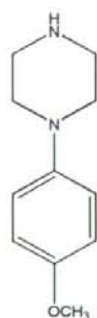
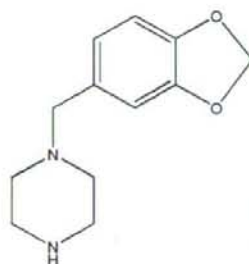


Tryptamines

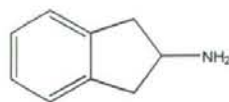
Compounds	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
MIPT	H	H	H	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
DPT	H	H	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃
DIPT	H	H	H	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
5-MeO-AMT	OCH ₃	H	CH ₃	H	H
5-MeO-DMT	OCH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃
5-MeO-DET	OCH ₃	H	H	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃
5-MeO-MIPT	OCH ₃	H	H	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
5-MeO-DPT	OCH ₃	H	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃
5-MeO-DALT	OCH ₃	H	H	CH ₂ CH=CH ₂	CH ₂ CH=CH ₂
4-OH-DIPT	H	OH	H	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
4-AcO-DIP	H	OCOCH ₃	H	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
5-MeO-EIPT	OCH ₃	H	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	H



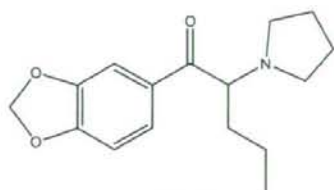
4-MPP



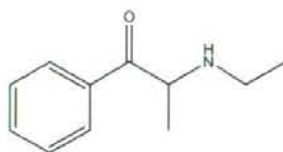
MDBP



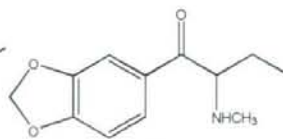
Indan-2-amine



MDPV



N-ethylcathinone



bk-MBDB

Fig.1-2 Structures of tested hallucinogenic designated substances

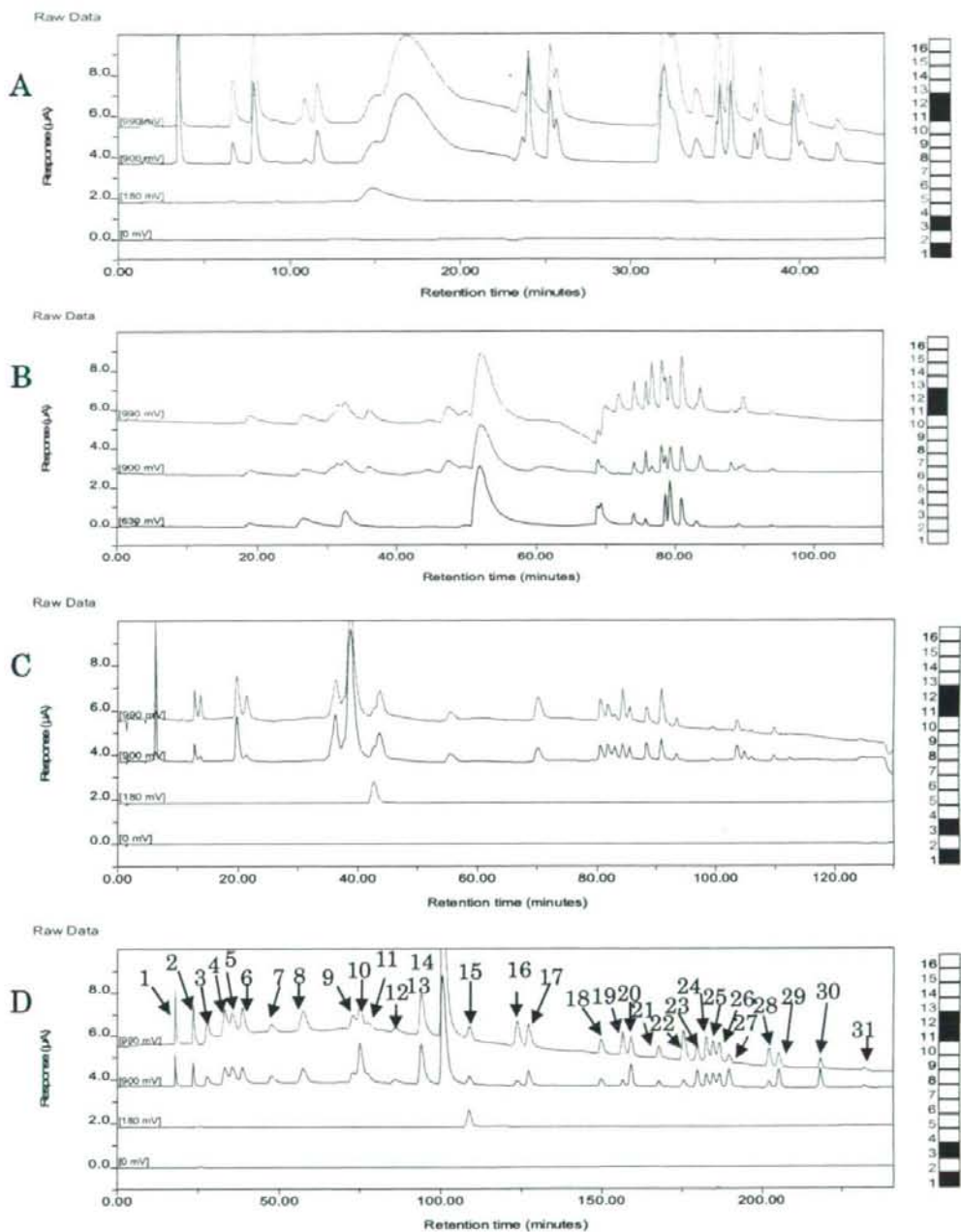


Fig.2. Chromatograms of 31 designated substances by HPLC-CAD

1: MBZP, 2: 4-MPP, 3: *N*-ethylcathinone, 4: bk-MBDB, 5: Indan-2-amine, 6: PMMA, 7: *N*-Me-FMP, 8: MMDA-2, 9: BDB, 10: HMDMA, 11: 4FMP, 12: 2C-C, 13: TMA-6, 14: DOC, 15: MDPV, 16: 5-MeO-DMT, 17: 2C-T-2, 18: 2C-I, 19: 5-MeO-AMT, 20: 2C-E, 21: MIPT, 22: ALEPH-2, 23: 5-MeO-MIPT, 24: DOI, 25: 4-OH-DIPT, 26: 5-MeO-EIPT, 27: 2C-T-4, 28: 5-MeO-DALT, 29: DIPT, 30: 5-MeO-DPT, 31: DPT.

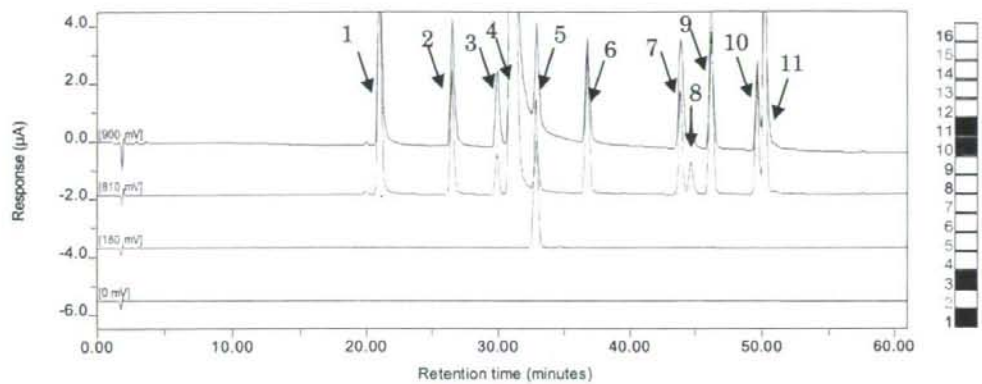


Fig.3 Chromatograms of tryptamines by HPLC-CAD

1: 5-MeO-DMT, 2: 5-MeO-AMT, 3: MIPT, 4: 5-MeO-MIPT, 5: 4-OH-DIPT, 6: 5-MeO-EIPT, 7: 5-MeO-DALT, 8: DIPT, 9: 4-AcO-DIPT, 10: 5-MeO-DPT, 11: DPT.

