

令和3～令和5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)
危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究(21KC1003)

総合研究報告書

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	清水英徳	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者	岩木孝晴	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者	細井紀也	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者	伊藤哲朗* ¹	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者	田中宏幸* ²	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者	種田靖久	(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	森川美空	(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	岩井康晴	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者	安陪晃ノ介	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者	嶋田百伽	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)

*¹ 現所属：岐阜医療科学大学 生薬学研究室

*² 現所属：岐阜薬科大学 生態機能解析学大講座 免疫生物学研究室

【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に関する研究]

[緒言] 近年、合成カンナビノイド (SCs) およびフェンタニルとその類似体の乱用が世界各国で増加しており、薬物動態パラメータの特定および代謝挙動の解明が望まれている。本研究では、薬物動態パラメータの特定を目的として、SCs を用いた *in vitro* 実験から薬物動態パラメータを算出する有用性および薬物動態パラメータに影響を与える因子についての検討を行った。また、代謝挙動の解明を目的として、フェンタニル類似体 (FAs) を用いた位置異性体識別方法の確立および *N*-アシル基の炭素数の差異による代謝挙動の比較を行った。

[方法] SCs として CUMYL-PINACA および 5F-CUMYL-PINACA を、FAs として FFF、3-PPF および BZF を用いた。 *In vitro-in vivo* 比較 (IVIVC) による、1) より実測に近い薬物動態パラメータ特定の実施、2) FAs の測定法の確立と代謝挙動の解明、3) FAs のフッ素位置異性体識別および、4) ヒト肝ミクロソームを用いた代謝挙動の比較、5) *N*-アシル基の炭素数の差異による代謝挙動の比較および摂取証明に向けたバイオマーカーの特定を行った。

[結果] 1) では、*in vitro* 実験から算出された推定肝クリアランス (CLH) の推定範囲に *in vivo* 実験から算出された CL_{bile} の値が含まれていた。FAs を用いた 2) では、ヒト肝ミクロソームを用いた

代謝反応において nor 代謝物、アミド加水分解生成物、一水酸化体の 3 種類の第 I 相代謝物が確認された。3)では、既報を参考に GC-MS の測定条件を設定することで、FFF の 3 種のフッ素位置異性体を分離することができた。4)では、FFF のいずれのフッ素位置異性体においても同様の 3 種類の第 I 相代謝物が推定されたが、代謝物生成量比には異性体間で差がみられた。5)では、N-アシル基の炭素数と水酸化代謝反応との関係性を確認し、摂取証明のためのバイオマーカーを特定した。

[考察] SCs の IVIVC の結果、肝代謝を受けたものは全て胆汁排泄を受けている可能性が示唆された。このことから、脂溶性の高い SCs では血中遊離型分率を算出することが重要であり、これによってさらにヒトでの生体内挙動の推測を正確に行うことができる可能性が示唆された。FAs を用いた代謝実験では、親化合物の半減期が短い化合物では、ヒトにおいても体内からの消失が速やかに起こると考えられ、摂取証明に代謝物の特定が有用であることが示唆された。

[結論] SCs および FAs 測定系の確立により、規制薬物の厳密な同定が可能であることが明らかとなった。さらに、ヒト肝ミクロソームを用いた代謝実験はヒトでの代謝、毒性予測において有用であることが示唆された。今後より多くの SCs および FAs の代謝プロファイルを明らかにすることで、構造代謝関連の理解に貢献できると考えられた。

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。

SCs が未だに多く流通する一方、近年フェンタニルおよびフェンタニル類似体 (FAs) の乱用も増加している。フェンタニルは製造が容易で安価であり、またその化学構造を容易に組み替えることが出来るため、非常に多くの類似体が市場に出回っている。また、FAs はその種類により、効力や毒性、法的位置が異なる可能性がある。

本研究では、SCs を用いた *in vitro* 実験から薬物動態パラメータを算出する有用性の検討と薬物動態パラメータに影響する因子についての検討および FAs のフッ素位置異性体識別、並びに代謝挙動の比較を行った。

