

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：99999

研究種目：奨励研究

研究期間：2022～2022

課題番号：22H04282

研究課題名 乱用薬物の立体選択的ヒト代謝反応の解明と法科学的応用

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） 370,000円

研究成果の概要：N-アシル鎖長の異なるフェンタニルアナログ4種（アセチルフェンタニル、フェンタニル、ブチリルフェンタニル、バレリルフェンタニル）を基質としてヒト肝ミクロソーム代謝処理し、主要な代謝物の生成プロファイルを評価した。N-脱アルキル化体、エチルリンカー水酸化体、ピペリジン環水酸化体の生成量は、いずれも基質のアシル鎖伸長とともに増大し、ブチリルフェンタニルで最大、バレリルフェンタニルで減少した。一方、基質のアシル鎖伸長とともにフェネチル部分の芳香環水酸化体は減少、アシル側鎖水酸化体は増大した。併せて、エチルリンカー上の 位炭素水酸化体のエナンチオマー間で生成量に明確な差異がみられることもわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェンタニル類の化学構造と産生される代謝物の種類・量の相関や光学活性を有する代謝物の生成挙動を明らかにすることができた。本成果は代謝酵素の基質特異性や立体選択性の新たな一面を解明する貴重な知見となり得る。今後 *in vitro* から *in vivo* へ展開できれば、代謝物の経時的な変化量や量比の差異等から薬物の摂取時期推定など有用な法科学的指標を得ることができると期待される。

研究分野：法薬毒物学

キーワード：フェンタニル類 ヒト肝ミクロソーム 代謝 消失半減期 クリアランス アシル エナンチオマー
液体クロマトグラフィー 高分解能質量分析

1. 研究の目的

合成オピオイドであるフェンタニル類が関与する使用事犯や急性中毒・死亡事案が世界各国で数多く発生している。これまでの代謝研究により、フェンタニル類のヒト代謝機構は概ね解明されたといえるものの、フェンタニル類の化学構造と得られる代謝物の種類・生成量の相関に関しては未だ不明な点が多い。また、フェンタニル類の代謝物の中には光学活性を有する代謝物（キラル代謝物）も存在しており、各エナンチオマーの産生挙動まで個々に評価した報告は見当たらない。本研究では、*N*-アシル鎖長の異なるフェンタニルアナログ4種（アセチルフェンタニル、フェンタニル、ブチリルフェンタニル、バレリルフェンタニル；図1）を基質としてヒト肝ミクロソーム（HLM）により *in vitro* 代謝処理し、液体クロマトグラフィー高分解能質量分析（LC/HRMS）法を用いて各基質の薬物動態（PK）パラメータと主要代謝物（キラル代謝物を含む）の生成プロファイルの評価した。

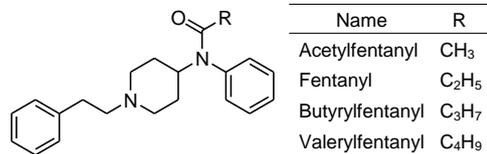


図1. *N*-アシル鎖長の異なるフェンタニルアナログ4種の化学構造

2. 研究成果

(1) 実験方法

① HLM 代謝試験と試料前処理

各フェンタニルアナログを0.1Mリン酸緩衝液に溶解し、NADPH再生系試薬とともにHLM（150ドナー）を加えて37°Cで一定時間インキュベートした。反応終了後、内部標準（IS）としてフラニルフェンタニル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、遠心後、上清を分析試料とした。

② LC/HRMS 条件

分析装置 Thermo Fisher Scientific 製 Vanquish Core HPLC/Orbitrap Exploris 120

LC条件 カラム：L-column 2 ODS（1.5 mm i.d. × 15 cm, 粒子径 5 μm, 移動相 MeOH-10 mM 酢酸アンモニウムのグラジエント）あるいは CHIRALPAK IG-3（2.1 mm i.d. × 15 cm, 粒子径 3 μm, 移動相 MeOH のアイソククラティック）、カラム温度：40°C, 流速：0.1 mL/min

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：スキャン

(2) 結果および考察

① 分析法バリデーション

4種のフェンタニルアナログ（アセチルフェンタニル、フェンタニル、ブチリルフェンタニル、バレリルフェンタニル）とフェンタニルのキラル代謝物であるβ-ヒドロキシフェンタニルと(ω-1)-ヒドロキシフェンタニル（いずれもラセミ体）を分析対象として、0.5–26 nMと26–1300 nMの各濃度範囲について、ODSカラムを用いたLC/HRMS法によるバリデーション試験を実施した（表1）。いずれの分析対象でも、検量線は高い直線性（相関係数 $\gamma > 0.9977$ ）を示し、 10^{-7} Mオーダーの高い検出感度と良好な定量精度（相対標準偏差（RSD）12%以下）・定量真度（相対誤差（RE）8%以内）を有していた。したがって、本法は下記②で求められる定量分析と下記③で求められる高感度・高分解能分析に適用可能と判断された。

