

平成 30～令和 2 年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
総合研究報告書 (H30-医薬-一般-004)
危険ドラッグ及び関連代謝物の有害作用解析と乱用実態把握に関する研究

分担研究報告書 [3年間のまとめ]

危険ドラッグの生体内挙動とその有害性の相関に関する研究

分担研究者：	北市清幸	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	田中宏幸	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者：	伊藤哲朗	(岐阜医療科学大学 生薬学研究室)
研究協力者：	首村菜月	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	木下智絵	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	松久貴哉	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	伊藤宏輔	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	森川美空	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	曾田 翠	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)

【研究概要】

[研究テーマ：危険ドラッグの生体内挙動とその有害性の相関に関する研究]

合成カンナビノイド (SCs) の部分構造から SCs を合成し、1) SCs 位置異性体の識別法の開発、2) SCs 位置異性体の *in vitro* における代謝経路の推定、3) SCs 位置異性体の *in vivo* における代謝経路および消失経路の推定を行った。

その結果、1) では、SCs を含む製品における位置異性体識別にも適用可能な LC-MS および ESI-QqQ による FUB-JWH-018 とその位置異性体の識別が可能な系を確立することが出来た。

また、2) では、肝ミクロソーム (LMs) を用いた *in vitro* での検討において ATHPINACA の Tail 部の置換基のみが異なる 2 種の SCs (AFUBINACA, ACHMINACA) およびそれぞれのアダマンチル位置異性体および 5F-CUMYL-PINACA および CUMYL-PINACA における代謝挙動の解析に LC-MS-IT-TOF で成功した。

さらに、3) では 5F-CUMYL-PINACA および CUMYL-PINACA での *in vivo* における代謝の解明および消失経路の推定に成功した。結果として、両 SCs は肝代謝が主な消失経路であるが、その代謝物の尿中排泄はほとんどなく、ごく一部が胆汁中への排泄を経て、糞便に排泄されることが明らかになった。

以上の知見は、摂取 SCs およびその代謝物の識別技術確立に技術的基盤として極めて有用であり、今後の効率的な SCs の検出、法的規制および有害性の推定において有用な情報であることが考えられた。

緒言

危険ドラッグに含まれる成分にはカチノン類や合成カンナビノイド (SCs) 等が知られて

いる。国はこれらについて法律による規制を行っているが、その構造の一部を変えた指定薬物対象外の新規化合物が次々と出現する、いわゆる“イタチごっこ”の状況が続いてきた。また、SCs は未変化体が尿などの生体試料から検出困

難であることが知られており、既報の SCs 代謝実験において、*in vitro* 代謝と *in vivo* 代謝の結果は完全には一致しないことも指摘されている。また、SCs には法的規制がされている SCs とその異性体が存在しており、法的規制がされている SCs についてはそれ以外の異性体との識別を厳密に行う必要がある。

そこで本研究では、高速液体クロマトグラフ (LC)–質量分析装置 (MS)、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) タンデム型質量分析装置 (QqQ)、LC-MS-イオントラップ飛行時間質量分析計 (LC-MS-IT-TOF) を用い、SCs およびその位置異性体を識別測定する技術を確立すると共に、それらを用いた SCs の代謝挙動の検討を肝ミクロソーム (LMs) および *in vivo* 動物実験モデルを用いて行った。

1) SCs 異性体同定と *in vivo* での生体内挙動に関する基礎的研究 (1 年目)

本年度より構築された合成カンナビノイド (SCs) の部分構造から入手困難な SCs 標準品を合成する適時供給体制を利用し、SCs を用い、各種の検討を行った。

その結果、ヒト LMs における ATHPINACA 位置異性体 2 種 (ATHPINACA isomer 1、ATHPINACA isomer 2) はいずれも代謝半減期が非常に短く、摂取後の識別には代謝物の検出とその代謝プロファイル情報が必要であることが明らかになった。なお、両化合物の主要代謝経路はアダマンチル基への速やかな水酸基の導入であり、代謝反応 3 時間後の主要代謝物は、isomer 1 では二水酸化体、isomer 2 では一水酸化体であることが明らかとなった。また、両 isomer の未変化体および主要代謝物のプロトン付加分子から生成されるプロダクトイオンには明確な違いがあり、ATHPINACA 位置異性体 2 種の識別は、未変化体、主要代謝物のいずれの検出によっても可能であることが示唆された。

また、5F-CUMYL-PINACA および CUMYL-PINACA の薬効用量 (0.3~0.5 mg/kg, iv) をラットに投与して行った薬物動態学的解析の結果、

両薬剤の挙動が明らかになった。すなわち、両化合物の未変化体の尿中排泄は確認されず、*in vitro* 代謝実験で得られた主要代謝物もごく微量にしか検出されないことが明らかになった。このことより、摂取 SCs の同定にはサンプル種の選択などさらなる工夫が必要であることが考えられた。

