⁻⁹⁾。さらに、9位に結合した11位のメチル基は酵素的酸化を受けやすく、P450によってカルボン酸体が生成することも分かっている¹⁰⁾。カルボン酸体はグルクロン酸抱合を受けると考えられる^{9, 11)}。今後、 11α -HHC および 11β -HHCについては更なる代謝物の確認も必要と思われるが、脱アセチル化反応が速やかであるため、脱アセチル化により生成する Δ^9 -THC及び Δ^8 -THCの代謝様式は概ね既知のものと同じと考えることは問題ないと思われる。本研究では、加水分解による規制薬物 Δ^9 -THC、 Δ^8 -THC、 11α -HHC および 11β -HHCの生成の蓋然性が担保できた点で所期の目的を果たせたと考える。

E. 結論

Δ^9 -THC、 Δ^8 -THC、 11α -HHC および 11β -HHCのアセチル化体は、生体内で酵素化学的加水分解を受け、規制薬物 Δ^9 -THC、 Δ^8 -THC、 11α -HHC および 11β -HHCを生成すると考えられる。

これらの反応には、少なくともHLMのカルボキシエステラーゼが関与することが示唆された。

F. 参考文献

- 1) Potter PM, Wadkins RM: Carboxylesterases-- detoxifying enzymes and targets for drug therapy. *Curr Med Chem.* 2006; 13(9): 1045-1054.
- 2) Satoh T, Hosokawa M: The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:257-288.
- 3) Satoh T, Hosokawa M, Atsumi R, Suzuki W, Hakusui H, Nagai E: Metabolic activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin, a novel antitumor agent, by carboxylesterase. *Biol Pharm Bull.* 1994;17(5):662-664.
- 4) Toffoli G, Cecchin E, Corona G, Boiocchi M: Pharmacogenetics of irinotecan. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2003;3(3):225-237.
- 5) 今井輝子: カルボキシルエステラーゼ研究の現状とプロドラッグ体内動態の予測. *薬剂学*, 2011;71:198-206.
- 6) Holmes RS, Cox LA, Vandenberg JL: A new class of mammalian carboxylesterase CES6. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 2009;4(3):209-217.
- 7) 山本 郁男, 吉村 英敏: 大麻成分の代謝と薬理作用. *衛生化学*. 1982;28(5):233-248.
- 8) 山本 郁男: 大麻主成分の代謝と薬理-毒性. *薬学雑誌*. 1986;106(7):537-561.
- 9) White RM: Cannabidiol and Δ^8 -Tetrahydrocannabinol: Cannabinoids of

Rising Interest and Concern. *Forensic Sci Rev.*
2023;35:27-45.

- 10) Watanabe K, Narimatsu S, Yamamoto I,
Yoshimura H: Oxygenation mechanism in
conversion of aldehyde to carboxylic acid
catalyzed by a cytochrome P-450 isozyme. *J
Biol Chem.* 1991;266(5):2709-2711
- 11) Bianchi V, Donzelli G: Rapid reversed-phase
high-performance liquid chromatographic
method for the assay of urinary 11-nor-delta
9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid and
confirmation of use of cannabis derivatives. *J
Chromatogr B Biomed Appl.* 1996; 675(1):
162-167.

G. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
学会発表

- 1) Jorge Carlos Pineda Garcia, 趙 爽利、李 任
時、花尻 瑠理、出水庸介、田中嘉孝、石井
祐次: Δ^9 -THC-acetate および Δ^8 -THC-acetate
のヒト肝臓ミクロゾームによる酵素化学的加水
分解と Δ^9 -THC および Δ^8 -THC 生成. 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

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

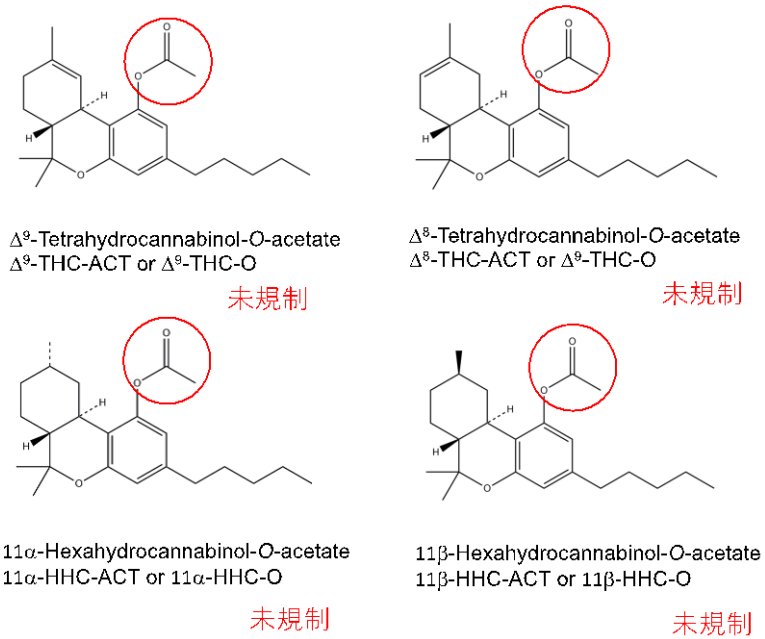


Fig. 1 *In vitro* での加水分解反応の検討を行う対象化合物

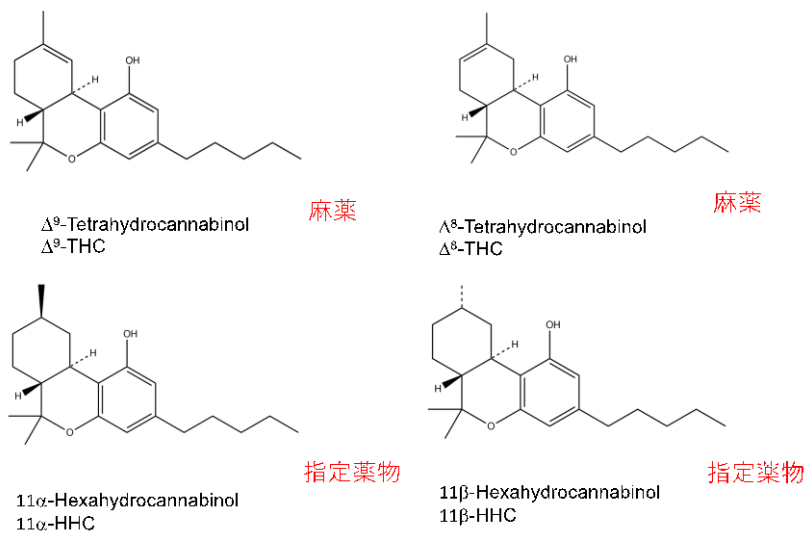


Fig. 2 Δ⁹-THC-ACT, Δ⁸-THC-ACT, 11α-HHC-ACT 及び 11β-HHC-ACT の *in vitro* での酵素化学的加水分解反応で生成することが予想される物質

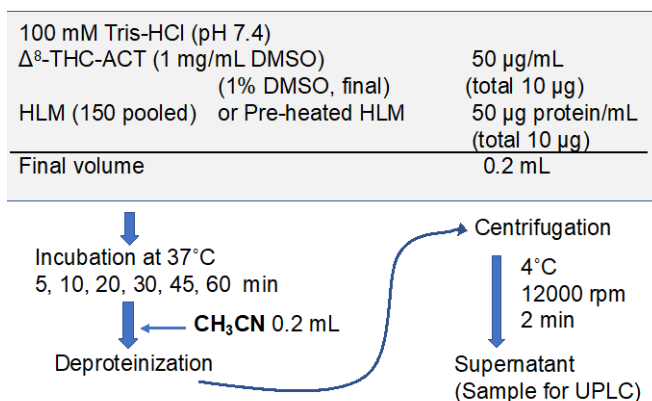


Fig. 3. HLM を酵素源とした酵素化学的加水分解反応
反応条件: Δ^8 -THC-ACT を例として

Equipment
: ACQUITY UPLC H-Class (Waters, Milford, MA)
Column:
: ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 Column,
130 Å, 1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm
Column temperature: 40°C
Sample temperature: 4°C
Injection volume: 10 μ L
Flow rate : 0.2 mL/min
Mobile phase :
Solvent A: water+0.1% formic acid
Solvent B: acetonitrile
0-20 min A: 20%; B:80%

Fig. 4. UPLC における分析条件

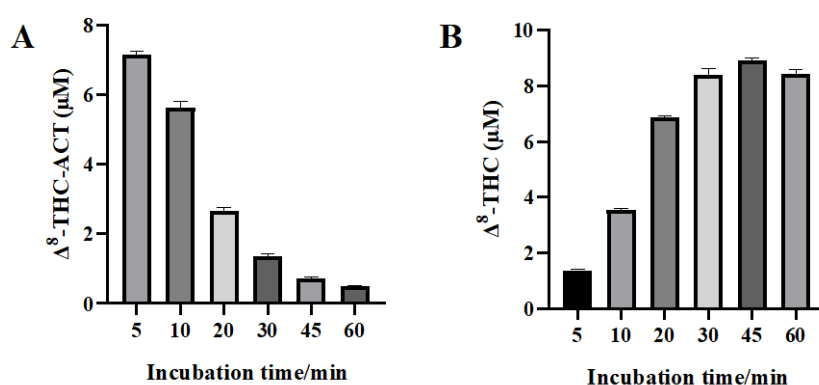


Fig. 5. Time course of Δ^8 -THC-ACT metabolism and Δ^8 -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM). HLM were incubated with Δ^8 -THC-ACT with a incubator at 37°C. (A) Δ^8 -THC-ACT metabolism and (B) Δ^8 -THC formation were determined. Drug concentrations were determined using UPLC photodiode array detection at 211 nm. Each bar represents the mean \pm SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay.

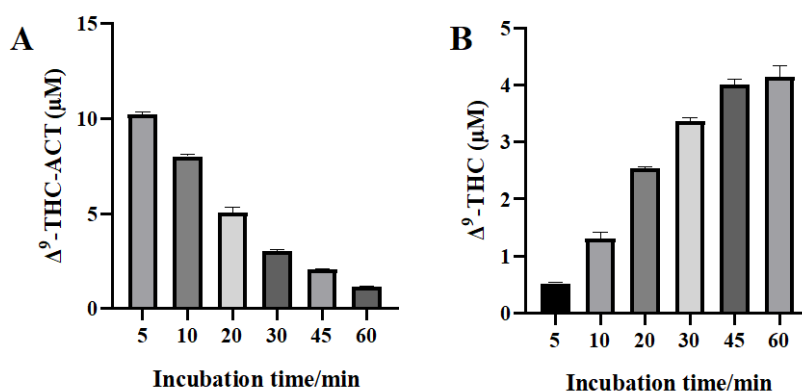


Fig. 6. Time course of Δ^9 -THC-ACT metabolism and Δ^9 -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM). HLM were incubated with Δ^9 -THC-ACT with a incubator at 37°C. (A) Δ^9 -THC-ACT metabolism and (B) Δ^9 -THC formation were determined. Drug concentrations were determined using UPLC photodiode array detection at 211 nm. Each bar represents the mean \pm SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay.