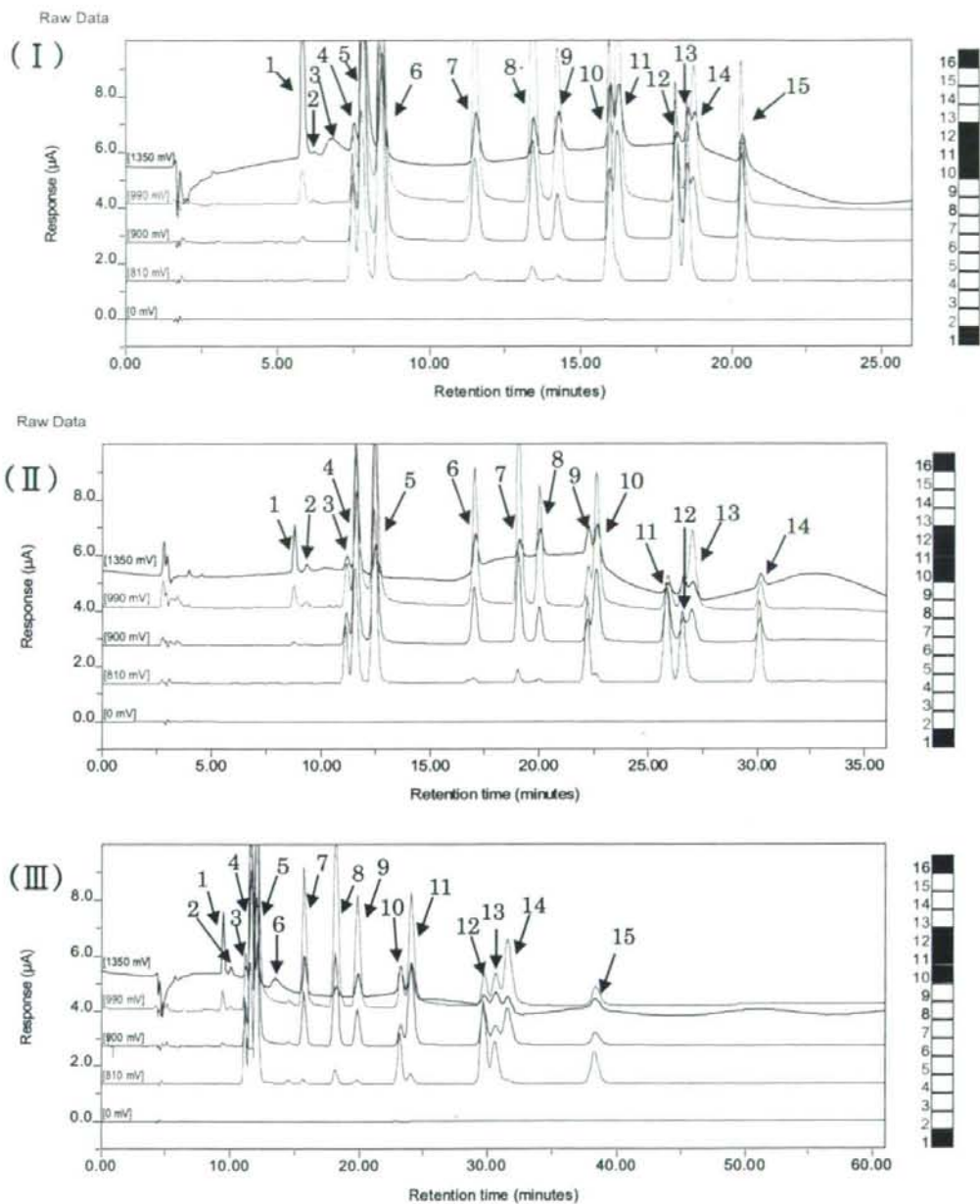


Fig.4 Chromatograms of phenethylamines by HPLC-CAD

1: PMMA, 2: *N*-Me-FMP, 3: MMDA-2, 4: BDB, 5: HMDMA, 6: 4FMP, 7: 2C-C, 8: TMA-6, 9: DOC, 10: 2C-T-2, 11: 2C-I, 12: 2C-E, 13: ALEPH-2, 14: DOI, 15: 2C-T-4.

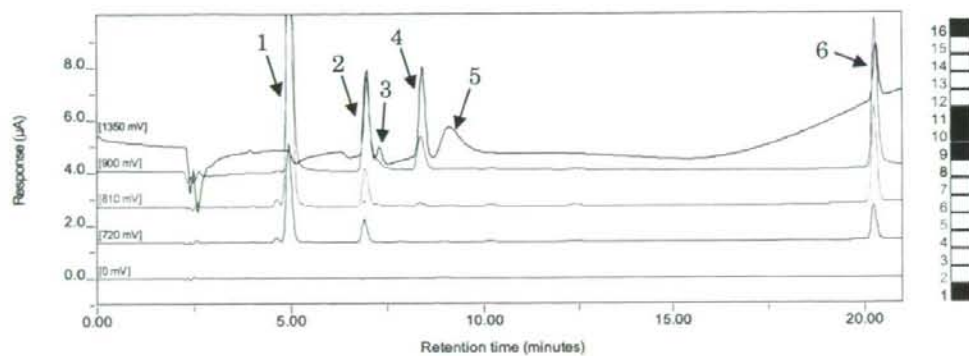
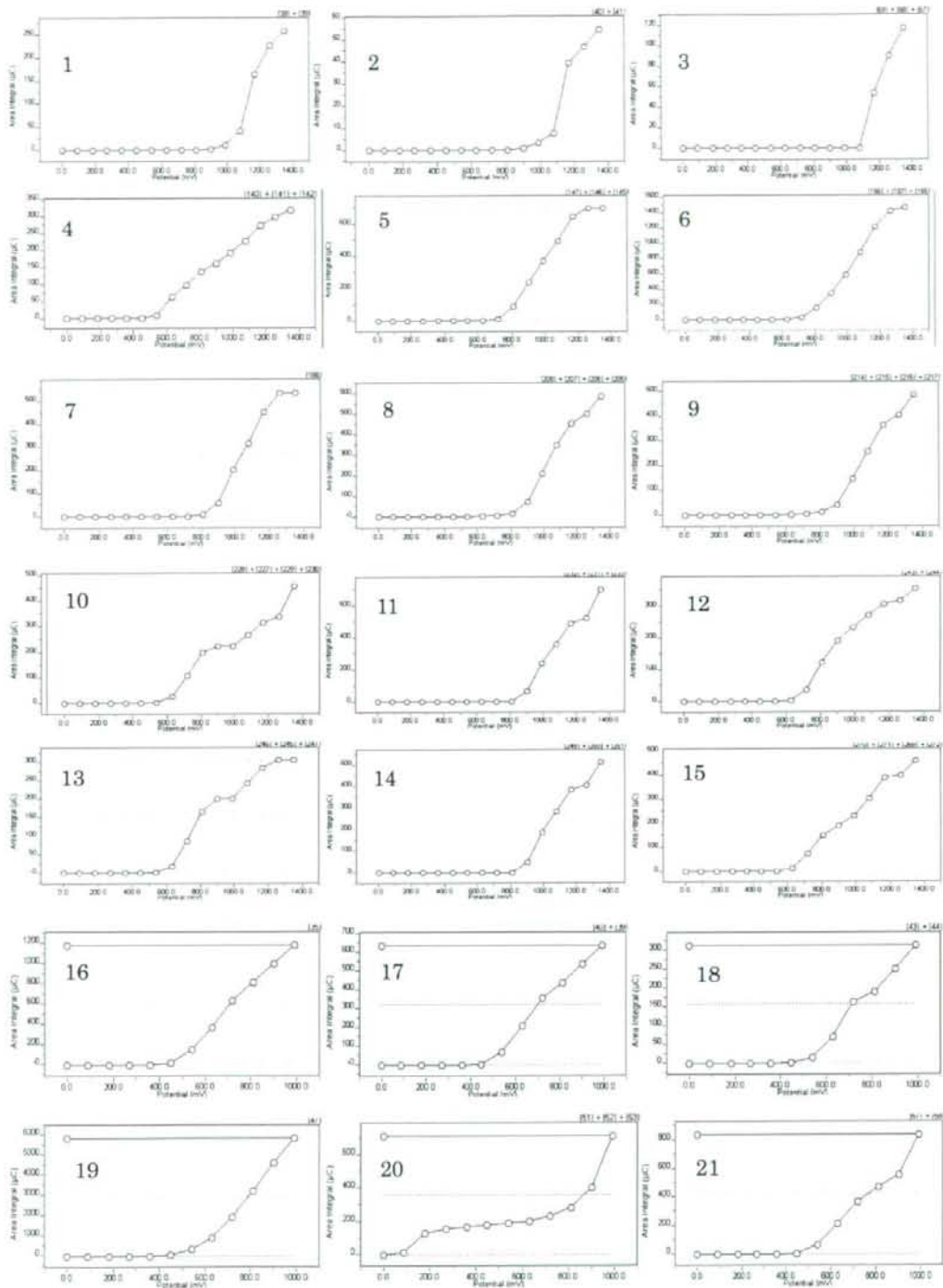


