

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09282

研究課題名(和文) 合成カンナビノイドの体内動態とカタレプシー発現との関連性の解明

研究課題名(英文) Relationship between the pharmacokinetic parameters and the cataleptic effect of synthetic cannabinoids

研究代表者

松本 智寛 (MATSUMOTO, Tomohiro)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：90405176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：質量顕微鏡を用いて、合成カンナビノイドJWH-210を投与したマウスでの薬物分布を観察したところ、脳、肝臓をはじめ様々な臓器に幅広く分布していることが判明した。また、JWH-210、5F-NNE1及びNM2201の血中消失半減期はいずれも1時間以下と極めて短かったにもかかわらず、4時間以上にわたって強度のカタレプシーが観察され、半減期と有害作用持続時間との間には大きな乖離が認められた。一方、脳内濃度の半減期は血中濃度よりも著しく長く、血中から消失した後も脳内で薬物が作用し続ける可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成カンナビノイドは「脱法ハーブ」として一時期大流行した濫用薬物であるが、その種類が多様であるため、いまだ十分に薬理学的研究が行われているとは言い難い。濫用者を検挙し公判で有罪とするためには、事件当時薬物の影響下にあったことが証明される必要があるが、今回の研究で、血中濃度と薬物の作用時間には著しい乖離があることが明らかとなった。また、血中濃度は低くても脳内濃度が高く、薬物作用が持続している可能性も示唆された。そのため薬物の血中濃度が低いからと言って一概に薬物の影響下になかったとは言えず、個別の事案ごとに慎重に対応する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the distribution of the synthetic cannabinoid JWH-210 in the brain, liver, and other organs in mice treated with JWH-210 using an imaging mass spectrometer. JWH-210 was widely distributed in all organs tested. Although the elimination half-lives of JWH-210, 5F-NNE1, and NM2201 in blood were extremely short (less than 1 hour), severe catalepsy was observed for more than 4 hours, and there was a significant discrepancy between the half-lives and the duration of the adverse effect. On the other hand, the half-lives of the synthetic cannabinoids in brain were longer than those in blood, suggesting that the cannabinoids can exert a continuous action even after it has been eliminated from the blood.

研究分野：法中毒学

キーワード：合成カンナビノイド カタレプシー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

合成カンナビノイド化合物は、その一部が麻薬及び向精神薬取締法で麻薬として、あるいは医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（いわゆる薬機法）で指定薬物として規制される新規濫用薬物である。従来型のフェネチルアミン系薬物やトリプタミン系薬物等の化合物と比較して、複数の基本骨格を有することから非常に構造類似体が多いのが特徴である。化学構造の多様さにも関わらず、合成カンナビノイドの薬理学的作用機序はカンナビノイド CB₁ 受容体アゴニスト作用を基本とし、大麻様の精神作用を惹起する。有害作用についても時間感覚及び空間感覚の変容やカタレプシーを始めとした大麻様症状を示す。濫用される合成カンナビノイドは、CB₁ 受容体アゴニストとしての potency 及び efficacy がともに大麻の幻覚成分である ⁹-tetrahydrocannabinol (⁹-THC) よりも強力であり、かつ精製された結晶として入手可能であることから、天然物である大麻製品を摂取した場合と比較して作用の発現が強力である。その結果、薬物濫用者による交通事故や薬物中毒死が多発して大きな社会問題へと発展した。しかし、膨大な種類の化合物が短期間に市場に流入したことから、合成カンナビノイドの薬理学的研究が追いつかず、危険運転致死傷罪のように高度なエビデンスを要求する事件の場合には科学的根拠の薄弱さが指摘されるなど、公判への影響も少なからず認められた。被疑者の事件当時の血中濃度や、薬物による精神及び身体への影響の多寡を推定するためには、より広範かつ詳細な薬理学的研究が求められることから、法医学あるいは法科学分野の研究者を始めとし精力的な研究が続けられている。現在のところ、合成カンナビノイドは一般に高脂溶性であることから、人体摂取時に脂肪組織への著しい蓄積が認められ、同時に血中からも速やかに消失し、血液及び尿試料からの検出時間が短い（あるいは検出困難である）ことが知られている。しかしながら、同じく消失半減期が短い薬物であるコカインと異なり、合成カンナビノイドの作用時間は数時間以上と言われ、作用時間と血中濃度が乖離している可能性が示唆されている。そのため、事件捜査や公判において血中濃度から濫用者がどの程度薬物の影響を受けていたのか推定することが困難である。

