

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893089

研究課題名(和文) 乱用薬物として流通している合成カンナビノイドの化学構造と体内動態の相関解析

研究課題名(英文) Determination of the main metabolic pathways of the recently abused synthetic cannabinoids and investigation of the relationship between pharmacokinetics and their chemical structures

研究代表者

財津 桂 (ZAITSU, Kei)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30700546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年乱用が拡大し、大きな社会問題となっている「危険ドラッグ」の主要成分である合成カンナビノイドの主代謝プロファイルをラットあるいはヒト生体試料を用いて解明した。さらに、置換基の違いによる体内動態プロファイルの違いについても検討を行い、基本骨格が同じであっても、置換基の違いによって体内動態が大きく変化することを明らかとした。さらに、合成カンナビノイドが内因性代謝物のプロファイルにも影響を及ぼすことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In this study, the main metabolic pathways of synthetic cannabinoids, which sometimes cause acute intoxication cases, in rats and humans have been demonstrated. In both rats and humans, the main metabolic pathway of MAM-2201 is defluorination, followed by oxidation. In addition, postmortem redistribution of MAM2201, which may be due to its high lipophilicity, was observed in human cases. The determined metabolic pathways of MAM2201 in rats are almost similar to those in humans. Also, this study have revealed that slight modification in some moieties of synthetic cannabinoids causes different pharmacokinetic profile. Also, synthetic cannabinoids can cause endogenous metabolites in central nervous system and peripheral part, suggesting that it may be one of the causes of acute intoxication of synthetic cannabinoids.

研究分野：法中毒学

キーワード：法中毒 分析化学 質量分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 2006年頃から「脱法ハーブ」と呼ばれる植物様の違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)の乱用が急速に拡大し、深刻な社会問題となっている。脱法ハーブを使用した際に大麻様の薬理効果が発現するのは、人工的に添加されている「合成カンナビノイド」によるものであり、大麻の有効成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノールと同等あるいはそれ以上のカンナビノイド受容体のアゴニスト活性を示すものが多い。

現在乱用されている合成カンナビノイドは、主としてインドール環とナフタレン環がメチルケトンで連結された「3-ナフトイルインドール」を基本骨格とするものであり、麻薬に指定されているJWH-018も同じ骨格を有している。しかし、アルキル鎖末端基の置換や、ナフタレン環の置換等によって、数多くの類縁体が存在する。

(2) 特に近年、これら合成カンナビノイドを含有する脱法ハーブの摂取による急性中毒事故が多発している。一般に急性中毒事故(特に急性中毒死事故)が発生した場合、生体試料の分析を行い、中毒起因薬物を特定することが法医学的には不可欠である。しかし、合成カンナビノイドの体内動態については現時点で詳細な報告がなく、合成カンナビノイドによる急性中毒事故が発生した場合、分析に適切な生体試料やターゲットとすべき代謝物を特定できていないのが現状である。なお、代謝については麻薬に指定されている2種類の合成カンナビノイド(JWH-018およびJWH-073)の乱用者尿試料を分析した報告が幾つかあり、尿中には未変化体が排泄されにくく、主としてインドール環の水酸化体が排泄されるとしている。しかし、それらの報告では摂取量や摂取からの経過時間等の詳細が不明であり、血中半減期や体内分布等を含めた体内動態に関する詳細は未だに明らかにされていないため、合成カンナビノイドの体内動態の詳細な解析が早急に求められる。

2. 研究の目的

(1) 化学構造の一部を置換した合成カンナビノイドを合成し、これらをラットに投与して、合成カンナビノイドの代謝プロファイルを把握し、体内動態を明らかにする。

(2) 化学構造(置換した部位の情報)と体内動態の相関を解析する。

(3) さらに、合成カンナビノイドが内因性代謝プロファイルに与える影響についても考察する。

3. 研究の方法

(1) MAM-2201のラット体内動態の把握

合成カンナビノイドMAM2201および内部標準(IS)として使用したMAM2201重水素化体(MAM2201-d4)は当研究室で合成したものをを用いた。

動物実験:6週齢のwistar系雄性ラット(体重207-321g, n=4)にMAM2201を5 mg/kgの投与量で腹腔内投与した。投与後0.5, 1, 2, 6, 12, 24, 48時間に解剖を行い、下大動脈から血液を採取した。得られた血液は全て血漿試料とし、分析時まで-30°Cで凍結保存した。

