

危険ドラッグの摂取証明を目的
とした代謝および排泄の研究

2022

掛橋 秀直

目 次

略語表	- iii -
緒論	- 1 -
本論	- 5 -
第 1 章 カチノン類の芳香環の構造が代謝および排泄に与える影響	- 5 -
第 1 節 背景および目的	- 5 -
第 2 節 実験および方法	- 7 -
2-1 項 試薬	
2-2 項 ピロリジノフェノン誘導体およびその代謝物の標準品合成	
2-3 項 分析試料および前処理	
2-4 項 分析装置および測定条件	
第 3 節 実験結果	- 15 -
3-1 項 1-Phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one 構造類似体の尿中代謝物の構造決定	
3-2 項 グルクロン酸抱合体の探索	
3-3 項 尿中代謝物濃度の比較	
第 4 節 考察	- 26 -
4-1 項 1-(4-Fluorophenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one の尿中代謝物	
4-2 項 1-(4-Methoxyphenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one の尿中代謝物	
4-3 項 2-(Pyrrolidin-1-yl)-1-(thiophen-2-yl)pentan-1-one の尿中代謝物	
4-4 項 摂取証明への活用	
第 5 節 小括	- 28 -
第 2 章 合成カンナビノイド類の脂溶性と官能基が尿排泄および血液中濃度に与える影響	- 29 -
第 1 節 背景および目的	- 29 -
第 2 節 実験および方法	- 31 -
2-1 項 試薬	
2-2 項 グループ分けと脂溶性の評価	
2-3 項 分析試料および前処理	
2-4 項 分析装置および測定条件	
2-5 項 分析バリデーション	
第 3 節 実験結果	- 36 -
3-1 項 脂溶性の評価	
3-2 項 尿中濃度	

3-3 項	血中濃度	
第 4 節	考察	- 40 -
4-1 項	官能基と脂溶性の関係	
4-2 項	脂溶性が与える尿排泄への影響	
4-3 項	官能基（アミド結合とエステル結合）が与える血中濃度への影響	
4-4 項	摂取証明への活用	
第 5 節	小括	- 44 -
第 3 章	潜在的な覚醒剤プロドラッグ “ <i>N-tert</i> -butoxycarbonyl メタンフェタミン” の代謝および尿中排泄	- 45 -
第 1 節	背景および目的	- 45 -
第 2 節	実験および方法	- 48 -
2-1 項	試薬およびラット	
2-2 項	未変化体およびその代謝物の標準品合成	
2-3 項	肝ミクロソームを用いた代謝試験	
2-4 項	ラットへの投与試験	
2-5 項	分析装置および測定条件	
2-6 項	分析バリデーション	
第 3 節	実験結果	- 54 -
3-1 項	分析条件の最適化	
3-2 項	肝ミクロソーム反応液中の代謝物	
3-3 項	代謝物の同定および定量	
3-4 項	ラット尿中の代謝物	
第 4 節	考察	- 65 -
4-1 項	代謝経路	
4-2 項	未変化体および代謝物の尿中排泄	
4-3 項	摂取証明への活用	
第 5 節	小括	- 69 -
総括		- 70 -
結語		- 72 -
謝辞		- 73 -
引用文献		- 74 -

略 語 表

4F- α -PVP : 1-(4-Fluorophenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one
4MeO- α -PVP : 1-(4-Methoxyphenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one
4OHAP : 4-Hydroxyamphetamine
4OHMA : 4-Hydroxymathamphetamine
5F-AB-PINACA : *N*-(1-Amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indazole-3-carboxamide
5F-ADB : Methyl 2-(1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indazole-3-carboxamido)-3,3-dimethylbutanoate
5F-AMB : Methyl (1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indazole-3-carbonyl)valinate
5F-NNEI-2' naphthylisomer : 1-(5-Fluoropentyl)-*N*-(naphthalen-2-yl)-1*H*-indole-3-carboxamide
5F-PB-22 : Quinolin-8-yl 1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indole-3-carboxylate
 α -PBP : 1-Phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)butan-1-one
 α -PVP : 1-Phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one
 α -PVT : 2-(Pyrrolidin-1-yl)-1-(thiophen-2-yl)pentan-1-one
AB-CHMINACA : *N*-(1-Amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(cyclohexylmethyl)-1*H*-indazole-3-carboxamide
AB-PINACA : *N*-(1-Amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1*H*-indazole-3-carboxamide
ADB-FUBINACA : *N*-(1-Amino-3,3-dimethyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-indazole-3-carboxamide
AM2201 : (1-(5-Fluoropentyl)-1*H*-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl)methanone
AM2232 : 5-(3-(1-Naphthoyl)-1*H*-indol-1-yl)pentanenitrile
AP : Amphetamine (1-phenylpropan-2-amine)
APINAC : Adamantan-1-yl 1-pentyl-1*H*-indazole-3-carboxylate
Boc : *tert*-Butoxycarbonyl
BocMA : *N-tert*-Butoxycarbonyl methamphetamine
CATs : Cathinones
CE : Collision energy
Cl_H : Estimated hepatic clearance
Cl_{int} : Estimated intrinsic clearance
CXP : Collision cell exit potential
DBA : Dibenzylamine
DP : Declustering potential
EAM2201 : (1-(5-Fluoropentyl)-1*H*-indol-3-yl)(1-naphthalenyl)methanone

EP : Entrance potential
 ER : Extraction ratio
 ESI : Electrospray ionization
 FUB-PB-22 : Quinolin-8-yl 1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indole-3-carboxylate
 Glu : Glucuronide
 HLM : Human liver microsomes
 IS : Internal standard
 JWH-018 : Naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone
 JWH-081 : (4-Methoxynaphthalen-1-yl)(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)methanone
 JWH-122 : (4-Methyl-1-naphthyl)-(1-pentylindol-3-yl)methanone
 JWH-210 : 4-Ethyl-naphthalen-1-yl-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)methanone
 JWH-250 : 2-(2-Methoxyphenyl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)ethanon
 HR : High resolution
 LC-MS/MS : Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
 LOD : Limit of detection
 logP : Partition coefficient (octanol/water)
 LOQ : Limit of quantification
 LSD : Lysergic acid diethylamide
 MA : Methamphetamine (*N*-methy-1-phenylpropan-2-amine)
 MAM2201 : (1-(5-Fluoropentyl)-1*H*-indol-3-yl)(4-methyl-1-naphthalenyl)methanone
 MC : Methcathinone
 MDMA : 3,4-Methylenedioxymethamphetamine
 ND : Not detected
 NM2201 : Naphthalen-1-yl 1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indole-3-carboxylate
 NMR : Nuclear magnetic resonance
 NNEI : *N*-(Naphthalen-1-yl)-1-pentyl-1*H*-indole-3-carboxamide
 NPS : New psychoactive substance
 NQ : Not quantified
 NR : Not recorded
 NS : No sample
 PPs : Pyrrolidinophenone derivatives
 Q1 : Quadrupole 1
 Q3 : Quadrupole 3
 RLM : Rat liver microsomes
 SC : Synthetic cannabinoid
 SRM : Selected reaction monitoring

THC : Tetrahydrocannabinol

THF : Tetrahydrofuran

UNODC : United nations office on drug and crime

WHO : World Health Organization

緒 論

乱用薬物は世界各国で蔓延しており、世界保健機関（WHO）および国連薬物犯罪事務所（UNODC）は、薬物乱用の根絶に注力している^[1, 2]。我が国においても薬物乱用の抑止は重要課題であり、啓蒙活動や厳しい取り締まりが行われてきた。しかし、乱用薬物は「安全、合法、多くの人が使っている」等の虚言で新たな乱用者を生み出し、販売形態を店舗型からソーシャルネットワーク（SNS）を窓口とした宅配型に移す等、薬物捜査を巧妙に回避してきた。

現在流通する乱用薬物の種類は多岐に渡り、覚醒剤であるフェニルメチルアミノプロパン（MA）およびフェニルアミノプロパン（AP）をはじめ、麻薬であるコカイン、ヘロイン、3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン（MDMA）およびリゼルギン酸ジエチルアミド（LSD）、大麻（THC 種）等が古くからよく知られている。これら規制薬物は覚醒剤取締法、麻薬及び向精神薬取締法そして大麻取締法に基づいて、所持・使用・製造・輸入・販売に至るまで、厚生労働省および警察当局による厳しい規制と取り締まりが行われている^[3-5]。国内では、中枢神経興奮作用を示す覚醒剤ならびに、幻覚作用および中枢抑制作用を示す大麻の乱用が多く見られ、2020 年の薬物事犯の検挙人員は、覚醒剤で 8471 人、大麻で 5034 人であった^[6]。

しかしながら、2000 年頃から、流通する乱用薬物の種類に大きな変化が見られるようになった。既存の法律では規制対象外になる新規精神活性物質（NPS: new psychoactive substance）の流通が、続々と報告されるようになった。この NPS は、通称“危険ドラッグ（2014 年 7 月に厚生労働省と警察庁が呼称として選定）”とよばれ、その実態は現行の法規制から逃れるために、既存の乱用薬物の官能基等の化学構造を一部変化させた“デザイナードラッグ”である。これらデザイナードラッグの薬理作用は、基となった既存薬物に匹敵するまたは大きく上回るものが多く存在する。しかし、このような高い薬理活性およびその危険性はほとんど認識されなかったため、20~30 代の若者を中心に乱用者が急増した。この乱用者の増加に伴って、急性薬物中毒、薬物乱用者による暴行や殺人事件、そして薬物影響下での危険運転による交通事故が相次いで発生した^[7-9]。その結果、危険ドラッグの乱用は、大きな社会問題として国内外のメディアで大きく取り上げられるようになった。

厚生労働省は危険ドラッグ乱用問題への施策として、2007 年 4 月から医薬品・医療機器等の品質・有効性及び安全性の確保等に関する法律（医薬品医療機器等法、旧薬事法）により、危険ドラッグを“指定薬物”として順次規制

し、該当物質の製造、輸入、販売の取り締まりを強化した^[10]。さらに 2014 年 4 月の法改正により単純所持および使用についても規制することで、危険ドラッグの売買者に加えて乱用者の取り締まりも強化した。2007 年に初めて危険ドラッグ（31 物質）が指定薬物として法律で規制され、その後も新たな危険ドラッグの登場とともに指定薬物は追加された（表 1）。しかしながら、危険ドラッグの個別指定では、法規制が施行される頃には該当指定薬物は市場から姿を消し、構造をわずかに改変させた新たな薬物が既に流通しているという事態が繰り返されるようになった。この危険ドラッグの構造改変と法整備の“いたちごっこ”への対策として、薬物基本骨格と官能基の組合せを用いた「包括指定」と呼ばれる薬物規制が実施された。包括指定は、2013 年 3 月、2014 年 1 月および 2015 年 5 月に施行され、それぞれ 759 物質、474 物質および 827 物質が一度に指定薬物に追加された。その後も指定薬物は追加され、2021 年 12 月現在、2389 物質が指定薬物として規制の対象となっており、今後も継続的に追加される見通しである。なお、1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one (α -PVP)や quinolin-8-yl 1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indole-3-carboxylate (5F-PB-22)等、指定薬物の中でも有害性が極めて高いと判断された化合物は、罰則がより重い麻薬に格上げ指定されている。

これら危険ドラッグは基本骨格ごとに大別され、カチノン類（CATs）、合成カンナビノイド類（SCs）をはじめ、トリプタミン類、フェネチルアミン類、亜硝酸エステル類、フェンタニル類、LSD 類等がよく知られている（図 1）。中でも CATs と SCs の押収量は際立って多く、その化学構造の派生也多岐に渡る。規制されている構造類似体は、CATs で約 1400 種（全指定薬物の 6 割）、カンナビノイド類では約 800 種（全指定薬物の 3 割）に上る。また、2017 年には、MA のアミノ基に *tert*-butoxycarbonyl (Boc)基が導入された BocMA が指定薬物に追加されている。これは、BocMA が MA の密輸の手口として使われていたためであるが、経口摂取後に、胃液中で MA を生成する潜在的な MA プロドラッグとしても危険視されている。

これら乱用薬物の摂取証明には、非侵襲的かつ容易に採取が可能な尿試料が汎用される。また、薬物未変化体に加えてその代謝物を試料中から検出することが分析の信頼性の点から非常に重要とされ、代謝が速く未変化体が試料中から検出されない薬物でも、その薬物に特異的な代謝物を検出することで摂取証明が可能となる。なお、交通事故の場合は、当時の薬物の影響を推測するために血液中の未変化体濃度が重要視される。このように、ヒトにおける薬物の代謝・排泄経路の解明は、摂取証明を行う上で不可欠である。

しかしながら、新たに登場する危険ドラッグの代謝および排泄に関する情報は極めて乏しい。加えて、危険ドラッグの標準品は高価であり、試薬会社が製

造販売するまでに長い時間を要する。なお、危険ドラッグの代謝物に至っては、ほぼ全てが入手不可能である。

本研究では、流通する危険ドラッグの大半を占める CATs および SCs について、これらを使用したとされるヒトの尿および血液試料を分析し、得られた結果から、CATs および SCs の構造や官能基の違いが代謝および排泄に与える影響とともに、摂取証明に有用な代謝物や生体試料の選択について考察する。また、潜在的 MA プロドラッグである BocMA については、使用者の生体試料が入手できなかったことから、*in vitro* (胃液および肝ミクロソーム) および *in vivo* (ラットへの投与) 代謝試験を行うことで、その代謝・排泄経路を予測する。なお、入手ができない危険ドラッグやその代謝物については、適宜、有機合成により標準品を作成した。

得られた研究結果から、危険ドラッグの代謝・排泄挙動解明するとともに、摂取証明に有用な分析対象となる代謝物を示し、生体試料の選択や分析法についても提案する。

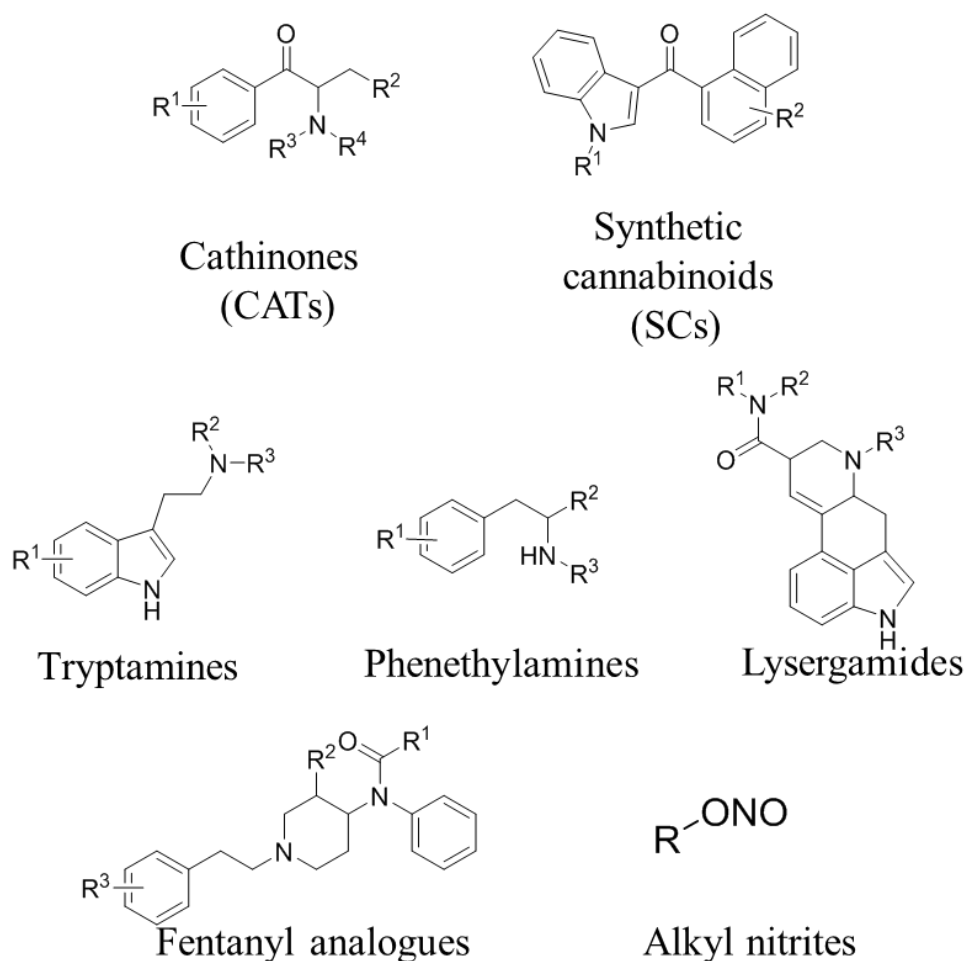


図 1. 危険ドラッグとその構造

表 1. 指定薬物の規制年表

施行年月日	指定薬物		備考
	追加数	合計	
2007.4.1	31	31	
2008.1.11	5	36	
2008.1.18	-3	33	(3物質が麻薬に格上げ指定)
2009.1.16	6	39	
2009.11.20	6	45	
2010.9.24	5	50	
2011.5.14	9	59	
2011.10.20	9	68	
2012.7.1	9	77	
2012.8.3	-4	73	(4物質が麻薬に格上げ指定)
2012.11.16	17	90	α-PVPが指定薬物に追加
2013.1.16	8	98	
2013.3.1	-6	92	(α-PVPを含む6物質が麻薬に格上げ指定)
2013.3.22	759	851	第1回包括規制(SCs)
2013.5.26	-2	849	
2013.5.30	27	876	5F-PB-22が指定薬物に追加
2013.7.28	5	881	
2013.11.20	7	888	
2014.1.12	474	1362	第2回包括規制(CATs)
2014.1.19	-2	1360	(2物質が麻薬に格上げ指定)
2014.4.5	10	1370	
2014.7.11-8.11	9	1379	(5F-PB-22が麻薬に格上げ指定)
2014.8.25	21	1400	
2014.9.29	14	1414	
2014.11.8	8	1422	
2014.11.28	7	1429	
2015.1.5	8	1437	
2015.2.9	11	1448	
2015.2.28	6	1454	
2015.4.4	16	1470	
2015.5.11	827	2297	第3回包括規制(CATs)
2015.6.1-12.5	27	2324	
2015.12.25	3	2327	
2016.1.31-6.26	12	2339	
2016.7.2	6	2345	
2016.9.3	3	2348	
2016.11.11-12.31	8	2356	
2017.3.6-7.1	10	2366	
2017.8.25	-8	2358	(8物質が麻薬に格上げ指定)
2017.9.8-12.29	10	2368	BocMAが指定薬物に追加
2018.3.10-12.29	4	2372	
2019.3.1-6.23	6	2378	
2019.7.28	-9	2369	(9物質が麻薬に格上げ指定)
2019.9.8-12.27	9	2378	
2020.3.9	7	2385	
2020.8.7	-10	2375	(10物質が麻薬に格上げ指定)
2020.9.5	6	2381	
2020.11.29	3	2384	
2021.2.1	4	2388	
2021.3.25	4	2392	
2021.6.27	2	2394	
2021.9.4	3	2395	
2021.10.8	-5	2389	(5物質が麻薬に格上げ指定)

本 論

第 1 章 カチノン類の芳香環の構造が代謝および排泄に与える影響

第 1 節 背景および目的

流通する危険ドラッグの多くはカチノン類 (CATs) と合成カンナビノイド類 (SCs) の 2 種類に大別される。本研究対象薬物の 1 つである CATs は、熱帯地域に自生する植物 Khat (学名 *Catha edulis*) に含まれるアルカロイド「カチノン」を基に作られたもので、覚醒剤 (MA, AP) と類似の化学構造を有し、シナプス間隙でのドパミン取り込み阻害といった覚醒剤と同様の機序により、中枢神経興奮作用を示す^[11-13]。国内では、2010 年頃から 20~30 代の若年層を中心に乱用者が急増しており、薬物使用が引き金となった殺人や傷害等、凶悪事件も報告されている^[8]。しかしながら、CATs の摂取証明に有用な特異的代謝物や分析条件等は十分にわかっておらず、摂取証明法の確立は重要課題とされている。

CATs の基本的な代謝は、その共通構造であるカルボニル基の還元であり、生成するアルコール体 (M1) は、未変化体の基本骨格が保持されていることから、CATs の摂取証明に有用な代謝物とされる^[14-18]。このほかの代謝経路は、アミン部、芳香環、アルキル鎖 (主鎖) の長さによって変化し、主要代謝経路もこれらの構造に依存する^[16-28]。CATs の中でも特に流通量の多い 1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one (別名 α -PVP, 2012 年に指定薬物に指定され、2013 年に麻薬へ格上げ指定) に代表されるピロリジノフェノン誘導体 (PPs) は、ピロリジン環のヒドロキシ化および脱水素反応 (酸化) を経てピロリジン環酸化体 (M2) へと代謝されることが示されている^[25-28]。加えて、PPs の主要代謝経路は、アルキル鎖の伸長に伴い、カルボニル還元から、ピロリジン環酸化を経て、アルキル鎖の $\omega/\omega-1$ 位の酸化へと変遷していくことが報告されている (図 2) ^[25-29]。一方で、流通する PPs の構造改変はアルキル鎖だけでなく、芳香環にも及んでいる。中でもフェニル基にフルオロ基、メチル基、メトキシ基またはメチレンジオキシ基が導入されたものや、フェニル基が硫黄原子を含むチエニル基に置換された構造類似体の流通が多く報告されている。本研究では、 α -PVP の芳香環部の構造類似体であり指定薬物として規制されている 3 種の PPs {1-(4-fluorophenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one (4F- α -PVP)、1-(4-methoxyphenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one (4MeO- α -PVP) および 2-(pyrrolidin-1-yl)-1-(thiophen-2-yl)pentan-1-one (α -PVT)} を対象として、これらの代謝物の標準品を合成し、使用者の尿試料について液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を行うことで、各 PPs の代謝物の定性・定量

分析を行った。得られた結果から、芳香環の構造がPPsの代謝経路に与える影響および摂取証明に有用な代謝物を考察する。

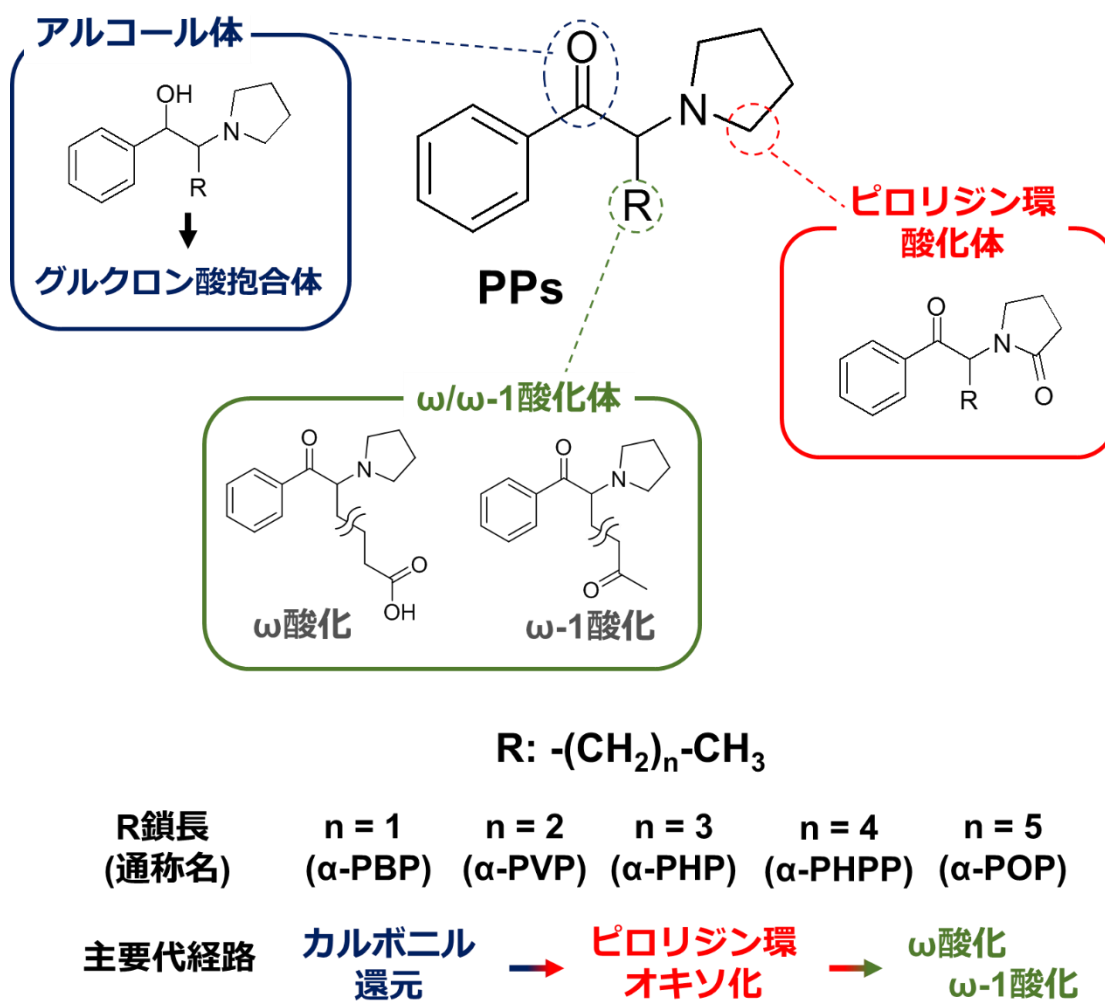


図 2. PPs の代謝経路とアルキル鎖長の変化が代謝経路に与える影響

第 2 節 実験および方法

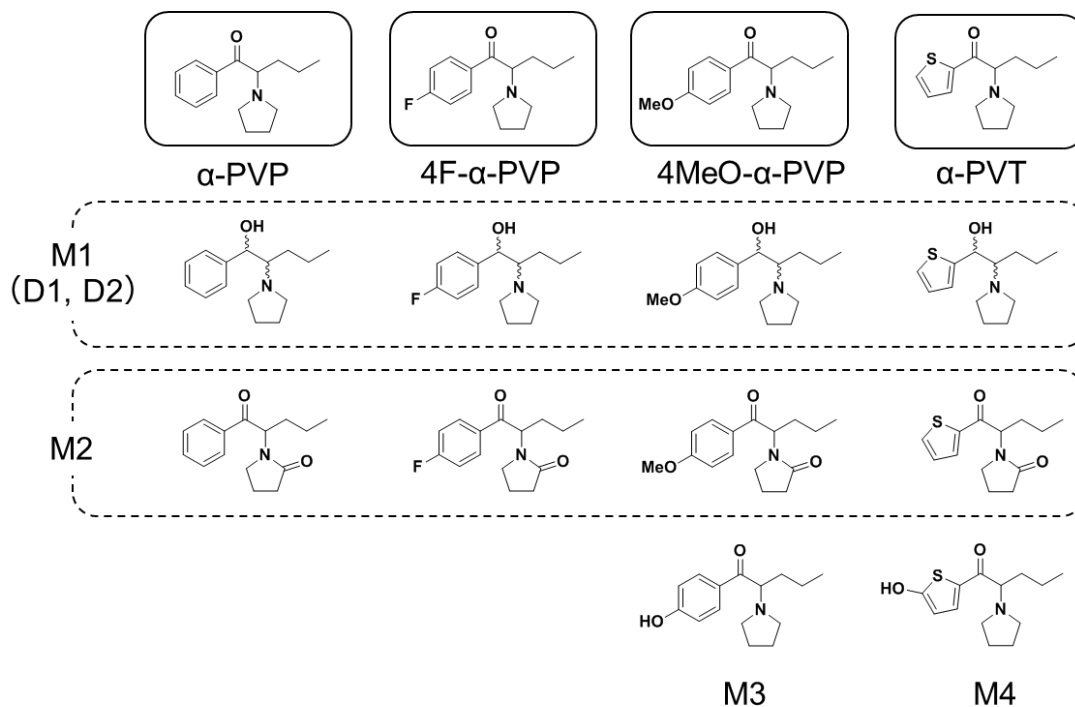
2-1 項 試薬

尿試料中の PPs 代謝物であるグルクロン酸/硫酸抱合体の加水分解酵素には、Sigma-Aldrich 社製の β -グルクロニダーゼ Type H-1 (from *Helix pomatia*, グルクロニダーゼ活性 : 498,800 units/g, スルファターゼ活性 : 14,000 units/g) を用いた。1 M ギ酸アンモニウム溶液および LC/MS 用メタノールは、和光純薬工業から購入した。内部標準物質 (IS) として和光純薬製の dibenzylamine (DBA) を用い、高分解能質量分析のキャリブレーションには、AB Sciex 製の試薬 (Positive Calibration Solution) を用いた。標準品合成は、全て和光純薬製の試薬を用いた。