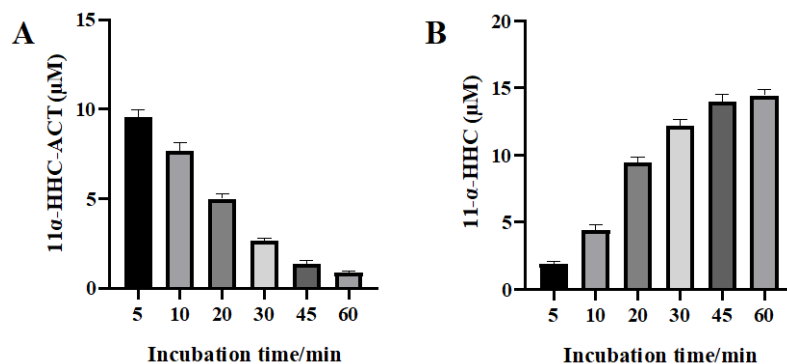


Fig. 7. Time course of 11 α -HHC-ACT metabolism and 11 α -HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM). HLM were incubated with 11 α -HHC-ACT with a incubator at 37°C. (A) 11 α -HHC-ACT metabolism and (B) 11 α -HHC formation were determined. Drug concentrations were determined using UPLC photodiode array detection at 211 nm. Each bar represents the mean \pm SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay.

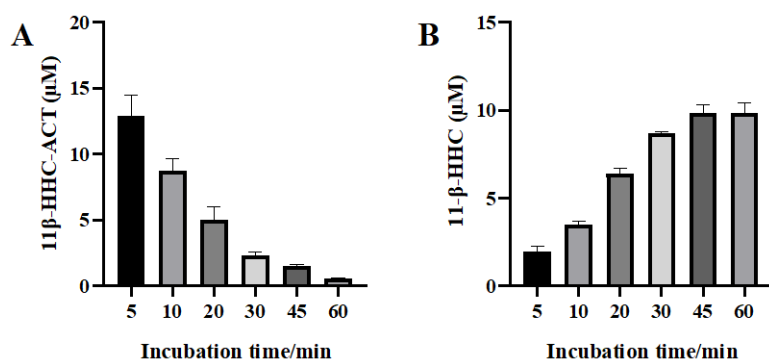


Fig. 8. Time course of 11β-HHC-ACT metabolism and 11β-HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM). HLM were incubated with 11β-HHC-ACT with a incubator at 37°C. (A) 11β-HHC-ACT metabolism and (B) 11β-HHC formation were determined. Drug concentrations were determined using UPLC photodiode array detection at 211 nm. Each bar represents the mean ± SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay.

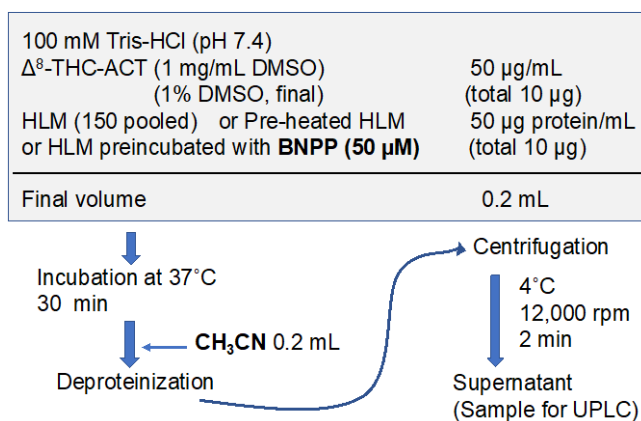


Fig. 9. HLM を酵素源とした酵素化学的加水分解反応: CES 阻害剤 BNPP の影響
反応条件: Δ⁸-THC-ACT を例として. HLM は, 100 μM BNPP と 10 min preincubation (final 50 μM).

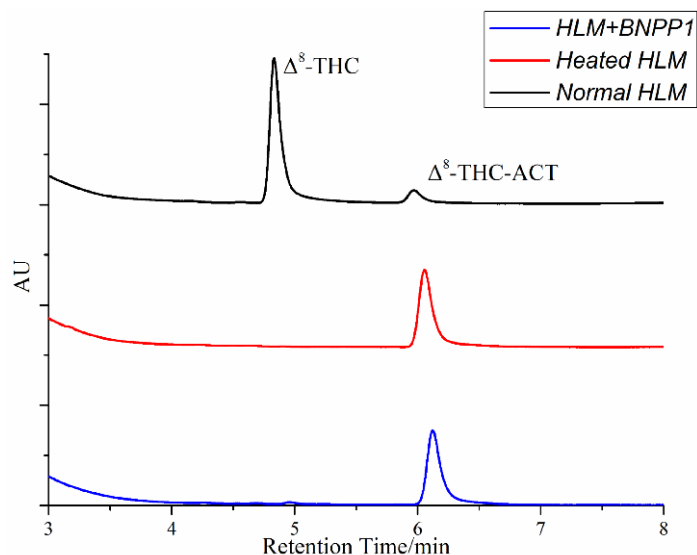


Fig. 10. UPLC-chromatogram of Δ^8 -THC-ACT metabolism and Δ^8 -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM): effect of BNPP. HLM were incubated with Δ^8 -THC-ACT with at 37°C for 30 min. (Blue line) HLM-preincubated with BNPP; (Redline) HLM-preheated; (Black line) normal HLM. UPLC photodiode array detection at 211 nm. One of the representative data of triplicate assay is shown. Details are shown in Fig. 9.

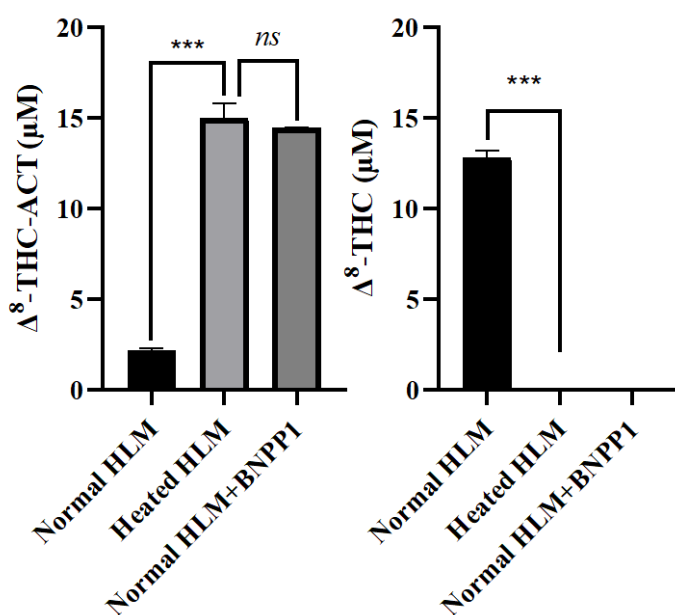


Fig. 11. Effect of carboxylesterase inhibitor BNPP on Δ^8 -THC-ACT metabolism and Δ^8 -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM). HLM were incubated with Δ^8 -THC-ACT at 37°C for 30 min. Comparison was made among normal HLM, that preincubated with BNPP and heated HLM. Concentration of Δ^8 -THC-ACT and Δ^8 -THC were determined. Each bar represents the mean \pm SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay. Significantly different from heated HLM: *** $P < 0.001$

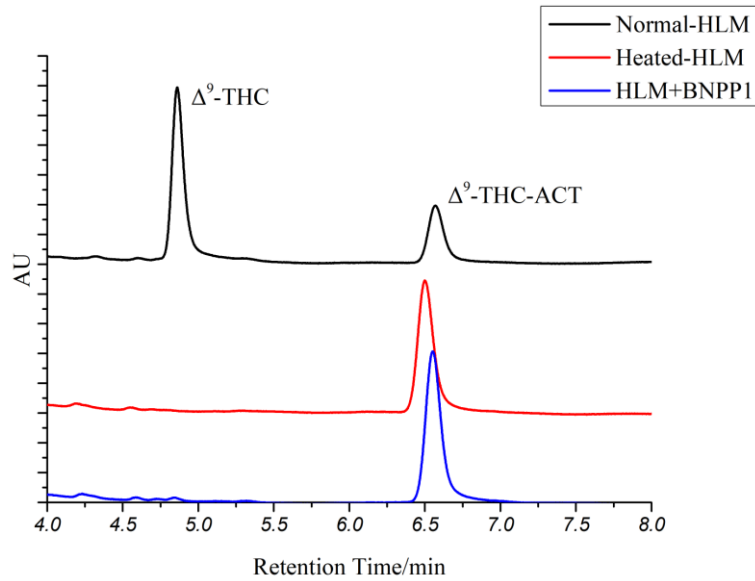


Fig. 12. UPLC-chromatogram of Δ^9 -THC-ACT metabolism and Δ^9 -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM): effect of BNPP. HLM were incubated with Δ^9 -THC-ACT at 37°C for 30 min. (Blue line) HLM-preincubated with BNPP; (Redline) HLM-preheated; (Black line) normal HLM. UPLC photodiode array detection at 211 nm. One of the representative data of triplicate assay is shown. Details are shown in Fig. 9.

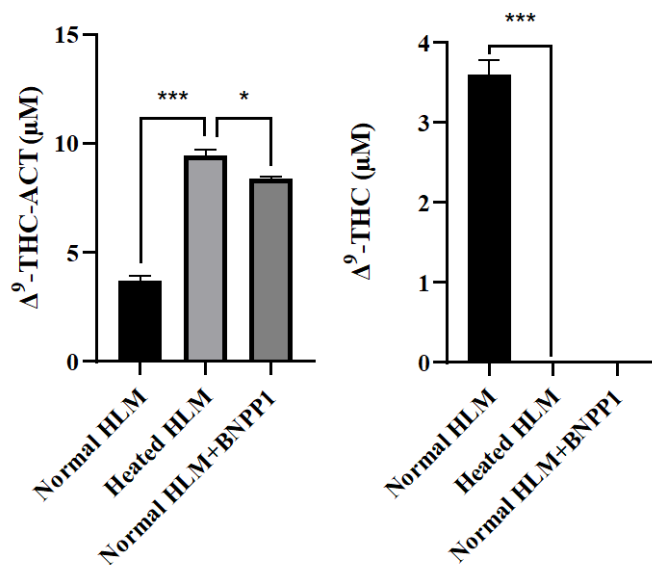


Fig. 13. Effect of carboxylesterase inhibitor BNPP on Δ^9 -THC-ACT metabolism and Δ^9 -THC formation with pooled human liver microsomes (HLM) HLM were incubated with Δ^9 -THC-ACT at 37°C for 30 min. Comparison was made among normal HLM, that preincubated with BNPP and heated HLM. Concentration of Δ^9 -THC-ACT and Δ^9 -THC were determined. Each bar represents the mean \pm SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay. Significantly different from heated HLM: *** $P < 0.001$

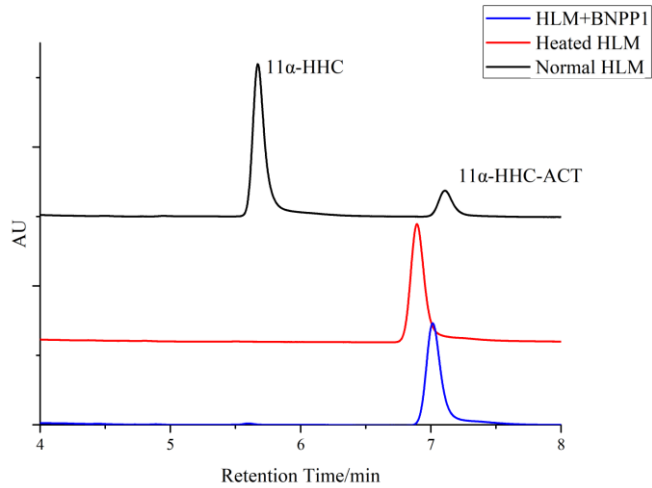


Fig. 14. UPLC-chromatogram of 11α -HHC-ACT metabolism and 11α -HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM): effect of BNPP. HLM were incubated with 11α -HHC-ACT at 37°C for 30 min. (Blue line) HLM-preincubated with BNPP; (Redline) HLM-preheated; (Black line) normal HLM. UPLC photodiode array detection at 211 nm. One of the representative data of triplicate assay is shown. Details are shown in Fig. 9.