装置と分析条件:島津製作所製NexeraX2およびAB Sciex社製TripleTOF 5600 LC/MS/MS systemを使用した。分析条件は、移動相Aを10 mMギ酸アンモニウム水溶液-5%MeOH、移動相Bを10 mMギ酸アンモニウム水溶液-95%MeOHとした。分析カラムはL-column2 ODS(1.5×50mm、粒子径3 μ m)を使用し、グラジエント溶出(0 min: A 100%、0-3 min: B 100%(2 min 保持))を行った。

試料の前処理:血漿試料各100 μ lにISを添加した後、塩基性条件下で酢酸エチル200 μ lを用いて抽出し、得られた抽出液を蒸発乾固した。乾固後の残さをギ酸アンモニウム水溶液-10%MeOH 30 μ lに再溶解したものを分析試料とし、2 μ l注入した。

(2) MAM-2201のラット尿中代謝物のプロファイル解析

上記(1)と同様に、MAM-2201は合成したものをを使用した。MAM2201の脱フッ素化・水酸化体(5-hydroxypentyl metabolite)及び脱フッ素化・カルボン酸体(pentanoic acid metabolite)とその重水素化体はどれもCayman Chemicalより購入した。

動物実験:6週齢のWistar系雄性ラットにMAM2201を5 mg/kgで腹腔内投与し、2, 6, 12, 24, 48時間毎に蓄尿して、尿を採取した(各n=3)。

尿300 μ Lに、0.2 M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.0) 30 μ L、 β -glucuronidase/sulfatase(H. Pomantia由来)約3000 unitsを加え37°C、4時間加水分解した。加水分解後の尿試料について、メタノール除タンパクを行い、蒸発乾固した後、20%メタノール10 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 5.0)に再溶解したものを分析試料とした。

装置はNexeraX2(島津製作所)及びTripleTOF5600 system(AB Sciex)を使用した。カラムはL-column 2 ODS(2.1×150 mm、粒子径5 μ m、化学物質評価機構)を使用し、10 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 5.0)及びメタノールによるリニアグラジエントを行った。その他の条件は以下の通りである。流量:0.2 mL/min、カラム温度:40°C、イオン化法:ESI-positive

(3) MAM-2201の急性中毒死者生体試料中の代謝プロファイル解析とラット代謝プロファイルの比較

MAM-2201、3-naphthoylindole、3-(4-methylnaphthoyl)indoleは当研究室で合成したものをを用いた。MAM-2201摂取による

と思われる急性中毒死者の解剖時に採取された心臓血（右・左）および大腿血の血漿試料を分析に用いた。

島津製作所製 Nexera X2 および AB Sciex 社製 TripleTOF 5600 LC/MS/MS system を使用した。移動相は A 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液-5% MeOH、移動相 B 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液-95 % MeOH とし、分析カラムは L-column 2 ODS (1.5×150 mm, 粒子径 3 μm) を使用した。分析条件は以下の通り。グラジエント 0 min : A 100%、0-15 min : B 100% (5 min 保持)。

上記血漿試料（各 100 μl）についてメタノール除タンパクを行い、遠心分離後に得られた上清を遠心濃縮器で乾固した。乾固後の残さをギ酸アンモニウム水溶液-10% MeOH (30 μl) に再溶解したものを分析試料とした。

(4) MAM-2201 投与ラットにおける内因性代謝物プロファイルの変動解析

wistar 系雄性ラット(6 週齢、体重 211-251g) に MAM2201 (DMSO 溶液) を 5 mg/kg、15 mg/kg で腹腔内投与した。また、control 群には DMSO を投与した。投与 2 時間後に、各ラットを解剖し、大脳および血漿を得た。

凍結した大脳を 10 分間氷上に置き、氷冷したメタノール 400μl を加えて安田機械製 MB-1000 細胞破砕機を用いてホモジナイズした。その後、遠心分離し、上清を得た。大脳の上清あるいは血漿 0.3 ml に内部標準 2-Isopropylmalic acid を加えた後、CHCl₃/MeOH(v/v, 2:5)混液を用いて抽出を行った。抽出液 400 μl を遠心濃縮した後、一晚、凍結乾燥した。得られた凍結乾燥物にメトキシアミン塩酸塩ピリジン溶液および MSTFA を用いて誘導体化を行った。この試料を GC-MS/MS (MRM 測定) により分析した。装置は島津製作所製 GCMS-TQ8030 を使用し、分離カラムには Agilent 社製 DB-5(30 m×0.25 mm i.d. df=1.00 μm)を用いた。データ解析には、島津製作所製 GC/MS 代謝成分データベース (release 2.00) を使用し、多変量解析は Umetrics 社製 Simca-P+ (ver.13) を用いた。

