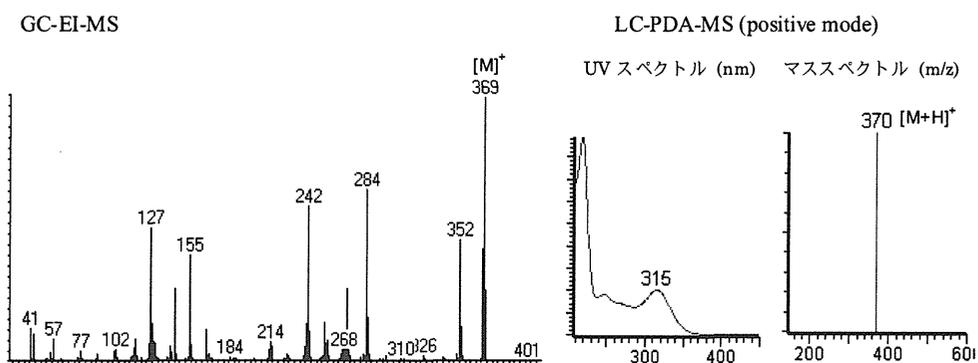
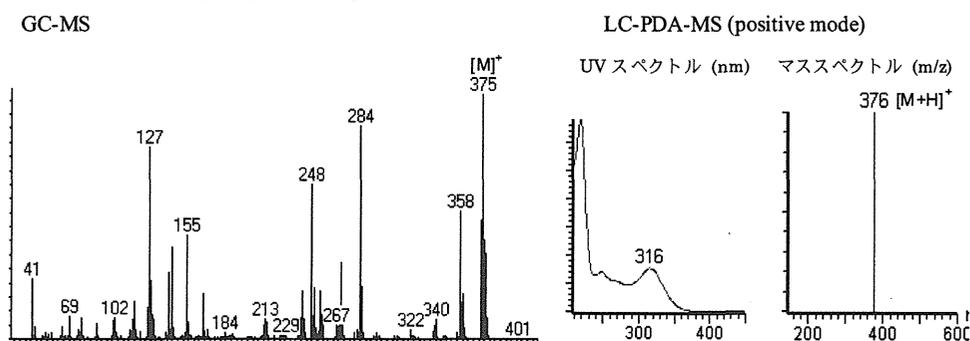


別紙1 国立衛研所有包括指定化合物(国立衛研所有26化合物, 個別規制化合物を除く)のGC-MS及びLC-PDA-MS分析におけるスペクトルデータ(化合物番号はTable 2に対応)

