

分担研究課題:違法ドラッグ成分の中枢に及ぼす作用評価

分担研究者: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

研究協力者:小早川 令子 (公財)大阪バイオサイエンス研究所神経機能学部門・研究室長

—大麻主活性成分 $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol( $\Delta^9$ -THC)の  
神経活動マーカー遺伝子(*c-fos* m-RNA)発現への影響—

研究要旨: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、これら違法ドラッグの中枢神経系に及ぼす作用を評価する方法として、マウスの全脳を用いて、大脳における神経活動マーカー遺伝子(*c-fos* m-RNA)の発現に及ぼす作用を検討することとした。本研究では、まず、大麻の主活性成分である代表的カンナビノイド: $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol( $\Delta^9$ -THC, 麻薬)の *c-fos* 発現への影響を検討した。

その結果、 $\Delta^9$ -THC を投与したマウスでは投与しなかったマウスに比較して、扁桃体や分界条床核における神経活動マーカー遺伝子の発現が上昇するのに対して、大脳における神経活動マーカー遺伝子の発現が低下する傾向が認められた。扁桃体や分界条床核は情動が誘発する行動を制御すると考えられているのに対して、大脳は思考や判断に基づいた行動の制御に関与すると考えられている。 $\Delta^9$ -THC 投与が誘発する神経活動マーカーの変動と、脳の機能から推測すると、 $\Delta^9$ -THC は情動が突き動かす行動を制御する脳領域の活動を強力に上昇させる一方で、思考や判断に基づいた行動を制御する脳領域の神経活動を低下させている可能性がある。もし、この可能性が正しいのであれば、 $\Delta^9$ -THC の投与は理性的な判断を失わせ、衝動的な行動を誘発する可能性がある。従って、今後、様々な薬剤を投与した条件で、大脳の神経活動と、扁桃体や分界条床核の神経活動を解析することで、その薬剤が衝動的な行動を誘発するリスクを評価できる可能性がある。

研究協力者

裏出 良博 (公財)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

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。これまで我々は、違法ドラッグ成分の中枢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きた<sup>1-6)</sup>。さらに今回、これら違法ドラッグの中枢神経系に及ぼす作用を評価する新たな方法として、マウスの全脳を用いて、大脳における神経活動マーカー遺伝子(*c-fos* m-RNA)の発現に及ぼす作用を検討することとした。本研究では、まず、大麻の主活性成分である代表的カンナビノイド: $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol( $\Delta^9$ -THC, 麻薬)の *c-fos* 発現への影響を検討した。

## B. 研究方法

$\Delta^9$ -THC (Cerilliant 社製) は, Ethanol/emurphor® EL-620 (GAF Chemical, Wayne, NJ)/生理食塩水 (1/1/18) の溶媒に溶解させた. Vehicle として, 上記溶媒 Ethanol/emurphor® EL-620/生理食塩水 (1/1/18) を用いた.

日本 SLC から購入した約 9 週齢の雄の C57/BL6 マウスを, 1 匹ずつテストケージに移し, 実験環境で約 2 時間馴化を行った. 馴化後,  $\Delta^9$ -THC (10 mg/kg) 又は vehicle を腹腔内に注射し (各 n=2), 60 分後にマウスをイソフルラン麻酔し, 4% パラホルムアルデヒドで還流固定後, 脳を摘出した. 摘出した脳は 4% パラホルムアルデヒドで一晩後固定したのちに, パラフィンブロックを作成し, 自動パラフィン切片作製装置 (KURABO, AS-200S) を用いて 5  $\mu$ m の切片を作成した. 切片は, 4枚の連続切片を 50  $\mu$ m 毎に作成し, これを全脳にわたって行った. 得られた切片は自動 *in situ* Hybridization 装置 (Roche, VENTANA XT) を用いて *c-fos* mRNA の発現を検出した.

(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

### 【扁桃体における *c-fos* mRNA の発現】

図 1 に, vehicle および  $\Delta^9$ -THC を投与したマウスの扁桃体における *c-fos* mRNA の発現を示した. 左図 (a, c) は扁桃体の全体を, 右図 (b, d) は扁桃体中心核を拡大して示した.  $\Delta^9$ -THC 投与マウス (c, d) においては, vehicle 投与マウス (a, b) に比較して扁桃体中心核 (CeA) において *c-fos* mRNA の発現が顕著に亢進していることが明らかになった.

### 【分界条床核における *c-fos* mRNA の発現】

図 2 に, vehicle および  $\Delta^9$ -THC を投与したマウスの分界条床核における *c-fos* mRNA の発現を

示した. 左図 (a, c) は左右の分界条床核を含む低倍率の画像を, 右図 (b, d) は一方の分界条床核部分を拡大した画像を示している.  $\Delta^9$ -THC 投与マウス (c, d) においては, vehicle 投与マウス (a, b) に比較して分界条床核の側方領域において, *c-fos* mRNA の発現が顕著に亢進していることが明らかになった.

### 【扁桃体中心核における *c-fos* mRNA の発現の個体間の比較】

図 3 に, vehicle および  $\Delta^9$ -THC を投与したマウス各 2 個体に関して, 扁桃体中心核における *c-fos* mRNA の発現を示した.  $\Delta^9$ -THC を投与した #1, #2 のいずれの個体 (c, d) も, control #1, #2 の個体 (a, b) に比較して *c-fos* mRNA の顕著な発現亢進が観察された.

### 【分界条床核における *c-fos* mRNA の発現の個体間の比較】

図 4 に, vehicle および  $\Delta^9$ -THC を投与したマウス各 2 個体に関して, 分界条床核における *c-fos* mRNA の発現を示した.  $\Delta^9$ -THC を投与した #1, #2 のいずれの個体 (c, d) も, control #1, #2 の個体 (a, b) に比較して, 分界条床核側方領域における *c-fos* mRNA の顕著な発現亢進が観察された.

## D. 結論

本研究において,  $\Delta^9$ -THC を投与したマウスでは投与しなかったマウスに比較して, 扁桃体や分界条床核における神経活動マーカー遺伝子の発現が上昇するのに対して (図 1~4), 大脳における神経活動マーカー遺伝子の発現が低下する傾向が認められた (data not shown). 扁桃体や分界条床核は情動が誘発する行動を制御すると考えられているのに対して, 大脳は思考や判断に基づいた行動の制御に関与すると考えられている.  $\Delta^9$ -THC 投与が誘発する神経活動マーカーの変動と, 脳の機能から推測すると,  $\Delta^9$ -THC は情動が突き動かす行動を制御する脳領域の活動を強力に上昇させる一方で, 思考や判断に基づいた

行動を制御する脳領域の神経活動を低下させている可能性がある。もし、この可能性が正しいのであれば、 $\Delta^9$ -THC の投与は理性的な判断を失わせ、衝動的な行動を誘発する可能性がある。様々な薬剤を投与した条件で、大脳の神経活動と、扁桃体や分界条床核の神経活動を解析することで、その薬剤が衝動的な行動を誘発するリスクを評価できる可能性がある。

従って、今後さらに、興奮薬、鎮静薬、幻覚薬等の薬物に関して中枢神経への影響を検討し、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) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「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」平成 19 年度研究分担報告「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」(裏出良博, 内山奈穂子)
  - 2) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「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」平成 20 年度研究分担報告「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」(裏出良博, 内山奈穂子)
  - 3) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 21 年度研究分担報告「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
  - 4) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 22 年度研究分担報告「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究(2)」(裏出良博, 内山奈穂子)
  - 5) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 23 年度研究分担報告「麻薬成分ケタミン誘導体:メトキセタミンのラット脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
  - 6) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Matsumoto N., Huang Z.L., Urade Y., Goda Y. Effects of synthetic cannabinoids on electroencephalogram power spectra in rats. *Forensic Sci. Int.* (2012) 215:179-183.
- F. 健康危険情報:特になし.
- G. 研究発表:特になし.
- H. 知的財産権の出願・登録状況:特になし.