2-2 項 ピロリジノフェノン誘導体およびその代謝物の標準品合成

図 3-A に α -PVP とともに示すとおり、研究対象である 3 種の PPs ならびに、それらの代謝物 M1~4 (M1-D1 および M1-D2, アルコール体の各ジアステレオマー ; M2, ピロリジン環酸化体 ; M3, O-脱メチル体 ; M4, チェニル基酸化体) は、既報^[30]に準じ、以下 (1) ~ (5) の通りに合成した。これらの合成経路を図 3-B に示す。合成した全ての標準試料 (M4 を除く) は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで単離した後、核磁気共鳴 (NMR) により同定した。

(A)



(B)

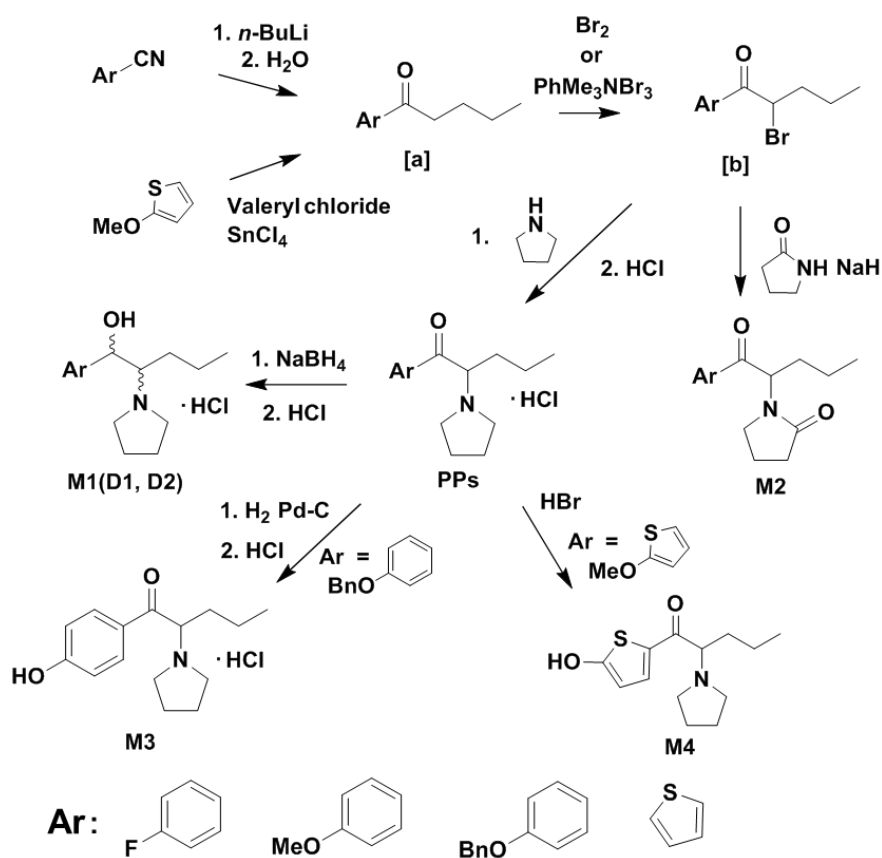


図 3. PPs およびその関連代謝物の化学構造(A)ならびに合成経路(B)

(1) PPs (4F- α -PVP、4MeO- α -PVP および α -PVT)

芳香族ニトリル 3.0 g (以下順に 4-fluorobenzonitrile: 2.5 mmol、4-methoxybenzonitrile: 2.3 mmol および thiophene-2-carbonitrile: 2.8 mmol) をテトラヒドロフラン (THF) に溶かし (0.5 M)、窒素雰囲気下で 0°C に冷却した後、1 当量の *n*-ブチルリチウムのヘキサン溶液 (2.6 M) をゆっくりと滴下した。添加後に反応液は室温まで昇温させ、過剰量の飽和塩化アンモニウム水溶液に移し反応を停止させた後、酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後減圧濃縮することで得られた粗生成物を、シリカゲルを用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製し、芳香族ケトンである中間体[a]を得た (収率 93, 85, 75%)。中間体[a] 1 g をジクロロメタンに溶解し、これに 1 当量の臭素を滴下した後、室温で 10 分間攪拌し反応させた。その後、水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後減圧濃縮することで得られた粗生成物を、シリカゲルを用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製し、2-臭素化-芳香族ケトンである中間体[b]が得られた (収率 92, 81, 77%)。中間体[b] 0.5 g の THF 溶液 (0.5 M) に 2 当量のピロリジンを滴下し、室温で 24 時間反応させた。反応液に水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥しろ過後減圧濃縮することで粗生成物を得た。シリカゲルを用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製し、5%塩化水素メタノール液を添加後、減圧濃縮することで各 PPs (塩酸塩) が得られた (収率 89, 85, 80%)。

(2) M1

各 PPs (50 mg)のエタノール溶液 (0.05 M) を 60°C に昇温した後、5 当量のテトラヒドロホウ酸ナトリウムを加え、攪拌しながら 60°C で 1 時間反応させた。反応液に水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後減圧濃縮することで粗生成物を得た。シリカゲルを用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製し、5%塩化水素メタノール液を添加後、減圧濃縮することで各 M1 の塩酸塩を得た (収率 99, 98, 92%)。なお、M1 は 2 種のジアステレオマー (D1 および D2) として生成され、その混合比は ¹H-NMR の積分値から算出した。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃; M1 of 4F- α -PVP as mixture of D1 denoted by * and D2 denoted by §): δ 7.34–7.26 (m, 2H*, 2H§), 7.04–6.99 (m, 2H*, 2H§), 4.95 (d, J = 3.7 Hz, 1H*), 4.16 (d, J = 9.2 Hz, 1H§), 2.76–2.49 (m, 5H*, 5H§), 1.79 (br, 4H*, 4H§), 1.50–1.25 (m, 2H*, 2H§), 1.12–0.82 (m, 2H*, 2H§), 0.70 (t, J = 7.3 Hz, 3H*, 3H§). M1-D1/M-D2 = 1.0.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 ; M1 of 4MeO- α -PVP as mixture of D1 denoted by * and D2 denoted by §): δ 7.29–7.25 (m, 2H*, 2H§), 6.89–6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H*, 2H§), 4.92 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H*), 4.13 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H§), 3.80 (s, 3H§), 2.80–2.50 (m, 5H*, 5H§), 1.77 (br, 4H*, 4H§), 1.50–1.21 (m, 2H*, 2H§), 1.18–0.79 (m, 2H*, 2H§), 0.68 (m, 3H*, 3H§). M1–D1/M–D2 = 0.72.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 ; M1 of α -PVT as mixture of D1 denoted by * and D2 denoted by §): δ 7.26–7.21 (m, 1H*, 1H§), 6.98–6.91 (m, 2H*, 2H§), 5.11 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H*), 4.48 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H§), 2.81–2.59 (m, 5H*, 5H§), 1.75 (br, 4H*, 4H§), 1.52–0.91 (m, 4H*, 4H§), 0.85–0.75 (m, 3H*, 3H§). M1–D1/M–D2 = 1.2.

(3) M2

各中間体[b] 0.5 g の THF 溶液 (0.3 M) に、2 当量のピロリドンと流動パラフィンに分散した水素化ナトリウムを 0°C で 10 分間反応させた THF 溶液 (1 M) をゆっくり滴下し、室温で 1 時間攪拌し反応させた。反応液に水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後減圧濃縮することで得られた粗生成物を、シリカゲルを用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製することで、各 M2 を得た (収率 12, 7, 5%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 ; M2 of 4F- α -PVP): δ 8.13–8.10 (dd, $J = 5.5, 8.7$ Hz, 2H), 7.16–7.12 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.62 (dd, $J = 6.0, 9.3$ Hz, 1H), 3.40–3.33 (m, 1H), 3.26–3.20 (m, 1H), 2.51–2.30 (m, 2H), 2.04–1.72 (m, 4H), 1.36–1.30 (m, 2H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 ; M2 of 4MeO- α -PVP): δ 8.05 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.95 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 5.62 (dd, $J = 6.0, 9.1$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.38–3.21 (m, 2H), 2.46–2.28 (m, 2H), 1.96–1.69 (m, 4H), 1.36–1.25 (m, 2H), 0.97 (t, $J = 7.3$, 3H).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 ; M2 of α -PVT): δ 8.02 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.13 (m, 1H), 5.53 (dd, $J = 5.8, 9.0$ Hz, 1H), 3.42–3.30 (m, 2H), 2.49–2.33 (m, 2H), 2.02–1.71 (m, 4H), 1.37–1.28 (m, 2H), 0.97 (t, $J = 7.3$, 3H).

(4) M3

本項 (1) に従い、4-(benzyloxy)benzonitrile (5 g) を原料として 1-(4-benzyloxyphenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one (4BnO- α -PVP) を合成した (総括収率 69%)。4BnO- α -PVP (0.3 g) のエタノール溶液 (0.05 M) に、触媒としてパラジウム炭素 20 mg を添加し、室温／水素ガス気流下で 3 日間攪拌しながら反応させた。この反応液をセライトでろ過し、ろ液に 5% 塩化水素メタノール液を添加後、減圧乾固し M3 (塩酸塩) を得た (収率 94%)。なお、純度が

高かったことから、M3 について精製操作は実施しなかった。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 ; M3 of 4MeO- α -PVP): δ 7.97 (d, J = 8.7, 2H), 6.90 (d, J = 8.7, 2H), 4.09 (dd, J = 8.8, 4.4 Hz, 1H), 2.87–2.69 (m, 4H), 1.94–1.76 (m, 6H), 1.26–1.20 (m, 2H), 0.83 (t, J = 7.3, 3H).

(5) M4

原料 2-methoxythiophene (3 g)のクロロホルム溶液 (0.3 M) に、1 当量の valeryl chloride を加えた後、窒素気流下で -20°C に冷却した。その後、1 当量の四塩化スズのクロロホルム溶液 (0.1 M) を 1.5 時間かけて滴下し、反応液を 0°C まで昇温した。この反応溶液をあらかじめ 0°C に冷却された 2 M の塩酸に注ぎ反応を停止させた。その後、クロロホルムで3回抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後減圧濃縮することで得られた粗生成物を、シリカゲルを用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製することで中間体[a]を得た (収率 48%)。中間体[a] (0.4 g)の THF 溶液に、1 当量の trimethylphenylammonium tribromide を加え、攪拌しながら 50°C で 10 分間反応させた。反応液に水を加え、酢酸エチルで3回抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後減圧濃縮することで得られた粗生成物を、シリカゲルを用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製することで中間体[b]が得られた (収率 70%)。中間体[b] (0.2 g)の THF 溶液 (0.2 M) に2当量のピロリジンを滴下し、室温で 24 時間反応させた。減圧濃縮し、得られた粗生成物を、シリカゲルを用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製することで 1-(5-methoxythien-2-yl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one (5MeO- α -PVT)が得られた (収率 85%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 ; 5MeO- α -PVT): δ 7.75 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 6.25 (d, J = 4.6, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.49 (q, J = 4.6 Hz, 1H), 2.68–2.52 (m, 4H), 1.86–1.69 (br, 6H), 1.32–1.23 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

得られた 5MeO- α -PVT (90 mg)を 40%臭化水素酸に溶かし、5 時間加熱還流した。得られた反応液を飽和炭酸水素ナトリウムで pH10 に調整した後、クロロホルム-イソプロパノール (3:1) で抽出し、減圧濃縮した。その後、薄層クロマトグラフィーで精製することで M4 を得た。得られた M4 は微量であったことから、高分解能質量分析を用いて精密質量を測定し ($[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 254.1209)、分子式を特定 ($\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{S}$) することでその生成を確認した。

合成した全ての標準試料は、1 mg/mL のメタノール溶液に各々調製し -20°C で保存した。これら保存液は必要に応じて蒸留水で希釈して実験に用いた。

2-3 項 分析試料および前処理

大阪府警科学捜査研究所に鑑定嘱託された尿試料のうち、本研究対象となる 3 種の PPs が検出された計 26 検体（内訳：4F- α -PVP, 18 検体；4MeO- α -PVP, 2 検体； α -PVT, 6 検体）について分析した。

尿試料 100 μ L に、DBA (100 ng/mL) 100 μ L およびメタノール 600 μ L を添加して攪拌し、遠心分離（7,000 g, 5°C, 15 min）した後、得られた上清 200 μ L を蒸留水 800 μ L で希釈し、その 5 μ L を LC-MS/MS に注入した。

必要に応じて、抱合代謝物を対象に加水分解を行った。尿試料 1 mL に 1M 酢酸および酢酸緩衝液を加えて pH5 に調整し、加水分解酵素（ β -グルクロニダーゼ）1 mg を添加した後、37°C で 5 時間反応させた。

2-4 項 分析装置および測定条件

液体クロマトグラフには島津製 Prominence を用いた。質量分析装置には、PPs および M1~4 の定性・定量分析用に AB Sciex 製 3200Q TRAP（三連四重極型）、その他の代謝物探索用に AB Sciex 製 TripleTOF 5600（四重極-飛行時間型）を使用し、以下に示す条件で分析を実施した。カラム：L-column 2 ODS セミマイクロカラム（1.5 mm i.d. \times 150 mm, 粒子径 5 μ m, 化学物質評価研究機構製）、移動相：A ボトル-10 mM 酢酸アンモニウム含有 5% メタノール、B ボトル-10 mM 酢酸アンモニウム含有 95% メタノール、グラジエント条件：[B ボトル] 0-100%（0-15 min, リニアグラジエント）-100%（15-25 min）-0%（25-35 min）、移動相流量：0.1 mL/min, カラムオーブン：40°C、イオン化：エレクトロスプレーイオン化（ESI）ポジティブ測定モード、イオンスプレー電圧：5.5 kV、ターボスプレー温度：500°C、ネブライザーガスおよびコリジョンガス：窒素。質量分析装置による定性分析は、各化合物のプロトン化分子をプリカーサーイオンとしたプロダクトイオンスキャンモード（コリジョンエネルギー：35 eV）で行った。定量分析は、選択的反応モニタリング（SRM）モードで実施し、各化合物の設定条件は表 2 に示す通りである。また、高分解能質量分析装置（TripleTOF 5600）におけるフルスキャン分析およびプロダクトイオンスキャン分析は、それぞれ測定範囲 m/z 100-1000 および m/z 50-1000 で実施し、分析に先立ちキャリブレーション試薬（Positive Calibration Solution）を用いて質量校正を行った。

2-5 項 分析バリデーション

ドラッグフリー尿 990 μ L に、M1 (D1, D2)、M2 および M3 の濃度が 0.2、0.5、1、5、10、50、100 および 500 ng/mL になるように、標準品のメタノール溶液 10 μ L を添加し、よく攪拌した。この標準品を添加した尿試料 100 μ L

に、DBA (100 ng/mL) 100 μ L およびメタノール 600 μ L を添加して攪拌し、遠心分離 (7,000 g, 5°C, 15 min) した後、得られた上清 200 μ L を蒸留水 800 μ L で希釈し、その 5 μ L を LC-MS/MS に注入した。また、同様の手順で反応液濃度が 30、100 ng/mL となるように標準品を添加した尿試料を分析し、精度および確度を算出した ($n = 5$)。

前項に従って分析し、バリデーションを実施した結果、いずれの化合物でも、ミクロソームでは 0.5-500 ng/mL の範囲で、検量線は高い直線性 ($r^2 > 0.993$) を示した。検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ) は、各 SRM トランジションのシグナル/ノイズ比をそれぞれ 3 および 10 として定義した。検討の結果、尿中の各 PPs および M1~3 は、いずれも定性限界は 0.2 ng/mL、定量限界は 0.5 ng/mL であった。バリデーションを実施した全ての化合物について、精度および確度は日内日間ともに誤差 15% 未満であった。また、検量線の範囲を超えた各 PPs および代謝物を含む尿試料については、ドラッグフリー尿で適宜希釈し、定量した。

表 2. 分析化合物と定量分析用 SRM パラメータ

Compound	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	Time (msec)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (eV)	CXP (V)
4F- α -PVP	250.2	109.1	50	43	7	15	32	6
M1-D1 and -D2	252.2	191.3	50	31	6	15	32	6
M2	264.2	109.1	50	33	7	15	33	6
4MeO- α -PVP	262.3	121.1	50	38	7	15	34	6
M1-D1 and -D2	264.2	203.3	50	26	7	15	30	6
M2	276.2	140.2	50	28	6	15	32	6
M3	248.2	107.1	50	38	7	15	33	6
α -PVT	238.2	126.2	50	36	7	15	30	6
M1-D1 and -D2	240.2	179.3	50	26	6	15	30	6
M2	252.2	140.3	50	25	6	15	21	6
IS (DBA)	198.1	91.1	50	31	7	12	27	6

DP: declustering potential, EP: entrance potential, CE: collision energy, CXP: collision cell exit potential, Q1: quadrupole 1, Q3: quadrupole 3, IS: internal standard

第3節 実験結果

3-1 項 1-Phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one 構造類似体の尿中代謝物の構造決定

本研究で対象とした3種のPPsは、 α -PVPを基本骨格としており、第1節で述べた通り、主にアルコール体(M1)およびピロリジン環酸化体(M2)として尿中に排泄される^[25]。そこで、M1およびM2を中心とした尿中代謝物の探索を行った。各PPsの使用者尿分析により得られた抽出イオンクロマトグラムおよびプロダクトイオンスペクトルを図4, 5, 6に示す。各PPsの未変化体および代謝物の同定は、検出されたPPs(および代謝物)の保持時間およびプロダクトイオンスペクトルを、合成した標準試料の分析結果と比較することで行った。4F- α -PVPにおいては、未変化体(保持時間: 18.9分)とともに、M1-D1(16.3分)、M1-D2(16.9分)およびM2(21.6分)が検出された(図4)。4MeO- α -PVPおよび α -PVTにおいては、4F- α -PVPと同様に未変化体、M1-D1, M1-D2およびM2がそれぞれ検出されたほか、4MeO- α -PVPではO-脱メチル体(M3、保持時間: 14.5分)、 α -PVTではチエニル基酸化体(M4、保持時間: 11.0分)が併せて検出された(図5および6)。

以上の結果から、いずれのPPsにおいてもカルボニル還元およびピロリジン環酸化の代謝を受けることが示され、さらに4MeO- α -PVPにおいてはO-脱メチル化、 α -PVTにおいては芳香環酸化の経路が存在することが明らかとなった。なお、M3に関しては、Ellefsenらが行ったヒト肝細胞を用いた*in vitro*実験によってその存在が推定されていたが^[31]、本研究により実際のヒトの摂取においてもM3に代謝、排泄されることが示された。また、M4については、Swortwoodらが高分解能質量分析を用いて α -PVT使用者尿の分析を行いその存在を示唆していたが^[32]、質量分析を用いた構造推定の域を出ずチエニル基上のどの位置が酸化されているのかは不明であった。本研究では、合成した標準品を基にM4を同定し、チエニル基の5位が酸化されていることを初めて証明した。また、危険ドラッグは、基本骨格を保ちながら末端構造をわずかに改変して流通・乱用されるため、新規化合物の尿中代謝物を探索する際は、既存化合物の保持時間およびプロダクトイオンスペクトル情報を参照しながら行うのが効果的である。本研究で検出された代謝物の保持時間に着目すると、本法で用いたODS(C18)系カラムに対しては、代謝物M1は未変化体と比べて保持が弱く溶出時間が早くなるのに対し、代謝物M2は保持が強く溶出時間が遅かった(図4-A, 5-A, 6-A)。この結果は、これまでのPPsの報告とよく一致する^[25-28, 32]。また、O-脱メチル化およびチエニル基の酸化によって極性が高くなるM3およびM4はM1よりもさらに保持が弱かった(図5-A, 6-A)。

Intensity (cps)

5.0 $\times 10^5$

1.0 $\times 10^5$

5.0 $\times 10^5$

0

250.2>109.1

252.2>191.1

264.2>109.1

4F- α -PVP

M1-D1

M1-D2

M2

Retention time (min)

The figure displays four mass spectra and their corresponding chemical structures with fragmentation pathways:

- 4F-α-PVP:** The mass spectrum shows major peaks at m/z 84, 109, 123, 126, 179, 207, 250 ($[M+H]^+$), and 279 ($[M+H]^+$). The chemical structure shows fragmentation pathways with arrows indicating the loss of various fragments, including the 4-fluorophenyl group and the pyrrolidine ring.
- M1-D1:** The mass spectrum shows major peaks at m/z 72, 109, 135, 163, 191 ($[M+H-H_2O-C_3H_7]^+$), 234 ($[M+H-H_2O]^+ + 2$), and 252 ($[M+H]^+$). The chemical structure shows fragmentation pathways with arrows indicating the loss of various fragments, including the 4-fluorophenyl group and the pyrrolidine ring.
- M1-D2:** The mass spectrum shows major peaks at m/z 72, 109, 135, 163, 191 ($[M+H-H_2O-C_3H_7]^+$), 234 ($[M+H-H_2O]^+ + 2$), and 252 ($[M+H]^+$). The chemical structure shows fragmentation pathways with arrows indicating the loss of various fragments, including the 4-fluorophenyl group and the pyrrolidine ring.
- M2:** The mass spectrum shows major peaks at m/z 98, 109, 123, 140, 146, 161, 179, 246 ($[M+H-H_2O]^+$), and 264 ($[M+H]^+$). The chemical structure shows fragmentation pathways with arrows indicating the loss of various fragments, including the 4-fluorophenyl group and the pyrrolidine ring.

