

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17413

研究課題名(和文) 危険ドラッグ5F-ADBの毒性解析・薬物動態とメタボローム解析によるアプローチ

研究課題名(英文) Investigation of 5F-ADB Toxicity through Pharmacokinetics and Metabolomics

研究代表者

草野 麻衣子 (Kusano, Maiko)

名古屋大学・環境医学研究所・特任助教

研究者番号：60733574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：合成カンナビノイド5F-ADB及びその主代謝物であるエステル加水分解代謝物M1について、QuEChERS-STQ法と高速液体クロマトグラフィー四重極飛行時間型質量分析(LC/Q-TOFMS)によるヒト臓器中5F-ADB及びM1の定量分析法を構築し、分析バリデーションを行った。5F-ADBはカルボキシルエステラーゼ(CES)、特にCES1によって加水分解されることから、CES1の発現が異なる臓器を対象としてヒト臓器中5F-ADB及びM1濃度を比較し、ヒトにおけるCES1の発現が異なる臓器間での代謝との相関を明らかにした。

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乱用の急増以降、国内外では新規合成カンナビノイド及び代謝物の同定と代謝経路の推定、CB受容体への親和性評価などが行われてきた。しかし、5F-ADBを含むエステル・アミド基を有する合成カンナビノイドについては、代謝酵素(特にCES)の発現が異なる臓器間での代謝との相関に関する研究はこれまでに報告がない。合成カンナビノイドは類似した基本骨格を有する化合物が多いことから、他の合成カンナビノイドにも拡張できることが期待されるため、臓器間におけるCESの発現と5F-ADB濃度の相関を明らかにすること、及び毒性評価は、法医学・薬物代謝学・社会医学の観点からも非常に意義のあるものである。

研究成果の概要(英文)：5F-ADB is an indazole-type synthetic cannabinoid (SC) that has been associated with several acute and fatal intoxication cases since 2015. It has extremely high affinity for CB1 receptor and is one of the most potent SCs to date, posing substantial risk and harm to the public health.

The major metabolic pathway of 5F-ADB appears to be the rapid enzymatic hydrolysis by carboxylesterases (CES). The purpose of this study was to investigate the contribution of human CES to the abundance of 5F-ADB and its ester hydrolysis metabolite M1 in various tissue specimens in human and mice. Sample pretreatment by QuEChERS-STQ method combined with LC/Q-TOFMS was used to develop a quantitative analysis method and validated.

研究分野：分析化学

キーワード：分析化学 LC/Q-TOFMS 薬物抽出 危険ドラッグ 合成カンナビノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「危険ドラッグ」と呼ばれている新規乱用薬物の代表例として、カンナビノイド受容体 (CB₁あるいはCB₂)を介して作用する合成カンナビノイドがあるが、新規合成カンナビノイドはCB₁への親和性が極めて高く、急性毒性が強いことが示されている。特にフッ素がアルキル鎖末端に置換された合成カンナビノイドはCB₁受容体への親和性が極めて高いとされている。また、血中における未変化体の検出は困難とされており、その理由としては、速やかな代謝や脂溶性が高いため脂肪組織などへの臓器蓄積、死後再分布等が推定される。

合成カンナビノイドの代謝は、主に酸化還元酵素シトクロム P450 (CYP) による酸化が知られているが、アミドやエステル結合を有する化合物は主としてカルボキシエステラーゼ (CES) によって加水分解されることが報告されている¹⁾。インダゾールカルボキシアミド系合成カンナビノイド 5F-ADB は急性毒性が極めて高く、研究代表者は以前、剖検試料より検出した血中 5F-ADB 濃度が 0.19 ng/mL と極めて低値であることを報告した²⁾。5F-ADB はCESによって速やかに加水分解されることが推定され、研究代表者は 5F-ADB の主代謝物がエステル結合の加水分解物 (M1) であることも確認していた²⁾。

CES の発現は臓器によって異なり、特に CES1 は主に肝臓と肺に多く存在する。そのため、CES1 の発現が高い臓器中の 5F-ADB 未変化体の分布は血液同様に極めて低く、反対に M1 の分布は高いと推定され、一方、脳や脂肪組織は CES1 の発現が低い臓器であり、これらの臓器においては未変化体の分布は高く、M1 の分布は低いことが想定された。CES1 の発現が異なる臓器間での代謝との相関に関する報告はヒトでも *in vivo* 実験系でもされておらず、上記の仮説を明らかにするため、ヒト及びマウス臓器中から 5F-ADB 及び M1 を効率的に抽出し、高感度に検出・定量が可能な分析法の構築が求められた。