1) SCs の薬物動態パラメータの特定および FAs 測定法の確立と代謝挙動の解明 (1 年目)

本研究では、SCs である CUMYL-PINACA [1-pentyl-N-(2-phenylpropan-2-yl)-1H-indazole-3-carboxamide] および 5F-CUMYL-PINACA [1-(5-fluoropentyl)-N-(2-phenylpropane-2-yl)-1H-indazole-3-carboxamide] の *in vitro-in vivo* 比較 (IVIVC) による、1) より実測に近い薬物動態パラメータ特定の実施、2) フェンタニル類似化合物である *p*-fluorofranylfentanyl (*p*-FFF) の測定方法の確立と *in vitro* 代謝実験の実施を試みた。

1) について、SCs の血中遊離型分率 (unbound factor, fu) についての既報を参考に、より実測値に近いと考えられる *in vitro* 薬物動態パラメータの算出を行った。結果として、脂溶性の高い SCs は fu が小さく、これが *in vitro* 実験と *in vivo* 実験での結果の差異を引き起こしていることが明らかとなった。また、IVIVC の結果、*in vitro* 実験から算出された推定肝クリアランス (CLH) の推定範囲に *in vivo* 実験から算出された CLbile の値が含まれていることから、肝代謝を受けたものは全て胆汁排泄を受けている可能性が示唆された。以上のことから、脂溶性の高い SCs では fu を算出することが重要であり、これによってさらにヒトでの生体内挙動の推

測を正確に行うことができる可能性が示唆された。

2) について、LCMS-IT-TOF、LC-MS/MS を用いて *p*-FFF の測定方法の確立を行った。また、SCs で確立した *in vitro* 実験の方法に一部変更を加えた方法によって、代謝物の検出についても可能であった。このことから、SCs と同様に検出技術の確立とデータの蓄積を行うことで国内での規制に役立つ可能性が示唆された。また *in vitro* 代謝の結果より、3 種の第 I 相代謝物が特定された。さらに、親化合物の半減期が短かったことからヒトにおいても体内からの消失が速やかに起こると考えられ、代謝プロファイル情報が必要となることが明らかとなった。これらの知見は、国内における SCs と同様に FAs を含む危険ドラッグの流通の阻止に資すると考えられる。

2) FAs の位置異性体識別およびヒト肝ミクロソームを用いた代謝挙動の比較 (2 年目)

本研究では、FAs として FFF のフッ素位置異性体である *o*-FFF、*m*-FFF、*p*-FFF をモデル化合物とし、1) 親化合物のカラム分離による異性体識別、2) *in vitro* 代謝実験による各異性体の代謝挙動の解明を試みた。

1) について、LC-MS/MS による FFF 位置異性体の分離には C8、C18、PFP、Cholester および π NAP の 5 つのカラムを使用した。いずれのカラムでも位置異性体の完全分離は行えなかった。GC-MS による分離は、既報を参考に測定条件を設定した。その結果、3 種のフッ素位置異性体を分離することができた。このことから、FFF 位置異性体の分離が GC-MS で行えることが明らかになった。

2) について、前年度 *p*-FFF を用いて行った代謝実験と同様に、ヒト肝ミクロソームに FFF 位置異性体を添加し、経時的に採取したサンプルを LCMS-IT-TOF にて測定した。その結果、いずれの異性体においても前年度 *p*-FFF で得られた代謝物と同様の 3 種の第 I 相代謝物が推定されたが、その代謝物生成量比には異性体間で差

がみられた。このことから、FFF 位置異性体はいずれも半減期が短く、摂取証明に代謝物の特定が有用であることが示唆された。

FFF 摂取のバイオマーカーとしては、FFF 由来のフラン環やアニリン環を持つ酸化的 *N*-脱アルキル化体 (nor 体) が有用であると考えられた。3 種の FFF 位置異性体において 3 つの同様な第 I 相代謝物が推定されたが、異性体間で代謝物の生成量や保持時間に差がみられたことから、それらを組み合わせることで、代謝物の情報を用いて FFF 位置異性体を識別できる可能性が示唆された。これらの知見は、国内における FAs を含む危険ドラッグの流通の阻止に資すると考えられる。