プリカーサーイオンはプロトン付加分子。

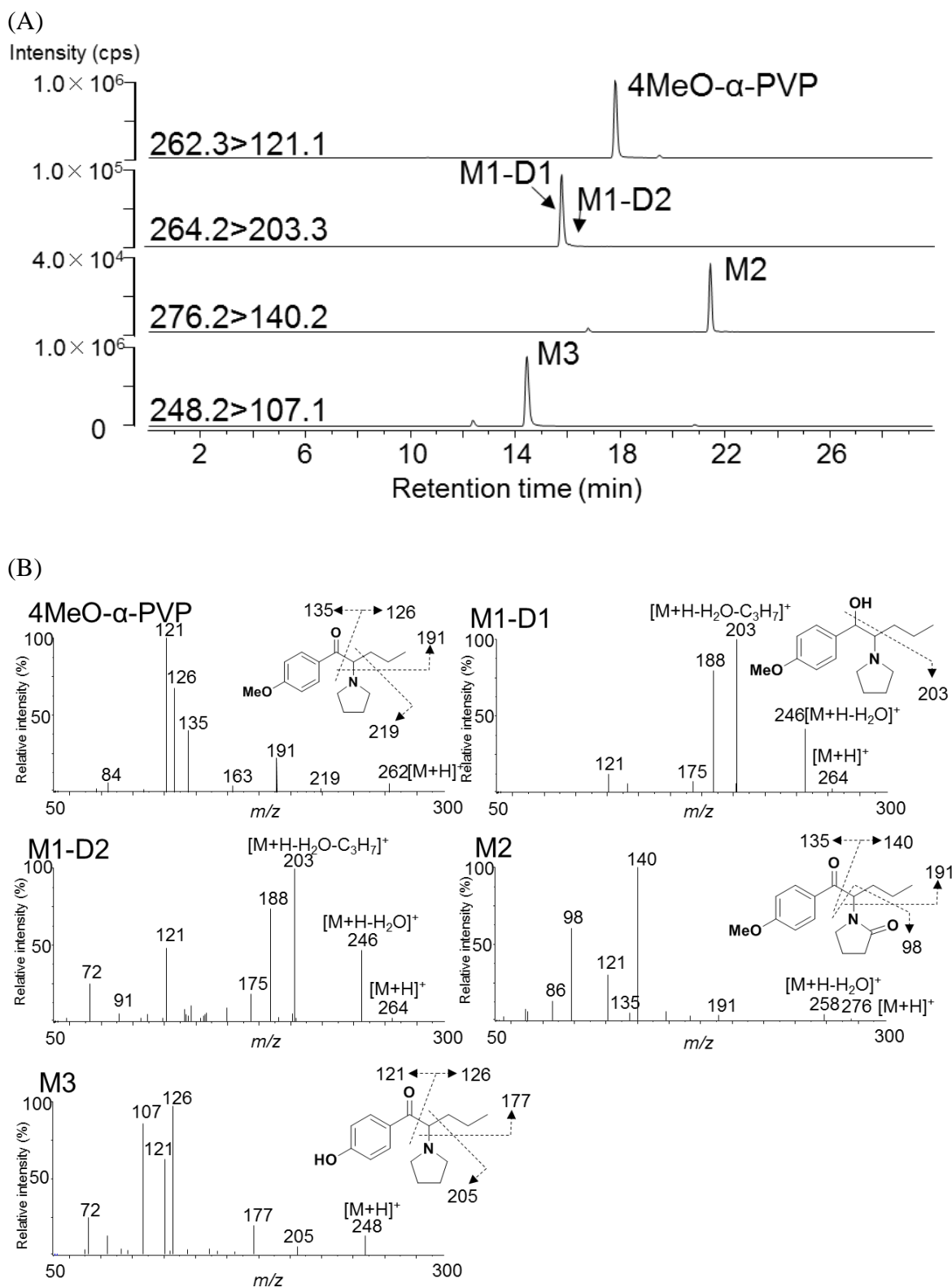


図 5. 4MeO- α -PVP 摂取者尿から得られた(A)抽出イオンクロマトグラムと(B)プロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオンはプロトン付加分子。

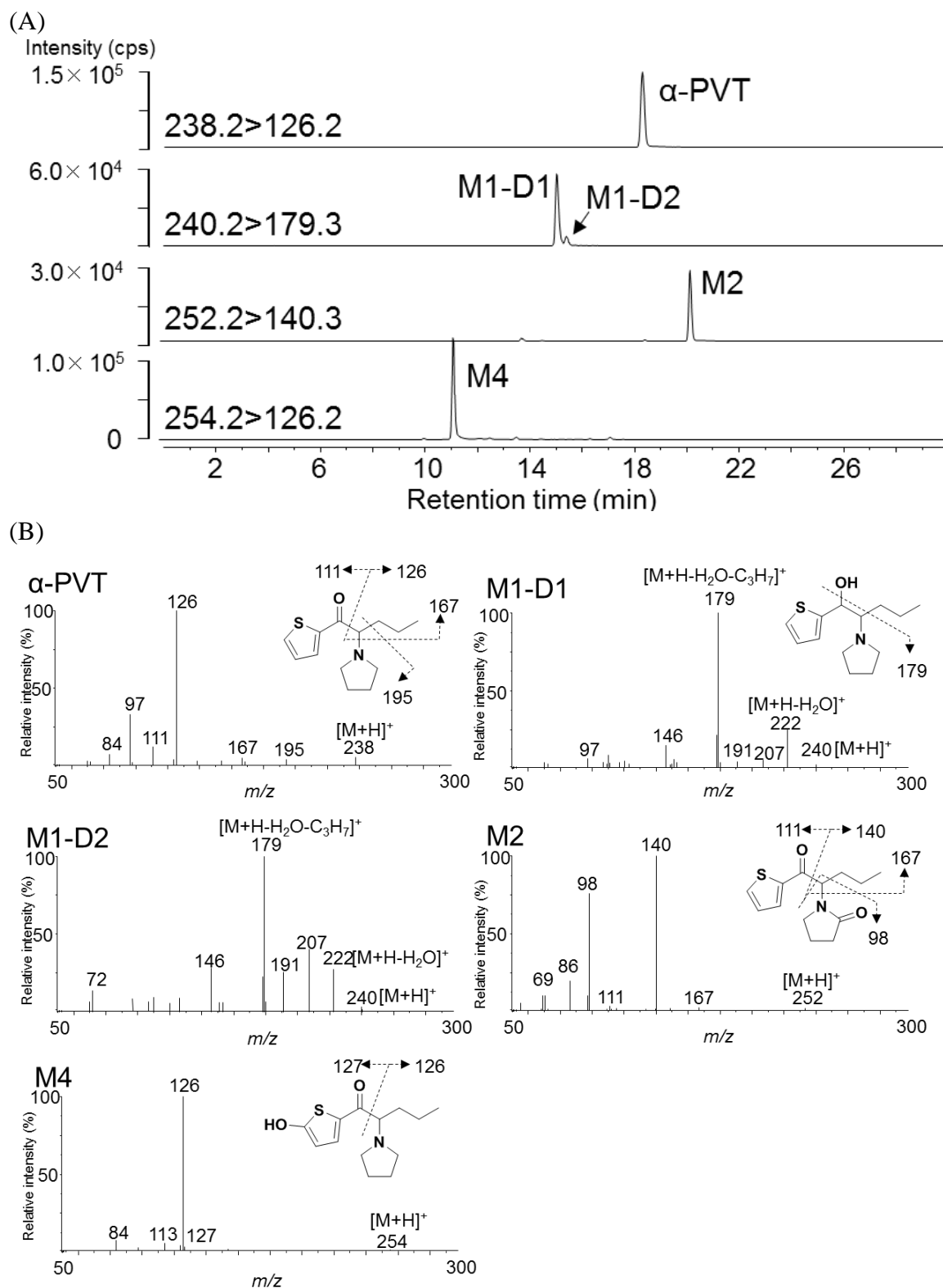


図 6. α -PVT 摂取者尿から得られた(A)抽出イオンクロマトグラムと(B)プロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオンはプロトン付加分子。

各 PPs 代謝物のプロダクトイオンについて、いずれの M1 も未変化体では観察されない脱水イオン ($[M+H-H_2O]^+$) およびその脱アルキルイオン ($[M+H-H_2O-C_3H_7]^+$) が強く観察された (図 4-B, 5-B, 6-B)。この開裂は PPs の M1 に共通するものと考えられる^[25-28, 32]。一方で、M2 は各 PPs の芳香環の違いによって若干の差がみられた。4F- α -PVP の M2 においては芳香環を含むプロダクトイオン (m/z 109 および 123) が強く観察されたのに対し、4MeO- α -PVP および α -PVT の M2 ではピロリジン環 (ピロリドン) を含むイオン (m/z 98 および 140) が強く観察された (図 4-B, 5-B, 6-B)。この現象は、各 PPs の芳香族ケトン部の電子密度の差に寄与しているものと考えられる。質量分析装置の ESI (ポジティブイオンモード) において、噴霧・プロトン化された分析対象化合物は、コリジョンセル (気相) において、窒素分子と衝突することで開裂し、プロダクトイオンを生成する。M2 については、電子が局在化するケトン部またはピロリドンのアミドがプロトン化されるものと推定される。すなわち、フェニル基のパラ位の水素が電子求引性を有するフルオロ基に置換されると、共役系にあるケトン部の電子密度が下がるためプロトン親和性は低下する。その結果、アミドがプロトン化され、その後の α 炭素で起きる開裂 (α 開裂) の際に、プロトン化されたピロリドン側に電荷が偏るため、芳香環を含むプロダクトイオンが生成するものと考えられる。

一方で、フェニル基のパラ位に電子供与性を有するメトキシ基が導入される、あるいはフェニル基が芳香族複素環であるチエニル基に置換されると、共役系にあるケトン部の電子密度 (プロトン親和性) が高くなると考えられる。その結果、ケトン部がプロトン化され、開裂時には、ピロリドンを含むプロダクトイオンが観測されるものと考えられる。このようにカルボニル基の電子密度に関する情報は、M2 が生成するプロダクトイオンの予測や帰属を行う際の一助となる可能性が示唆された。

これらの保持時間およびプロダクトイオンに関する考察は、代謝経路が明らかになっていない新規 PPs の代謝物の構造推定する際に活用できるものと考えられる。

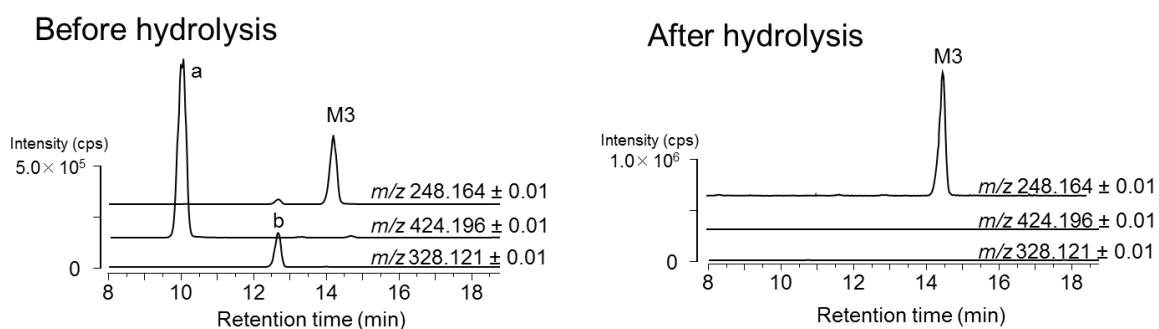
3-2 項 グルクロン酸抱合体の探索

4MeO- α -PVP の代謝物である M3 はフェニル環に水酸基を有し、 α -PVT の代謝物である M4 はチエニル基に水酸基を有するため、第 II 相代謝 (抱合反応) を受けている可能性が考えられた。そこで、高分解能質量分析により M3 および M4 の抱合体の探索を行った。その結果、図 7-A に示すように、M3 のグルクロン酸抱合体 (ピーク a) および硫酸抱合体 (ピーク b) と推定される成分が

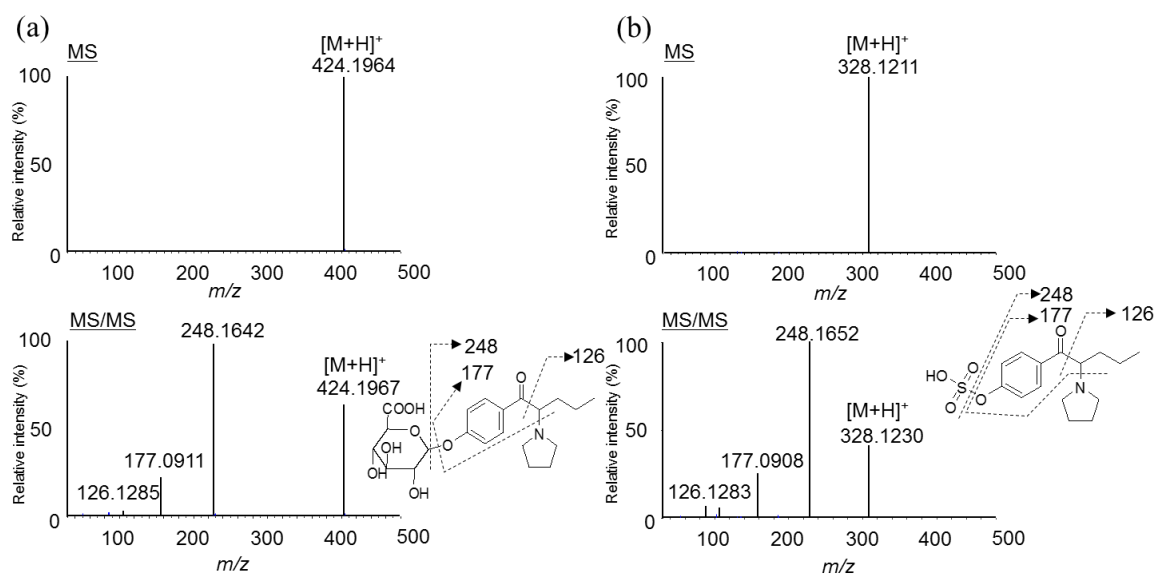
検出された。

各成分（ピーク a および b）の測定精密質量が各抱合体の理論値（グルクロン酸抱合体のプロトン化分子 $[\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{NO}_8]^+$ ：424.1966，硫酸抱合体のプロトン化分子 $[\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_5\text{S}]^+$ ：328.1213）とよく一致したのに加え、それぞれのプロダクトイオンスペクトルにおいてもアグリコン（M3）由来のイオン（ $[\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_2]^+$ ：248.1645）や M3 の特徴的なプロダクトイオン（ m/z 177 および 126）が検出された（図 7-B）。さらには、 β -グルクロニダーゼ（スルファターゼ活性を含む）を用いた加水分解によりピーク a および b は完全に消失し、M3 の増加が確認されたことから（図 7-A）、ピーク a および b はグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体であることが強く示唆され、M3 は第 II 相代謝（抱合反応）を受けるものと考えられた。なお、M4 の抱合体は検出されなかった（図 7-C）。

(A)



(B)



(C)

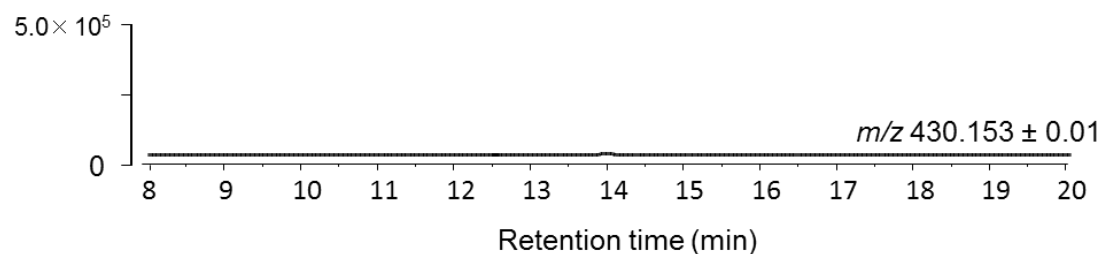


図 7. 酵素加水分解前後の 4MeO- α -PVP 摂取者尿から得られた(A)抽出イオンクロマトグラム、(B)ピーク a と b の高分解能プロダクトイオンスペクトル、ならびに(C) α -PVT 摂取者尿から得られた抽出イオンクロマトグラム
プリカーサーイオンは各推定プロトン付加分子 (a: $m/z\ 424.2$ 、b: $m/z\ 328.1$)。

3-3 項 尿中代謝物濃度の比較

次に PPs の芳香環部の構造が主要代謝経路に与える影響について検討するため、各 PPs の未変化体および代謝物の定量を行った。なお、 α -PVT の代謝物である M4 については、合成標準品を精製するに至らず定量分析を実施できなかったため、その検出イオン強度から考察した。各 PPs の定量結果を表 3, 4, 5 に示し、各未変化体を基準 (100%) とした代謝物の相対濃度を図 8 に示す。なお、基本骨格である α -PVP の代謝物の相対濃度についても既報^[25]より引用し、併せて示す。

4F- α -PVP 使用者尿 18 検体について定量分析した結果、未変化体および代謝物の濃度範囲は、未変化体が 0.0106~11.5 $\mu\text{g/mL}$ 、M1-D1 が 0.0075~13.2 $\mu\text{g/mL}$ 、M1-D2 が 0.0033~0.675 $\mu\text{g/mL}$ 、M2 が 0.0071~2.22 $\mu\text{g/mL}$ であった (表 3)。M1-D1、M1-D2 および M2 の濃度を比較すると、M1-D1 が最も高濃度である試料は 10 検体、M2 が最も高濃度である試料は 8 検体であった (図 8)。

4MeO- α -PVP 使用者尿 2 検体について定量分析した結果、未変化体および代謝物の濃度は、未変化体が 1.04 および 2.11 $\mu\text{g/mL}$ 、M1-D1 が 0.153 および 0.222 $\mu\text{g/mL}$ 、M1-D2 が 0.0006 および 0.0062 $\mu\text{g/mL}$ 、M2 が 0.0040 および 0.0699 $\mu\text{g/mL}$ 、M3 が 0.601 (加水分解後 : 2.3) および 4.28 (加水分解後 : 19.2) $\mu\text{g/mL}$ であった (表 4)。代謝物濃度を比較すると、M3 の濃度は M1 および M2 と比べて顕著に高かった (図 8)。

α -PVT 使用者尿 6 検体について定量分析した結果、未変化体および代謝物の濃度範囲は、未変化体が 0.0092~5.50 $\mu\text{g/mL}$ 、M1-D1 が 0.0006~0.720 $\mu\text{g/mL}$ 、M1-D2 が検出下限以下~0.0775 $\mu\text{g/mL}$ 、M2 が 0.0336~1.79 $\mu\text{g/mL}$ であった (表 5)。代謝物の定量値を比較すると、全ての試料において M2 濃度が、M1 (D1, D2) と比べて顕著に高かった (図 8)。なお、定量値は得られなかったものの、検出イオンのピーク面積は、全ての試料 ($n=6$) において、M4 が最も高かった (図 6-A)。

表 3. 4F- α -PVP 摂取者尿の 4F- α -PVP 未変化体および代謝物濃度

Subject no.	Urinary concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	4F- α -PVP	M1-D1	M1-D2	M2
1	11.5	13.2	0.675	2.16
2	5.18	4.35	0.137	2.22
3	0.999	1.43	0.0311	0.945
4	0.685	0.699	0.0239	0.364
5	0.671	0.505	0.0203	0.865
6	0.426	0.278	0.0125	0.198
7	0.384	0.667	0.0199	2.13
8	0.315	0.249	0.0090	0.859
9	0.301	0.216	0.0091	0.257
10	0.240	0.126	0.0085	0.159
11	0.132	0.111	0.0062	0.077
12	0.116	0.0791	0.0067	1.68
13	0.0877	0.0768	0.0055	0.181
14	0.0641	0.0259	0.0037	0.181
15	0.0638	0.175	0.0088	0.0179
16	0.0192	0.0075	0.0033	0.0071
17	0.0135	0.0429	0.0055	0.0135
18	0.0106	0.0228	0.0035	0.0197

表 4. 4MeO- α -PVP 摂取者尿の 4MeO- α -PVP 未変化体および代謝物濃度

Subject no.	Urinary concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
	4MeO- α -PVP	M1-D1	M1-D2	M2	M3
19	2.11	0.153	0.0006	0.0699	4.28 (19.2) ^a
20	1.04	0.222	0.0062	0.0040	0.601 (2.3) ^a

カッコ内の値は、加水分解後の濃度を示す。

表 5. α -PVT 摂取者尿の PVT 未変化体および代謝物濃度

Subject no.	Urinary concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	α -PVT	M1-D1	M1-D2	M2
21	5.50	0.173	0.0206	1.79
22	2.69	0.720	0.0775	1.60
23	1.71	0.0670	0.0093	0.517
24	1.45	0.218	0.0237	1.70
25	0.191	0.0116	N.Q.	0.513
26	0.0092	0.0006	0.0015	0.0336

NQ: Not quantified (LOD 以下)

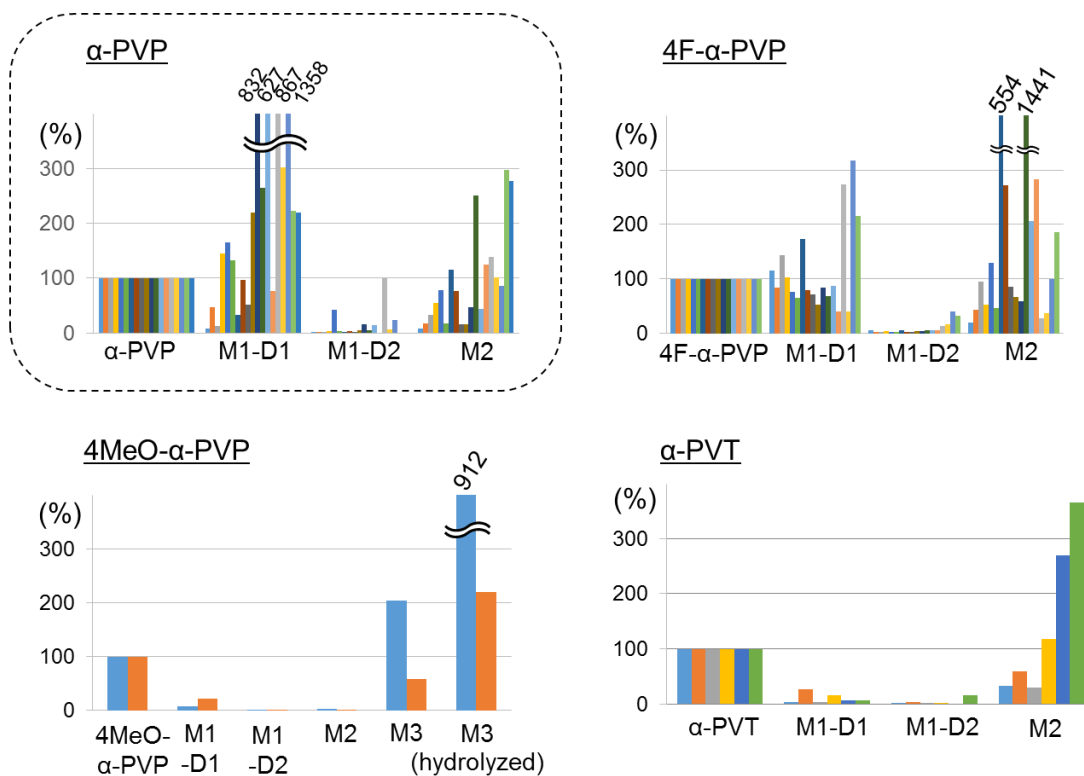


図 8. 4F-α-PVP, 4MeO-α-PVP および α-PVT の各代謝物の相対濃度
未変化体に対する比 (%) を示す。α-PVP に関する値はshima らの論文^[25]から引用。

第4節 考察

4-1 項 1-(4-Fluorophenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one の尿中代謝物

4F- α -PVP の使用者尿 ($n=18$) 中の M1-D1、M1-D2 および M2 の濃度の比較結果から、4F- α -PVP の主要代謝物は、 α -PVP と同様に、M1-D1 および M2 であることが示唆された。また、未変化体を基準とした代謝物の相対濃度についても、 α -PVP の使用者尿と比較して顕著な差は認められなかった (図 8)。主要代謝物と考えられる M1-D1 および M2 の濃度比については規則性が見られず、いずれの代謝物が優位に排泄されるかは、摂取からの経過時間や個々の代謝能力 (カルボニル還元酵素、チトクロム P450 等の代謝活性) の影響を受ける可能性がある。なお、カルボニル還元においては、M1 のジアステレオマー比 (M1-D1/M1-D2) が 7.0~45 (平均 20.0 ± 11.2 , $n=18$) であったことから、立体選択的な代謝であることが示唆された。 α -PVP のカルボニル還元も立体選択的な代謝であったため (M1-D1/M1-D2 : 2.3~46、平均 41.0 ± 11.8 , $n=16$)^[25]、4F- α -PVP は α -PVP と同様に、代謝によるカルボニル還元の立体選択性が維持されることが示された。以上の結果から、フェニル基の 4 位にフルオロ基が導入されても PPs の代謝経路には顕著な影響を及ぼさないことが示唆された。

4-2 項 1-(4-Methoxyphenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one の尿中代謝物

4MeO- α -PVP 使用者尿 ($n=2$) 中代謝物濃度の比較から、主代謝物は M3 と考えられた。また、未変化体を基準とした M1 および M2 の相対濃度は、 α -PVP の使用者尿と比較しても顕著に低く、主要代謝経路は α -PVP とは異なることが示唆された (図 8)。さらに、主要代謝物と考えられる M3 に関しては、酵素加水分解することでその濃度が概ね 4 倍に増加したため、約 7~8 割が抱合体 (グルクロン酸抱合体および硫酸抱合体) として尿中に存在することが示された。以上の結果から、フェニル基の 4 位がメトキシ基に置換されると、 α -PVP では主要代謝経路であったカルボニル還元およびピロリジン環酸化は副経路となり、代替して O-脱メチル化およびそれに続く抱合体化が主要経路になるものと考えられた。