### *c-fos* mRNA detection in the Amygdala

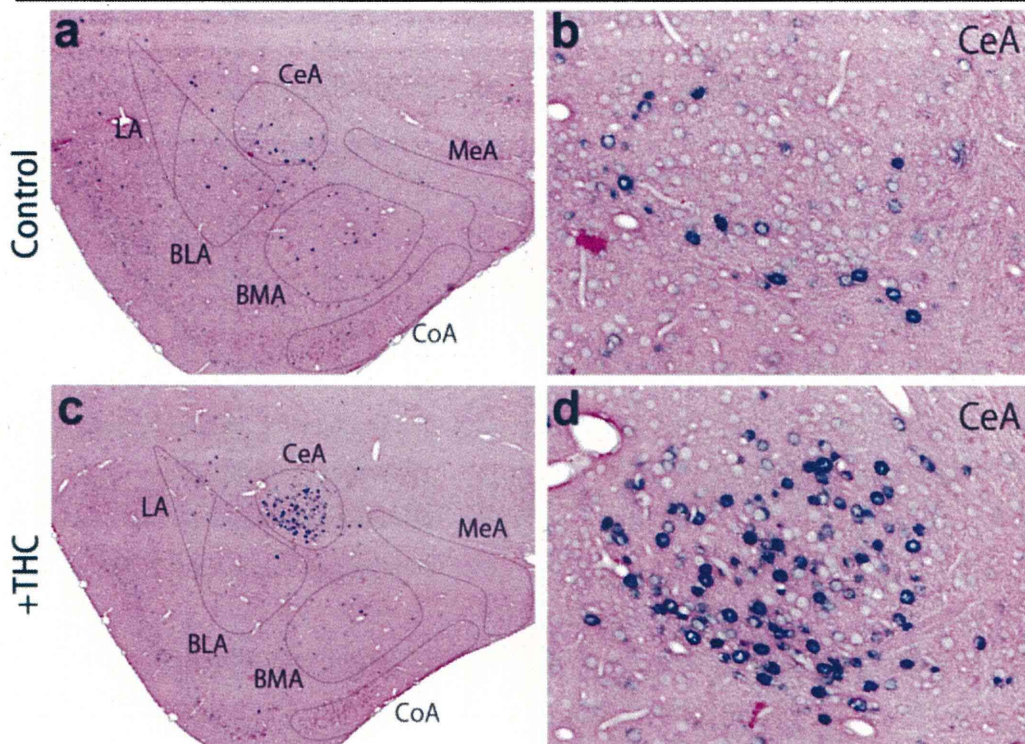


図 1. 扁桃体における *c-fos* mRNA の発現

CeA: central amygdala; LA: lateral amygdala; BLA: basolateral amygdala; BMA: basomedial amygdala; MeA: medial amygdala; CoA: cortical amygdala.