Fig.5. Chromatograms of piperazines and other designated substances by HPLC-CAD
 1: MBZP, 2: 4-MPP, 3: *N*-ethylcathinone, 4: bk-MBDB, 5: Indan-2-amine, 6: MDPV.



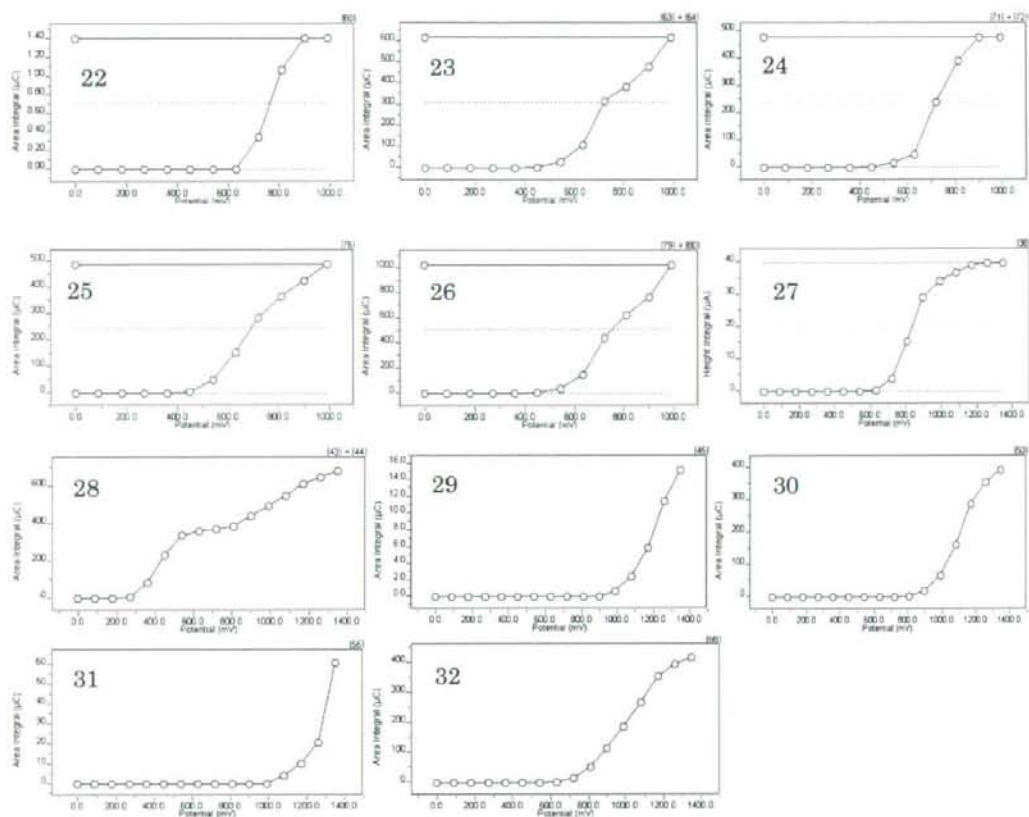


Fig.6. Hydrodynamic voltammogram of designated substances obtained from HPLC-CAD
 1: PMMA, 2: *N*-Me-FMP, 3: MMDA-2, 4: BDB, 5: HMDMA, 6: 4FMP, 7: 2C-C, 8: TMA-6, 9: DOC,
 10: 2C-T-2, 11: 2C-I, 12: 2C-E, 13: ALEPH-2, 14: DOI, 15: 2C-T-4, 16: 5-MeO-DMT, 17: 5-MeO-AMT,
 18: MIPT, 19: 5-MeO-MIPT, 20: 4-OH-DIPT, 21: 5-MeO-EIPT, 22: 5-MeO-DALT, 23: DIPT, 24:
 4-AcO-DIPT, 25: 5-MeO-DPT, 26: DPT, 27: MBZP, 28: 4-MPP, 29: *N*-ethylcathinone, 30: bk-MBDB,
 31: Indan-2-amine, 32: MDPV.

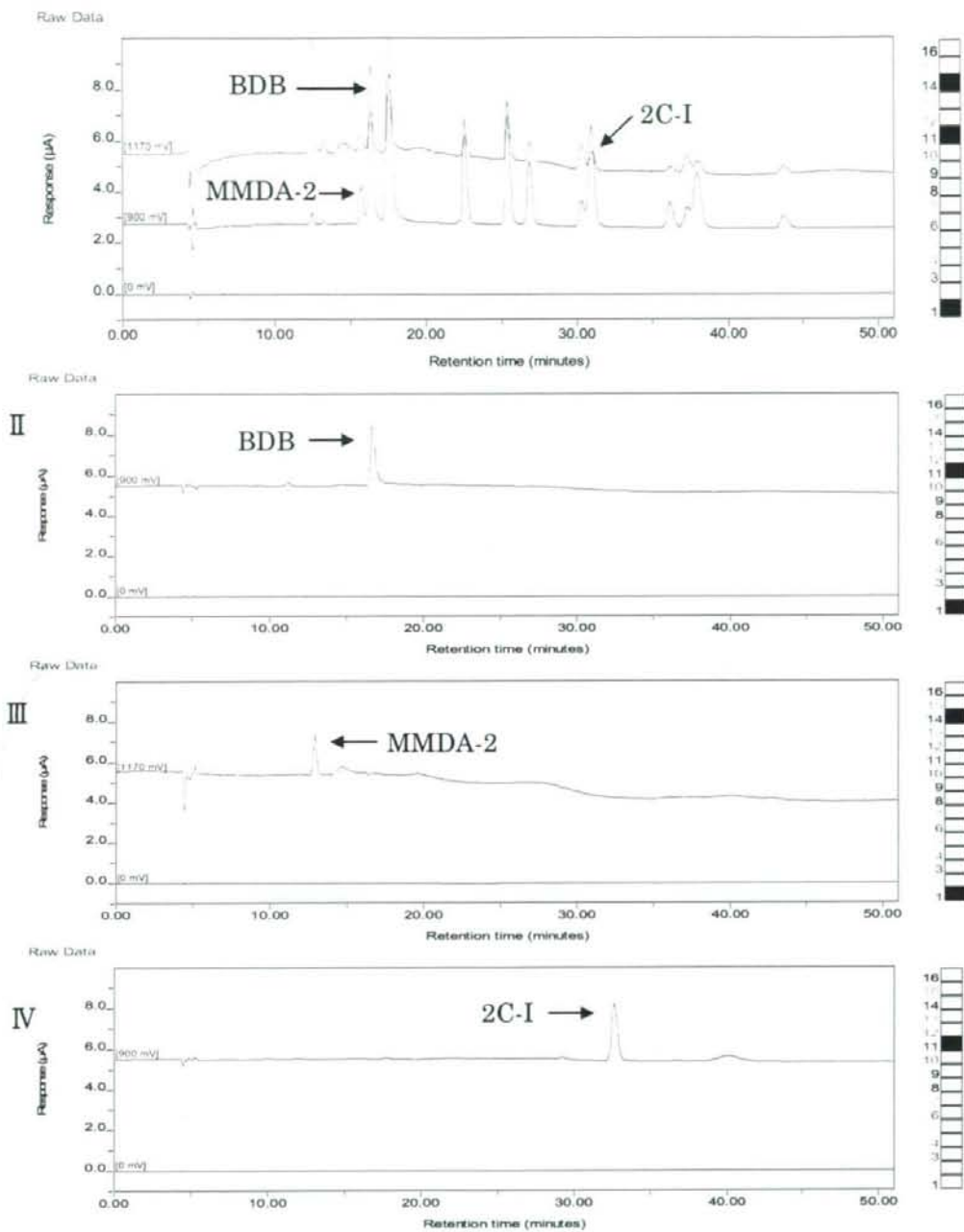


Fig.7 Chromatograms obtained from real samples by HPLC-CAD
 I, standard; II, BDB; III, JETS; IV, Honey Flash 2.