4-3 項 2-(Pyrrolidin-1-yl)-1-(thiophen-2-yl)pentan-1-one の尿中代謝物

α -PVT 使用者尿 ($n=6$) 中の代謝物濃度から、M2 は主要代謝物と考えられた (表 5)。また、未変化体を基準とした代謝物の相対濃度を比較すると、M1-D2 および M2 は、 α -PVP 使用者の尿と同様の濃度比であったが、M1-D1 の未変化体に対する濃度は極めて低く、 α -PVP の結果と大きな差がみられた (図 8)。

チエニル基の酸化体である M4 は定量できなかったが、いずれの尿試料でも、

その検出強度は、他の代謝物より高かった（図 6-A）。以上の結果から、PPs のフェニル基がチエニル基に置換されると、カルボニル還元がマイナーな代謝経路になるとともに、チエニル基の酸化が主経路になる可能性が示唆された。 α -PVP や 1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)butan-1-one (α -PBP) 使用者の尿からは、芳香環（フェニル基）のヒドロキシ化体は検出されなかったのに対し^[25, 28]、 α -PVT では、チエニル基の酸化体が主要代謝物として検出されたことは興味深い。

4-4 項 摂取証明への活用

本研究で同定された α -PVP 類似体の代謝物 M1~4 は、いずれも各 PPs 未変化体の構造をよく保持していることから、これらの代謝物を検出は、未変化体の摂取証明に大きく寄与するものと考えられる。

各代謝物を探索した結果、PPs の 1 つである α -PVP のフェニル基の 4 位へのフルオロ基およびメトキシ基の導入ならびに、フェニル基がチエニル基に置換された場合でも、M1 および M2 は尿中から検出された。この定性結果に基づくと、PPs の芳香環の構造が改変された場合でも、M1 および M2 は、尿中から検出される可能性が高い分析対象と考えられる。また、各代謝物の定量結果に基づくと、 α -PVP の 4 位へのフルオロ基導入による主代謝物の変化はわずかであるが、メトキシ基が導入されると主代謝物は O-脱メチル化体となり、チエニル基導入ではチエニル基の酸化体が主代謝物となっており、主代謝物に大きな変化が見られた。

このように、PPs の芳香環の構造も代謝経路に様々な影響を与えることが示された。以上のことから、アミン、アルキル鎖そして芳香環の各構造によって CATs の主代謝経路が変化すると考えられる。なお、これらの構造が CATs の代謝経路に与える影響の強弱関係については更なる検討が必要と考えられる。

第5節 小括

本研究では、 α -PVP の構造類似体である 3 種の PP_s (4F- α -PVP, 4MeO- α -PVP, α -PVT) について、それらの使用者の尿を対象に、合成した標準試料を用いた代謝物分析を実施した。その結果、 α -PVP の主要代謝物でアルコール体およびピロリジン環酸化体は、いずれの誘導体においても検出された。また、4F- α -PVP の主代謝経路は α -PVP と同様であったのに対し、4MeO- α -PVP では O-脱メチル化とそれに続く抱合化が、 α -PVT ではチエニル基の酸化が主代謝経路となっていた。このように、主要な代謝物は各誘導体によって大きく異なっており、芳香環の種類や置換基が PP_s の代謝に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。本研究で得られた知見は、新規に流通する PP_s を含む CAT_s の摂取証明を行う上で有効に活用されるものと期待される。

PP_s の構造類似体として 4-クロロフェニル、インダン、ベンゾフラン、あるいはジヒドロベンゾフランを有するものの流通も確認されている。今後は、これら PP_s の代謝についても検討し、流通する新規薬物の取り締まりに対応していく必要があると考えている。

第2章 合成カンナビノイド類の脂溶性と官能基が尿排泄および血中濃度に与える影響

第1節 背景および目的

CATs とともに、流通する危険ドラッグの大半を占める合成カンナビノイド類 (SCs) は、大麻 (学名 *Cannabis sativa* L.) に含まれる Tetrahydrocannabinol (THC) の構造を基に合成されたものである^[33]。1994 年に John William Huffman によって研究目的で合成された SC である Naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-018) が、2004 年頃から欧州で乱用されはじめ、その後世界中に拡大したものと考えられている。SCs は、エンドカンナビノイドシステムに作用点をもつことが知られている^[34, 35]。このエンドカンナビノイドシステムは、脳内の海馬や大脳皮質に多く発現し認知や記憶を司る CB₁ 受容体と、末端臓器や免疫細胞に多く発現する CB₂ 受容体で形成されている。大麻有効成分 THC は CB₁ 受容体のパーシャルアゴニストとして知られている一方、JWH-018 をはじめとする多くの SCs はフルアゴニストとして作用する^[36-39]。そのため、SCs は大麻よりも高い薬理活性を持つとされ、幻覚や強硬症 (カタレプシー) といった深刻な作用を引き起こすことがわかっている^[40, 41]。2008 年から現在に至るまで、アメリカやヨーロッパ、ロシアをはじめとする世界各国で、大規模な SCs の流通が確認されており、それに伴う中毒事件も多く報告されている^[42]。日本では 2011 年以降、これら SCs の影響下で交通事故を起こす事件が急増し、重大な人身事故に至るケースも報告された。その結果、危険ドラッグは重大な社会問題として認識されるようになった。一方で、薬理作用の強化や法規制の回避を目的とした化学構造の改変は継続的に行われており、これまでに 200 種類以上の SCs が世界各国で流通している^[43]。これら SCs の摂取証明に加えて、事故当時の薬物の影響を推測するには、事故を起こした運転手から採取した尿や血液試料中の SCs の定性・定量分析が不可欠となるが、一連の化学構造改変に伴い、分布や代謝、排泄等も大きく変化していることが想定される。しかしながら、これら体内動態に関する情報は非常に限られているため、生体試料分析による摂取証明や血中濃度の解釈が難航するケースが散見された。本研究では、SCs の影響で交通事故を起こしたとされる運転手から採取した尿および血液試料から検出された 16 種の SCs を活用して、体内動態の予測を試みた。具体的には、検出された SCs を化学構造的特徴に基づいて 3 グループに分類し、分子編集ソフト (ChemBioDraw) を用いて算出した各 ClogP (オクタノール/水分配係数) を脂溶性の指標値とし、この値と生体試料中 SCs 濃度を比較し、傾向を観察した。

得られた結果から、脂溶性や官能基といった化学的特徴が尿排泄や血中濃度に与える影響について考察することで体内動態を予測する。加えて、有効な摂取証明法（試料選択および採取時期）についても考察する。

第2節 実験および方法

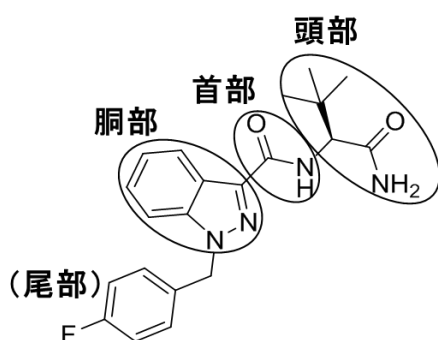
2-1 項 試薬

本研究で用いた全ての SCs { (4-Ethyl-1-naphthyl) – (1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-210)、 (4-ethylnaphthalen-1-yl)(1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indol-3-yl)methanone (EAM2201)、 (1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indol-3-yl)(4-methyl-1-naphthalenyl)methanone (MAM2201)、 3-(1-naphthalenylcarbonyl)-1*H*-indole-1-pentanenitrile (AM2232)、 *N*-(naphthalen-1-yl)-1-pentyl-1*H*-indole-3-carboxamide (NNEI)、 quinolin-8-yl 1-pentyl-1*H*-indole-3-carboxylate (PB-22)、 quinolin-8-yl 1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indole-3-carboxylate (5F-PB-22)、 quinolin-8-yl 1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-indole-3-carboxylate (FUB-PB-22)、 naphthalen-1-yl 1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indole-3-carboxylate (NM2201)、 *N*-(1-amino-3,3-dimethyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-indazole-3-carboxamide (ADB-FUBINACA)、 *N*-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(cyclohexylmethyl)-1*H*-indazole-3-carboxamide (AB-CHMINACA)、 *N*-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1*H*-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA)、 *N*-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indazole-3-carboxamide (5F-AB-PINACA)、 methyl *N*-(1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indazole-3-carbonyl) valinate (5F-AMB)、 methyl 2-(1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indazole-3-carboxamido)-3,3-dimethylbutanoate (5F-ADB)、 1-(5-fluoropentyl)-*N*-(naphthalen-2-yl)-1*H*-indole-3-carboxamide (5F-NNEI-2'naphthylisomer)} は、 Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) から購入し、 1 mg/mL のメタノール溶液に各々調製し-20°C で保存した。これら保存液は必要に応じて蒸留水で希釈して実験に用いた。その他の試薬とドラッグフリー血液は富士フイルム和光純薬 (Osaka, Japan) から購入した。

2-2 項 グループ分けと脂溶性の評価

SCs は流通する時期によって構造に特徴がみられる。そこで European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) の報告^[44]を参考に、SCs の構造を頭部・首部・胴部および尾部に分け、尾部を除く3部の構造(官能基)を基に、3つの Class に分類した(図 9-A)。なお、Class 1 は頭部にナフチル基誘導体、首部にケトン、胴部にインドール基をもつもの、Class 2 は頭部にキノリンやナフチル基誘導体、首部にエステルまたはアミド基、胴部にインドール基をもつもの、Class 3 は頭部に L-valine 又は L-*tert*-leucine 等のアミノ酸誘導体、首部にアミド基、胴部にインダゾール基、をもつものとした。加えて、Class 3 は頭部の末端がエステル型とアミド型の2つのタイプに分類した(図 9-B)。なお、Class 1 は 2011~2012 年、Class 2 は 2012~2013 年、Class 3 は 2013~2014 年に、流通が多く確認されている。

(A)



	Class 1	Class 2	Class 3
頭部	Naphthyl derivative	Quinoline/ Naphthyl	Valine/ <i>tert</i> -Leucine derivative
首部	Ketone	Ester/amide	Amide
胴部	Indole	Indole	Indazole

(B)

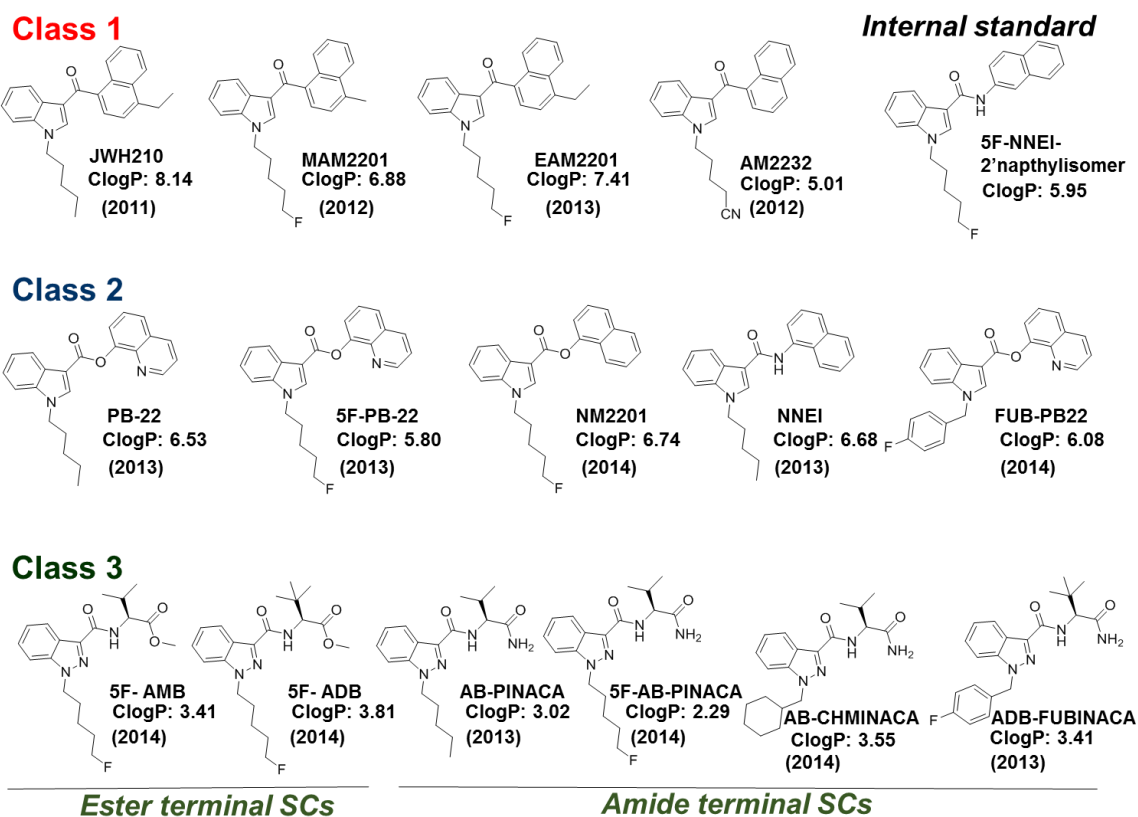


図 9. 検出された SCs の(A)分類と(B)分類した SCs の構造式および CLogP 値
 カッコ内の値は指定薬物に追加された年を示す。

2-3 項 分析試料および前処理

2012~2014 年の間に大阪で起きた交通事故のうち、SCs の影響下にあったとされる運転者 31 名 (Subject No. 1~31、19~48 歳、平均値 27 歳、中央値 29 歳、男性 31 名/女性 0 名) から採取された尿および血液試料について分析した。血液試料は、病院にて医師の指示の下、抗血液凝固剤 ethylenediamine-tetra acetic acid dipotassium 入りの採血管に採取され、大阪府警察科学捜査研究所に嘱託されたものである。なお、試料採取から分析までは、病院または警察署、および大阪府警察科学捜査研究所において -20°C の冷凍庫で保管された。事故から尿および血液試料採取までの経過時間は、病院/警察署の記録を参照した。

尿または血液試料 500 μ L に、IS 水溶液 (5F-NNEI-2naphthylisomer solution : 10 pg/mL) 2 mL を添加して攪拌した後、1 mL のクロロホルムで 2 回液-液抽出した。得られた有機層を合せた後、窒素気流下で乾固させた。得られた残渣は 20%メタノール溶液 100 μ L に再溶解し、遠心分離 (7,000 g, 5°C, 10 min) で得られた上清の 10 μ L を LC-MS/MS に注入した。ただし、Subject No. 4 の血液試料、Subject No. 18, 20, 25, 26 および 30 の尿試料については、試料量が不十分であったことから、定性分析のみ実施した。

2-4 項 分析装置および測定条件

液体クロマトグラフには島津製 Prominence を用いた。質量分析装置には、定性/定量分析用に AB Sciex 製 5500QTRAP (三連四重極型) を使用し、以下に示す条件で分析を実施した。カラム : L-column 2 ODS セミマイクロカラム (1.5 mm i.d. \times 150 mm, 粒子径 5 μ m, 化学物質評価研究機構製)、移動相 : A ボトルー 10 mM ギ酸アンモニウム含有 5%メタノール、B ボトルー 10 mM ギ酸アンモニウム含有 95%メタノール、グラジエント条件 : [B ボトル] 0~100% (0~20 min, リニアグラジエント) \rightarrow 100% (20~25 min) \rightarrow 0% (25~35 min)、移動相流量 : 0.1 mL/min、カラムオーブン : 40°C、イオン化 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) ポジティブ測定モード、イオンスプレー電圧 : 5.5 kV、ターボスプレー温度 : 500°C、ネブライザーガスおよびコリジョンガス : 窒素。質量分析装置による定性分析は、各化合物のプロトン化分子をプリカーサーイオンとしたプロダクトイオンスキャンモード (コリジョンエネルギー : 35 eV) で行った。定量分析は、選択的反応モニタリング (SRM) モードで実施し、各化合物の設定条件は表 6 に示した通りである。なお、分析バリデーションは、各 SCs を添加した尿または血液試料を分析することで実施した。

表 6. 分析化合物と定量分析用 SRM パラメータ

Compound	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	Time (msec)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
MAM2201	374.2	141.1	50	88	10	62	13
EAM2201	388.3	183.1	50	106	10	35	13
AM2232	353.1	155.1	50	82	10	30	13
NM2201	376.3	232.2	50	27	10	20	13
NNEI	357.2	214.3	50	69	10	28	13
FUB-PB-22	397.1	109.1	50	30	10	48	13
PB-22	359.2	214.2	50	32	10	23	13
5F-PB-22	377.2	232.2	50	32	10	25	13
5F-ADB	378.1	233.1	50	46	10	29	13
AB-CHMINACA	357.1	241.2	50	30	10	31	13
5F-AMB	364.2	233.2	50	46	10	26	13
ADB-FUBINACA	383.2	109.1	50	27	10	66	13
AB-PINACA	331.2	215.1	50	37	10	31	13
5F-AB-PINACA	349.2	233.2	50	27	10	29	13
IS	375.2	232.2	50	66	10	29	13

DP: declustering potential, EP: entrance potential, CE: collision energy, CXP: collision cell exit potential, Q1: quadrupole 1, Q3: quadrupole 3, IS: internal standard

2-5 項 分析バリデーション

分析バリデーションは、Shima および Drummer らの方法を参考に実施した^[45, 46]。検討の結果、本条件において、いずれの SCs においても検量線は高い直線性を示した（尿: $r^2 > 0.995$, 血液: $r^2 > 0.992$ ）。ただし、検量線は、尿試料で 10~1000 pg/mL（Class 1~3 の全 SCs）、血液試料で 100~10000 pg/mL（Class 1 および 2 の SCs）、30~3000 pg/mL（5F-AB-PINACA を除く Class 3 の SCs）、3~300 pg/mL（5F-AB-PINACA）の範囲で作成した。また、検量線の範囲を超えた SCs を含む血液試料については、薬物を含まない血液で適宜希釈し、定量した。検出限界（LOD）と定量限界（LOQ）は、各 SRM トランジションのシグナル/ノイズ比を 3 として定義した。検討の結果、各 LOD および LOQ は、尿試料では Class 1~3 の全 SCs で 1~5 pg/mL であり、血液試料では、Class 1 および 2 の SCs で 10~15 pg/mL、Class 3 の SCs で 3~10 pg/mL であった。精度および確度はいずれの SCs において 10% 未満であった。

第3節 実験結果

3-1 項 脂溶性の評価

検出された SCs について、その構造的特徴に基づいて 3 つの Class に分類し、脂溶性の指標となる ClogP をそれぞれ算出した結果、SCs の各 ClogP は、Class 1 および 2 はそれぞれ 5.01~8.14 および 5.80~6.74 であったのに対し、Class 3 が 2.29~3.81 と顕著に低かった（図 9-B）。

3-2 項 尿中濃度

本研究で尿試料（26 検体）から検出された SCs とその濃度および自動車事故から採尿までの経過時間を表 7 に示す。経過時間は、Class 1 が 1 および 5 時間、Class 2 が 2 および 3 時間、Class 3 が 2~7 時間であった。なお、Subject No. 1 および 6 の採尿までの経過時間は不明であった。分析の結果、Class 1 および 2 に分類される SCs は、未変化体としては検出されなかったが、Class 3 の SCs (5F-ADB, 5F-AMB, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, ADB-FUBINACA) は、未変化体として尿試料 12 検体から検出され (>0.01 ng/mL)、その濃度は 0.05~25 ng/mL の範囲であった。なお、Subject No. 16 については、5F-ADB が検出されず、Subject No. 27~29 については、尿試料が鑑定嘱託されなかったため、情報は得られなかった。

3-3 項 血中濃度

尿試料の結果と同様、血液試料 31 検体から検出された SCs とその濃度および事故から採血までの時間とともに表 7 に示す。また、各 SCs の血中濃度を ClogP 値に対してプロットした結果を図 10 に示す。検出された SCs のうち、Class 1 に該当する SCs (MAM2201, EAM-2201, AM2232, JWH210) は未変化体として 4 検体から、Class 2 の SCs (NM2201, NNEI, PB-22, 5F-PB-22, FUB-PB-22) は 11 検体から、Class 3 の SCs (5F-ADB, 5F-AMB, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, ADB-FUBINACA) は 13 検体から検出された。事故からの経過時間は、Subject No. 1（時間不明）、3（1 時間）および 6（時間不明）を除いて、全ての Class で 7~13 時間の範囲内であった。Class 2 に分類された SCs は、いずれの尿試料からも検出されなかったが、血液試料からは 12 検体全てから検出された。Class 3 の SCs については、Subject No. 16 を除く全ての尿試料から検出されていたが、血液試料では 16 検体中 13 検体から検出された。なお、尿試料から 5F-AMB および 5F-AB-PINACA が検出された被験者（Subject No. 21~23）について、運転手は事故当時、これら 2 種類の SCs の同時摂取が疑われていたが、血液資料からそれらの成分は検出されなかった。ま

た、Class 2 と Class 3 の SCs の血中濃度範囲に注目すると、採血までの経過時間に差はみられなかったが、Class 2 は、未変化体の血中濃度範囲が 0.10~5.0 ng/mL であったのに対し、Class 3 は 0.0036~31 ng/mL であり、より広範囲に分布していた (図 10)。

表 7. 本研究で検出された SCs の尿および血中濃度

Class (ClogP range)	Subject No.	Year of the accident	SC	Urine		Blood	
				Concentration (ng/mL)	Elapsed time (hr)	Concentration (ng/mL)	Elapsed time (hr)
Class 1 (5.01-8.14)	1	2012	MAM2201	ND	NR	3.1	NR
	2	2013	EAM-2201	ND	5	0.11	13
	3	2012	AM2232	ND	1	41	0.8
	4	2012	JWH210	No sample	-	NQ	NR
Class 2 (5.80-6.74)	5	2014	NM2201	ND	2	0.73	13
	6	2013	NEEI	ND	NR	2.3	NR
			5F-PB-22	ND	NR	0.35	NR
	7	2013	NEEI	ND	2	0.88	9
			5F-PB-22	ND	2	1.6	9
	8	2014	FUB-PB-22	ND	3	0.79	11
	9	2014	FUB-PB-22	ND	3	0.71	12
	10	2013	PB-22	ND	3	5.0	9
			5F-PB-22	ND	3	0.93	9
	11	2013	5F-PB-22	ND	3	3.7	9
	12	2013	5F-PB-22	ND	2	0.30	8
	13	2013	5F-PB-22	NS	-	0.20	12
	14	2014	5F-PB-22	ND	2	0.16	7
	15	2013	5F-PB-22	ND	3	0.10	10
Class 3 (2.29-3.81)	16	2014	5F-ADB	ND	2	0.43	8
	17	2014	5F-ADB	0.10	2	0.25	13
	18	2014	5F-AMB	NQ	5	0.092	8
			5F-AB-PINACA	NQ	5	0.032	8
	19	2014	5F-AMB	3.9	3	0.078	12
			AB-CHMINACA	0.65	3	0.61	12
	20	2014	5F-AMB	NQ	3	0.069	11
	21	2014	5F-AMB	0.21	3	ND	10
			5F-AB-PINACA	0.050	3	ND	10
	22	2014	5F-AMB	0.34	2	ND	10
			5F-AB-PINACA	0.10	2	ND	10
	23	2014	5F-AMB	0.61	3	ND	10
			5F-AB-PINACA	0.050	3	ND	10
	24	2014	AB-CHMINACA	25	2	31	7
	25	2014	AB-CHMINACA	NQ	7	2.7	10
	26	2014	AB-CHMINACA	NQ	5	1.7	12
	27	2012	ADB-FUBINACA	No sample	-	29	9
	28	2013	AB-PINACA	No sample	-	0.038	7
	29	2014	5F-AB-PINACA	No sample	-	0.16	11
	30	2014	5F-AB-PINACA	NQ	5	0.022	12
	31	2014	5F-AB-PINACA	3.0	2	0.0036	11