3) FAs の *N*-アシル基の炭素数と水酸化代謝反応との関係性および摂取証明に向けたバイオマーカーの特定 (3 年目)

本研究では、ヒト肝ミクロソームを用いて 3-phenylpropanoylfentanyl (3-PPF) および Benzoylfentanyl (BZF) の *in vitro* 代謝挙動の解明を試みた。

ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験により、半減期は 3-PPF で 7.9 ± 0.5 min、BZF で 85.4 ± 7.2 min と算出された。3-PPF の代謝物として nor 体、一水酸化体および nor 体の一水酸化体が検出された。一水酸化体は反応開始直後から急速に生成されたが、反応開始 20 分以降その検出強度は減衰した。試験終了時 (120 min) においては、nor 体が最も高い強度で検出された。BZF の代謝物として nor 体、アミド加水分解体、一水酸化体が得られ、いずれも緩徐に生成された。試験終了時 (180 min) においては、nor 体が最も高い強度で検出された。

LCMS-IT-TOF 分析により、両 FAs 代謝物の水酸基の位置を決定することでアミド側鎖の伸長により水酸化反応の反応部位が変化し、より *N*-アシル基で水酸化を受けやすくなることが確認された。よりアミド側鎖の長い 3-PPF は *N*-アシル基の水酸化反応によって速やかに消失することが明らかになった。BZF

は半減期が長いいため、親化合物が摂取証明に利用可能であることが示された。一方で3-PPFの半減期は極めて短く、親化合物の検出は摂取証明に適さないことが示唆された。摂取証明のためのバイオマーカーとしては、3-PPFではnor代謝物が、BZFでは親化合物とnor代謝物が利用可能であることが示唆された。

【総括】

SCsおよびFAsの測定系の確立により、規制薬物の厳密な同定が可能であることが明らかとなった。さらに、ヒト肝ミクロソームを用いた代謝実験はヒトでの代謝、毒性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、FAs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

- 1) Ito S, Mori M, Matsuo M, Yamasaki R, Oida Y, Soda M, Kitaichi K: Establishment to measure oxycodone in plasma with liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Neuropsychopharmacol Rep*, 42(3): 299-305, 2022.

2. 学会発表

- 1) 木下智絵, 森川美空, 伊藤宏輔, 曾田翠, 塚本桂, 岩木孝晴, 田中宏幸, 伊藤哲朗, 北市清幸: 合成カンナビノイドの代謝における種差に関する研究. 日本薬剤学会第36年会. Web, 2021年5月13-15日
- 2) 森川美空, 木下智絵, 伊藤宏輔, 岩木孝晴, 曾田翠, 清水英徳, 田中宏幸, 細井紀也, 北市清幸: フェンタニル類似体 Fluorofuranylfenanyl の異性体識別と代謝物の同定に関する研究. 日本薬学会第142年

会. 名古屋, 2022年3月25-28日

- 3) 伊藤宏輔, 森川美空, 岩井康晴, 木下智絵, 岩木孝晴, 曾田翠, 清水英徳, 田中宏幸, 篠田範夫, 北市清幸: フェンタニル類似体の摂取証明に向けた識別法の開発に関する研究. BPCNP4 学会合同年会. 東京, 2022年11月4-6日
- 4) Oida Y, Morikawa M, Itoh K, Iwai K, Iwaki T, Soda M, Shimizu H, Tanaka H, Shinoda N, Kitaichi K: The establishment of the method to differentially identify the isomers of a fentanyl analog, Fluorofuranylfentanyl. 34th CINP World Congress, Montréal, Canada, 2023.5.7-10.
- 5) 岩井康晴, 伊藤宏輔, 森川美空, 木下智絵, 曾田翠, 種田靖久, 北市清幸: フェンタニル類似体 benzoylfentanyl および 3-phenylpropanoylfentanyl の摂取証明に向けた代謝研究. 第53回日本神経精神薬理学会年会. 東京, 2023年9月7-9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