分担研究課題：違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究
研究分担者：栗原 正明 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長

－違法ドラッグ成分の活性評価法の開発－

研究要旨：違法ドラッグにおいてはその有害性、蓋然性を評価する手法が確立されていない。本研究では、コンピュータを用いた化学計算によるインシリコ評価法を開発する。本年度は、既知の化合物との構造の類似性に基づいたファーマコフアフィンガープリント法及び2D-QSAR法による評価法の検討を行った。

A. 研究目的

違法ドラッグが大きな社会問題となっている。違法ドラッグを迅速に規制するために、薬事法が改正され「指定薬物」が決められるようになった。そこで、指定薬物を決定するための科学的評価の基盤作りが必要となる。本研究では、それら違法ドラッグ類縁薬物のコンピュータを用いた化学計算によるインシリコ評価法を開発することを目的とする。本年度は、5-MeO-EIPT について検討した。（図1）

B. 研究方法

5-MeO-EIPT の生物活性値の予測には以下の2つの方法で行った。いずれも化学計算パッケージ MOE を使った。

(1) ファーマコフアフィンガープリント法

3点のファーマコフアフィンのグラフ距離で分子の類似性を評価する。AMT を1としたときのそれぞれの分子の類似性を数値で表す。

(2) 2D-QSAR (定量的活性相関) 法
QSAR モデル式で用いられた記述子は、MOE 上で動作する AutoQuaSAR プログラムによって、MOE に搭載されている 184 の全ての

2D 記述子から選択したものである。ラット脳 synaptosome における 5-HT の monoamine re-uptake に対する構造類似化合物の実測活性値 (IC₅₀ 値) について AutoQuaSAR を使って妥当な QSAR モデル式を構築し、5-MeO-EIPT の活性値を予測した。

Table 1: モデル構築に使用した構造類似化合物の実測活性値 (ラット脳 synaptosome におけるセロトニンの monoamine re-uptake に対する IC₅₀ 値)

	IC ₅₀ , μM
AMT	0.38
5-MeO-AMT	2.9
5-MeO-DMT	4.1
5-MeO-MIPT	6.4
5-MeO-DIPT	2.2

C. 研究結果

ファーマコフアフィンガープリント法、2D-QSAR 法によって求めたそれぞれの分子の類似性の結果をグラフにまとめた。（図2, 3）

D. 考察

既知である類似化合物の活性データの有無がデータの信頼性に大きく係わって来ることが最大の問題点である。

E. 結論

類似化合物の活性（既知）と比較するために、ファーマコフォアフィンガープリント法及び2D-QSAR（定量的活性相関）法の2方法で評価した。どちらの方法でも5-MeO-EIPTは類似の活性があることが予測された。

F. 研究発表等

1. 論文発表

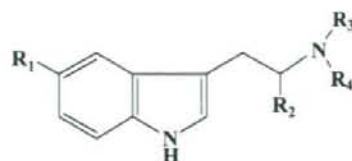
参考文献

- 1) Hakamata, W., Sato, Y., Okuda, H., Honzawa, S., NSaito, N., Kishimoto, S., A. Yamamoto, A., Sugiura, T., Kittaka, A., Kurihara, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 120-123(2008)
- 2) Honzawa, S., Yamamoto, Y., Yamashita, A., Sugiura, T., Kurihara, M., M. A. Arai, M. A., Kato, S., Kittaka, A., *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 3002-3024 (2008)
- 3) Kakuda, S., Okada, K., Eguchi, H., Takenouchi, K., Hakamata, W., Kurihara, M., M. Takimoto-Kamimura M., *Acta Crystallogr. F*, **64**, 970-973(2008)
- 4) Hasegawa, T., Takahashi, K., Saijo, M., Ishii, T., Nagata, T., Kurihara, M., Haishima, Y., Goda, Y., Kawahara, N. *Chem. Pharm. Bull.*, 185-189(2009)
- 5) Nagano, M., Tanaka, M., Doi, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Suemune, H., *Org. Lett.*, (2009) in press.

2. 学会発表

- 1) 栗原正明, 佐藤由紀子, 奥田晴宏, 花尻瑠理, 合田幸広 「コンピューターシュミレーションによる違法薬物の活性予測」 日本薬学会第128年会(2008)

G 知的財産権の出願・登録状況
特になし。



Compounds	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
AMT	H	CH ₃	H	H
5-MeO-AMT	OCH ₃	CH ₃	H	H
5-MeO-DMT	OCH ₃	H	CH ₃	CH ₃
5-MeO-MIPT	OCH ₃	H	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
5-MeO-EIPT	OCH ₃	H	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂
5-MeO-DIPT	OCH ₃	H	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂

図1. 5-MeO-EIPT 及びモデル構築に使用した構造類似化合物の構造

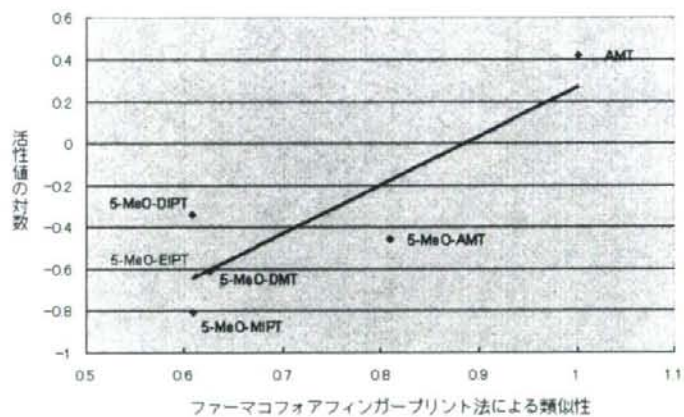


図2

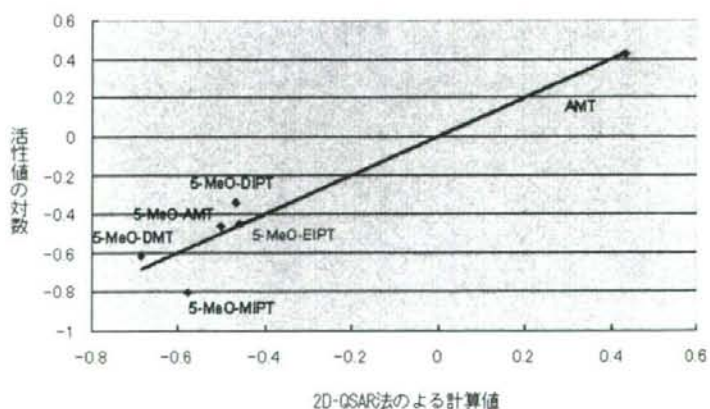


図3

分担研究課題：違法ドラッグ成分の脳波による作用評価

研究分担者：裏出 良博（財）大阪バイオサイエンス研究所分子行動生物学部門
研究部長

一フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用
および血漿中薬物濃度に関する研究一

研究協力者：内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員

研究要旨：我々は、違法ドラッグ成分の中樞神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚作用を検出する方法として、動物実験用脳波解析システムを導入し、動物の脳波の変化から薬物の薬理学的効果を判定する方法を検討している。今回、興奮系違法ドラッグとして、2種類のフッ素置換アンフェタミン誘導体 4-Fluoroamphetamine (4-FMP), *N*-Methyl-4-fluoroamphetamine (*N*-Me-4-FMP) を用いた。平成19年度、平成20年度にそれぞれ指定薬物となった両化合物をラットに腹腔内投与し、脳波、覚醒-睡眠時間、自発運動量の変化について検討を行った。その結果、両化合物ともにラットの脳波に有意な変化を与え、また覚醒量および自発運動量についても投与量依存的に有意に増加させることが明らかとなった。さらに、両薬物投与後のラット血漿中薬物濃度変化についても検討を行ったところ、血漿中薬物濃度は投与量に依存して増加し、また、その薬物濃度の経時変化は、覚醒量および自発運動量の経時変化と相関がみられた。また、4-FMP, *N*-Me-4-FMP および覚醒剤である *d*-amphetamine (*d*-AP), *d*-methamphetamine (*d*-MP) 1 mg/kg 投与6時間後において、*d*-AP, *d*-MP は血漿中から消失していたが、4-FMP および *N*-Me-4-FMP の代謝物である 4-FMP は血漿中に存在していた。従って、これらフッ素置換アンフェタミン誘導体は覚醒剤と比べて長時間血中に存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