ND: Not detected, NQ: Not quantified (only detected), NR: Not recorded

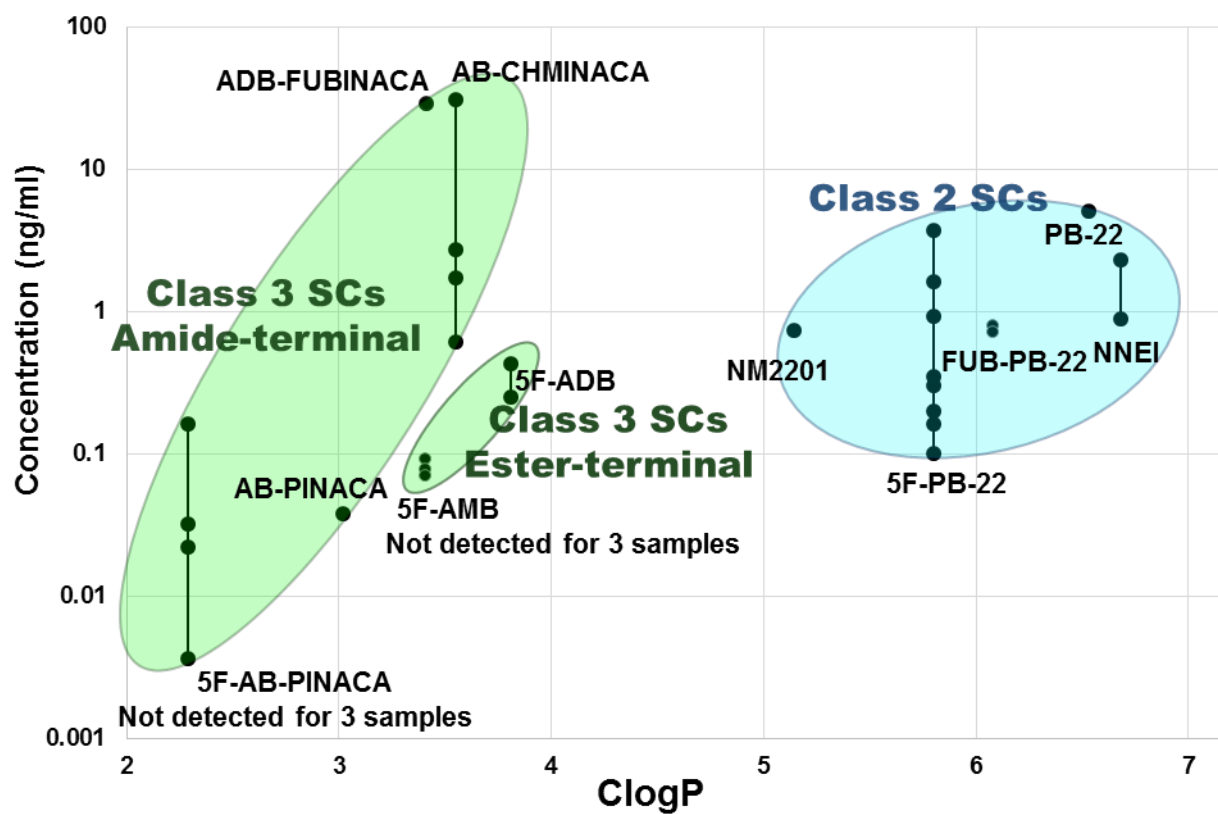


図 10. 本研究で得られた Class 2 および 3 SCs の血中濃度を各 ClogP 値にプロットした両対数グラフ

第4節 考察

4-1 項 官能基と脂溶性の関係

Class 1 (ClogP 5.01~8.14) および Class2 (ClogP 5.80~6.74) と比較して、Class 3 (ClogP 2.29~3.81) の SCs は水溶性が高いことが示された。この結果から、Class 1 および 2 のように、主にインドール/インダゾール基、ケトン/エステル/アミド基およびキノリン/ナフチル基誘導体等の低極性の官能基で構成されている SCs は脂溶性が高くなるが、Class 3 のようにアミノ酸であるバリンおよび *tert*-ロイシン誘導体が導入された SCs は水溶性が高くなると予想される。

4-2 項 脂溶性が尿排泄に与える影響

一般に、高脂溶性の薬物は腎臓において受動的に尿細管再吸収されるため、尿からはほとんど排泄されない。本研究においても、高い脂溶性を有する Class 1 および 2 の SCs は、未変化体として尿試料から検出されなかった。また、Huestis らは、Class 1 および 2 に分類される SCs は、摂取者尿からはほとんど検出されず、代わりに代謝物である酸化体が頻繁に検出されると報告しており、これは本研究の結果とよく一致している。Kaneko は、Class 3 に分類される SCs は尿試料から検出されており、水溶性の高いものほど、尿中に排泄される傾向にあると報告している。本研究において、尿試料から検出されなかった Class 1 および 2 の SCs の Clog P は 5 以上であり、尿から検出され易い Class 3 の SCs の Clog P は 4 以下であった。この結果から、SCs の Clog P を算出することで尿中排泄の有無を予測でき、Clog P 4~5 の間に“検出境界線”があると考えられた。

さらにこの結果から、水溶性の高い SCs は未変化体としての尿中排泄量が増加するため、血中 SCs の半減期が短くなり、血中 SCs 濃度にも顕著な影響を与える可能性が考えられた。

4-3 項 脂溶性および官能基が与える血中濃度への影響

SCs の摂取量は血中濃度に影響を与えるが、全ての事例において、摂取量の正確な情報は得られなかった。一方で、SCs を含有する危険ドラッグ（ハーブ類）は、カモミールやお茶等の乾燥葉片に、アセトン等の溶剤に溶かした SCs を噴霧した後、溶媒を揮発させることで調製されており、方法もマニュアル化され大量生産されている。また、本研究の対象となる SCs の薬理作用の影響下で交通事故を起こした運転手らは、喫煙により SCs を経肺吸収により摂取している。以上のことから、SCs の製品含有量および摂取量には優位な差が無

かったと想定し、考察を行った。

血液試料 31 検体中 4 検体 (Subject No. 1~4) から、Class 1 に分類される SC が検出された (表 7)。さらに、そのうち 3 検体について、SCs (MAM2201, EAM2201, AM2232) を定量した結果、その濃度は 0.11~41 ng/mL であった。2013 年に Yeakal らは、薬物影響下で車両を運転したとされる 12 人の運転手から採取した血液試料中 SCs について分析した結果を報告しており、全ての血液試料から Class 1 に分類される SCs (AM2201, JWH-018, JWH-081, JWH-122, JWH-210 または JWH-250) が検出されている^[47]。また、それら SCs の濃度範囲は、検出下限以下であった検体を除いて 0.10~9.9 ng/mL であった。本研究で検出された Class 1 の SCs (MAM2201, EAM2201, AM2232) は Yeakal らが検出した AM2201 と構造が酷似しており、本研究の MAM2201 の定量値 (3.1 ng/mL) は、彼らの AM2201 の定量値 (0.94 および 3.6 ng/mL) と同レベルであった。一方で、本研究で検出された AM2232 の定量値 (41 ng/mL) は、文献値より高い値を示しているが、これは SCs 摂取量の違い、または採血までの経過時間が短かったこと (事故から 1 時間後に病院で採血されている) によるものと考えられる。我が国において、こうした薬物摂取が疑われる運転手から採血を行う場合、司法手続きに多くの時間を必要とするため、事故発生から採血までに概ね 10 時間が経過してしまう。その間も SCs の代謝および排泄が進むため、未変化体の血中濃度が低下したものと考えられる。なお、事故発生から 1 時間後に採取された血液から得られた 41 ng/mL という高い SCs 血中濃度は、正常な運転が出来なくなる状態 (薬理作用) を誘発する血中濃度に近い値と考えられる。

本研究において、脂溶性の高い Class 2 の SCs 血中濃度の分布 (0.1~3.7 ng/mL) は、Class 3 の SCs (0.0036~31 ng/mL、不検出を除く) と比較して、狭くなるという現象がみられた (図 10)。Ashton は、大麻成分である THC (Clog P 5.53)、cannabinol (Clog P 6.07) および cannabidiol (Clog P 6.38) のような脂溶性の高い SCs は、摂取後脂肪組織へ速やかに分布することを示唆している^[48]。これらの高脂溶性 SCs は、血液からの検出も数日間可能であり、脂肪組織から血中に徐々に再放出されることで血中濃度の減少が緩やかになると考えられている。加えて、Hwang らは、本研究で Class 2 に分類される Adamantan-1-yl 1-pentyl-1*H*-indazole-3-carboxylate (APINAC、Clog P 6.55) についての代謝実験を行っている^[49]。彼らは、APINAC はラット肝ミクロソーム中で速やかに代謝された ($T_{1/2} = 15.2$ min) 一方で、ラットへの投与実験においては、半減期は長かった (静脈注射: $T_{1/2} = 11.3$ h、経口投与: $T_{1/2} = 3.8$ h) と報告している。このことから、脂溶性化合物の蓄積と再分布という動態メカニズムが、脂溶性の高い Class 2 の SCs 血中濃度の減少速度を緩やかに

し、その濃度範囲を狭める要因となった可能性がある。

Kaneko は、Class 3 に分類されるカルボキサミド型の SCs である 5F-AMB の摂取者は、事故後、薬物摂取による酩酊状態から速く回復するケースがよく見られ、この現象の理由の 1 つに、ヒト体内での代謝が速やかである可能性を挙げている^[50]。しかしながら、同様に速やかな回復がみられると報告された 5F-AB-PINACA は、*in vitro* 代謝試験において、5F-AMB よりも 36 倍も半減期が長かった（代謝が遅かった）という報告があることから^[51, 52]、酵素による代謝反応速度以外にも血中濃度を低下させる要因があるものと考えられた。本研究において、5F-AB-PINACA は、検討した SCs の中で最も低い Clog P を有しており、水溶性が高い（血液中に分布し、肝代謝や尿排泄され易い）ことも、既報の速やかな意識の回復に寄与したものと考えられる。

さらに、Class 3 に分類される SCs において、頭部末端にエステル結合を有する 5F-AMB および 5F-ADB の血中濃度は、同程度の Clog P を持つが頭部末端にアミド結合を有する AB-CHMINACA および ADB-FUBINACA の血中濃度と比べて、低い値を示した（図 10）。Thomsen らは、エステルまたはアミド結合を有する SCs はヒト肝において高発現するカルボキシエステラーゼにより代謝されると報告している^[53]。また、Huestis らは、ヒト肝ミクロソームを用いた代謝試験において、頭部末端にエステル結合を持つ 5F-AMB および AMB は、頭部末端にアミド結合をもつ AB-PINACA および 5F-AB-PINACA よりも、速やかに加水分解されると報告している^[51, 52]。これらの結果から、頭部に末端エステルを持つ Class 3 の SCs は、末端アミド型に比べ、肝臓で酵素加水分解されやすく、血中からより速やかに消失するものと考えられる。

以上の結果から、SCs の脂溶性や末端エステル/アミド結合は、SCs 未変化体の尿中排泄や血中濃度に大きな影響を与えるものと考えられる。

4-4 項 摂取証明への活用

尿検査による摂取証明について、胴部がインドール/インダゾール基、首部がケトン/エステル/アミド基、頭部がキノリン/ナフチル誘導体で構成される Class 1 および 2 のような SCs（Clog P > 5）は、大麻の有効成分 THC と同様に高い脂溶性を有するため、尿細管での再吸収されやすいため、未変化体は殆ど尿中排泄されないと考えられる。対照的に、Class 3 のように、頭部にアミノ酸誘導体が導入された Class 3 のような SCs は、脂溶性が低下しているため尿中排泄され易いと推測される。

血液検査による摂取証明については、Class 1 および 2 のような高い脂溶性をもつ SCs は、THC と同様に脂肪組織に分布され、血中半減期が長くなるため^[48, 54, 55]、採血が遅れた場合でも、摂取証明のための試料として検査する価

値があると考えられる。一方で、Class 3 のような水溶性が比較的高い SCs は、半減期が短い可能性があるため、可能な限り速やかな採血が強く推奨される。なお、SCs の頭部が末端エステル型である場合も同様に、体内半減期が短い可能性を考慮する必要がある。

また、尿試料（SCs 検出率 42%）と血液試料（SCs 検出率 92%）を比較すると、尿試料からは SCs の未変化体は検出されない可能性が高く、比較的尿から検出され易い Class 3 の SCs であっても、数時間後の排泄尿中から検出できないケースも見られたため、尿試料から SCs を検出するためには、極めて速やかな採尿が推奨される。

以上のことから、尿または血液のどちらが鑑定試料として適切であるかは、SCs の有する官能基や脂溶性によって異なるため、使用された SCs に関する情報が無いときは、両方の試料を採取しておくことが推奨される。

なお、本研究では、事故を起こした運転手間で、SCs の摂取量には顕著な差が無いという想定のもと、全ての考察を行っている。厳密な SCs の摂取量が不明であることは本研究の限界である。しかしながら、この想定下においても、生体試料中 SCs 濃度は 10~100 倍の差が見られたことから、体内動態の傾向は捉えられたものとする。今後、ヒトへのマイクロドーズ臨床試験等により厳密な検討を実施することで、SCs の体内動態について、より緻密な考察が可能になると考えられる。

第5節 小括

SCs は、1990 年代にカンナビノイドシステムの研究のために合成された化合物が起源とされ、その後、NPS として世界中に拡散、乱用されるようになった。また、SCs はその化学構造を改変させることで、NPS を取り締まるための法規制から逃れてきた。本研究では、変遷する SCs の化学構造が、尿排泄や血中濃度にも影響を与えると考えられたことから、脂溶性や官能基が体内動態に与える影響を検討し、生体試料中 SCs の効率的な分析について考察した。その結果、SCs は、Clog P4~5 付近に「尿中排泄の有無」の境界線があるとみられた。血中濃度については、Clog P が 4 以下であった Class3 の SCs は、Clog P が 5 以上の Class1 および 2 の SCs よりも濃度分布が広く、Clog P が低くなるにつれて濃度が低くなる傾向にあった。加えて、Class3 の SCs のうち、頭部末端エステル型は、頭部末端アミド型より血中濃度が低い傾向にあった。

これら SCs の脂溶性および官能基の生体試料中濃度を与える影響に関する情報は、ヒトにおける SCs の動態を考察する上で有益なものである。また、本研究で得られた情報は、今後流通する新たな SCs の摂取証明に加えて、事故当時の SCs の薬理作用の有無を推測する際にも貢献するものと考えられる。

第3章 潜在的な覚醒剤プロドラッグ “*N-tert-butoxycarbonyl* メタンフェタミン” の代謝および尿中排泄

第1節 背景および目的

覚醒剤メタンフェタミン (MA) は、高い精神依存性を持つフェネチルアミン系薬物として知られている。MA は、製造から譲渡、所持、使用まで覚醒剤取締法で厳しく規制されているが、この取り締まりを回避するための手口は巧妙かつ多岐に渡る^[56, 57]。近年、MA の *tert-butoxycarbonyl* (Boc) 基の導入体である BocMA が、国内外の空港税関検査で大量押収されている^[58, 59]。Boc 基は有機合成分野でアミノ基の保護に多用され、一般に熱や塩基、酸化に対して安定とされるが、塩酸等の強酸で処理すると容易に脱保護され、目的の化合物を生成する (図 11)。この反応を用いることで、専門的な知識や複雑な操作を必要とせずに、BocMA から MA を高収率に得ることが可能である。Kurakami らは、加熱条件下、塩化水素を含む各種溶媒中において、BocMA が速やかにかつ高収率に MA に転換されると報告している^[60]。そのため、BocMA は MA の新たな密輸手口に利用されることが警戒されている。

加えて、BocMA は希塩酸を含む胃液モデル中でも MA に転換されることが明らかになっている (図 12)^[61]。この結果は、BocMA が経口摂取型のプロドラッグとなる可能性を示しており、MA 使用者の抗弁に利用されるケースを含め、MA 摂取の取り締まりを回避するための手口に利用されることも懸念されている。BocMA は 2017 年に医薬品医療機器等法の指定薬物に追加されており、所持や使用も規制されているが、MA (覚醒剤) と BocMA (指定薬物) 摂取の識別方法は確立されていないため、法中毒および裁判化学において、BocMA の代謝および排泄経路の解明は重要課題となっている。

既存の MA の“プロドラッグ”として、フェネチルアミン系の医薬品ベンツフェタミン、ファンプロファゾンおよびセレギリンが知られており、その代謝や尿排泄については多くの研究報告がある^[62-66]。これら先行研究において、尿中 MA の由来 (摂取薬物) を識別する際には、「特異的代謝物の検出」、「MA と AP の含有比」および「MA のエナンチオマー比」が有効な指標になる。すなわち、薬物の代謝・排泄挙動を明らかにすることで、MA の由来の識別が可能となる。

これまでに筆者は、BocMA の胃液モデル中での分解速度が比較的緩やかであったことから、経口摂取された BocMA の一部は、胃で分解されずに腸へ移行し、体内に吸収される可能性が高いことを示した^[61]。この結果から、BocMA に特異的な代謝物が尿中に排泄される可能性が示唆され、それを検出することで、BocMA の摂取証明が可能になると考えられた。しかしながら、

吸収後の BocMA の代謝および尿中排泄に関する研究は、これまでに報告されていない。そこで本研究では、MA と BocMA 摂取の識別法を確立することを目的とした *in vitro* および *in vivo* 代謝試験を実施した。*in vitro* 試験ではヒト肝ミクロソーム (HLM) /ラット肝ミクロソーム (RLM) による代謝試験を行い、*in vivo* 試験ではラットへの腹腔内投与による尿中代謝物の探索を実施した。得られた結果から、ヒトにおける BocMA の代謝経路および排泄様式を推測し、BocMA の摂取証明に有用な分析対象となる特異的代謝物について論じる。

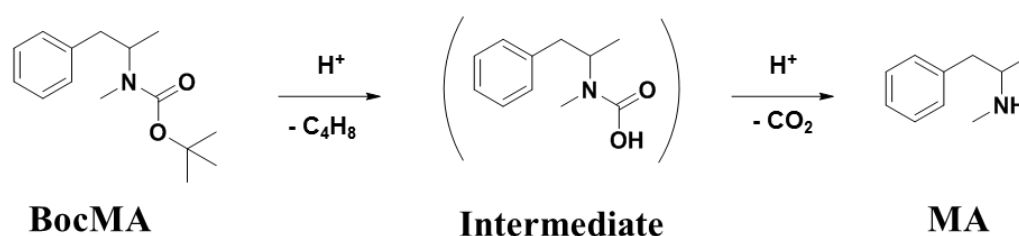


図 11. 酸存在下での BocMA の脱 Boc 化による MA の生成

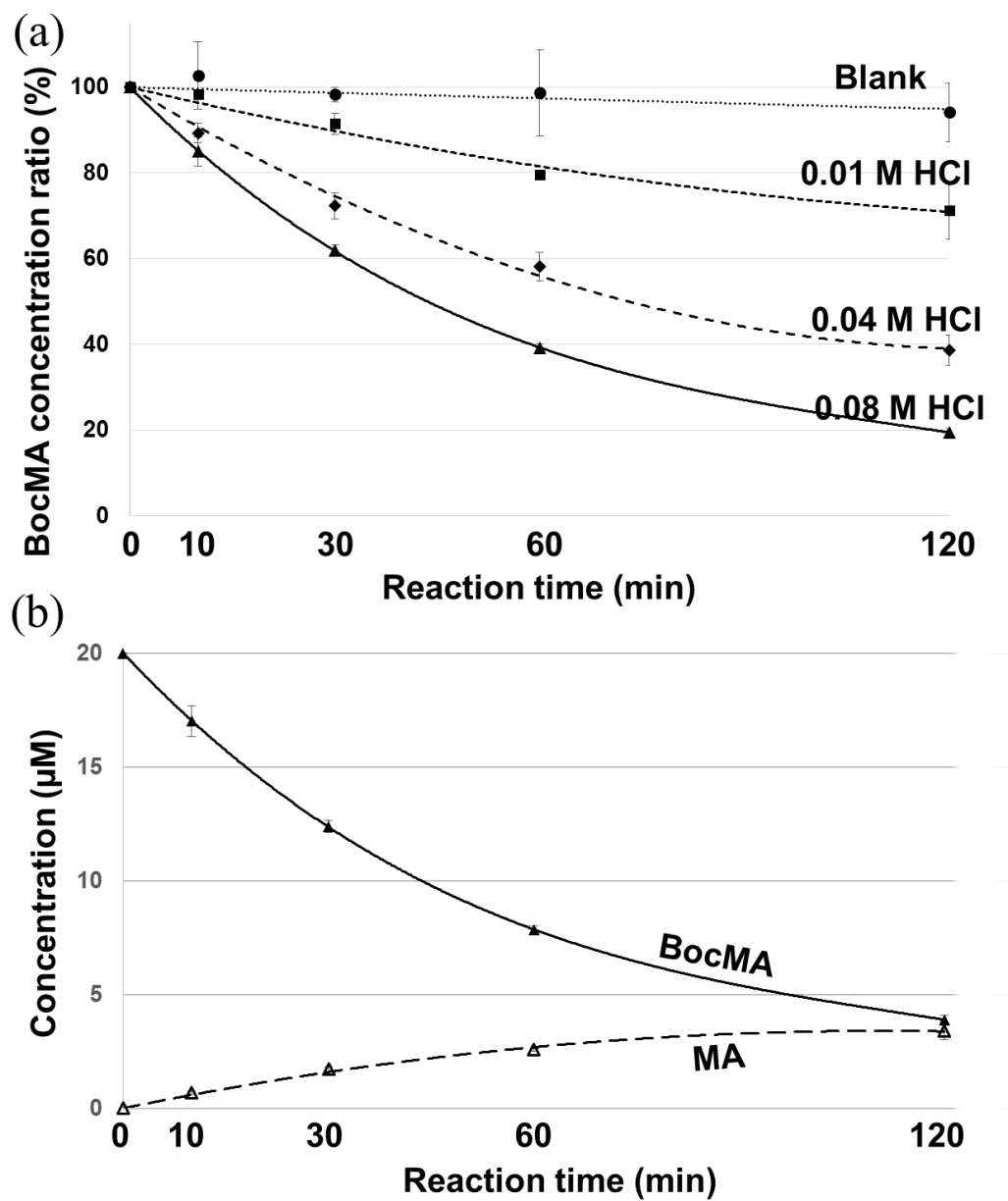


図 12. 胃液モデル中における BocMA の消失 (a) と MA の生成 (b)

第2節 実験および方法

2-1 項 試薬およびラット

HLM (50 donor pool)、RLM、NRS solution A および B は CORNING 社製のものを、Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer pH 7.4 は、ニッポンジーン製のものを、ラット (Wister 種、オス、6 週齢、200±15 g) は紀和実験動物研究所より購入し、室温 23~25°C、明暗周期 12 時間の環境下で管理した。尿中代謝物の加水分解には、Sigma-Aldrich 社製の β -グルクロニダーゼ Type IX-A (from *Escherichia coli*、グルクロニダーゼ活性：4,040,000 units/g)を用いた。高分解能質量分析用のキャリブレーション試薬には Sciex 社製の Positive Calibration Solution を用いた。その他の分析用試薬および合成用試薬 (いずれも特級試薬) は富士フイルム和光純薬工業から購入した。

2-2 項 未変化体およびその代謝物の標準品合成

BocMA、候補代謝物 (M5-D1, M5-D2, M6, M7, M8, Boc 化メトカチノン) および内部標準物質 (IS, *N*-valeryl-methamphetamine) は、以下の (1) ~ (7) に示す通りに合成した。合成した全ての標準試料は、単離・精製した後 NMR により同定した。また、標準品はアセトニトリル溶液として -10°C で保存し、使用直前に蒸留水または尿で希釈し使用した。

- (1) BocMA : フラスコに *d*-MA 塩酸塩 (450 mg, 2.4 mmol)、THF (10 mL)、トリエチルアミン (2 mL, 14 mmol) とジメチルアミノピリジン (触媒量) を加え、10 分間攪拌した。その後、この混合液に Boc₂O (880 mg, 4.1 mmol) を添加し、室温で終夜攪拌した。反応液に水を加えたのち、酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後減圧濃縮することで得られた粗生成物を、シリカゲルを用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製し、BocMA を得た (収率 94%)。
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 50°C): δ 7.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.16 (m, 3H), 4.40 (br, 1H), 2.74 (m, 2H), 2.70 (s, 3H), 1.32 (s, 9H), 1.18 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H).
- (2) *N*-*tert*-butoxycarbonylephephedrine (M5-D1), *N*-*tert*-butoxycarbonylpseudoephedrine (M5-D2): 本項 (1) に従い、エフェドリンまたはプソイドエフェドリンを合成原料として合成し、M5-D1 (収率 50%) および M5-D2 (収率 51%) をそれぞれ得た。
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 50°C; M5-D1): δ 7.36–7.26 (m, 2H), 7.24–7.22 (m, 3H), 4.78 (s, 1H), 4.11 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 2.65 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.25 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H). (400 MHz, CDCl₃, 50°C; M5-D2): δ 7.36–7.25 (m, 5H), 4.54 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 2.74 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.20 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H).
- (3) *N*-*tert*-butoxycarbonylamphetamine (M6) 本項 (1) に従い、amphetamine (AP) を合成原料として合成し、M6 (収率 97%) を得た。

- ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 50°C): δ 7.29–7.14 (m, 5H), 3.89 (br, 1H), 2.70 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.95 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).
- (4) *N-tert-Butoxycarbonyl-4-hydroxymethamphetamine* (M7): フラスコに 4-hydroxymethamphetamine 硫酸塩 (3 g, 14 mmol)、THF (20 mL)、トリエチルアミン (3.9 mL, 28 mmol) を加え 20 分間攪拌した。その後、*tert*-butyldimethylchlorosilane (TBDMSCl, 2.3 g, 15.4 mmol) を加え室温で終夜攪拌した。反応液に蒸留水を加えたのち、酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせ有機層を飽和食塩水で洗浄したのち、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これをろ過後、減圧濃縮することで得られた粗生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製し、合成中間体 4TBDMSO-MA を得た (収率 51%)。得られた生成物を合成原料に本項 (1) に従って合成し、4TBDMSO-BocMA を得た (収率 66%)。4TBDMSO-BocMA (500 mg, 1.32 mmol) を THF (10 mL) に溶かし、tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF, 500 mg, 1.5 mmol) を添加し、室温で 1 時間攪拌した。反応液に飽和食塩水を加えたのち、酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせ有機層を飽和食塩水で洗浄したのち、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これをろ過後、減圧濃縮することで得られた粗生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製し、M7 を得た (収率 77%)。
- ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ 7.10 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 5.28 (s, 1H), 2.68 (s, 3H), 2.71–2.55 (m, 2H) 1.36 (s, 9H), 1.12 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H).
- (5) *N-tert-Butoxycarbonyl-2-amino-1-phenylpropan-1-one* (M8): 本項 (1) に従い、cathinone を合成原料として合成し、M8 (収率 85%) を得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 50°C ; M4): δ 7.96 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.58 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.48 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 5.27 (br, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.20 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H).
- (6) *N-tert-Butoxycarbonyl-2-(methylamino)-1-phenylpropan-1-one* (Boc 化メトカチノン: BocMC): 本項 (1) に従い、methcathinone を合成原料として合成し、BocMC (収率 80%) を得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 50°C): δ 7.88 (br, 2H), 7.45 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 5.59 (br, 1H), 2.57 (br, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.19 (br, 3H).
- (7) *N-Valerylmethamphetamine* (IS): フラスコに MA (100 mg, 0.54 mmol)、THF (10 mL)、無水吉草酸 (200 mg, 1.1 mmol)、トリエチルアミン (0.45 mL, 3.1 mmol) とジメチルアミノピリジン (10 mg) を加え、室温で終夜攪拌した。反応液に蒸留水を加えたのち、酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせ有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。これをろ過後、減圧濃縮することで得られた粗生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製し、*N*-valerylmethamphetamine を得た。収率 41%。
- ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ 7.21–7.09 (m, 5H), 4.08 (m, 1H), 2.83 (s, 3H), 2.74 (m, 4H), 2.17 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.05–1.85 (m, 1H), 1.45–1.08 (m, 7H), 0.83 (m, 4H).

