

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和3年6月28日現在

機関番号：  
 研究種目：奨励研究  
 研究期間：2020  
 課題番号：20H01133  
 研究課題名：光学活性を有する乱用薬物の立体選択的代謝反応の定量評価と法科学への応用

研究代表者  
 村上 貴哉 (MURAKAMI, Takaya)  
 石川県警察本部科学捜査研究所・専門研究員

交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：400,000 円

研究成果の概要： $\alpha$ -ピロリジノアルキルフェノン系カチノン類の基本構造である  $\alpha$ -pyrrolidinopropiophenone ( $\alpha$ -PPP) のラセミ体をヒト肝マイクロソーム (HLM) で *in vitro* 代謝処理し、光学活性代謝物の定量分析を行った。カルボニル還元代謝物の各エナンチオマーの生成量は明確に異なり、特に(S,S)体の生成が顕著であった。オキシ化代謝物の総生成量はカルボニル還元代謝物の総生成量と比較して極めて小さかった。ヒト肝サイトゾル (HLC) の代謝試験では、いずれの代謝物の生成量も HLM 代謝に比べて小さかったことから、カルボニル還元およびオキシ化代謝反応は肝小胞体代謝酵素の寄与によるものと判断された。

### 研究成果の学術的意義や社会的意義

カチノン類のエナンチオマーまで考慮した詳細な代謝反応を明らかにすることができた。本研究で示された立体選択的カルボニル還元代謝反応の知見は、ヒト肝小胞体に発現する代謝酵素の新たな機能を解明する一助となり得ると考えられる。また、本知見に基づけば、薬物の摂取時期推定など法科学分野への応用も期待できる。

研究分野：法薬物学 法中毒学 法化学

キーワード：危険ドラッグ カチノン類 エナンチオマー 薬物代謝 カルボニル還元  
 液体クロマトグラフィー キャピラリー電気泳動 質量分析

### 1. 研究の目的

危険ドラッグの主たる薬物群であるカチノン類の代謝機構は、これまでの代謝研究によってほぼ解明されたものの、カチノン類そのものやその代謝物はいずれも光学活性を有しており (図1)、各エナンチオマーの代謝量まで個々に定量評価した報告は今のところ見当たらない。もしエナンチオマー間で代謝変化量や量比に明確な差異があるならば、これまで未知であったカチノン類の立体選択的なヒト代謝挙動を明らかにできることに加え、その差異を指標とした薬物の摂取時期推定法の開発など法科学的な応用も期待できる。

危険ドラッグとして出回っているカチノン類はすべてラセミ体であることが知られている。本研究では、 $\alpha$ -ピロリジノアルキルフェノン系カチノン類の基本構造である  $\alpha$ -pyrrolidinopropiophenone ( $\alpha$ -PPP) のラセミ体を基質として、ヒト肝マイクロソーム (HLM) やヒト肝サイトゾル (HLC) を用いて *in vitro* 代謝させ、光学活性代謝物であるカルボニル還元体 (OH- $\alpha$ -PPP) およびオキシ化体 (2''-oxo- $\alpha$ -PPP) の生成量を定量評価し、 $\alpha$ -PPP の第 I 相反応における立体選択的な代謝プロファイルを明らかにした。

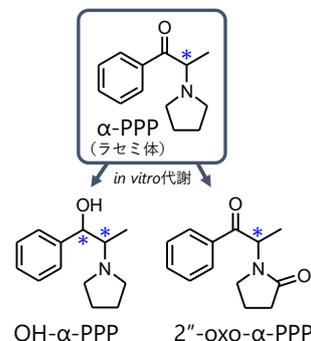


図1.  $\alpha$ -PPP の第 I 相代謝反応

### 2. 研究成果

#### (1) 実験方法

##### ① 試薬

標準試薬として、1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)propan-1-one ( $\alpha$ -pyrrolidinopropiophenone,  $\alpha$ -PPP), 1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)propan-1-ol (OH- $\alpha$ -PPP), 1-phenyl-2-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)propan-1-one

