

相の送液を行い、カラムで分離して蛍光検出器で検出した。その後カラムの洗浄のため、もう一方の送液ポンプで洗浄用液の送液を行った後、移動相に切り替えてその後の試料中の MDMA 類の定量を行った。

2.2. 試料の前処理

MDMA 類の定量を行うに当たり、既報³³⁾の 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride (DIB-Cl) を用いた蛍光誘導体化法によって、試料中薬物の蛍光誘導体化を行った。内標準物質として 1-methyl-3-phenylpropylamine を用い、試料である脳透析液、炭酸緩衝液及び蛍光誘導体化試薬 DIB-Cl を添加し、室温で誘導体化反応を行う。10 分後、アンモニア水を加えて反応を停止させ、上記の HPLC-蛍光分析に供した。

3. マイクロダイアリシス条件

マイクロダイアリシス法とは、先端に半透膜を有する透析プローブを生体組織に挿入し、人工脳脊髄液などを灌流することにより、標的部位の外液中に存在する内因性及び外因性の低分子量物質を透析液中に経時的に回収する方法である²⁴⁾。

本研究では脳内の DA 及び 5-HT の経時的なサンプリングを目的として、マイクロダイアリシス法をラット脳組織に適用した。

3.1. 実験動物

8 週齢の Wistar 系雄性ラット (271-311 g) を使用した。

飼育環境は室温 22±1°C、湿度 55±5%、12 時間 (明期 8:00-20:00) の明暗サイクルとし、飼料 (固形飼料 MF) 及び水道水は自由に摂取できるものとした。

全ての操作は、長崎大学における動物実験の指針に基づいて行った。なお、本研究は、長崎大学動物実験委員会の承認 (受付番号 071109-2) の下で行った。

3.2. マイクロダイアリシス法及び実験スケジュール

ラットをカルバミド酸エチル (1.5 g/kg, i.p.) で麻酔し、脳定位固定装置に固定した。頭皮を切開し頭蓋骨を露出させた後、ドリルで頭蓋骨に透析プローブ挿入のための穴 (直径 2 mm) を開け、プローブを挿入した。プローブには MAB6 (カットオフ値 15,000 Da, polyethersulfone 膜, 膜長 4 mm) を使用し、プローブ挿入部位は Paxinos & Watson の脳地図³⁰⁾に従い、左線条体 (A, +0.6 mm; L, +3.0 mm; H, -7.0 mm from bregma) とした。灌流液には aCSF を用い、CMA/100 マイクロインジェクションポンプによって流速 2.0 µL/min にて灌流した。

プローブ挿入後、組織損傷による内因性物質への影響を除くため、脳透析液は採取せずに 1 時間灌流した。その後、ベースラインとして 20 分間脳透析液を採取し、薬物を i.p. 投与した。薬物投与後 3 時間まで 10 分間隔、以後 10 時間まで 1 時間間隔で脳透析液を採取した。

脳透析液中の脳内アミンの分解を防ぐため、脳透析液の採取は氷上にて行い、保存液として 0.1 mM EDTA・2Na を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.5) をあらかじめ添加したエッペンドルフチューブを用いて採取した。採取した脳透析液は HPLC 分析へ供した。

3.3. 投与薬物及び投与量

本研究で検討した投与群は以下の通りである。

- MDMA (12 mg/kg) + saline (n=4)
- MDMA (25 mg/kg) + saline (n=4)
- MP (10 mg/kg) + saline (n=4)
- MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg) (n=4)

MDMA は生理食塩水に懸濁させ、超音波処理後、メンブランフィルター (Millex®-LG Sterile, 0.2 µm, 日本ミリポア株式会社, 東京) で濾過したものをを用いた。MP は生理食塩水に溶解したものを使用した。投与薬物は投与量がラットの体重 100 g 当たり 0.1 mL となるように調製し、i.p. 投与した。なお、2 種類の薬物を併用投与する際には、2 種類の薬物を連続して i.p. 投与した。

本研究で用いた MDMA (12 mg/kg) は, 70 kg のヒトにおいて約 164 mg に相当する用量である³¹⁾. 1錠の MDMA 錠剤中に 1-207 mg の MDMA が含まれているという報告^{2,3,11,25-28)}から, 今回用いた用量はヒトが 1 から 2 錠使用したことに相当すると考える.

MDMA 錠剤中の MP の混在比は錠剤により様々である^{2,3,25)}ため, 本研究では混在比が同程度であると仮定し, MP (10 mg/kg) とした. また, MDMA 錠剤中に混在する MP との相互作用を評価するために, MDMA (12 mg/kg) 及び MP (10 mg/kg) の併用投与と当量の MDMA (25 mg/kg) の投与を行った.

3.4. マイクロダイアリシスプローブの回収率

In vivo の recovery (Rin vivo) は, 本研究と同一ロットのプローブ及び灌流液を用いたため, 当研究室で算出した値 (DA, 8.5%; 5-HT, 15.0%; MDMA, 12.4%; MDA, 10.1%; MP, 11.5%; AP, 11.3%) を用いた¹⁸⁾.

本研究で得られた各透析液中の DA, 5-HT 及び MDMA 類の濃度は, 算出した Rin vivo% で補正して評価した.

4. 統計解析及び脳内アミンの挙動評価方法

解析結果は平均値±標準偏差で示した. 統計処理は SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc.) を用いて行った. 4 群間の比較について Scheffe's multiple comparison test を用いた. また, 脳内アミン及び薬物の相関性については, Pearson の相関係数に基づき評価した. いずれの場合も $P < 0.05$ を有意差ありとした.

脳内の薬物が脳内アミンの挙動に及ぼす影響を検討するため, 脳内アミン及び薬物の相関性の評価を行った. 脳内アミンは AUC_{0-600} を, 薬物については, 脳内アミンの T_{max} までの MDMA 及び MP 濃度のプロットから近似式の傾きを算出し, これらの相関係数に基づき評価した.

C. 研究結果

1. MDMA 及び MP 投与時の脳内アミンの濃度推移

1.1 ラット脳線条体における DA の濃度推移

MDMA (12 mg/kg) 及び MP (10 mg/kg) をそれぞれ単独投与もしくは併用投与した場合, 及び MDMA (25 mg/kg) を単独投与した場合の DA 濃度の経時変化を Fig. 2 (a)に, AUC_{0-600} を Fig. 2 (b)に示す. また, 各群のパラメータを Table 1 に示す.

MDMA (12 mg/kg) 単独投与群と比較して, MP (10 mg/kg) 単独投与群及び MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg) 併用投与群では DA の C_{max} 及び AUC_{0-600} が有意に増加した ($P < 0.05$). MP (10 mg/kg) 単独投与群は MDMA (12 mg/kg) 単独投与群と比較して, 顕著な DA 濃度増加を示し, これらの各単独投与群の AUC_{0-600} の和は MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg) 併用投与群の AUC_{0-600} に相当した. また, MDMA (25 mg/kg) 単独投与群と比較して, 当量の MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg) 併用投与群では, DA の AUC_{0-600} が有意に増加した ($P < 0.05$).

1.2 ラット脳線条体における 5-HT の濃度推移

MDMA (12 mg/kg) 及び MP (10 mg/kg) をそれぞれ単独投与もしくは併用投与した場合, 及び MDMA (25 mg/kg) を単独投与した場合の 5-HT 濃度の経時変化を Fig. 3 (a)に, AUC_{0-600} を Fig. 3 (b)に示す. また, 各群のパラメータを Table 2 に示す.

MDMA (12 mg/kg), MDMA (25 mg/kg) 及び MP (10 mg/kg) の各単独投与群と比較して, MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg) 併用投与群では 5-HT の C_{max} 及び AUC_{0-600} は増加傾向を示したが, いずれのパラメータにおいても有意差は得られなかった.