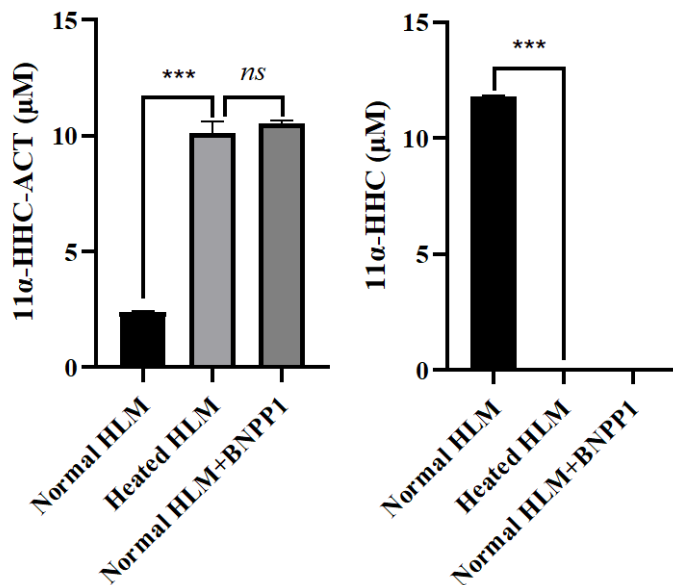


Fig. 15. Effect of carboxylesterase inhibitor BNPP on 11α -HHC-ACT metabolism and 11α -HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM) HLM were incubated with 11α -HHC-ACT at 37°C for 30 min. Comparison was made among normal HLM, that preincubated with BNPP and heated HLM. Concentration of 11α -HHC-ACT and 11α -HHC were determined. Each bar represents the mean \pm SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay. Significantly different from heated HLM: *** $P < 0.001$

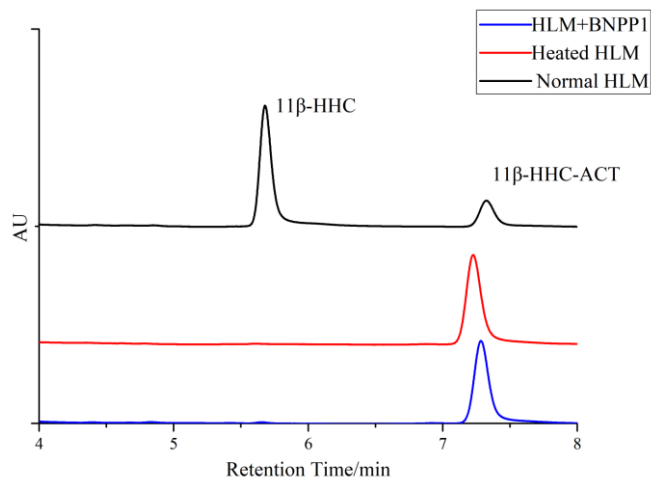


Fig. 16. UPLC-chromatogram of 11β-HHC-ACT metabolism and 11β-HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM): effect of BNPP. HLM were incubated with 11β-HHC-ACT at 37°C for 30 min. (Blue line) HLM-preincubated with BNPP; (Redline) HLM-preheated; (Black line) normal HLM. UPLC photodiode array detection at 211 nm. One of the representative data of triplicate assay is shown. Details are shown in Fig. 9.

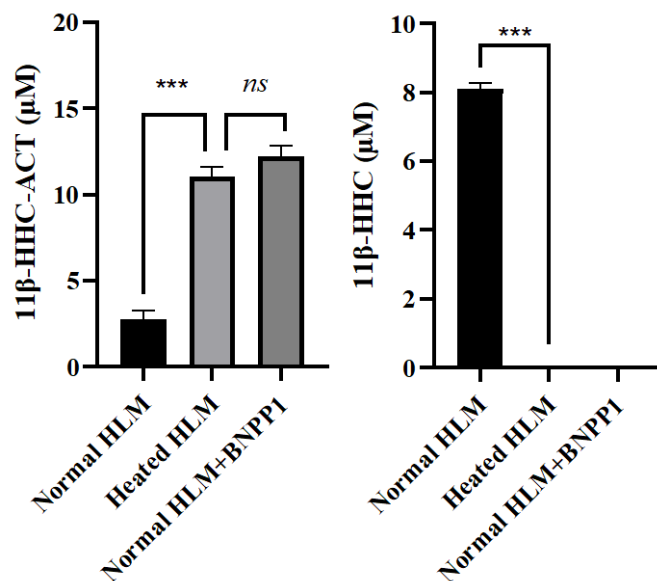


Fig. 17. Effect of carboxylesterase inhibitor BNPP on 11β-HHC-ACT metabolism and 11β-HHC formation with pooled human liver microsomes (HLM) HLM were incubated with 11β-HHC-ACT at 37°C for 30 min. Comparison was made among normal HLM, that preincubated with BNPP and heated HLM. Concentration of 11β-HHC-ACT and 11β-HHC were determined. Each bar represents the mean ± SE of the mean (S.E.M) of duplicate analysis of triplicate assay. Significantly different from heated HLM: *** P<0.001

Fig. 18 Δ^9 -THC-acetate, Δ^8 -THC-acetate, 11α -HHC-acetate 及び 11β -HHC-acetate の HLM による酵素化学的加水分解: UPLC-QTOFMS による定性分析

1. 測定条件

UPLC

カラム: CORTECS C18 (2.1 mm i.d. x 150 mm, 2.7 μ m, Waters)

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: A/B 90/10-35/65(10min)-30/70(20min)-20/80(30min)

流速: 0.3 mL/min

カラム温度: 40°C

UPLC/MS

機器: TripleTOF 6600 LC/MS/MS system (AB SCIEX, MA, USA)/

イオン化: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

positive mode

Source temperature: 550°C

gas: N₂

ion source gas 1: 50 psi; ion source gas 2: 50 psi

curtain gas: 25 psi

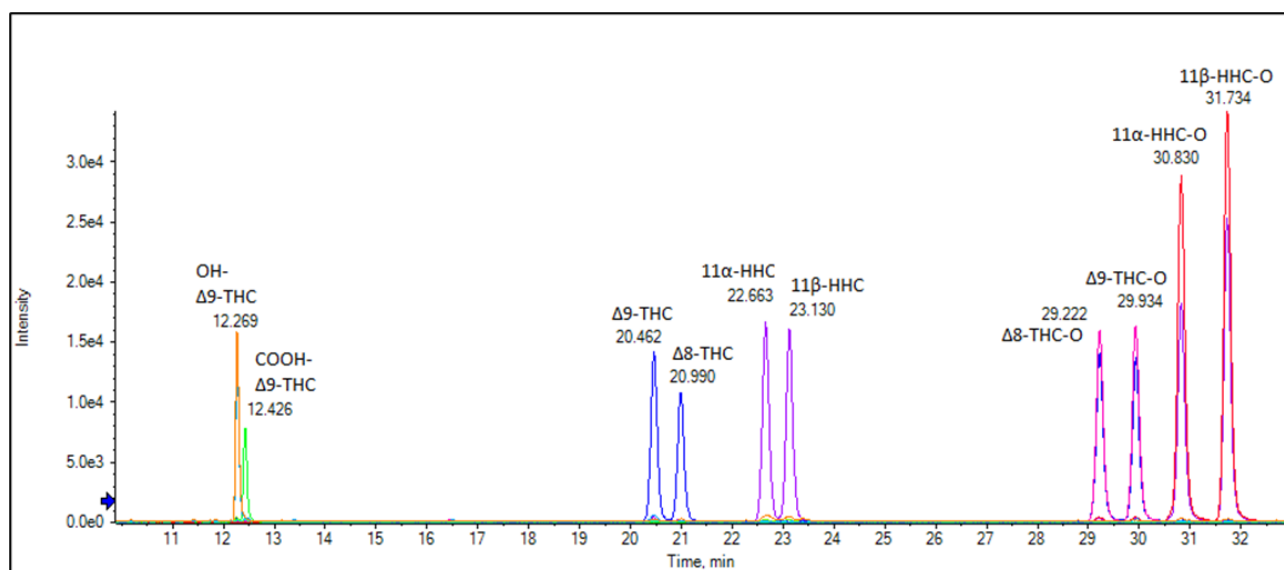
ion spray voltage: 5500 V

declustering potential: 80 V

Collision Energy: 10V

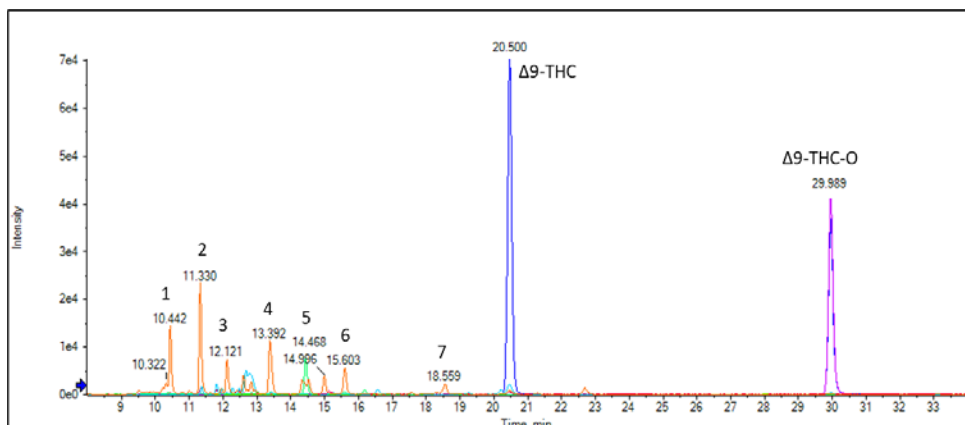
mass spectral range: m/z 100–650

2. 標準溶液 (10 化合物混合溶液 50 ng/mL)