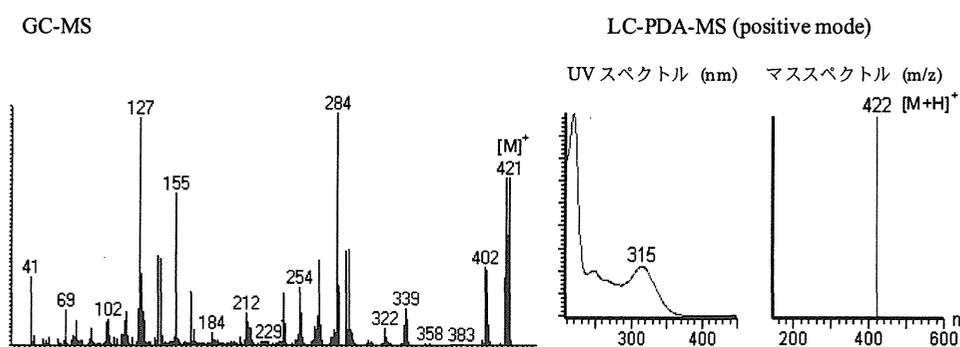
(1) JWH-020



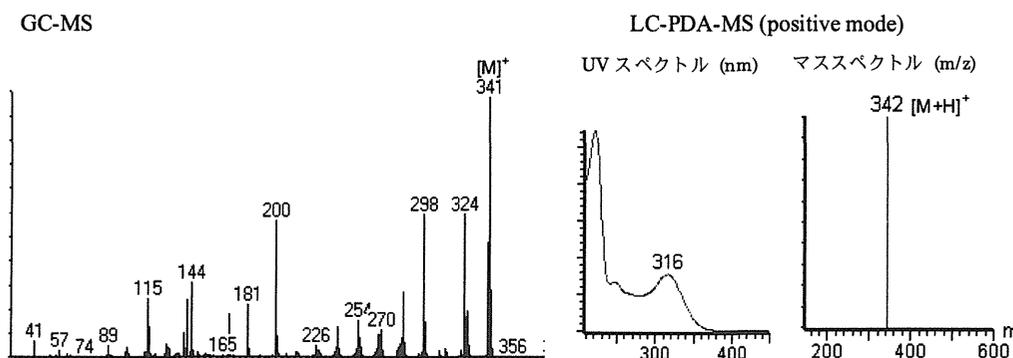
(2) JWH-018 N-(5-chloropentyl) analog



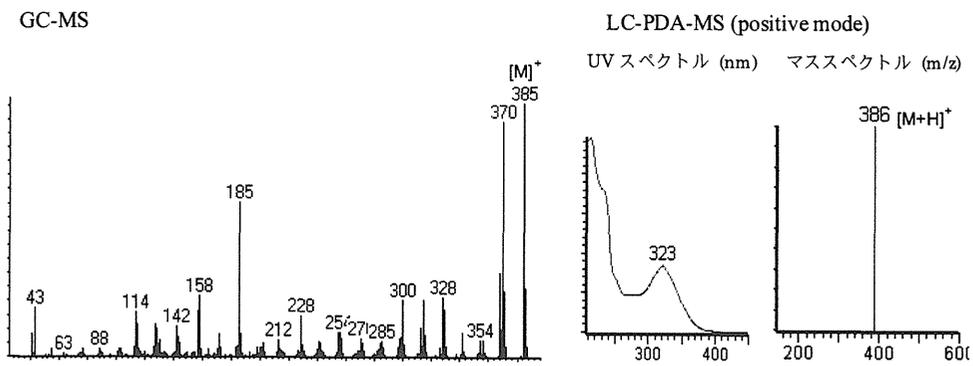
(3) JWH-018 N-(5-bromopentyl) analog



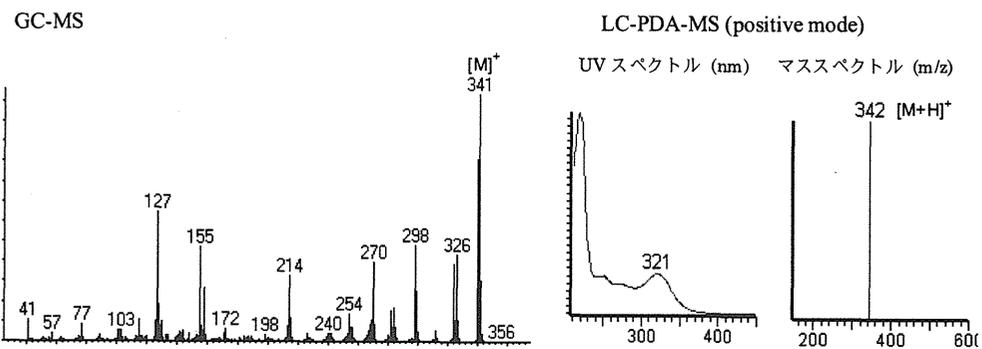
(4) JWH-073 4-methylnaphtyl analog



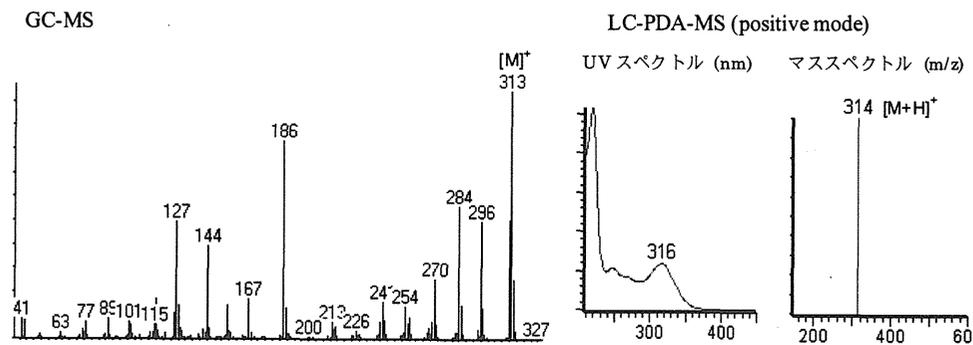
(5) JWH-098



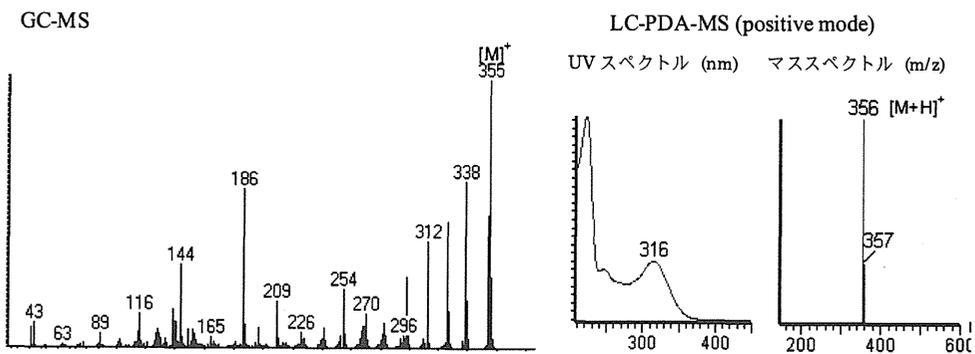
(6) JWH-016



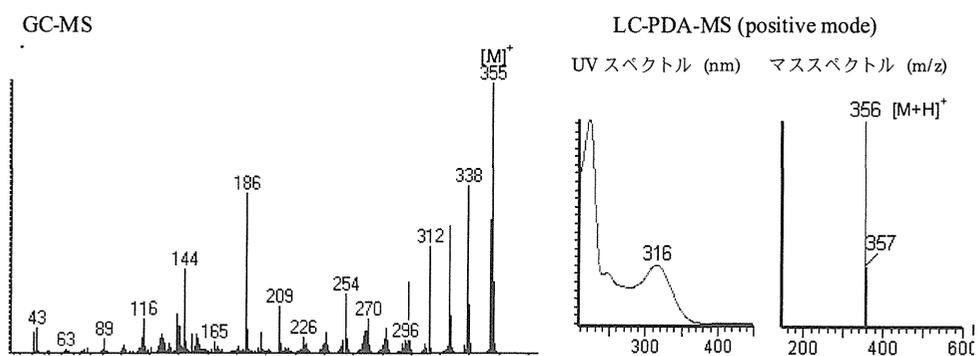
(7) JWH-072



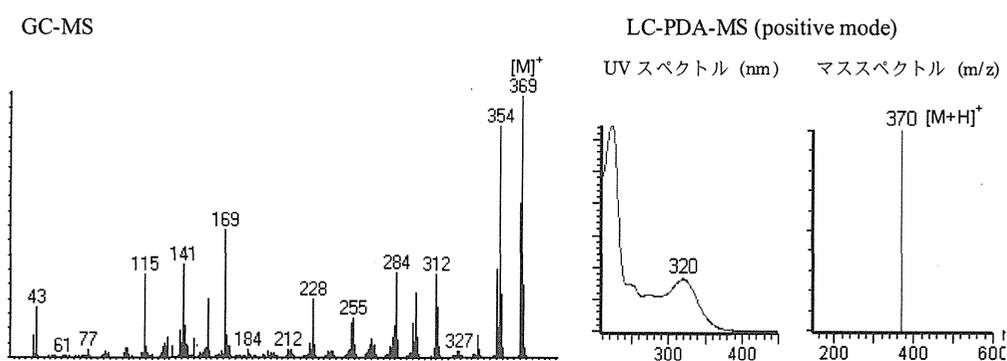
(8) JWH-180



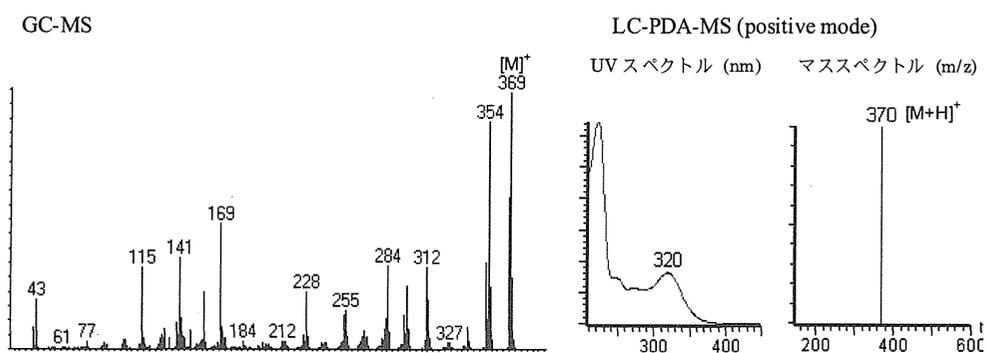
(9) EAM-2201 (流通確認)



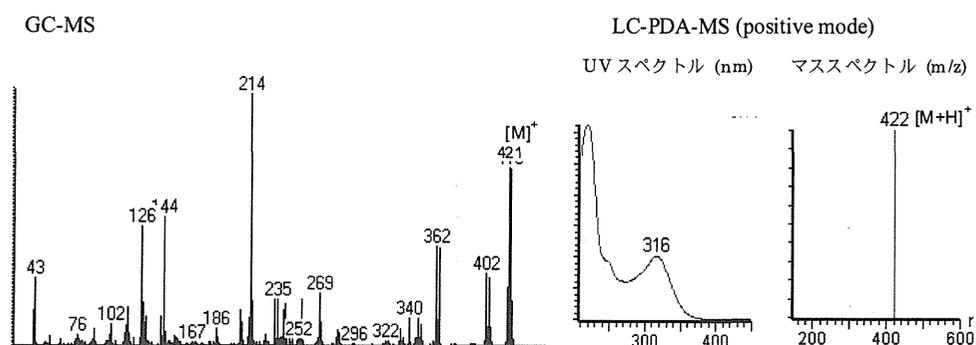
(10) JWH-149



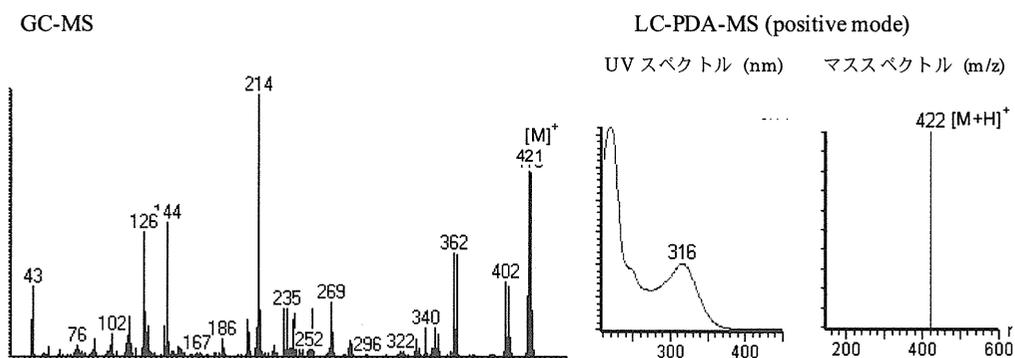
(11) JWH-412



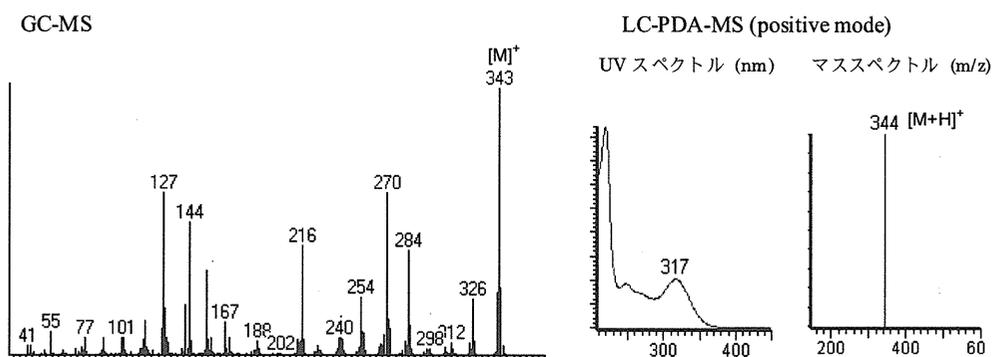
(12) JWH-387



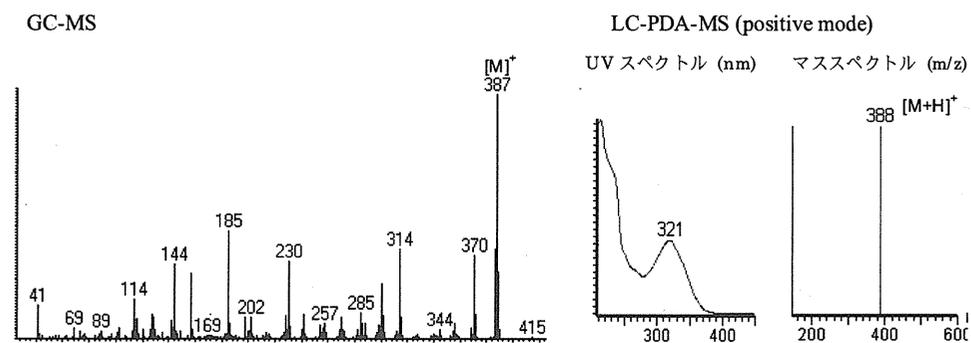
(13) JWH-018 N-(5-hydroxypentyl) analog (流通確認)



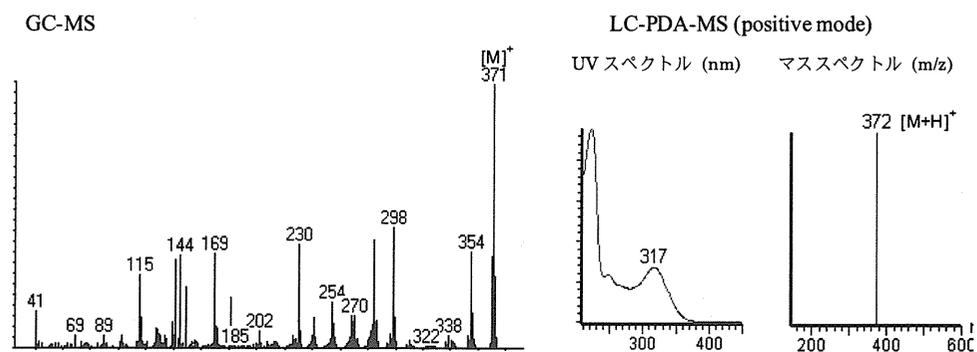
(14) JWH-073 N-(4-hydroxybutyl) analog



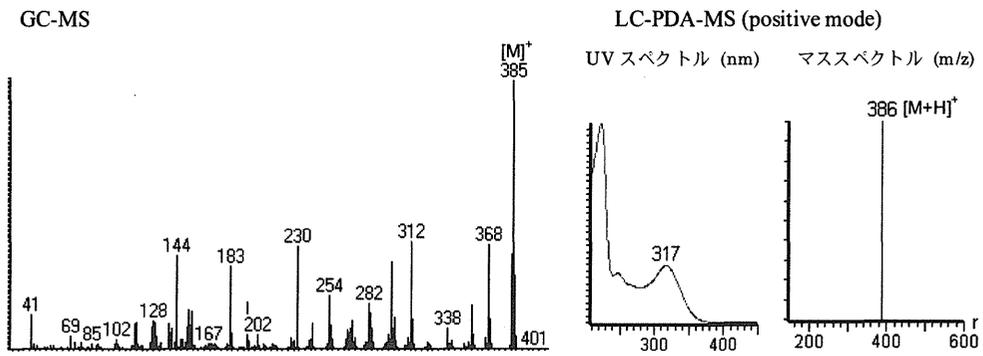
(15) JWH-081 N-(5-hydroxypentyl) analog



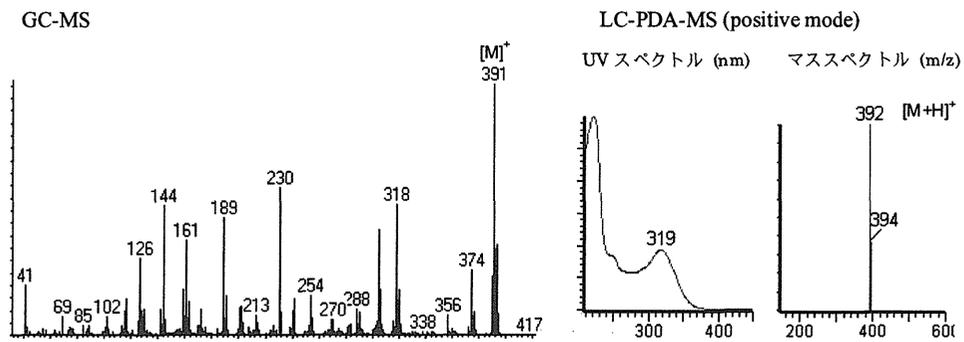
(16) JWH-122 N-(5-hydroxypentyl) analog (流通確認)