### *c-fos* mRNA detection in the Bed nucleus of the stria terminalis (BNST)

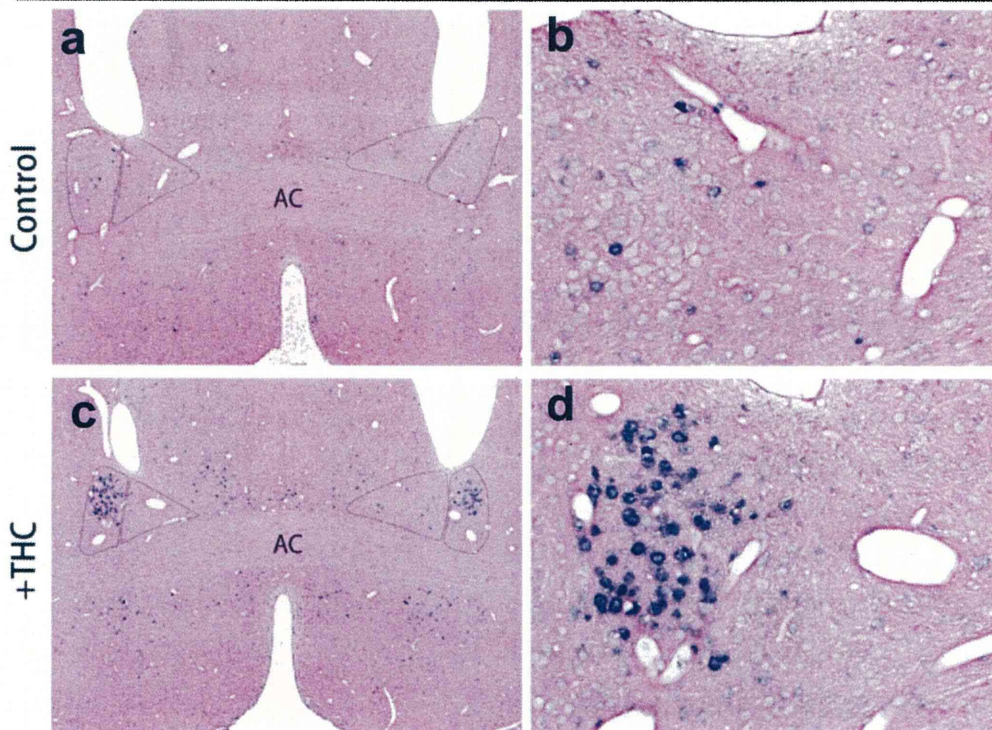


図 2. 分界条床核における *c-fos* mRNA の発現

AC: anterior commissure



## Amygdala

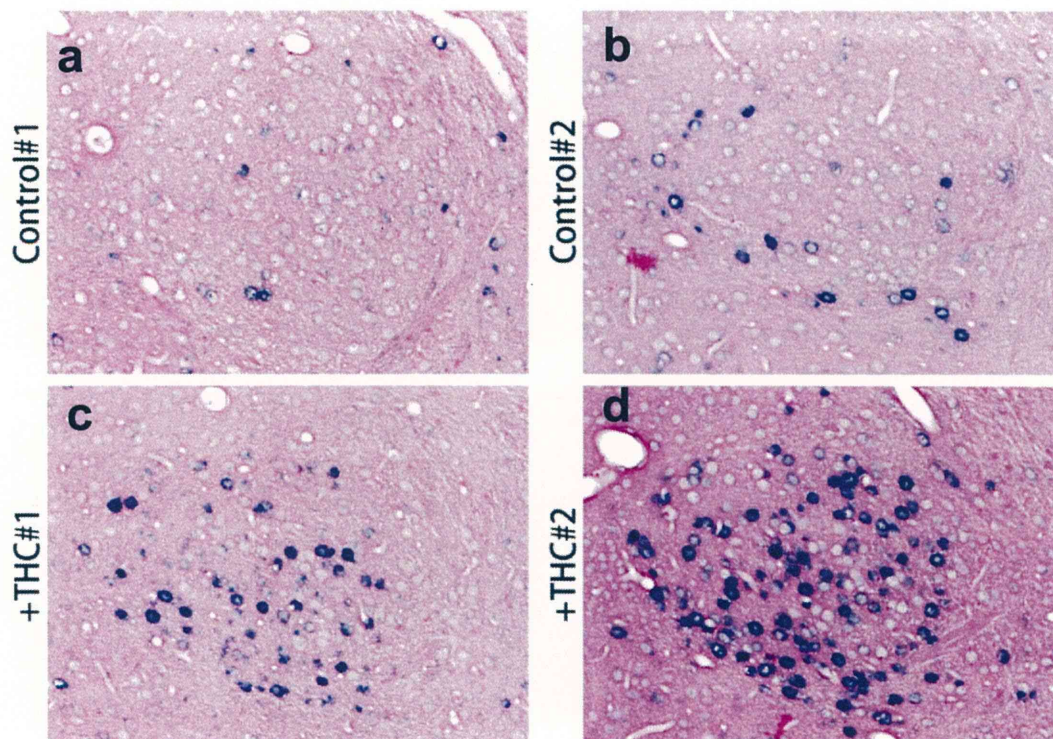


図 3. 扁桃体中心核における *c-fos* mRNA の発現の個体間の比較

## Bed nucleus of the stria terminalis (BNST)

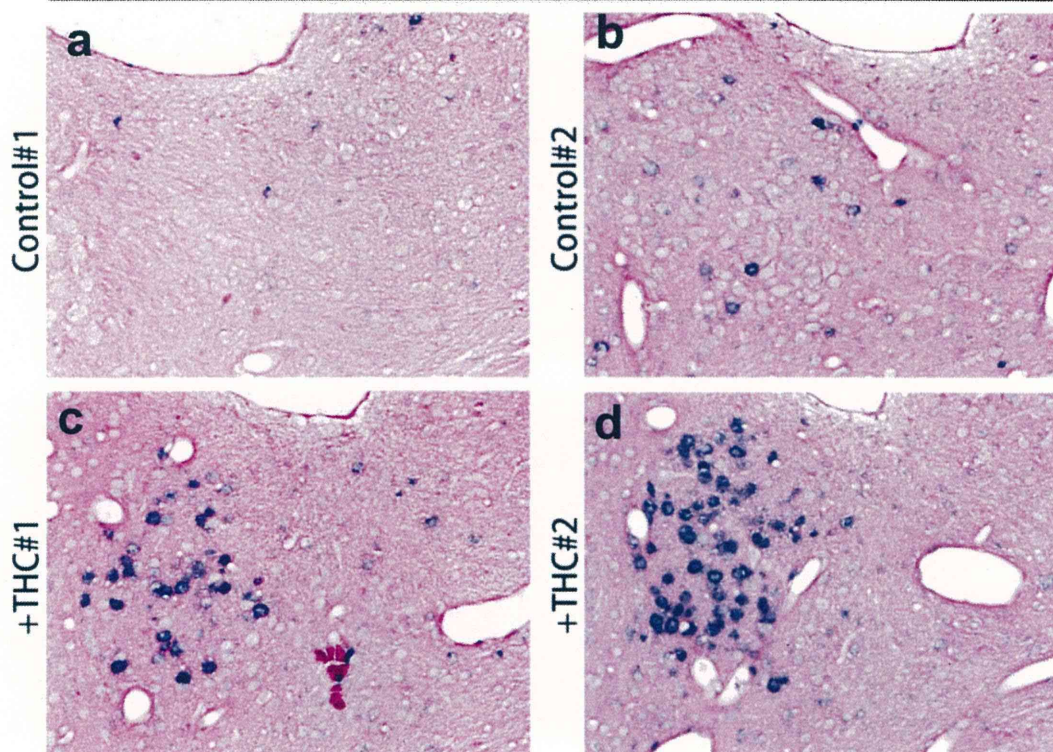


図 4. 分界条床核における *c-fos* mRNA の発現の個体間の比較

分担研究課題：違法ドラッグの分析に関する研究

分担研究者：豊岡 利正 静岡県立大学薬学部 教授

ーヒト肝ミクロソームを用いた違法ドラッグの代謝物予測に関する研究ー

研究要旨： 指定薬物等、様々な違法ドラッグが市場に出回っており、社会問題となっている。しかし、これらの薬物に対する生体内代謝物質に関する情報は少ない。本研究では、違法ドラッグの代謝に着目し、ヒト肝ミクロソーム画分を用いてインダゾールアミド系 3 種類、インドール酢酸エステル系 2 種類、チオフェン系 1 種類について代謝実験を行った。反応後 UPLC-MS/MS で測定することにより、その分子量に相当する  $m/z$  値から構造を予測した。さらに代謝物予測ソフトを用いて、その推定構造の妥当性を考察した。その結果、インダゾールアミド系およびチオフェン系では水酸化体、インドール酢酸エステル系では加水分解によるカルボン酸体が代謝物であることが明らかとなり、代謝物検索ソフトを用いた予測とほぼ相違ないことを確認した。

A. 研究目的

近年、麻薬・覚せい剤類の代用として、様々な化学物質や植物が乱用され、これらの製品はいわゆる「違法ドラッグ」と呼ばれ、健康被害や社会的弊害が懸念されている。違法ドラッグ市場で取り扱われる化合物は、法的な規制を逃れるため多様化し、一定の基本骨格を持つ様々な新規構造類似化合物が流通しており、幻覚作用や興奮作用、多幸感を標榜し、薬理作用が麻薬と類似しているものも多い。

違法ドラッグは 1998 年頃からアダルトショップ、インターネット等の通信販売などで「合法ドラッグ」「脱法ドラッグ」などと称して半ば公然と販売されている。違法ドラッグは、薬事法違反である疑いが強いにもかかわらず、麻薬や向精神薬に指定された成分は含有していないため、その乱用がますます拡大する傾向にある。2011 年度以降、これまで以上に多種多様な化合物が次から次へと出現し、日本においても違法ドラッグが関与し

た健康被害や自動車事故等の他害事件・事故が急増している。このような違法ドラッグ問題に対応すべく、厚生労働省は 2012 年度だけで、34 化合物を指定薬物に、10 化合物を麻薬に指定すると共に、「包括指定」を新たに取り入れ、一気に 760 化合物を指定薬物に加えた。さらに 2013 年 12 月時点の指定薬物数は、1362 化合物となっている。このように、違法ドラッグ市場では、構造の一部を変え多様化しているにもかかわらず、生体内代謝に関する情報は少ない。そこで、指定薬物の代謝に着目し、ヒト肝ミクロソーム画分を用いてインダゾールアミド系違法ドラッグ 3 種類、インドール酢酸エステル系違法ドラッグ 2 種類、チオフェン系違法ドラッグ 1 種類について代謝実験を行った。反応後 LC-MS/MS で測定することにより、その分子量に相当する  $m/z$  から構造を予測した。さらに代謝物予測ソフトを用いて、その推定構造の妥当性を考察した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

インダゾールアミド系違法ドラッグ 3 種類  
(*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-(4-fluorobenzyl)-1*H*-indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA),  
*N*-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1*H*-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA)),  
インドール酢酸エステル系違法ドラッグ 2 種類  
(quinolin-8-yl 1-pentyl-(1*H*-indole)-3-carboxylate (QUPIC), quinolin-8-yl 1-(5-fluoropentyl)-(1*H*-indole)-3-carboxylate (5F-QUPIC)),  
チオフェン系違法ドラッグ 1 種類 ( $\alpha$ -pyrrolidino valerothiophenone ( $\alpha$ -PVT)) (Fig. 1)は, 国立医薬品食品衛生研究所より入手した.

QUPIC, 5F-QUPIC の代謝物の標品  
(1-pentyl-1*H*-indole-3-carboxylic acid ( $C_{14}H_{17}NO_2$ ), 1-(5-fluoropentyl)-1*H*-indole-3-carboxylic acid)は, Cayman Chemical. Co. より購入した.

肝ミクロソームは BD Biosciences 社のウルトラプール 150 ドナープールドヒト肝ミクロソーム, NADPH, A および B 再生溶液, リン酸バッファーは全て BD Biosciences 社から購入した. ギ酸, ジメチルスルホキシド, 移動相に用いた LC-MS 用アセトニトリル(ACN)は関東化学から購入した. ソフトウェアは MarkerLynx<sup>TM</sup>XS および MetaboLynx<sup>TM</sup>XS を使用した.

### 2. 代謝実験

ジメチルスルホキシドに溶解した薬物(5 mM) 2  $\mu$ L に, 0.5 M リン酸緩衝液(pH 7.4) 400  $\mu$ L, NADPH 再生溶液 A 100  $\mu$ L, NADPH 再生溶液 B 20  $\mu$ L および精製水 1426  $\mu$ L を加え, 37°C で 5 分間振とうした. その後, 肝ミクロソーム(含量 0.5 mg) 50  $\mu$ L を加え, 60 分間振とう反応後, 停止剤

として, ACN 2 mL を加え, 氷中に静置した. その後, 遠心分離(2,600g, 10 min)し, 上清を 1 mL 分取した. 上清を濃縮し, 100  $\mu$ L の UPLC 用初期移動相に溶解したのち LC-MS/MS 分析用試料とした. その 2  $\mu$ L(基質の物質量は 50 pmol)を注入し, 代謝物を検索した.

### 3. UPLC-ESI-MS/MS

代謝物の測定には, 超高速 LC-ESI-MS/MS 分析システム(UPLC-ESI-MS/MS)を採用した. 測定機器には, 超高速 LC として Waters ACQUITY Ultra Performance LC(送液ポンプ, カラムオープン, オートサンプラー), カラムに ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7  $\mu$ m, 2.1 $\times$ 100 mm, Waters)を使用した. カラム温度 40°C, サンプル温度 10°C, 流速 0.3 mL/min, 移動相には 0.1%ギ酸を含む水(A)と 0.1%ギ酸を含む ACN (B)の混合溶媒を使用し, 傾斜勾配溶出法に分析した. 溶出条件は, B%:5% (0~1 min), 5-95% (1~11 min)で行った.

MS/MSとして Waters Xevo<sup>TM</sup> TQ-S, 自動解析ソフトとして MassLynx XS を使用した. MS/MS 測定はエレクトロスプレーイオン化(ESI)法の positive ion mode (ESI<sup>+</sup>) および negative ion mode(ESI<sup>-</sup>), キャピラリー電圧 3000 V, コーン電圧 30 V, コリジョン電圧 25 V, 脱溶媒温度 500°C で行い, 測定範囲は *m/z* 50-500 とした.