2. MDMA 類の定量

本研究と同一個体から得られた試料を用いて脳内薬物濃度の測定を行った. MDMA (12

mg/kg) 及び MP (10 mg/kg) をそれぞれ単独投与もしくは併用投与した場合、及び MDMA (25 mg/kg) を単独投与した場合の脳内薬物濃度の経時変化を Fig. 4 に示す。また、各群のパラメータを Table 3 に示す。

MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg) 併用投与群では、MDMA の C_{max} (3308.1 ng/mL) 及び AUC_{0-600} (689.8 $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$) は MDMA 12 mg/kg 単独投与群 (C_{max} , 3308.1 ng/mL; AUC_{0-600} , 348.0 $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$) と比較して増加傾向を示した。さらに、併用群の MP 滞留時間 (210.3 min) は MP 単独投与群 (123.0 min) と比較して有意な延長が観察された ($P<0.05$)。

D. 考察

MDMA を摂取すると多幸感や社交性の増大など、摂取者が期待する効果を得られる一方、様々な健康被害が生じる危険性がある^{10,11)}。MDMA を摂取することで生じる主な有害事象として異常高熱が挙げられ、重篤な場合には死に至るといった報告がある^{12,14)}。このメカニズムは未だ解明されていないが、DA や 5-HT などの脳内アミンの関与が示唆されており^{7,15-17)}、MDMA により生じる健康被害のメカニズムを解明する上で、脳内アミンを用いた評価は有用であると考えられる。

MDMA 錠剤中には MDMA の他に、MP をはじめとする様々な薬物の混在が確認されている^{2,3,11,25-29)}。複数の薬物の同時摂取により毒性が増強することが懸念されるため、これらの薬物相互作用リスクの評価は健康被害を予測、予防する上で重要である。MDMA 錠剤中の MP の混在比は錠剤により様々であるため^{2,3,25)}、本研究では混在比が同程度であると仮定し、MDMA 及び MP を投与したラット脳内の DA 及び 5-HT を指標として相互作用リスクの評価を行った。

本研究において DA については、MDMA (12 mg/kg) 単独投与群と比較して、MP (10 mg/kg) 単独投与群及び MDMA (12 mg/kg) と

MP (10 mg/kg) 併用投与群において C_{max} 及び AUC_{0-600} が有意に増加した。このうち、単独投与群では MDMA と比較して、MP が DA 濃度を大きく増加させた。このとき、併用投与群の AUC_{0-600} は、各単独投与群の AUC_{0-600} の和に相当した。また、MDMA (25 mg/kg) 単独投与群と比較して、当量の MDMA (12 mg/kg) と MP (10 mg/kg) 併用投与群では AUC_{0-600} が有意に増加した。

5-HT に関しては、MDMA (12 mg/kg)、MDMA (25 mg/kg)、及び MP (10 mg/kg) の各単独投与群と比較して、MDMA (12 mg/kg) と MP (10 mg/kg) の併用投与群では C_{max} 及び AUC_{0-600} の増加傾向が観察された。

本研究では、MDMA と比較して MP は顕著に DA 濃度を増加させた。MDMA は dopamine transporter (DAT) と比較して、SERT とより親和性が高いことが知られている⁷⁻⁹⁾。MP では SERT と比較して、DAT と親和性が高く、DA 放出促進作用及び再取り込み阻害作用が強いことが報告されている^{8,9)}ことから、この結果は妥当であると考えられる。

また、MDMA (25 mg/kg) 単独投与群と比較して、当量の MDMA (12 mg/kg) と MP (10 mg/kg) の併用投与群では DA の C_{max} 及び AUC_{0-600} は有意に増加し、5-HT では増加傾向を示した。この結果から、MDMA と MP との相互作用により脳内アミンの増加が引き起こされ、毒性が増強する可能性が考えられた。MDMA と MP の反復投与及び長期投与により、それぞれの単独投与時と比較して併用投与時ではラット線条体内の DA 及び 5-HT の枯渇の程度が増大したという報告^{22,23)}からも、MDMA と MP との相互作用による毒性の増強が示唆される。

本研究の結果から、MDMA と MP の混在比が同程度の場合、MDMA 錠剤中に MP が混在することにより、より深刻な健康被害が生じる可能性が示された。本研究においては、脳内アミンの変動を指標として MDMA 錠剤中に混在が確

認められている MDMA と MP との相互作用リスクを評価することができたと考える。

次に本研究と同一試料中の薬物の定量を HPLC-FL 法を用いて行っている。薬物の毒性を評価するため、これらの結果を用いて脳内アミン放出量を決定する因子の検討を試みた。

MDMA, MP 及び脳内アミンの AUC_{0-600} を用いてパラメータ化を試みたが、関連性は得られなかった。次に脳内アミン及び薬物の相のずれが原因と考え、脳内アミンの MRT_{0-600} までの AUC を用いてパラメータ化を試みたが、同様に関連性は得られなかった。

減衰曲線を並べた際に (Fig. 5), MDMA 及び MP と比較して、脳内アミンの消失が早いことから、薬物投与初期における薬物の刺激により、脳内アミンの放出が起こるということが示唆された。そのため、脳内アミンの AUC_{0-600} と、脳内アミンの T_{max} までの脳内薬物濃度の近似式から算出した傾きを用いて、相関性を評価した。得られた結果を Fig. 6 に示す。

その結果、DA では $r=0.659$, 5-HT では $r=0.498$ の相関性を示した ($P<0.05$)。

以上の結果から、薬物投与初期の脳内薬物濃度の傾きが、脳内アミン放出量を決定する因子のひとつであると示唆された。

薬物動態学的評価と薬力学的評価を同一個体にて行った研究はこれまでほとんどなく、薬物が脳内アミンの挙動に及ぼす影響を解明するには、今後さらなる検討が必要であると考えらる。

E. 結論

本研究では、HPLC-ECD 法とマイクロダイアリス法を組み合わせ、脳内アミンを指標として MDMA 錠剤摂取時に想定される MDMA と MP との相互作用リスクを評価した。

今回の結果から、MDMA 及び MP の併用投与により、脳内アミン濃度が MDMA 単独投与時よりも増加したことから、これらの薬物の相互作用が脳内において影響を及ぼすことが示唆さ

れ、MDMA 錠剤中に MP が混在することにより、より深刻な健康被害が生じる可能性が示された。

今回の検討では MDMA 錠剤中に混在が確認されている MDMA と MP との相互作用リスクを評価したが、MDMA, MP に限らず、近年は様々な類似薬物が出現し乱用されていることから、これら他の乱用薬物の毒性の評価も必要であると考えらる。

今回の研究結果が MDMA 錠剤をはじめ様々な乱用薬物により生じる健康被害のメカニズムを解明する上で有用な情報となり、薬物乱用防止の一助となることを期待する。

F. 参考文献

- 1) 警察庁, 平成 23 年度版警察白書, 116-118 (2011).
- 2) Makino, Y., Tanaka, S., Kurobane, S., Nakauchi, M., Terasaki, T., and Ohta, S., *J. Health Sci.*, **49**, 129-137 (2003).
- 3) Teng, S.F., Wu, S.C., Liu, C., Li, J.H., Chien, C.S., *Forensic Sci. Int.*, **161**, 202-208, (2006).
- 4) 中川貴之, 金子周司, *医学のあゆみ*, **217**, 1143-1146 (2006).
- 5) Hagino, Y., Takamatsu, Y., Yamamoto, H., Iwamura, T., Murphy, D.L., Uhl, G.R., Sora, I., Ikeda, K., *Curr. Neuropharmacol.*, **9**, 91-95 (2011).
- 6) Gudelsky, G.A., Yamamoto, B.K., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **90**, 198-207 (2008).
- 7) Cole, J.C., Sumnall, H.R., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **27**, 199-217 (2003).
- 8) Han, D.D., Gu, H.H., *BMC Pharmacol.*, **6**, 6-12 (2006).
- 9) Rothman, R.B., Baumann, M.H., Dersch, C.M., Romero, D.V., Rice, K.C., Carroll, F.I., Partilla, J.S., *Synapse*, **39**, 32-41 (2001).
- 10) 縄田陽子, 山本経之, *医学のあゆみ*, **217**, 1167-1170 (2006).
- 11) Brunt, T.M., Koeter, M.W., Niesink, R.J.M.,