2. 研究の目的

(1) 合成カンナビノイド 5F-ADB 及び M1 について、急性中毒事例の剖検試料から採取した肝臓・肺・脳等の臓器中 5F-ADB 及び M1 濃度を測り、5F-ADB の薬物動態の解明を目的とした。その際に必要となる、高速液体クロマトグラフィー-四重極飛行時間型質量分析 (LC/Q/TOFMS) を用いた定量分析法の構築及び分析バリデーションによる評価も目的とした。

(2) 剖検試料 (ヒト由来サンプル) と併せて、マウスに 5F-ADB を投与した *in vivo* 実験を行い、CES の発現が異なる臓器中の濃度と体内分布との相関を調べることを目的とした。

(3) 5F-ADB 及び M1 の薬理作用について、毒性を及ぼすのが 5F-ADB 未変化体なのか、あるいは主代謝物 M1 が活性代謝物であるのか、5F-ADB のその強い毒性に寄与するものの解明と、*in vivo* 実験系を用いて表現型変化を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 解剖時に採取された臓器 (肝臓・肺・脂肪組織・脳) に対して 5F-ADB 及び M1 を添加し、QuEChERS 法を用いて臓器中 5F-ADB 及び M1 抽出法の条件検討を行った。その後、内部標準法による定量分析の構築と分析バリデーションを行った。定量分析法構築後、5F-ADB による急性中毒死事例の剖検試料を用いて測定し、CES の発現が高い臓器 (肺・肝臓) と低い臓器 (脳・脂肪組織) における 5F-ADB 及び M1 の濃度を調べた。

試料

解剖時に採取された臓器 (肝臓・肺・脂肪組織・脳) 0.5 g に 5F-ADB 及び M1 を添加し、QuEChERS 法を用いて前処理を実施した。精製ステップには dSPE あるいは Smart-SPE を用いた。最終的に、10 倍濃縮した試料を測定に用いた。

装置と分析条件

装置: 島津製作所製 NexeraX2 及び AB Sciex 製 TripleTOF5600、分析条件: L-column 2 ODS (1.5 x 50 mm, 3 µm; 科学物質評価研究機構)、移動相: [A] 10mM ギ酸アンモニウム-5%メタノール溶液、[B] 10mM ギ酸アンモニウム-95%メタノール溶液によるリニアグラジエント (0-15 min で[A] 100%→[B] 100%)、流速: 0.15 mL/min、カラムオープン温度: 40 °C、イオン化法: エレクトロスプレーイオン化法 (ESI, positive)、測定モード: プロダクトイオンスキャン (PIS)

定量分析

内部標準法による検量線は 0.1 - 20 ng/g の範囲で 6 点の濃度で作成し、さらに検量線の直線性と定量性能の評価を行った。定量用の内部標準にはそれぞれに適した合成カンナビノイドの重水素体を用いた。

(2) マウス臓器中 5F-ADB の定量分析法の構築と毒性メカニズム解明への発展

動物実験

1 - 10 mg/kg の異なる濃度の 5F-ADB を ICR マウス (6 - 8 週齢・雄性) に腹腔内投与し、表現型の変化を観察及び評価した。その後、解剖を実施し、肝臓及び脳を採取した。また、定量

分析法構築のための試料として薬物投与していない ICR マウスの肝臓及び脳を同様に採取した。

試料

動物実験より採取したマウス臓器（肝臓・脳）に 5F-ADB 及び M1 を添加した後ホモジナイズし、QuEChERS 法を小容量化した改良 QuEChERS 法を前処理を実施した。精製ステップには Captiva EMR Lipids を用いた。最終的に、10 倍濃縮した試料を測定に用いた。

装置と分析条件

装置：島津製作所製 NexeraX2 及び AB Sciex 製 TripleTOF5600、分析条件：L-column 2 ODS (1.5 x 50 mm, 3 μ m; 科学物質評価研究機構)、移動相：[A] 10mM ギ酸アンモニウム-5%メタノール溶液、[B] 10mM ギ酸アンモニウム-95%メタノール溶液によるリニアグラジエント（0-4 min で[A] 70%→[B] 100%）、流速：0.15 mL/min、カラムオープン温度：40、イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法 (ESI, positive)、測定モード：プロダクトイオンスキャン (PIS)

4. 研究成果

(1) ヒト臓器中 5F-ADB 及び M1 の定量分析法の構築

前処理法の条件検討

肺試料においては、液体含有量の多い検体の場合、既存の QuEChERS 法で用いる溶媒量では有機相の分離が不十分である場合があった。そのため、溶媒量および精製ステップに用いる dSPE の量を 1.5 倍に変更した。脂肪組織においては、精製ステップでより効果的に脂質除去を行うため、固相カートリッジ Smart-SPE (アイスティサイエンス) を用いた。既存の残留農薬一斉分析法 STQ 法を一部改正し、2 段階の固相抽出ステップを 1 段階に減らすことで抽出液量を約半量まで減らし、窒素乾固時間を短縮し、QuEChERS-STQ 法として改良した。