## C. 研究結果

Figs. 2-7 に代謝実験前後のマスキロマトグラム, それぞれの溶出時間における MS/MS スペクトルおよびこれらの結果から予想される代謝物の推定構造式を示した. 最上段のクロマトグラムは左右 2 つが 1 セットで左図は代謝操作をしていない薬物, 右図は代謝操作を行った薬物の選択的イオンモニタリングによるクロマトグラムを示している. その下にはクロマトグラムで示された溶出時間における, 違法ドラッグおよびその代謝物の陽イオンモードでの MS/MS による各スペクトルと, 推測

されるフラグメントパターンを示した。

インダゾールアミド系の ADB-FUBINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA では、分子量が 16 増加した代謝物が測定されたことから、水酸化体が予想された。MS/MS スペクトルの結果から水酸化部位の同定を試みたところ、ADB-FUBINACA における陽イオンモードでは、フラグメントとして不顕在化している部分での水酸化を示唆する結果となった。従って、陰イオンモードでの測定を追加し、結果を最下段に示した。この結果より、1-アミノ-3,3-ジメチル-1-オキソブタンでの水酸化を受けた化合物が代謝物の推定構造式として挙げられた。同様の手順で AB-FUBINACA についても水酸化部位の予測を行った。また AB-PINACA については、異性体となる 2 つの水酸化物が予想されたのでフラグメントパターンを帰属したところ、ペンチル基および前者 2 種の化合物と同様の位置での代謝の可能性を示す結果となった(Figs. 2-4)。

インドール酢酸エステル系である QUPIC, 5F-QUPIC に関しては分子量が 127 減少した代謝物が測定されたことから、加水分解を受けたカルボン酸が予想された。カルボン酸についてはそれぞれの標品を入手することができたので、標品の選択的イオンモニタリングによるクロマトグラム, MS/MS スペクトルの順に代謝物のスペクトルの下に示した。これによってインドール酢酸エステル系 2 種では、加水分解反応が起こっていることが確認された(Figs. 5-6)。

$\alpha$ -PVT に関しては分子量が 16 増加した代謝物のピークが複数確認されたことから、水酸化を受けた化合物およびその異性体の存在が予想された。スペクトルを帰属したところ、 $\alpha$ -PVT については様々な位置での水酸化の可能性が挙げられた(Fig. 7)。

#### D. 考察

今回行った肝ミクロソームを使った微量薬物の代謝実験により、インダゾールアミド系薬物類は、

1-アミノ-3,3-ジメチル-1-オキソブタンでの水酸化を受けた化合物が推測された。また、インドール酢酸エステル系薬物類では加水分解による代謝物が観測された。チオフェン系薬物では、水酸化物の異性体である化合物が複数観測された。しかし、これらの構造は、あくまで推定構造式であり、標品等を別途合成し構造を確認しなければならない。ここに得られた結果を基に、代謝物が確定できれば、違法ドラッグの使用証明の一助となるものと期待される。

#### E. 結論

ヒト肝ミクロソームを用いて、インダゾールアミド系違法ドラッグ 3 種類、インドール酢酸エステル系違法ドラッグ 2 種類、チオフェン系違法ドラッグ 1 種類の代謝実験を行った。その結果、水酸化物や加水分解物といった代謝物の構造を予測することができた。今後は、ミクロソーム量や酵素反応の条件等を精査し、代謝物の収率をあげることと、それに伴って生成する新たな代謝物を確認することが必要と考えられる。本法は、微量で代謝物を予測することができるため、様々な薬物の代謝実験に応用できるものと示唆される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Takayama, T., Suzuki, M., Inoue, K., Todoroki, K., Min, J, Z., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Toyooka, T. UPLC-ESI-MS/MS based determination of metabolism of several new designated substances, ADB-FUBINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, QUPIC, 5F-QUPIC and  $\alpha$ -PVT, by human liver microsome. *Biomed. Chromatogr.*, in press,

##### 2. 学会発表

1) 鈴木麻友, 高山卓大, 轟木堅一郎, 井之上浩一, 関俊哲, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 豊岡利正: ヒト肝ミクロソームを用いた



UPLC-TQS-MS/MSによる違法ドラッグの代謝物探索研究, 第 11 回フィジカルファーマフォーラム 2013, 静岡(2013. 8).

- 2) 鈴木麻友, 高山卓大, 轟木堅一郎, 井之上浩一, 関俊哲, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 豊岡利正:in vitro 試験における LC/MS/MS を用いた違法ドラッグの代謝物構造予測, 日本薬学会第 134 年会, 熊本(2014. 3).

G. 知的財産所有の取得状況

なし

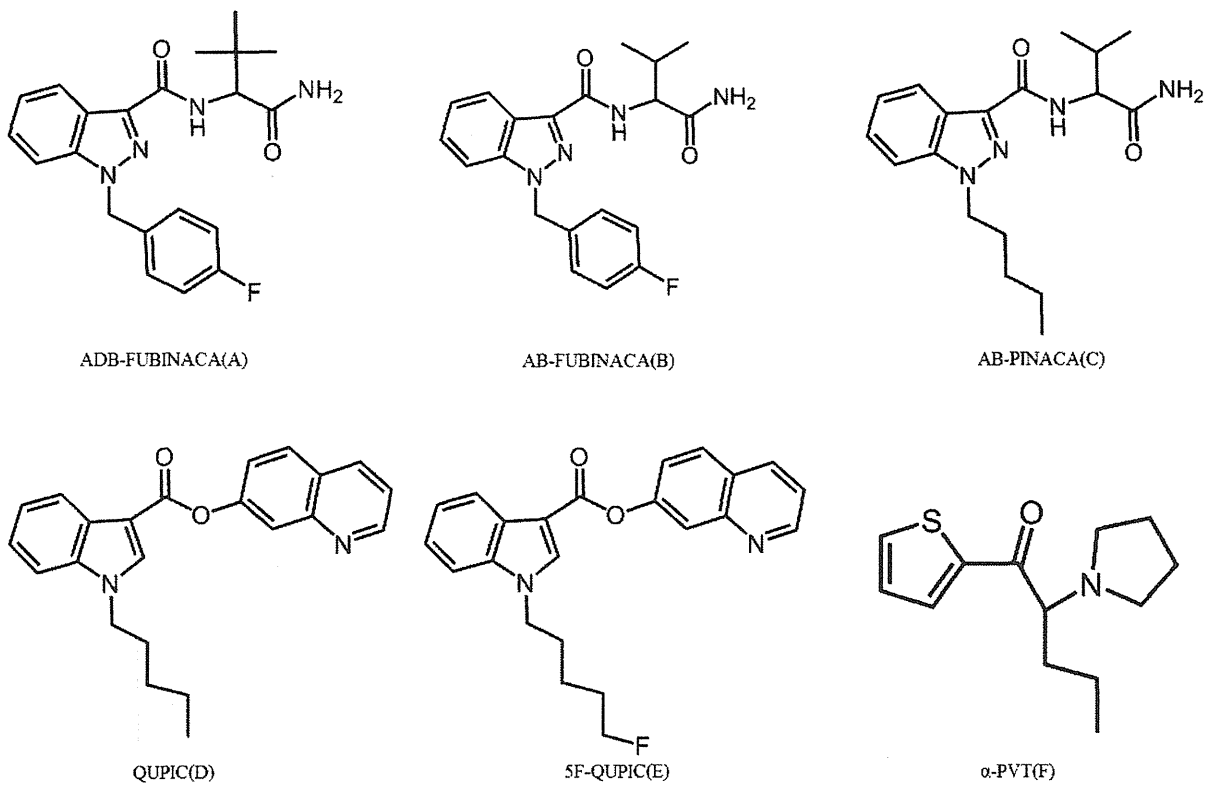


Fig. 1 Structure of the detected (A-F)