2. 研究の目的

このような現状を鑑み、公判維持に資するための科学的データを蓄積すべく、これまで我々の研究室においては、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (LC-MS-MS) を用いたマウス生体試料からの合成カンナビノイド迅速定量法の開発や、合成カンナビノイド投与マウスの血中濃度プロファイル及び脳内濃度プロファイルの解明等に関する研究を行ってきた。今回我々は、継続テーマとして (1) 合成カンナビノイド投与マウスにおける血中濃度及び脳内濃度の薬物速度論解析を実施し、新規テーマとして (2) イメージング質量分析法 (IMS) による合成カンナビノイド投与後のマウス臓器における薬物分布の解明及び (3) マウスにおける合成カンナビノイドのカタレプシー惹起作用に関する研究を実施した。また、血中濃度と薬物作用時間の関係を解明するために、(1) 及び (3) の結果から、血中及び脳内における薬物消失時間とカタレプシー惹起作用の関連性について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 合成カンナビノイド標品は総てナカライテスク株式会社より購入した。今回実験に用いた合成カンナビノイド化合物は、naphthoylindole 系の JWH-210, naphthalenyloxycarbonyl 系の NM2201 及び naphthalenylcarbamoyl 系の 5F-NNE1 で、その化学構造を図 1 に示す。また、各標準液 (stock solution) はいずれもアセトニトリル溶液とした。実験動物には 8 - 10 週齢 C57BL/6J 雄性マウスを用いた。合成カンナビノイド溶液を 0.1 - 0.5 mg/kg で腹腔内投与したのち、各個体を経時的に頸椎脱臼法にて屠殺し (30 - 180 min)、採血及び全脳の摘出を行った。得られた生体試料は以下の方法に従って前処理したのち、LC-MS-MS 分析を行い、定量データから生物学的半減期等の薬物速度論パラメータを算出した。

分析前処理

血液試料については、内標準 (AB001) を添加したのち冷アセトニトリルにて除タンパク処理したものを分析試料とした。脳試料については、全脳をビーズクラッシャーにてホモジナイズしたのち、内標準を添加して冷アセトニトリルにて除タンパク処理したものを分析試料とした。

LC-MS-MS の分析条件

装置：島津製作所製 LCMS-8040

分析カラム：Phenomenex 製 KinetexXB-C18 (100 mm × 2.1 mm i.d., 2.6 μm)

移動相：A) 10 mM HCOONH₄, 0.1 v/v% HCOOH, in H₂O

B) 10 mM HCOONH₄, 0.1 v/v% HCOOH, in MeOH

0 - 7.5 min A:B = 95:5 5:95

7.5 - 10 min A:B = 5:95

流速：0.3 mL/min

オープン温度：40

イオン化モード：ESI (+)

CID ガス：Ar

質量分析部：トリプル四重極型

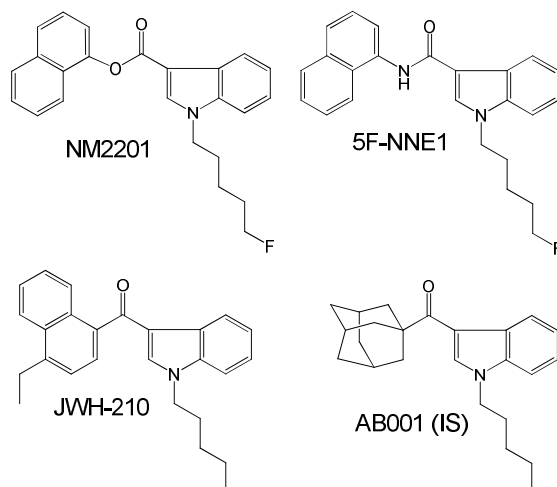


図 1. 本研究で用いた合成カンナビノイドの化学構造

(2) 8 - 10 週齢 C57BL/6J 雄性マウスに対して合成カンナビノイド溶液を 1.0 - 5.0 mg/kg で腹腔内投与し、1 h 経過後、頸椎脱臼法にて屠殺し、速やかに脳、肺、心臓、肝臓、腎臓及び脾臓の 6 臓器を摘出した。各臓器は摘出後ドライアイスで速やかに凍結させたのち、クライオスタットで 10 - 20 μm の薄切とし、導電性の indium tin oxide (ITO) コーティングスライドガラス上に貼付、乾燥させ IMS 用のプレパラートを作成した。MALDI 用マトリクスには -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 9-aminoacridine (9-AA), 1,5-diaminonaphthalene (1,5-DAN) 及び 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) を用い、加熱蒸着により塗布した。