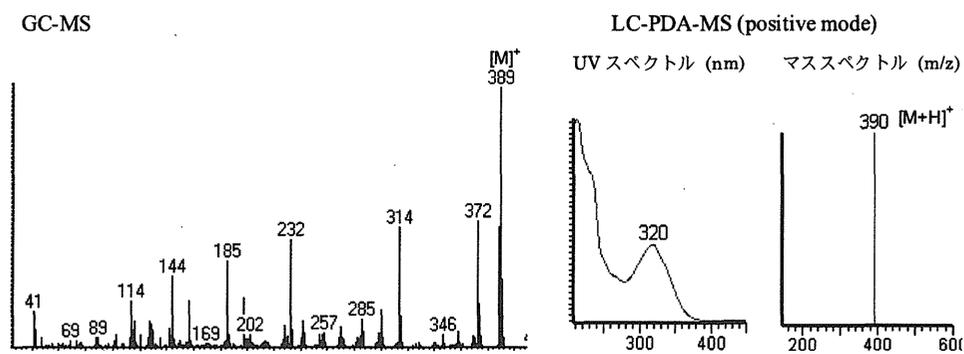
(17) JWH-210 N-(5-hydroxypentyl) analog



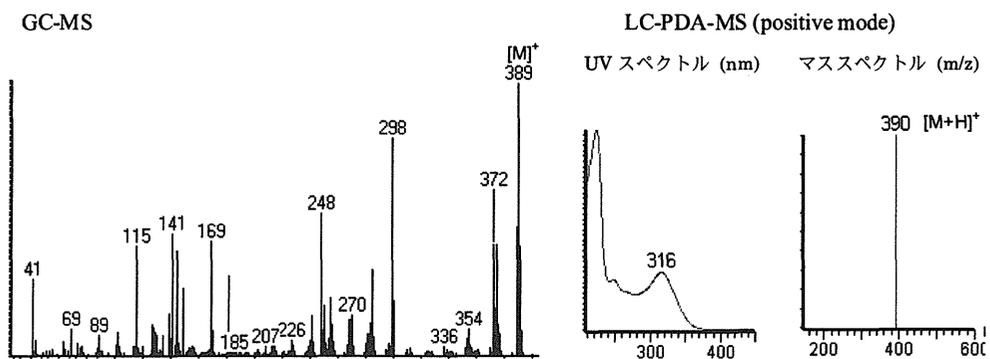
(18) JWH-398 N-(5-hydroxypentyl) analog



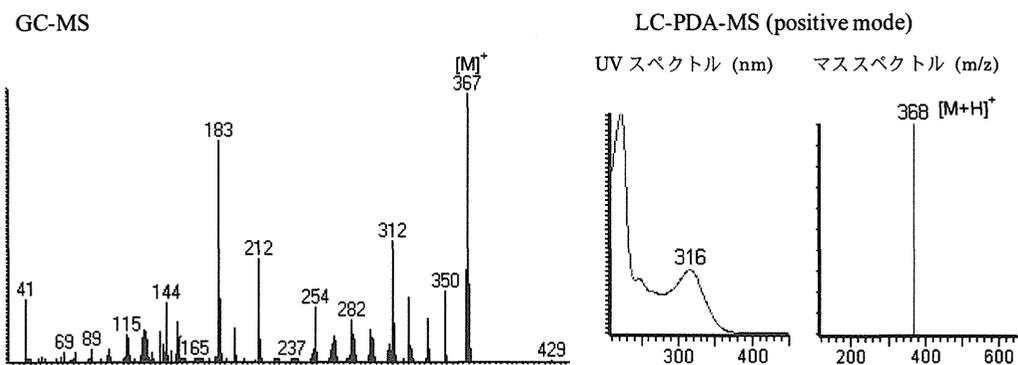
(19) 4-Methoxy-AM-2201 (流通確認)



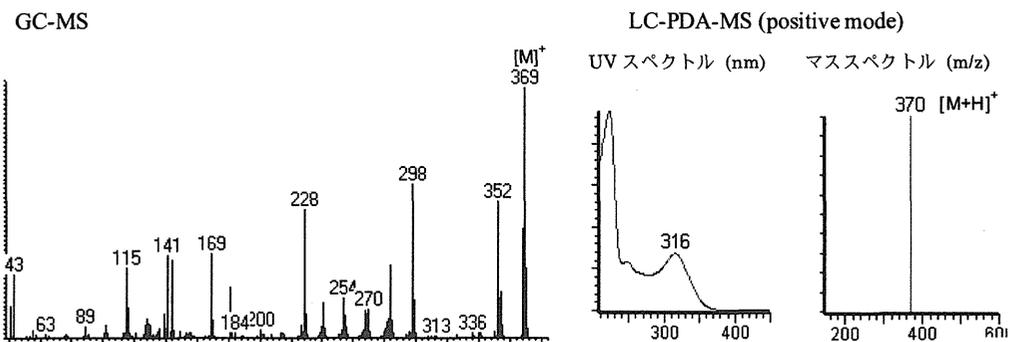
(20) JWH-122 N-(5-chloropentyl) analog (流通確認)



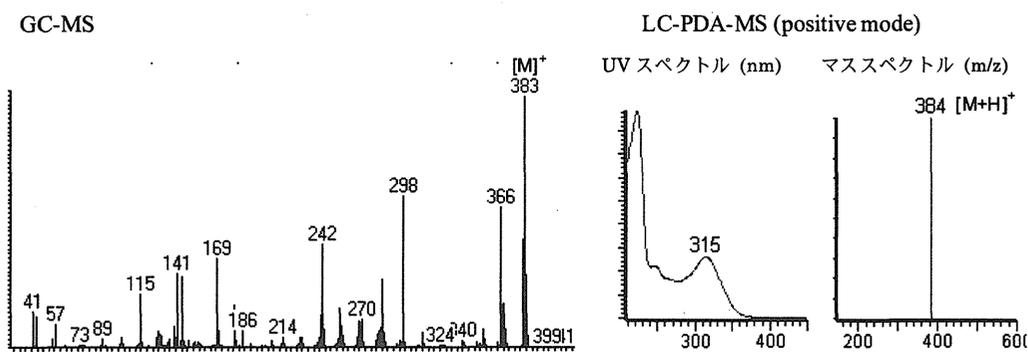
(21) JWH-210 N-(4-pentenyl) analog (流通確認)



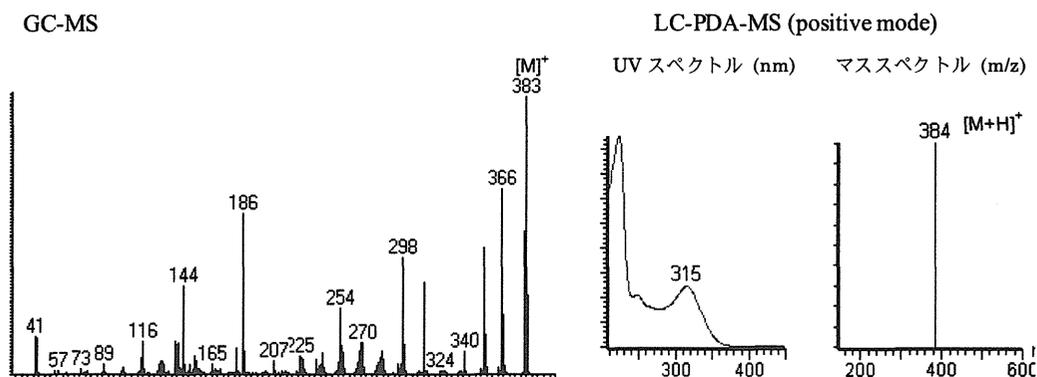
(22) JWH-019 4-methylnaphthyl analog



(23) JWH-020 4-methylnaphthyl analog

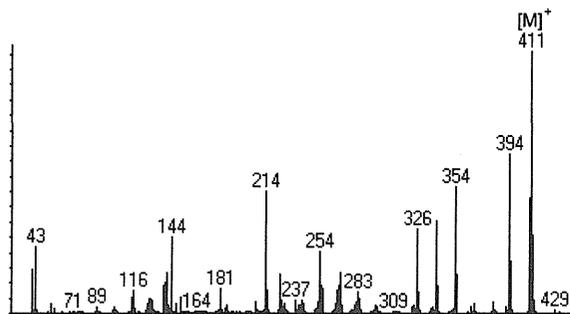


(24) JWH-072 4-pentyl-naphthyl analog



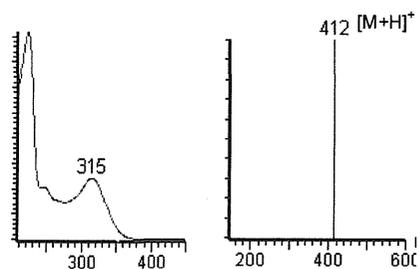
(25) JWH-018 4-pentyl-naphthyl analog

GC-MS



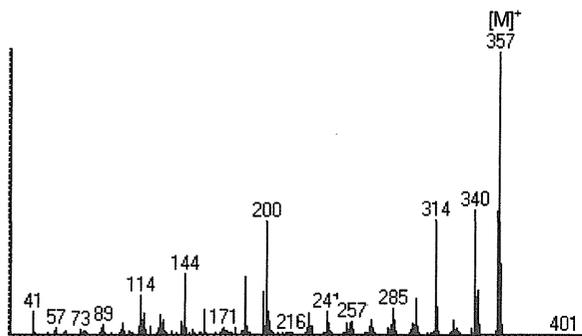
LC-PDA-MS (positive mode)