- van den Brink, W., *Psychopharmacol.* **220**, 751-762 (2012).
- 12) Eede, H.V., Montenji, L.J., Touw, D.J., Norris, E.M., *J. Emerg. Med.*, **42**, 655-658 (2012).
- 13) Sano, R., Hasuike, T., Nakano, M., Kominato, Y. Itoh, H., *Leg. Med.*, **11**, 294-297 (2009).
- 14) Greene, S.L., Dargan, P.I., O'connor, N., Jones, A.L., Kerins, M., *Am. J. Emerg. Med.*, **21**, 121-124 (2003).
- 15) Benamar, K., Geller, E.B., Alder, M.W., *Eur. J. Pharmacol.*, **596**, 84-88 (2008).
- 16) Shioda, K., Nisijima, K., Yoshino, T., Kuboshima, K., Iwamura, T., Yui, K., Kato, S., *Neurotoxicology*, **29**, 1030-1036 (2008).
- 17) Stanley, N., Salem, A., Irvine, R.J., *Neuroscience*, **146**, 321-329 (2007).
- 18) Ikeda, R., Igari, Y., Fuchigami, Y., Wada, M., Kuroda, N., Nakashima K., *Eur. J. Pharmacol.*, **660**, 318-325 (2011).
- 19) Kehr, J., Ichinose, F., Yoshitake, S., Goiny, M., Sievertsson, T., Nyberg, F., Yoshitake, T., *Br. J. Pharmacol.*, **164**, 1949-1958 (2011).
- 20) Baumann, M.H., Clark, R.D., Rothman, R.B., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **90**, 208-217 (2008).
- 21) Clemens, K.J., Cornish, J.L., Hunt, G.E., McGregor, I.S., *Drug Alcohol Depend.*, **86**, 183-190 (2007).
- 22) Clemens, K.J., Cornish, J.L., Li, K.M., Hunt, G.E., McGregor, I.S., *Neuropharmacology*, **49**, 195-207 (2005).
- 23) Clemens, K.J., van Nieuwenhuyzen, P.S., Li, K.M., Cornish, J.L., Hunt, G.E., McGregor, I.S., *Psychopharmacology*, **173**, 318-325 (2004).
- 24) 村上照夫, 高野幹久, *医学のあゆみ*, **182**, 478-479 (1997).
- 25) Morefield, K.M., Keane, M., Felgate, P., White, J.M., Irvine, R.J., *Addiction*, **106**, 1293-1300 (2011).
- 26) Vogels, N., Brunt, T.M., Rigter, S., van Dijk, P., Vervaeke, H., Niesink, R.J.M., *Addiction*, **104**, 2057-2066 (2009).
- 27) Giraudon, I., Bello, P.Y., *Subst. Use Misuse*, **42**, 1567-1578 (2007).
- 28) Cole, J.C., Bailey, M., Sumnall, H.R., Wagstaff, G.F., King, L.A., *Addiction*, **97**, 1531-1536 (2002).
- 29) Tanner-Smith, E.E., *Drug Alcohol Depend.*, **83**, 247-254 (2006).
- 30) Paxinos, G., Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinates 5th edition*, Elsevier Academic Press (2005).
- 31) McCann, U.D., Ricaurte, G.A., *Neuropsychopharmacology*, **24**, 333-334 (2001).
- 32) Yamaoka, K., Nakagawa, T., Uno, T., *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **6**, 547-558 (1978).
- 33) Fuchigami, Y., Ikeda, R., Wada, M., Kuroda, N., Nakashima, K., *The International Conference & Expo on Forensic and Analytical Toxicology*, San Francisco (2011).

G. 研究発表

学会発表

1. Sugimoto, Y., Wada, M., Ikeda, R., Crabtree, B.L., Evans, C., Montgomery, J.H., Kuroda, N., Nakashima, K., Determination of methamphetamines in abusers' hair: Usefulness of hair analysis in pre-registration for abusers, The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT 2012), Hamamatsu, (2012. 6).
2. 葛島美季, 瀧上由貴, 池田理恵, 和田光弘, 黒田直敬, 中島憲一郎: MDMA 錠剤中に混在が確認されているメタンフェタミンとの相

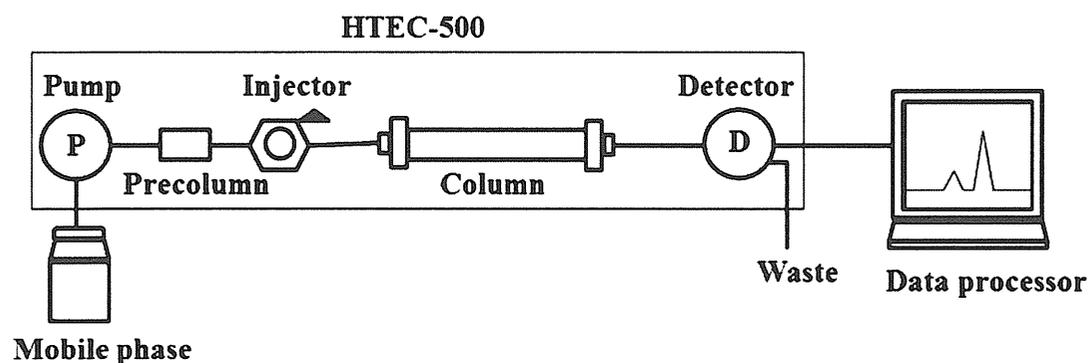
相互作用リスクの評価, 第 29 回日本薬学会九州支部大会, 熊本, (2012. 12).

論文発表

1. Wada, M., Yamahara, K., Ikeda, R., Kikura-Hanajiri, R., Kuroda, N., Nakashima K., Simultaneous determination of *N*-benzyl piperazine and 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine in rat plasma by HPLC-fluorescence detection and its application to monitoring of these drugs, *Biomed. Chromatogr.*, **26**, 21-25 (2012).
2. Wada, M., Sugimoto, Y., Ikeda, R., Isono, K., Kuroda, N., Nakashima, K., Determination of methamphetamine in neonatal hair and meconium samples: estimation of fetal drug abuse during pregnancy, *Forensic Toxicol.*, **30**, 80-83 (2012).
3. Wada, M., Ochi, Y., Nogami, K., Ikeda, R., Kuroda, N., Nakashima K., Evaluation of hair roots for detection of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine abuse by use of an HPLC-chemiluminescence method, *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 2569-2576 (2012).

H. 知的所有権の取得状況

該当なし



System, HTEC-500

Column, EICOMPAK PP-ODS II (30×4.6 mm, i.d., 2 μm)

Column temperature, 25°C

Mobile phase, 1.5% methanol in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.4) containing 500 mg/L sodium 1-decanesulfonate and 50 mg/L EDTA•2Na

Flow rate, 0.5 mL/min

Working electrode, WE-3G (graphite)

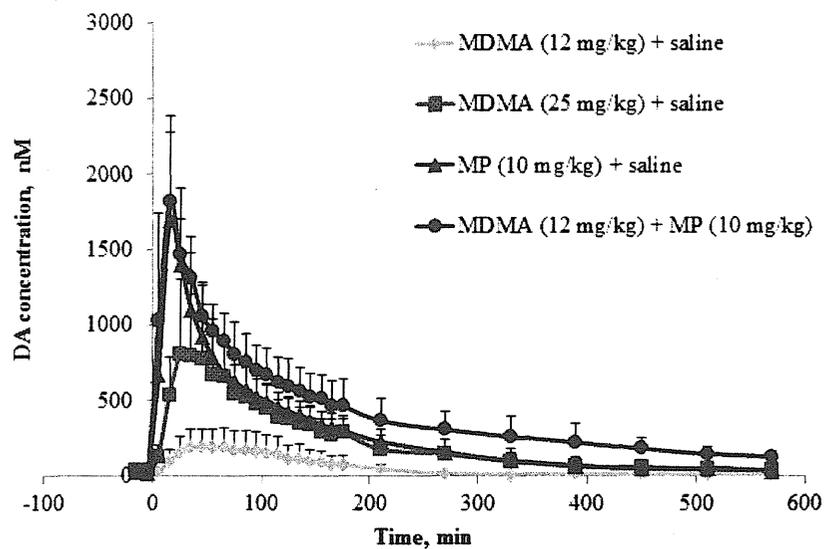
Reference electrode, RE-100 (Ag/AgCl)

Applied potential, +400 mV

Injection volume, 10 μL

Fig. 1 HPLC-ECD system and conditions for determination of DA and 5-HT.