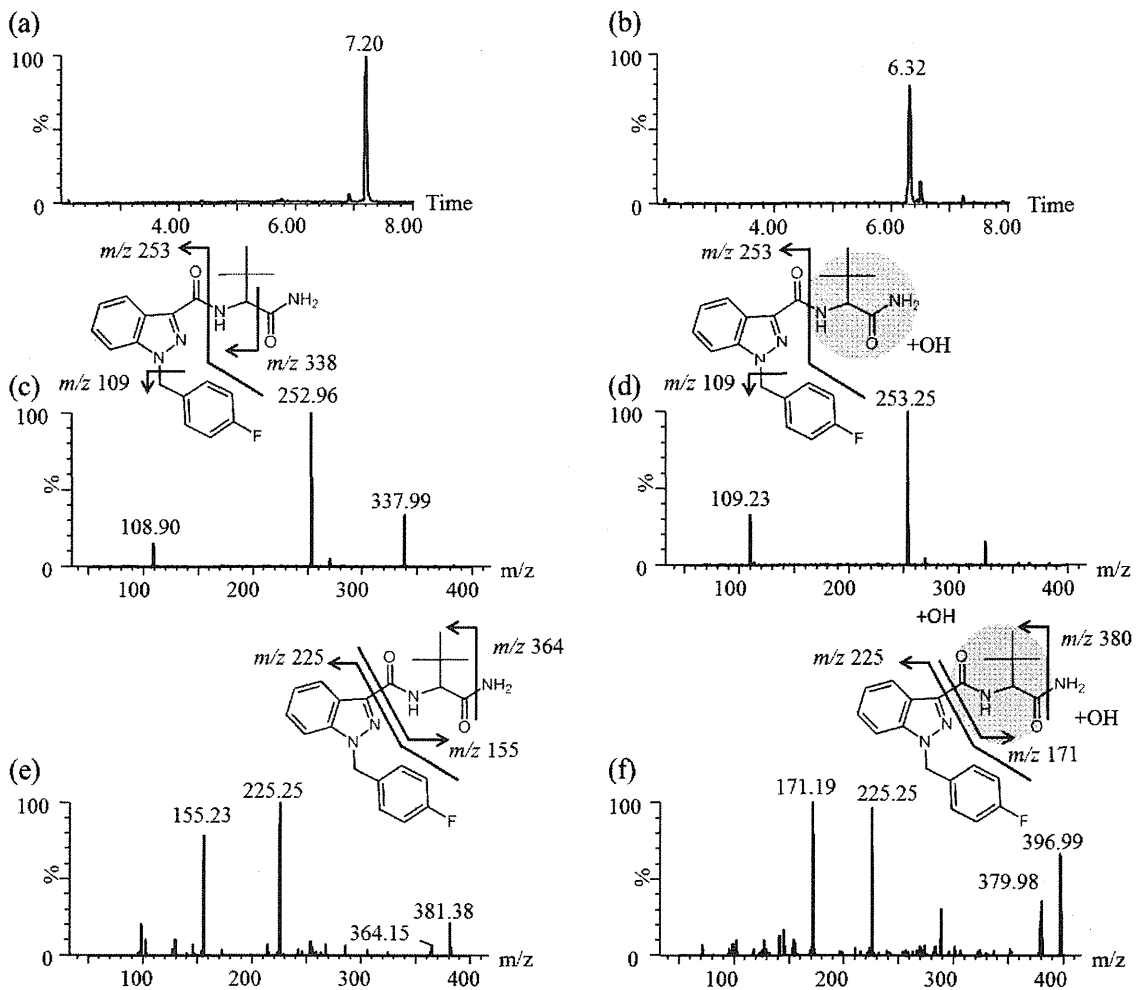


Fig. 2 LC/MS analysis of ADB-FUBINACA (A) metabolites by liver microsomes

(a) SIC of  $m/z=383[M+H]^+$ ; (b) SIC of  $m/z=399[M+OH]^+$ ; (c) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=383[M+H]^+$  from the peak at 7.20 min (positive ion mode); (d) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=399[M+OH]^+$  from the peak at 6.32 min (positive ion mode); (e) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=381[M-H]^-$  from the peak at 7.20 min (negative ion mode); (f) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=397[M+O-H]^-$  from the peak at 6.32 min (negative ion mode).

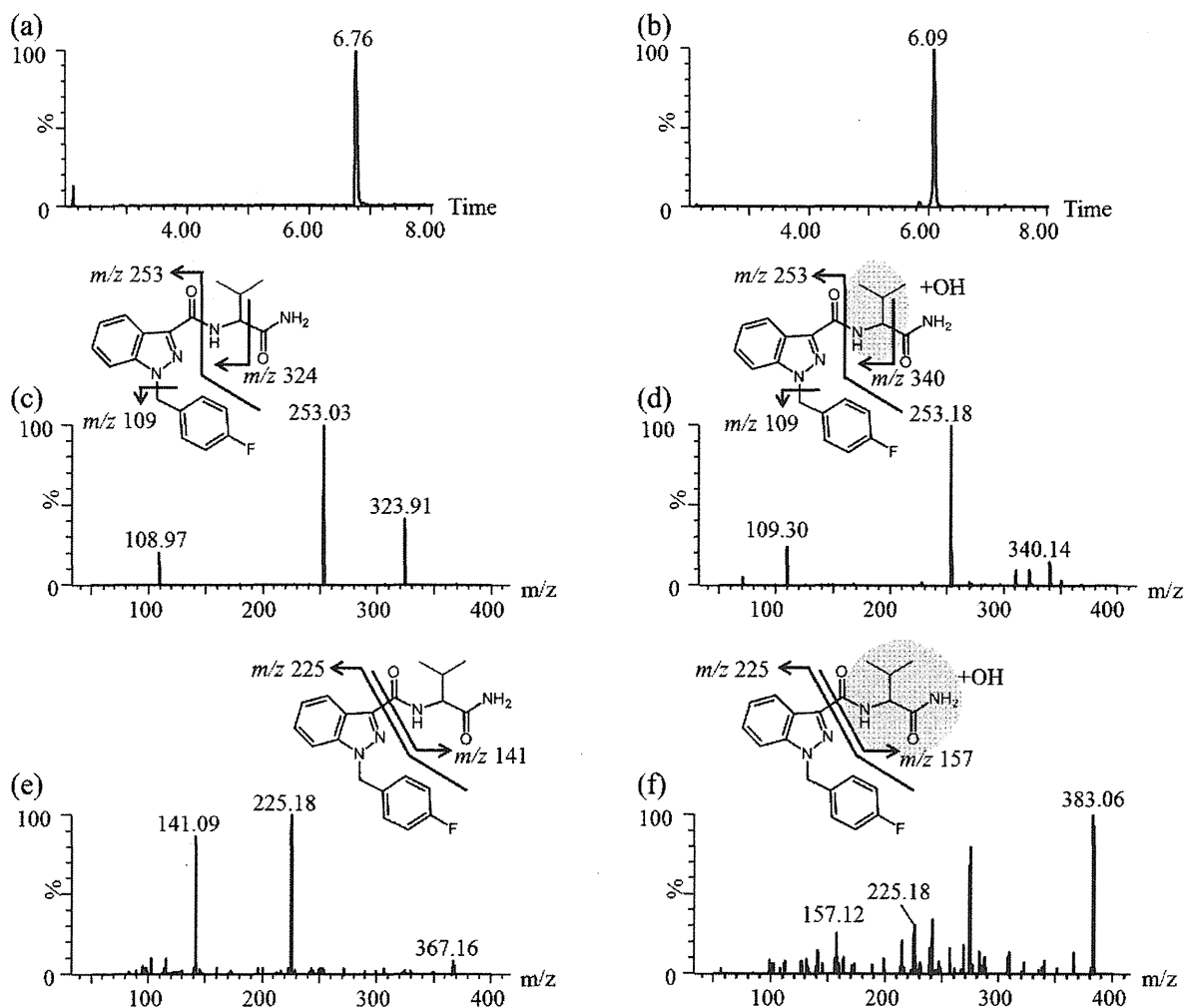


Fig. 3 LC/MS analysis of AB-FUBINACA (B) metabolites by liver microsomes

(a) SIC of  $m/z=369[M+H]^+$ ; (b) SIC of  $m/z=385[M+OH]^+$ ; (c) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=369[M+H]^+$  from the peak at 6.76 min (positive ion mode); (d) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=385[M+OH]^+$  from the peak at 6.09 min (positive ion mode); (e) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=367[M-H]^-$  from the peak at 6.76 min (negative ion mode); (f) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=383[M+O-H]^-$  from the peak at 6.09 min (negative ion mode).