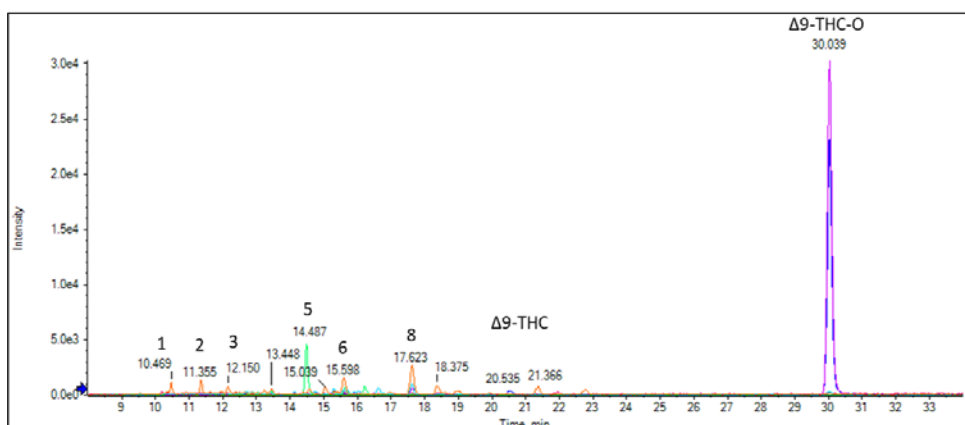


3. 試料測定

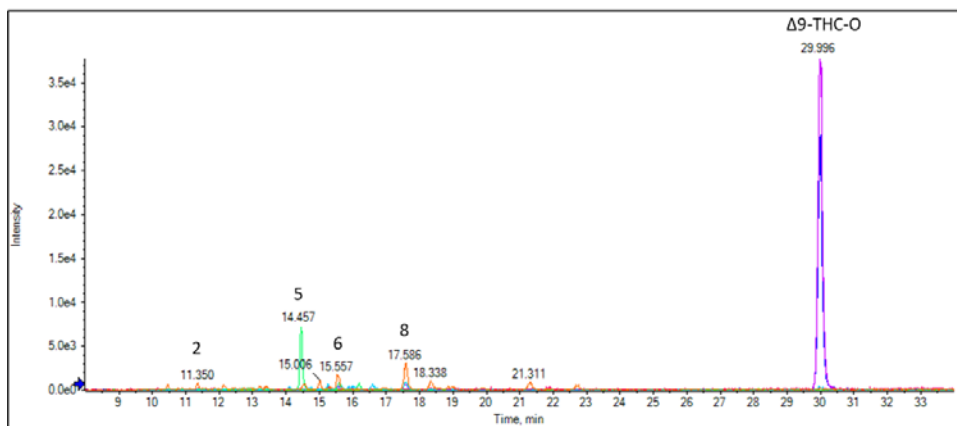
① delta9-THC-O 反応溶液 (代表1例: Fig. 13 参照)



② delta9-THC-O + BNPP 前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 13 参照)



③ delta9-THC-O + 加熱タンパク変性前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 13 参照)



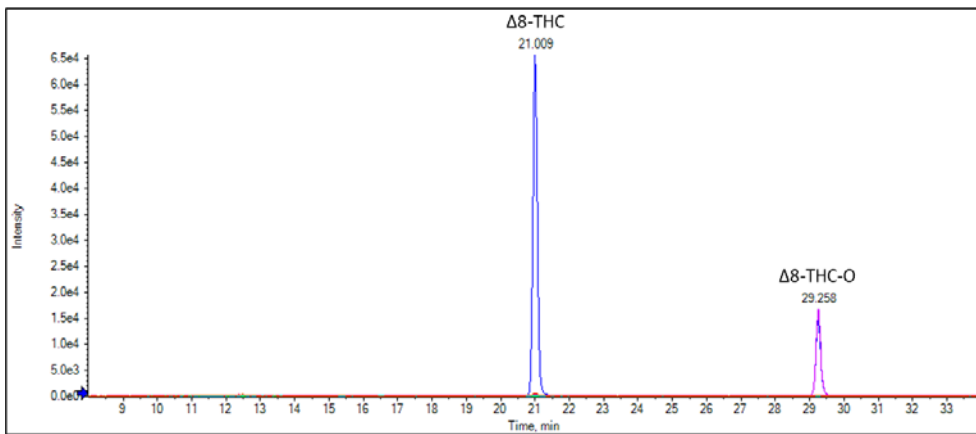
XIC モニターイオン (delta9 and delta8-THC-O)

No.	m/z	Compound
1	315.2319	THC
2	357.2424	THC-O
3	331.2268	OH-THC
4	329.2111	oxo-THC
5	349.2373	diOH-HHC
6	345.206	COOH-THC
7	313.2162	OH-THCのフラグメントイオン

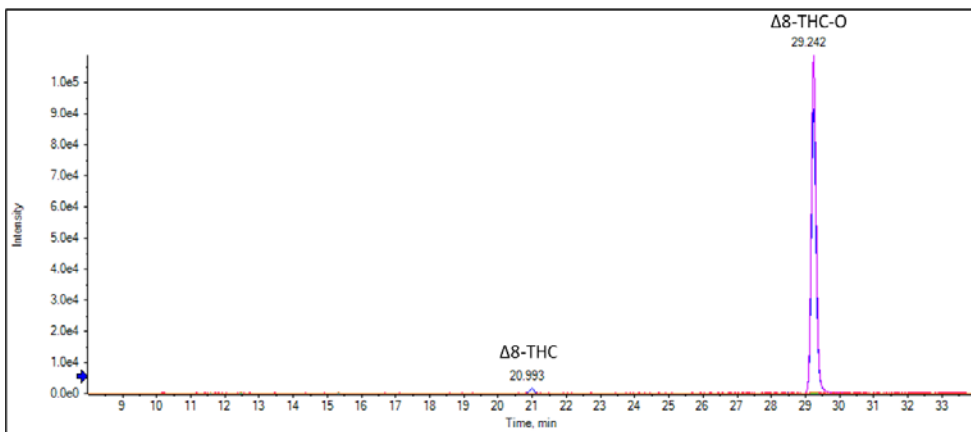
各ピークの TOFMS による推定組成式

Peak No	Formula	m/z	mDa
1	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	329.2111	0.2
2	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	347.2217	0.1
3	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	347.2217	-1
4	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	329.2111	0.4
5	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	345.206	0.2
6	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	329.2111	-0.6
7	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	329.2111	0.1
8	C ₂₃ H ₃₀ O ₄	371.2217	-0.2

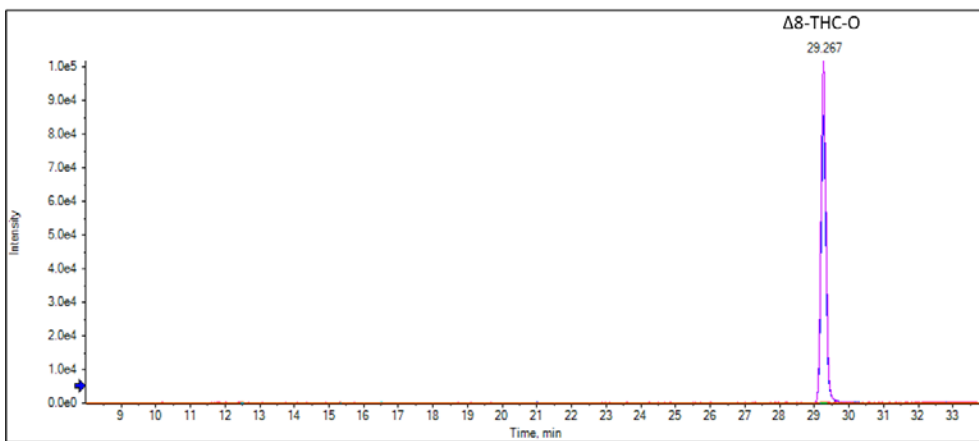
① Δ^8 -THC-O 反応溶液 (代表1例: Fig. 11 参照)



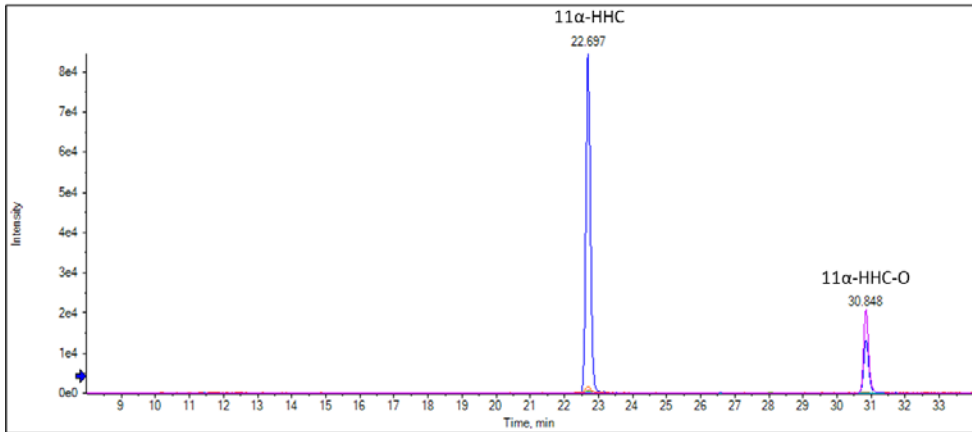
② Δ^8 -THC-O+BNPP 前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 11 参照)



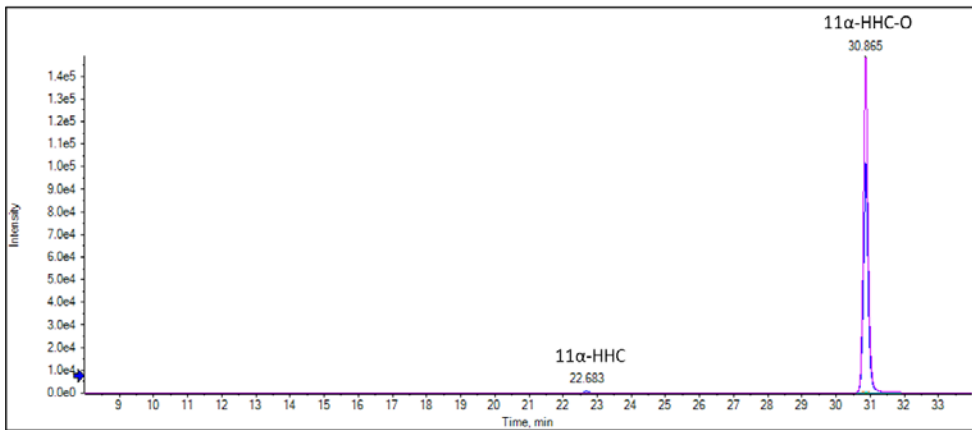
③ Δ^8 -THC-O+加熱タンパク変性前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 11 参照)



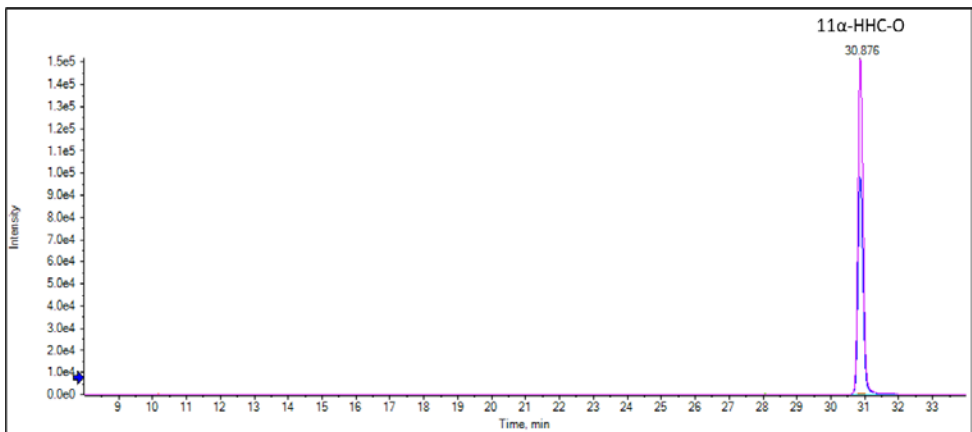
① 11 α -HHC-O 反応溶液 (代表1例: Fig. 15 参照)



② 11 α -HHC-O+BNPP 前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 15 参照)