表1. 分析法バリデーション結果

Compound	Monitored ion ($m/z \pm 5$ ppm)	Calibration range (nM)	Correlation coefficient (γ)	Limit of detection (nM)	Precision (%RSD)		Accuracy (%RE)	
					Low ^a	High ^a	Low ^b	High ^b
Acetylfentanyl	323.2118	0.5–26	0.9977	0.11	3.0	0.4	-7.7	-1.6
		26–1300	0.9996		1.7	6.3	6.0	0.2
Fentanyl	337.2274	0.5–26	0.9989	0.16	9.0	7.5	-4.7	-1.1
		26–1300	0.9998		9.4	4.7	3.6	0.1
Butyrylfentanyl	351.2431	0.5–26	0.9990	0.19	9.1	8.9	-5.4	-1.0
		26–1300	0.9998		11.0	5.3	4.1	0.1
Valerylfentanyl	365.2587	0.5–26	0.9988	0.11	11.6	9.0	-5.7	-1.1
		26–1300	0.9998		11.5	5.4	4.2	0.1
β-Hydroxyfentanyl	353.2224	0.5–26	0.9989	0.24	10.8	7.7	-4.2	-1.1
		26–1300	1		9.3	4.6	3.4	0.2
(ω-1)-Hydroxyfentanyl	353.2224	0.5–26	0.9988	0.24	12.1	7.7	-2.0	-1.2
		26–1300	0.9995		10.2	4.8	2.9	0.2

^a Evaluated at 2.6 nM (Low) and 26 nM (High) in the calibration range of 0.5–26 nM

^b Evaluated at 130 nM (Low) and 1300 nM (High) in the calibration range of 26–1300 nM

② フェンタニルアナログの消失半減期とクリアランス

フェンタニル類のヒト代謝物解析に関する報告は複数なされているが、ヒト PK パラメータまで言及した報告例は多くはない。各フェンタニルアナログを NADPH 要求性酵素活性条件下で HLM 代謝処理し、上記①の分析法で定量分析を行い、反応時間と各アナログの残存率の関係から消失半減期 ($t_{1/2}$) を算出した。その結果、 $t_{1/2}$ はブチリルフェンタニル (52 分) < バレリルフェンタニル (76 分) < フェンタニル (95 分) < アセチルフェンタニル (127 分) の関係にあった (表 2)。つまり、基質のアシル鎖の伸長は代謝反応を高め、ブチリル鎖を有するブチリルフェンタニルで最大となるが、さらなる伸長 (バレリルフェンタニル) は代謝反応を鈍化させることがわかった。続いて、肝ミクロソーム固有クリアランス ($CL_{int,MS}$) を算出し、*in vitro*-*in vivo* スケールアップ法から肝固有クリアランス (CL_{int}) および well-stirred model に基づいた肝クリアランス (CL_H) を予測した (表 2)。

表 2. フェンタニルアナログの消失半減期とクリアランス

Compound	$t_{1/2}$ (min)	$CL_{int,MS}$ ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	CL_{int} ($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)	CL_H ($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)
Acetylfentanyl	127	9.1	8.2	5.9
Fentanyl	95	12.2	10.9	7.2
Butyrylfentanyl	52	22.0	19.8	10.2
Valerylfentanyl	76	15.2	13.6	8.3

③ フェンタニルアナログの化学構造と代謝物プロファイルの関係性

HLM は第 I 相代謝物の予測に適してはいるが、その存在量の多寡は必ずしも生体内の代謝を反映するものではない。しかしながら、同一条件で代謝試験を行うことで類似構造を有する基質の代謝プロファイルの共通/相違点を検証することは可能である。