2-3 項 肝ミクロソームを用いた代謝試験

蒸留水 788 μL 、pH 7.4 $\times 10$ トリスバッファー 100 μL 、NRS solution A 50 μL および B 10 μL の混合液を 37°C で 5 分間保ち、この混合液に 2 mM の BocMA のアセトニトリル溶液 2 μL およびミクロソーム（タンパク濃度：40 mg/mL）50 μL を添加し、反応を開始した（ $n=3$ ）。反応開始から 3、8、13、20、30 および 60 分後に、反応液 100 μL を分取し、20 ng/mL の IS 入りの冷却クロロホルム 500 μL に添加し攪拌することで、反応を停止させた。クロロホルム層を窒素気流下で乾固させた後、残渣を 20% メタノール水溶液 100 μL に溶解した。これを 7,000 g で 10 分間遠心し得られた上清 10 μL を LC-MS/MS で分析した。

BocMA の半減期（half-life: $t_{1/2}$ ）は、各反応時間に対する BocMA のピーク面積をプロットすることで得られた減衰曲線から算出した。得られた半減期と式 1 からミクロソーム固有クリアランス（ $\text{CL}_{\text{int,mic}}$ ）算出した^[67]。また、式 2 を用いて $\text{CL}_{\text{int,mic}}$ を肝臓レベルにまでスケールアップさせることで、予想肝固有クリアランス（ CL_{int} ）を算出し、予想肝クリアランス（ CL_{H} ）および予想肝抽出率（ER）は、well-stirred モデルに従い、タンパク結合率は考慮せずに、それぞれ式 3 および 4 を用いて算出した^[67]。なお、これらの動態パラメータは、以下の既報値^[67-69]を参考に算出した。肝臓重量あたりのミクロソームタンパク量（human: 45.0 mg/g, rat: 44.8 mg/g）、体重あたりの肝臓重量（human: 20 g/kg, rat: 40 g/kg）、体重あたりの肝血流量（ Q_{H} , human: 20.7 mL/min/kg, rat: 55.2 mL/min/kg）。

式 1.

$$\text{CL}_{\text{int,mic}} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \times \frac{\text{mL of incubation}}{\text{mg of microsomes}}$$

式 2.

$$\text{CL}_{\text{int}} = \text{CL}_{\text{int,mic}} \times \frac{45 \text{ (human) or } 44.8 \text{ (rat) mg of microsomes}}{\text{g of liver}} \times \frac{20 \text{ (human) or } 40 \text{ (rat) g of liver}}{\text{kg of body weight}}$$

式 3.

$$\text{ER} = \frac{\text{CL}_{\text{H}}}{Q_{\text{H}}}$$

式 4.

$$\text{CL}_{\text{H}} = \frac{Q_{\text{H}} \times \text{CL}_{\text{int}}}{Q_{\text{H}} + \text{CL}_{\text{int}}}$$

2-4 項 ラットへの投与試験

ラット ($n=3$, No. 1~3) は、代謝ケージで個々に 1 週間馴化させたのち、1% (w/v) Tween20 水溶液に溶かした BocMA を腹腔内投与 (i.p., 20 mg/kg body weight) した。投与から 0、4、8、24、48 および 72 時間後に、排泄尿を回収し、分析まで -20°C で保管した。なお、採尿容器には、防腐剤としてあらかじめ 100 μL のトルエンを添加した。また、1% (w/v) Tween20 水溶液を投与したラットをコンロール ($n=1$) として用いた。なお、全てのラットは投与後 8 時間までは絶食させたが、水は自由に飲める環境で実験を行い、投与から 72 時間後にペントバルビタールナトリウム水溶液を投与 (i.p., 200 mg/kg body weight) することで、安楽死させた。なお、本実験プロトコルは厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する指針^[70]に沿って作成され、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所動物実験委員会の承認を得ている。

尿試料 200 μL に 200 ng/mL の IS アセトニトリル溶液 20 μL を添加し、クロロホルム 200 μL で 3 回抽出し、併せた有機層を窒素気流下で乾固させた。得られた残留物を 20% メタノール水溶液 100 μL で溶解させ、遠心 (7,000 g, 5°C , 10min) し得られた上清を BocMA とその第 I 相代謝物の分析用試料とし、10 μL を LC-MS/MS に供した。なお、必要に応じて、尿試料 200 μL に加水分解酵素 (β -グルクロニダーゼ) を添加し (20,200 U/mL urine)、 37°C で 90 分間保温した後、前述の抽出操作を実施した。また、尿 100 μL に冷却メタノール 300 μL を加え、攪拌・遠心 (9,000 g, 5°C , 10 min) することで得られた上清 100 μL を蒸留水で 2 倍に希釈した試料を用いて、BocMA の第 I 相および第 II 相代謝物を探索した。第 II 相代謝物の探索は、第 I 相代謝物のうちヒドロキシ化体のグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体を対象とした。なお、BocMA 投与後のラットか検出された第 I・II 相代謝物は、BocMA 非投与および BocMA 投与前のラットのいずれの尿からも検出されないことを確認した。

2-5 項 分析装置および測定条件

(1) NMR

核磁気共鳴装置には JEOL 製 ECZ-400S を用い、次の条件で行った。測定核： ^1H 、測定周波数：400 MHz、測定溶媒： CDCl_3 、測定温度：25 または 50°C 、測定範囲： $-2.5\sim 12.5$ ppm。

(2) LC-MS/MS

- ① 液体クロマトグラフィー (LC) には、島津製作所製 Prominence UFLC を用い、次の条件で行った。カラム：化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (150 mm \times 1.5 mm i.d., 粒子径 5 μm)、移動相：A ボトル-10 mM 酢酸アンモニウム含有 5% メタノール、B ボトル-10 mM 酢酸アンモニウム含有 95% メタノール、グラジエント条件：[B ボトル] 0-100% (0-15 min, linear gradient) -100% (15-25 min) -0% (25-35 min)、移動相流速：0.1 mL/min、カラムオープン温度： 40°C 。

② 質量分析装置には、定性には Sciex 社製 Triple TOF 5600 を用いて、次に示す条件で、定性分析を行った。イオン化法：エレクトロスプレーイオン化 (ESI)、イオンスプレー電圧：5.5 kV、ターボスプレー温度：200°C、デクラスタリングポテンシャル (DP)：40 V、コリジョンエネルギー (CE)：10 eV、ネブライザーガスおよびコリジョンガス：窒素、測定モード：フルスキャン、測定範囲： m/z 100–1000、積算時間：250 ms。測定モード：information dependent acquisition (IDA)、積算時間：250 ms、測定範囲： m/z 50–1000、ターゲットイオン：検出強度が 100 cps を超えた上位 20 までのイオン。また、定量には、Sciex 社製 3200 QTRAP を用いて、分析条件については Shima らの報告^[25]を基に ESI および Selected reaction monitoring (SRM) モードで行ない、SRM パラメータは表 8 に示す条件で行った。

2-6 項 定量分析法の検討

HLM および RLM の分析試料調製は上記ミクロソーム中代謝試験の項の手順に従って作成した。トリスバッファー、NRS solution A, B およびミクロソームの混合液 99 μL に、BocMA および M5 (D1, D2) の反応液濃度が 10, 30, 100, 300 および 1000 ng/mL になるように標準品アセトニトリル溶液 1 μL を添加後、速やかに 20 ng/mL の IS 入りの冷却クロロホルム 500 μL を添加し攪拌・抽出した。得られた抽出液を窒素気流下で乾固させた後、残留物を 20% メタノール水溶液 100 μL に溶解したものを分析試料とした。また、同様の手順で反応液濃度が 40, 400 ng/mL となるように標準品を添加した試料を分析し、精度および確度を算出した ($n = 5$)。

ラット尿の分析試料調製は、コントロールとして用いたラット尿 990 μL に、BocMA および M5 (D1, D2) の尿中濃度が 0.3, 1, 3, 10, 30 および 100 ng/mL になるように、標準品のアセトニトリル溶液 10 μL を添加し、よく攪拌した。この標準品添加尿 200 μL に、200 ng/mL の IS アセトニトリル溶液 20 μL を添加した後、クロロホルム 200 μL で 3 回抽出した。抽出液を窒素気流下で乾固させた後、残留物を 20% メタノール水溶液 100 μL に溶解したものを分析試料とした。また、同様の手順で反応液濃度が 4, 40 ng/mL となるように標準品を添加した尿試料を分析し、精度および確度を算出した ($n = 5$)。

前項に従って分析し、バリデーションを実施した結果、いずれの化合物でも、ミクロソームでは 10–1000 ng/mL の範囲で、尿では 0.3–100 ng/mL の範囲で、いずれの化合物も検量線は高い直線性 (ミクロソーム： $r^2 > 0.993$ 、尿： $r^2 > 0.995$) を示した。検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ) は、各 SRM トランジションのシグナル/ノイズ比をそれぞれ 3 および 10 として定義した。検討の

結果、ミクロソーム反応液中の BocMA および M5 (D1, D2) は、ともに定性限界は 3 ng/mL、定量限界は 10 ng/mL であった。ラット尿中の BocMA および M5 (D1, D2) は、ともに定性限界は 0.1 ng/mL、定量限界は 0.3 ng/mL であった。バリデーションを実施した全ての化合物について、精度および確度は日内日間ともに誤差 15% 未満であった。また、検量線の範囲を超えた BocMA または BocMA 代謝物を含む尿試料については、薬物を含まないラット尿で適宜希釈し、定量した。

第3節 実験結果

3-1 項 分析条件の最適化

BocMAは不安定な化合物であるため、Triple TOF 5600により低分子化合物の推奨条件 {ターボスプレー温度：500°C、デクラスタリング電圧 (DP)：60 V} で測定すると、インソース分解 (In-source CID) され、Boc基が脱離したMAのプロトン付加体 ($[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}]^+$, m/z 150.1) として検出された (データ示さず)。また、後述のBocMA代謝物も同様にインソースでBoc基が脱離するため、分析条件の最適化が必要であった。そこで、ターボスプレー温度およびDPをそれぞれ、100~400°Cおよび20~80 Vの範囲で検討したところ、2-5項で示した条件 (ターボスプレー温度：200°C、DP：40 V) で、BocMAのIn-source CIDが抑制され、プロトン付加分子 ($[\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{NO}_2]^+$, m/z 250.2) として最も強く検出されたため、本分析条件を用いて定性分析を行った。また、定量分析に用いた3200 QTRAPのパラメータについても、各成分のプロトン付加分子をプリカーサーイオンとして最適化を行い、各成分が最も高感度で検出されるように設定した (表8)。

表8. BocMA および M5 (D1, D2) の定量分析用SRMパラメータ

Compound	RT (min)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Time (msec)	Temp (°C)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
BocMA	20.1	250.2	194.2	50	300	26	4.0	11	4
M5-D1	18.1	266.2	192.2	50	300	36	8.5	27	4
M5-D2	18.4	266.2	192.2	50	300	36	8.5	27	4
IS	18.0	234.2	91.0	50	300	66	11	33	4

DP: declustering potential, EP: entrance potential, CE: collision energy, CXP: collision cell exit potential, Q1: quadrupole 1, Q3: quadrupole 3, IS: internal standard

3-2 項 肝ミクロソーム反応液中の安定性試験

体内に吸収された BocMA が受ける肝代謝の影響を評価するために、ヒトおよびラット肝ミクロソーム中における BocMA の代謝試験を行い、得られた半減期から各薬物動態パラメータを算出した。その結果、基質である BocMA はいずれの肝ミクロソームでも速やかに減少し、半減期はそれぞれ、HLM で 3.3 分、RLM で 2.0 分と算出された。これらの半減期を用いて肝クリアランス等の各薬物動態パラメータを算出した結果を表 9 に示す。ヒト肝ミクロソームにおける CL_{int} (200 mL/min/kg) から、BocMA は Obach らの報告した 29 種類の既存薬物の CL_{int} (1 種類の薬物は <0.52 で、残りの 28 種類は 0.9~189 mL/min/kg、28 種類の平均値: 34 mL/min/kg) と比較しても高い肝クリアランスを持つ薬物に分類されることに加え^[67]、ER の値 (HLM: 0.90, RLM: 0.92) からヒトおよびラットいずれにおいても BocMA は腸管吸収後に初回通過効果を大きく受ける薬物であると予測された。

表 9. HLM/RLM 反応液中の BocMA の半減期と予想薬物動態パラメータ

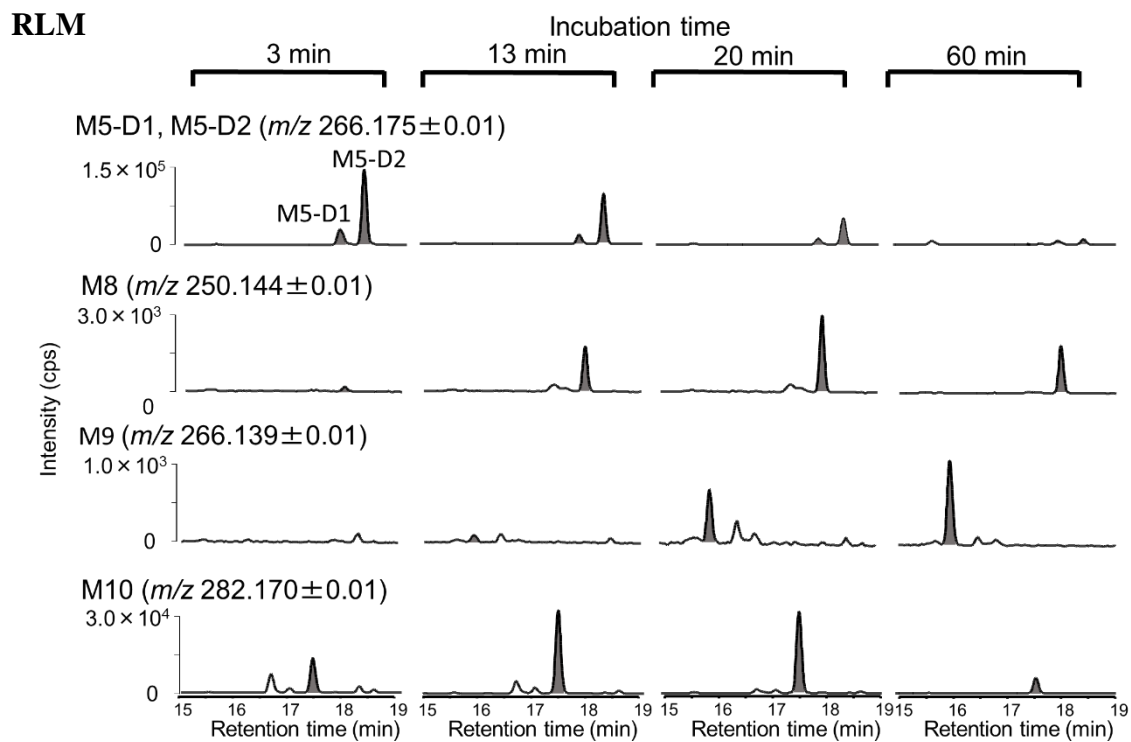
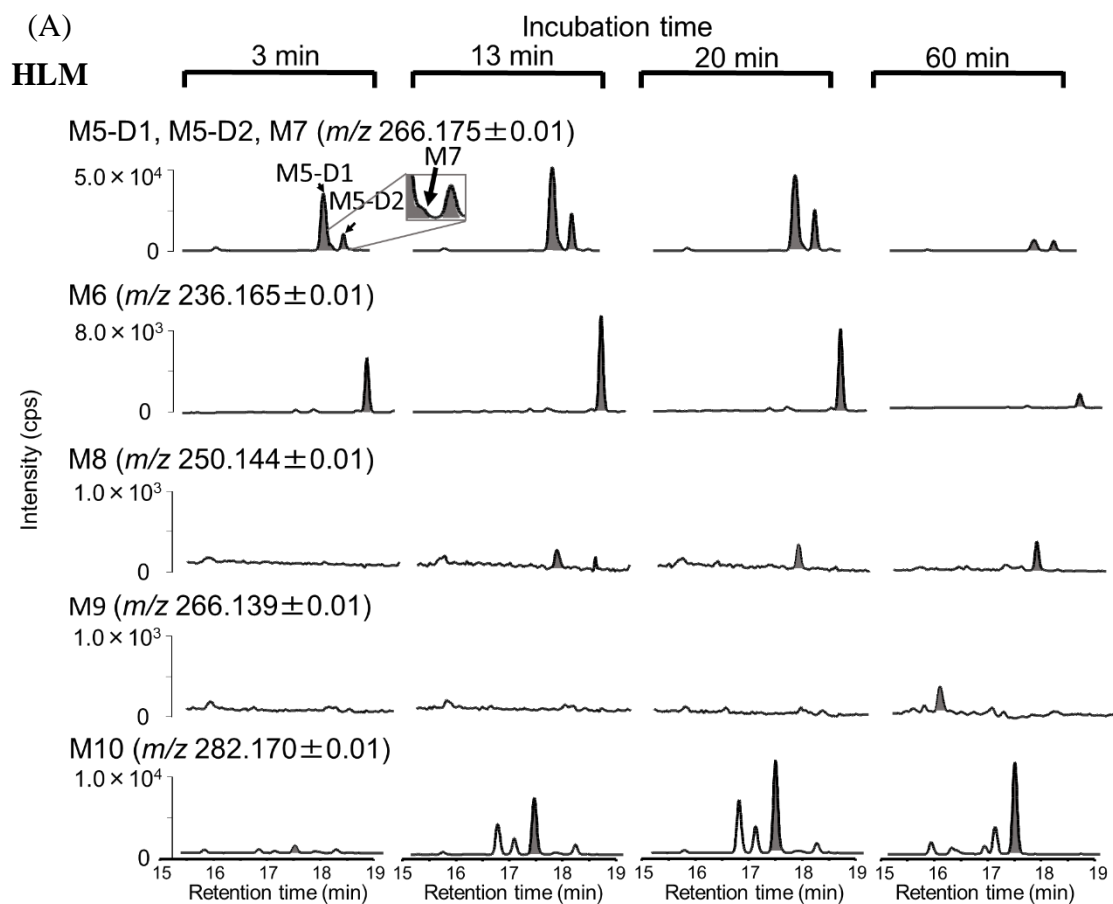
Pharmacokinetic parameter	HLM	RLM
	(mean \pm SD, $n=3$)	(mean \pm SD, $n=3$)
Half-life (min)	3.2 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2
$CL_{int,micr}$ (mL/min/mg)	0.22 \pm 0.02	0.36 \pm 0.04
CL_{int} (mL/min/kg body wt.)	200 \pm 20	640 \pm 70
CL_H (mL/min/kg body wt.)	19 \pm 1	51 \pm 1
ER	0.90 \pm 0.01	0.92 \pm 0.01

$CL_{int,micr}$: Intrinsic microsome clearance, CL_{int} : Estimated intrinsic clearance, CL_H : Estimated hepatic clearance, ER: Extraction ratio

3-3 項 代謝物の同定および定量

BocMAの代謝経路を明らかにするために、HLMおよびRLM反応液中で生成したBocMA代謝物について、液体クロマトグラフィー–高分解能タンデム質量分析LC–HR–MS/MSによる探索を行った。その結果、HLMおよびRLMを用いた試験のいずれから、MAならびにMA代謝物であるAP、4-hydroxyMA (4OHMA)および4-hydroxyAP (4OHAP)は検出されなかった。一方で、HLMを用いた試験では7成分 (M5–D1、M5–D2およびM6~10) が代謝物候補として検出され、それらの保持時間は、M5–D1が18.0分、M5–D2が18.5分、M6が19.1分、M7が18.3分、M8が17.9分、M9が17.5分、M10が15.9分であった (図13-A, B)。また、RLMを用いた試験においては、M5–D1、M5–D2およびM8~10が検出された (図13-A, B)。代謝物候補の各成分について、プロトン付加分子 ($[M+H]^+$) の精密質量値、保持時間およびプロダクトイオンスペクトルからそれぞれ構造を推定した。さらに、構造推定した代謝物のうち合成が可能であった5成分 (M5–D1, M5–D2, M6~8) について、2-2項の手順に従って標準品を合成し同定を行った。その結果、M5–D1およびM5–D2は、Boc化エフェドリンおよびBoc化プソイドエフェドリン、M6はBoc化アンフェタミン、M7は4-ヒドロキシBocMA、M8はBoc化カチノンであることが示された。また、M9は、プロトン付加分子の精密質量値 (m/z 266.1395) から分子式が $[C_{14}H_{19}NO_4]$ と推定され、さらにプロダクトイオン (m/z 194.0829, 150.0930, 132.0819) および保持時間から考察すると、M8の*tert*-butylヒドロキシ化体と考えられた (図13-B)。

M10については、M5およびM8の中間代謝物である可能性が考えられた。M5およびM8の化学構造に注目すると、M5からM8に代謝される際に、中間代謝物としてBoc化ノルエフェドリンあるいはBoc化メトカチノン (BocMC) が中間代謝物と考えられたが、当該代謝物はいずれのミクロソーム反応液からも検出されなかった。一方で、中間代謝物候補であるM10は、 $[M+H]^+$ の精密質量値 (m/z 282.1699) から $[C_{15}H_{23}NO_4]$ と推定され、これは、M5に酸素原子が1つ付加した化合物 $[C_{15}H_{23}NO_3+O]$ およびBocMC (保持時間18.5分) の水分子付加体 $[C_{15}H_{21}NO_3+H_2O]$ に相当していた。さらにプロトン付加したM10は脱水 (minus H_2O : minus 18.0109) することで、プロダクトイオン (m/z 264.1590) を生成した。また、その他のプロダクトイオン (m/z 208.097, 164.107, 146.096) がBocMCと共通していた (図13-B)。



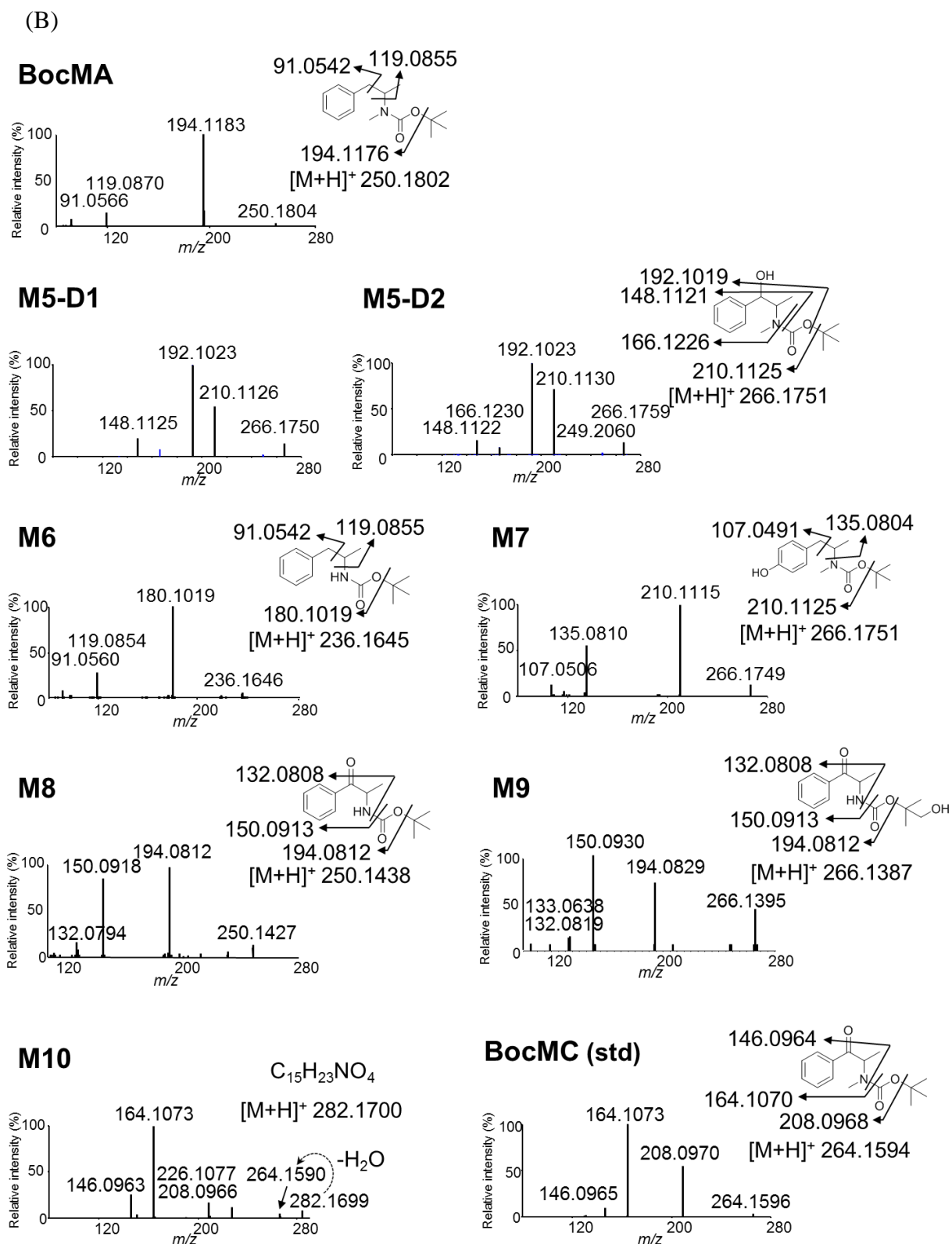


図13. (A) HLM/RLMと反応させたBocMA代謝物の抽出イオンクロマトグラムと(B)ミクロソーム反応液中のBocMA代謝物M5~10および標準品 (BocMAおよびBocMC) のプロダクトイオンスペクトル