乱用が懸念される違法ドラッグを迅速に規制するためには、その有害性を的確に把握し評価することが重要である。しかし、現状では違法ドラッグに関する科学的知見は少なく、また作用についても不明な点が多い。そこで本研究では、違法ドラッグ成分の中樞神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚作用を検出する方法として、動物実験用脳波解析システムを導入し、動物の脳波の変化から薬物の薬理学的効果を判定する

方法を検討することとした。

まず、麻薬、覚醒剤、指定薬物等の法的規制薬物から、興奮系・幻覚系・鎮静系作用を有する代表的な薬物を選定し、動物に投与し、各薬物による脳波に違いがあるのかを調べ、その脳波から、単一薬物で興奮、鎮静、幻覚等の判断が可能であるかを検討する。次に代表的な薬物投与により判断が可能であるならば、違法ドラッグについても脳波測定を行い、被験動物の脳波変化を代表的な薬物投与の結果と比較する。

これにより、興奮若しくは抑制又は幻覚作用を持つ各薬物の分類が可能であるか、また、各薬物間の脳波変化の相違についても検討することとした。

本研究では、代表的な興奮薬として覚醒剤である *d*-amphetamine (*d*-AP)、*d*-methamphetamine (*d*-MP) を選定し、また、興奮作用を持つと考えられる違法ドラッグとして、2種類のフッ素置換アンフェタミン誘導体 4-Fluoroamphetamine (4-FMP)、*N*-Methyl-4-fluoroamphetamine (*N*-Me-4-FMP) を用いた (Fig. 1)。4-FMP、*N*-Me-4-FMP は、それぞれ平成19年度、平成20年度に規制された指定薬物である。これら4薬物を用いて、ラットの脳波、覚醒-睡眠時間、自発運動量の変化について検討を行った。さらに、4薬物投与後のラット血漿中薬物濃度変化についても検討を行った。

B. 研究方法

1. ラットの脳波、筋電位、自発運動量の測定

【使用動物】Sprague-Dawley ラット (オス、生後10週、体重270-330g) を日本エスエルシー株式会社より購入した。

【飼育方法】ラットは防音チャンパー内に設置したアクリル製ゲージで個別に管理した。12時間ごとの明暗周期 (午前8時より明期開始) 下で、ラット用固定型飼料を与え、飼料と水を自由に摂取させた。

【脳波・筋電位測定用電極の処理手術と測定装置への接続】ラットに脳波・筋電位測定用の電極の処理手術を実施し^{1,2)}、回復用チャンパーに10日間おいて回復させた。その後、記録用チャンパーに移して電極に測定用ケーブルを接続し、4日間順応させた。

【薬物投与】各薬物を生理食塩水に溶解させ、SD ラットに腹腔内投与 (intraperitoneal administration: i.p.) した。投与は10:00 (明期開始時刻8:00 から2時間後) に行い、1日目は溶媒

単独のコントロールとして、生理食塩水のみを投与し、2日目に薬物を投与した ($n = 3-4$)。 *d*-AP・H₂SO₄ および *d*-MP・HCl は各1 mg/kg ずつ、*dl* 体である 4-FMP・HCl および *N*-Me-4-FMP・HCl は各1, 2.5, 5 mg/kg ずつ投与した。

【脳波・筋電位の記録と解析】脳波および筋電位は増幅 (脳波: 0.5-35 Hz, 筋電位: 16-128 Hz) 後、サンプリング速度: 128 Hz でデジタル化して記録した。解析は脳波記録ソフトウェア 'Sleep Sign' (キッセイコムテック社製) を用いて、10秒間のデータを1エポックとし、脳波と筋電位の周波数成分・波形によって、各エポックを覚醒、レム (Rapid Eye Movement: REM) 睡眠、ノンレム (Non-REM) 睡眠のいずれかに自動判定した。得られた判定結果は最終的に研究者自身が確認し必要に応じて修正を行った。投与後24時間にわたる脳波データを解析し、1時間毎の覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の時間を算出した。また、脳波のパワースペクトルのFFT (Fast Fourier Transform) 解析を行い、各段階における周波数 (0.5 - 34.5 Hz) の強度について、コントロールを100%とした相対強度を算出し、各薬物を比較した。

【自発運動量測定】自発運動量の測定は、脳波・筋電位の測定と同時にを行い、赤外線センサーによりラットの動きをカウントした。投与後24時間にわたるデータを解析し、1時間毎の自発運動量を算出した。

2. ラット血漿中薬物濃度の測定

【薬物投与】各薬物を生理食塩水に溶解させ、SD ラットに腹腔内投与 (i.p.) した。*d*-AP・H₂SO₄ および *d*-MP・HCl は各1 mg/kg ずつ、*dl* 体である 4-FMP・HCl および *N*-Me-4-FMP・HCl は各1, 2.5, 5 mg/kg ずつ単回投与した ($n = 3$)。投与5, 15, 30, 60, 120, 360分後 (1 mg/kg i.p.) または、5, 15, 30, 60, 120, 360, 480分後 (2.5, 5 mg/kg i.p.) にラット眼窩静脈叢よりヘパリン

処理済みガラス細管を用いてヘパリン入りプラスチックチューブに採血した後、直ちに3分間10,000 rpmで遠心分離し、上清を血漿試料とした。得られた血漿試料は分析まで-20°Cで保存した。

【抽出方法】血漿試料(100 μ l)に、内部標準溶液(MP-d₄, 10 ng/ml 0.1% ギ酸アセトニトリル) 1 mlを加えて抽出し、4°C、12,000 rpmで4分間遠心分離後、得られた上清を窒素気流下で抽出溶液を乾固した。さらに、LC-MSの初期移動相(100 μ l)を加えて、膜ろ過(Ultrafree-MC, 0.45 μ m filter unit, MILLIPORE社製)し、分析試料とした。

【LC-MS分析】装置:[UPLC] Waters ACQUITY UPLC/ [MS] Waters Single Quadrupole Detector(SQD), カラム:Atlantis HSST3 (2.1 mm i.d. x 100 mm, 1.8 μ m, Waters), ガードカラム:Van Guard column (2.1 mm i.d. x 5 mm, 1.8 μ m, Waters), 移動相A:0.1% ギ酸 水溶液, 移動相B:0.1% ギ酸 アセトニトリル/メタノール(1:1), グラジエント条件:A/B 85/15 (0 min) -80/20 (8 min) -30/70 (10 min, 3 min hold), 測定波長:190-500 nm, 流速:0.3 mL/min, カラム温度:40°C, 注入量:1 μ L, 検出:フォトダイオードアレイ検出器(PDA)および質量検出器

質量分析条件

イオン化:エレクトロスプレーイオン化(ESI)法

Desolvation gas flow : N₂ 650 l/h, Desolvation gas temp. : 350°C, Capillary voltage : 3000 V

○Positive and negative scan mode : Cone voltage : 30 V, scan range : *m/z* 50-500

○Single Ion Recording (SIR) mode : monitoring ion および cone voltage は Table 1 に示した条件で行った。

