

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890088

研究課題名(和文) 薬毒物動態学的アプローチによる合法ハーブの毒性解明

研究課題名(英文) Analysis of the toxicity of illegal herbals with approach of pharmacokinetics and toxicology

研究代表者

池村 真弓 (IKEMURA, Mayumi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30515490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では合法ハーブの成分分析を行い、合法ハーブの吸引量と血中濃度相関および毒性相関を示すことを目的とした。

その結果、入手した合法ハーブから入手時に規制対象であったJWH-203が検出され、合法ハーブには規制対象化合物が含有される可能性が明らかになった。また合法ハーブは死亡しない量の使用では、血中から検出されにくい可能性がある一方で、使用された合法ハーブの種類によって、体内動態および毒性が全く異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyze the component of illegal herbals and investigate the correlation among the respiratory intake of illegal herbals, blood concentration and toxicity. We detected the regulated compound, "JWH-203", from the illegal herbals obtained in our laboratory, suggesting that the illegal herbals should contain the regulated compounds. It is suggested that the pharmacokinetics and toxicity of illegal herbals may differ depending on the variety, whereas the component of illegal herbals may not be detected in blood with lethal doses.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：合法ハーブ 薬物動態 乱用薬物 JWH - 203 M P H P

1. 研究開始当初の背景

我が国は第三次薬物乱用期といわれ、薬物事犯の増加が社会問題となっているが、その対照薬物は、覚醒剤、大麻だけでなく、MDMA に代表される合成麻薬等多岐に渡っている。そのうち、違法ドラッグ(いわゆる合法ドラッグ)は、「麻薬または向精神薬には指定はされていないが、それと類似の有害性が疑われる物質であって、人に乱用させることを目的として販売等がされるもの」と定義される。すなわち向精神薬類似作用をもつ天然物や指定薬物に類似構造をもつ化合物であるが、中には指定薬物よりも有害な物質が含まれる場合があり、規制の厳格化が急がれるも、新規類似物質の出現は後を絶たず含有成分や毒性等の実態は不明な点が多い。

合法ハーブは違法ドラッグのひとつに分類され、主に観賞用やお香として急速に流通が拡大している植物である。近年、それらの成分分析により、多くの製品で合成カンナビノイドや誘幻覚化合物が検出されたとの報告があるものの、成分や含有量など詳細はいまだ不明な点が多い。主に吸引や摂食によって人体へ摂取されるが、一般に遅効性のため過量摂取される危険性が高く、それらが原因と考えられる救急搬送例が急増し、死亡事例が報告されるなど、国内外で乱用が問題となっている。また、成分が既知の合法ハーブを摂取したヒトの尿を、TLC 試験及び GC/MS により詳細に分析を行っても、それらの成分や代謝物が検出されないことがあるなど、体内での薬物の蓄積性など薬物の体内動態については不明なままであり、中毒量や致死量も全く明らかにされていない。さらに実際の合法ハーブ吸引時の煙中の成分濃度と血中濃度から体内吸収率を検討した報告はなく、血液や尿など生体試料の薬毒物検査から合法ハーブ乱用を確証する根拠となる情報はまだ乏しい。

2. 研究の目的

本研究では、(1)合法ハーブの成分分析、(2)培養細胞を用いた合法ハーブの細胞毒性および有害成分同定、(3)ラットを用いた合法ハーブ吸引時における血中および臓器中薬物濃度と脳内モノアミン変動の3点を明らかにし、合法ハーブの血中濃度と吸引量および毒性相関を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)合法ハーブの成分分析

合法ハーブの成分分析
入手した合法ハーブを細切後、水、エタノール、アセトン溶媒にて還流抽出し、ロータリーエバポレーターを用いて蒸発乾固させて合法ハーブ抽出液を得、それらにつきカラムクロマトグラフ法、分取ハクソウク

ロマトグラフ法にて成分分離、回収を繰り返して、単離、精製を行う。得られた単離成分についてガスクロマトグラフ質量分析計等を用いて、成分の同定を行う。

機器分析条件の確立

成分分析の結果を基に、1製品中の全成分をガスクロマトグラフ質量分析計にて一斉分析する分析条件を確立する。

(2) 培養細胞を用いた合法ハーブの細胞毒性および有害成分同定

ドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞、セロトニン系培養神経細胞 B65 細胞、ラット心臓由来 H9c2 細胞、肺上皮モデル細胞 A549 細胞、これら4系統の細胞を用いて、それぞれ合法ハーブ抽出液暴露実験(時間依存、濃度依存)を行い次の項目を検討し、細胞毒性を評価する。