N-アシル鎖長の異なるフェンタニルアナログ 4 種を HLM 代謝処理し、主要な代謝物として観測された N-脱アルキル化 (デスフェネチル化) 体および 4 種の水酸化 (エチルリンカー、ピペリジン環、フェネチル部分の芳香環、アシル側鎖への水酸化) 体の生成量を基質間で比較した (図 2)。N-脱アルキル化体、エチルリンカー水酸化体、ピペリジン環水酸化体の生成量は、いずれも基質のアシル鎖伸長とともに増大し、ブチリルフェンタニルで最大、バレリルフェンタニルで減少する傾向がみられた。これは、上記②で得られたクリアランスの序列と同一の関係性であった。N-脱アルキル化とエチルリンカーへの水酸化には CYP3A4 の寄与が支配的と考えられており、CYP3A4 による酸化反応がクリアランスに強く影響していると考えられる。一方、基質のアシル鎖伸長とともにフェネチル部分の芳香環水酸化体は減少、アシル側鎖水酸化体は増大した。芳香環への水酸化には一部 CYP2D6 が、アシル側鎖への水酸化には CYP2D6 や CYP3A4 (酸化を受ける炭素位置によって寄与する酵素が異なる) が関与していると考えられており、基質のアシル鎖伸長に伴い、CYP2D6 による芳香環への酸化から CYP2D6 または CYP3A4 によるアシル側鎖への酸化へと代謝経路がシフトしたと考えられる。

④ β -水酸化体のエナンチオマー分析

我々はこれまでに光学活性を有する各種カチノン類のエナンチオマーをキャピラリー電気泳動質量分析法を用いて一斉分析することに成功している。本研究にも本法を適用することを試みたがキラル代謝物を分離するには至らなかった。そこで、キラルカラム (CHIRALPAK IG-3) を用いた LC/HRMS 法を採用したところ、アセチルフェンタニルとフェンタニルの代謝系においてのみ、エチルリンカー上の β 位炭素への水酸化 (β -水酸化) 体をキラル分離することができた。いずれの系でも、 β -水酸化体のエナンチオマー間で生成量に約 1.5 倍の差異が認められ (図 3)、CYP3A4 による β 位炭素への酸化反応の顕著な立体選択性を明らかにすることができた。

今後、ヒト肝細胞による *in vitro* 代謝試験や文献に基づくヒト *in vivo* 代謝試験の結果を踏まえ、本結果の妥当性を検証した上で、代謝物やそのエナンチオマーの経時的な変化量や量比の差異などから薬物の摂取時期推定等に資する法科学的指標を探索していく。

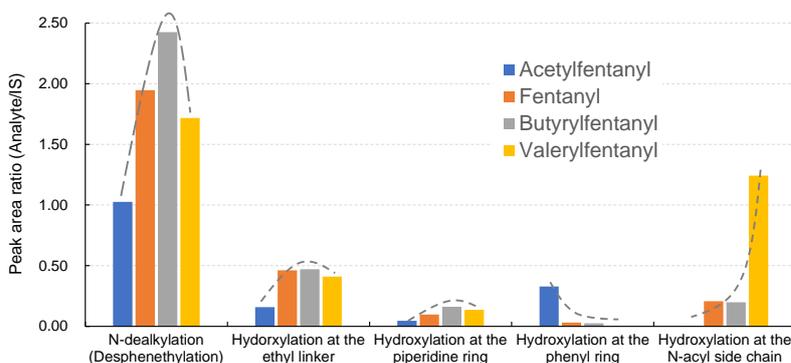


図 2. フェンタニルアナログ 4 種の HLM 代謝 (反応時間 180 分) による N-脱アルキル化体と 4 種の水酸化体の生成量比較

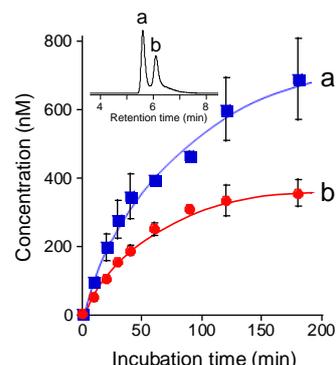


図 3. フェンタニルの HLM 代謝系における β -水酸化体の各エナンチオマーの経時的生成量変化

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takaya Murakami, Ryoichi Wakata, Aya Mamorita, Asami S. Mashio, Kuo Hong Wong, Satoshi Chinaka, Hiroshi Hasegawa	4. 巻 39
2. 論文標題 Direct analysis of biodegradable chelating agents based on liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry using a metal-free hydrophilic interaction liquid chromatographic column	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 663-670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s44211-022-00247-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上 貴哉, 脇田 諒一, 守田 彩, 黄 国宏, 眞塩 麻彩実, 長谷川 浩
2. 発表標題 メタルフリー-HILICカラムを用いたLC/MSによる生分解性キレート剤の直接分析
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
今村 優希	(Imamura Yuki)
神田 康司	(Kanda Koji)
渡邊 慎平	(Watanabe Shimpei)