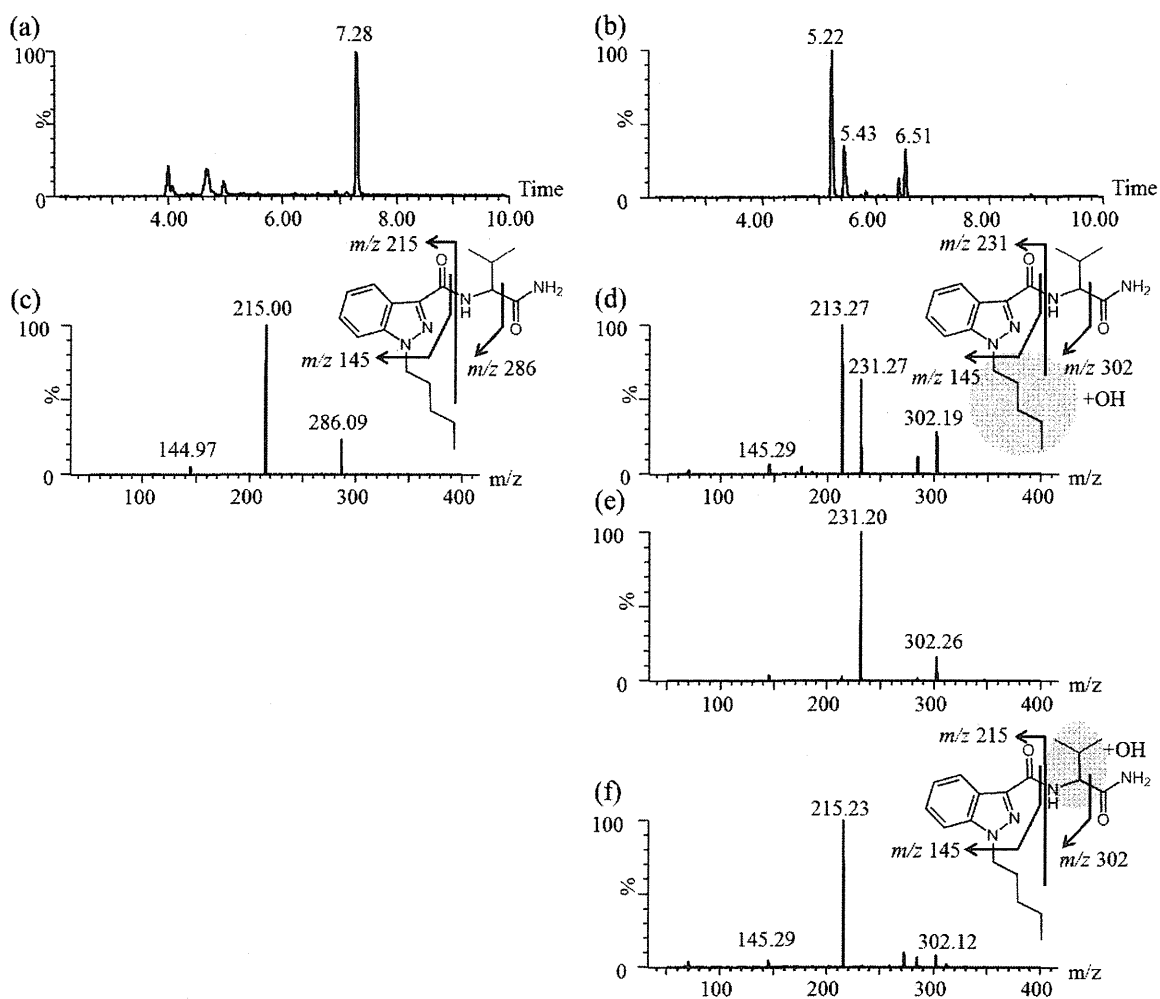


Fig. 4 LC/MS analysis of AB-PINACA(C) metabolites by liver microsomes

(a) SIC of  $m/z=331[M+H]^+$ ; (b) SIC of  $m/z=347[M+OH]^+$ ; (c) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=331[M+H]^+$  from the peak at 7.28 min (positive ion mode); (d) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=347[M+OH]^+$  from the peak at 5.22 min (positive ion mode); (e) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=347[M+OH]^+$  from the peak at 5.43 min (positive ion mode); (f) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=347[M+OH]^+$  from the peak at 6.51 min (positive ion mode).

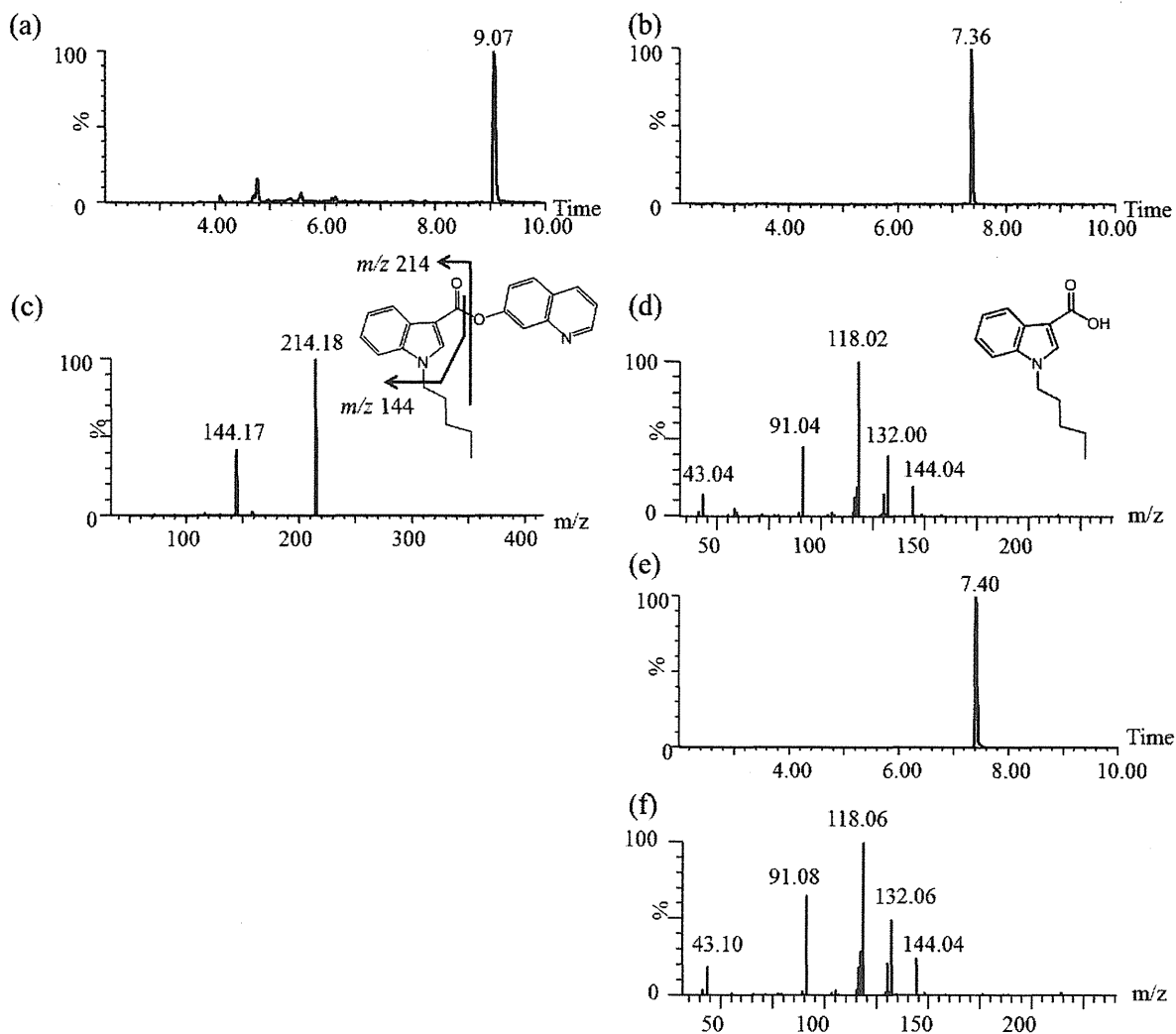


Fig. 5 LC/MS analysis of QUPIC (D) metabolites by liver microsomes

(a) SIC of  $m/z=359[M+H]^+$ ; (b) SIC of  $m/z=232[M-C_9H_5N+H]^+$ ; (c) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=359[M+H]^+$  from the peak at 9.07 min (positive ion mode); (d) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=232[M-C_9H_5N+H]^+$  from the peak at 7.36 min (positive ion mode); (e) SICs of  $m/z=232[M-C_9H_5N+H]^+$  from the authentic compound (positive ion mode); (f) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=232[M-C_9H_5N+H]^+$  from the authentic compound at 7.40 min (positive ion mode).