細胞死と細胞溶解を定量する培養上清中乳酸脱水素酵素活性測定、ミトコンドリア傷害を定量する MTT アッセイ、リソソーム傷害を定量する neutral red アッセイを行い、細胞傷害および傷害部位を検討する。

カルチャースライド上に暴露実験後の細胞を固定し、H.E.染色や TUNEL 染色等の免疫染色を行い、形態学的変化を観察する。

細胞死が確認されたものは、蛍光マイクロビーズ式多項目同時バイオアッセイシステム Luminex[®] 200[™] (Luminex Japan、現有)にて培養上清中の腫瘍壊死因子 Tumor Necrosis Factor (TNF)- α 、炎症性サイトカイン interleukin (IL)-6、IL-10 等を定量する。

(3) ラットを用いた合法ハーブ吸引時における血中および臓器中薬物濃度と脳内モノアミン変動

Wistar 系雄性ラット(CLEA Japan)の右頸静脈に自由行動下での採血用にカニューレション処置を施し、合法ハーブを焚いた気密容器内で一定時間暴露させ、血液および臓器を採取する。

【薬毒物動態学的評価:TK】暴露中の大気、血液検体および臓器検体はそれぞれ適当な前処理の後、合法ハーブ成分濃度を測定する。

【薬毒物力学的評価:TD】脳は側坐核、大脳基底核、前頭葉皮質、縫線核など各部位に分画し、Micro Smash[™](MA-100:TOMY、現有)にて粉碎し、市販の ELISA キットを利用してドパミンおよびセロトニン濃度を定量する

4. 研究成果

合法ハーブはインターネットの通信販売を利用して平成 24 年度内に入手した。入手した合法ハーブ約 9g より約 1.4g のハーブ抽出液を得、その後、クロロホルム、メタノール等適宜溶媒選択を行い、カラムクロマトグラムおよび分取薄層クロマトグラムにて抽出液の成分単離および精製を行い、最終的に 9

画分の分離画分液を得た。これらにつき質量分析計付きガスクロマトグラムにて成分分析を行ったところ、3画分より合成カンナビノールである 2-(2-chlorophenyl)-1-(1-pentyl-1H-indol-3-yl)-ethanone (JWH-203) が検出された。JWH-203 は平成 23 年に規制薬物に指定されており、当該ハーブは入手時には規制対象製品であったことが明らかとなり、合法ハーブ製品に規制薬物が含有されている可能性が示唆された。さらに同ハーブの分析から、他規制薬物と類似骨格をもち、合法ハーブに添加されていると推察される化合物が JWH-203 の検出された 3 画分から検出されていたが構造決定には至らず、計画していたその後の細胞および実験動物を用いた合法ハーブの毒性解明の研究に着手することができなかった。他の 6 画分から検出された成分は色素等、合法ハーブに用いられた植物由来の成分であった。また、合法ハーブの成分単離実験と並行して、ラットにおける合法ハーブ吸引実験と合法ハーブ使用者の血液および、合法ハーブを使用後に死亡したと推察される者の血液分析を行った。ラットの吸引実験では、成分分析実験と同じ合法ハーブを用い、約 10 分間合法ハーブを焚いた煙を吸引させた。吸引開始より 15 分後および 60 分後にペントバルビタール麻酔下にて腹部大動脈より血液を採取し、JWH-203 濃度を測定した。吸引開始直後、ラットの行動量は著しく低下した後ケージ内を後退にて動き回る等の異常行動が認められたものの、吸引開始 15 分後の血液分析では JWH-203 およびその代謝物等、特異的成分は検出されなかった。また吸引開始 60 分後ではラットの異常行動は認められず、血液分析においても特異的成分は認められなかった。さらに、合法ハーブ使用者の血液分析では使用者よりハーブ製品の提供を受け、質量分析計付きガスクロマトグラフにてそれらのハーブ抽出液と血液のクロマトグラムを比較する事により分析を行った。その結果、合法ハーブの分析では合成カンナビノイド類が検出されたものの、血液中からは特異的な成分は検出されなかった。一方、死亡事例では 4'-Methyl- α -pyrrolidinohezanophenone (M PHP) とその代謝物および類似構造化合物を 4 種類検出した。これらの結果より、合法ハーブは死亡しない量の使用では、向精神性が得られても血中濃度が非常に低い可能性や、代謝が非常に速く血中から検出されにくい可能性がある一方で、使用された合法ハーブの種類によって、体内動態および毒性が全く異なる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Haruka Mannou、Mayumi Ikemura、Yasuhisa Nakagawa、Masayuki Nata、Hiromasa Inoue. An autopsy case of serotonin toxicity resulting from suicidal administrations of fluvoxamine and lithium. *Rom J Leg Med* 2014; 22: 59-62. 査読有