さらに、同定された代謝物の中で最も検出強度が高かったM5 (D1, D2) について、経時的に定量分析を行った (図14)。その結果、ラット肝ミクロソームでは反応開始から3分で、それまでに消失したBocMA (初期濃度の83%に相当) のうち、45%がM5 (M5-D1: 5%, M5-D2: 40%) として検出された。一方、HLMにおいても、反応開始8分で、それまでに消失したBocMA (初期濃度の80%に相当) のうち、14%がM5 (M5-D1: 10%, M5-D2: 4%) として検出された。これらの結果から、BocMAの主代謝経路はベンジル位のヒドロキシ化と考えられた。

3-4 項 ラット尿中の代謝物

尿中に排泄される代謝物を明らかにするため、ラット ($n = 3$) に BocMA (20 mg/kg body weight)を腹腔内投与した後、0-4、4-8、8-24、24-48 および 48-72 時間の尿試料を対象に、未変化体および代謝物の探索を行った。その結果、BocMA、M5-D1、M5-D2 および M9 はいずれのラット (Rat No. 1-3) からも検出され、M7 は一匹のラット (No. 3) からわずかに検出された。なお、M6, M8 および M10 はいずれの尿試料からも検出されなかった。なお、*in vitro* 試験と同様に、MA およびその代謝物 (AP、4OHMA および 4OHAP) は検出されなかった。

次に、第Ⅱ相代謝物を探索したところ、いずれのラットの尿からも3つの候補 M11~13 が検出された。これらのプロトン付加分子の精密質量とプロダクトイオンスペクトル (図 15) から、M11 および M12 は、M5 (D1 または D2) のグルクロン酸抱合体、M13 は M9 のグルクロン酸抱合体と推定された。

なお、M5およびM9の硫酸抱合体、ならびにM7の抱合体は検出されなかった。

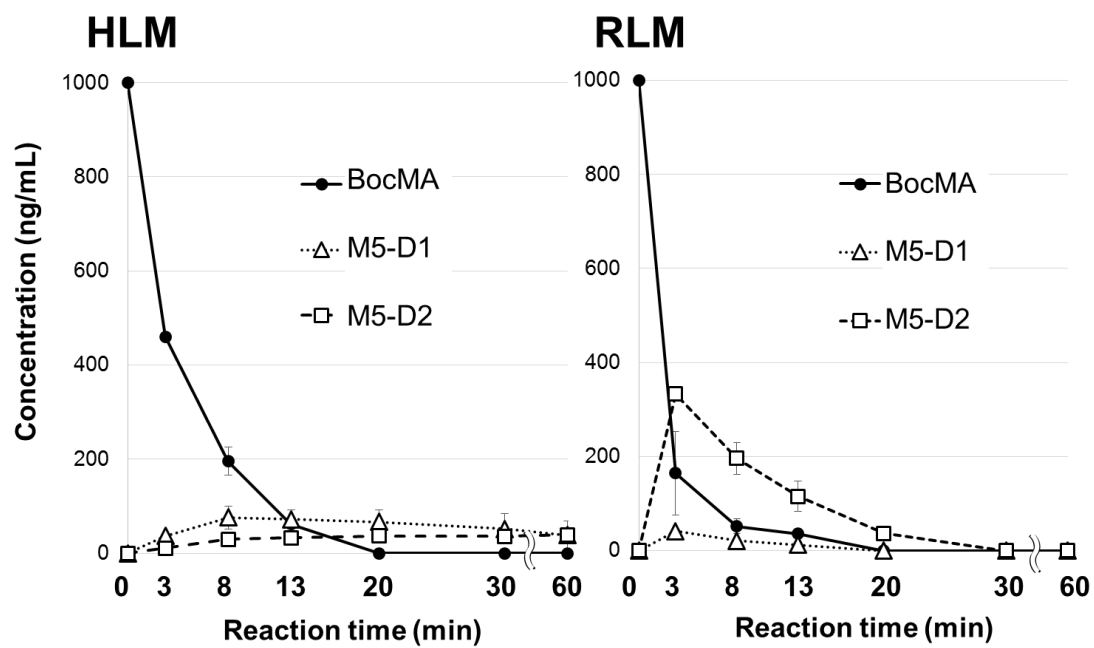


図 14. HLM/RLM 反応液中における BocMA および M5 (D1, D2) 濃度変化

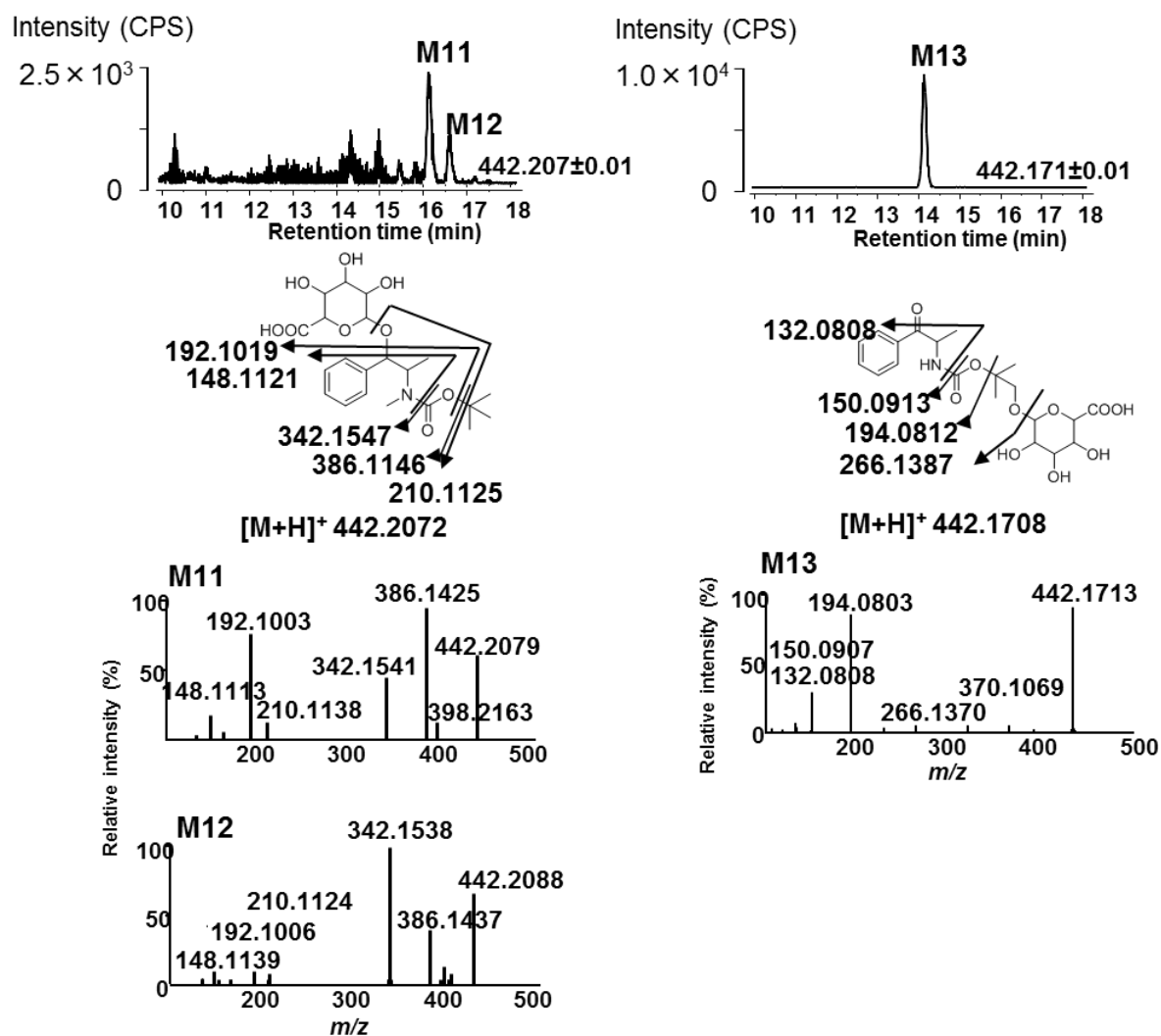


図 15. BocMA 投与から 4 時間後に回収したラット尿から検出された代謝物 M11、M12 および M13 の抽出イオンクロマトグラムおよびプロダクトイオンスペクトル

BocMA および主代謝物の、投与量に対する尿中排泄量の割合を検討するために、ラット尿中の BocMA および M5 (D1, D2)の定量を行った。また、M5 については、一部がグルクロン酸抱合体として尿中排泄されていたことから、酵素加水分解処理による脱抱合処理の前後で、定量を行った。なお、本酵素加水分解条件では、尿中の BocMA および M5 (D1, D2)が分解しないことをあらかじめ確認している。定量結果を表 10 に示す。未変化体は投与後 4 時間までに最高濃度に達し、その後、経時的に減少し、投与後 72 時間までに尿中排泄された総量は、投与量の 0.13% (平均値、 $n = 3$) であった。

ラット尿中の M5-D1 および M5-D2 は、投与後 4 または 8 時間で最高濃度に達し、その後は経時的に減少し、投与後 24-72 時間の採取尿からは検出されなかった。また、M11 および M12 ((M5-D1-Glu, M5-D2-Glu) は前述の加水分解処理によりいずれも検出されなくなり、M5-D1 および M5-D2 の尿中濃度が増加した。なお、加水分解前後の定量結果から、投与から 72 時間までに尿中排泄された M5-D1 の 90% (平均値、 $n = 3$) および M5-D2 の 80% (平均値、 $n = 3$) がグルクロン抱合体として尿中排泄されていると考えられた。投与開始から 72 時間までに尿中排泄された M5 (グルクロン酸抱合体 M11 および 12 を含む) の総量は、投与量の 0.016% (平均値、 $n = 3$) であった。

M9 およびそのグルクロン酸抱合体 M13 については、いずれも投与 72 時間後の尿からも検出され、それぞれ投与後 0-4 または 4-8 時間で最高濃度に達し、その後経時的に減少した。そこで、酵素加水分解前後での M9 のピーク強度を比較したところ、全ての尿試料で、加水分解により M13 のピークがほぼ完全に消失し、M9 のピーク強度が加水分解前の約 10 倍に上昇した (図 16)。M9 の標準品は合成できなかったことから、M5-D1 と M9 の検出感度が同等と仮定して、M9 の尿中濃度を概算したところ、投与から 72 時間までに尿排泄された M9 (グルクロン酸抱合体を含む) の総量は、投与量の約 0.14% であった。

RLM 代謝試験では、反応開始から 3 分で消失した BocMA の約半分 (45%) が M5 に代謝されており、主代謝物と考えられたが、ラットへの投与試験では、M5 の尿排泄総量は投与量に対して極微量 (M5 : 0.016%) であり、M9 の尿排泄量も微量 (0.14%) であった。

なお、M5 (D1, D2)のジアステレオマー比 ($R = M5-D1/M5-D2$) は、HLM ($1 \leq R \leq 3.4$)と RLM ($0.12 \leq R \leq 1$)で大小関係が逆転していた。

表 10. 摂取から 72 時間までのラット尿中に排泄された BocMA および M5 (D1, D2) 濃度および総量

Rat No.	Time (hr)	Urine volume (mL)	BocMA ^a		Before hydrolysis		After hydrolysis		Before hydrolysis		After hydrolysis		Total percentage of the excreted BocMA(%)
			(ng/mL)	(ng)	M5-D1 ^a (ng/mL)	M5-D1 ^a (ng/mL)	M5-D1 ^a (ng/mL)	M5-D1 ^b (ng)	M5-D2 ^a (ng/mL)	M5-D2 ^a (ng/mL)	M5-D2 ^a (ng/mL)	M5-D2 ^b (ng)	
1	0-4	1.5	58	87	0.47	0.46	0.69	1.5	5.2	7.8	—	—	—
	4-8	1.0	8.9	8.9	0.51	54	54	0.67	35	35	—	—	—
	8-24	8.0	7.4	59	ND	ND	2.3	ND	ND	—	—	—	—
	24-48	7.0	12	84	ND	ND	—	ND	ND	—	—	—	—
	48-72	10	ND	—	ND	ND	—	ND	ND	—	—	—	—
	0-72	28	—	2.4×10 ²	—	—	57	—	—	43	0.0091	—	—
2	0-4	2.0	95	1.9×10 ²	6.5	5.2	10	12	12	24	—	—	—
	4-8	2.0	39	78	3.0	89	1.8×10 ²	1.0	14	28	—	—	—
	8-24	15	2.9	44	3.0	4.8	72	ND	ND	—	—	—	—
	24-48	20	ND	—	ND	ND	—	ND	ND	—	—	—	—
	48-72	15	ND	—	ND	ND	—	ND	ND	—	—	—	—
	0-72	54	—	3.1×10 ²	—	—	2.6×10 ²	—	—	52	0.015	—	—
3	0-4	0.50	5.4×10 ³	2.7×10 ³	50	1.4×10 ²	70	8.1	1.0×10 ²	50	—	—	—
	4-8	2.0	2.2×10 ³	4.4×10 ³	3.2	2.2×10 ²	4.4×10 ²	1.5	33	66	—	—	—
	8-24	10	6.8×10 ²	6.8×10 ³	ND	86	8.6×10 ²	ND	4.2	42	—	—	—
	24-48	8.0	83	6.6×10 ²	ND	11	88	ND	ND	—	—	—	—
	48-72	9.0	90	8.1×10 ²	ND	0.71	6.4	ND	ND	—	—	—	—
	0-72	30	—	1.5×10 ⁴	—	—	1.5×10 ³	—	—	1.6×10 ²	0.42	—	—

a は尿中濃度、b は総量を示す。

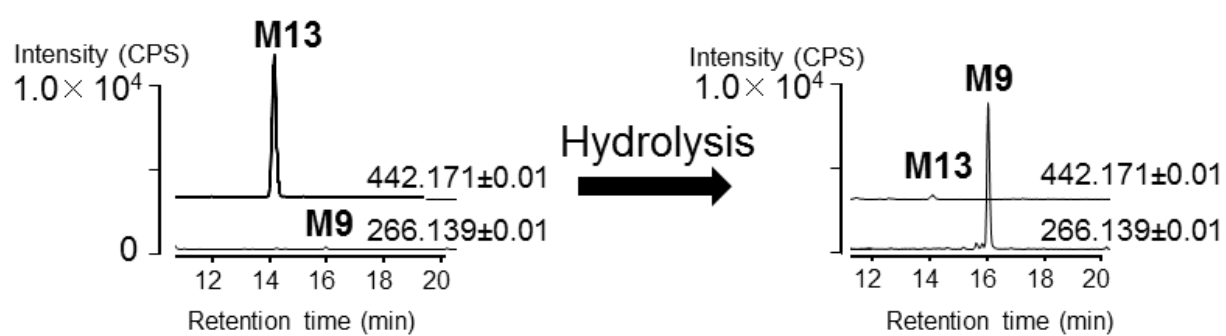


図 16. 加水分解処理前後のラット尿から得られた代謝物 M9 および M13 の抽出イオンクロマトグラム

第4節 考察

4-1 項 代謝経路

肝ミクロソームによる代謝試験で算出された CL_{int} 、 CL_H およびER値から、経口摂取後のBocMAが腸管吸収されると、初回通過効果を大きく受けることが示唆された。また、ヒトおよびラットいずれにおいても、BocMAはMAに代謝されずに、ベンジル位がヒドロキシ化されたM5 (D1, D2)、*N*-脱メチル化されたM6、フェニル基がヒドロキシ化されたM7、ベンジル位のカルボニル化と*N*-脱メチル化されたM8、M8の*tert*-butyl基がヒドロキシ化されたM9、およびM5のヒドロキシ化体またはBocMCの関連代謝物と考えられるM10を生成することが示唆された。また、図17に示すように、M10の生成機構として、「メチル基のヒドロキシ化」または「BocMCの生成とそれに続く水の付加」が考えられた。これらに類似した反応が、エフェドリンとホルムアルデヒドの反応^[71]およびカチノン系抗うつ薬であるBupropionの代謝でそれぞれ報告^[72-74]されているが、M10の構造決定や生成機構について、今後更なる検討が必要である。加えて、M10は、M5およびM8の中間代謝物と考えられた。この理由としてM10がM5のヒドロキシ化体またはBocMCに関連した構造を有することや、反応開始から60分までRLM反応液中で、各代謝物の検出強度が最大となった反応時間が、M5が3分、M10が13分、M8が20分、M9が60分であり、経時的にシフトしていたことも挙げられる。したがって、“BocMA→M5→M10→M8→M9”はBocMAの代謝経路の1つと考えられた（図18）。この一連の代謝は、化学構造の点からも妥当であり、この経路を支持するものであった。

なお、M5 (D1, D2) のジアステレオマー比が、HLM ($1 \leq R \leq 3.4$) とRLM ($0.12 \leq R \leq 1$) で逆転していたことから、本代謝に関わる酵素には種差があるものと考えられた。同様の種差における代謝の差異は、*tert*-butyl基を持つBupropionでも見られる^[72]ことから、立体的な嵩高さが立体選択的な代謝の要因となる可能性がある。これに加えて、M5のジアステレオマー比の逆転は、ラット肝ミクロソーム試験 ($R \leq 1$) とラットへの投与試験 ($R \geq 1$) の間でも見られたことから、ラット体内において、M5-D1とM5-D2の間で、尿排泄速度が大きく異なる可能性が考えられた。

4-2 項 未変化体および代謝物の尿中排泄

尿試料は非侵襲的かつ簡便に採取することが可能であるうえに、尿中には摂取薬物および代謝物の多くが排泄されるため、薬物の摂取証明を目的とした検査には尿試料を用いるのが一般的である。覚醒剤の摂取証明も例外ではなく、尿試料を用いて実施することが多いため、BocMAの摂取証明（MA摂取との識別）も尿試料を用いて行うことが効率的である。しかしながら、ラットの尿からは、肝ミクロソーム代謝試験で確認されたM6、M8、M10は検出されず、水酸基を有するM5 (D1, D2)、M7およびM9のみが検出された。加えて、検出されたM5 (D1, D2)およびM9のほとんどがグルクロン酸抱合として尿中排泄されていたことから、極性の高い代謝物のみが尿中に排泄されることが示唆された。さらに、投与から72時間までに、尿中に排泄されたBocMAおよび代謝物の投与量に対する割合は約0.3%であり、MAの80–90%^[75]と比較すると顕著に低かった。BocMAおよび代謝物M5~11が、ほとんど（または全く）尿中排泄されなかった要因として、脂肪組織への移行、糞便排泄等が考えられた。MAは、Boc基導入により化合物の脂溶性が高くなったことに加え、Boc化されたアミンが塩基性を失い、プロトン化（電荷付与）されなくなることで極性を著しく低下させたと考えられる。脂溶性の高い薬物は、尿細管等での再吸収が促され、尿中への排泄率が低くなる^[76, 77]とともに、脂肪組織等への分布あるいは胆汁を介した糞便排泄される傾向にあり、BocMAも同様である可能性が考えられる。また、M7は抱合体としては検出されなかったが、フェノール性水酸基を有しているため、4OHMAやHMMAと同様に^[78-81]、ヒト尿中では硫酸抱合体として排泄される可能性を考慮しておく必要がある。

4-3 項 摂取証明への活用

本研究で実施した *in vitro* および *in vivo* 試験の結果から、BocMA は M5~13（ジアステレオマーおよびグルクロン酸抱合体を含む）に幅広く代謝されることが示された。また、興味深いことに、BocMA は MA およびその主要代謝物（AP、4OHMA および 4OHAP）に代謝されなかったことから、経口摂取以外の方法（静脈注射および粘膜吸収等）で服用した場合は、MA が血中および尿中に存在することはないことが示唆された。裁判化学において、MA の摂取証明は、生体試料中から MA とその主要代謝物を検出することで達成される。従って、BocMA が静脈注射や粘膜吸収により乱用された場合は、これら成分が検出されないため、MA 摂取の可能性は極めて低いと考えられる。

一方、経口摂取した場合、既報に示す通り、BocMA は胃酸により加水分解されて MA へと変換されて吸収されるため、MA およびその代謝物が血中および尿中から検出されることが想定される^[61]。しかしながら、胃酸での分解速

度は緩やかであり、経口摂取された BocMA の一部は、胃酸で分解されずに体内へと吸収されるため、MA 摂取との識別を可能にする特異的代謝物が存在することも十分考えられた。本研究の結果から、BocMA は極めて肝代謝を受けやすいことが示されたため、未変化体とともに M5~10 を指標とすることで、BocMA の摂取証明の一助となるものと期待される。ただし、*in vivo* 試験で明らかになったように、BocMA は脂溶性が高いこともあり、尿中に排泄される割合は低く、ほとんどが糞便排泄される可能性がある。従って、法科学分野で汎用される尿試料を分析対象とする場合は、尿中排泄され易い、比較的極性の高い代謝物（M5, M7, M9 およびそれらの抱合体）を指標とすることが望ましいと考えられる。なお、M5-D1 および M5-D2 は（プソイド）エフェドリンの Boc 化体であり、その流通が国外で数件確認されているため、摂取証明の際は、それらを摂取した可能性も考慮する必要がある。また、M7（抱合体を含む）は検出強度が低かったため、実際にヒト尿中から検出されるか否かは今後検討する必要があるが、代謝物としての特異性が高いため、BocMA および MA 摂取の識別において、有用な指標として期待される。

今後、摂取識別法を確立するためには、前章の PPs や SCs と同様に、臨床試験等で BocMA を摂取したヒトから採取した生体試料について薬物モニタリングを行うことで、代謝・排泄経路を明らかにする必要がある。

第5節 小括

BocMAは、経口で摂取すると胃酸によりMAに変換されるため、覚醒剤使用罪で誤認される可能性がある注意を要する化合物である。本研究では、BocMAの代謝経路を明らかにすることを目的に*in vitro*および*in vivo*代謝試験を実施し、10種の代謝物（ジアステレオマーおよび抱合体を含む）を検出した。検出された代謝物に基づくと、BocMAは、第Ⅰ相でヒドロキシ化、カルボニル化および脱メチル化等の代謝を受け、さらにヒドロキシ化された代謝物については第Ⅱ相でグルクロン酸抱合を受けることが示唆されたため、実際の鑑定では、BocMAに特異的な代謝物を生体試料から検出することで、BocMAの摂取証明やMA摂取との識別が可能になると期待される。しかしながら、BocMAは脂溶性が高いため、本研究で実施したラットへの投与実験では、尿中に排泄される未変化体および代謝物の割合は顕著に低く、排泄される代謝物も極性が高いものが中心となり限定的であった。従って、実際のヒト尿中には、主に水酸基を有する代謝物が抱合体（第Ⅱ相代謝物）として排泄される可能性が高いと推定される。本研究は、BocMAの代謝に関する初めての報告であり、BocMAとMA摂取の識別に有用な知見になるものと考えられる。

なお、オーストラリアではBoc化されたMDMA (BocMDMA)の押収が報告されていることから^[82]、今後は、BocMA以外のBoc化規制薬物についての代謝および排泄についても検討していく必要がある。

総 括

2000 年頃から、日本を含む世界各国で、新規乱用薬物、通称：危険ドラッグが続々と流通されるようになった。この新たな薬物乱用問題の対策として、厚労省は、流通が確認された危険ドラッグを順次、指定薬物として法律で規制している。しかし、これら危険ドラッグは、法規制を回避するために、既存の化学構造を巧妙に改変させてきた。CATs と SCs をはじめとする危険ドラッグの構造類似体が指定薬物として規制されたことに加えて、MA の密輸に用いられ、覚醒剤プロドラッグとしての性質を持つ BocMA も指定薬物に追加された。

これら乱用薬物の摂取証明には、非侵襲的に採取が可能な尿試料が最も多く用いられる。また、交通事故を引き起こした場合では、当時の薬物の影響を推測するためには、血液試料の定量分析が不可欠である。しかしながら、新規危険ドラッグの代謝および排泄についてはほとんど明らかになっていない。本研究は、危険ドラッグの代謝および排泄を考察することで、摂取証明に有用な特異的代謝物や生体試料選択を提示するとともに、生体試料の適切な前処理や分析法を提案することを目指したものである。