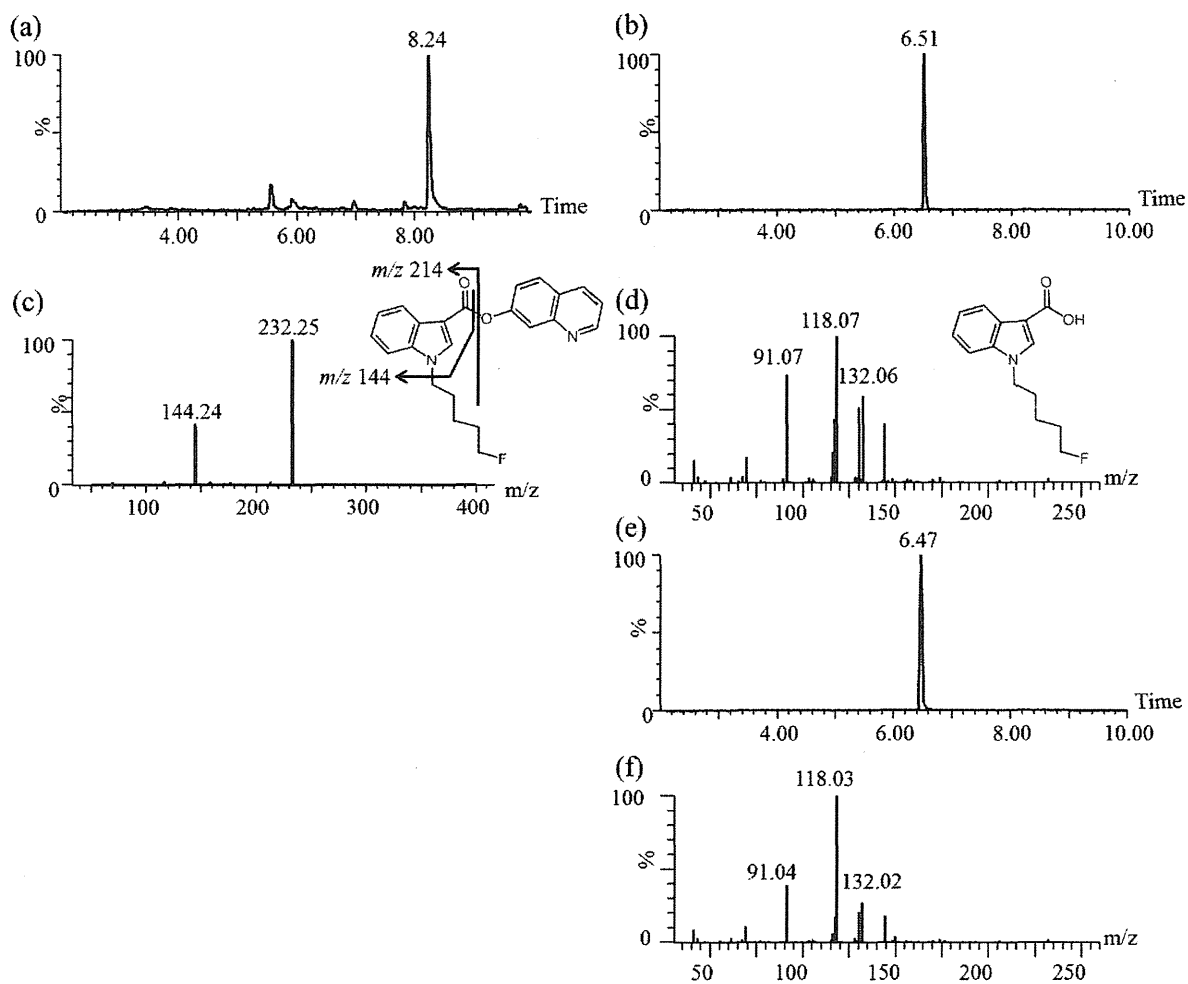


Fig. 6 LC/MS analysis of 5F-QUPIC (D) metabolites by liver microsomes

(a) SIC of  $m/z=377[M+H]^+$ ; (b) SIC of  $m/z=250[M-C_9H_5N+H]^+$ ; (c) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=377[M+H]^+$  from the peak at 8.24 min (positive ion mode); (d) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=250[M-C_9H_5N+H]^+$  from the peak at 6.51 min (positive ion mode); (e) SICs of  $m/z=250[M-C_9H_5N+H]^+$  from the authentic compound (positive ion mode); (f) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=250[M-C_9H_5N+H]^+$  from the authentic compound at 6.47 min (positive ion mode).

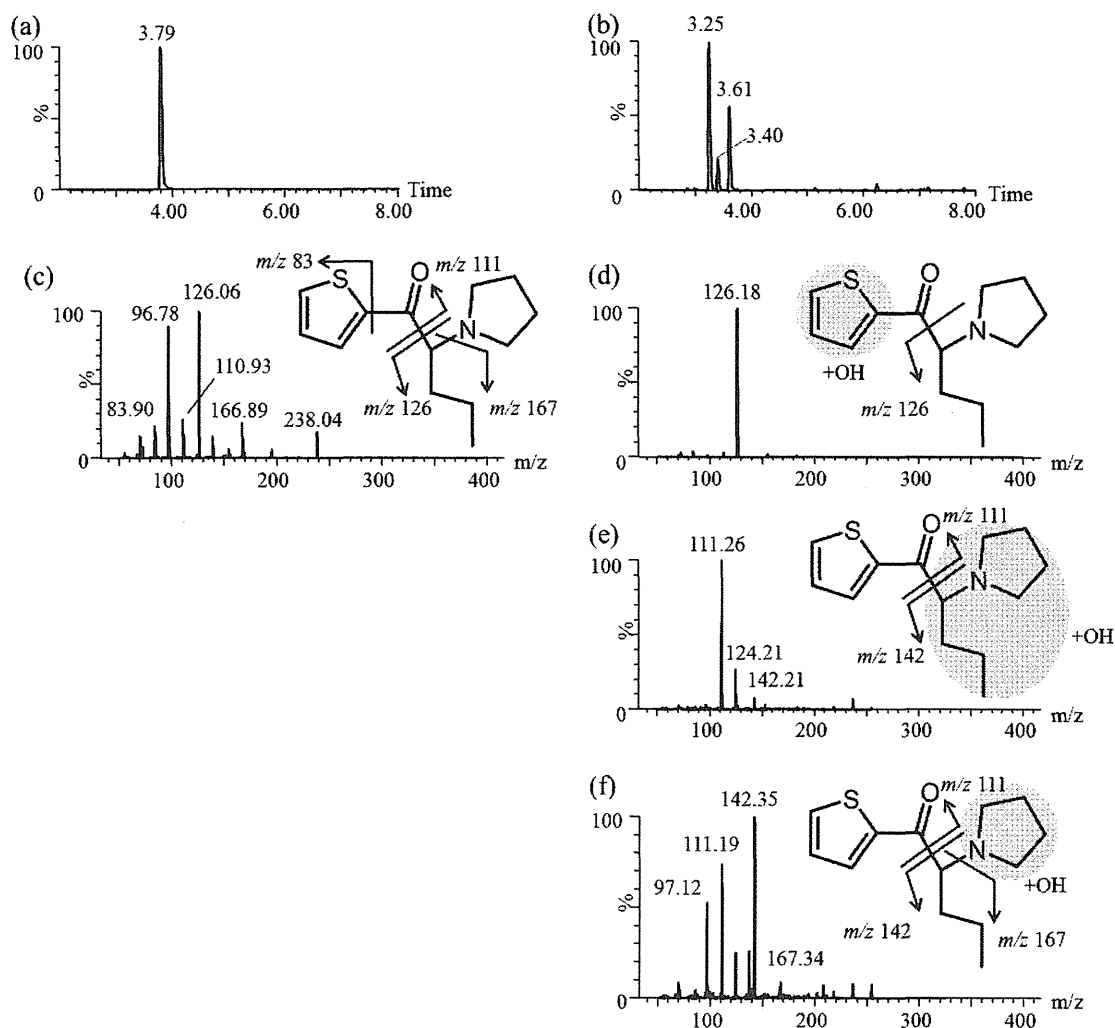


Fig. 7 LC/MS analysis of 5F-QUPIC (E) metabolites by liver microsomes

(a) SIC of  $m/z=377[M+H]^+$ ; (b) SIC of  $m/z=250[M-C_9H_5N+H]^+$ ; (c) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=377[M+H]^+$  from the peak at 8.24 min (positive ion mode); (d) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=250[M-C_9H_5N+H]^+$  from the peak at 6.51 min (positive ion mode); (e) SICs of  $m/z=250[M-C_9H_5N+H]^+$  from the authentic compound (positive ion mode); (f) Product ion scan MS spectrum of  $m/z=250[M-C_9H_5N+H]^+$  from the authentic compound at 6.47 min (positive ion mode).