(a)



(b)

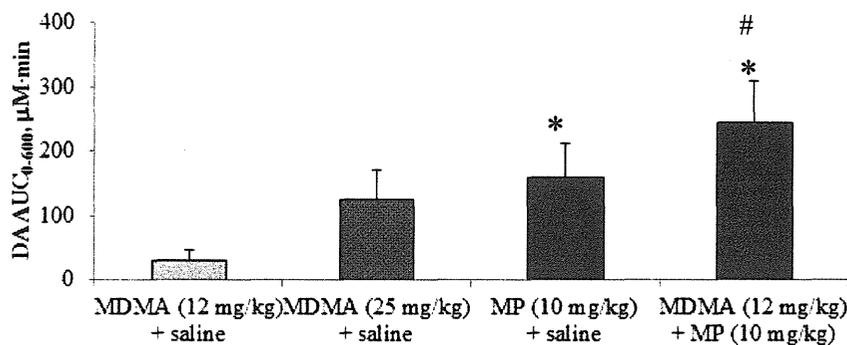


Fig. 2 (a) Time-concentration profiles of DA after a single administration (*i.p.*) of MDMA (12 mg/kg) + saline, MDMA (25 mg/kg) + saline, MP (10 mg/kg) + saline and MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg), and (b) comparison of the mean AUC₀₋₆₀₀ of DA response for 600 min after administration.

Each point represents the mean±SD (n=4).

* $P < 0.05$ vs. MDMA (12 mg/kg) + saline group, # $P < 0.05$ vs. MDMA (25 mg/kg) + saline group (Scheffé's multiple comparison test).

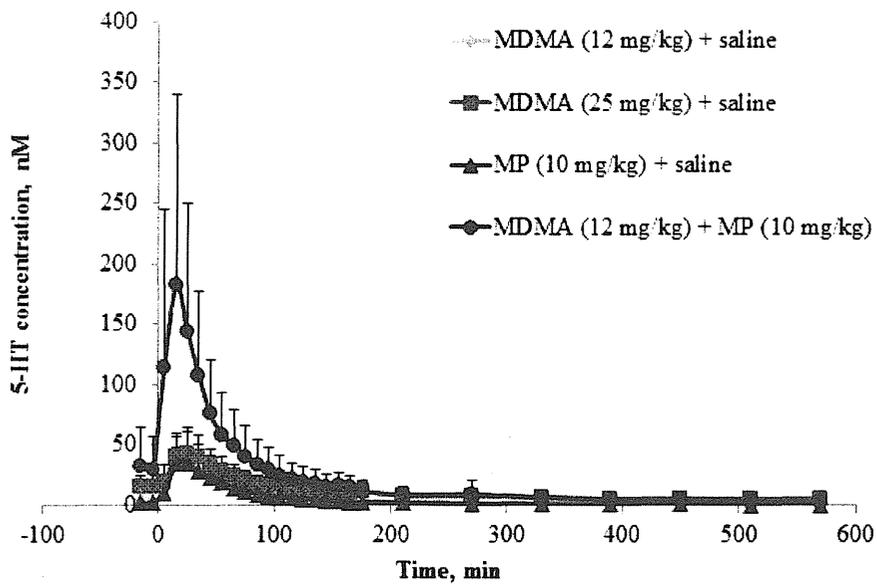
Table 1 Moment parameters of DA in rat striatum after a single administration (*i.p.*) of MDMA (12 mg/kg) + saline, MDMA (25 mg/kg) + saline, MP (10 mg/kg) + saline and MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg).

	MDMA (12 mg/kg) + saline	MDMA (25 mg/kg) + saline	MP (10 mg/kg) + saline	MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg)
C_{max} , nM	196.79 ±100.59	882.10 ±421.66	1687.25 ±584.50*	1823.45 ±560.55*
T_{max} , min	42.50 ±20.62	35.00 ±14.14	15.00 ±0.00	17.50 ±5.00
AUC_{0-600} , $\mu M \cdot min$	29.88 ±17.50	123.40 ±47.30	159.91 ±50.92*	243.37 ±65.66* [#]
MRT_{0-600} , min	151.92 ±41.49	150.42 ±28.75	123.01 ±31.43	171.91 ±27.79

Data are expressed as mean±SD.

* $P < 0.05$ vs. MDMA (12 mg/kg) + saline group, [#] $P < 0.05$ vs. MDMA (25 mg/kg) + saline group (Scheffe's multiple comparison test).

(a)



(b)

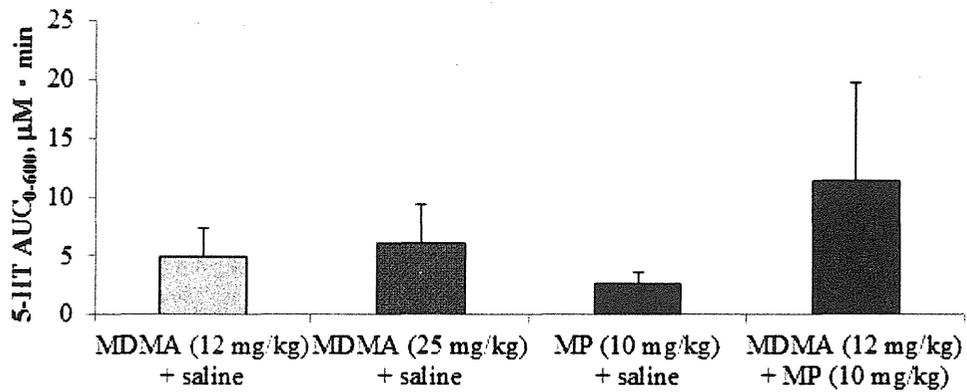


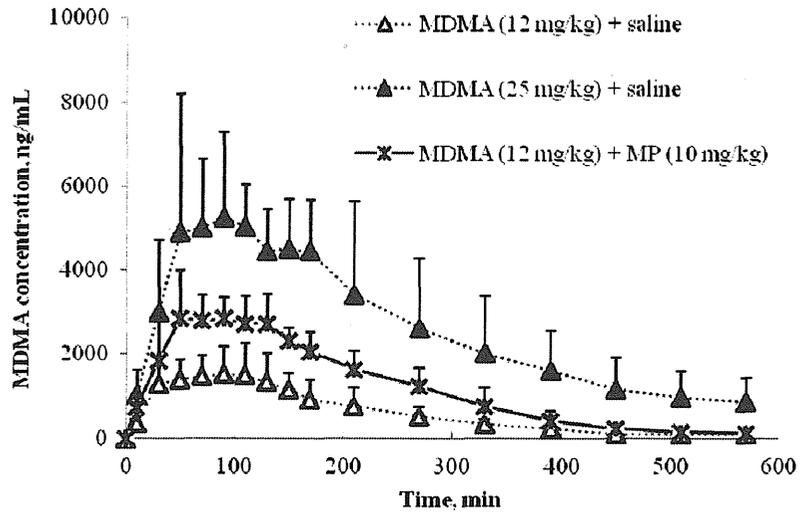
Fig. 3 (a) Time-concentration profiles of 5-HT after a single administration (*i.p.*) of MDMA (12 mg/kg) + saline, MDMA (25 mg/kg) + saline, MP (10 mg/kg) + saline and MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg), and (b) comparison of the mean AUC₀₋₆₀₀ of 5-HT response for 600 min after administration. Each point represents the mean+SD (n=4).