はじめに、麻薬に指定されている CATs である 1-Phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one (α -PVP) の芳香環置換誘導体 3 種 (4F- α -PVP, 4MeO- α -PVP, α -PVT) について、それらの使用者の尿を対象に、合成した標準試料を用いた代謝物分析を実施した結果、 α -PVP の主要代謝物であるアルコール体およびピロリジン環酸化体は、いずれの誘導体においても検出された。4F- α -PVP は、 α -PVP と大きな差は見られなかったが、4MeO- α -PVP では、アルコール体およびピロリジン環酸化体はマイナー代謝物となり、代わりに脱メチル化体のグルクロン酸抱合体が尿中の主代謝物となっていた。また、 α -PVT では、ピロリジン環酸化体に加えて、チエニル基酸化体が主代謝物であることが示唆された。このことから、芳香環の種類や置換基がピロリジノフェノン誘導体 (PPs) の代謝に大きな影響を及ぼすことが示唆され、摂取証明に有用な代謝物を提案した。

次に、構造が次々と改変される SCs の影響下で交通事故を起こした運転手から採取した尿および血液試料について、LC-MS/MS を用いた SCs の定性・定量分析を行い、各 SCs を化学構造的特徴に基づき 3 つのグループに分類し、分子編集ソフト (ChemBioDraw) を用いて、脂溶性の指標として ClogP を算出し、傾向を観察した。その結果から、ClogP4~5 が SCs の尿排泄の境界線であり、Class3 の SCs は Class1 および 2 よりも血中濃度に大きなばらつき

がみられ、末端エステル型 SC はアミド型よりも血中半減期が短い可能性が示唆された。これらの結果から、中毒症状を発現し、交通事故を起こした事例における各 SCs の血中濃度や尿中排泄を明らかにするとともに、各 SCs の化学的特徴が生体試料中濃度に与える影響について一定の知見を得た。

BocMA は、経口で摂取すると胃酸により MA に変換されるため、覚醒剤使用罪と誤認される可能性がある注意を要する化合物である。そこで、BocMA の代謝経路の明らかにするために *in vitro* および *in vivo* 試験を実施し、10 種の代謝物（ジアステレオマーおよび抱合体を含む）を検出した。検出された代謝物に基づくと、BocMA は、第 I 相でヒドロキシ化、カルボニル化および脱メチル化等の代謝を受け、さらにヒドロキシ化された代謝物については第 II 相でグルクロン酸抱合を受けることが示唆された。しかしながら、BocMA は脂溶性が高いため、本研究で実施したラットへの投与実験では、尿中に排泄される未変化体および代謝物の割合は顕著に低く、排泄される代謝物も極性が高いものが中心となり限定的であった。従って、実際のヒト尿中には、主にヒドロキシ基を有する代謝物（M5, M7, M9）が抱合体（第 II 相代謝物）として排泄される可能性が高く、BocMA と MA 摂取の識別に有用な分析対象候補として提案した。

以上の結果、本研究は、危険ドラッグ（PPs, SCs, BocMA）の化学的特徴に基づいて代謝・排泄について考察しており、今後新規に流通する薬物の代謝・排泄挙動の予測に寄与すると考えられた。また、本研究で示した薬物および代謝物の各濃度や機器分析データ、ならびに提案した生体試料の選択方針や各種分析手法が、今後の薬物事犯の取り締まりに貢献することを期待する。

結 語

筆者は、「危険ドラッグの摂取証明を目的とした代謝および排泄の研究」を行うことで、以下の結論を得た。

- ・危険ドラッグの摂取者から採取した尿試料について、CATs である α -PVP の芳香環置換誘導体 3 種 (4F- α -PVP, 4MeO- α -PVP, α -PVT) および代謝物の定性・定量分析を行うことで、芳香環の構造がピロリジノフェノン誘導体 (PPs) の代謝経路に及ぼす影響を明らかにすることで、摂取証明に有用な代謝物を提案した。

- ・SCs の影響下で交通事故を起こしたとされる運転手から採取した尿および血液中の SCs を定量分析することで、官能基や脂溶性が、生体試料中の未変化体濃度に影響を与える影響について考察し、未変化体を検出するのに有用な生体試料を提案した。

- ・潜在的覚醒剤プロドラッグ “BocMA” について、ミクロソーム代謝試験とラットへの投与試験によりその代謝および排泄の検討を行い、Boc 基導入が MA の代謝および排泄経路が顕著に変化させることを明らかにし、MA 摂取と BocMA 摂取の識別に有用な代謝物を提案した。

以上のことから、本研究は、構造を次々と改変させてきた危険ドラッグについて、ヒトから採取した生体試料分析および代謝試験の結果から、代謝および排泄について一定の知見を得た。加えて、官能基や脂溶性といった化学的性質に着目した考察は、既存の危険ドラッグだけでなく、新たに流通する危険ドラッグの摂取証明にも活用されることが期待されるものである。

謝 辞

本研究結果をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました神戸薬科大学衛生化学研究室 長谷川 潤 教授に深く感謝の意を表します。

本研究の論文審査にあたり、有益な御助言、御校閲を賜りました神戸薬科大学薬剤学研究室 大河原 賢一 教授、薬品化学研究室 上田 昌史 教授、中央分析室 竹内 敦子 准教授に深謝致します。

私を衛生薬学・裁判化学分野へと導いていただいた和歌山県立医科大学 薬学部・衛生薬学研究室 太田 茂 教授に深謝致します。

大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所に入所以来、終始御指導、御鞭撻を賜りました三木 昭宏 博士、片木 宗弘 博士、西岡 裕 博士、鎌田 徹 博士、志摩 典明 博士、鎌田 寛恵 博士、松田 駿太郎 博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり多大なるご支援、ご協力を賜りました大阪安全基盤研究所 土井 崇広 博士、大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所 佐々木 啓子 研究員、藤井 史保子 研究員、和田 美暁 研究員、浅井 龍太郎 研究員、新田 篤志 研究員、三宅 亜香里 研究員、松本 謙吾 研究員、元大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所 土橋 均 博士、近畿大学生物理工学部 生命情報工学科 財津 桂 教授に感謝いたします。

最後に、私の研究生活を支えてくれた、最愛の理解者である妻の亜弓、娘の日菜子・佳純、両親、祖父の豊市に心より感謝します。

引用文献

- [1] World Health Organization website available from [https://www.who.int/health-topics/drugs-psychoactive#tab=tab_1], accessed Feb 2, 2022.
- [2] United Nations website available from [<http://www.unodc.org/unodc/index.html>], accessed Feb 2, 2022.
- [3] 「覚醒剤取締法」, 昭和 26 年法律第 252 号.
- [4] 「麻薬及び向精神薬取締法」, 昭和 28 年法律第 14 号.
- [5] 「大麻取締法」, 昭和 23 年法律第 124 号.
- [6] 警察庁, 令和 2 年における組織犯罪の情勢 (薬物情勢、統計データ), available from [<https://www.npa.go.jp/publications/statistics/kikakubunseki/index.html>], accessed Feb 2, 2022.
- [7] Rojek S., Kula K., Maciów-Głąb M. et al. New psychoactive substance α -PVP in a traffic accident case. *Forensic Toxicol.* 34 (2016), 403–410.
- [8] 警察庁, 平成 25 年の薬物・銃器情勢 (暫定値), available from [https://www.npa.go.jp/soshikihanzai/yakubutujyuki/yakujuu/yakujuu1/h25_1_yakujuu_jousei.pdf], accessed Oct 2, 2013.
- [9] 金子 周司, 危険ドラッグ吸引と自動車事故—2012 年から 2014 年にかけて国内で起こった 96 の事例—, 日本法科学技術学会誌, 22 (2017), 49-59.
- [10] 「薬事法」, 昭和 35 年法律第 145 号. 「薬事法の一部を改正する法律」(平成 25 年法律第 84 号) により「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」に改題.
- [11] Meltzer P. C., Butler D., Deschamps J. R., Madras B. K. 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) analogues: a promising class of monoamine uptake inhibitors. *J. Med. Chem.* 49 (2006), 1420-1432.
- [12] Baumann M. H., Ayestas M. A., Partilla J. S., Sink J. R., Shulgin A. T., Daley P. F., Brandt S. D., Rothman R. B., Ruoho A. E., Cozzi N. V. The designer methcathinone analogs, mephedrone and methylone, are substrates for monoamine transporters in brain tissue. *Neuropsychopharmacology* 37 (2011), 1192-1203.
- [13] Simmler L. D., Buser T. A., Donzelli M., Schramm Y., Dieu L. H., Huwyler J., Chaboz S., Hoener M. C., Liechti M. E. Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 168 (2013), 458-470.
- [14] Brenneisen R., Geissbuesler S., Schorno X. Metabolism of cathinone to (-)-norephedrine and (-)-norpseudoephedrine. *J. Pharm. Pharmacol.* 38 (1986), 298-300.
- [15] Paul B. D. and Cole K. A. Cathinone (Khat) and methcathinone (CAT) in urine

- specimens: a gas chromatographic-mass spectrometric detection procedure. *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001), 525–530.
- [16] Zaitzu K., Katagi M., Kamata H. T., Kamata T., Shima N., Miki A., Tsuchihashi H., Mori Y. Determination of the metabolites of the new designer drugs bk-MBDB and bk-MDEA in human urine. *Forensic Sci. Int.* 188 (2009), 131–139.
- [17] Shima N., Katagi M., Kamata H., Matsuta S., Nakanishi K., Zaitzu K., Kamata T., Nishioka H., Miki A., Tatsuno M., Sato T., Tsuchihashi H., Suzuki K. Urinary excretion and metabolism of the newly encountered designer drug 3,4-dimethylmethcathinone in humans. *Forensic Toxicol.* 31 (2013), 101–112.
- [18] Tyrkkö E., Pelander A., Ketola R., Ojanperä I. In silico and in vitro metabolism studies support identification of designer drugs in human urine by liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013), 6697–6709.
- [19] Meyer M. R., Vollmar C., Schwaninger A. E., Maurer H. H. New cathinone-derived designer drugs 3-bromomethcathinone and 3-fluoromethcathinone: studies on their metabolism in rat urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and their detectability in urine. *J. Mass Spectrom.* 47 (2012), 253–262.
- [20] Meyer M. R., Wilhelm J., Peters F. T., Maurer H. H. Beta-keto amphetamines: studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of mephedrone, butylone, and methylone in urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010), 1225–1233.
- [21] Kamata H. T., Shima N., Zaitzu K., Kamata T., Miki A., Nishikawa M., Katagi M., Tsuchihashi H. Metabolism of the recently encountered designer drug, methylone, in humans and rats. *Xenobiotica.* 36 (2006), 709–723.
- [22] Wikström M., Thelander G., Nyström I., Kronstrand R. Two fatal intoxications with the new designer drug methedrone (4-methoxymethcathinone). *J. Anal. Toxicol.* 34 (2010), 594–598.
- [23] Meyer M. R., Du P., Schuster F., Maurer H. H. Studies on the metabolism of the α -pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and its detectability in urine by GC-MS. *J. Mass Spectrom.* 45 (2010), 1426–1442.
- [24] Michaelis W., Russel J. H., Schindler O. Metabolism of pyrovalerone hydrochloride. *J. Med. Chem.* 13 (1970), 497–503.
- [25] Shima N., Katagi M., Kamata H., Matsuta S., Sasaki K., Kamata T., Nishioka H.,

- Miki A., Tatsuno M., Zaitzu K., Ishii A., Sato T., Tsuchihashi H., Suzuki K. Metabolism of the newly encountered designer drug α -pyrrolidinovalerophenone in humans: identification and quantitation of urinary metabolites. *Forensic Toxicol.* 32 (2014), 59–67.
- [26] Shima N., Kakehashi H., Matsuta S., Kamata H., Nakano S., Sasaki K., Kamata T., Nishioka H., Zaitzu K., Sato T., Miki A. Urinary excretion and metabolism of the α -pyrrolidinophenone designer drug 1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)octan-1-one (PV9) in humans. *Forensic Toxicol.* 33 (2015), 279–294.
- [27] Paul M., Bleicher S., Guber S., Ippisch J., Polettini A., Schultis W. Identification of phase I and II metabolites of the new designer drug α -pyrrolidinohexiophenone (α -PHP) in human urine by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *J. Mass Spectrom.* 50 (2015), 1305–1317.
- [28] Matsuta S., Shima N., Kamata H., Kakehashi H., Nakano S., Sasaki K., Kamata T., Nishioka H., Miki A., Katagi M., Zaitzu K., Sato T., Tsuchihashi H., Suzuki K. Metabolism of the designer drug α -pyrrolidinobutiophenone (α -PBP) in humans: identification and quantification of the phase I metabolites in urine. *Forensic Sci. Int.* 249 (2015), 181–188.
- [29] Matsuta S., Shima N., Kakehashi H., Kamata H., Nakano S., Sasaki K., Kamata T., Nishioka H., Miki A., Zaitzu K., Tsuchihashi H., Katagi M. Metabolism of α -PHP and α -PHPP in humans and the effects of alkyl chain lengths on the metabolism of α -pyrrolidinophenone-type designer drugs. *Forensic Toxicol.* 36 (2018), 486–49.
- [30] Archer R. P. Fluoromethcathinone, a new substance of abuse. *Forensic Sci. Int.* 185 (2009), 10–20.
- [31] Ellefsen K., Wohlfarth A., Swortwood M., Diao X., Concheiro M., Huestis M. 4-methoxy- α -PVP: in silico prediction, metabolic stability, and metabolite identification by human hepatocyte incubation and high-resolution mass spectrometry. *Forensic Toxicol.* 34 (2015), 61–75.
- [32] Swortwood M. J., Carlier J., Ellefsen K. N., Wohlfarth A., Diao X., Concheiro-Guisan M., Kronstrand R., Huestis M. In vitro, in vivo and in silico metabolic profiling of α -pyrrolidinopentiothiophenone, a novel thiophene stimulant. *Bioanalysis.* 8 (2016), 65–82.
- [33] Huffman J. W., Dai D, Martin B. R., Compton D. R. Design, Synthesis and Pharmacology of Cannabimimetic Indoles, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4 (1994), 563–566.
- [34] Shanks K. G., Clark W. Behonick G. Death associated with the use of the synthetic

- cannabinoid ADB-FUBINACA. *J. Anal. Toxicol.* 40 (2016), 236-239.
- [35] Abouchdid R., Ho J. H., Hudson S., Dines A., Archer J. R. H., Wood D. M. Acute toxicity associated with use of 5F-derivations of synthetic cannabinoid receptor agonists with analytical confirmation. *J. Med. Toxicol.* 12 (2016), 396-401.
- [36] Adamowicz P. Fatal intoxication with synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA. *Forensic Sci Int.* (2016), 261:e5-e10.
- [37] Schep L. J., Slaughter R. J., Hudson S., Place R., Watts M. Delayed seizure-like activity following analytically confirmed use of previously unreported synthetic cannabinoid analogues. *Hum Exp Toxicol.* 34(2015), 557-560.
- [38] Tait R. J., Caldicott D., Mountain D., Hill S. L., Lenton S. A systematic review of adverse events arising from the use of synthetic cannabinoids and their associated treatment. *Clin. Toxicol.* 54 (2016), 1-13.
- [39] Spaderna M., Addy P. H., D'Souza D. C. Spicing things up: synthetic cannabinoids. *Psychopharmacol (Berl)*. 228 (2013), 525-540.
- [40] Castaneto M. S., Gorelick D. A., Desrosiers N. A., Hartman R. L., Pirarda S., Huestis M. A. Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and Alcohol Dependence* 144 (2014), 12–41.
- [41] Seely K. A., Lapoint J., Moran J. H., Fattore L. Spice drugs are more than harmless herbal blends. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 39 (2012), 234–243.
- [42] United Nations, Synthetic Cannabinoids in Herbal Products, 2011, available from [https://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids.pdf] accessed Feb 2, 2022.
- [43] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Synthetic cannabinoids in Europe – a review, 2021, available from [<https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/14035/Synthetic-cannabinoids-in-Europe-EMCDDA-technical-report.pdf>] accessed Feb 2, 2022.
- [44] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Synthetic cannabinoids in Europe (Perspectives on Drugs), 2017, available from [https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2753/POD_Synthetic%20cannabinoids_0.pdf] accessed Feb 2, 2022.
- [45] Shima N., Katagi M., Kamata H., Zaito K., Kamata T., Miki A., Tsuchihashi H., Sakuma T., Nemoto N. Conjugates of p-hydroxymethamphetamine and 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine in blood obtained from methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine users: analysis by LC-MS-MS, *Forensic Toxicol.* 26 (2008), 58–65.

- [46] Drummer O. H. Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007), 1495–1503.
- [47] Yeakal J. K., Logan B. K. Blood synthetic cannabinoid concentrations in cases of suspected impaired driving. *J. Anal. Toxicol.* 37 (2017), 547–551.
- [48] Ashton C. H. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br. J. Psychiatry* 171 (2001), 101–106.
- [49] Hwang J., Hwang J., Ganganna B., song I., Heo M. Y., Ahn S., Lee J. Metabolic and pharmacokinetic characterization of a new synthetic cannabinoid APINAC in rats. *Forensic Toxicol.* 36 (2018), 88–101.
- [50] Kaneko S. Motor vehicle collisions caused by the ‘super-strength’ synthetic cannabinoids, MAM-2201, 5F-PB-22, 5F-AB-PINACA, 5F-AMB and 5F-ADB in Japan experienced from 2012 to 2014. *Forensic Toxicol.* 35 (2017), 244–251.
- [51] Andersson M., Diao X., Wohlfarth A., Scheidweiler K. B., Huestis M. A. Metabolic profiling of new synthetic cannabinoids AMB and 5F-AMB by human hepatocyte and liver microsome incubations and high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 30 (2016), 1067–1078.
- [52] Wohlfarth A., Castaneto M. S., Zhu M., Pang S., Scheidweiler K. B., Kronstrand R., Huestis M. A. Pentylindole/Pentylindazole Synthetic Cannabinoids and Their 5-Fluoro Analogs Produce Different Primary Metabolites: Metabolite Profiling for AB-PINACA and 5F-AB-PINACA. *AAPS J.* 17 (2015), 660–677.
- [53] Thomsen R., Nielsen L. M., Holm N. B., Rasmussen H. B., Linnet K. Synthetic cannabimimetic agents metabolized by carboxylesterases, *Drug Test Anal.* 7 (2015), 565–576.
- [54] Castaneto M. S., Gorelick D. A., Desrosiers N. A., Hartman R. L., Pirarda S., Huestis M. A. Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and Alcohol Dependence* 144 (2014), 12–41.
- [55] Ménétrey A., Augsburger M., Favrat B., Pin M. A., Rothuizen L. E., Appenzeller M., Buclin T., Mangin P., Giroud C. Assessment of driving capability through the use of clinical and psychomotor tests in relation to blood cannabinoids levels following oral administration of 20 mg dronabinol or of a cannabis decoction made with 20 or 60 mg Δ^9 -THC. *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005), 327–338.
- [56] Takekawa K., Ohmori T., Kido A., Oya M. Methamphetamine body packer: acute poisoning death due to massive leaking of methamphetamine. *J. Forensic. Sci.* 52 (2007), 1219–1222.
- [57] Stoneberg D. M., Shukla R. K., Global M. M. B., Methamphetamine trends: an evolving problem. *Int. Crim. Justice* 28 (2018), 136–161.

- [58] Sunlive (2017) T-boc meth intercepted at border. [[http:// sunlive. Co.nz/ news/ 149476- tboc-meth-intercepted-at-border.html](http://sunlive.co.nz/news/149476-tboc-meth-intercepted-at-border.html)], accessed 16 Jul 2021
- [59] 税関, 各税関の摘発事件発表 (平成 31 年・令和元年)
[<https://www.customs.go.jp/kyotsu/hodo/jikenhodo/h31jiken/jiken2019.htm>],
accessed Jul 16, 2021.
- [60] Kurakami D., Sugie K., Akutsu M. Stability of *tert*-butoxycarbonyl-methamphetamine against heat and acid. In *56th annualmeeting of the international association of forensic toxicologist*, 2018, 301
- [61] Kakehashi H., Kamata H, Ishikawa A., Asai R., Nitta A., Wada M., Fujii S, Matsuta S., Sasaki S. N., Kamata T., Nishioka H., Miki A., Katagi M. Analyses of a methamphetamine precursor *N-tert*-butoxycarbonyl-methamphetamine (t-BOCMA) and its behavior in simulated gastric juice. *Jpn. J. Forensic Sci. Technol.* 24 (2019), 73–78.
- [62] Cody J., Valtier S. Detection of amphetamine and methamphetamine following administration of benzphetamine. *J. Anal. Toxicol.* 22 (1998), 299–309.
- [63] Shin H. S., Park B. B., Choi S. N., Oh J. J., Hong C. P., Ryu H. Identification of new urinary metabolites of famprofazone in human. *J. Anal. Toxicol.* 22 (1998), 55–60.
- [64] Chan K. H., Hsu M. C., Tseng C. Y., Chu W. L. Famprofazone use can be misinterpreted as methamphetamine abuse. *J. Anal. Toxicol.* 34 (2010), 347–353.
- [65] Maurer H. H., Kraemer T. Differentiation of the intake of selegiline and methamphetamine by enantioselective gas chromatographymass spectrometry (GC–MS) in clinical and forensic toxicology. *Arch. Pharm.* 324 (1991), 609.
- [66] Maurer H. H., Kraemer T. Toxicological detection of selegiline and its metabolites in urine using fluorescence polarization immunoassay (FPIA) and gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) and differentiation by enantioselective GC–MS of the intake of selegiline from abuse of methamphetamine or amphetamine. *Arch. Toxicol.* 66 (1992), 675–678.
- [67] Obach R. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 27 (1999), 1350–1359.
- [68] Naritomi Y., Terashita S., Kimura S., Suzuki A., Kagayama A., Sugiyama Y. Prediction of human hepatic clearance from in vivo animal experiments and in vitro metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. *Drug Metab. Dispos.* 29 (2001), 1316–1324.

- [69] Davies B., Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.* 10 (1993), 1093–1095.
- [70] 厚生労働省, 厚生労働省通知 科発 0601002 号, 平成 18 年 6 月 1 日.
- [71] Tsujikawa K., Okada Y., Segawa H., Yamamuro T., Kuwayama K., Kanamori T., Iwata Y. T. Degradation of 1-phenyl-2-propanone during long-term storage: useful information for methamphetamine impurity profiling. *Forensic Toxicol.* 39 (2021), 405–416.
- [72] Bhattacharya C., Kirby D., Van Stipdonk M., Stratford R. E. Comparison of in vitro stereoselective metabolism of bupropion in human, monkey, rat, and mouse liver microsomes. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 44 (2019), 261–274.
- [73] Posner J., Bye A., Dean K., Peck A. W., Whiteman P. D. The disposition of bupropion and its metabolites in healthy male volunteers after single and multiple doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 29 (1985), 97–103.
- [74] Suckow R. F., Smith T. M., Perumal A. S., Cooper T. B. Pharmacokinetics of bupropion and metabolites in plasma and brain of rats, mice, and guinea pigs. *Drug Metab. Dispos.* 14 (1986), 692–697.
- [75] Caldwell J., Dring L., Williams R. Metabolite of [14C] methamphetamine in man, the guinea pig and the rat. *Biochem. J.* 129 (1972), 11–22.
- [76] Kakehashi H., Shima N., Ishikawa A., Nitta A., Asai R., Wada M., Nakano S., Matsuta S., Sasaki K., Kamata H., Kamata T., Nishioka H., Miki A., Katagi M. Effects of lipophilicity and functional groups of synthetic cannabinoids on their blood concentrations and urinary excretion. *Forensic Sci. Int.* 307 (2020), 110106.
- [77] Huestis MA. Human cannabinoids pharmacokinetics. *Chem. Biodivers.* 4 (2007), 1770–1804.
- [78] Shimosato K., Tomita M., Ijiri I. Urinary examination of *p*-hydroxylated methamphetamine metabolites in man. *Arch. Toxicol.* 59 (1986), 135–140.
- [79] Hayakawa K., Miyoshi Y., Kurimoto H., Matsushima Y., Takayama N., Tanaka S., Miyazaki M. Simultaneous determination of methamphetamine and its metabolites in the urine samples of abusers by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Biol. Pharm. Bull.* 16 (1993), 817–821.
- [80] Shima N., Kamata H. T., Katagi M., Tsuchihashi H. Urinary excretion of the main metabolites of methamphetamine, including *p*-hydroxymethamphetamine-sulfate and *p*-hydroxymethamphetamine-glucuronide, in humans and rats. *Xenobiotica* 36 (2006), 259–267.
- [81] Shima N., Kamata H., Katagi M., Tsuchihashi H., Sakuma T., Nemoto N. Direct determination of glucuronide and sulfate of 4-hydroxy-3-

- methoxymethamphetamine, the main metabolite of MDMA, in human. *J. Chromatogr. B* 857 (2007), 123–129.
- [82] Collins M., Donnelly C., Cameron S., Tahtouh M., Salouros H. Identification and characterization of *N*-*tert*-butoxycarbonyl-MDMA: a new MDMA precursor. *Drug Test Anal.* 9 (2017), 399-404.