IMS の分析条件

装置：島津製作所製 iMScope 試作機

マトリクス蒸着：島津製作所製 iMLayer

イオン化モード：MALDI (+)

質量分析部：飛行時間型 (TOF)

(3) 8 - 10 週齢 C57BL/6J 雄性マウスに対して JWH-210, NM2201 及び 5F-NNE1 溶液を 0.05 - 0.5 mg/kg で腹腔内投与し、0.5 - 4.0 h まで経時的に Bar Test にてカタレプシー持続時間を測定した。但し、計測時間は最大で 180 sec までとした。

4. 研究成果

(1) 各合成カンナビノイド JWH-210, NM2201, 5F-NNE1 及び内標準 AB001 を LC-MS-MS にて分析したところ、いずれも良好な分離を示した (図 2)。定量限界はいずれも 0.05 ng/mL で、0.05 - 50 ng/mL の濃度範囲で良好な直線性を示した。

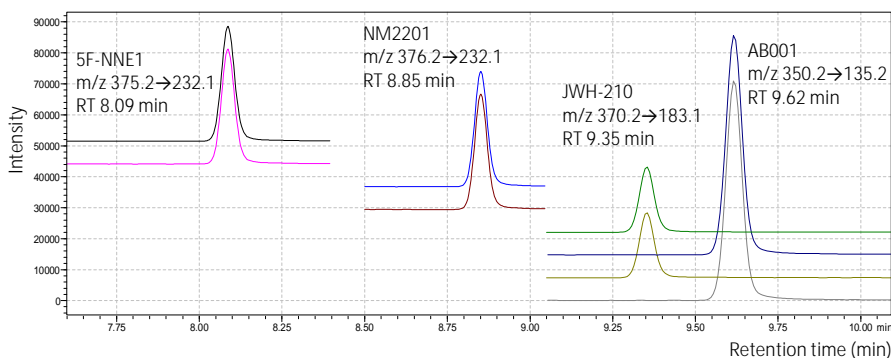


図 2. 合成カンナビノイドの MRM クロマトグラム

各合成カンナビノイドを 0.25 mg/kg で腹腔内投与したときの血中消失半減期は、JWH-210 が約 0.7 h、5F-NNE1 が約 0.8 h であった。構造中にエステル結合を有する NM2201 では消失速度が極めて速く、*in vivo* で正確に測定するのは困難であったが、計算上は約 12 min 程度の半減期と推察された。*in vitro* での文献値は 8 min とされていることから (X. Diaonet al., Foren Toxicol. 2017; **35**(1): 20-32)、参考値ではあるがほぼ妥当な数値であるものと判断される。これらの結果から、合成カンナビノイドは一般に排泄速度が早いことで知られているコカイン

(半減期約 1 h)と同レベルかあるいはそれ以上の速度で血中より消失する薬物であるものと推察される。特に、生体中に広く分布するカルボキシルエステラーゼの代謝を受ける可能性が考えられる NM2201 については、極めて短時間で血中から消失する可能性が示唆された。しかしながらその一方で、JWH-210、5F-NNE1、NM2201 の脳内半減期は、それぞれ約 2 h、約 2 h、約 1.8 h と、いずれも血中半減期と比較して大幅に延長した。これらの結果は、合成カンナビノイドが血中からは速やかに消失するものの、脳内では依然高濃度で存在して長時間にわたり薬理作用を発揮し続ける可能性を示唆するものである。