UV スペクトル (nm)    マススペクトル (m/z)



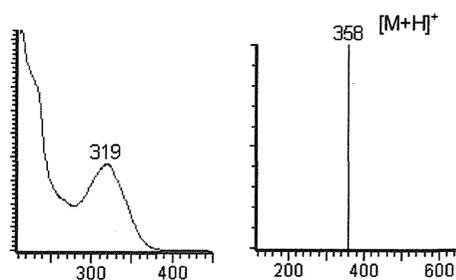
(26) JWH-080

GC-MS



LC-PDA-MS (positive mode)

UV スペクトル (nm)    マススペクトル (m/z)



別紙2 国立衛研所有包括指定化合物（個別規制化合物を除く）の GC-MS 及び LC-MS 分析における保持時間

Compounds	GC-MS 条件1		GC-MS 条件2		LC-PDA-MS	
	Retention time (min)	Relative retention time 5-MeO-DMT = 1	Retention time (min)	Relative retention time 5-MeO-DMT = 1	Retention time (min)	Relative retention time 吉草酸ヘタメタゾン=1
JWH-020	52.84	1.88	21.39	4.30	23.1	2.63
JWH-018 N-(5-chloropentyl) analog	54.21	1.93	22.80	4.59	15.5	1.76
JWH-018 N-(5-bromopentyl) analog	55.69	1.98	24.20	4.87	16.4	1.86
JWH-073 4-methylnaphthyl analog	51.44	1.83	19.60	3.94	17.7	2.01
JWH-098	54.28	1.93	22.89	4.61	20.1	2.28
JWH-016	50.76	1.81	18.59	3.74	16.5	1.88
JWH-072	49.69	1.77	16.89	3.40	12.6	1.43
JWH-180	52.06	1.85	20.45	4.11	19.5	2.22
EAM-2201	53.95	1.92	22.58	4.54	17.1	1.94
JWH-149	52.77	1.88	21.29	4.28	21.2	2.41
JWH-412	50.75	1.81	18.63	3.75	19.6	2.23
JWH-387	53.91	1.92	22.51	4.53	22.6	2.57
JWH-018 N-(5-hydroxypentyl) analog	54.16	1.93	22.78	4.58	7.3	0.83
JWH-073 N-(4-hydroxybutyl) analog	53.15	1.89	21.76	4.38	6.0	0.68
JWH-081 N-(5-hydroxypentyl) analog	58.25	2.07	26.60	5.35	8.3	0.94
JWH-122 N-(5-hydroxypentyl) analog	55.89	1.99	24.44	4.92	9.0	1.02
JWH-210 N-(5-hydroxypentyl) analog	56.87	2.02	25.33	5.10	11.1	1.26
JWH-398 N-(5-hydroxypentyl) analog	56.74	2.02	25.19	5.07	11.1	1.26
4-Methoxy-AM-2201	54.89	1.95	23.51	4.73	14.1	1.60
JWH-122 N-(5-chloropentyl) analog	55.93	1.99	24.44	4.92	17.5	1.99
JWH-210 N-(4-pentenyl) analog	52.77	1.88	21.34	4.29	19.8	2.25
JWH-019 4-methylnaphthyl analog	53.15	1.89	21.77	4.38	22.6	2.57
JWH-020 4-methylnaphthyl analog	54.29	1.93	22.91	4.61	24.9	2.83
JWH-072 4-pentyl naphthyl analog	54.14	1.93	22.78	4.58	24.3	2.76
JWH-018 4-pentyl naphthyl analog	56.31	2.00	24.82	4.99	28.0	3.18
JWH-080	52.72	1.88	21.3	4.29	16.6	1.89
5-MeO-DMT	28.10	1	4.97	1	-	-
吉草酸ヘタメタゾン	-	-	-	-	8.8	1

分担研究課題:違法ドラッグ製品の分析法の開発,成分分析,分析標準品の調製

分担研究者:花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

—新規流通違法ドラッグの *in vitro* 活性評価について—

研究要旨:近年,違法ドラッグ市場(海外を含む)に登場した活性未報告の化合物を中心に,モノアミン再取り込み阻害作用(11化合物及び既麻薬指定化合物 *ethcathinone*)もしくはカンナビノイド受容体への結合能(9化合物,平成23年度報告書済み化合物を加え15化合物)を測定し,中枢神経系へ影響を及ぼす蓋然性について検討した.今回モノアミン再取り込み阻害作用を検討した12化合物のうち,3級アミンである4-methoxy-*N,N*-dimethylcathinone以外の化合物において,阻害作用が認められた.特に,欧州で複数の死亡事例を含む健康被害が問題となった5-ITが極めて強い作用を示し,そのdopamine再取り込み阻害作用は,平成24年度に麻薬として規制された*ethcathinone*の約30倍の値を示した.また, $\alpha$ -PBP及び $\alpha$ -PVT等,pyrrolidinyl基を有する化合物において強いdopamine再取り込み阻害作用が認められた.一方,15種類の測定対象合成カンナビノイドすべてにおいて,カンナビノイドCB<sub>1</sub>及びCB<sub>2</sub>受容体結合能が認められた.この中で,平成24年に日本国内で広く流通し,その健康被害が問題となった違法ドラッグのひとつ,MAM-2201において特に強いCB<sub>1</sub>受容体結合能が認められ,急性毒性が報告されている構造類似化合物JWH-122の9.5倍の値を示した.その他,APICA *N*-(5-fluoropentyl) analog等,MAM-2201と同様にインドール構造の*N*-アルキル側鎖末端にハロゲン置換基を有する化合物に,比較的強いCB<sub>1</sub>受容体結合能が認められた.過去に特許や論文等で報告されていない新しい化合物が次々と違法ドラッグ市場に出現しているが,上述の通り,ヒトに対し強い薬理作用を有する恐れがある化合物も多く,今後も継続して新規流通化合物調査を行っていく必要がある.

A. 研究目的

近年,カンナビノイド受容体に強い活性を示す合成カンナビノイド類を乾燥植物細片に混合して販売されるいわゆる「脱法ハーブ」や,「リキッド・アロマ」「バスソルト」等として販売される興奮性アミン類(カチン誘導体等)含有製品による健康被害が急増して深刻な社会問題となっている<sup>1,2)</sup>.その対応策のひとつとして,平成24年度においては違法ドラッグの規制化が積極的に行われ,平成25年4月公布予定化合物を加えると,指定薬物61化合物(うち2化合物は同年度内に麻薬として規制)及び麻薬12化合物が新規に規制さ

れた.また合成カンナビノイドのうち,ナフトイルインドール骨格に特定の置換基を有する化合物群759化合物(個別指定化合物を除く)が包括的に指定薬物として規制された.しかし,規制化に伴い,従来流通していた化合物にはない新しいタイプの構造を有する活性未知の違法ドラッグが次々と出現し<sup>3-5)</sup>,分析鑑定現場を混乱させている.本研究では,近年,違法ドラッグ市場(海外を含む)に登場した活性未報告の化合物を中心に,モノアミン再取り込み阻害作用もしくはカンナビノイド受容体への結合能を測定し,中枢神経系へ影響を及ぼす蓋然性について検討した.

## B. 研究方法

### 1. 試験物質

#### 1) カンナビノイド受容体結合性

新規流通合成カンナビノイド9化合物を測定に使用した。平成 23 年度報告書にて測定結果を報告した化合物を含めた 15 化合物の構造を Fig. 1~3 に示した。

#### 2) モノアミン再取り込み阻害作用

新規流通カチノン系化合物を中心とした活性未知の合計 11 化合物と ethcathinone (活性既知, 平成 25 年 3 月 1 日より麻薬として規制) を測定に使用した。各化合物の構造を Fig. 4 に示した。

### 2. 試験方法

#### 2-1. カンナビノイド受容体結合性

##### 1) 試験物質溶液の調製

被験物質を秤量し, DMSO で溶解し, DMSO で段階希釈することにより, 最終濃度の 100 倍濃度の溶液を調製する。更に, 調製した各濃度の溶液を, Milli-Q 水で 10 倍希釈することにより被験物質溶液を調製する (用時調製)。

被験物質 (最終濃度): 8 濃度

##### 2) 陽性物質溶液の調製

陽性物質を秤量し, DMSO で溶解し, DMSO で段階希釈することにより, 最終濃度の 100 倍濃度の溶液を調製する。更に, 調製した各濃度の溶液を, Milli-Q 水で 10 倍希釈することにより陽性物質溶液を調製する (用時調製)。

陽性物質 (最終濃度): 8 濃度

##### 3) 測定系

以下の試験条件に従い測定する。各濃度 2 例で 1 回測定する。

#### 3)-1. Cannabinoid CB<sub>1</sub> (Human)

緩衝液: 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mmol/L EDTA 及び 0.05% BSA を含む 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)

置換物質: (R)-(+)-WIN55212-2 mesylate salt, Sigma, Cat No. W-102

陽性物質: (R)-(+)-WIN55212-2 mesylate salt, Sigma, Cat No. W-102

トレーサー: CP-55,940, [side chain-2,3,4(N)-<sup>3</sup>H]-, PKI, Cat No. NET1051

レセプター: Human recombinant, PKI, Cat No. ES-110-M

反応条件: 30°C, 90 min

#### 3)-2. Cannabinoid CB<sub>2</sub> (Human)

緩衝液: 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mmol/L EDTA 及び 0.05% BSA を含む 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)