定量分析

内部標準法を用いて検量線を作成したところ、5F-ADB と M1 はどちらも、いずれの臓器においても R^2 値が 0.978-0.996 の良好な直線性を示した。両化合物の回収率は各臓器において概ね 40~80% であった。また、すべての対象臓器について、ばらつき（精度）および理論値とのずれ（確度）を算出し評価した。定量結果の精度は概ね 20% 以下、確度は 20% 以内と良好な値を示した。また、PIS による定量限界は 0.10-0.54 ng/g であった。定量分析結果の一部を表 1 に示す。

表 1 5F-ADB 及び M1 の分析バリデーション結果

5F-ADB	肝臓	肺	大脳	脂肪組織
Range (ng/g)	0.5-20	0.5-20	0.5-20	0.1-20
r^2	0.987	0.978	0.978	0.99
LOD (ng/g)	0.12	0.5	0.3	0.23
LOQ (ng/g)	0.5	0.98	1	0.7
M1	肝臓	肺	大脳	脂肪組織
Range (ng/g)	0.1-20	0.1-20	0.1-20	0.1-20
r^2	0.996	0.981	0.998	0.985
LOD (ng/g)	0.22	0.54	0.1	0.21
LOQ (ng/g)	0.51	0.74	0.21	0.65

以上の研究成果は国内・国際学会において発表を行い、現在論文投稿準備中である。

(2) ヒト臓器中 5F-ADB 及び M1 の濃度と CES の発現が異なる臓器との相関

過去の研究で定量を行った血液試料の結果と併せて、本研究で対象とした CES1 が発現している臓器のうち、肝臓からは 5F-ADB 未変化体は検出されず、肺からは微量に検出された。（図 1）大脳及び脂肪組織中の 5F-ADB 未変化体濃度は肺中に比べ、約 3 倍の濃度で検出された。

CES1 がほぼ発現していない大脳では未変化体の定量値が一番高く、M1 定量値は対象とした臓器中で一番低かった。定量分析の結果、5F-ADB について、ヒトにおける CES1 の発現が異なる臓器間での代謝との相関を明らかにした。

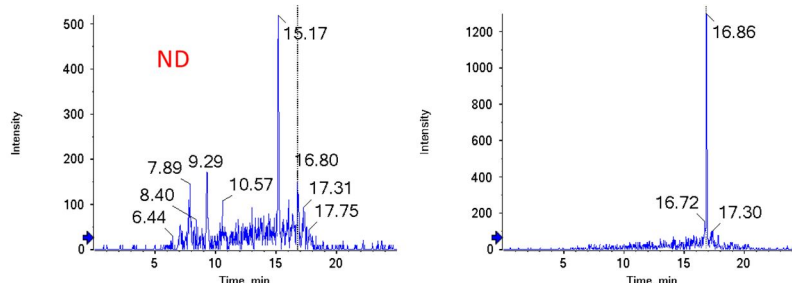


図 1 CES 発現臓器中の 5F-ADB の探索

以上の研究成果は一部国内・国際学会において発表を行い、現在論文投稿準備中である。

(3) マウス臓器中 5F-ADB の定量分析法の構築と毒性メカニズム解明への発展

定量分析

小容量化した改良 QuEChERS 法を前処理とし、内部標準法を用いて検量線を作成した結果、5F-ADB と M1 はどちらも、各マウス臓器においても R^2 値が 0.99 以上の良好な直線性を示した。また、両化合物の回収率は各臓器において概ね 70~80%であった。

表現型の変化と毒性評価

マウスに 5F-ADB を投与し、表現型変化の評価と、本研究目的に対する最適投与濃度の検討を行った。5F-ADB を投与されたマウスは、過去に合成カンナビノイド JWH-018 や MAM2201 などを投与したマウスとは明らかに異なる行動を示し、5F-ADB の毒性解明の必要性が明らかとなった。また、性差がある可能性が見られたため、今度の研究の課題として検討している。

今後は *in vivo* 実験系における 5F-ADB 及び M1 について、GC/MS/MS を用いてメタボローム解析を行い、毒性評価と毒性メカニズムの解明を行う予定である。得られた結果を本事例の結果と併せ総合的に評価し、5F-ADB における毒性発現機序解明及び毒性評価を検討している。

引用文献：1) Banister et al., *ACS Chem Neurosci* (2015) 6: 1445. 2) Kusano et al., *Drug Test Anal* (2018) 10: 284-293.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----