【分析バリデーション】検量線は、ラットコントロール血漿試料100 μ lに、薬物濃度が、0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ng/ml となるように、それ

ぞれの薬物の標準メタノール溶液を加えて、前述の方法で分析操作を行い、内部標準物質(MP-d₄)に対する薬物のピーク面積比から作成した。真度および精度(相対標準偏差)は、ラットコントロール血漿試料100 μ lに、標準溶液を5, 50, 500 ng/mlの3濃度になるように添加し、分析操作を各濃度5回ずつ繰り返し測定した結果から評価した。

(倫理面の配慮)

動物実験は、大阪バイオサイエンス研究所および国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験に関する指針」を厳守し、動物福祉の観点に基づいて、適切な実験計画、実験手技のもとで実施した。

C. 研究結果および考察

【覚醒・睡眠時間に及ぼす作用】各薬物の投与による覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠量の経時変化をそれぞれ、Fig. 2a-2c, 2d-2f, 2g-2i に示した。4-FMP および *N*-Me-4-FMP (1, 2.5, 5 mg/kg) をラットに投与したところ、覚醒量は濃度依存的に増加した (Fig. 2a, 2b)。1 mg/kg 投与した場合、4-FMP, *N*-Me-4-FMP, *d*-AP, *d*-MP 全てにおいて、投与2時間後まで覚醒量が増加した (Fig. 2a-2c)。4-FMP を2.5, 5 mg/kg 投与した場合、それぞれ投与4時間後、7時間後まで有意に覚醒量が増加した (Fig. 2a)。また、*N*-Me-4-FMP を2.5, 5 mg/kg 投与した場合、それぞれ投与5時間後、7時間後まで有意に覚醒量が増加した (Fig. 2b)。一方、ノンレム睡眠量は、覚醒量の増加に伴い、4-FMP および *N*-Me-4-FMP 共に、濃度依存的に減少した (Fig. 2d, 2e)。1 mg/kg 投与した場合、4-FMP, *N*-Me-4-FMP, *d*-AP, *d*-MP 全てにおいて、投与2時間後までノンレム睡眠量が減少した (Fig. 2d-2f)。4-FMP を2.5, 5 mg/kg 投与した場合、それぞれ投与4時間後、7時間後まで有意にノンレム睡眠量が減少した (Fig. 2d)。また、*N*-Me-4-FMP を2.5, 5 mg/kg

投与した場合、それぞれ投与5時間後、7時間後まで有意にノンレム睡眠量が減少した (Fig. 2e)。また、レム睡眠量に関しても、4-FMP および *N*-Me-4-FMP 投与後、共に濃度依存的に減少した (Fig. 2g, 2h)。以上の結果から、4-FMP および *N*-Me-4-FMP は *d*-AP および *d*-MP と同様に、ラットの覚醒量を有意に増加させることが示され、また、その覚醒量は濃度依存的に増加することが明らかとなった。

【自発運動量に及ぼす作用】各薬物の投与による自発運動量の経時変化を、Fig. 3d-3f に示した。また、比較のため、覚醒量の経時変化を Fig. 3a-3c に示した。4-FMP および *N*-Me-4-FMP (1, 2.5, 5 mg/kg) をラットに投与したところ、自発運動量は濃度依存的に増加した (Fig. 3d, 3e)。1 mg/kg 投与した場合、4-FMP, *N*-Me-4-FMP, *d*-AP, *d*-MP 全てにおいて、投与2時間後まで自発運動量が増加した (Fig. 3d-3f)。4-FMP を 2.5, 5 mg/kg 投与した場合、それぞれ投与4時間後、7時間後まで有意に自発運動量が増加した (Fig. 3d)。また、*N*-Me-4-FMP を 2.5, 5 mg/kg 投与した場合、それぞれ投与5時間後、6時間後まで有意に自発運動量が増加した (Fig. 3e)。また、自発運動量の経時変化と覚醒量の経時変化は良く類似していた (Fig. 3a-3f)。

以上の結果から、これらフッ素置換アンフェタミン誘導体 (4-FMP および *N*-Me-4-FMP) は、覚醒剤 (*d*-AP および *d*-MP) と同様に、ラットの覚醒量および自発運動量を有意に増加させることが示されたことから、4-FMP および *N*-Me-4-FMP は興奮作用を示す化合物である可能性が示された。

【各周波数における脳波のパワースペクトル変化】

次に、各薬物投与による、覚醒時 (Fig. 4a-4h)、ノンレム睡眠時 (Fig. 5a-5h)、レム睡眠時 (Fig. 6a-6h) における周波数の強度を、コントロールを 100% とした相対強度を算出し、比較した。

覚醒時における周波数強度率のパターンは、4薬物に類似の傾向がみられた。即ち、周波数 7.0 ~ 8.5 Hz 付近に強度率の増加がみられ、逆に、11.0 ~ 19.0 Hz 付近では強度の減少がみられた (Fig. 4a-4h)。*d*-AP および *d*-MP は投与1時間後に最も強い強度率変化がみられたが (Fig. 4g-4h)、4-FMP および *N*-Me-4-FMP を 2.5, 5 mg/kg 投与した場合、投与2時間後に最も強い強度変化がみられた (Fig. 4b, 4c, 4e, 4f)。なお、4-FMP および *N*-Me-4-FMP を 1 mg/kg 投与した場合は、周波数強度に有意な変化はみられなかった (Fig. 4a, 4d)。以上の結果から、覚醒時において、いずれの薬物も特定の周波数強度率に有意な変化を与えることが示された。周波数 7.0 ~ 8.5 Hz 付近は、一般的にレム睡眠時に明らかな増加がみられる帯域であるが、覚醒時にこの帯域の増加が認められたことは興味深い。また、その変化が認められる時間は、各薬物投与時の覚醒量が有意に増加した時間とほぼ同等であった (data not shown)。

次に、ノンレム睡眠時における周波数強度率の経時変化を比較した (Fig. 5a-5h)。4-FMP および *N*-Me-4-FMP (1, 2.5, 5 mg/kg) を投与した場合、周波数 1.0-3.0 Hz 付近に強度率の増加がみられ、周波数 6.5 Hz 以降の高周波数帯域での強度率の減少がみられた (Fig. 5a-5f)。*d*-AP および *d*-MP を投与した場合、僅かに周波数 1.0-3.0 Hz 付近に強度率の増加がみられた (Fig. 5g, 5h)。以上の結果から、ノンレム睡眠時において、4-FMP および *N*-Me-4-FMP は特定の周波数強度率に有意な変化を与えることが示された。

さらに、レム睡眠時における周波数強度率の経時変化を比較した (Fig. 6a-6h)。4-FMP および *N*-Me-4-FMP (2.5, 5 mg/kg) を投与した場合、周波数 5.0-7.0 Hz 付近に強度率の増加がみられ、周波数 8.0 Hz 以降の帯域での強度率の減少がみられた (Fig. 6b, 6c, 6e, 6f)。なお、各薬物を 1 mg/kg 投与した場合は、周波数強度に有意な変

化はみられなかった (Fig. 6a, 6d, 6g, 6h). 以上の結果から, レム睡眠時において, 4-FMP および *N*-Me-4-FMP は特定の周波数強度率に変化を与えることが示された.

従って, 4-FMP および *N*-Me-4-FMP はラットの脳波に有意な変化を与えることが明らかとなり, その変化は, 覚醒剤である *d*-AP, *d*-MP と一部類似の挙動を示した.

【分析バリデーション】ラットコントロール血漿に標準薬物溶液を添加し, 本分析による直線性の範囲, 精度, 真度を検討したところ, *d*-AP は, 1-500 ng/ml の濃度範囲で, *d*-MP, 4-FMP および *N*-Me-4-FMP は 5-500 ng/ml の濃度範囲で直線性 ($R^2 > 0.996$) が得られた. また, LC-MS SIR クロマトグラム上では生体試料中の常在成分による妨害は認められず, 良好なピークが得られた. また, その範囲内では, 精度, 真度ともに 20% 以下であった (Table 2).