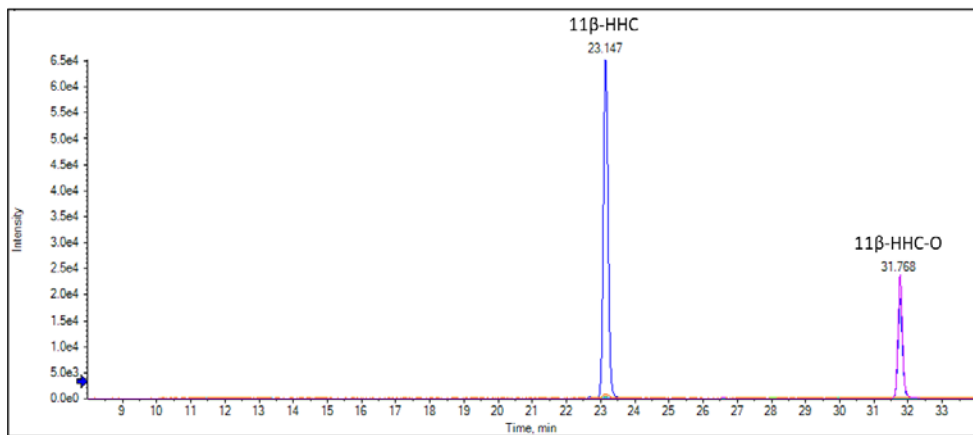
③ 11 α -HHC-O+加熱タンパク変性前処理 反応溶液(代表1例: Fig. 15 参照)



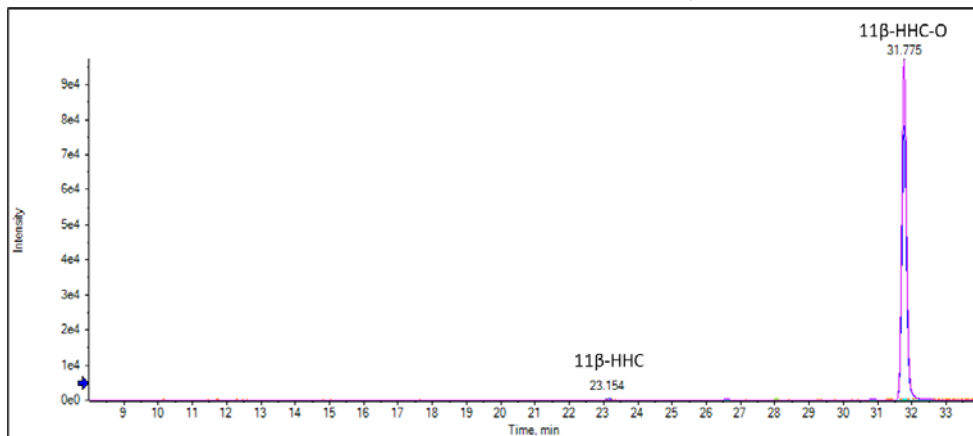
XIC モニターイオン(11 α -HHC-O and 11 β -HHC-O)

No.	m/z	Compound
1	317.2475	HHC
2	359.2581	HHC-O
3	333.2424	OH-HHC
4	331.2268	oxo-HHC
5	349.2373	diOH-HHC
6	347.2217	COOH-HHC
7	315.2319	OH-HHCのフラグメントイオン

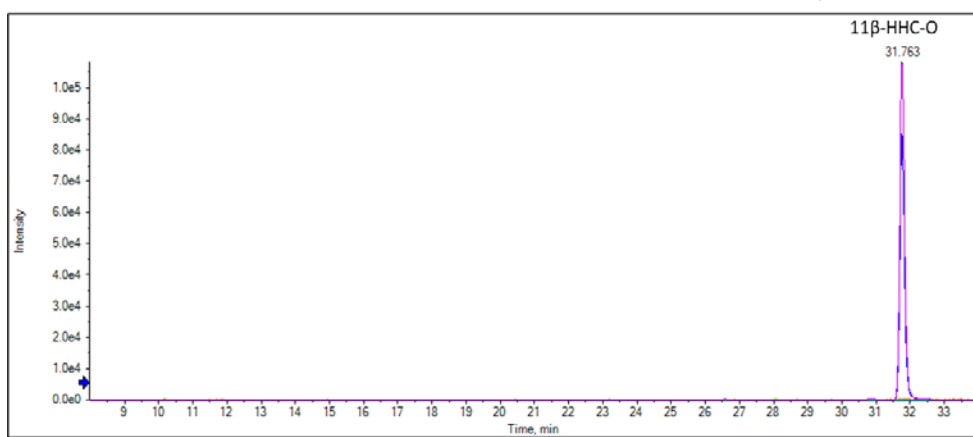
① 11 β -HHC-O 反応溶液 (代表1例: Fig. 17 参照)



② 11 β -HHC-O+BNPP 前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 17 参照)



③ 11 β -HHC-O+加熱タンパク変性前処理 反応溶液 (代表1例: Fig. 17 参照)



分担研究課題:植物成分由来危険ドラッグの行動薬理特性の検討

研究分担者:船田正彦 湘南医療大学薬学部薬理学教室 教授

研究要旨:本研究では、大麻成分の化学構造に類似した半合成カンナビノイドである Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate について、運動活性に対する影響とカンナビノイド受容体作用の有無を検討した。1) 行動薬理的解析: Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate による運動活性および体温に対する影響を検討した。 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate により、カタレプシー様の無動状態が引き起こされた。同様に、体温下降作用の発現が確認された。これら効果は、カンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置によって抑制された。無動状態および体温下降の発現には、カンナビノイド CB_1 受容体が関与することが明らかになった。2) CB_1 受容体作用: ヒト CB_1 受容体発現細胞株 CHO- CB_1 細胞により解析した。 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC 及び 11β -HHC-O-acetate の添加により細胞内 Ca^{2+} が増加し、この効果は CB_1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。陽性対象薬である CP-55,940 と比較して弱い効果ではあったが、 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC 及び 11β -HHC-O-acetate は CB_1 受容体作用を有していることが確認された。 11α -HHC-O-acetate のみ有意な受容体活性化は認められなかったが、動物実験において薬理作用の発現を認めることから、その活性には生体内における代謝の関与が示唆された。

本研究により、 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate を摂取した場合に認められる薬理作用には、 CB_1 受容体が関与していると考えられる。本解析結果から、これらの化合物を乱用することにより健康被害の発生が危惧される。 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11α -HHC, 11β -HHC, 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate は適切な法規制を施す必要があると考えられる。

研究協力者

富山県一 国立精神・神経医療研究センター精神
保健研究所薬物依存研究部 室長

A. 研究目的

Hemp から抽出されるカンナビノイドを利用して合成される Hexahydrocannabinol (HHC) などの半合成カンナビノイド (Semi-synthetic

cannabinoid) が乱用され、健康被害の発生が懸念されている¹⁾。米国では、新たに tetrahydrocannabinol (THC) のアセチル化体である Δ^9 -THC-O-acetate や Δ^8 -THC-O-acetate を含む製品の流通が確認されている²⁾。我が国でも半合成カンナビノイドの流通拡大が懸念されるが、これらの薬理作用は不明な点が多い。

そこで、本研究では Δ^9 -THC-O-acetate,

Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate の行動薬理学的特性を明確にする目的で, 1) 行動薬理学的特性, 2) カンナビノイド受容体作用について検討を行った.

B. 研究方法

使用動物: すべての行動薬理実験には, ICR 系雄性マウス (Jcl, 20 - 25g, 日本クレア) を使用した. 本動物実験は, 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センターの動物実験倫理問題検討委員会により承認された動物実験計画書に従って実施した.

使用薬物: Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate を使用した (国立医薬品食品衛生研究所より提供). 合成カンナビノイド CP-55,940 (Tocris Bioscience), カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬として AM251 (Tocris Bioscience), カンナビノイド CB₂ 受容体拮抗薬として AM630 (Tocris Bioscience) を使用した.

1. 運動活性及び体温に対する影響

Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate, 11 β -HHC-O-acetate 及び陽性対象として CP-55,940 により誘発される無動状態は, バートテストにより測定した. 直腸体温は, デジタル温度計 (SANWA, TH3 型) を用いて測定した. 対照群は溶媒である 10% DMSO 含有生理食塩液を投与した. それぞれの測定は, 薬物もしくは溶媒投与後の 180 分間行った.

カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 (3 mg/kg, i.p.) は, Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate 投与の 15 分前に処置した.

2. カンナビノイド受容体作用の解析

Chinese Hamster Ovary (CHO) チャイニーズハムスター卵巣細胞にヒト CB₁ 受容体をトランスフェクションし, 発現安定細胞株 CHO-CB₁ 細胞を確立した. この細胞を使用して, 細胞内カルシウム濃度を測定した. 96 穴ブラックプレート (Greiner) に 5×10^4 cells/well と なるように播種し, 37°C · 5.0% CO₂ 条件下で培養した. 24 時間後, Fluo-4 を 1 時間取り込ませ, Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate, 11 β -HHC-O-acetate 及び陽性対象として CP-55,940 添加による蛍光強度の変化を, Flexstation II により測定した. データは蛍光強度 (Relative Fluorescence Units, RFU) として解析した.

C. 結果

1. 運動活性及び体温に対する影響

Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate は, それぞれ 20 mg/kg の投与により, カタレプシー様無動状態及び直腸体温の下降が ICR マウスにおいて観察された (Fig. 1A-L). 一方で, カンナビノイド CB₁ 受容体の強力な作用薬である CP-55,940 は, 1mg/kg の投与によってカタレプシー様無動状態及び直腸体温の下降が発現した (Fig. 1M-N). 続いて, それぞれの化合物について CB₁ 受容体の関与を調べるために, CB₁ 受容体拮抗薬である AM251 を前処置の影響を検討した. Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 β -HHC 及び 11 β -HHC-O-acetate (20 mg/kg) の投与 90 分後および 11 α -HHC 及び 11 α -HHC-O-acetate (20 mg/kg) の投与 180 分後において, カタレプシー様無動状態および体温下降はカンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 (3 mg/kg) の前処置により, 有意に抑制された (Fig. 2A-L).

2.カンナビノイド受容体作用の解析

CHO-CB₁ 細胞を利用して、 Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate, 11 β -HHC-O-acetate 及び CP-55,940 のカンナビノイド CB₁ 受容体に対する作用を検討した. 陽性対象である CP-55,940 の EC₅₀ は 7.42×10^{-7} M であった (Fig. 3A). 一方で, Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC 及び 11 β -HHC-O-acetate は 40 μ M で有意な蛍光の増加が認められた (Fig. 3B). 11 α -HHC-O-acetate については, 本試験濃度では, 有意な増加は認められなかった. CB₁ 受容体に対する Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC 及び 11 β -HHC-O-acetate の有意な活性作用は, カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 (10 μ M) の前処置により完全に抑制された. 一方, CB₂ 受容体拮抗薬 AM630 ではいずれの化合物においても抑制作用が認められなかった (Fig. 4).

D. 考察

本研究では, 大麻成分の化学構造に類似した 6 種類の半合成カンナビノイドである Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate の行動薬理学的特性およびカンナビノイド受容体作用について検討した.

動物を用いた実験では, Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate の行動薬理学的特性を解析した. Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate の投与によって, カタレプシー様無動状態および体温下降が発現した. 同様に, 6 種類の半合成カンナビノイドの薬理作用は, CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 で抑制されることから, カンナビノイド CB₁ 受容体を介して発現することが確認された. 一方, 陽性対象である合成カンナビノ

イドの CP55,940 は, これら 6 種類の半合成カンナビノイドと比較して, 低用量で有意なカタレプシー様無動状態および体温下降が発現した. したがって, 今回評価を行った半合成カンナビノイドの薬理作用の発現強度は, 既存の合成カンナビノイドと比較して弱いと考えられる.