(2''-oxo- $\alpha$ -PPP)の各エナンチオマー8化合物を以下のとおり取り揃えた。

$\alpha$ -PPP(ラセミ体)は塩酸塩として試薬会社から購入した。OH- $\alpha$ -PPPと2''-oxo- $\alpha$ -PPP(いずれもラセミ体)は合成により得た。日本分光製高速液体クロマトグラフ LC-2000plus およびダイセル製多糖誘導体コーティング型キラルカラム(順相用) CHIRALCEL OD-3 (4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm, 粒子径 3  $\mu$ m), OD-H (10 mm i.d.  $\times$  250 mm, 粒子径 5  $\mu$ m)を用いて  $\alpha$ -PPP, OH- $\alpha$ -PPP, 2''-oxo- $\alpha$ -PPP の各ラセミ体を光学分割し、日本分光製旋光計 P-1020 を用いて比旋光度測定を行い、文献に基づき立体配置を決定した。

ヒト肝組織画分である HLM, HLC については、平均的なヒト代謝活性パターンの取得および再現性向上を目的として、昨年度の奨励研究課題(No.19H00471)で用いたもの(50 ドナー)よりもプールサイズの大きい 150 ドナーのものを購入・使用した。

## ② *in vitro* 代謝反応と試料前処理

$\alpha$ -PPP 塩酸塩(ラセミ体)を 0.1M リン酸緩衝液に溶解し、NADPH 再生系試薬を添加後、ブレインキューベーションののち、HLM または HLC を加えて 37°C で一定時間(0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min)インキュベートした。反応終了後、内部標準(IS)として(S)-(-)-1-phenylethylamine (1-PEA)を含有するメタノール(MeOH)溶液を加えて除タンパク処理し、遠心分離後、その上澄を分析試料とした。

## ③ 液体クロマトグラフィー(LC)条件

**分析装置** 島津製作所製高速液体クロマトグラフ UFLC20A

**LC 条件** カラム: ダイセル製多糖誘導体耐溶剤型キラルカラム CHIRALPAK IA, IB N-5, IC, ID, IE, IF, IG, IH (4.6 mm i.d.  $\times$  15 cm, 粒子径 5  $\mu$ m), IG-3 (4.6 mm i.d.  $\times$  25 cm, 粒子径 3  $\mu$ m), 多糖誘導体コーティング型キラルカラム(逆相用) CHIRALPAK AY-RH, CHIRALCEL OD-RH, OJ-PH, OZ-RH (4.6 mm i.d.  $\times$  15 cm, 粒子径 5  $\mu$ m), カラム温度: 25°C, 移動相: アセトニトリル(ACN)-ジエチルアミン(DEA) (100:1, v/v), MeOH-DEA (100:1, v/v) または MeOH-2-プロパノール(2-PrOH)-DEA (70:30:0.1, v/v/v) のアイソクラティック, 流速: 0.4 または 0.8 mL/min, 検出器: フォトダイオードアレイ検出器, 検出波長: 205 nm, 注入量: 5  $\mu$ L

## ④ 液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)条件

**分析装置** 島津製作所製高速液体クロマトグラフ UFLC20A/Thermo Fisher Scientific 製リニアイオントラップ型質量分析装置 LXQ

**LC 条件** カラム: CHIRALPAK IG-3 (2.1 mm i.d.  $\times$  15 cm, 粒子径 3  $\mu$ m), カラム温度: 25°C, 移動相: MeOH, MeOH-2-PrOH-DEA (70:30:0.1, v/v/v), MeOH-2-PrOH (70:30, v/v), MeOH-DEA (100:0.1, v/v) または MeOH-H<sub>2</sub>O (98:2, 95:5, 90:10, 70:30, v/v) のアイソクラティック, 流速: 0.2 mL/min, 流入量: 1  $\mu$ L