(5) 置換基が異なる化合物の体内動態の検討

Wister 系ラット (雄性、6 週齢、体重 186-225g、n=4) に JWH-018、AM-2232、MAM2201 の 3 種類の合成カンナビノイドを 5mg/kg で腹腔内投与した。投与後 0・6・24 時間後に解剖を行い、脳・肝臓・心臓・血液 (下大静脈から採取) を採取した。得られた血液は全て血漿試料とし、全ての試料は分析時まで-20 で冷凍保存した。

血漿 100 μL に 300 ng/ml の内部標準溶液 30μl および MeOH 300 μl を加えて攪拌した後、遠心分離を行った。得られた上清を 1 時間遠心濃縮し、25% MeOH 200 μl に再溶解して分析試料とした。

脳・肝臓・心臓：脳には 4 ml、肝臓および心臓には 800μl の MeOH を加えて細胞破砕機にかけた。上清に 300 ng/ml の内部標準溶液を 30 μl 加えた後、1 時間遠心濃縮し、25% MeOH 200 μl に再溶解して分析試料とした

4. 研究成果

(1) MAM-2201 のラット体内動態の把握
MAM-2201 の血漿中濃度の変化を対数変換して示した (図 1)。

図 1 MAM-2201 のラット血漿中濃度の変化 (横軸は時間、縦軸が濃度 (ng/ml))

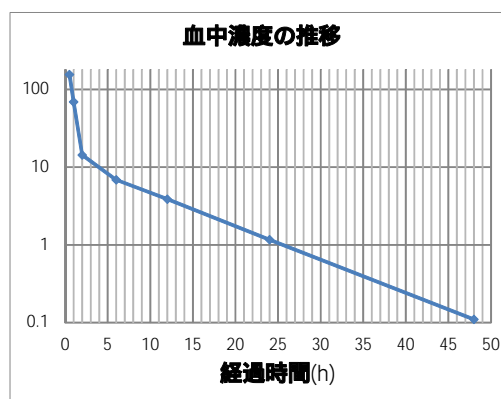


図 1 の結果から、MAM-2201 の血漿中濃度の変化は 2 相性を示すことが明らかとなった。特に投与後 2 時間以内では急速に血漿中 MAM2201 の濃度が減少 (α 相) することがわかった。また、投与後 6 時間~48 時間では比較的緩やかな濃度減衰 (β 相) が生じることも明らかとなった。また、投与 48 時間後には、MAM2201 は血漿中からほぼ消失した。以上の結果、MAM2201 は投与後 1~2 時間で急速に体内分布あるいは代謝・排泄が進むことで、血漿中濃度が急激に低下し、一方、その後は比較的緩やかな濃度低下を示すことが示唆された。

(2) MAM-2201 のラット尿中代謝物のプロファイル解析

何れの尿採取時間においても、尿から未変化体である MAM2201 及びその N-脱アルキル化体である 3-(4-methyl-1-naphthoyl)indole は検出されなかった。LC/Q-TOFMS による代謝物の探索結果では、MAM2201 脱フッ素化・水酸化体 (M1)、MAM2201 脱フッ素化・カルボン酸体 (M2)、MAM2201 モノヒドロキシ体、MAM2201 ジヒドロキシ体、M2 モノヒドロキシ体、3-(4-methyl-1-naphthoyl)indole モノヒドロキシ体と推定される代謝物が検出された。これらの推定代謝物のうち、M1 および M2 については標準品による確認分析を実施した。また、M1 および M2 の LC/Q-TOFMS による定量分析結果を表 1 に示す。表 1 に示すように、M1 および M2 の尿中排泄量は非常に低く、また、投与薬物量に対する排泄率も極めて少ないことが明ら

かとなった。

表 1 蓄尿時間における代謝物排泄量(μg)と投与量に対する排泄率(%)