細胞実験では, CHO-CB₁ 細胞を利用して, カンナビノイド CB₁ 受容体に対する作用を検討した. Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC 及び 11 β -HHC-O-acetate の添加により, 蛍光強度は有意に増加した. また, これらの効果は, カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制され, CB₁ 受容体に対する活性作用が確認された. 一方, これらの半合成カンナビノイドの活性強度は, 陽性対象である CP-55,940 と比較すると弱いものであった.

細胞実験において, 11 α -HHC-O-acetate は高濃度の添加において, 蛍光強度が増加する傾向は認められたものの, 有意な受容体活性化は認められなかった. 本研究では, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 α -HHC は動物試験において, 薬理作用の発現が確認された. したがって, 11 α -HHC-O-acetate は脱アセチル化等の代謝の影響を受け, 11 α -HHC に変換されると想定され, 代謝物も薬理作用の発現に関わる可能性が示唆された. 以上の結果から, Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate 及び 11 β -HHC-O-acetate は, CB₁ 受容体を介して作用が発現するものと考えられる.

Hemp から抽出されるカンナビノイドを利用した半合成カンナビノイド自体の生体に対する影響については, まだよくわかっていない. 一方, こうした化合物は使用方法によって有害な作用を引き起こす可能性が指摘されている. 近年, THC またはニコチンを含有する電子タバコの使用によって肺損傷の発生が報告され

ている³⁾。これらの患者の多くは、回収された気管支肺胞洗浄液からビタミン E アセテートが検出されている。ビタミン E アセテートは加熱により、ケテンが生成される可能性があり、ケテンによって肺が損傷される可能性が指摘されている³⁾。 Δ^8 -THC-O-acetate などカンナビノイドのアセチル化体は、ビタミン E アセテートと類似の構造を含み、加熱吸引条件下でケテンの生成が報告されている⁴⁾。したがって、新たに登場する半合成カンナビノイドの乱用は、予期せぬ健康被害を引き起こす可能性がある。こうした半合成カンナビノイド自体の健康被害については、継続してモニタリングしていくことが必要である。

本研究により、 Δ^9 -THC-O-acetate、 Δ^8 -THC-O-acetate、 11α -HHC、 11β -HHC、 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate を摂取した場合に認められる薬理作用には、 CB_1 受容体が関与していると考えられる。

E. 結論

大麻成分を利用した半合成カンナビノイド Δ^9 -THC-O-acetate、 Δ^8 -THC-O-acetate、 11α -HHC、 11β -HHC、 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate の行動薬理学特性を検討した。本研究から、 Δ^9 -THC-O-acetate、 Δ^8 -THC-O-acetate、 11α -HHC、 11β -HHC、 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate は CB_1 受容体作用薬としての特性を有することが明らかになったことから、その乱用により健康被害発生の危険性が高く、適切な規制を行う必要があると考えられる。

F. 参考文献

- 1) EMCDDA technical expert meeting on hexahydrocannabinol (HHC) and related cannabinoids.
https://www.emcdda.europa.eu/news/2022/emcdda-technical-expert-meeting-hexahydrocannabinol-hhc-and-related-cannabinoids_en. (Last accessed: February 6, 2023)

- 2) Alaina K Holt, Justin L Poklis, Michelle R Peace: Δ^8 -THC, THC-O Acetates and CBD-di-O Acetate: Emerging Synthetic Cannabinoids Found in Commercially Sold Plant Material and Gummy Edibles. *J Anal Toxicol.* 2022;6(8):940-948.
- 3) Blount BC, Karwowski MP, Shields PG, Morel-Espinosa M, Valentin-Blasini L, Gardner M, Braselton M, Brosius CR, Caron KT, Chambers D, Corstvet J, Cowan E, De Jesús VR, Espinosa P, Fernandez C, Holder C, Kuklennyik Z, Kusovschi JD, Newman C, Reis GB, Rees J, Reese C, Silva L, Seyler T, Song MA, Sosnoff C, Spitzer CR, Tevis D, Wang L, Watson C, Wewers MD, Xia B, Heitkemper DT, Ghinai I, Layden J, Briss P, King BA, Delaney LJ, Jones CM, Baldwin GT, Patel A, Meaney-Delman D, Rose D, Krishnasamy V, Barr JR, Thomas J, Pirkle JL: Vitamin E Acetate in Bronchoalveolar-Lavage Fluid Associated with EVALI. *N Engl J Med.* 2020; 382(8):697-705.
- 4) Kaelas R Munger, Robert P Jensen, Robert M Strongin: Vaping Cannabinoid Acetates Leads to Ketene Formation. *Chem Res Toxicol.* 2022; 35(7):1202-1205.

G. 健康危険情報

本研究成果は、大麻成分を利用した半合成カンナビノイド Δ^9 -THC-O-acetate、 Δ^8 -THC-O-acetate、 11α -HHC、 11β -HHC、 11α -HHC-O-acetate 及び 11β -HHC-O-acetate の行動薬理学的特性に関する評価解析であり、結果はすべて健康危険情報に該当する。

G. 研究発表

学会発表

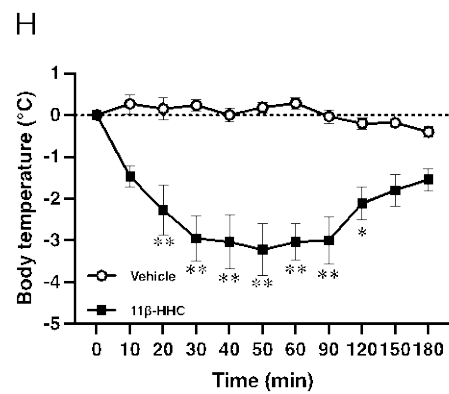
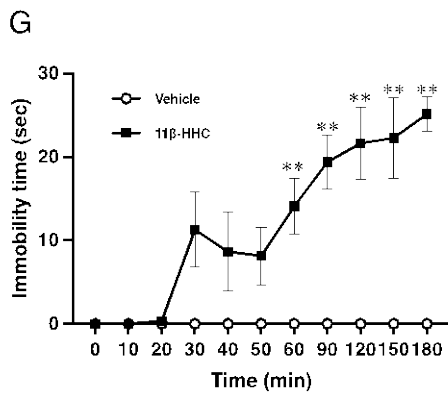
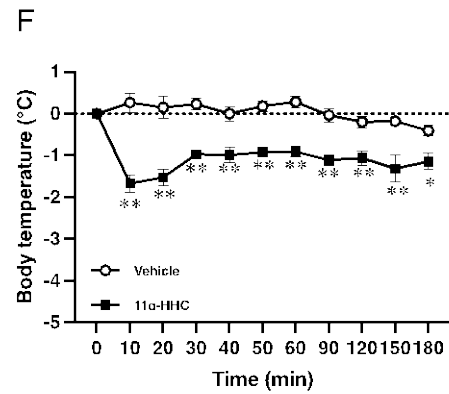
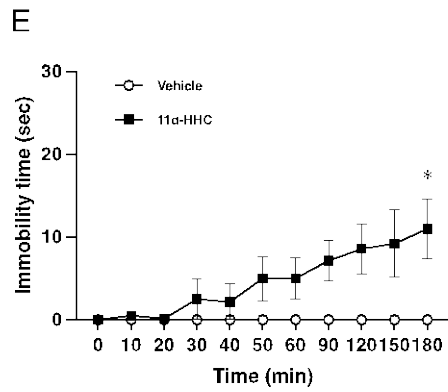
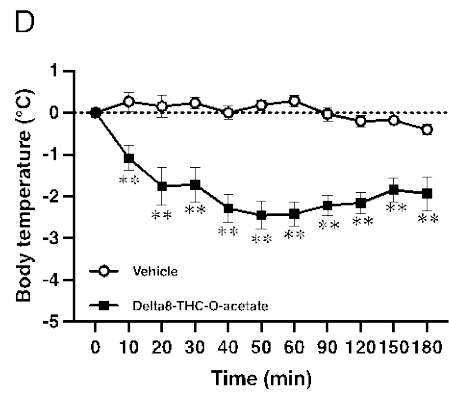
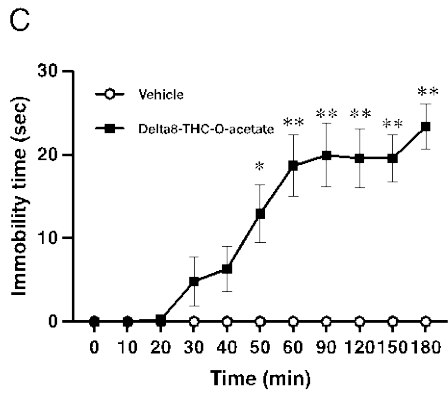
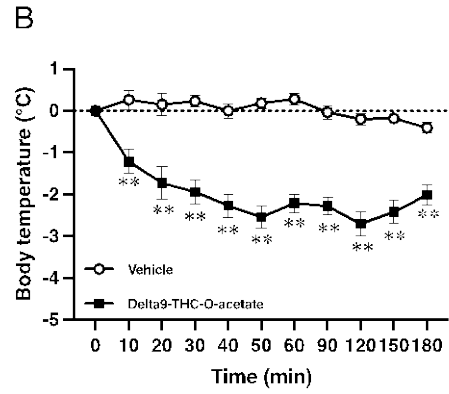
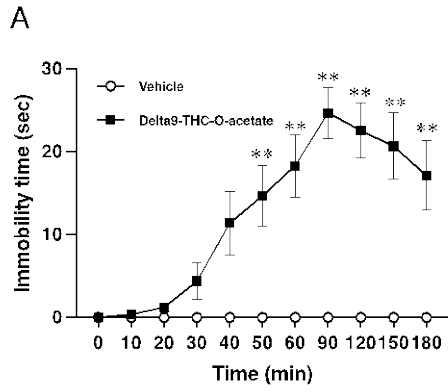
なし