**MS 条件** イオン化法: エレクトロスプレーイオン化法(ESI, positive), 分析モード: プロダクトイオンスキャン, コリジョンガス: Ar

## ⑤ キャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)条件

**分析装置** Agilent Technologies 製キャピラリー電気泳動装置 7100/トリプル四重極型質量分析装置 6470A

**CE 条件** キャピラリー: フューズドシリカキャピラリー素管(50  $\mu$ m i.d.  $\times$  100 cm), キャピラリー温度: 25°C, 印加電圧: +30 kV, 泳動液: heptakis(2,3-diacetyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin (1.2mM) および highly sulfated  $\gamma$ -cyclodextrin (0.4 mM) を含有する 1 M ギ酸-1 M ギ酸アンモニウム水溶液(50:1, v/v, pH 2.0), 試料注入: 50 mbar  $\times$  10 s

**MS 条件** イオン化法: ESI (positive), シース液: 10 mM 酢酸アンモニウム-MeOH(1:1, v/v, 8  $\mu$ L/min), 分析モード: 多重反応モニタリング(MRM, 表 1), データ取込時間: 40 ms, コリジョンガス: N<sub>2</sub>

表 1. CE-MS の MRM トランジション条件

Compound	Ion	Transition		FV <sup>a</sup> (V)	CE <sup>b</sup> (V)	CAV <sup>c</sup> (V)
		Q1 (m/z)	Q3 (m/z)			
$\alpha$ -PPP	QT <sup>d</sup>	204	105	110	29	4
	QL <sup>e</sup>		98	110	25	4
OH- $\alpha$ -PPP	QT	206	188	110	21	4
	QL		72	110	17	4
2''-Oxo- $\alpha$ -PPP	QT	218	105	110	13	4
	QL		133	110	25	4
1-PEA (IS)	QT	122	105	50	33	4
	QL		77	50	9	4

<sup>a</sup>フラグメンター電圧 <sup>b</sup>コリジョンエネルギー <sup>c</sup>セル加速電圧

<sup>d</sup>定量イオン <sup>e</sup>定性イオン

(2) 結果および考察

① 一斉分析可能なキラルカラムの選定と LC 分析法の最適化

移動相を ACN-DEA (100:1, v/v) または MeOH-DEA (100:1, v/v) のアイソテック (流速 0.8 mL/min) として、キラルカラム IA, IB N-5, IC, ID, IE, IF, IG, IH, AY-RH, OD-RH, OJ-PH, OZ-RH (4.6 mm i.d. × 15 cm, 粒子径 5 μm) の 12 種を用いて OH-α-PPP および 2''-oxo-α-PPP の各エナンチオマー計 6 化合物の LC 分離能を比較した。

移動相 ACN-DEA では、いずれのカラムでも OH-α-PPP の 4 化合物を溶出させることはできなかった。移動相 MeOH-DEA でも、IG, OJ-RH を除く 10 種のカラムで OH-α-PPP の 4 化合物のうちいずれかが溶出しなかった。一方、IG, OJ-RH では、ベースライン分離とまでは難しいものの、6 化合物をすべて分離して検出することができた。分離度は IG の方が優れていた。

そこで、6 化合物のさらなる高分離化のため、カラム長 25 cm, 粒子径 3 μm の IG-3 カラムを用い、移動相を MeOH-2-PrOH-DEA (70:30:0.1, v/v/v) のアイソクラテック、流速を 0.4 mL/min としたところ、さらに高い分離度で一斉検出することに成功した (図 2)。

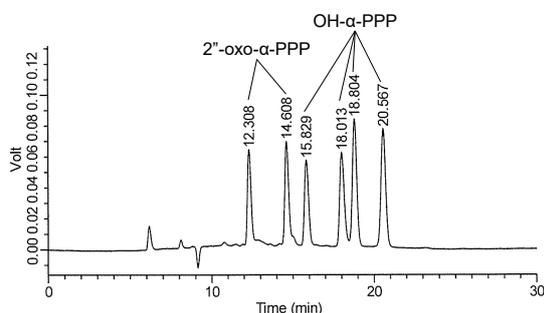


図 2. 以下の最適化条件で得られたクロマトグラム [カラム: IG-3 (4.6 mm i.d. × 25 cm, 粒子径 3 μm), 移動相: MeOH-2-PrOH-DEA (70:30:0.1, v/v/v), 流速: 0.4 mL/min]