Table 2 Moment parameters of 5-HT in rat striatum after a single administration (*i.p.*) of MDMA (12 mg/kg) + saline, MDMA (25 mg/kg) + saline, MP (10 mg/kg) + saline and MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg).

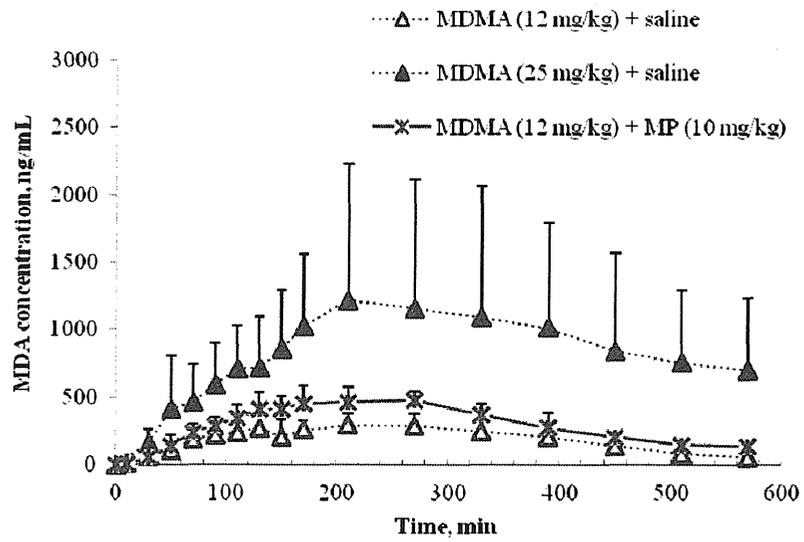
	MDMA (12 mg/kg) + saline	MDMA (25 mg/kg) + saline	MP (10 mg/kg) + saline	MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg)
C_{max} , nM	50.72 ±23.78	43.22 ±17.61	36.87 ±12.55	183.26 ±157.22
T_{max} , min	25.00 ±8.16	25.00 ±8.16	22.50 ±5.00	17.50 ±5.00
AUC_{0-600} , μM·min	4.87 ±2.52	6.12 ±3.20	2.55 ±1.04	11.37 ±8.36
MRT_{0-600} , min	110.43 ±17.20	164.29 ±73.4	80.18 ±16.07	105.88 ±30.24

Data are expressed as mean±SD.

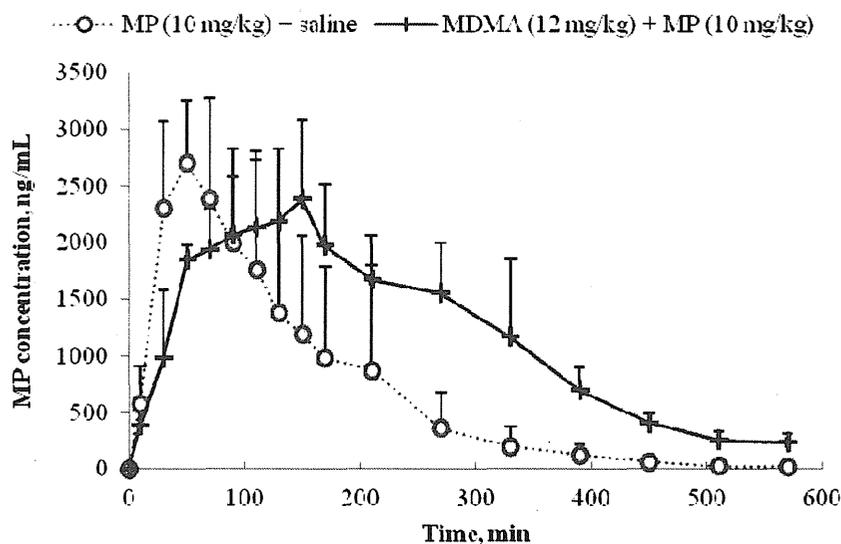
(a)



(b)



(c)



(d)

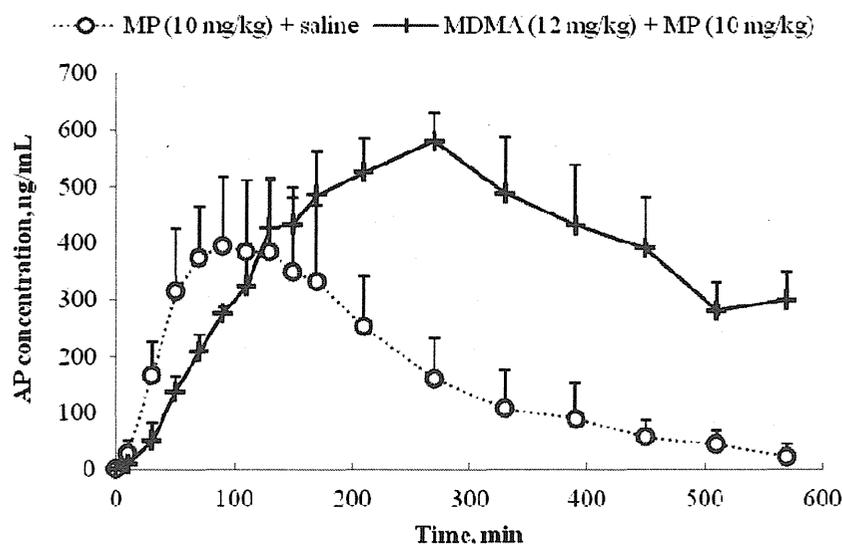


Fig. 4 Time-concentration profiles of (a) MDMA and (b) MDA after a single administration (*i.p.*) of MDMA (12 mg/kg) + saline, MDMA (25 mg/kg) + saline and MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg), and time-concentration profiles of (c) MP and (d) AP after a single administration (*i.p.*) of MP (10 mg/kg) + saline and MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg). Each point represents the mean+SD (n=4).

Table 3 Moment parameters of (a) MDMA, MDA, (b) MP and AP in rat striatum after a single administration (*i.p.*) of MDMA (12 mg/kg) + saline, MDMA (25 mg/kg) + saline, MP (10 mg/kg) + saline and MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg).

(a)

	MDMA 12 mg/kg	MDMA 25 mg/kg	MDMA 12 mg/kg +MP 10 mg/kg
<i>MDMA</i>			
C_{max} , ng/mL	1847.9±599.8	6077.7±2484.1*	3308.1±674.2
T_{max} , min	85.0±55.1	85.0±30.0	95.0±44.3
$T_{1/2}$, min	84.6±12.1	175.4±73.1	96.7±27.3
AUC, $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$	348.0±120.3	1490.9±657.4*	689.8±129.4
MRT, min	170.9±31.7	205.2±39.9	171.3±32.6
CL, mL/min	11.0±3.0	5.6±2.3*	5.3±0.9*
<i>MDA</i>			
C_{max} , ng/mL	327.1±63.5	1351.9±936.1	492.7±90.2
T_{max} , min	205.0±79.0	290.0±116.6	230.0±49.0
$T_{1/2}$, min	150.2±79.0	503.5±309.2	182.5±111.7
AUC, $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$	107.9±27.7	483.4±360.2	166.6±31.9
MRT, min	258.5±26.9	300.2±32.7	271.9±16.9

(b)