【ラット血漿中薬物濃度】各薬物をラットに腹腔内投与し, 投与後 360 分間 (1 mg/kg i.p.) または, 480 分間 (2.5, 5 mg/kg i.p.) にわたり採血し, 得られた血漿試料中の薬物濃度を LC-MS により測定した. Fig. 7a-7d に薬物投与 30 分後のラット血漿抽出物の LC-MS-SIR クロマトグラムを示し, Fig. 3g-3j にラット血漿中の薬物濃度変化を示した.

4-FMP (1, 2.5, 5 mg/kg) 投与ラットでは, 全ての濃度において投与 30 分後に最高血中濃度に達し, その血中濃度はそれぞれ, 166, 325, 672 ng/ml, 生物学的半減期 ($t_{1/2}$) はそれぞれ 205 分, 210 分, 380 分程度であった (Fig. 3g). *N*-Me-4-FMP (1, 2.5, 5 mg/kg) 投与ラットでは, 全ての濃度において投与 15 分後に最高血中濃度に達し, その血中濃度はそれぞれ, 54, 127, 325 ng/ml, $t_{1/2}$ はそれぞれ 60 分, 90 分, 65 分程度であった (Fig. 3h). また, 全ての濃度 (1, 2.5, 5 mg/kg) において, *N*-脱メチル代謝物である 4-FMP も同時に検出され (Fig. 7b), この化合物

は全ての濃度において投与 120 分後に最高血中濃度に達し, その血中濃度はそれぞれ, 84, 196, 376 ng/ml, $t_{1/2}$ はそれぞれ >360 分, 360 分, 370 分程度であった (Fig. 3h). 一方, *d*-AP (1 mg/kg) 投与ラットでは, 投与 15 分後に最高血中濃度に達し, その血中濃度は 106 ng/ml, $t_{1/2}$ は 100 分程度であった (Fig. 3i). *d*-MP (1 mg/kg) 投与ラットでは, 投与 30 分後に最高血中濃度に達し, その血中濃度は 154 ng/ml, $t_{1/2}$ は 110 分程度であった (Fig. 3i). また, *N*-脱メチル代謝物である *d*-AP も同時に検出され (Fig. 7d), 投与 60 分後に最高血中濃度に達し, その血中濃度は 11 ng/ml であり, $t_{1/2}$ は >120 分であった (Fig. 3i). 以上の結果から, 4-FMP, *N*-Me-4-FMP とともに, 投与量に依存して血漿中薬物濃度も増加することが示された. また, *N*-Me-4-FMP 投与では *N*-脱メチル代謝物である 4-FMP が同時に検出され, 代謝物の血漿中薬物濃度も投与量に依存して増加することが示された.

また, 4-FMP, *N*-Me-4-FMP, *d*-AP, *d*-MP を 1 mg/kg 投与後の血中濃度変化を比較したところ, 投与 6 時間後では, *d*-AP, *d*-MP は血漿中から消失していたが, 4-FMP, および *N*-Me-4-FMP の代謝物である 4-FMP は血漿中に存在しており, その濃度はそれぞれ, 43, 53 ng/ml であった (Fig. 3j). また, 1 mg/kg 投与後の 4-FMP の $t_{1/2}$ (205 分程度) は, *d*-AP の $t_{1/2}$ (100 分程度) の約 2 倍長いことがわかった. 一方, *N*-Me-4-FMP の $t_{1/2}$ (60 分程度) は, *d*-MP の $t_{1/2}$ (110 分程度) よりも短いことが明らかとなった (Fig. 3j). 従って, *N*-Me-4-FMP の代謝 (*N*-脱メチル化など) は, *d*-MP に比べて速く進行する可能性があるが, 4-FMP の代謝は, *d*-AP に比べて遅い可能性が示された. この原因として以下の可能性が考えられる. 覚醒剤である MP 投与後のラットおよびヒトで検出される代謝産物は, 未変化体の MP 以外に, AP (*N*-脱メチル体), 4-OH-MP (*p* 位水酸化体) および 4-OH-AP (*p* 位水酸化体)

などが報告されている³⁾。しかし、4-FMP および *N*-Me-4-FMP の *p* 位はフッ素で置換されていることから、*p* 位の水酸化への代謝が進みにくいため、これらフッ素置換アンフェタミン誘導体(4-FMP および *N*-Me-4-FMP)は覚醒剤(*d*-AP, *d*-MP)と比べて長時間血中に存在している可能性が考えられる。

さらに、4-FMP および *N*-Me-4-FMP 投与後の覚醒量、自発運動量、血中濃度は、いずれも投与量に依存して増加し、また、血中濃度の減少と共に、覚醒量、自発運動量も減少する傾向がみられた (Fig. 3a-3j)。従って、血中薬物濃度の経時変化は、覚醒量および自発運動量の経時変化と相関があると考えられた。

D. 結論

本研究により、フッ素置換アンフェタミン誘導体 4-FMP, *N*-Me-4-FMP は、ラットの覚醒量および自発運動量を投与量依存的に有意に増加させることが明らかとなった。また、ラットの脳波にも有意な変化を与え、その変化は覚醒時において、代表的興奮薬である *d*-AP, *d*-MP と類似の挙動を示した。さらに、4-FMP, *N*-Me-4-FMP 投与後のラット血漿中薬物濃度は投与量に依存して増加し、また、その薬物濃度の経時変化は、覚醒量および自発運動量の経時変化と相関がみられた。また、4-FMP, *N*-Me-4-FMP は、覚醒剤 (*d*-AP, *d*-MP) と比べて、長時間血中に存在することが明らかとなった。以上の結果から、4-FMP, *N*-Me-4-FMP は *d*-AP, *d*-MP と類似の挙動を示す興奮性の化合物

であることが明らかとなった。なお、これまでに薬理学的作用の報告がなかった *N*-Me-4-FMP を指定薬物として規制するにあたり、本研究の結果が参考された。

今後、興奮薬にとどまらず、鎮静薬、幻覚薬等に関しても脳波測定を実施し、薬物の中枢作用評価法を確立すべく検討を行う予定である。

E. 参考文献

- 1) Huang Z.L. *et al.*, *J. Neurosci.*, **23**, 5975-5983 (2003).
- 2) Okada T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 29-34 (2003)
- 3) Hutchaleclaha A., Mayersohn M., *J. Pharm. Sci.*, **85**, 541-545 (1996).

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

- 1) N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri, Y. Goda, M. Wada and Y. Urade. Effects of new fluoro-substituted amphetamine analogs on electroencephalogram (EEG) power spectra in rats. XXVI CIMP CONGRESS (13-17 July 2008 in Munich, Germany).

H. 知的財産権の出願・登録状況

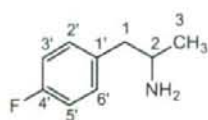
特になし。

Table 1 LC-MS 分析における SIR のモニタリングイオン, cone 電圧および保持時間 (retention time)

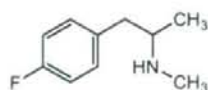
Compounds	SIR/MS	cone (V)	r.t. (min)
4-FMP	154.09	20	5.22
<i>N</i> -Me-4-FMP	168.14	20	5.93
<i>d</i> -AP	136.11	25	4.24
<i>d</i> -MP	150.14	25	4.87
MP- <i>d</i> ₄	154.10	30	4.82

Table 2 ラットコントロール血漿中薬物分析における直線性, 精度および真度

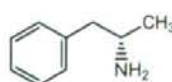
Compounds	Linear range (ng/ml)	Linearity	Precision (%)		Accuracy (%)	
			ng/ml	%	ng/ml	%
4-FMP	5-500	$y = 0.0109x + 0.0089$ $R^2 = 0.9961$	5	10.11	5	-3.78
			50	-9.91	50	7.24
			500	-11.85	500	2.76
<i>N</i> -Me-4-FMP	5-500	$y = 0.0206x + 0.0491$ $R^2 = 0.9993$	5	7.93	5	-4.90
			50	-1.84	50	3.18
			500	4.37	500	1.41
<i>d</i> -AP	1-500	$y = 0.0177x + 0.0023$ $R^2 = 0.9962$	5	4.58	5	-11.13
			50	-5.44	50	5.61
			500	-11.48	500	2.75
<i>d</i> -MP	5-500	$y = 0.0129x + 0.0259$ $R^2 = 0.9999$	5	7.53	5	5.74
			50	-0.09	50	7.97
			500	4.65	500	2.92



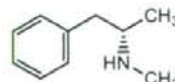
4-FMP
(指定薬物)



N-Me-4-FMP
(指定薬物)



d-amphetamine
(覚醒剤)



d-methamphetamine
(覚醒剤)

Fig. 1. Structures of chemical drugs.