② LC-MS による一斉分析法の検討

上記①の分析法では検出感度が低く、代謝物分析への適用が困難であったため、LC-MS による高感度一斉分析法の検討を試みた。α-PPP, OH-α-PPP, 2''-oxo-α-PPP の各エナンチオマー計 8 化合物を分析対象とし、上記①で良好な分離能を示した IG-3 カラムおよび MeOH-2-PrOH-DEA (70:30:0.1, v/v/v) の移動相条件で分析したところ、α-PPP と OH-α-PPP は検出・キラル分離可能であったが、2''-oxo-α-PPP を検出することはできなかった。移動相を MeOH-2-PrOH (70:30, v/v) あるいは MeOH-DEA (100:0.1, v/v) とした場合でも同様の結果であったことから、2-PrOH および DEA はともに 2''-oxo-α-PPP のイオン化を著しく阻害させることがわかった。一方、移動相を MeOH とした場合、α-PPP と OH-α-PPP をキラル分離することはできなかったが、2''-oxo-α-PPP を検出・キラル分離することは可能であった。さらに、移動相 MeOH に各体積比 (2, 5, 10, 30 vol%) で水を添加したところ、MeOH-H<sub>2</sub>O (95:5, v/v) で最も高い 2''-oxo-α-PPP のイオン化効率およびキラル分離度を達成した。

③ CE-MS による一斉分析法の評価

上記②の分析法は標準溶液では高感度に検出可能だが、代謝反応後の除タンパク処理で得られた分析試料では夾雑成分の影響により分析対象を検出することは困難であった。そこで、フェネチルアミン系薬物のキラル分離分析に有利な CE-MS を用いて定量分析を行うこととした。本分析法では α-PPP と OH-α-PPP の各エナンチオマー 6 化合物のキラル分離は可能だが、2''-oxo-α-PPP のキラル分離は未達であった。

HLM マトリクス下における分析法バリデーション試験の結果、検量線は各分析範囲内で良好な直線性 (相関係数  $\gamma > 0.9993$ ) を示し、精度 (%RSD) 12% 以下、真度 (%RE)  $\pm 10\%$  以内と十分な分析能を有することがわかった (表 2)。

表 2. 分析法バリデーション結果

Compound	Calibration range (ng/mL)	Correlation coefficient ( $\gamma$ )	Precision (%RSD)		Accuracy (%RE)	
			Conc. level <sup>a</sup>		Conc. level <sup>b</sup>	
			Low	High	Low	High
(S)-α-PPP	100-10000	1	5.1	3.8	-2.1	-0.03
(R)-α-PPP	100-10000	1	4.6	4.2	-2.1	-0.03
(S,S)-OH-α-PPP	10-1000	0.9999	7.2	4.3	0.8	0.4
(R,S)-OH-α-PPP	2-100	0.9993	5.9	12	10	-0.2
(R,R)-OH-α-PPP	2-100	0.9995	5.1	8.9	8.5	-0.2
(S,R)-OH-α-PPP	2-100	0.9994	4.8	6.5	9.5	-0.2
2''-Oxo-α-PPP	2-100	0.9998	4.3	7.1	0.6	-0.1

<sup>a</sup> (S)-, (R)-α-PPPs, (Low) 500 ng/mL (High) 10000 ng/mL; (S,S)-OH-α-PPP, (Low) 100 ng/mL (High) 1000 ng/mL; (R,S)-, (R,R)-, (S,R)-OH-α-PPPs and 2''-oxo-α-PPP, (Low) 5 ng/mL (High) 100 ng/mL.

<sup>b</sup> (S)-, (R)-α-PPPs, (Low) 500 ng/mL (High) 10000 ng/mL; (S,S)-OH-α-PPP, (Low) 100 ng/mL (High) 1000 ng/mL; (R,S)-, (R,R)-, (S,R)-OH-α-PPPs and 2''-oxo-α-PPP, (Low) 10 ng/mL, (High) 100 ng/mL.