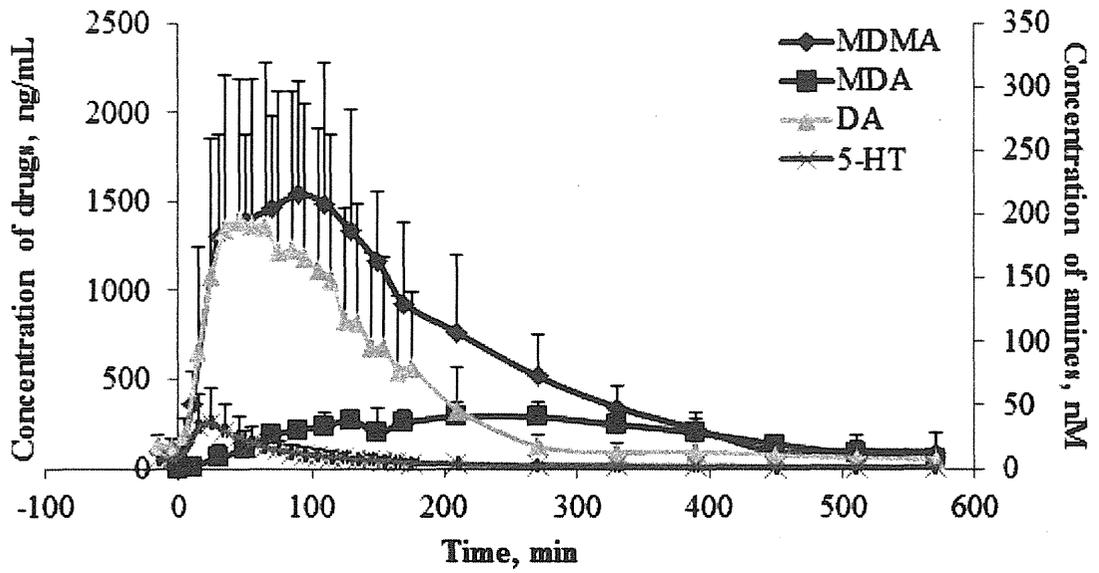
	MP 10 mg/kg	MDMA 12 mg/kg +MP 10 mg/kg
<i>MP</i>		
C_{max} , ng/mL	2757.1±626.0	2675.1±594.3
T_{max} , min	45.0±10.0	110.0±36.5 [†]
$T_{1/2}$, min	70.4±20.8	117.6±34.6
AUC, $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$	401.8±213.6	671.7±151.2
MRT, min	123.0±17.4	210.3±6.5 [†]
CL, mL/min	8.8±4.0	4.6±1.1
<i>AP</i>		
C_{max} , ng/mL	452.0±81.8	580.5±51.2 [†]
T_{max} , min	115.0±44.3	270.0±0.0
$T_{1/2}$, min	109.3±32.3	309.0±143.8 [†]
AUC, $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$	98.2±23.3	217.4±27.4 [†]
MRT, min	187.4±34.2	301.4±7.2 [†]

Data are expressed as mean±SD.

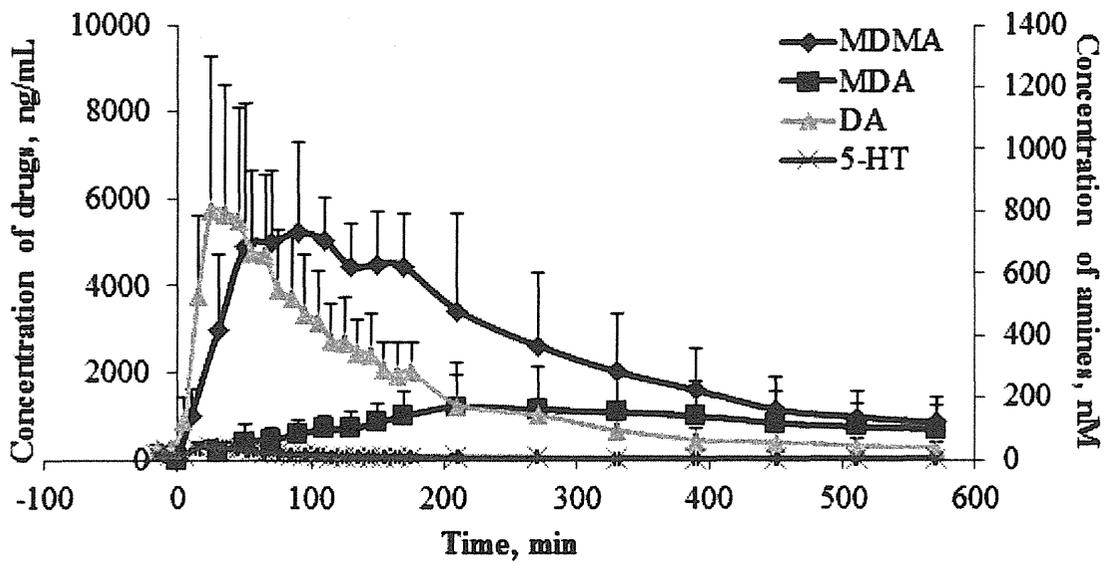
* $P<0.05$ vs. MDMA (12 mg/kg) + saline group (Scheffe's multiple comparison test), [†]

$P<0.05$ vs. MP (10 mg/kg) + saline group (Student's *t*-test).

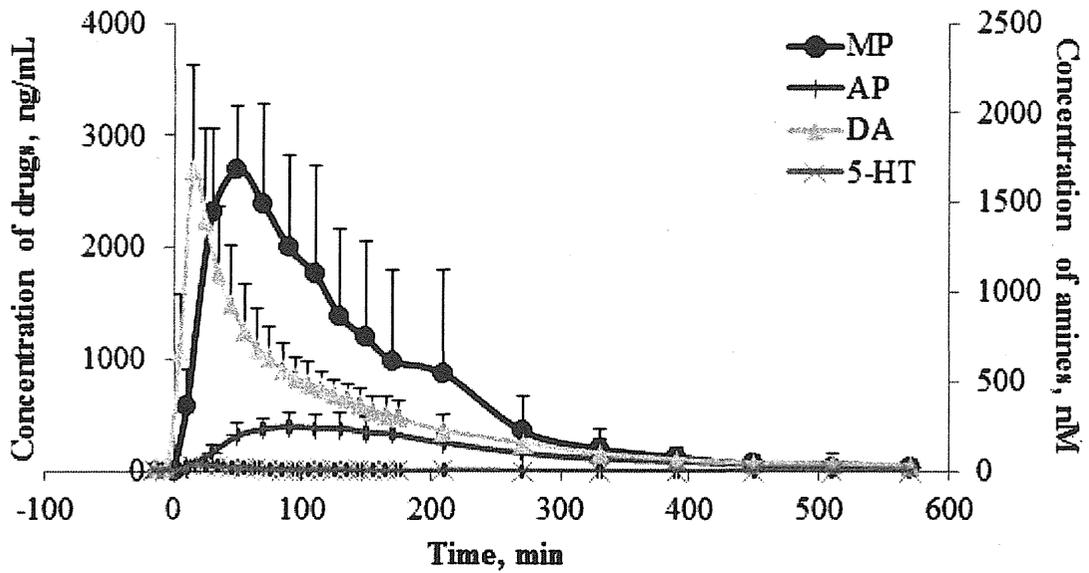
(a)



(b)



(c)



(d)