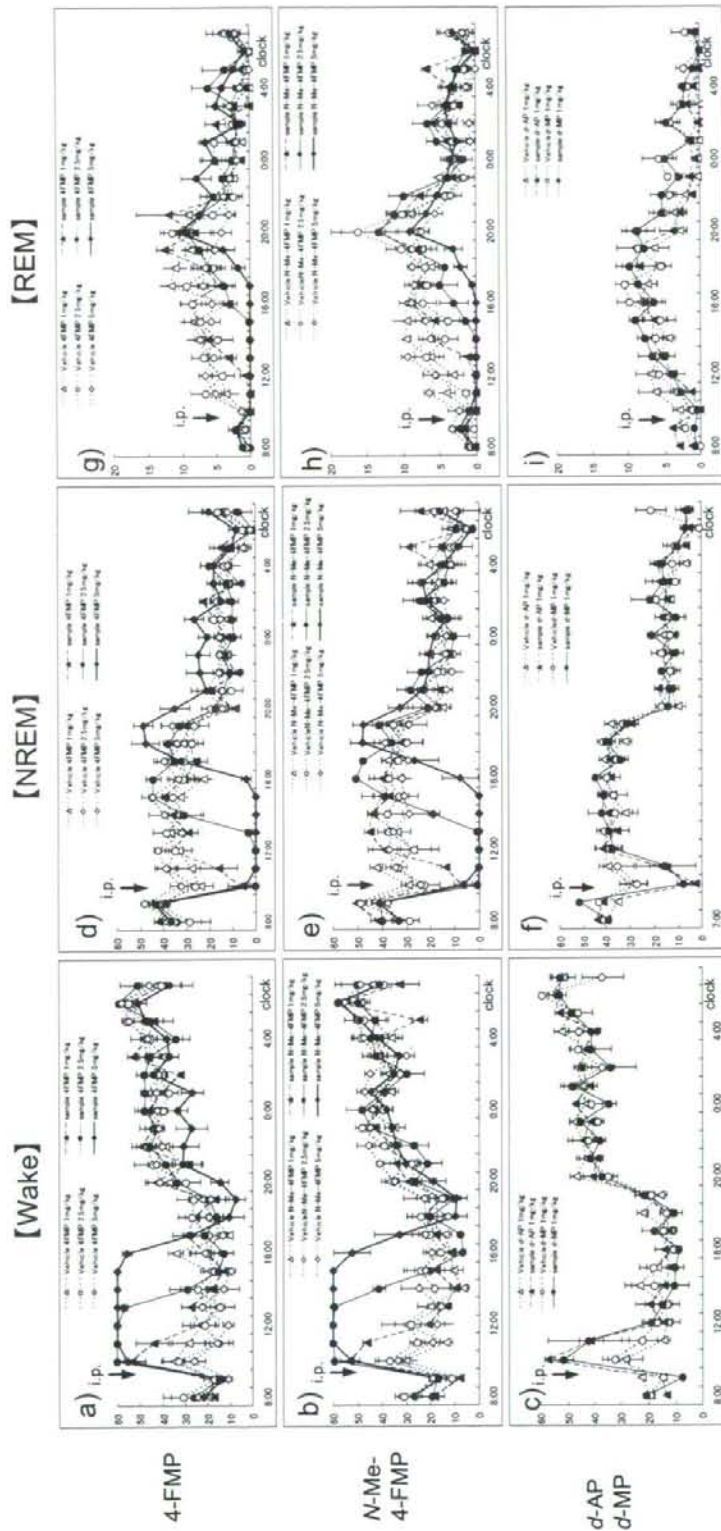


Fig. 2 薬物投与後のラットの覚醒量, ノンレム睡眠量, レム睡眠量の経時変化

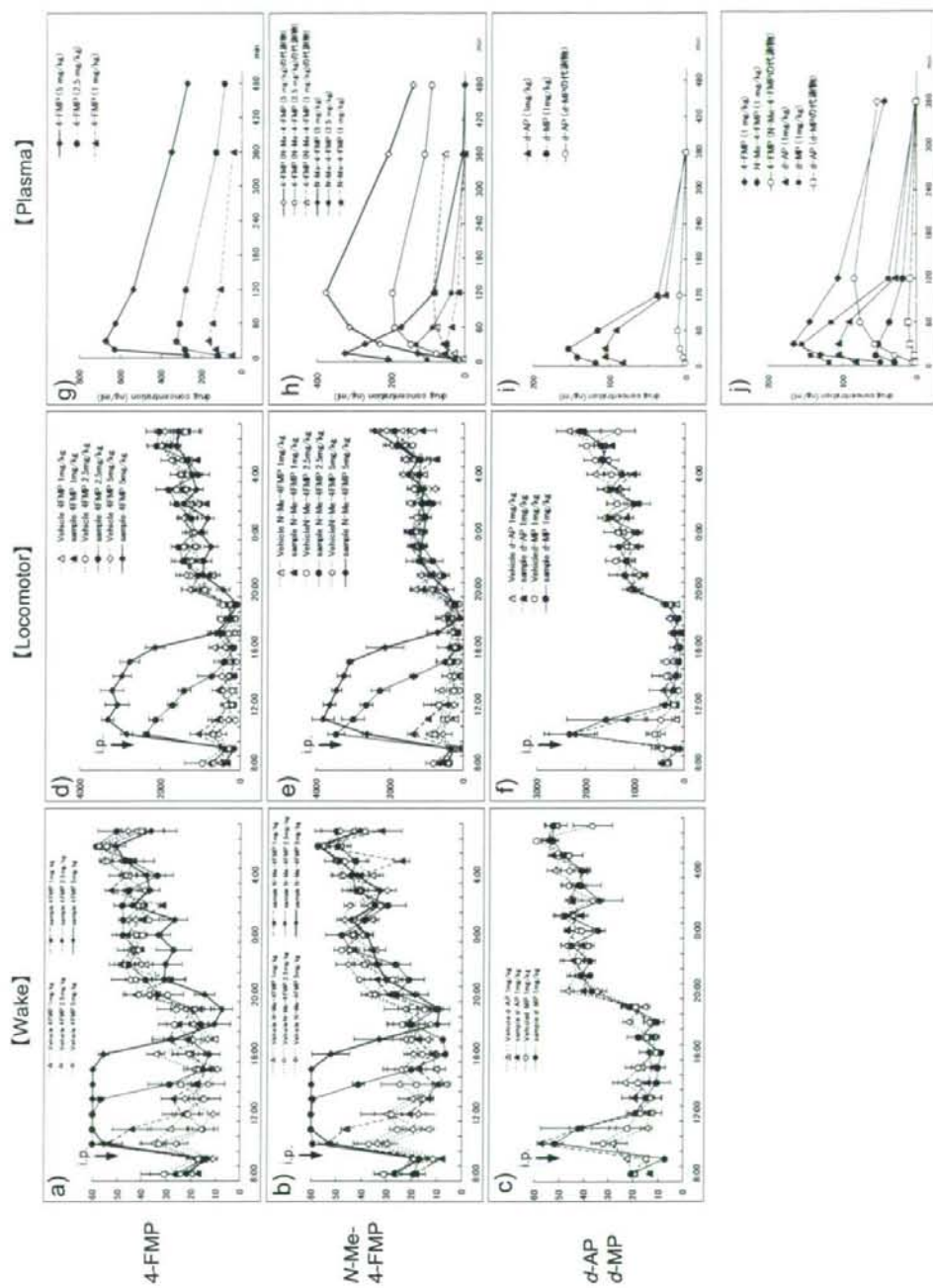


Fig. 3 薬物投与後のラットの覚醒量、自発運動量の経時変化および血漿中の薬物濃度変化