投与後時間(h)	2	6	12	24
M1	0.3 μg (0.02%)	9.4 μg (0.6%)	20 μg (1.5%)	83 μg (5.7%)
M2	0.4 μg (0.03%)	9.8 μg (0.62%)	67 μg (0.02%)	358 μg (25%)

さらに、精密質量測定で構造が推定された代謝物について、内部標準を基準とした「相対面積比」を基にした代謝物プロファイルを図 2 に示す。

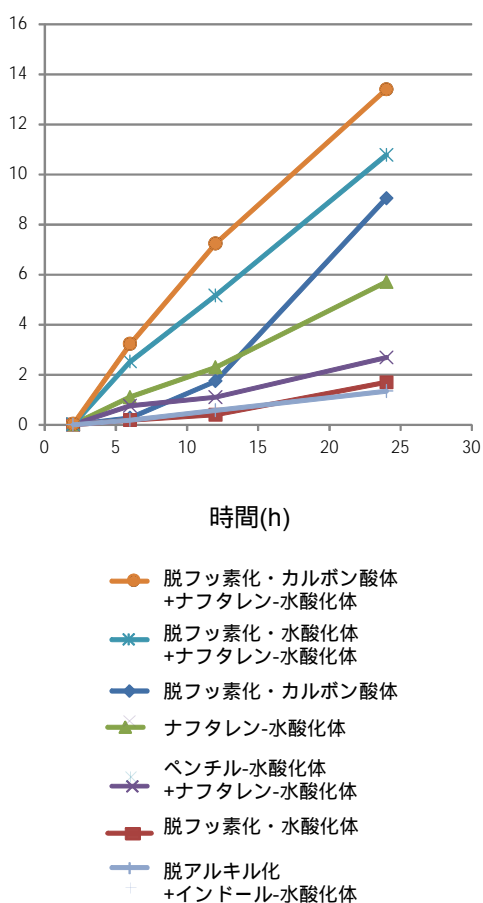


図 2 各代謝物のピーク面積比 (縦軸は面積比)

本結果から考察すると、最も排泄の多い脱フッ素化・カルボン酸体+ナフタレン環水酸化体であっても、面積比は定量結果を得た M1 および M2 と比較しても、数倍程度であることが明らかとなった。よって、装置感度の差はあるものの、総じて MAM2201 代謝物の尿中排泄量は低いという結論が得られた。さらに、抱合体について LC/Q-TOFMS で調べた結果、水酸化代謝物の一部がグルクロン酸抱

合を受けて排泄されることも明らかとなった。

(3) MAM-2201 の急性中毒死者生体試料中の代謝物プロファイル解析とラット代謝物プロファイルの比較

血漿試料から、MAM2201 およびその代謝物と推定される脱アルキル化体、脱フッ素化体、脱フッ素化・カルボン酸体およびいくつかの水酸化代謝物が検出された。また、未変化体および代謝物の定量分析を行った結果を表 2 に示す。

表 2 中毒死者血漿試料中の濃度 (ng/ml)

名前	左心血	右心血	大腿血
MAM-2201	85.8	30.7	16.3
脱アルキル化体	9.76	4.70	1.79
脱フッ素化・水酸化体	223	178	116
脱フッ素化・カルボン酸体	14.4	25.0	7.30

本定量結果から、MAM2201 は主として脱フッ素化・水酸化体へと代謝されることが明らかとなった。さらに、心臓血と大腿血には 1.5 ~ 5.3 倍程度の差があることから、MAM2201 は死後再分布を生じることも明らかとなった。

(4) MAM-2201 投与ラットにおける内因性代謝物プロファイルの変動解析

血漿から 57 種類の内因性代謝成分が検出された。このメタボロームデータについて多変量解析を行った結果、第一主成分上に投与量の影響が反映されていることから、メタボロームの変動には投与量依存性が示唆された。そこで、control 群と 15 mg/kg 投与群の 2 群間の分離に影響を及ぼす成分を OPLS-DA (S-plot) から探索し、これらの成分について Kruskal-Wallis 検定を行ったところ、Glucose、Galactose など 13 種類の化合物で有意差 (p<0.05) が確認された。特に TCA 回路にかかわる代謝成分で有意差が観察されたことから、MAM2201 は末梢系においてエネルギー代謝等に影響を及ぼすことが示唆された。また、大脳からは 80 種類の内因性代謝物が検出された。得られたメタボロームデータについて、多変量解析を行った結果、PLS-DA score plot 上で control 群と 5mg/kg、15mg/kg 投与群は明確に分離され、主として第一主成分上で群間差が反映された。また、PLS-DA loading plot から、投与量が多いほど大脳中の phenylalanine、valine などが高値を示し、malic acid、succinate などが低値を示すことが示唆されたことから、これらについて Kruskal-Wallis 検定を行ったところ、有意差 (p<0.05) が確認された。MAM2201 投与群において phenylalanine が有意に増加した