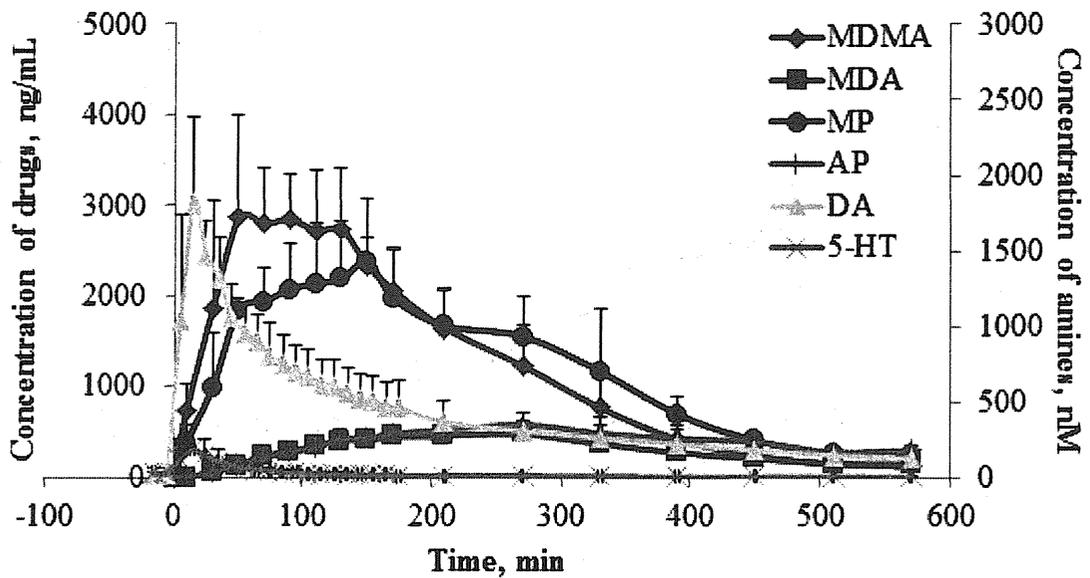
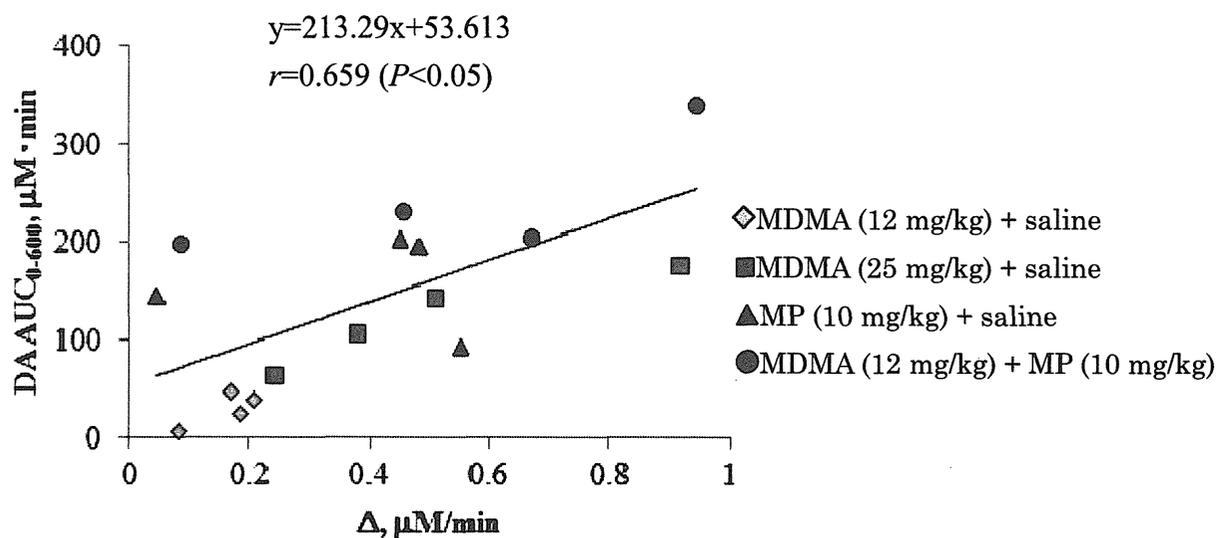


Fig. 5 Time-concentration profiles of drugs and amines after a single administration (*i.p.*) of (a) MDMA (12 mg/kg) + saline, (b) MDMA (25 mg/kg) + saline, (c) MP (10 mg/kg) + saline, and (d) MDMA (12 mg/kg) + MP (10 mg/kg). Each point represents the mean+SD (n=4).

(a)



(b)

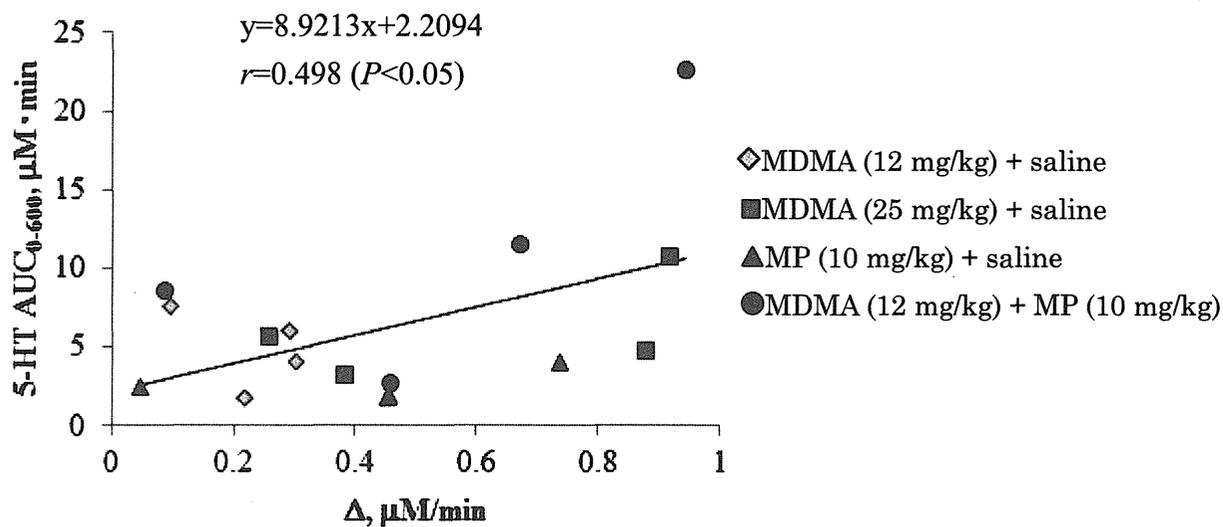


Fig. 6 Correlations between drugs and (a) DA, and (b) 5-HT in rat brain. $P<0.05$, Pearson's correlation coefficient.

「違法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究」

分担研究課題:植物系違法ドラッグ製品の基原種の特定
分担研究者:合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

—植物系違法ドラッグ製品の基原植物種の同定—

研究協力者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨:“合法ハーブ”と称する違法ドラッグ製品 48 製品の DNA 塩基配列を指標とした基原植物の同定を行った。48 製品中、最も検出された植物種は *Althaea officinalis* (マシュマロウ, ウスベニタチアオイ) で 28 製品から検出された。また、昨年まで最も検出されていた *Turnera diffusa* (ダミアナ) は、わずか 3 製品であった。今年度は大麻などの幻覚性植物は検出されなかった。

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 主任研究官

DNA 塩基配列を用いた製品中の植物片の基原種の調査を行った。

A. 研究目的

違法ドラッグ市場では、2008 年頃から「Spice」をはじめとして植物の乾燥物、粉砕物に、合成カンナビノイドを添加し「お香」と謳い販売する「脱法ハーブ」が社会問題化している。これら製品は「合法ハーブ」としてメディアにも数多く取り上げられ、ニュースや事件として連日報道されている。本研究機関ではこれまで違法ドラッグ対策を目的として、継続的に化学的¹⁻⁴⁾、分子生物学的⁵⁾手法を用いた製品分析を行っている。これまでに、分子生物学的手法を用いた解析では、DNA 塩基配列を用いた植物種の同定として、大麻 (*Cannabis sativa* L.)、指定薬物であるサルビアデイビノラム (*Salvia divinorum*)、幻覚性植物であるクラートン (*Mitragyna speciosa*) の混入を確認している⁵⁾。依然として違法ドラッグ市場において流通量の多い脱法ハーブ製品の実態調査として、