さらに、SCs の構造類似化合物 (異性体等) の識別を目指して、LC-MS 及びモデル化合物を用いた基礎研究を行い、FUB-JWH-018 とその異性体の識別が可能な系を確立した。なお、この評価系は、SCs を含む製品における位置異性体識別にも適用可能であることが明らかになった。

以上の知見は、摂取 SCs およびその代謝物の識別技術確立に技術的基盤として極めて有用であり、今後の効率的な SCs の法的規制においても有用であることが考えられた。

2) SCs 異性体同定と *in vivo* での生体内挙動に関する発展的研究 (2 年目)

前年度取り組んだ ATHPINACA 位置異性体識別法の適用拡大を目的とし、置換基の違いが代謝挙動に及ぼす影響を検討するために、ATHPINACA の Tail 部の置換基のみが異なる 2 種の SCs (AFUBINACA, ACHMINACA) それぞれのアダマンチル位置異性体 (isomer 1、isomer 2) を合成し、LCMS-IT-TOF を *in vitro* 代謝挙動の解明を試みた。その結果、ヒト LMs による *in vitro* 代謝半減期および Tail 部への代謝反応は化合物ごとに大きく異なっていたが、全てにおいてその主要な代謝経路はアダマンチル基への水酸基付加であることが明らかになった。一方、主要代謝物は位置異性体間で異なっており、いずれの SCs においても isomer 1 はアダマンチル基の二水酸化体、isomer 2 は一水酸化体であることが明らかとなった。また、未変化体および主要代謝物のプロトン化分子から生成される MS2 スペクトルには明確な違いが見られ、isomer 1 からのみアダマンチル基を示すプロダクトイオンが強い相対強度で得られた。以上の

結果より、アダマンチル位置異性体は LC-MS-IT-TOF を用いた精密質量分析と MS2 スペクトルにおけるプロダクトイオンの比較により、未変化体、主要代謝物いずれにおいても明確に識別可能であることが示唆された。

また、*in vivo* 試験では、5F-CUMYL-PINACA、CUMYL-PINACA 共に胆汁中からは未変化体と代謝物の検出が可能であり、両化合物の排泄経路の一つが胆汁排泄であることが示唆された。さらに、SCs 位置異性体 (FUB-JWH-018 とその異性体) 3 種のフッ素位置異性体 (オルト、メタ、及びパラ置換体) についてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) タンデム型質量分析装置 (QqQ) を用いての識別を行ったところ、プロトン化イオンをプリカーサーイオンとして広範囲のコリジョンエネルギー (CE) 条件下、識別上鍵となるプロダクトイオンを探索した。CE 80eV において得られた主要フラグメントについて、多変量解析を組み合わせることで、識別に資する二種のプロダクトイオンを特定した。得られた評価系は、他の位置異性体識別にも適用可能であることが明らかになった。以上の知見もまた、摂取 SCs およびその代謝物の識別技術確立に技術的基盤として極めて有用であり、今後の効率的な SCs の法的規制においても有用であることが考えられた。

3) *in vivo*での生体内挙動に関する詳細な検討とヒトへのデータ外挿性に関する検討

昨年の結果で胆汁排泄の重要性が明らかになったことを受け、糞便中における SCs の排泄の経時的な確認と検体採取としての有用性を検証した。その結果、ラットに投与した 5F-CUMYL-PINACA および CUMYL-PINACA の代謝物が胆汁中に排出されたことを受け、今年度は糞便中からの代謝物の同定を試みた。その結果、各 SCs の主要代謝物である一水酸化体は糞便からも検出できることが明らかとなった。また、2 日後の糞便からの検出も可能であり、ヒトにおいても糞便の採取により使用薬物を特定できる可能性があることが示唆された。

さらにこれまでのデータのヒトへの外挿性を検討するために、ラット LMs を用いた代謝実験を行った。その結果、消失半減期、主要代謝物についてはヒトとラットの間に顕著な差は見られないことが明らかとなった。よって、入手しやすいラット LMs のデータはヒトの代謝挙動、毒性を予測するツールとして有用であることが示唆された。また、得られたパラメータより算出された肝クリアランスより、生体において両 SCs は肝血流依存的に肝臓での代謝を強く受けることも明らかとなった。

【総括】

SCs の測定系の確立により、規制薬物の厳密な同定が出来ることが明らかとなった。また、SCs 異性体の確認も規制薬物の同定に寄与する可能性が示唆された。

さらに、ラット LMs を用いた代謝実験はヒトでの代謝予測において有用であることが示唆された。

これら基盤技術の構築は、SCs のみならず他の危険ドラッグの有害作用を予測する上で極めて有用な技術であり、得られたデータは規制根拠として有効に活用できると考えられる。

【研究業績】

1. 論文発表

- 11) Chikumoto T., Furukawa R., Kohyama E., Suenami K., Nagai H., Tada H., Kawashima H., Kadomura N., Soda M., Kitaichi K., Ito T. Liquid chromatography–mass spectrometry studies on the isomeric 1-fluorobenzyl-3-naphthoyl-indoles: FUB-JWH-018 and five isomers. *Forensic Toxicology Forensic Toxicology* 37, 113–120 (2019).
- 12) Chikumoto T., Kadomura N., Matsuhisa T., Kawashima H., Kohyama E., Nagai H., Soda M., Kitaichi K., Ito T. Differentiation of FUB-JWH-018 positional isomers by electrospray ionization–triple quadrupole mass spectrometry.