ことから、phenylalanine から tyrosine への pathway が抑制されている可能性が示唆された。また malic acid、succinate などの TCA 回路構成成分が有意に減少したことから、エネルギー代謝にも影響を及ぼすものと考えられた。

(5) 置換基が異なる化合物の体内動態の検討

各対象薬物の血漿中濃度を表 3 に示す。投与後 0~6 時間での血漿中濃度の低下率は投与後 6~24 時間と比較すると、著しく大きく、各薬物は体内への分布が速やかに進むこと、あるいは速やかに代謝が進むことが示唆された。また、0 時間の時点での各薬物の血中濃度にも大きな差異が見られた。特に MAM-2201 と AM-2232 に関しては、投与直後での血中濃度比が約 1 : 7 であった。また、AM-2232 に関しては、投与直後における濃度が低いこともあり、24 時間後には定量限界以下まで血漿中濃度が低下した。

表 3 各時点における血漿中濃度 (ng/ml)

投与後	0時間	6時間	24時間
JWH-018	62	2.2	1.8
AM-2232	22	1.1	n.q.
MAM-2201	152	7.1	1.8

n.q.: not quantitated

今回投与に使用した 3 種類の薬物は、基本骨格が同じであるにも関わらず、血漿中濃度の経時変化の結果に明確な差が出た。これはすなわち、官能基のわずかな違いから、体内動態には大きな差異が生じることを示唆する結果である。脳・肝臓・心臓、臓器分布の結果を加えることで、各薬物の体内動態をさらに詳細に考察することが可能であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

- (1) Kei Zaitso, Yumi Hayashi, Kei Suzuki, Hiroshi Nakayama, Nanpei Hattori, Rina Takahara, Maiko Kusano, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii. Metabolome disruption of the rat cerebrum induced by the acute toxic effects of the synthetic cannabinoid MAM-2201. Life Sciences 2015 (in press)

[学会発表](計 5 件)

- (1) Kei Zaitso, Yumi Hayashi, Kei Suzuki, Hiroshi Nakayama, Nanpei Hattori, Rina Takahara, Maiko Kusano, Hitoshi Tsuchihashi, Akira Ishii. Metabolomics of rat cerebrum and plasma to investigate the acute toxic effects of the synthetic cannabinoid MAM-2201. The 52th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists. (2014 年 11 月 11 日) Buenos Aires, Argentina.
- (2) 財津 桂. 法中毒におけるメタボロミクスを中心とした質量分析法の応用. (招待講演) 北陸質量分析談話会 (2014 年 10 月 25 日) 石川県、金沢市、北陸大学.
- (3) 服部南平、財津 桂、林 由美、中山 浩、鈴木 圭、高原里奈、草野麻衣子、土橋 均、石井 晃. 合成カンナビノイド MAM2201 を投与したラットの血漿メタボローム解析. 第 39 回日本医用マススペクトル学会年会 (2014 年 10 月 17 日) 千葉県、千葉市、三井ガーデンホテル.
- (4) 鈴木 圭、財津 桂、林 由美、中山 浩、服部南平、高原里奈、草野麻衣子、土橋 均、石井 晃. 合成カンナビノイド MAM2201 投与ラットの脳メタボローム解析. 第 39 回日本医用マススペクトル学会年会 (2014 年 10 月 17 日) 千葉県、千葉市、三井ガーデンホテル.
- (5) 久恒一晃、財津 桂、中山 浩、林 由美、松本智寛、石場 厚、肥田宗政、土橋 均、石井 晃. 合成カンナビノイド MAM2201 のラット尿中代謝物の分析. 日本法中毒学会第 33 年会 (2014 年 7 月 4 日) 愛知県、名古屋市、名古屋大学.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

財津 桂 (ZAITSU, Kei)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 30700546

(2) 研究分担者

なし