分担研究課題:違法ドラッグ成分の危害影響予測手法に関する研究

分担研究者:栗原 正明 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 部長

### —違法ドラッグ成分の活性評価法の開発—

研究要旨:違法ドラッグを迅速に規制するためにはコンピュータを用いた活性予測が有効である。本研究ではコンピュータを用いた化学計算による活性予測法を開発する。本年度は、包括規制範囲外カチノン系化合物の活性を予測する目的で、2D-QSAR 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。そこで、違法ドラッグを速やかに規制するためには、違法ドラッグの迅速な評価法が必要である。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。本年度はインシリコ評価法(2D-QSAR(定量的活性相関)法)を用いて、カチノン系化合物に対する包括規制導入前後に新たに出現した活性未知の包括規制範囲外カチノン系化合物8種類(図1, 2)の活性予測を行った。

#### B. 研究方法

QSAR 式の構築には化学計算パッケージ MOE を使った。また、モデル構築のために活性既知類似化学物の活性値としては、ドパミン取り込み作用に対する 50%抑制濃度(IC50 値)を用いた。(表 1) QSAR(定量的活性相関)法は AutoQuaSAR 法を使って妥当な QSAR モデル式を構築し、表 2 に示した 8 つの化合物の活性予測を行った。QSAR モデル式で用いた記述子は、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 のすべての 2D 記述子から選択されたものである。QSAR 式は交差検定の  $R^2$ (相関係数の 2 乗)が最も良

いものを用いた。

#### C. 研究結果

構築した QSAR 式を図 3 に示した。QSAR 式によって求めた 8 つの化合物の活性予測値を表 2 に示した。

#### 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

ここで調べた 8 つの化合物はいずれも強い活性があることが予測された。特にピロリジニル基を有する化合物で強い活性が予測された。

#### F. 研究発表等

論文発表

特になし。

学会発表

特になし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

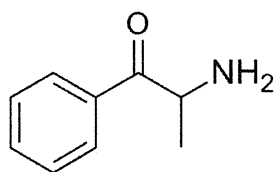


図1: カチノン (Cathinone)

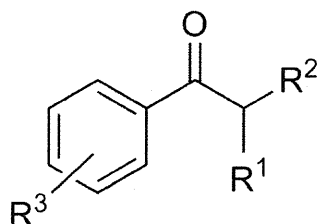
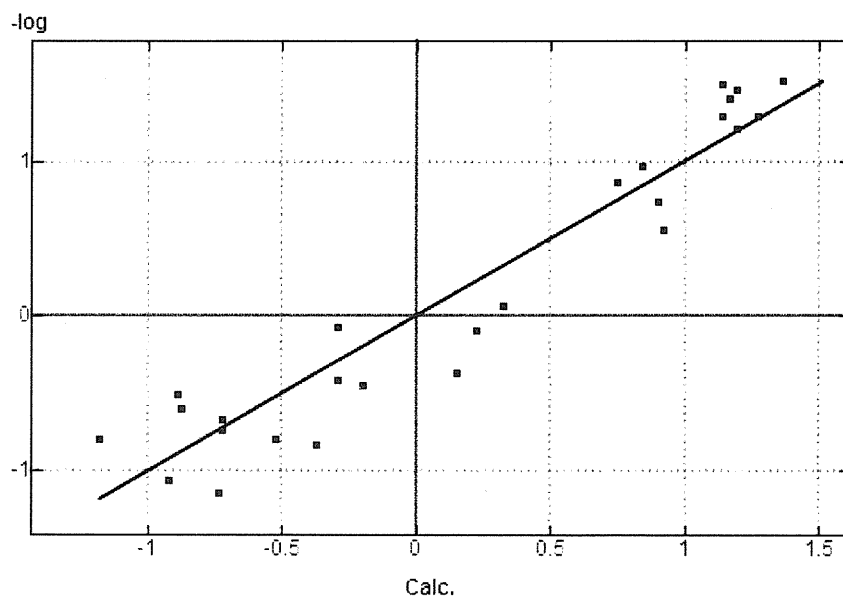


図2: カチノン系化合物

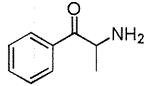
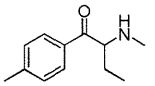
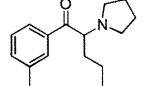
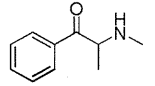
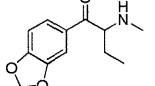
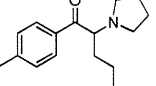
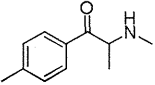
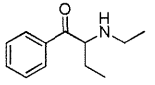
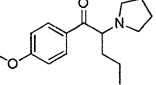
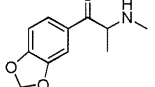
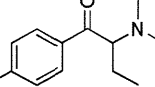
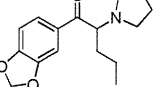
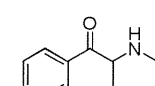
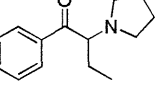
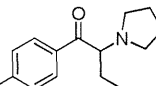
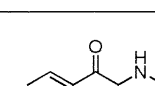
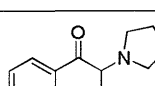
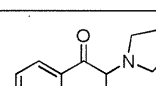
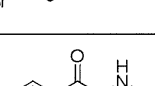
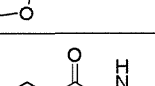
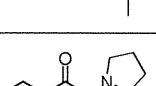
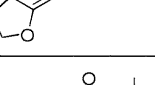
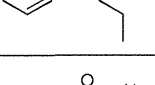
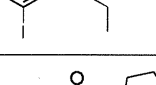
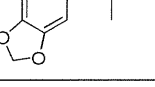
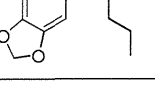


Model :	Const.	*	Desc.	
	- 0.913852			
	+ 0.029855	*	PEOE_VSA+3	Total positive 3 vdw surface area
	- 0.024522	*	S <sub>MR</sub> _VSA1	Bin 1 S <sub>MR</sub> (0.110,0.260]
	- 0.002292	*	S <sub>MR</sub> _VSA7	Bin 7 S <sub>MR</sub> (0.560,10]
	+ 0.027594	*	SlogP_VSA8	Bin 8 SlogP ( 0.30, 0.40]

$$R^2=0.890778, XR^2=0.832069$$

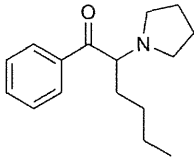
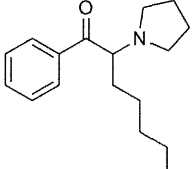
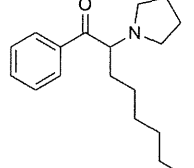
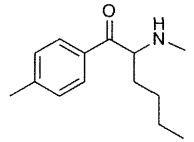
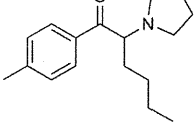
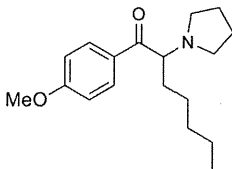
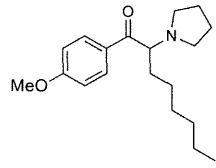
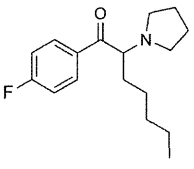
図3: QSAR 式

表 1 ドパミン取り込み阻害活性が既知の化合物とその活性 (IC<sub>50</sub> 値, μM)

	カチノン系化合物	DAT (μM)	10		2.70	20		0.063
1		14	11		6.92	21		0.063
2		1.12	12		2.90	22		0.035
3		3.31	13		1.21	23		0.283
4		4.82	14		6.36	24		0.031
5		6.35	15		0.138	25		0.185
6		11.7	16		0.110	26		0.040
7		5.68	17		1.27	27		0.052
8		4.04	18		0.874	28		0.032
9		2.40	19		0.052			

- 1) Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwylar J, Chaboz S, Hoener MC, Liechti ME; Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro; *Br J Pharmacol.* 2013, 168, 458-470.
- 2) Fleckenstein AE, Haughey HM, Metzger RR, Kokoshka JM, Riddle EL, Hanson JE, Gibb JW, Hanson GR.; Differential effects of psychostimulants and related agents on dopaminergic and serotonergic transporter function.; *Eur J Pharmacol.* 1999, 382, 45-49.
- 3) Meltzer PC, Butler D, Deschamps JR, Madras BK.; 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) analogues: a promising class of monoamine uptake inhibitors.; *J Med Chem.* 2006, 49, 1420-32.

表 2 カチノン系化合物の活性予測

	化合物	予測活性値 (μM)
1		0.01
2		0.005
3		0.001
4		0.18
5		0.02
6		0.01
7		0.003
8		0.01