#### ④ *in vitro* 代謝による光学活性代謝物の生成量評価

$\alpha$ -PPP(ラセミ体)を NADPH 要求性酵素活性条件下で HLM 代謝処理し、上記③の分析法で定量分析を行った。OH- $\alpha$ -PPP の各エナンチオマーの生成量は(S,R) < (R,S) < (R,R) < (S,S)と明確な差異を示し、*anti* 体に比べ *syn* 体の方が生成しやすく、特に(S,S)体の生成が顕著であった(図 3a)。また、(S)- $\alpha$ -PPP のカルボニル還元体として考えられる(S,S)体と(R,S)体の総量は、(R)- $\alpha$ -PPP のカルボニル還元体である(R,R)体と(S,R)体の総量よりも大きく上回っていたことから、カルボニル還元代謝反応は(R)- $\alpha$ -PPP よりも(S)- $\alpha$ -PPP の方が進行しやすいことがわかった(図 3a)。2''-oxo- $\alpha$ -PPP の生成量は OH- $\alpha$ -PPP と比べて極めて小さかった(図 3b)。HLC の代謝実験系では、いずれの代謝物の生成量も HLM 代謝系に比べて小さかったことから、カルボニル還元およびオキシ化代謝反応は肝小胞体に局在する代謝酵素の作用が支配的であると考えられた。

なお、第 I 相反応の代謝物の大部分が OH- $\alpha$ -PPP および 2''-oxo- $\alpha$ -PPP であると仮定して算出された  $\alpha$ -PPP の *in vitro* 肝固有クリアランスは 0.51  $\mu$ L/mg protein/min であり、well-stirred model によりスケールアップした *in vivo* 肝クリアランスは 0.45 mL/kg/min と算出された。

以上、本研究によってヒトの第 I 相反応における立体選択的なカルボニル還元代謝の生起を明らかにすることができた。今後は、ヒト肝細胞による代謝試験や *in vivo* 代謝実験により、本結果の妥当性を検証した上で、OH- $\alpha$ -PPP の各エナンチオマーの経時的代謝変化量や量比の差異などから薬物の摂取時期推定に資する指標を探索し、実際のヒト試料への適用可能性を評価する。

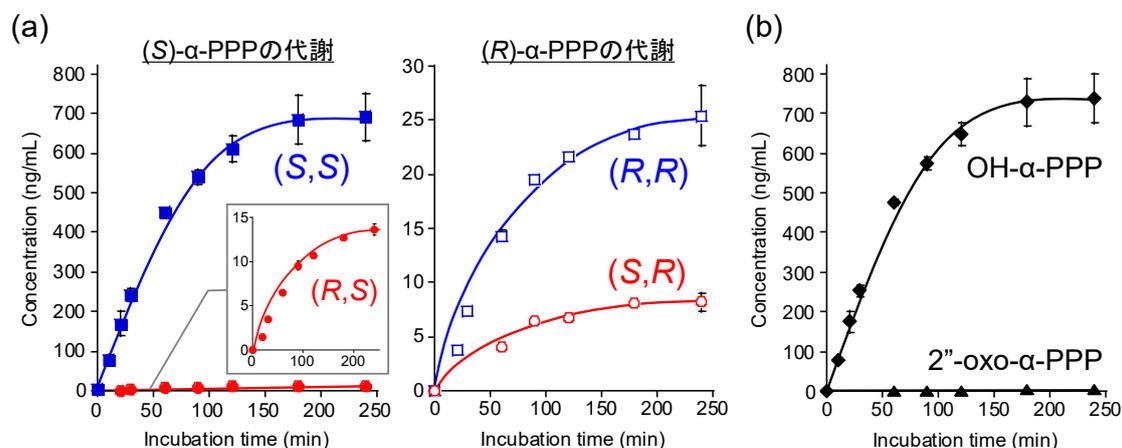


図 3.  $\alpha$ -PPP(ラセミ体)の HLM 代謝試験における (a) OH- $\alpha$ -PPP の各エナンチオマーの生成量比較 (b) OH- $\alpha$ -PPP と 2''-oxo- $\alpha$ -PPP の生成量比較 (縦軸は CE-MS に供した分析試料中の濃度を示す)

### 3. 主な発表論文等

### 4. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：石丸 麗子、神田 康司、大塚 尚哉、榎山 儀恵

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。