置換物質: (R)-(+)-WIN55212-2 mesylate salt, Sigma, Cat No. W-102

陽性物質: (R)-(+)-WIN55212-2 mesylate salt, Sigma, Cat No. W-102

トレーサー: CP-55,940, [side chain-2,3,4(N)-<sup>3</sup>H]-, PKI, Cat No. NET1051

レセプター: Human recombinant, PKI, Cat No. ES-111-M

反応条件: 30°C, 90 min

#### 4) 阻害率の算出

阻害率は、「100 - 結合率」より算出する。

結合率:  $[(B - N) / (B_0 - N)] \times 100 (\%)$

B: 被験物質存在下での結合放射能量 (個別値)

B<sub>0</sub>: 被験物質非存在下での総結合放射能量 (平均値)

N: 非特異的結合放射能量 (平均値)

陽性物質に関しても被験物質と同様に阻害率を算出する。

#### 5) Dose-response curve の作成 (IC<sub>50</sub> 値の算出)

Dose-response curve は, 被験物質存在下での特異的結合放射能 (B - N) と非存在下での総結合放射能 (B<sub>0</sub> - N) との比  $((B - N) / (B_0 - N))$  を logit 変換した後, 被験物質の最終濃度の常用対数値に対してプロットする logit-log モデルにあてはめ作成する。Dose-response curve の回帰は, 次の回帰式を用いる。

$$Y = aX + b$$

$$(Y = \text{logit } y = \ln(y / (1 - y))),$$

$$y = (B - N) / (B_0 - N)$$

( $X = \log x$ ,  $x$  は被験物質の最終濃度)

( $a, b =$  定数)

得られた回帰式より,  $IC_{50}$  値を算出する. また, 回帰の際, 被験物質最終濃度の阻害率平均が 5% ~95%の範囲を超えたものについては採用せず, 範囲内の測定値を用いて  $IC_{50}$  値を算出する. 陽性物質に関しても被験物質と同様に  $IC_{50}$  値を算出する.

## 2-2. モノアミン再取り込み阻害作用

### 1) 測定系

#### I. Dopamine uptake

緩衝液: 118 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L  $CaCl_2$ , 1.2 mmol/L  $MgSO_4$ , 1.2 mmol/L  $KH_2PO_4$ , 25 mmol/L  $NaHCO_3$ , 11.7 mmol/L glucose, 0.57mmol/L アスコルビン酸及び 0.04 mmol/L  $Na_2EDTA$  を含む水溶液

置換物質: GBR12909 dihydrochloride

陽性物質: GBR12909 dihydrochloride

トレーサー: Dihydroxyphenylethylamine  
3,4-[ring-2,5,6- $^3H$ ]-Dopamine

シナプトソーム: ラット線条体

反応条件: 37°C, 10 min

#### II. Norepinephrine uptake

緩衝液: 119 mmol/L NaCl, 3.9mmol/L KCl, 0.51 mmol/L  $CaCl_2$ , 0.65mmol/L  $MgSO_4$ , 15.6 mmol/L  $Na_2HPO_4$ , 3.4 mmol/L  $NaH_2PO_4$ , 10 mmol/L glucose, 0.57mmol/L アスコルビン酸及び 0.0156 mmol/L iproniazid を含む水溶液(pH 7.4)

置換物質: Desipramine hydrochloride

陽性物質: Desipramine hydrochloride

トレーサー: Norepinephrine Hydrochloride,  
DL-[7- $^3H(N)$ ]-

シナプトソーム: ラット視床下部

反応条件: 37°C, 5 min

#### III. Serotonin uptake

緩衝液: 119 mmol/L NaCl, 3.9mmol/L KCl, 0.51 mmol/L  $CaCl_2$ , 0.65mmol/L  $MgSO_4$ , 15.6

mmol/L  $Na_2HPO_4$ , 3.4 mmol/L  $NaH_2PO_4$ , 10 mmol/L glucose, 0.57mmol/L アスコルビン酸及び 0.0156 mmol/L iproniazid を含む水溶液(pH 7.4)

置換物質: Imipramine hydrochloride

陽性物質: Imipramine hydrochloride

トレーサー: Hydroxytryptamine Creatinine Sulfate,  
5-[1,2- $^3H(N)$ ]-

シナプトソーム: ラット橋延髄

反応条件: 37°C, 5 min

### 2) 測定系の最適化

Dopamine uptake, Norepinephrine uptake, Serotonin uptake 測定系について測定法の確認試験を行う. 各濃度 2 例で 1 回測定する.

#### I. 置換物質溶液の調製

置換物質を秤量し, DMSO で溶解することにより, 最終濃度の 100 倍濃度の溶液を調製する. 更に, 調製した各濃度の溶液を, Milli-Q 水で 10 倍希釈することにより置換物質溶液を調製する(用時調製).

置換物質(最終濃度):  $1 \times 10^{-5}$  mol/L

#### II. トレーサー溶液の調製

トレーサーを緩衝液で希釈することにより, トレーサー溶液を調製する(用時調製).

トレーサー(最終濃度): 3 濃度

#### III. シナプトソーム液の調製

シナプトソーム画分を緩衝液で希釈することにより, シナプトソーム液を調製する. (用時調製).

シナプトソーム(最終濃度): 3 濃度

#### IV. 測定法

- 1) 非特異的結合算出用チューブには置換物質溶液を, 総結合算出用チューブには 10% DMSO をそれぞれ 25  $\mu$ L 添加する.
- 2) 緩衝液 75  $\mu$ L を添加する.
- 3) トレーサー溶液 100  $\mu$ L を添加する.
- 4) シナプトソーム液 50  $\mu$ L を添加する.
- 5) インキュベート(反応条件は「2.2 測定系」に記載)する.

- 6) セルハーベスターにより濾過 (GF/C, Whatman) し, 緩衝液で洗浄.
- 7) 濾紙を測定バイアルビンに移し, 液体シンチレーター (PICO-FLUOR™ PLUS) 5 mL を添加し, 液体シンチレーションカウンターで測定 (測定時間 2 min) する.

## V. データ解析

### 特異的結合放射エネルギーの算出

特異的結合放射エネルギーは以下の式により算出する. 2 例の平均値より算出した値を dpm 単位で記載する.

特異的結合放射エネルギー:  $B_0 - N$

$B_0$  : 総結合放射エネルギー (平均値)

$N$  : 非特異的結合放射エネルギー (平均値)

### 3) 測定系の確認

Dopamine uptake, Norepinephrine uptake, Serotonin uptake 測定系について陽性物質の dose-response curve を作成し, 反応の特異性について検討する. 各濃度 2 例で 1 回測定する.

#### I. 陽性物質溶液の調製

陽性物質を秤量し, DMSO で溶解し, DMSO で希釈することにより, 最終濃度の 100 倍濃度の溶液を調製する. 更に, 調製した各濃度の溶液を, Milli-Q 水で 10 倍希釈することにより陽性物質溶液を調製する (用時調製).

陽性物質 (最終濃度) : 5 濃度

#### II. 置換物質溶液の調製

2-2. 1) I. と同様に行う.

#### III. トレーサー溶液の調製

トレーサーを緩衝液で希釈することにより, トレーサー溶液を調製する (用時調製).

トレーサー (最終濃度) : 1 濃度

#### IV. シナプトソーム液の調製

シナプトソーム画分を緩衝液で希釈することにより, シナプトソーム液を調製する. (用時調製).

シナプトソーム (最終濃度) : 1 濃度

## V. 測定法

- 1) 非特異的結合算出用チューブには置換物質溶液を, 総結合算出用チューブには 10% DMSO を, 陽性物質の阻害率算出用チューブには陽性物質溶液をそれぞれ 25  $\mu$ L 添加する.

2) 緩衝液 75  $\mu$ L を添加する.

3) トレーサー溶液 100  $\mu$ L を添加する.

4) シナプトソーム液 50  $\mu$ L を添加する.

5) インキュベート (反応条件は 2-2. 1) 測定系に記載) する.

6) セルハーベスターにより濾過 (GF/C, Whatman) し, 緩衝液で洗浄.

7) 濾紙を測定バイアルビンに移し, 液体シンチレーター (PICO-FLUOR™ PLUS) 5 mL を添加し, 液体シンチレーションカウンターで測定 (測定時間 2 min) する.

## VI. データ解析

### i) 阻害率の算出

阻害率は, 「100 - 結合率」より算出する.

結合率:  $[(B - N) / (B_0 - N)] \times 100 (\%)$

$B$ : 陽性物質存在下での結合放射エネルギー (個別値)

$B_0$ : 陽性物質非存在下での総結合放射エネルギー (平均値)

$N$ : 非特異的結合放射エネルギー (平均値)

陽性物質の各濃度に対する阻害率は, 2 例で測定した平均値を%単位で示す.

### ii) Dose-response curve の作成 ( $IC_{50}$ 値の算出)

Dose-response curve は, 陽性物質存在下での特異的結合放射能 ( $B - N$ ) と非存在下での総結合放射能 ( $B_0 - N$ ) との比 ( $(B - N) / (B_0 - N)$ ) を logit 変換した後, 陽性物質の最終濃度の常用対数値に対してプロットする logit-log モデルにあてはめ作成する.

Dose-response curve の回帰は, 次の回帰式を用いる.

$$Y = aX + b$$

$$(Y = \text{logit } y = \ln(y / (1 - y)), y = (B - N) / (B_0 - N))$$

( $X = \log x$ ,  $x$  は陽性物質の最終濃度)

( $a, b =$  定数)

得られた回帰式より,  $IC_{50}$  値を算出する.

#### 4) $IC_{50}$ 値の算出

モノアミン再取込に対する各被験物質の阻害作用について検討する. 各濃度 2 例で 1 回測定する.