- Forensic Chemistry 13, 100157 (2019).
- 13) Kadomura N, Ito T, Kawashima H, Matsuhisa T, Kinoshita T, Soda M, Kohyama E, Iwaki T, Nagai H, Kitaichi K. In vitro metabolic profiles of adamantyl positional isomers of synthetic cannabinoids. Forensic Toxicology 39:26-44 (2021).
2. 学会発表
- 15) 首村菜月, 古川諒一, 川島英頌, 松久貴哉, 曾田翠, 神山恵理奈, 筑本貴郎, 永井宏幸, 伊藤哲朗, 北市清幸. LCMS-IT-TOF を用いた危険ドラッグ成分ATHPINACAの位置異性体識別および代謝物の推定. 第64回日本薬学会東海支部 総会・大会, 愛知, 2018年6月30日.
- 16) 伊藤哲朗, 首村菜月, 松久貴哉, 川島英頌, 神山恵理奈, 曾田翠, 筑本貴郎, 永井宏幸, 舩田正彦, 北市清幸. 危険ドラッグ蔓延防止に向けた岐阜県における取り組み(3): 合成カンナビノイド代謝物の同定と異性体の構造識別. 第53回日本アルコール・アディクション医学会学術総会, 横浜, 2018年9月8-10日.
- 17) 筑本貴郎, 首村菜月, 古川諒一, 川島英頌, 松久貴哉, 神山恵理奈, 永井宏幸, 曾田翠, 北市清幸, 伊藤哲朗. LC-MS を用いた危険ドラッグの異性体識別-FUB-JWH-018 について. 第55回全国衛生化学技術協議会年会, 奈良, 2018年11月29-30日.
- 18) 伊藤哲朗, 神山恵理奈, 川島英頌, 首村菜月, 松久貴哉, 曾田翠, 筑本貴郎, 永井宏幸, 松永俊之, 原英彰, 北市清幸. 岐阜危険ドラッグ解析技術連携協議会の取り組みについて(第三報). 第51回東海薬剤師学術会, 静岡, 2018年12月2日.
- 19) 伊藤哲朗, 神山恵理奈, 筑本貴郎, 永井宏幸, 川島英頌, 首村菜月, 松久貴哉, 曾田翠, 北市清幸. 指定薬物の同定を目指した官学連携による基礎研究について. 平成30年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸支部衛生化学部会, 岐阜, 2019年1月31日-2月1日.
- 20) Kadomura N., Kawashima H., Matsuhisa T., Soda M., Kohyama E., Chikumoto T., Nagai H., Ito T., Kitaichi K. The isomeric discrimination and investigation of the metabolic profiles of synthetic cannabinoids. ASEAN-CINP, Yogyakarta, Indonesia, Feb 28.– Mar. 2.
- 21) 松久貴哉, 川島英頌, 首村菜月, 曾田翠, 神山恵理奈, 筑本貴郎, 永井宏幸, 伊藤哲朗, 北市清幸. 第三世代合成カンナビノイドの代謝挙動に関する研究. 第38年会日本法中毒学会, 博多, 2019年7月26日-7月27日
- 22) 岩木孝晴, 神山恵理奈, 永井宏幸, 筑本貴郎, 曾田翠, 原英彰, 北市清幸, 伊藤哲朗. 岐阜危険ドラッグ解析技術連携協議会における官学連携による基礎研究と地域啓発への展開について. 第56回全国衛生化学技術協議会年会, 広島, 2019年12月5-6日.
- 23) 伊藤哲朗, 岩木孝晴, 神山恵理奈, 首村菜月, 松久貴哉, 木下智絵, 曾田翠, 永井宏幸, 松永俊之, 原英彰, 北市清幸. 岐阜危険ドラッグ解析技術連携協議会の取り組みについて(第四報) 産学連携による基礎研究と地域啓発について. 第52回東海薬剤師学術会, 四日市, 2019年12月1日.
- 24) Kinoshita T, Matsuhisa T, Morikawa M, Ito K, Soda M, Tsukamoto K, Iwaki T, Tanaka H, Kitaichi K. Evaluation of in vitro metabolism and extrapolation approaches between different species for synthetic cannabinoids. CINP 2021 VIRTUAL WORLD CONGRESS, 2021年2月26日-2月28日
3. 知的財産権の出願・登録状況
- 特許取得：特になし
 実用新案登録：特になし
 その他：特になし