論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



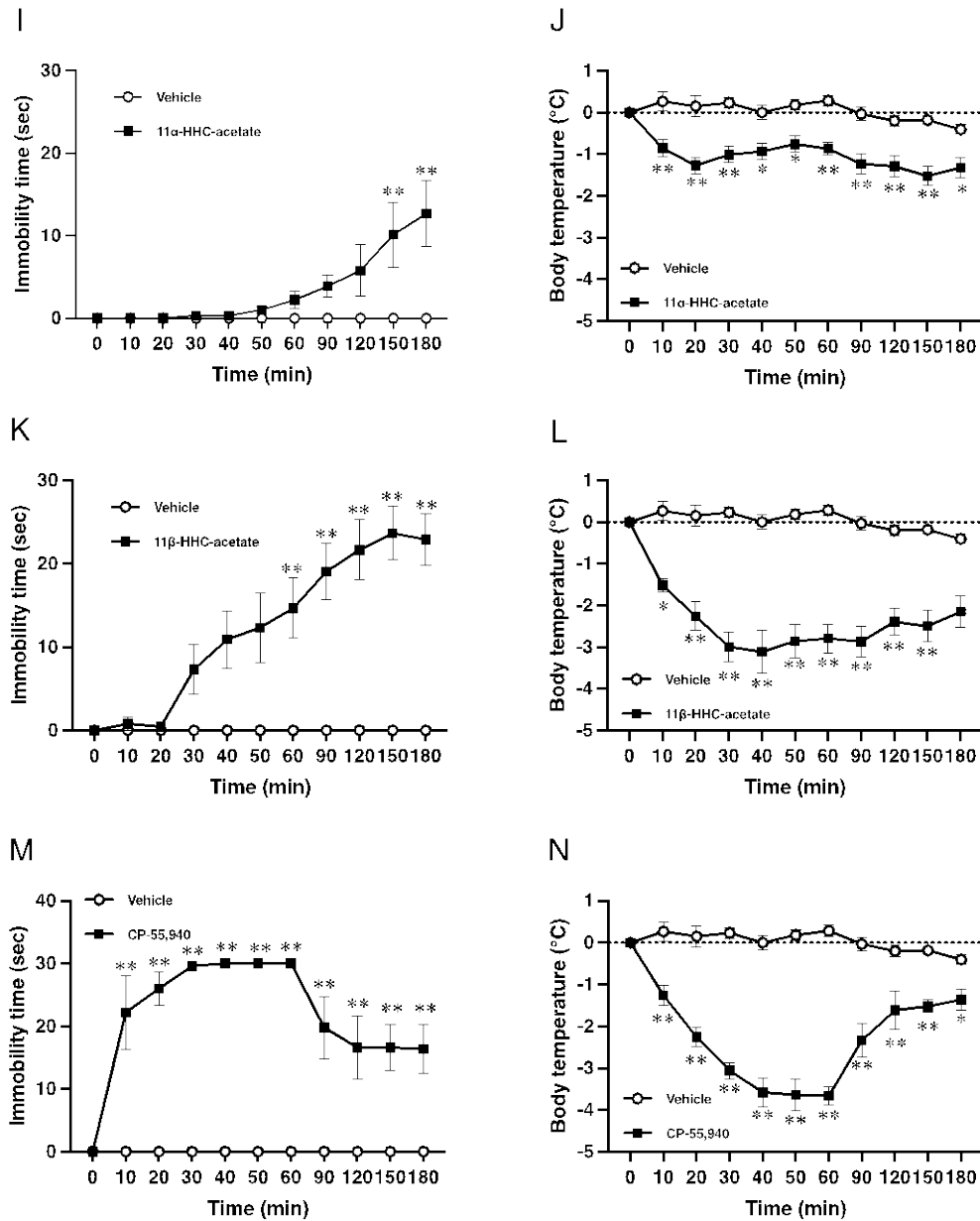
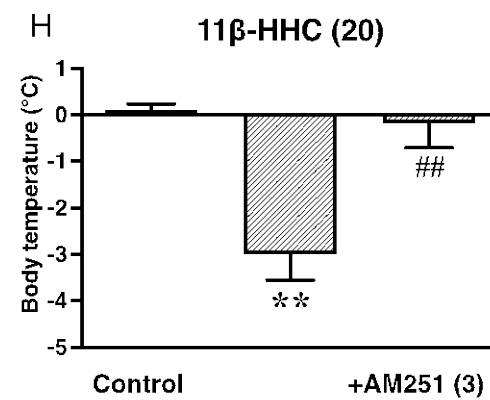
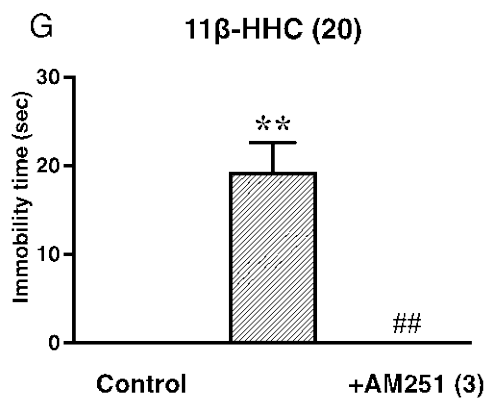
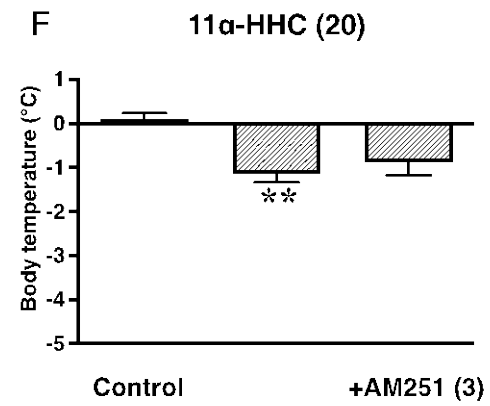
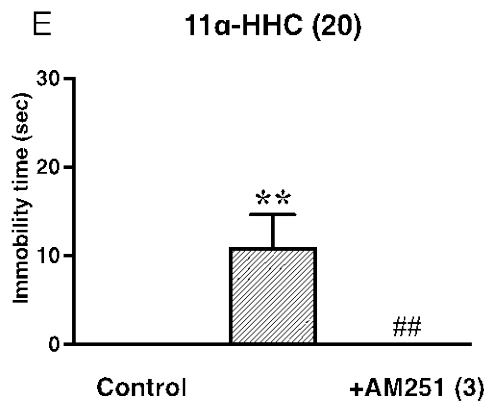
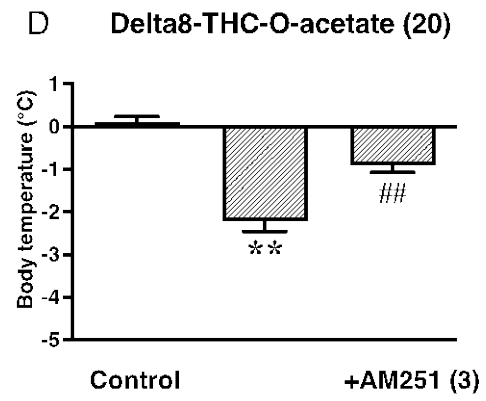
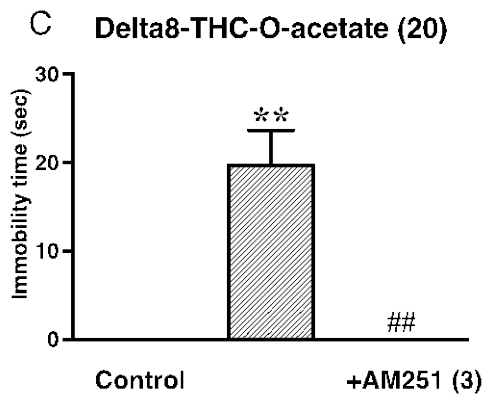
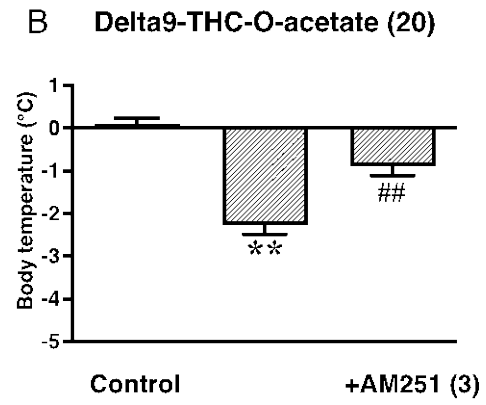
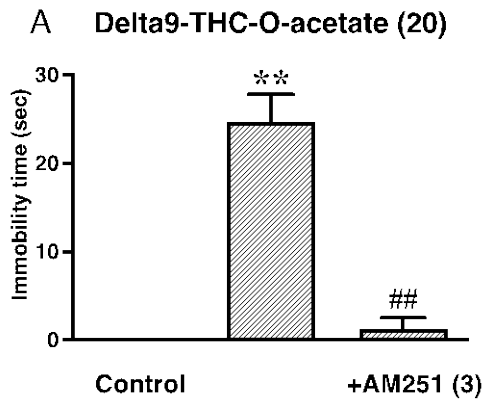


Fig. 1. (運動活性及び体温に対する影響)

The effect of semi-synthetic cannabinoids and synthetic cannabinoid CP-55,940 on general behavior and rectal temperature in mice. (Left) The effect of Δ^9 -THC-O-acetate (20 mg/kg, i.p.), Δ^8 -THC-O-acetate (20 mg/kg, i.p.), 11 α -HHC (20 mg/kg, i.p.), 11 β -HHC (20 mg/kg, i.p.), 11 α -HHC-O-acetate (20 mg/kg, i.p.), 11 β -HHC-O-acetate (20 mg/kg, i.p.) and CP-55,940 (1 mg/kg, i.p.) on the incidence of immobility with the forelimbs placed on a standard horizontal bar (4 cm high). (Right) Similarly, the effect of Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate, 11 β -HHC-O-acetate and CP-55,940 on the body temperature. Each column represents the mean with S.E.M. of 9-12 animals in Δ^9 -THC-O-acetate (A, B), Δ^8 -THC-O-acetate (C, D), 11 α -HHC (E, F), 11 β -HHC (G, H), 11 α -HHC-O-acetate (I, J), 11 β -HHC-O-acetate (K, L) or CP-55,940 (M, N)-treated group. Statistical analysis was conducted via one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's multiple comparison post-test by comparing target levels to a vehicle-treated cell (control). * p <0.05, ** p <0.01 vs. saline (SAL)-treated group.



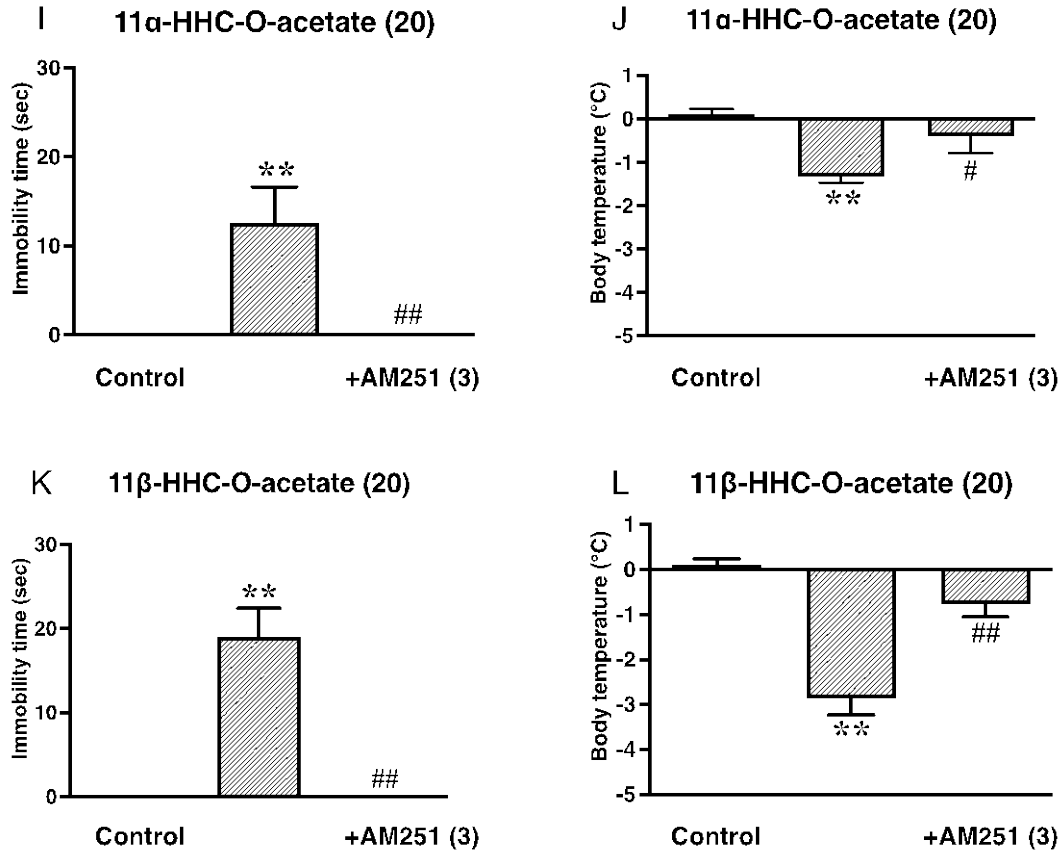


Fig. 2. (CB₁ 受容体拮抗薬併用による運動活性及び体温に対する影響)

For antagonist study, CB₁ antagonist AM251 (3 mg/kg, i.p.) was administered 15 min before treatment of Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate and 11 β -HHC-O-acetate (20 mg/kg, i.p.). Columns show the effect of pretreatment with AM251 on the maximum effect exhibited by Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 β -HHC and 11 β -HHC-O-acetate at 90 min, 11 α -HHC and 11 α -HHC-O-acetate at 180 min. Mean \pm SEM calculated by 2-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test for multiple comparisons in each condition (n=6-12). ** p <0.01 vs. saline (SAL)-treated group. # p <0.05, ## p <0.01 vs. Δ^9 -THC-O-acetate (A, B), Δ^8 -THC-O-acetate (C, D), 11 α -HHC (E, F), 11 β -HHC (G, H), 11 α -HHC-O-acetate (I, J) and 11 β -HHC-O-acetate (K, L)-acetate treated group.