#### I. 被験物質溶液の調製

被験物質を DMSO で溶解, DMSO で希釈することにより, 最終濃度の 100 倍濃度の溶液を調製する. 更に, 調製した各濃度の溶液を, Milli-Q 水で 10 倍希釈することにより被験物質溶液を調製する(用時調製).

被験物質(最終濃度): 6 濃度 ( $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L)

#### II. 陽性物質溶液の調製

陽性物質を秤量し, DMSO で溶解することにより, 最終濃度の 100 倍濃度の溶液を調製する. 更に, 調製した各濃度の溶液を, Milli-Q 水で 10 倍希釈することにより陽性物質溶液を調製する(用時調製).

陽性物質(最終濃度): 6 濃度 ( $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L)

#### III. 置換物質溶液の調製

2-2. 1) I. と同様に行う.

#### IV. トレーサー溶液の調製

2-2. 3) III. と同様に行う.

#### V. シナプトソーム液の調製

2-2. 3) IV. と同様に行う.

#### VI. 測定法

- 1) 非特異的結合算出用チューブには置換物質溶液を, 総結合算出用チューブには 10% DMSO を, 被験物質あるいは陽性物質の阻害率算出用チューブには被験物質溶液あるいは陽性物質溶液をそれぞれ 25  $\mu$ L 添加する.
- 2) 緩衝液 75  $\mu$ L を添加する.
- 3) トレーサー溶液 100  $\mu$ L を添加する.

4) シナプトソーム液 50  $\mu$ L を添加する.

5) インキュベート(37°C, 5min)する.

6) セルハーベスターにより濾過(GF/C, Whatman)し, 緩衝液で洗浄.

7) 濾紙を測定バイアルビンに移し, 液体シンチレーター(PICO-FLUOR™ PLUS) 5 mL を添加し, 液体シンチレーションカウンターで測定(測定時間 2 min)する.

#### VII. データ解析

##### i) 阻害率の算出

阻害率は, 「100 - 結合率」より算出する.

結合率:  $[(B - N) / (B_0 - N)] \times 100(\%)$

B: 被験物質存在下での結合放射能量(個別値)

$B_0$ : 被験物質非存在下での総結合放射能量(平均値)

N: 非特異的結合放射能量(平均値)

陽性物質に関しても被験物質と同様に阻害率を算出する. 被験物質及び陽性物質の各濃度に対する阻害率は, 2 例で測定した平均値を%単位で示す.

##### ii) Dose-response curve の作成 ( $IC_{50}$ 値の算出)

Dose-response curve は, 被験物質存在下での特異的結合放射能( $B - N$ )と非存在下での総結合放射能( $B_0 - N$ )との比( $(B - N) / (B_0 - N)$ )を logit 変換した後, 被験物質の最終濃度の常用対数値に対してプロットする logit-log モデルにあてはめ作成する.

Dose-response curve の回帰は, 次の回帰式を用いる.

$$Y = aX + b$$

$$(Y = \text{logit } y = \ln(y / (1 - y)), y = (B - N) / (B_0 - N))$$

( $X = \log x$ ,  $x$  は被験物質の最終濃度)

( $a, b =$  定数)

得られた回帰式より,  $IC_{50}$  値を算出する. 陽性物質に関しても被験物質と同様に阻害率を算出する.  $IC_{50}$  値は, mol/L で指数表示する.

## C. 結果

### 1. カンナビノイド受容体結合性

得られた測定結果を Table 1 及び Table 2 に示す。また、各化合物の CB<sub>1</sub>もしくは CB<sub>2</sub>受容体に対する親和性の指標として、陽性物質 (R)-(+)-WIN55212-2 の IC<sub>50</sub> 値に対する各化合物の IC<sub>50</sub> 値の比の逆数((R)-(+)-WIN55212-2= 100 として算出)を示したグラフを、Fig. 5 に記載した。

今回測定した披験物質 9 化合物及び平成 23 年度に測定した 6 化合物の計 15 種類の測定対象合成カンナビノイドすべてにおいて、カンナビノイド CB<sub>1</sub> 及び CB<sub>2</sub> 受容体結合能が認められた。それぞれの CB<sub>1</sub> 及び CB<sub>2</sub> 受容体に対する結合性は、(IC<sub>50</sub> 値の逆数として示すと)、陽性物質 (R)-(+)-WIN55212-2 のそれぞれ約 1/63~1.4 倍及び約 1/77~1/4.2 倍であった。この中で、平成 24 年に日本国内で広く流通し、その健康被害が問題となった違法ドラッグのひとつ、MAM-2201 において特に強い CB<sub>1</sub> 受容体結合能が認められ、急性毒性が報告<sup>6)</sup>されている構造類似化合物 JWH-122 の 9.5 倍の値を示した。その他、APICA *N*-(5-fluoropentyl) analog 等、MAM-2201 と同様にインドール構造の *N*-アルキル側鎖末端にハロゲン置換基を有する化合物に比較的強い CB<sub>1</sub> 受容体結合能が認められた。

なお、WIN55212-2 は過去の報告<sup>7)</sup>において、ヒト CB<sub>1</sub> 及び CB<sub>2</sub> 受容体に対し、K<sub>i</sub> 値がそれぞれ 62.3 nM 及び 3.3 nM (同測定条件における (-)-Δ<sup>9</sup>-THC の K<sub>i</sub> 値はそれぞれ 55.3 nM 及び 75.3 nM) であることが報告されている。本測定系において計算した陽性物質 (R)-(+)-WIN55212-2 の CB<sub>1</sub> 及び CB<sub>2</sub> 受容体に対する K<sub>i</sub> 値は、それぞれ 5.4 nM 及び 5.5 nM であった。これらのことを考慮すると、今回検討した化合物は、大麻の活性成分 Δ<sup>9</sup>-THC と近似のカンナビノイド受容体親和性を有すると思われる。ただし、今回測定したのはあくまでもカンナビノイド受容体の親和性を検討したものであり、アゴニストもしくはアンタゴニスト

活性を評価したものではない。実際に生体に及ぼす影響を評価するためには、in vivo 等の実験を行う必要があると思われる。

### 2. モノアミン再取り込み阻害作用

Table 3 及び Table 4 に本測定系のバリデーションデータを示す。Table 5~7 に、ラット脳シナプトソーム画分におけるモノアミン (dopamine, norepinephrine, serotonin) 再取り込みに対する各被験物質の阻害活性 (IC<sub>50</sub> 値) を示す。測定の結果、今回検討した 12 化合物のうち、3 級アミンである 4-methoxy-*N,N*-dimethylcathinone 以外の化合物において、平成 24 年度に麻薬として規制された ethcathinone の約 0.3-30 倍 (dopamine) 及び約 0.3-11 倍 (norepinephrine) の強いモノアミン再取り込み阻害活性を示した。特に、欧州で複数の死亡事例を含む健康被害が問題となった 5-IT が極めて強い作用を示し、その dopamine 及び norepinephrine 再取り込み阻害作用は、ethcathinone のそれぞれ約 30 倍及び 11 倍もの値を示した。また、α-PBP 及び α-PVT 等、pyrrolidiny 基を有する化合物においても強い dopamine 再取り込み阻害作用が認められた。Serotonin に対しては、4-methylbuphedrone, pentedrone, pentylone については比較的強い活性を示したが、それ以外の化合物の IC<sub>50</sub> 値は >1×10<sup>-5</sup> であった。

なお、4-methoxy-*N,N*-dimethylcathinone については、いずれのモノアミンに対しても再取り込み阻害活性 IC<sub>50</sub> 値は >1×10<sup>-5</sup> であったが、濃度依存的な阻害作用が示唆された。なお、本化合物は生体内で代謝され、*N*-脱アルキル化体である methedrone (4-methoxymethylcathinone, 指定薬物) となることが予想されることから、in vivo においては、methedrone と同様の薬理活性が予想される。

今回、5-IT において極めて強いモノアミン再取り込み阻害作用が認められた。本化合物は、麻薬である α-methyltryptamine (AMT) の位置異性

体として、レセルピン拮抗作用及びモノアミン酸化酵素(MAO)阻害作用について過去に検討されており、トリプタミン系幻覚薬 LSD(麻薬)、サイロシン(麻薬)及びサイロシビン(麻薬)と類似の作用を有することが報告されている<sup>8)</sup>。しかし、モノアミン再取り込み阻害作用について示したのは本研究がはじめてである。2012年に、英国、スウェーデン、ハンガリーで5-ITが関与する死亡例が合計21名報告されている<sup>9)</sup>。また、5-IPを摂取すると、持続的な覚醒作用(心拍数の増加、食欲不振、利尿作用、体温上昇)が発現することが報告されている<sup>9)</sup>。このようなヒトへの作用は、トリプタミン類に類似した作用が起因というよりは、むしろ強いモノアミン再取り込み阻害が起因しているのではないかと考えられる。

#### D. 結論

今回検討した12化合物のうち、3級アミンである4-methoxy-*N,N*-dimethylcathinone以外の化合物において、モノアミン再取り込み阻害作用が認められた。特に、欧州で複数の死亡事例を含む健康被害が問題となった5-ITが極めて強い作用を示し、そのdopamine再取り込み阻害作用は、平成24年度に麻薬として規制されたethcathinoneの約30倍の値を示した。また、 $\alpha$ -PBP及び $\alpha$ -PVT等、pyrrolidinyl基を有する化合物において強いdopamine再取り込み阻害作用が認められた。一方、15種類の測定対象合成カンナビノイドすべてにおいて、カンナビノイドCB<sub>1</sub>及びCB<sub>2</sub>受容体結合能が認められた。この中で、平成24年に日本国内で広く流通し、その健康被害が問題となった違法ドラッグのひとつ、MAM-2201において特に強いCB<sub>1</sub>受容体結合能が認められ、急性毒性が報告<sup>6)</sup>されている構造類似化合物JWH-122の9.5倍の値を示した。その他、APICA *N*-(5-fluoropentyl) analog等、MAM-2201と同様にインドール構造の*N*-アルキル側鎖末端にハロゲン置換基を有する化合物に比較的強いCB<sub>1</sub>受容体結合能が認められた。