(2) JWH-210, NM2201, 5F-NNE1, AB001 の標準溶液をプレパラートに塗布し、マトリクス化合物として CHCA を用いてイメージング画像を測定したところ、いずれも十分な感度が得られなかった。また、マトリクスを DHB, 9-AA, 1,5-DAN に変更して検討を行ったが、いずれも不十分な結果であった。マトリクス膜厚の検討や液体スプレーによるマトリクス塗布も検討したものの劇的な感度向上は得られず、最終的に CHCA を用いて島津製作所製マトリクス蒸着装置 iMLayer で加熱蒸着する方法が最も高感度かつ簡便であった。感度不足を補うために薬物投与量を増やし、マウスに対して JWH-210 を 2.0 mg/kg で腹腔内投与し IMS 測定を行った。その結果、観察したすべての臓器について広く分布している様子が観察された。脳については、図 3 に示すようなイメージング画像が得られ、諸臓器と同様に JWH-210 は脳全体に分布しており、特に側脳室の脈絡叢において高濃度に局在している様子が観察された(図 3 右画像の矢印)。

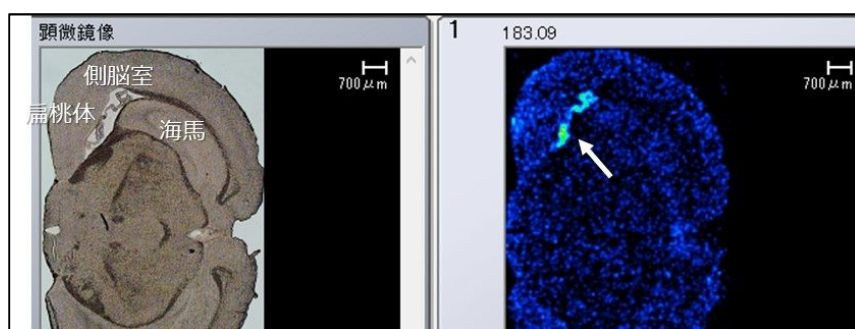


図 3. JWH210 投与後のマウス脳断片における顕微鏡像(左)と IMS 画像(右)

(3) JWH-210, NM2201 及び 5F-NNE1 を 0.05 - 0.5 mg/kg で腹腔内投与したマウスのうち、0.1, 0.25 及び 0.5 mg/kg で投与したマウスについては、いずれも投与後 4 h までに及ぶ著しいカタレプシーが観察された。5F-NNE1 を 0.25 mg/kg 投与した際、試みに 18 h 後のカタレプシー時間を計測したところ、依然として 60 sec 以上のカタレプシーが観察された。このような長時間にわたるカタレプシー惹起作用の発現は、これら薬物の血中消失半減期から考えると、不自然に長い持続時間であった。こうした血中濃度と有害作用発現時間の著しい乖離は、脳内におけるこれら合成カンナビノイドの消失半減期が血中と比較して著しく長いことが 1 つの要因と考えることができよう。すなわち、血中から薬物が速やかに消失したあとも脳内には依然として高濃度の薬物が存在し、薬理作用を発揮し続ける可能性が考えられる。脳内において消失半減期が長くなる理由については、現在のところ確たる結論に至っていないが、合成カンナビノイドは著しく脂溶性が高く脂肪組織に高濃度に蓄積するという性質から考えると、脂質含量が多い臓器である脳組織中に保持されやすいものと推察される。

今回検討した 3 物質に限らず、合成カンナビノイドは一般的に脂溶性が極めて高い薬物群であることから、他の合成カンナビノイドについても同様の問題が生じる可能性は十分に考えられる。特に、エステル構造を有する NM2201 については、血中消失半減期がごく短時間であるにもかかわらず、JWH-210 や 5F-NNE1 と遜色ないカタレプシー惹起作用を示しており、こうした研究結果を踏まえると、薬物の血中濃度が低いからと言って一概に薬物の影響下になかったとは言えないだろう。従って、薬物濫用者の摂取証明や事件当時の薬物による影響の有無を判断する際には、特に慎重に対応する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本智寛
2. 発表標題 危険ドラッグ成分のイメージング質量分析
3. 学会等名 第9回日本質量分析学会中部談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本智寛
2. 発表標題 C57BLマウスにおけるナフトイルインドール系合成カンナビノイドJWH-210のカタレプシー惹起作用
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本智寛
2. 発表標題 C57BLマウスにおける合成カンナビノイド化合物のカタレプシー惹起作用と消失半減期
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----