Inoue H, Nakagawa Y, Ikemura M, Usugi E, Kiyofuji Y, Nata M. Acute brainstem compression by intratumoral hemorrhages in an intracranial hypoglossal schwannoma. *Leg Med (Tokyo)*. 2013 Sep;15(5):249-252. 査読有

鈴木有芽、井上裕匡、中川泰久、池村真弓、臼杵恵梨、那谷雅之. 死体血における簡易 CPR 検査の利点および問題点. *法医学の実際と研究*. 2012; 55: 91-97. 査読有

Inoue H, Nakagawa Y, Ikemura M, Usugi E, Nata M. Molecular-biological analysis of acute lung injury (ALI) induced by heat exposure and/or intravenous administration of oleic acid. *Leg Med (Tokyo)*. 2012 Nov; 14(6): 304-308. 査読有

Ikemura M, Nakagawa Y, Shinone K, Inoue H, Nata M. The blood concentration and organ distribution of haloperidol at therapeutic and toxic doses in severe fatty liver disease. *Leg Med (Tokyo)*. 2012 May; 14(3): 147-153. 査読有

[学会発表](計 10 件)

池村真弓、山本好男、中川泰久、清藤佑馬、臼杵恵梨、那谷雅之、井上裕匡. 海外製ゾピクロン製剤の品質検討、第 60 回日本法医学会学術近畿地方集会、2013 年 11 月 16 日、近畿大学(大阪)

清藤佑馬、中川泰久、井上裕匡、池村真弓、臼杵恵梨、那谷雅之. スポーツ飲料摂取後の熱暴露による脳幹への影響の分子病態学的検討、第 20 回日本未病システム学会学術総会、2013 年 11 月 9-10 日、一橋大学一橋講堂学術総合センター(東京都)

臼杵恵梨、中川泰久、池村真弓、井上裕匡、清藤佑馬、那谷雅之. serotonin syndrome モデルラットを用いた Fluvoxamine の心保護作用とそのメカニズム、第 35 回日本法医学会学術中部地方集会、2013 年 10 月 12 日、金沢医科大学(石川)

後藤広樹、池村真弓、清藤佑馬、臼杵恵梨、中川泰久、井上裕匡、那谷雅之。胃内容物に対する簡易薬毒物検査キット Instant View™ M-1 の信頼性の検討、日本法中毒学会第 32 年会、2013 年 7 月 5 日-6 日、さわやかちば県民プラザ（千葉県）

中川泰久、井上裕匡、井上考司、平光正典、岡田美紀、臼杵恵梨、清藤佑馬、池村真弓、那谷雅之。熱暴露に対する事前の電解質飲料摂取の有効性の分子病態学的検討、第 97 次日本法医学会学術全国集会、2013 年 6 月 26 日-28 日、ロイトン札幌（北海道）

清藤佑馬、中川泰久、井上裕匡、池村真弓、臼杵恵梨、那谷雅之。電解質飲料摂取後の高温暴露に基づく脳幹の分子病態学的検討、第 97 次日本法医学会学術全国集会、2013 年 6 月 26 日-28 日、ロイトン札幌（北海道）

池澤宗成、大阪優、中川泰久、井上裕匡、池村真弓、臼杵恵梨、清藤佑馬、那谷雅之。上腕骨近位端骨髓腔頂の位置および恥骨結合面の性状による年齢推定法の再考。第 59 回日本法医学学術近畿地方集会。2012 年 11 月 10 日京都府立医科大学（京都）

井上裕匡、中川泰久、池村真弓、臼杵恵梨、清藤佑馬、那谷雅之。舌下神経鞘腫内出血による脳幹圧迫の死亡例。第 34 回日本法医学会学術中部地方集会。2012 年 10 月 13 日、信州大学（長野）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
池村 真弓 (IKEMURA, Mayumi)
三重大学・医学系研究科・助教
研究者番号：30515490

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：