B. 研究方法

1. 実験材料

違法ドラッグ市場品としてインターネット上で販売されている「脱法ハーブ」製品 48 製品 (Product No. 1-48; 植物体乾燥 (刻み) 品) を使用した。Product No.1 は合法ハーブとして販売していたが、合成カンナビノイド等合成化合物が検出されなかった製品 (data not shown)。Product No. 2-6 および No. 12-19 は、それぞれ、同一メーカーで製品名が若干異なる製品群。

2. 実験方法

製品に混入されている植物片を目視により、同一器官、組織に外観の形状から分類可能なものについては分離した。

各試料を液体窒素で凍結させた後、MM-300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した各試料は Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega) 内の溶出液に溶解し、Maxwell 16

(Promega)を用い DNA を抽出・精製した。回収 DNA 溶液, 各 200 μ L 中の 1 μ L を PCR 反応に用いた。これを鋳型として葉緑体 DNA 上の *rbcL*, *matK*, *trnL-trnF*, *trnH-psbA* および、核リボゾーマル DNA 上の ITS 領域を, 各領域で保存性の高い配列を基にしたプライマー⁶⁻⁸⁾を用い, Ex Taq (Takara)および Ampdirect plus (Shimadzu)を使用して, PCRによって各領域の増幅を以下のプログラムで行った(95°C 180 sec; 94°C 30 sec, 52°C 30 sec, 72°C 90 sec, 35 cycle; 72°C, 300 sec)。アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認後, シングルバンドについてはポリエチレングリコール (PEG)沈殿後, ダイレクトシーケンスを行った。また, バンドが複数確認できる場合は, PEG 沈殿後, Mighty TA-cloning Kit (Takara) を用い, ベクターライゲーション後, 塩基配列を決定した。Cycle Sequence 反応には, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い, 解析は ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI)を使用した。用いたプライマーを以下に示す。

rbcL forward primer;

5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3',

rbcL reverse primer;

5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3', *matK* forward primer;

5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3', *matK* reverse primer;

5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC-3', ITS forward primer;

5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',

ITS reverse primer;

5'-CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG-3',

trnL-trnF forward primer;

5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3', *trnL-trnF* reverse primer;

5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3',

trnH-psbA forward primer;

5'-ACTGCCTTGATCCACTTGGC-3',

trnH-psbA reverse primer;

5'-CGAAGCTCCATCTACAAATGG-3'.

C. 研究結果

1. 塩基配列解析

植物の鑑別・同定に使われる葉緑体 DNA 上の 4 領域および核ゲノムの ITS 領域を, 植物共通プライマーを用い増幅後, 各増幅産物の塩基配列を決定し, 国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) および BOLD systems (http://www.boldsystems.org/views/idrequest_plants.php) に登録されている配列と比較した。

表 1 に今回検出された DNA より推定される植物種(学名)を示す(上記, 分析 DNA 5 領域中, 2 領域以上で高い相同性を示した種(学名))。また, 種名が明確にできないものについては, 属名 (sp.)のみを示した。48 製品で最も検出された植物種は *Althaea officinalis* (マシュマロウ, ウスベニタチアオイ) (28 製品)で, 昨年まで最も検出されていた *Turnera diffusa* (ダミアナ)は, わずか 3 製品であった。8 製品から花卉, もしくは花の乾燥物が検出された(図 1)。これら検出された組織片と, その DNA から同定された植物種の形態的特徴は一致した。また, 今年度新規検出植物種について, 解析した DNA 領域およびその相同性検索結果を表 2 に示した。Product No. 34 の各 DNA 分析結果において, *matK* 領域では, アオギリ科の *Waltheria indica* と 100%の相同性を示した。*trnL-trnF* 領域の相同性検索結果は, 同科の *Rulingia parviflora* と最も高い相同性を示したが, その数値自体は低いものであった(452/488)。*Waltheria* 属の *trnL-trnF* 領域の配列はデータベースに登録されていない。また, ITS 領域の解析結果では, *matK* 領域同様, *Waltheria indica* と高い相同性を示すが, 数値自体は低い値を示した。これらのことから, アオギリ科の *Waltheria* 属であるが別種である可能性も示唆された。表 2 の塩基配列解析結果から, 各製品の植物種を決定した(表 1)。

D. 考察

違法ドラッグ市場に流通する合法ハーブと称する48製品中の植物片の基原種同定を行った。

近年の傾向としてはダミアナ(*Turnera diffusa*)の混入が顕著であったが、今年度はウスベニタチアオイ(*Althaea officinalis*)が最も検出される植物種であった(48製品中28製品)(表1)。また、1製品中の植物種の種類も減少(1製品1植物種)したが、Product No. 30, 31のように*Althaea officinalis*の葉や茎が内容物のほとんどであるが、その中に少量の花弁、Product No. 30であれば*Calendula officinalis*(黄色花弁)、Product No. 31であれば、*Nymphaea nouchali*(青色花弁)を添加するような製品が見られた(48製品中8製品)。また、Product No.7のように葉や茎は*Althaea officinalis*(緑色)で、花弁は*Calendula officinalis*(黄色花弁)、*Carthamus tinctorius*(赤色花弁)、*Centaurea cyanus*(青色花弁)のような形態の製品も見られた(表1, 図1)。これら植物片のほとんどは西欧など海外では「ハーブティー」として利用され、ネットなどでも購入可能であり、その植物の形態も合法ハーブ中に見られる植物片の形状と類似していた。

また、表2に新規に脱法ハーブの植物片として流通が確認された植物種を示した。Product No. 11では*Nepeta cataria*が検出された。Catnip(イヌハッカ)として、マタタビ同様、ネコが好む植物として知られており、これは成分中のNepetalactoneによるものと考えられている⁹⁾。また、エッセンシャルオイルや食品としての流通も見られるが、“PLANTS OF THE GODS”ではダミアナ同様、大麻の代用品であったと書かれている¹⁰⁾。*Tussilago farfara*(フキタンポポ)は成分中にpyrrolizidine alkaloid¹¹⁾を含むとされ、日本では専ら医薬品収載植物である。Product No. 34の*Waltheria indica(americana)*はアオギリ科の多年草で英名をsleepy morning, florida waltheriaといい、マラリアの煎じ薬(伝統薬)として使用されている¹²⁾。また、*W. americana*には成分としてアル

カロイドが報告されている¹³⁾。*Amaranthus retroflexus*はヒユ科のアオゲイトウで、海外では若芽、若葉は食品などに利用されているが、腎毒性があるとの報告がある¹⁴⁾。今回検出されたDNAは種子由来であった。植物体からは検出されなかった。

E. 参考文献

- 1) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., Haishima, Y., Goda, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 439–441 (2009).
- 2) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Ogata, J., Goda, Y., *Forensic Science International*, **198**, 31–38 (2010).
- 3) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Toxicol.*, **29**, 25–37 (2011).
- 4) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 21–32 (2013).
- 5) Ogata, J., Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 33–41 (2013).
- 6) CBOL Plant Working Group, *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 12794 – 12797 (2009).
- 7) Stanford, M. A., Harden, R., Parks, C. R., *American Journal of Botany* **87**, 872–882 (2000).
- 8) Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., *Plant Mol. Biol.* **17**, 1105–1109 (1991).
- 9) Sakurai, K., Ikeda, K., Mori, K., *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2369–2371 (1988).
- 10) Schultes, R. E., Hoffmann, A., Raetsch, C., *In Plants of the Gods, Healing Arts Press, Rochester, Vermont* (1992).
- 11) Röder, E., Wiedenfeld, H., Jost, E. J., *Planta Med.* **43**, 99–102 (1981).
- 12) Jansen, O., Angenot, L., Tits, M., Nicolas, J. P., De, Mol. P., Nikiéma, J. B., Frédéricich, M.,