過去に特許や論文等で報告されていない新しい化合物が次々と違法ドラッグ市場に出現しているが、上述の通り、ヒトに対し強い薬理作用を有する恐れがある化合物も多く、今後も継続して新規流通化合物調査を行っていく必要がある。

本結果は、平成24年4月、8月、10月及び平成25年2月に行われた指定薬物部会において、各種流通違法ドラッグを指定薬物に指定するための判断根拠となる科学的データとして提示された(平成24年7月1日、11月16日、平成25年1月16日より指定薬物として規制、また平成25年4月中に省令公布5月に規制予定)。

#### E. 参考文献

- 1) Kikura-Hanajiri, R. *et al.*, *Forensic Toxicol.* (2013) 31:44-53,
- 2) Kikura-Hanajiri, R. *et al.*, *Yakugaku Zasshi* (2013) 133:31-40,
- 3) Uchiyama, N. *et al.*, *Forensic Toxicol.* (2013) 31:93-100,
- 4) Uchiyama, N. *et al.*, *Forensic Sci. Int.* (2013) 227:21-32,
- 5) Uchiyama, N. *et al.*, *Forensic Toxicol.* (2013) online available.
- 6) Hermanns-Clausen, M. *et al.*, *Addiction* (2013) 108:534-544.
- 7) Felder, C. C. *et al.*, *Mol Pharmacol.* (1995) 48:443-450.
- 8) Garattini, S. *et al.*, *Adv Pharmacol.* (1968) 6:233-246.
- 9) EMCDDA-Europol joint report on a new psychoactive substance: 5-(2-aminopropyl)indole (2013).

#### F. 健康危険情報

MAM-2201は、平成24年度に最も流通した違法ドラッグ成分のひとつであり、交通事故等を含む他害事故にも数多く関わっている可能性が指摘されている。今回の*in vitro*評価において、カン

ナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体に対する親和性が極めて強いことが示され、本化合物による健康被害が憂慮される(平成25年4月中に麻薬として指定が政令公布予定)。また、日本においては今のところ流通が認められていないが、欧州において死亡事例を含む健康被害が報告されている5-ITについては、極めて強いモノアミン再取り込み阻害作用(特に dopamine 及び norepinephrine)が認められ、本化合物についても日本での流通が認められた場合、健康被害が憂慮される(平成25年1月16日より指定薬物として規制)。

#### G. 研究発表

##### 学会発表

1. 花尻(木倉)瑠理, 内山奈穂子, 合田幸広:新規流通違法ドラッグの *in vitro* 活性評価について. 日本法中毒学会第32年会(2013.7, 千葉)発表予定

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

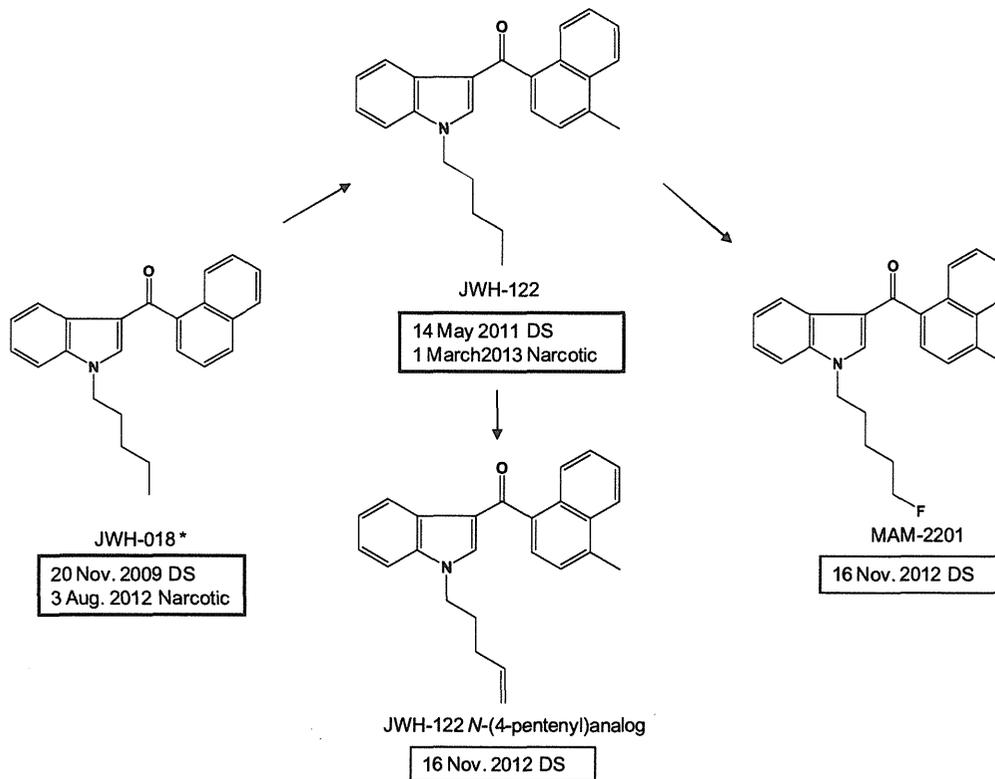


Fig. 1 Chemical structures of synthetic cannabinoids investigated their binding affinity against cannabinoid  $CB_1$  and  $CB_2$  receptors in this study (1). DS: Designated Substances, 日付は施行日

\*平成 23 年度報告書にて測定結果をすでに報告した化合物

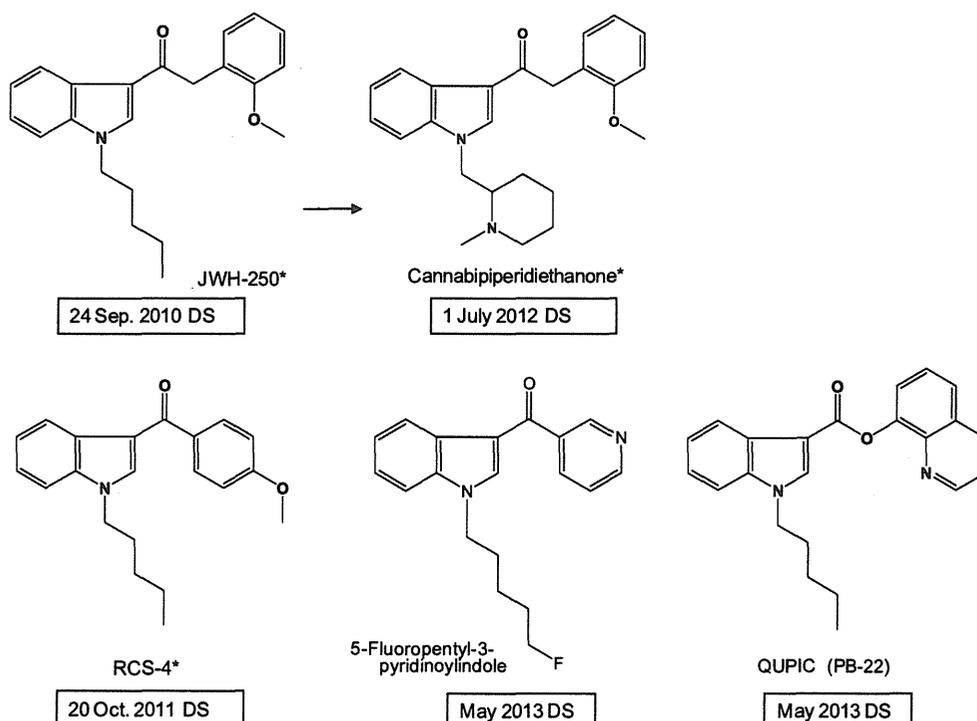


Fig. 2 Chemical structures of synthetic cannabinoids investigated their binding affinity against cannabinoid  $CB_1$  and  $CB_2$  receptors in this study (2). DS: Designated Substances, 日付は施行日

\*平成 23 年度報告書にて測定結果をすでに報告した化合物,

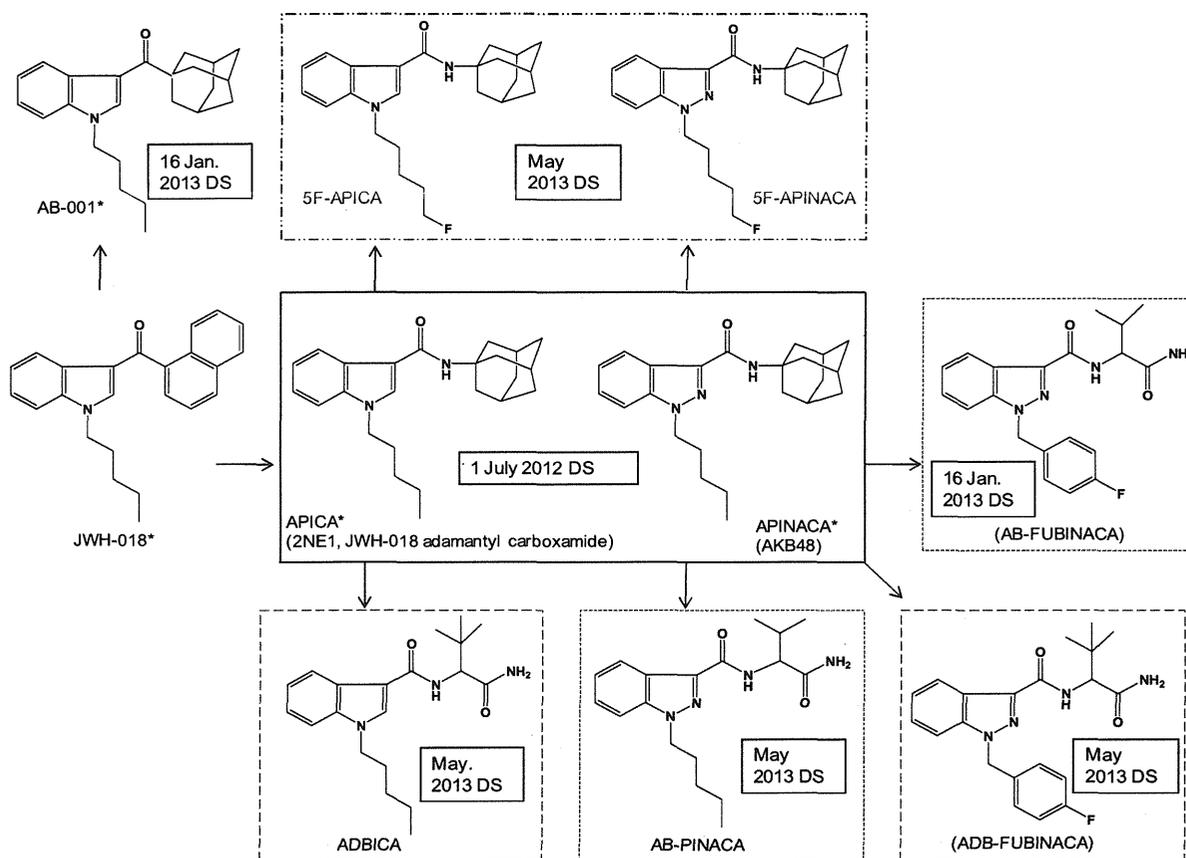
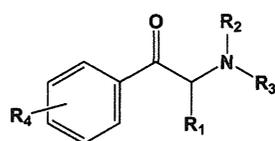
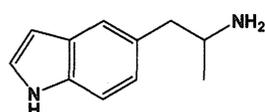