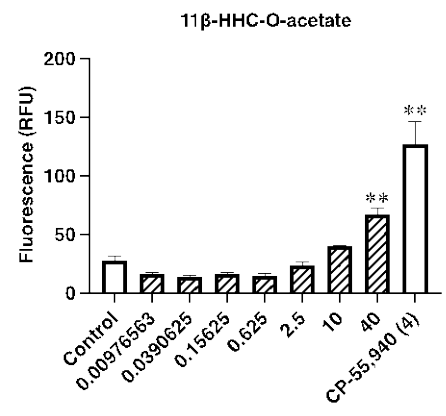
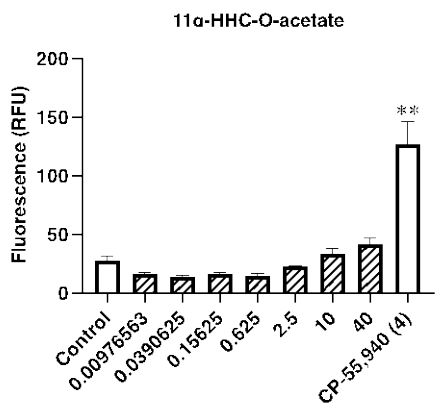
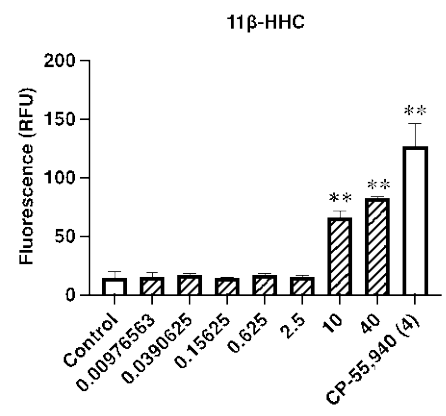
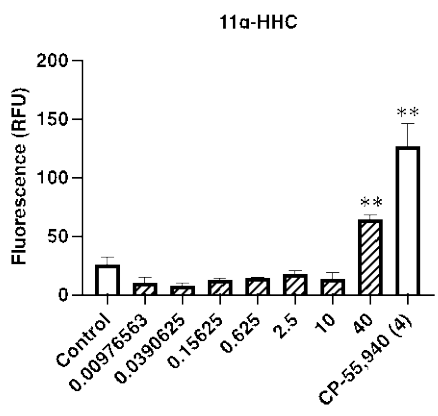
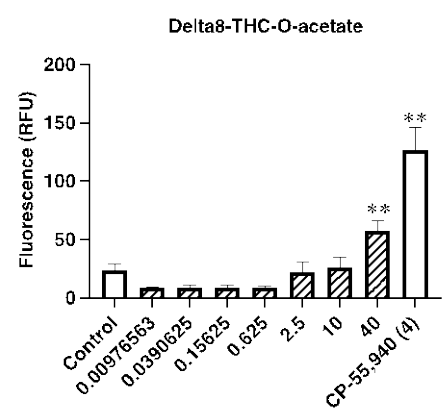
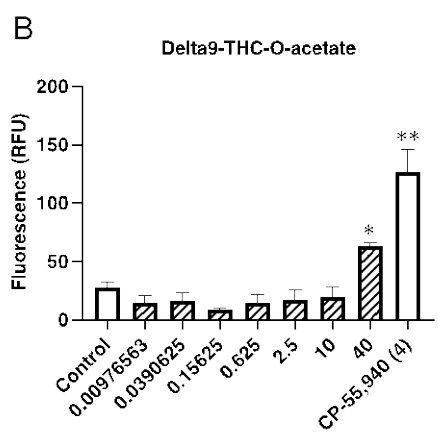
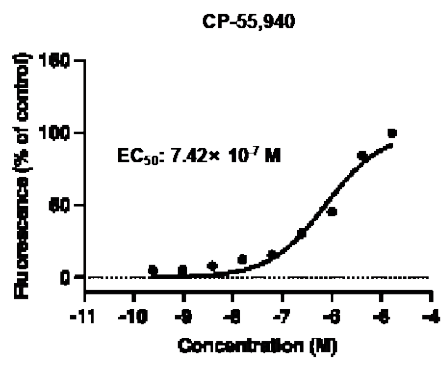
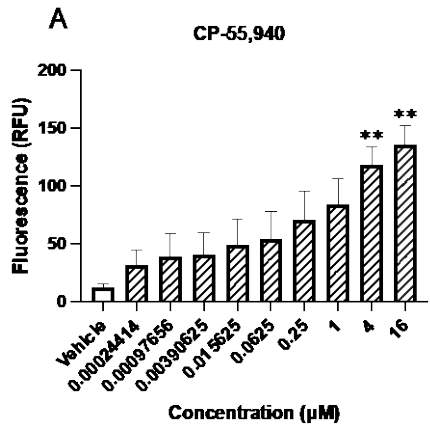


Fig. 3. (カンナビノイド受容体作用の評価)

Effect of synthetic cannabinoid on intracellular Ca^{2+} in CHO-CB₁ cells. (A) Changes in intracellular Ca^{2+} levels were data as changes in fluorescence in the FlexStation II (left graph). EC₅₀ values were calculated from the best-fit curves for the treatment of CP-55,940 on the experiment using Prism EC₅₀ curve-fitting algorithm (right graph). (B) Fluorescence measurements corresponding to increases in intracellular Ca^{2+} levels following simultaneous activation by Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate and 11 β -HHC-O-acetate. Treatment of CP-55,940 (4 μM) was used as a positive control. Each column represents the mean with SEM of three independent experiments. Statistical analysis was conducted via ANOVA and Dunnett's multiple comparison post-test by comparing target levels to a vehicle-treated cell (control). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Control-treated group.

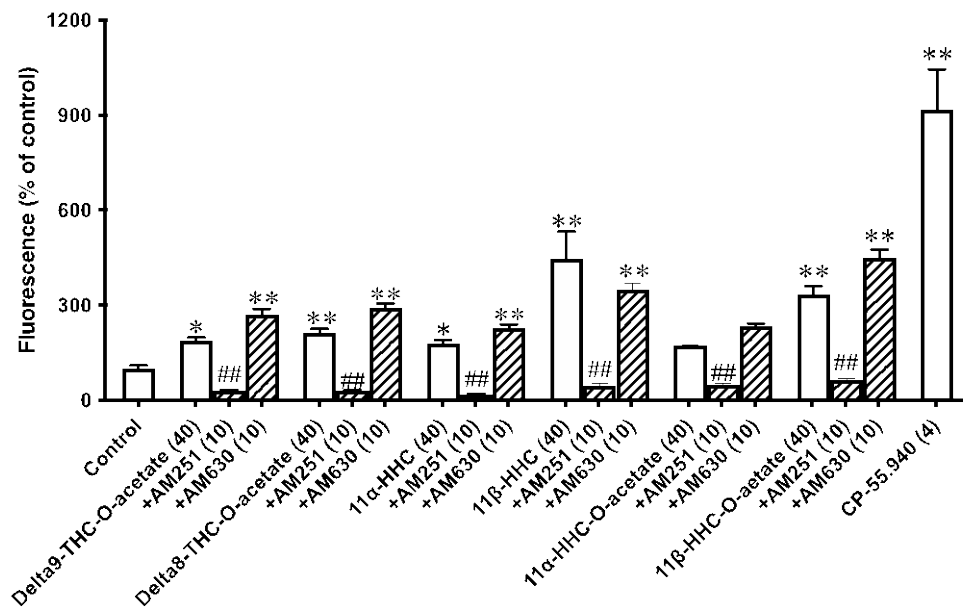


Fig. 4. (カンナビノイド受容体作用の評価)

Effect of synthetic cannabinoid on intracellular Ca^{2+} in CHO- CB_1 cells. For antagonist study, AM251 (CB_1 antagonist, 10 μM) or AM630 (CB_2 antagonist, 10 μM) was administered 15 min before administration of Δ^9 -THC-O-acetate (40 μM), Δ^8 -THC-O-acetate (40 μM), 11 α -HHC (40 μM), 11 β -HHC (40 μM), 11 α -HHC-O-acetate (40 μM) and 11 β -HHC-O-acetate (40 μM). Treatment of CP-55,940 (4 μM) was used as a positive control. Results were expressed in relative fluorescence units (RFU). Statistical analysis was conducted via ANOVA and Dunnett's multiple comparison post-test by comparing target levels to a vehicle-treated cell (control) or semi-synthetic cannabinoids. ** $p < 0.01$ vs Control-treated group. ## $p < 0.01$ vs. Δ^9 -THC-O-acetate, Δ^8 -THC-O-acetate, 11 α -HHC, 11 β -HHC, 11 α -HHC-O-acetate and 11 β -HHC-O-acetate.

研究成果の刊行に関する一覧表

特になし

令和5年3月30日

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年度厚生労働行政推進調査事業費補助金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。

- 研究事業名 厚生労働科学特別研究事業
- 研究課題名 急増する植物成分由来危険ドラッグの迅速な規制に資する研究 (22CA2018)
- 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。

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年度厚生労働行政推進調査事業費補助金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 厚生労働科学特別研究事業2. 研究課題名 急増する植物成分由来危険ドラッグの迅速な規制に資する研究(22CA2018)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。

令和5年3月30日

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年度厚生労働行政推進調査事業費補助金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。

- 研究事業名 厚生労働科学特別研究事業
- 研究課題名 急増する植物成分由来危険ドラッグの迅速な規制に資する研究(22CA2018)
- 研究者名 (所属部署・職名) 有機化学部・部長
(氏名・フリガナ) 出水 庸介・デミズ ヨウスケ
- 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。

厚生労働大臣殿

機関名 国立大学法人九州大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 石橋 達朗

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 厚生労働科学特別研究事業2. 研究課題名 急増する植物成分由来危険ドラッグの迅速な規制に資する研究3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学研究院・准教授(氏名・フリガナ) 石井 祐次・イシイ ユウジ

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。

厚生労働大臣殿

機関名 湘南医療大学所属研究機関長 職名 学長氏名 大屋敷 美志枝

次の職員の令和4年度厚生労働行政推進調査事業費補助金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 厚生労働科学特別研究事業
2. 研究課題名 急増する植物成分由来危険ドラッグの迅速な規制に資する研究(22CA2018)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 湘南医療大学 薬学部・教授
(氏名・フリガナ) 船田 正彦・フナダ マサヒコ

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:湘南医療大学における動物実験等に関する規程)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	湘南医療大学 薬学部 実験動物委員会	<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。