Fig. 3 Chemical structures of synthetic cannabinoids investigated their binding affinity against cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors in this study (3). \*DS: Designated Substances

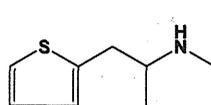
\*平成 23 年度報告書にて測定結果をすでに報告した化合物



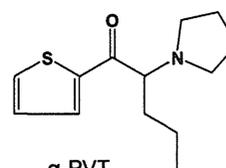
Common name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Ethcathinone	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H
4-Methoxy- <i>N,N</i> -dimethylcathinone	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4-OCH <sub>3</sub>
4-Methylbuphedrone	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	4-CH <sub>3</sub>
4-Methyl- <i>N</i> -methylbuphedrone	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub>
<i>N</i> -Ethylbuphedrone (NEB)	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H
Pentedrone	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H
bk-MDDMA	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	3,4-methylenedioxy
Pentylone	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3,4-methylenedioxy
α-PBP	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	pyrrolidinyl		H



5-(2-Aminopropyl)indole  
(5-API, 5-IT)



Methiopropamine



α-PVT

Fig. 4 Chemical structures of compounds investigated their monoamine uptake activities in this study

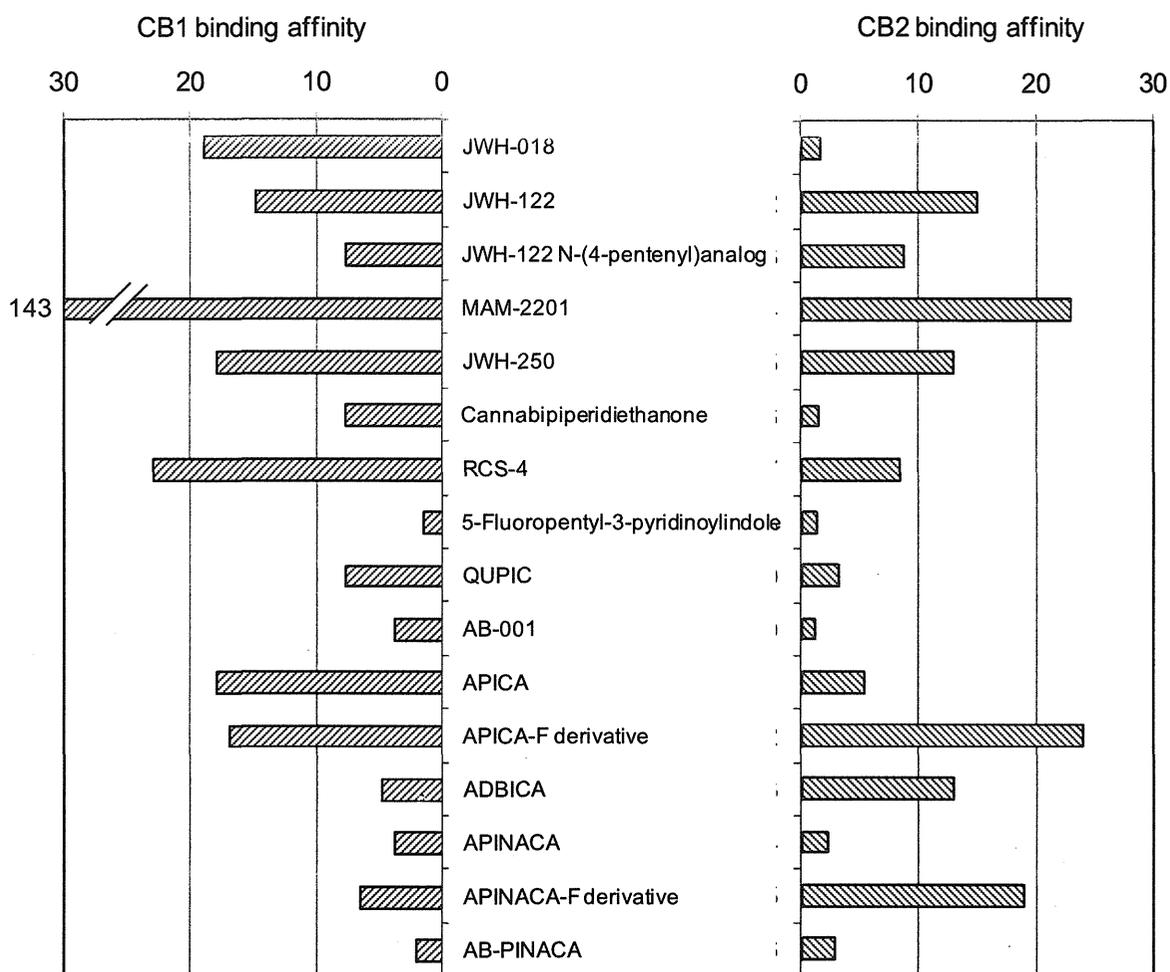


Fig. 5 Reciprocal numbers of the ratios of the  $IC_{50}$  values of the test substances on radioligand binding to the Cannabinoid  $CB_1$  or  $CB_2$  receptor to that of (*R*)-(+)-WIN55212-2 [(*R*)-(+)-WIN55212-2 = 100].

Table 1 Inhibitory Effect and IC<sub>50</sub> Values of Test Substances on Radioligand Binding to Cannabinoid CB<sub>1</sub> (Human) Receptor

Assay name	Substance	Substance concentration (mol/L)									IC <sub>50</sub> (nM)	Ratios (reciprocal x 10 <sup>-2</sup> )	
		3×10 <sup>-10</sup>	1×10 <sup>-9</sup>	3×10 <sup>-9</sup>	1×10 <sup>-8</sup>	3×10 <sup>-8</sup>	1×10 <sup>-7</sup>	3×10 <sup>-7</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>			1×10 <sup>-5</sup>
		Inhibition (%)											
	5-Fluoropentyl-3-pyridinoylindole	-	-	2.93	0.00	3.58	18.08	26.68	45.54	81.18	95.22	790	61 (1.6)
	APINACA-F derivative	-	-	1.95	10.36	31.03	39.38	55.72	68.55	86.82	98.17	197	15 (6.6)
	AB-PINACA	-	-	2.34	1.64	1.69	14.06	40.54	61.36	77.89	91.56	608	47 (2.1)
	QUPIC	-	-	3.45	11.69	32.84	41.38	59.70	73.16	86.47	97.02	165	13 (7.7)
	ADBICA	-	-	3.65	13.31	22.63	39.63	54.27	62.19	71.36	91.45	276	21 (4.8)
	APICA-F derivative (STS-135)	-	-	0.99	10.13	38.52	63.47	79.18	87.69	97.68	100.00	75.5	5.9 (17)
	(R)-(+)-WIN55212-2	3.56	8.31	28.63	48.90	63.94	89.15	89.36	96.51	-	-	13	1 (100)
	JWH-122	-	-	1.80	16.85	26.15	43.66	65.03	75.11	93.08	98.19	123	6.5 (15)
	JWH-122 <i>N</i> -(4-pentenyl)analog	-	-	0.19	6.61	27.32	43.23	51.25	75.52	84.31	97.39	244	13 (7.7)
Cannabinoid CB <sub>1</sub> (Human)	MAM-2201	0.00	3.79	22.44	43.95	67.98	83.69	98.02	98.43	-	-	13.2	0.7 (143)
	(R)-(+)-WIN55212-2	4.51	14.48	18.75	44.36	57.89	73.96	87.18	100.00	-	-	18.9	1 (100)
	APICA*	-	-	0.00	7.80	30.85	46.48	61.30	72.37	97.00	100.00	175	5.5 (18)
	APINACA*	-	-	1.68	0.00	14.54	19.18	35.76	47.70	67.07	84.13	824	26 (3.8)
	AB-001*	-	-	0.00	1.47	4.07	18.96	28.03	48.02	72.38	84.99	927	26 (3.8)
	JWH-018*	-	-	1.51	22.06	35.45	45.84	50.73	63.09	78.66	88.43	169	5.3 (19)
	(R)-(+)-WIN55212-2*	3.05	0.00	19.04	23.95	50.55	75.06	81.65	89.12	-	-	32	1 (100)
	Cannabipiperidiethanone*	-	-	4.13	0.00	9.48	24.50	39.61	61.50	76.52	86.42	591	13 (7.7)
	JWH-250*	-	-	0.00	0.00	22.67	34.61	52.55	66.19	81.44	92.21	260	5.7 (18)
	RCS-4*	-	-	0.00	14.28	25.79	46.53	51.59	74.99	78.56	91.59	194	4.3 (23)
	(R)-(+)-WIN55212-2*	0.00	1.17	16.00	31.17	39.32	60.35	77.81	86.64	-	-	45.6	1 (100)

\*平成 23 年度報告書にて測定結果をすでに報告した化合物。